

**Univerzita Karlova v Praze**  
**3. lékařská fakulta**

**Disertační práce**

Praha, 2021

**MUDr. Miroslava Chýlová**

**Univerzita Karlova**  
**3. lékařská fakulta**

## **Disertační práce**

**Možnosti agregometrie při antiagregační prevenci mozkových iktů**

*Vztah mezi sníženou agregací a prevencí rizika CMP*

Possibilities of aggregometry in antiplatelet prevention of strokes

*Relationship between reduced aggregation and stroke risk prevention*

**MUDr. Miroslava Chýlová**

**Školitel:**

**prof. MUDr. Pavel Kalvach, CSc., FEAN**

**Konzultant:**

**prof. MUDr. Ivana Štětkářová, CSc., MHA, FEAN**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1. 6. 2021

MUDr. Miroslava Chýlová

**Identifikační záznam:**

CHÝLOVÁ, Miroslava. *Možnosti agregometrie při antiagregační prevenci mozkových iktů. [Possibilities of aggregometry in antiplatelet prevention of strokes]*. Praha, 2021. Počet stran 125, počet příloh 2. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Neurologická klinika, 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, rok 2021, školitel prof. MUDr. Pavel Kalvach, CSc., FEAN, konzultant: prof. MUDr. Ivana Štětkářová, CSc., MHA, FEAN

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. Pavlu Kalvachovi, CSc., za zvolené téma disertační práce, odborné vedení, laskavý a lidský přístup a velmi podnětné diskuze v průběhu celého postgraduálního studia, dále za vedení při práci na odborných publikacích a této disertační práci.

Děkuji své školitelce konzultantce prof. Ivaně Štětkářové, Csc., přednostce Neurologické kliniky FNKV a 3. LF UK, za odborné vedení, zázemí, motivaci k publikační činnosti a za energii a optimismus v závěru studia.

Děkuji svému manželovi Petrovi za toleranci, podporu a poskytnutý čas na studium, práci a psaní textů. Dětem Tereze a Jakobovi děkuji za prostor a motivaci k dokončení práce.

Děkuji svým rodičům Marii a Václavovi Fauknerovým, za veškerou podporu během studia.

Dále děkuji kolegům Neurologické kliniky FNKV, jmenovitě prim. MUDr. Tomáši Peiskerovi, Ph.D., sestrám Veronice Klimešové, Lucii Fůrstové a všem, kteří se účastnili klinického výzkumu.

Děkuji RNDr. Aleně Fialové, Ph.D. za statistické zpracování výsledků.

Děkuji prof. Zuzaně Motřovské, Ph.D., za velmi podnětnou spolupráci a odborné vedení. Zároveň děkuji kolegům z Kardiologické kliniky FNKV, jmenovitě doc. Pavlu Osmančíkovi Ph.D. a sestře Haně Směšné a dále kolegům z Hematologické kliniky FNKV za spolupráci při laboratorním zpracování vzorků.

## 1. ABSTRAKT

Disertační práce nabízí přehled poznatků o krevních destičkách, principech agregace destiček, ovlivnění agregace antiagregačními a antikoagulačními léky, metodách měření agregace destiček a o aspirinové rezistenci. Účinek acetylsalicylové kyseliny (ASA) na snížení frekvence cévních příhod je odvozován nepřímo ze srovnání s jedinci užívajícími placebo a ne z výsledků agregometrických metod. Cílem práce bylo 1) ověřit agregaci destiček po podání různých dávek a forem podání ASA, 2) porovnat dvě různé metody měření agregace destiček a 3) zjistit, zda antikoagulační léčba u pacientů s ischemickou chorobou srdeční vyvolává současně změny v agregaci destiček.

**Metodika.** **Studie 1** se zúčastnilo 22 zdravých dobrovolníků a 30 pacientů po ischemickém iktu. Agregace byla měřena pomocí metody VerifyNow před a po podání ASA v různých dávkách a formách. **Studie 2** se zúčastnilo 30 pacientů s anamnézou ischemického iktu na terapii 100mg ASA denně. Porovnávali jsme výsledky získané metodou VerifyNow a klasickou optickou agregometrií (LTA) s různými induktory. **Studie 3** se týkala 24 pacientů s ischemickou chorobou srdeční na dlouhodobé antikoagulační terapii warfarinem. Pomocí metody VerifyNow a klasické optické agregometrie jsme zjišťovali, zda byla při antikoagulační léčbě ovlivněna též agregace a zda jsem schopni tuto změnu zaznamenat.

**Výsledky.** 1) U zdravých dobrovolníků redukovalo perorální podání 500 mg ASA agregaci na [průměr (SD)] 392 (36) ARU (aspirin reakčních jednotek) ( $p < 0.001$ ), 500 mg intravenózně na 428 (46) ( $p < 0.001$ ) and 100 mg perorálně na 460 (76) ( $p < 0.001$ ). 2) Agregace naměřená pomocí LTA byla snížena při indukci arachidonovou kyselinou (AA) na 37 %, po kolagenu na 33 %, po epinefrinu na 32 %. Po indukci adenosin-difosfátem (ADP) a ristocetinem došlo k nevýznamné redukci na 68 a 78 %. Agregace měřená VerifyNow byla potlačena na 433 (54) ARU. 3) Warfarinizovaní pacienti měli koagulaci sniženou na průměrné INR 2,07 (SD 0,6). Agregace měřená VerifyNow nebyla významně snížena, průměr činil 637,5 (SD 36,6) ARU. U agregace stanovené pomocí LTA taktéž nebyl zaznamenán významný pokles.

**Závěry.** Všechny dávky ASA signifikantně redukují agregaci destiček. Nebyla zjištěna výhoda intravenózního vůči perorálnímu podání ASA. Při testování účinku ASA na agregaci destiček jsme pozorovali dobrou korelaci mezi některými použitými agonisty, jednalo se o kolagen, AA a epinefrin. Kombinace metod a agonistů vede ke spolehlivějším výsledkům, ovšem s vyšší finanční náročností. Zvolenými metodami a agonisty jsme nebyli schopni detekovat signifikantní snížení agregace u pacientů na chronické antikoagulační terapii warfarinem.

## **Klíčová slova:**

trombocyty, hemostáza, agregace destiček, hemokolagulace, antiagregační léčba, acetylsalicylová kyselina, aspirin, warfarin, metody měření agregace, agregometrie, VerifyNow, optická agregometrie, aspirinová rezistence, zvýšená destičková reaktivita, závislost na dávce, podání léků, cévní mozková příhoda, kardiovaskulární onemocnění, individualizovaná léčba

## **ABSTRACT**

**Background.** This dissertation offers an overview of knowledge about platelets, the principle of platelet aggregation, its reduction by antiplatelet drugs and anticoagulation, methods of measuring platelet aggregation and views on resistance to acetylsalicylic acid.

The effectiveness of ASA (acetylsalicylic acid) in prevention of vascular events is usually derived indirectly from comparison of individuals taking placebo and not from the results of aggregometric methods. The purpose of our work was 1) to assess the effect of different doses and different routes of ASA administration on platelet aggregation, 2) to compare results of two different aggregometry methods and 3) to assess the effect of anticoagulation treatment on platelet aggregation in patients with chronic ischemic heart disease. **Methods.** The first study group consisted of 22 healthy individuals and 30 patients with documented ischemic stroke. Platelet aggregation was measured before ASA application and then after different doses and different routes of ASA administration. **In the second study** the group consisted of 30 patients with documented ischemic stroke who were taking orally 100mg ASA daily. We compared platelet aggregation measured by VerifyNow and by light transmission aggregometry (LTA) using different agonists. **In the third study** the group consisted of 24 patients with chronic ischemic heart disease on long-term warfarin therapy. Using VerifyNow and LTA we were interested in the influence of anticoagulation on the aggregation itself.

**Results.** 1) In healthy individuals, the dose of 500 mg ASA orally reduced the aggregability in average to (SD) 392 (36) ARU (aspirin reaction unit) ( $p < 0.001$ ), 500 mg intravenously to 428 (46) ( $p < 0.001$ ) and 100 mg orally to 460 (76) ( $p < 0.001$ ). 2) The average aggregability in LTA with arachidonic acid (AA) was reduced to 37 % of normal values, using collagen and epinephrine to 33 % and 32 % respectively. ADP and ristocetin achieved only an insignificant reduction to 68 % and 78 % respectively. Aggregation measured by VerifyNow was suppressed to a mean (SD): 433 (54) 3) The anticoagulated patients had their mean INR value 2,07 (SD 0,6). Their aggregation measured by VerifyNow was not suppressed significantly; it

was found in average on 637,5 (SD 36,6) ARU. The average aggregability by LTA was found insignificant as well. **Conclusions.** All doses of ASA, whether solitary or repeated, have produced a significant reduction of platelet aggregation. Preference of the parenteral to oral application route has not been established. For testing ASA effects on platelets three inducers act in good mutual correlation: AA, collagen and epinephrine. The combination of methods and agonists achieves higher reliability, however at a higher financial cost. The expected suppression of aggregability in persons on anticoagulation was not registered.

**Key words :**

platelets, hemostasis, platelet aggregation, hemocogulation, antiplatelet therapy, acetylsalicylic acid, aspirin, warfarin, platelet function tests, aggregometry, VerifyNow, optical aggregometry, light transmission aggregometry, aspirin resistance, high platelet reactivity, dose-response relationship, drug administration, stroke, cardiovascular disease, precision medicine

## **SEZNAM ZKRATEK**

AA – arachidonová kyselina

ADP – adenosin-difosfát

ANOVA – analýza rozptylu

AR – aspirinová rezistence

ARCTIC - The Assessment by a Double Randomization of a Conventional Antiplatelet Strategy for Drug-Eluting Stent Implantation and of Treatment Interruption vs. Continuation 1 Year after Stenting

ARR – absolutní roční redukce rizika

ARU – aspirin reakční jednotka

ASA – acetylsalicylová kyselina

ASPECT – aspirin induced platelet effect study

ATT' - Antitrombotic Trialists

AUC – area under curve, oblast pod křivkou

cAMP - cyklický adenosin-monofosfát

CADP – kolagen a ADP

CD – diferenční skupina

CEPI - kolagen a epinefrin

CMP – cévní mozková příhoda

COX - cyklooxygenáza

CXC - chemokin

CURE - Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events

CT – closure time

DNA – nukleová kyselina

EDRF – endothelium derived relaxing factor

EDTA – ethylendiaminetetraoctová kyselina

FS - fibrilace síní

GCP - good clinical practice

GIT – gastrointestinální trakt

GP – glykoprotein

GRAVITAS - Gauging Responsiveness with a VerifyNow Assay-Impact on Thrombosis And Safety

HMWK – high molecular weight kininogen

HPR – vysoká reaktivita na léčbě

IM – infarkt myokardu

INR – international normalized ratio

iso – TRAP – peptid aktivující trombinový receptor

LTA – Light transmission aggregometry – klasická optická agregometrie

MEA- Multiple Electrode Aggregometry

NIHSS – National Institutes Health Stroke Scale

NNT – number need to treat

NO – oxid dusnatý

NOAC – nová perorální antikoagulancia

NS - nesignifikantní

NSA, NSAIDs – nesteroidní antirevmatika

PA - aktivátor plasminogenu

PAF – platelet activating factor

PAR – proteasou aktivované receptory

PAU – platelet activation unit

PDGF – platelet- derived growth factor

PG – prostaglandin

PPP – plasma chudá na destičky

PRP – plasma bohatá na destičky

RNA – ribonukleová kyselina

ROTEM – rotační trombelastografie

RPFA – Rapid Platelet – Function Assay

RR - relativní riziko

SD – směrodatná odchylka

SNPs - single nucleotide polymorphisms

TEG - trombelastografie

TIA – transitorní ischemická ataka

tPA – tkáňový aktivátor plasminogenu

TRAP – peptid aktivující trombinový receptor

TOPIC - Timing of Platelet Inhibition after Acute Coronary Syndrome

TRIGGER - The Testing Platelet Reactivity in Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy with Prasugrel

TROPICAL- ACS - The randomized trial Testing Responsiveness to Platelet Inhibition on Chronic Antiplatelet Treatment for Acute Coronary Syndromes

TX - tromboxan

uPA – aktivátor plasminogenu urokinázového typu

VASP – phosphorylation of vasodilator stimulated phospho-protein

VN - Verify Now

vWF – von Willebrandův faktor

WBA- Impedance Whole Blood Aggregometry

## OBSAH

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Úvod.....</b>                                                          | <b>14</b> |
| 1.1 Trombocyty.....                                                          | 14        |
| 1.2 Hemostáza.....                                                           | 18        |
| 1.3 Hemokoagulace .....                                                      | 25        |
| 1.4 Fibrinolýza.....                                                         | 30        |
| 1.5 Léky ovlivňující agregaci destiček.....                                  | 31        |
| 1.6 Antitrombotický efekt aspirinu a závislost na dávce.....                 | 46        |
| 1.7 Warfarin a nové orální antikoagulační léky.....                          | 48        |
| 1.8 Metody měření agregace.....                                              | 49        |
| 1.9 Aspirinová rezistence.....                                               | 64        |
| 1.10 Současná doporučení antiagregační léčby pro prevenci a terapii CMP..... | 72        |
| <b>2. Hypotézy a cíle práce.....</b>                                         | <b>75</b> |
| <b>3. Materiál a metodika.....</b>                                           | <b>78</b> |
| 3.1 Studie 1.....                                                            | 78        |
| 3.2 Studie 2.....                                                            | 80        |
| 3.3 Studie 3.....                                                            | 81        |
| 3.4 Odběry krve a nakládání se vzorky.....                                   | 82        |
| 3.5 Měření agregace destiček.....                                            | 83        |
| 3.6 Statistická analýza.....                                                 | 85        |
| <b>4. Výsledky.....</b>                                                      | <b>86</b> |
| 4.1 Studie 1.....                                                            | 86        |
| 4.2 Studie 2.....                                                            | 90        |
| 4.3 Studie 3.....                                                            | 94        |
| <b>5. Diskuse.....</b>                                                       | <b>98</b> |

|            |                                                                                                               |            |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.1        | Studie 1.....                                                                                                 | 98         |
| 5.2        | Studie 2.....                                                                                                 | 101        |
| 5.3        | Studie 3.....                                                                                                 | 103        |
| 5.4        | Testy destičkových funkcí ve velkých klinických studiích.....                                                 | 106        |
| <b>6.</b>  | <b>Závěr.....</b>                                                                                             | <b>108</b> |
| 6.1        | Zhodnocení cílů a hypotéz.....                                                                                | 108        |
| 6.2        | Výhledy do budoucna.....                                                                                      | 110        |
| <b>7.</b>  | <b>Souhrn .....</b>                                                                                           | <b>111</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Summary.....</b>                                                                                           | <b>113</b> |
| <b>9.</b>  | <b>Seznam použité literatury.....</b>                                                                         | <b>116</b> |
| <b>10.</b> | <b>Příloha I: Seznam publikované literatury.....</b>                                                          | <b>126</b> |
| 10.1.      | Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace .....                                                    | 126        |
| 10.1.1     | Odborné články v časopisech s IF.....                                                                         | 126        |
| 10.1.2     | Odborné články bez IF.....                                                                                    | 126        |
| 10.2.      | Publikace in extenso, které nejsou podkladem disertační práce, ale vztahují se k tématu disertační práce..... | 126        |
| 10.2.1     | Odborné články s IF.....                                                                                      | 126        |
| 10.2.2     | Přehledové články.....                                                                                        | 127        |
| 10.2.3     | Kapitoly v odborných monografiích.....                                                                        | 127        |
| 10.3.      | Publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace.....                                                       | 128        |
| 10.3.1     | Odborné články bez IF.....                                                                                    | 128        |
| 10.4       | Přednášky.....                                                                                                | 128        |

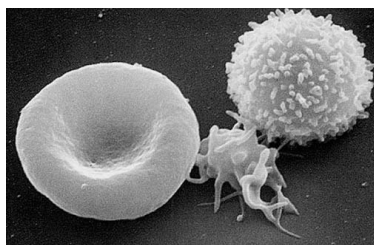
|                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 10.5 Postery.....                                                                 | 129        |
| <b>11. Příloha II: Tisky prací, souvisejících s tématem disertační práce.....</b> | <b>131</b> |

## 1. ÚVOD

### 1.1 TROMBOCYTY

#### Základní poznatky

Krevní destičky neboli trombocyty jsou nejmenší elementy krve. Poprvé je pozoroval a popsal Bizzozero kolem roku 1800, kdy je identifikoval jako korpuskule lidské krve a pozoroval pod mikroskopem, jak formují trombus při poškození cévní stěny (Harrison P., 2005). Destičky jsou bezjaderné, bezbarvé a mají tvar hladkých nepravidelně okrouhlých disků o průměru 2-4  $\mu\text{m}$  a tloušťce 0,5–1  $\mu\text{m}$ . Jejich objem (okolo 4-8 fl) a je několikanásobně menší, než objem erytrocytů (Obr. 1).



**Obr. 1. Základní krevní buňky na snímku elektronového mikroskopu.** Červená krvinka leží úplně vlevo, uprostřed krevní destička a vpravo bílá krvinka. (foto National Cancer Institute ve Fredericku, USA, veřejná doména, převzato z [www.akademon.cz](http://www.akademon.cz))

Počet destiček činí  $150-400 \cdot 10^9 / \text{l}$  krve, tedy druhá nejpočetnější korpuskule v krvi (Trávníčková E., 1996, Montague SJ et al., 2020). Počet je stejný u novorozenců, dětí i

dospělých. Asi 2/3 destiček je v cirkulaci a 1/3 ve slezině. Destičky ve slezině se volně směňují s cirkulujícími.

Doba života destiček v krevním oběhu je 7-12 dní. Jejich tvorba je v rovnováze s jejich zánikem a kolísání jejich počtu je malé. Fyziologické výkyvy nastávají u žen v průběhu menstruačního cyklu. Při namáhavé tělesné práci dochází k vyplavování destiček do oběhu (především z plic) a například podání adrenalinu vyvolá rychlou mobilizaci destiček ze sleziny.

### **Složení destiček**

Destičky, které nemají jádro (tedy žádnou DNA), obsahují RNA ribosomy, mitochondrie, skladovací organely a granula. Mají jen nepatrnou nebo žádnou schopnost proteosyntézy. Přesto mají mnoho funkcí, podobně jako kompletní buňky. Jejich metabolismus probíhá se značnou intenzitou a mají v cytoplazmě i v organelách bohaté enzymatické vybavení. Hlavním zdrojem energie v destičkách je glukóza, která je rychle získávána z plazmy.

Tvar cirkulujících destiček je udržován marginálními mikrotubuly, které přiléhají těsně k vnitřnímu povrchu membrány a plní úlohu buněčného skeletu. V cytoplazmě destiček se rozvětjuje bohatý systém navzájem spojených kanálků a vezikul. Tento spongiózní systém, tzv. denzní tubulární systém, komunikuje s povrchem destičky a je významný pro jejich sekreční funkci (např. je nositelem enzymů pro syntézu derivátů arachidonové kyseliny a je jedním ze zdrojů kalcia).

Velmi důležitou látkou jsou fosfolipidy (neboli destičkový faktor 3), obsažené v povrchové membráně destiček. Tyto prokoagulační fosfolipidy mají negativní náboj a tvoří povrch aktivovaných destiček; zde slouží jako katalytický podklad, na němž se váží a spolu reagují některé enzymy koagulačního systému.

Dále destičky obsahují kontraktilní bílkoviny aktin a myozin. Ty se uplatňují při změně tvaru aktivovaných destiček a při uvolňování obsahu granul.

### **Destičková granula**

Destičky obsahují tři typy granul, která jsou zdrojem pestré směsi látek významných pro funkce destiček a další děje. První typ představují okrouhlá menší denzní skladovací granula; obsahují adenosindifosfát, adenosintrifosfát, glutamát, kalcium, serotonin a histamin. Druhým typem jsou početnější, světlejší, oválná  $\alpha$ -granula, která obsahují směs proteinů. Sem patří destičkový faktor 4, který je antagonistou heparinu, a dále velmi účinný růstový faktor (PDGF- platelet-derived growth factor), který má mitogenní účinek na buňky hladké svaloviny cévních stěn a na fibroblasty a urychluje tak hojení poranění. Další látky  $\alpha$ -granul jsou fibrinogen, von Willebrandův faktor (vWF), faktor V (proakcelerin), faktor XIII, chemokiny a cytokiny. Za třetí typ destičkových granul můžeme označit lyzosomy, tzv. lambda granula. Jsou bohaté na enzymy štěpící bílkoviny a sacharidové komplexy (glykohydrolázy) (Trávníčková E., 1996, Montague SJ et al., 2020).

### **Tvorba a zánik destiček**

Destičky vznikají z buněk kostní dřeně - megakaryocytů. Jsou to velké (35-160 $\mu$ m) buňky, které pocházejí z pluripotentní kmenové buňky. Zralý megakaryocyt má polyploidní mnoholaločnaté jádro a velké množství cytoplazmy. Cytoplazma se postupně demarkuje v destičkové subjednotky, které se fragmentací megakaryocytů uvolňují. Zralé megakaryocyty jsou schopné měnit tvar; přisadají na zevní povrch sinusů kostní dřeně a vysouvají do jejich lumen výběžky, jejichž odlamováním vznikají destičky ihned unášené krevním proudem. Z jednoho megakaryocytu může vzniknout 1000-5000 destiček. Dřeňová produkce destiček se přizpůsobuje požadavkům na počet cirkulujících trombocytů. Regulující humorální faktory

jsou některé cytokiny a trombopoetin. Trombopoetin se tvoří, podobně jako erytropoetin, v ledvinách.

Destičky jsou selektivně odstraňovány v játrech a slezině nebo použity v rámci hemostázy (Trávníčková E., 1996, Montague SJ et al., 2020).

### **Funkce destiček**

Nejdůležitější funkcí destiček je jejich nezbytná úloha v ochraně organismu před ztrátou krve. Jedná se o komplexní systém, který funguje při procesu zástavy krvácení jak mechanicky, tak látkově (Trávníčková E., 1996).

Destičky se účastní důležitých biologických procesů, jako je hemostáza, trombóza, zánětlivé procesy včetně vzniku aterosklerózy, podílí se na imunitních reakcích, hojení ran a mají svou roli i v nádorovém růstu a metastázování nádorů.

Tzv. imunotrombosa je proces, při kterém destičky a imunitní buňky tvoří bariéru bránící diseminaci patogenu a vedoucí k aktivaci imunitního systému. Destičky tak zprostředkují komunikaci mezi hemostatickým a imunitním systémem. Mnohé virové a bakteriální infekce mohou zvyšovat riziko trombózy a mohou přispívat ke vzniku aterosklerózy. Imunotrombosa tak může přispívat, ke zvýšenému cévnímu riziku (Montague SJ et al., 2020).

### **Zobrazení destiček**

Zobrazení destiček je vzhledem k jejich velikosti a rychlosti aktivace v řádech milisekund problematické. Navíc je zde zřetelné ovlivnění krevním tokem a jeho parametry a pohybem destiček samotných. Aplikace moderních zobrazovacích metod již však umožňuje zobrazit destičkovou adhezi, aktivaci destiček a formaci trombu. In vitro nebo in vivo jsou používány pokročilé světelné mikroskopické systémy s fázovým kontrastem a fluorescenčními schopnostmi, konfokální mikroskop s jedno- i vícefotonovou laserovou excitací, elektronový

mikroskop a další pokročilé a speciální zobrazovací systémy (mikrofluidy, zobrazovací cytometrie, multimodální systémy, fluorescenční značení speciálních destičkových proteinů nebo receptorů aj.) (Montague SJ et al., 2020).

## **1.2 HEMOSTÁZA**

### **Fáze hemostázy**

Hemostáza neboli zástava krvácení je životně důležitý děj, který chrání organismus před ztrátou krve díky spontánní zástavě krvácení z poškozené cévy.

Rozlišujeme tři základní fáze:

- 1) v první fázi dochází k reakci cév v místě poranění (vazokonstrikci)
- 2) druhou fázi představuje činnost krevních destiček (jejich nahromadění v místě poranění a změny, které vedou k vytvoření hemostatické zátky)
- 3) třetí fáze je samotné srážení krve, tedy interakce plazmatických faktorů končící vytvořením fibrinu a definitivního trombu.

Později je trombus odstraněn fibrinolýzou. Aktivitou fibroblastů a hladkých svalových buněk se poranění zhojí.

Stupeň uplatnění jednotlivých složek závisí na druhu, místě a rozsahu poranění. Drobné trhliny kapilární stěny a případně malých venul, ke kterým dochází průběžně prakticky ve všech tkáních, jsou ucpávány především destičkami. Ve středních a zejména malých cévách vedou hemostatické děje k zástavě krvácení a následně ke zhojení poraněné tkáně. Při zasažení velké tepny, kde je krev pod značným tlakem, již přirozené mechanismy nestačí.

## **1) reakce cév**

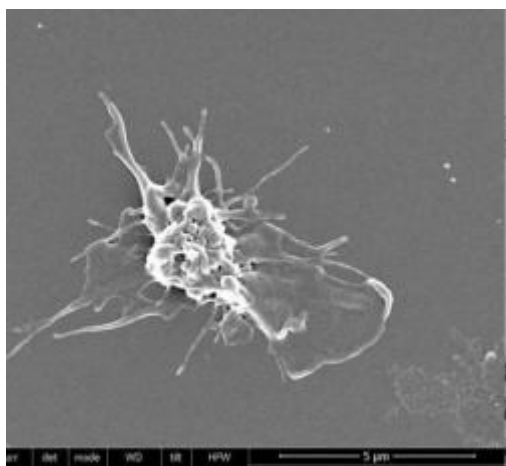
Reakce cév v místě poranění spočívá ve velmi rychlé a přechodné vazokonstrikci, na jejímž vyvolání se podílí více faktorů. Rychlá konstrikce poraněné cévy má charakter přímé odpovědi cévní stěny na poškození. Reakce sousedních cév je patrně výsledkem vazokonstrikčních reflexů. Význam mají i vazokonstrikčně působící látky uvolňující se při ostatních hemostatických dějích. Je to především derivát kyseliny arachidonové tromboxan  $A_2$  ( $TXA_2$ ), který tvoří aktivované destičky, a dále serotonin z denzních granúl destiček. Lokální rovnováhu udržuje vazodilatační  $PGI_2$  produkovaný endoteliálními buňkami. Největší podíl na vazokonstrikci však má přímá myogenní reakce cév na poranění (Trávníčková E., 1996, Martínková J., 2008).

## **2) činnost krevních destiček**

Primárním dějem při poranění nebo poškození cévní stěny je činnost krevních destiček, ta spočívá v jejich adhezi, změně tvaru, agregaci a uvolňovací reakci (sekreci obsahu granúl) (Trávníčková E., 1996); uvolňovány jsou agonisté, nebol-li induktory agregace  $TXA_2$  a ADP. Agonisté aktivují selektivní receptory na povrchu destiček a napomáhají expresi receptorů GP IIb/IIIa. Exprimované receptory váží fibrinogen, který je trombinem aktivován na fibrin za vzniku pevných spojů mezi destičkami (Martínková J., 2008). Činností destiček vznikne destičkový (bílý) trombus neboli provizorní hemostatická zátka, která ucpává drobné trhliny především v mikrocirkulaci, tj. v kapilárách a malých venulách.

Při porušení kontinuity cévní stěny se obnaží subendotelové pojivo (Trávníčková E., 1996). Tyto subendoteliální vrstvy kolagenu obsahují acidické fosfolipidy. Fosfolipidy aktivují destičky prostřednictvím specifických GP receptorů GP1a, GP1b za účasti von Willebrandova faktoru produkovaného endoteliálními buňkami a faktoru V produkovaného destičkami (Martínková J., 2008). Destičky v průběhu několika zlomků vteřiny přilnou k cévní stěně a adherují. Tato adheze je tedy zprostředkována dvěma specifickými makromolekulárními

proteiny: kolagenem, jehož vláknité struktury jsou hlavní složkou subendotelu, a který silně stimuluje destičky, a von Willebrandovým faktorem, který je secernován do plazmy i do subendotelového pojiva, k němuž poté poutá destičky (Trávníčková E., 1996). Dle míry tzv. shear stressu (neboli smykového napětí, což je síla, která uvádí do pohybu pomalejší vrstvu, vrstvou rychlejší) je při vysokém smykovém napětí aktivována cesta GP1b, při malém dominuje cesta GP1a (Montague SJ et al., 2020). Destičky se adhezí aktivují a začnou rychle prodělávat změny tvaru. Činností kontraktilních bílkovin a cytoskeletu se stávají kulovitými a vysílají dlouhé tenké výběžky – filopodie (Obr. 2).



**Obr. 2. Aktivovaná krevní destička s typickými výběžky. Snímek byl pořízen rastrovacím elektronovým mikroskopem.**

Nově jsou popisovány i tzv. „super-aktivované“ destičky, ty se naopak zakulacují a nafukují a podílejí se na urychlování reakcí v kaskádách vedoucích k tvorbě sraženiny (Obydennyy et al., 2016).

### **3) vlastní srážení destiček**

Vlivem dalšího mocného aktivátoru destiček – trombinu, který se v menším množství rychle vytvořil srážením krve v místě poranění, a účinkem dalších stimulujících látek, se destičky začnou shlukovat a zachycují se k sobě navzájem, tj. probíhá jejich agregace. Mediátorem agregace je fibrinogen, pro nějž exponují na svém povrchu aktivované destičky receptory a jehož dimerické molekuly destičky spojují. Současně se z destičkové membrány uvolňuje kyselina arachidonová a je metabolizována na endoperoxidy a  $\text{TXA}_2$ . Tyto extrémně labilní látky mají agregační účinky a podporují růst již značného shluku destiček. Adheze, změna tvaru a dosavadní tzv. primární agregace jsou reverzibilní. Destičky se ještě mohou uvolnit a odplynout krví. Sekundární agregace je ireverzibilní a je spojena s tzv. uvolňovací reakcí, při níž destičky secernují obsah svých granul. Kromě jiných látek (destičkový faktor 4, serotonin, PDGF) se secernuje i nejznámější agregačně působící substance – adenosindifosfát (ADP). Destičky tak mají vlastní účinný amplifikační mechanismus pro rychlé vytvoření velkých agregátů: dvě pozitivní zpětnovazebné smyčky v podobě uvolňování endoperoxidů a  $\text{TXA}_2$  a ADP secernovaného z granul. Nakonec se destičky úplně rozpadají a splynou (tzv. viskózní metamorfóza) (Obr. 3).

K aktivátorům destiček patří ještě adrenalin, vazopresin a faktor aktivující destičky (PAF – platelet activating factor). PAF je jeden z nejmocnějších známých stimulátorů destiček. Je uvolňován při infekčních a zánětlivých procesech z aktivovaných neutrofilních granulocytů, bazofilů a makrofágů, pochází i z endotelu a destiček samotných (Trávníčková E., 1996).



Ve finálním konglomerátu jsou destičky rozpadlé viskózní metamorfózou do splývajícího koagula (Trávníčková E., 1996, Mehta JL, Mohandas B, 2010).

### **Reverzibilita a regulace agregace destiček**

Reverzibilní destičkové odpovědi mají vztah k průběžné fyziologické úloze destiček: uzavírání stále se tvořících skulin v cévním endotelu primárními agregáty a zacelování malých defektů v subendotelu vlivem růstového faktoru (PDGF) z  $\alpha$ -granul. Ireverzibilní agregace je pak základem hemostatické funkce destiček. Provizorní zátka vzniká splynutím velkého množství tvarově změněných destiček a „zakotvená“ v místě trhliny cévní stěny potřebuje ke své konsolidaci a stabilizaci ještě fibrinová vlákna, která se v ní zachycují a trombus se tak stane hustším a mechanicky odolným.

Destičkové odpovědi jsou děje s dvousměrnou regulací. Musí být řízeny tak, aby v intaktních cévách nedocházelo k adhezi a agregaci destiček. Interakci mezi destičkami a cévní stěnou zabraňují normální endotelové buňky tvorbou a uvolňováním inhibitorů. Patří sem látky typu prostaglandinů, nestálý prostacyklin  $\text{PGI}_2$  a oxid dusnatý (NO), nazývaný také EDRF (endothelium derived relaxing factor). Obě látky inhibují funkce destiček a mají současně vasodilatační účinky (Trávníčková E., 1996, Martínková J., 2008).

### **Typy trombů**

Pokud dojde, obvykle neplánovaně, k excesivní, nekontrolovatelné destičkové adhezi a agregaci a tím ke zvýšené tvorbě trombinu a fibrinu, vzniká trombus. Velké tromby mohou uzavřít cévu anebo se rozpadnou a jejich malé části doputují do menších cév, které ucpou, v obou případech pak dojde k CMP nebo srdečnímu infarktu. Arteriální trombóza je obvykle spuštěna rupturou na kolagen a tkáňový faktor bohatého plátu, který zužuje cévu a za relativně vysokého smykového napětí dojde k aktivaci vWf a aktivaci destiček. Žilní

trombóza se objevuje při velmi nízkém až nulovém smykovém napětí za účasti zánětlivých buněk a cévní stěny (Trávníčková E., 1996).

### **Novinky v hemostáze**

Současné in vivo studie poskytují více komplexní pohled na hemostázu a trombózu. Hemostatická zátka má přesně danou architekturu, s odlišnou vnitřní a zevní vrstvou. Depozita fibrinu jsou vždy na bazi vnitřní - jádrové vrstvy v extravaskulárním prostoru, a to dokud není dosaženo kompletní hemostázy. Gradient aktivace destiček je patrný z P-selektin pozitivní jádrové vrstvy složené z aktivovaných degranulovaných destiček, zatímco vnější vrstva je složena z méně aktivovaných volněji uspořádaných P-selektin negativních destiček. Zevní vrstva je stabilní a propustná pro plasmu. Také agonisté jsou uspořádáni v patrném gradientu, v jádru trombu jsou vysoké koncentrace trombinu a zevní porózní vrstva obsahuje více ADP a TXA<sub>2</sub>.

Zevní porózní vrstva trombu umožňuje vazbu leukocytů nezbytných pro opravu poranění a eliminaci patogenů. V žilním nízkotlakém systému, hraje kromě aktivace destiček a formace trombu hlavní roli v atrakci leukocytů trombin. Aktivace destičkového trombinového receptoru PAR4 je zodpovědná za atrakci a migraci leukocytů a destičkový P-selektin umožňuje interakci leukocytů s trombem. Trombin vede ke vzniku fibrinu, který mechanicky brání migraci leukocytů. Konečně destičkový GP1b naváže trombin a omezí tak přesun leukocytů do trombu.

Za podmínek nízkého smykového napětí v žilách nebo i arteriích (např. při reperfuzi ischemie) vede adheze destiček k formaci CXCL7 chemotaktickému gradientu v těle trombu. To umožňuje intravaskulární migraci leukocytů přes trombus do místa poranění prostřednictvím CXCR1/2 receptorů. Mechanismy ukazují na schopnost destiček přilákat leukocyty a umožnit tak jejich kontakt s potencionálními patogeny (Montague SJ et al., 2020).

## 1.3 HEMOKOAGULACE

### Definice a historie

Srážení krve (hemokoagulace) je soubor enzymatických reakcí, jichž se zúčastňuje řada plazmatických proteinů, fosfolipidy a ionty a jejich výsledkem je přeměna tekuté krve v nerozpustný gel.

První ucelenou představu o srážení krve vytvořil již začátkem našeho století Morawitz. V jeho schématu však vystupují pouze čtyři faktory: účinkem trombokinázy z rozpadlých krevních destiček se za přítomnosti vápenatých iontů mění protrombin na účinný enzym trombin, který pak transformuje fibrinogen na nerozpustný vláknitý fibrin. Později byla objevena řada dalších koagulačních faktorů. Bylo sjednoceno jejich názvosloví a většina jich byla označena římskými číslicemi. U aktivovaných faktorů se připojuje k číslici malé a (Trávníčková E., 1996). Čísla reprezentují pořadí, v jakém byly faktory objeveny. Jednotlivé komponenty (faktory) jsou přítomny v krvi jako inaktivní prekurzory proteolytických enzymů a kofaktorů. Jsou aktivovány proteolýzou (Martínková J., 2008).

### Přehled koagulačních faktorů a jejich funkcí

Znamé koagulační faktory jsou: faktor I neboli fibrinogen, faktor II tedy protrombin, faktor III neboli tkáňový tromboplastin či tkáňový faktor (je přítomen v membráně pericytů, fibroblastů a jiných buněk přicházející do styku s krví uvolněnou z poraněné cévy). Faktor IV jsou v podstatě vápenaté ionty  $\text{Ca}^{2+}$ . Faktor V je známý též jako proakcelerin a je regulačním proteinem (kofaktorem) v komplexu aktivátoru protrombinu. Faktor VII tedy prokonvertin aktivuje v komplexu zevního systému faktor X. Faktor VIII neboli antihemofilický faktor, se uplatňuje jako kofaktor ve vnitřním systému koagulační kaskády a cirkuluje v plazmě ve vazbě s von Willebrandovým faktorem (vWF). Tento glykoprotein zprostředkovává vazbou na povrch aktivovaných destiček adhezi destiček na kolagen. Faktor IX tedy Christmasův

faktor působí společně v komplexu s faktorem VIIIa, X, destičkovým faktorem 3 a vápníkovými ionty a aktivují faktor X (Stuart Prowerové). Faktor XI se účastní v kontaktním systému. Faktor XII, tedy Hagemanův faktor, stojí na začátku vnitřního systému tzv. fáze kontaktu. Faktor XIII- fibrin stabilizující faktor podněcuje tvorbu kovalentních vazeb mezi molekulami fibrin-monomeru a tím vytvoření fibrinové sítě (Trávníčková E., 1996). Prekalikrein (- faktor Fletscherův) je součástí kontaktního systému, jako enzym podporuje další aktivaci faktorů XII a XI. HMWK- high molecular weight kininogen je kofaktorem ve fázi kontaktu na začátku vnitřního systému. Posledním známým faktorem je antikoagulačně působící faktor XIV neboli protein C spolu se svým kofaktorem proteinem S.

Všechny koagulační faktory kromě faktorů II a IV jsou glykoproteiny a patří mezi plazmatické globuliny. Tvoří se v játrech (vWF je syntetizován endotelovými buňkami a megakaryocyty) a tvorba faktorů II, VII, IX, X a XIV je závislá na vitamínu K.

Aktivní koagulační faktory mají většinou charakter proteolytických enzymů. Aktivace jednotlivých proenzymů na aktivní enzymy spočívá v jejich štěpení enzymem aktivovaným v předchozí reakci. Sled dějů vedoucích k vytvoření aktivátoru protrombinu tedy probíhá kaskádovitě. Společná pro všechny reakce (s výjimkou tzv. fáze kontaktu na začátku vnitřního systému) je nezbytná přítomnost vápenatých iontů (Trávníčková E., 1996).

### **Koagulační kaskáda**

Koagulační děje můžeme rozdělit do dvou systémů: vnitřního, jehož všechny faktory jsou obsaženy v krvi a proces může být odstartován in vitro, a zevního, jehož některé komponenty nejsou v krvi, je tedy dostupný in vivo a začíná uvolněním tkáňového tromboplastinu (Martínková J, 2008). Oba systémy konvergují při tvorbě faktoru Xa, a proto můžeme další sled reakcí, končící vytvořením fibrinu považovat za společný.

#### **1. Vnitřní systém**

Vnitřní systém se aktivuje kontaktem s negativně nabitým povrchem, tedy se strukturami obnaženými při poranění nebo poškození cévní stěny (kolagen, bazální membrána), ale i s fosfolipidy destiček. Fáze kontaktu spočívá v postupné komplexní interakci mezi tímto povrchem a čtyřmi proteiny: Hagemanovým faktorem, prekalikreinem, faktorem XI a HMW – kininogenem, cílem je aktivace faktoru IX za přítomnosti vápenatých iontů. Faktor IX a pak aktivuje faktor X v aktivačním komplexu, jehož členy jsou faktor IXa, VIIa, destičkové fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. K celému ději aktivace faktoru X v uvedeném komplexu může dojít nejen na povrchu destiček, ale i na buňkách cévního endotelu (Trávníčková E., 1996).

## **2. Zevní systém**

Zatímco aktivace faktoru X ve vnitřním systému zahrnuje celou řadu interakcí mezi více faktory a je relativně pomalá, je aktivace faktoru X účinkem zevního systému rychlá. Zevní systém je tvořen tkáňovým faktorem, faktorem VII a vápenatými ionty. Komplex aktivuje faktor IX a X (Trávníčková E., 1996).

Rovněž destičky přispívají ke koagulaci. Poskytují aktivní povrch svými membránovými fosfolipidy a přispívají i některými koagulačními faktory (faktor V a fibrinogen) (Martínková J., 2008).

## **3. Závěr koagulační kaskády**

Vnitřní a zevní systém konvergují do jednotného sledu dějů, který začíná aktivací faktoru X. Ten v komplexu s faktorem V, fosfolipidy a vápenatými ionty štěpí peptidické vazby protrombinu a přeměňuje jej na trombin.

Trombin je účinný proteolytický enzym a je klíčovým a koncovým enzymem celého koagulačního mechanismu. Štěpí fibrinogen na fibrin, kdy po odštěpení dvojice malých fibrinopeptidů A a B vzniká fibrin-monomer, který spontánně vzájemně polymeruje pomocí odkrytých nekovalentních vazeb. Tento fibrin-polymer se ještě může depolymerovat. Za

přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a vlivem trombinu se aktivuje faktor XIII, který fibrin polymer stabilizuje. Stabilizovaný fibrin je pevnější, elastičtější a odolnější vůči působení fibrinolytických činidel. Síť fibrinových vláken pak zpevňuje destičkový trombus a vytvoří definitivní hemostatickou zátku. Do prostorové fibrinové sítě se zachycují krvinky (Trávníčková E., 1996). Bílý trombus v podstatě zpomaluje průtok krve a tím vytváří podmínky pro tvorbu červeného trombu, sítě fibrinu, do níž jsou zachyceny erytrocyty; červený trombus se může tvořit také de novo, zejména v nízkotlakém venózním řečišti (Martínková J., 2008). Ukládání fibrinu v místě poranění přispívá k tkáňovým reparačním procesům.

Trombin kromě výše popsané enzymatické aktivity (přeměňuje fibrinogen na fibrin, aktivuje faktory VIII, V a XIII) účinkuje jako jediný koagulační faktor na krevní destičky a je jedním z jejich nejúčinnějších aktivátorů. V oběhu se rychle váže na vysoce afinitní místa cévního endotelu a v jeho buňkách indukuje sekreci biologicky aktivních látek: aktivátorů plazminogenu, PAF, hormonu endothelinu, a konečně prostacyklinu ( $\text{PGI}_2$ ) a tzv. EDRF. Dále vyvolává trombin proliferaci endotelových buněk a zvyšuje permeabilitu kapilár, a tím prostup makromolekul, což má význam při zánětu. V neposlední řadě působí na buňky v místě cévní ruptury a vyvolává proliferaci fibroblastů, osteoblastů a chemotaxi monocytů a přispívá tak k hojivým procesům (Trávníčková E., 1996).

### **Regulace koagulace**

Koagulační kaskáda je regulována soustavou chemických signálů, aby byla udržena tzv. fluido-koagulační rovnováha, tedy zachování tekuté krve v intaktních cévách a prevence jejích ztrát při zranění. Krevní sraženina musí zůstat omezena na místo poranění a srážení nesmí pokračovat ani v prostoru ani v čase, aby nedocházelo k trombóze nebo ke krvácení.

Inhibičně působí samotný proud krve, který omezuje propagaci sraženiny, ředí koagulační faktory a odplavuje je z místa poranění. Neporušený cévní endotel neumožňuje spuštění sledu dějů ani v zevním ani ve vnitřním systému. Nejdůležitější je ovšem inhibice humorální, která zahrnuje řadu negativních zpětných vazeb a specifické inhibitory. Smyslem protisrážlivých dějů je odstranění a inaktivace koagulačních faktorů především trombinu. Toto spočívá v jeho vazbě na destičky, endotelové a jiné buňky v místě poranění, v jeho inkorporaci do fibrinové sraženiny a v jeho inaktivaci plazmatickými inhibitory proteáz. Vazba trombinu na fibrin a jeho inkorporace do sraženiny je příkladem zpětné vazby, kdy konečný produkt celého procesu srážení tedy fibrin má silnou afinitu pro trombin a reverzibilně jej váže.

Nejúčinnější a nejspecifičtější inhibice srážení spočívá v působení plazmatických faktorů antitrombinu III a proteinu C. Antitrombin III je plazmatický glykoprotein syntetizovaný v játrech. Žírné buňky produkují glykosaminoglykan heparin, který tvoří komplex s antitrombinem III. Společně pak inhibují koagulační proteázy trombinu, faktoru IXa, Xa, XIa a XIIa a tvoří s nimi ireverzibilní komplexy. Účinky heparinu jsou neutralizovány destičkovým faktorem 4, proto je v okolí destičkové zátky inhibovaná aktivita antitrombinu III a srážení může lokálně probíhat. Významným přirozeným protisrážlivým faktorem je dále protein C spolu s kofaktorem proteinem S. Oba se vytvářejí v játrech a jsou závislé na vitaminu K. Aktivovaný protein C má v komplexu s proteinem S na endotelu, destičkách nebo jiných buňkách, antikoagulační účinky a proteolyticky inaktivuje neenzymatické faktory Va a VIIIa (Trávníčková E., 1996).

## 1.4 FIBRINOLÝZA

### Princip a regulace fibrinolýzy

Po určité době, když krevní sraženina splnila svou hemostatickou funkci, je fibrinová usazenina odstraněna enzymatickým štěpením fibrinu plazminem. Plazmin je extracelulární širokospektrální proteáza, která rozpouští fibrin na fibrinové degradační produkty, které jsou nakonec odstraněny z oběhu játry a buňkami mononukleárního fagocytárního systému.

Fibrinolytický systém má čtyři složky. Neúčinný plazminogen, účinný plazmin, aktivátory plazminogenu (PA) a inhibitory (Trávníčková E., 1996). Aktivace plazminogenu nastává buď cestou vnitřní (prostřednictvím plazmatických proaktivátorů, faktoru XIIa, kalikreinu a HMWK (Martínková J., 2008)), nebo cestou zevní vlivem dvou hlavních aktivátorů - tkáňového tPA a aktivátoru izolovaného z moči uPA. Aktivátory plazminogenu pocházejí především z buněk vaskulárního endotelu. Jejich uvolňování je stimulováno trombinem, různými vazoaktivními stimuly (adrenalinem, vasopresinem). Dále jsou obsaženy v buňkách téměř všech parenchymatózních orgánů, zvláště plic, ledvin, prostaty a placenty, odkud se uvolňují při poranění (Martínková J., 2008).

Inhibice fibrinolytického systému pobíhá přes inhibitory aktivátorů plazminogenu (ty jsou produkovány hlavně buňkami vaskulárního endotelu a placenty; inhibitor typu 1 je obsažen v  $\alpha$ -granulech destiček a ochraňuje primární hemostatickou zátku proti předčasnému rozpuštění). Druhou cestou je inhibice přes inhibitory plazminu (patří sem  $\alpha_2$  antiplazmin a  $\alpha_2$  makroglobulin).

Fibrinolytický systém je v patřičné rovnováze a úzkých vztazích k systému koagulačnímu. Jeho aktivita musí být usměrňována nejen co do lokalizace, ale i do časového průběhu, neboť masivní nebo předčasná fibrinolýza může vést k obnovení krvácení. V celém procesu mají

významnou úlohu nejen krevní destičky a látkové faktory, ale i cévní endotel, který udržuje tekutost krve a neustálý netrombogenního stav (Trávníčková E., 1996).

### **Rozdíly ve složení trombů**

Důležité je si uvědomit i rozdíl ve složení venózního a arteriální trombu. Venózní trombus má malou destičkovou komponentu a značný obsah fibrinu. Část trombu může být oddělena a působit jako embolus. Arteriální trombus, obvykle spojený s aterosklerózou, je složen hlavně z primární destičkové zátky. Trombus může ovlivnit průtok krve orgánem s rizikem ischemie nebo infarktu (Martínková J., 2008).

## **1.5 LÉKY OVLIVŇUJÍCÍ AGREGACI DESTIČEK**

Trombotické a embolické komplikace aterosklerózy jsou nejčastější příčinou ischemických cévních příhod mozkových. Antiagregační léčba má za cíl inhibovat agregaci destiček. Má své místo jak v primární prevenci, tak zejména v terapii a sekundární prevenci ischemických cévních mozkových příhod. Rozhodnutí mezi léčbou antiagregační a antikoagulační vychází z určení etiologie ischemického iktu. Antiagregační léčba se uplatňuje při ateroskleróze velkých tepen, onemocnění malých tepen a dále v případech iktů jiné určené či neurčené etiologie, kdy není indikována léčba antikoagulační.

Antiagregační terapie snižuje vaskulární příhody, včetně nefatálního IM, nefatálního iktu a cévní smrti u pacientů s předcházejícím iktem nebo TIA (RR 0,78; 95% CI 0,76-0,80) (ESO guidelines, 2009).

Inhibovat agregaci můžeme působením na jejích 7 hlavních aktivátorů: a/ tromboxan (TX), vznikající působením cyklooxygenázy na arachidonovou kyselinu, b/ trombin, c/ adenosin – difosfát (ADP), uvolňovaný z granul destiček, d/ kolagen, aktivující destičky při obnažení

cévní stěny prostřednictvím glykoproteinových receptorů, e/ katecholaminy, f/ smykové napětí a g/ faktor aktivující destičky (platelet activating factor - PAF), uplatňující se zejména při zánětlivých procesech.

## **Přehled antiagregačních farmak:**

### **1. Kyselina acetylsalicylová (ASA)**

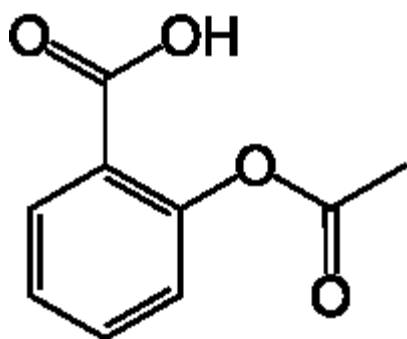
#### **Historie**

Kyselina acetylsalicylová (ASA) je látka stará více než sto let. V lidovém léčitelství jí používali mimo jiné staří Egypťané v podobě odvaru z vrbového listí proti horečce a bolestem. Vrba (*Salix*) totiž obsahuje právě kyselinu salicylovou. Reverendu Edwardu Stoneovi z Oxfordshire se připisuje první vědecká zpráva o použití prášku z vrbové kůry pro léčbu horečky v roce 1763. Profesor Johann Andreas Buchner z Mnichovské univerzity již v roce 1827 popsal léčivé účinky extraktu z kůry evropské vrby. V roce 1876 pak Thomas MacLagen, lékař z Dundee, začal podávat přípravek z kůry vrby, salicin, pro léčbu bolestí kloubů, otoků a horečky při revmatizmu.

Profesor chemie v Marburgu Herman Kolbe zavedl syntézu kyseliny salicylové extrakcí z kůry vrby v roce 1859 a už r. 1874 byla jedna chemická továrna v Drážďanech schopna dodávat kyselinu na trh. Pro nepříznivé gastrointestinální vedlejší účinky pak chemik Felix Hoffmann v roce 1897 v laboratořích firmy Bayer zavedl do molekuly kyselinu octovou a vznikla tak chemicky čistá a stabilní forma kyseliny acetylsalicylové, nazývaná aspirin. Úspěšně ji vyzkoušeli na mnoha nemocných kloubním revmatizmem, potvrdili její antipyretický a analgetický účinek, a tak je tomu dodnes. Průmyslově se dnes ASA vyrábí z benzenu (Obr. 4). Protizánětlivého působení vyšších dávek ASA se stále využívá při léčbě revmatizmu a jiných zánětů.

V roce 1892 získal britský farmakolog, Sir John Vane společně se švédskými biochemiky Bergströmem a Samuelssonem Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství za průkopnickou práci o prostaglandinech a jim příbuzných biologicky aktivních látkách, což vedlo k použití ASA v nové indikaci jako lék antiagregační, působící při prevenci a léčbě cévních onemocnění.

ASA se využívá i při léčbě demence a u některých nádorových onemocnění, zejména pak v prevenci vzniku nádorů tlustého střeva (www.aspirin.cz, Jack DB, 1997).



**Obrázek 4. Strukturní vzorec ASA.**

### **Farmakokinetika ASA**

ASA je slabá organická kyselina s  $pK_a$  3,5. V žaludku se v důsledku nízkého pH nachází především v neionizované formě, která dobře prostupuje žaludeční stěnou. Část látky se dále vstřebává v proximální části tenkého střeva (Lincová D. et al., 2007). Během 30 minut dochází k hladinám, které se již projeví terapeutickým účinkem. Inhibice destičkových funkcí je evidentní do jedné hodiny. Maximální hladina salicylátů v krvi je obvykle dosažena asi za 2 hodiny po p.o. podání přípravku (Patrono C. et al., 2008, Hynie S., 2001). Po podání enterických tablet trvá dosažení maximální koncentrace v plazmě 3-4 hodiny. Perorální biologická dostupnost ASA pravidelně podávané je 40-50 % v poměrně širokém pásmu

dávek. U enterických tablet je biologická dostupnost znatelně nižší. ASA uplatní svůj efekt zejména v portální cirkulaci před dosažením jater (Kuliczowski W. et al., 2009). Plasmatická koncentrace ASA klesá s poločasem od 15 do 20 minut. Přes rychlé odstraňování ASA z cirkulace trvá inhibiční účinek na destičku po zbytek jejich života, prostřednictvím ireverzibilní inhibice enzymu cyklooxygenázy 1 (COX -1), viz níže. ASA také acetyluje enzym v megakaryocytech před uvolněním nových destiček do oběhu. Střední doba života destičky se pohybuje od 8 do 10 dnů; denně je 10-12% destiček vyměněno. Nicméně obnova tromboxanu  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>), destičkového induktoru a vasokonstriktoru, je in vivo při prolongovaném podávání ASA rychlejší než předpovídá destičkový obrat, to je pravděpodobně dáno nelineárním vztahem mezi inhibicí destičkové COX-1 aktivity a TXA<sub>2</sub> syntézou (Kalvach P et al., 2010; Patrono C. et al., 2008).

ASA je v krvi, játrech a dalších tkáních esterázami metabolizována na kyselinu octovou a svůj aktivní metabolit, kyselinu salicylovou. Salicyláty dobře prostupují do tkání a po vyšších dávkách se objevují i v synoviální tekutině a v mozkomíšním moku, procházejí placentární bariérou a prostupují do mateřského mléka. U novorozenců mohou vést k jádrovému ikteru vytěsněním bilirubinu z vazby na plazmatické bílkoviny.

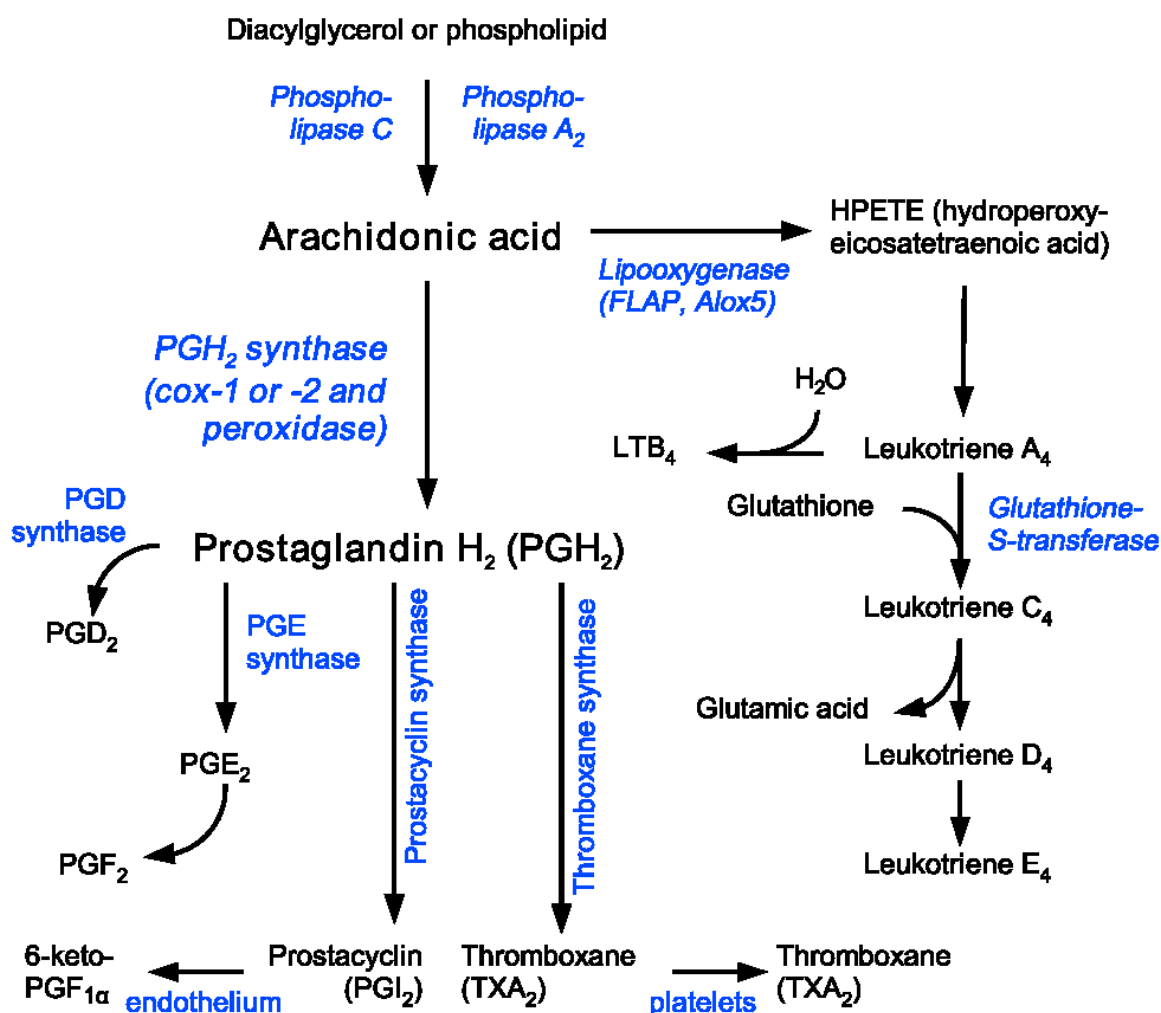
Salicyláty se metabolizují a konjugují v játrech. ASA se eliminuje hlavně ledvinami ve formě kyseliny salicylové a jejích konjugátů. Exkrece je závislá na použité dávce a pH moči - alkalizace moči zvyšuje eliminaci ASA. V běžných analgetických dávkách se eliminuje kinetikou prvního řádu, poločas eliminace je 2-5 hodin.

Po protizánětlivých dávkách nad 4g/ den převládá v důsledku částečné saturace jaterních enzymů kinetika nultého řádu a poločas eliminace se prodlouží až na 15 hodin. K saturaci jaterních enzymů dochází přibližně po týdenním podávání ASA. Na možnost kumulace je

nutno myslet při chronickém podávání vysokých dávek, riziko se zvyšuje u pacientů s poškozením renálních funkcí (Lincová D. et al., 2007).

## Farmakodynamika ASA

SA ireverzibilně inhibuje cyklooxygenásovou (COX) aktivitu prostaglandin H syntetázy 1 a 2 (COX-1 a COX-2). Tyto isoenzymy katalyzují první krok v syntéze prostanoidů, tedy přeměnu kyseliny arachidonové na PGH<sub>2</sub> (přes PGG<sub>2</sub>) (Obr. 5).



Obr. 5. Syntéza tromboxanu.

Kyselina arachidonová je dvacetí-uhlíkatá mastná kyselina, která obsahuje 4 dvojné vazby a je uvolňována z fosfolipidové membrány fosfolipázami. Cytosolová prostaglandin H syntetáza má COX a hydroperoxidázovou aktivitu. COX syntetáza existuje ve dvou formách: COX -1 a COX -2. Již nízké dávky ASA selektivně inhibují COX-1, vysoké dávky ASA inhibují jak COX-1 tak COX-2. Vytvořený PGH<sub>2</sub> je následně konvertován tkáňově specifickými isomerázami na prostanoidy: tromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandin D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> a prostacyklin (PGI<sub>2</sub>). Tyto bioaktivní lipidy aktivují specifické membránové receptory z rodiny G-proteinů (TP = receptor TX, DP<sub>s</sub>= receptor PGD<sub>2</sub>, EP= receptor PGE<sub>2</sub>, FP= receptor PGF<sub>2α</sub>, IP = receptor prostacyklinu).

COX - 1 a 2 jsou homodimery, každý dimer obsahuje tři nezávislé podjednotky: doména epidermálního růstového faktoru, membránová vazebná doména a enzymatická doména. V enzymatické doméně je místo jak pro peroxidázovou katalytickou aktivitu tak pro COX aktivitu; ta je umístěna na hrotu hydrofobního kanálu. Molekulární mechanismus permanentní inaktivace COX aktivity ASA spočívá v bloádě COX kanálu acetylací strategicky umístěného serinového zbytku (serin 529 v lidském COX-1, serin 516 v lidském COX-2), tato acetylace zabrání vstupu substrátu ke katalytickému enzymu. Hydrofóbní prostředí COX kanálu stabilizuje modifikovaný serinový postranní řetězec proti hydrolýze. Inhibice na COX-1 závislých destičkových funkcích je dosaženo podáním nízké dávky ASA jedenkrát denně. Inhibice COX-2 závislých patofyziologických procesů jako bolesti, zánětu vyžaduje vyšší dávky ASA, a to pravděpodobně proto, že acetylace je podmíněna oxidačním stavem enzymu a je inhibována v buňkách s vysokou peroxidázovou aktivitou. Dále je zde mnohem kratší dávkovací interval protože jaderné buňky rychle enzym resyntetizují. Z toho vyplývá variace v řádech stovek při dávkování ASA při zánětlivých procesech či v roli protideštičkového léku. Navíc poměr přínosu a rizika závisí na dávce a indikaci, protože gastrointestinální toxicita je též dávkově závislá.

Destičky a buňky cévního endotelu produkují  $\text{TXA}_2$  a  $\text{PGI}_2$ .  $\text{TXA}_2$  indukuje destičkovou agregaci a vazokonstrikci zatímco  $\text{PGI}_2$  inhibuje destičkovou agregaci a indukuje vazodilataci. Zatímco  $\text{TXA}_2$  je zejména produkt COX-1 z destiček a tím vysoce citlivý k inhibici ASA, cévní  $\text{PGI}_2$  vzniká nejen činností COX-1, ale z větší části činností COX-2. Na COX-1 závislá produkce  $\text{PGI}_2$  se objevuje při stimulaci agonisty např. bradykininem a je senzitivní k inhibici ASA. COX-2 zprostředkovaná produkce  $\text{PGI}_2$  se objevuje trvale jako odpověď na laminární třecí síly a je necitlivá k ASA v konvenčních protideštičkových dávkách. To vysvětluje reziduální COX-2 dependentní  $\text{PGI}_2$  syntézu in vivo při denních dávkách ASA v rozmezí 30-100mg přesto, že dojde přechodně k supresi na COX-1 závislé  $\text{PGI}_2$  tvorbě.  $\text{PGI}_2$  je tromboprotektivní látka; myši postrádající  $\text{PGI}_2$  receptory jsou náchylnější k experimentální trombóze a některá nesteroidní antirevmatika (NSAIDs) jakožto COX-2 inhibitory zvyšují riziko cévních komplikací, zejména IM (Patrono C. et al., 2008, Sztriha LK et al., 2005, Patrono C., 2003, 2013).

Je třeba poznamenat, že ASA blokuje pouze jednu dráhu destičkové aktivace, přičemž další dráhy stimulované ADP, adrenalinem, trombinem, smykovým napětím a vyššími dávkami kolagenu zůstávají nedotčeny (Sztriha LK et al., 2005).

## **Účinky ASA**

Účinky kyseliny acetylsalicylové jsou dány jak bezprostředním působením nezměněné látky, tak jejím aktivním metabolitem, kyselinou salicylovou.

V první řadě má ASA účinek analgetický, je vhodná k tlumení mírných a středně silných bolestí. Podává se jednorázově perorálně obvykle v dávce 500 mg, dávku lze opakovat v intervalu 4-6 hodin, obvykle do dávky 3-4 g denně.

Další důležitý je účinek antipyretický, nastupuje asi za 30 minut po perorálním podání a přetrvává přibližně 3-4 hodiny. Toxické dávky mohou paradoxně vyvolat hyperpyrexii

s pocením, dehydratací a kolapsem. Antiflogistický a antirevmatický účinek se dostavuje až při vyšších dávkách (přes 6 g/ den), po těchto dávkách se již objeví řada nežádoucích účinků. V nízkých dávkách může ASA snižovat eliminaci kyseliny močové.

Antiagregační účinek se projeví ještě před vstupem do systémové cirkulace a před deacetylací ASA v játrech, kdy ASA ireverzibilně inhibuje v portálním řečišti destičkovou cyklooxygenázu a brání v destičkách vzniku proagregačního  $\text{TXA}_2$ , bez významného ovlivnění  $\text{PGI}_2$  v cévním endotelu. Agregabilita destiček je porušena po celou dobu jejich života. Pokud jde o deacetylované deriváty kyseliny acetylsalicylové, její aktivní derivát kyselina salicylová inhibuje COX pouze reverzibilně. Vysoká citlivost destičkové cyklooxygenázy a ireverzibilní charakter inhibice umožňuje intermitentní podávání nízkých dávek ASA cca 100mg denně, které nenaruší tvorbu vazodilatačně působícího prostacyklinu  $\text{PGI}_2$  a mají minimální nežádoucí účinky. Standardní dávkovací interval jedenkrát denně vychází z farmakokinetiky a farmakodynamiky léku (Lincová D. et al., 2007). Nicméně musíme brát v úvahu i obrat destiček. U zvýšeného destičkového obratu je vhodnější dávkování dvakrát denně. To nastává např. u myeloproliferativních onemocnění, jako je trombocytémie, ale např. i u diabetiků (Sztriha LK et al., 2005).

ASA patří mezi nejužívanější antiagregancia. Destičky se účastní na tvorbě a progresi arteriálního trombu. Při nekontrolované propagaci a perzistenci destičkové aktivace přes zpětnovazebné smyčky tvorby  $\text{TXA}_2$  a ADP, může dojít k nárůstu intraluminárního trombu, cévní okluzi a tranzitorní ischemii nebo infarktu. ASA **oproti placebo vede k roční absolutní redukci rizika (ARR) recidivy mozkového infarktu/úmrtní asi o 1-2 %** (number needed to treat – NNT = 100) (Antithrombotic trialists' collaboration, 2002). ASA snižuje recidivu bez ohledu na dávku (50–1300 mg/den), i když vysoké dávky (>150 mg/den) zvyšují vedlejší účinky. U pacientů se symptomatickou intrakraniální aterosklerózou je ASA stejně účinná jako perorální antikoagulace a má méně komplikací (ESO guidelines, 2009).

Zvlášť je diskutován protektivní efekt ASA v tvorbě trombu u hluboké žilní trombózy. Dlouhodobé užívání nízké dávky ASA redukuje incidenci hluboké žilní trombózy, navíc pokud podávání ASA následuje antikoagulační léčbu žilní trombózy, je redukováno riziko rekurence o více než jednu třetinu. ASA acetyluje fibrinogen a další koagulační faktory, což vede k fibrinolýze a snížené tvorbě trombinu (acetylací protrombinu). Acetylace je však očekávána až u vyšších dávek. Při nízkých dávkách ASA jde spíše o ovlivnění cesty  $TXA_2$  (Sztriha LK et al., 2005).

Dále se hromadí údaje o antineoplastickém působení nesteroidních protizánětlivých látek. Epidemiologické studie ukázaly, že dlouhodobá léčba ASA výrazně snižuje výskyt kolorektálního karcinomu. Kromě inhibice COX-2 v gastrointestinální mukóze a tím snížení buněčné proliferace, apoptózy a angiogeneze při podávání vyšších dávek ASA se i u nízkodávkové ASA předpokládá inhibice destičkové aktivace v gastrointestinální mukóze. Navíc aktivace destiček a jejich agregace cirkulujícími nádorovými buňkami je považována za možnou ochranu nádorových buněk před vlastním zničením NK (natural killer) buňkami. To vysvětluje i nižší výskyt metastáz u pacientů užívajících ASA.

Kyselina salicylová se též užívá k léčbě průjmů způsobených radioterapií. Existují údaje, že by ASA mohla být užitečná u neurodegenerativních onemocnění, ve zpomalení nástupu a progresu onemocnění (Lincová D et al., 2007). Zvýšená  $TXA_2$  tvorba po CMP je spojena s výskytem demence po CMP. ASA dle některých studií potenciálně redukuje kognitivní úbytek u starších osob. Destičky se totiž mohou chovat jako buňky přirozené imunity a ovlivňovat aktivitu leukocytů, jejich migraci do tkání, uvolňování cytotoxických mediátorů a vlastní remodelaci ve tkáních po poranění. Protizánětlivý efekt nízké dávky ASA, který přispívá ke snížení neurodegenerace, tak nutně nevyžaduje inhibici COX-2. Navíc aspirinem uvolněné lipoxiiny (rodina eikosanoidů tvořená interakcí mezi 5- lipooxygenasou a aspirinem acetylovanou COX-2), hrají roli v oslabení zánětu v mozku stimulací alternativní aktivace

mikroglie. In vivo je ovšem průkaz syntézy těchto látek zatím nedosažitelný (Sztriha LK et al., 2005).

### **Nežádoucí účinky, kontraindikace a projevy předávkování**

K nejčastějším nežádoucím účinkům patří gastrointestinální obtíže: nauzea, dyspepsie, vomitus, okultní krvácení, eroze, gastroduodenální vřed, ale i postižení esofagu a dalších částí trávicího ústrojí. Gastritida a vředová choroba jsou proto kontraindikací pro podávání. Po opakovaném podávání vyšších dávek se mohou objevit poruchy sluchu, tinitus, hluchota a vertigo. Tyto nežádoucí účinky typické pro salicyláty se označují jako salicylismus. Vzácné jsou poruchy ledvinových funkcí a asymptomatická hepatitida. I když antiagregační účinek ASA je využíván terapeuticky, může snížení krevní srážlivosti a prodloužení doby krvácení vést ke klinickým komplikacím např. při chirurgickém zákroku a proto se ASA má vysadit týden před plánovanou operací. V těhotenství se doporučuje podávat ASA pouze krátkodobě a v menších dávkách. Chronické podávání může ohrozit matku a plod zvýšenou krvácivostí.

Alergická reakce se projevuje svěděním, vyrážkou, k vážnějším projevům patří vzácný výskyt Leyellova a Stevensova-Johnsonova syndromu, anafylaktický šok je vzácný. Bronchokonstrikce a indukce astmatického záchvatu je považována za pseudoalergickou reakci. Provokace astmatického záchvatu, a přecitlivělost na ASA se objevuje často spolu s nazálními polypy a tato triáda se označuje jako Samterův syndrom.

Při léčbě horečky u dětí s virovým onemocněním existuje riziko vzniku tzv. Reyeova syndromu (náhlá hyperpyrexie, metabolická acidóza, hyperpnoe, zvracení, křeče, neuropsychologické poruchy a hepatopatie). Přesto, že se tato komplikace objevuje velmi vzácně, podáváme dětem do 12 let při virových onemocněních raději jiná antipyretika.

Kyselinu acetylsalicylovou nekombinujeme s jinými protizánětlivými léky, protože by se snižoval jejich protizánětlivý účinek.

K poruchám acidobazické rovnováhy dochází obvykle při léčbě vysokými dávkami ASA (více než 5 g/ den). Nejdříve dochází ke stimulaci respiračního centra s hyperventilací a respirační alkalózou, kompenzovanou zvýšeným vylučováním bikarbonátů močí. Toxické dávky salicylátů mohou vést k respirační depresi s respirační acidózou (hromadění  $\text{CO}_2$  v plazmě) a později i nekompensovanou metabolickou acidózou (nahromadění laktátu v plazmě).

Při akutním předávkování je častá nauzea nebo zvracení. Poruchy acidobazické rovnováhy, delirium, křeče a kóma patří k projevům těžkého předávkování, které může končit smrtí v důsledku respiračního selhání. Hypertermie se vysvětluje jako důsledek rozpojení oxidativních fosforylací a energie jinak využívaná k tvorbě ATP se uvolní ve formě tepla.

Chronická intoxikace se projevuje hučením v uších, bolestmi hlavy, závratí a zmateností (Patrono C. et al., 2008).

### **Další vlivy ASA na hemostázu**

Ukázalo se, že ASA má účinky na hemostázu, které nejsou spojeny s jeho schopností inaktivovat destičkovou COX-1. Patří sem na dávce závislá inhibice destičkové funkce, rozvoj fibrinolýzy a potlačení koagulace plasmy.

Neprostaglandinové účinky ASA na hemostázu jsou, na rozdíl od jasné inhibice COX-1, mnohem méně jasně definované a závislé na dávce. Například inhibice třecími podmínkami indukované agregace záleží na poskytnuté hladině ASA.

Navýšená fibrinolýza přes N-acetylaci lysylových reziduí fibrinogenu je pozorována in vivo při vyšších dávkách ASA kolem 650 mg, ale je mnohem rychlejší in vitro při nefyziologických alkalických podmínkách.

ASA tlumí koagulaci plasmy mnohými mechanismy. První popsal v roce 1943 Link a kolektiv a byl poté potvrzen dalšími autory; je způsoben působením ASA proti vitaminu K. Vyžaduje vysoké dávky ASA a nepřispívá k antitrombotickému efektu ASA do dávek 1500 mg/ den. Druhý způsob, za který odpovídají destičky, je závislý na inhibici tvorby trombinu v plné krvi. Jednotlivá dávka 500 mg ASA sníží množství tvorby trombinu, zatímco opakovaná dávka 300 mg redukuje celkové množství vytvořeného trombinu. Interakce s destičkovými fosfolipidy, která je otupěna při hypercholesterolemii má vysvětlovat efekt ASA na tvorbu trombinu. Je možné, ačkoliv to nebylo prokázáno, že se tento efekt objevuje jako následek chybné destičkové srážlivé aktivity vyvolané sekundárně inhibicí TX dependentní destičkové agregace. Není známo, zda podobný efekt mají i nižší dávky ASA. Navíc vysoké dávky aspirinu mohou způsobit abnormální koagulaci in vitro přímou acetylací jednoho nebo více srážecích faktorů (Patrono C. et al., 2008, Patrono C., 2003).

Podle Malinina zůstává efekt ASA na povrchové destičkové receptory nejasný a tento autor předkládá teorii, kdy ASA inhibuje in vitro P- selektin, CD63, CD107 a GP IIb/IIIa . Tato inhibice může být způsobena jak přímým působením ASA na daný receptor, tak nepřímo inhibicí proteinové syntézy ASA. Z literatury je také známo, že ASA inhibuje expresi P-selektinu přes syntézu tromboxanu a efekt ASA na expresi GPIIb/IIIa je spojen s tyrozinovou fosforylací destičkových proteinů, které jsou na COX-1 nezávislé. Je tedy zřejmé, že mechanismus účinku ASA je multifaktoriální (Malinin AI et al., 2003).

Přes mnohé méně či více prozkoumané teorie se zdá, že nejspíše žádný další potenciální efekt ASA na další determinanty arteriální trombózy není tak důležitý jako inhibice destičkové COX-1 aktivity ((Patrono C. et al., 2008, Patrono C., 2003).

## **2. Kardegic (lysin acetylsalicylátu)**

Účinnost této látky je odvozena od ASA. Kardegic nejprve disociuje na lysin a ASA a dále již působí jako ASA. Podává se obvykle dávka 250 - 500 mg intravenózně. Výhodou je forma podání využívaná u pacientů v akutním stavu a při nemožnosti perorálního příjmu (Peisker T. et al., 2017 a 2019).

## **3. Dipyridamol**

Mechanismem účinku tohoto léku je inhibice fosfodiesterázy, adenosin deaminázy a současně blokáda vychytávání adenosinu do buněk. Vede tak k akumulaci destičkového inhibitoru cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) a navíc inhibuje syntézu tromboxanu A<sub>2</sub>. Dipyridamol se užívá v kombinaci s ASA, jako preparát Aggrenox (25 mg ASA + 200 mg dipyridamol), v tabletové formě a takto je podáván 2 krát denně. Roční ARR oproti ASA je 1-1,5 % / rok (NNT = 66). Dipyridamol plus ASA tedy snižuje riziko cévní smrti, infarktu nebo IM, ve srovnání se samotnou ASA (RR 0,82; 95% CI 0,74-0,91) [7]. Častým nežádoucím účinkem léku při nasazení jsou **bolesti hlavy; pak lze vyzkoušet postupné titrování dávky**, nicméně v současné době při výskytu bolesti spíše rovnou přecházíme na jiný preparát (Peisker T. et al., 2017 a 2019).

## **4. Klopidoogrel (thienopyridin)**

Jedná se o prodrug, tedy prekursor účinné látky, kdy až po přeměně v aktivní metabolit lék selektivně inhibuje ADP indukovanou destičkovou agregaci prostřednictvím destičkových

receptorů P2Y<sub>12</sub>. Plný účinek je dosažen během 2-3 dní a mizí po 5 dnech po vysazení. Užívá se v dávce 75 mg jedenkrát denně, perorálně. ARR mozkového infarktu bylo ve srovnání s ASA (325 mg) sníženo o 0,51 % (NNT = 200). Klopido­grel je tedy mírně účinnější než ASA v prevenci cévních příhod (RR 0,91; 95% CI 0,84– 0,97). Může být účinnější u vysoce rizikových pacientů (tedy pacientů s předchozím iktem, chorobou periferních tepen, symptomatickým koronárním postižením nebo diabetem) (ESO guidelines, 2009).

K nežádoucím účinkům patří zvýšené riziko krvácení, vyšší výskyt průjmů a kožních projevů (rash) oproti ASA, naopak nižší výskyt krvácivých gastrointestinálních komplikací, lehčí a reverzibilní neutropenie srovnatelně s ASA (0,17%), vzácně (incidence 0,4/100 tisíc léčených) může klopido­grel, stejně jako ticlopidin, vyvolat sekundární trombotickou trombocytopenickou purpuru (obvykle do 14 dní po nasazení).

Je známa klopido­grelová rezistence neboli snížená odpověď na léčbu, z hlavních příčin jsou popisovány: noncompliance, porucha resorpce klopido­grelu, porucha konverze na aktivní thiolový metabolit (nejčastěji při genetickém polymorfismu CYP2C19, pacienti hůře metabolizují klopido­grel a mají vyšší riziko kardiovaskulárních příhod, efekt zvýšení dávky klopido­grelu je ověřován studiemi), dále snížený účinek při interakci s blokátory protonové pumpy a statiny (výsledky studií nejsou jednoznačné), zvýšení nabídky ADP, zvýšená aktivita receptoru P2Y<sub>12</sub>, receptorů pro kolagen epinefrin nebo trombin, aktivace destiček jiným cestami (přes trombin, epinefrin) ( Hamm CW et al., 2011, Tomek A. et al., 2018, Peisker T. et al., 2017 a 2019).

## **5. Ticlopidin (thienopyridin)**

Vzhledem k riziku vzniku neutropenie (v prvních 3 měsících po nasazení u 1% pacientů) a z toho plynoucí nutnosti monitorace krevního obrazu t.č. není tento lék nově nasazován.

## **6. Triflusal (reverzibilní COX -1 inhibitor)**

Lék má srovnatelná účinnost se samotnou ASA, ale méně nežádoucích účinků. V ČR není běžně používán (Peisker T. et al., 2017 a 2019).

### **Další antiagregační léky:**

Jedná se o léky používané v minulosti, preparáty zkoušené ve studiích, či užívané v kardiologických indikacích, t.č. nejsou u nás v léčbě a prevenci CMP doporučeny.

## **7. Prasugrel (thienopyridin)**

Jedná se o inhibitor aktivace a agregace krevních destiček prostřednictvím ireverzibilní vazby jeho aktivního metabolitu na třídu P2Y<sub>12</sub> receptorů ADP na destičkách.

Přípravek je indikován současně s ASA k prevenci aterotrombotických příhod u pacientů s akutním koronárním syndromem, kteří podstupují primární nebo elektivní perkutánní koronární intervenci.

Dle studií vykázal prasugrel ve srovnání s klopidogrelem vyšší účinnost při snižování doby do výskytu prvního kardiovaskulárního úmrtí, nefatálního IM nebo nefatální CMP. Vyšší účinnost byla doprovázena zvýšením výskytu závažného krvácení.

**Je kontraindikován u pacientů s anamnézou TIA a ischemické CMP pro vyšší riziko krvácení.**

Forma podání je perorální ([www.sukl.cz](http://www.sukl.cz), 2020).

## **8. Tikagrelor**

Lék působí přímou reverzibilní blokádu P2Y<sub>12</sub> receptoru (membránový receptor pro ADP).

Má rychlejší nástup účinku i vyšší účinnost než klopidogrel, nižší riziko selhání léčby - v podskupině nemocných s nízkou aktivitou CYP2C19 i s vysokou aktivitou glykoproteinu P, kteří mají nízkou léčebnou odpověď na klopidogrel, je zachován plný efekt tikaggreloru. V současnosti je indikován v kombinaci s ASA u pacientů s akutním koronárním syndromem anebo u pacientů s infarktem myokardu v anamnéze a vysokým rizikem rozvoje aterotrombotických komplikací. Užívá se 60 nebo 90 mg dvakrát denně ([www.sukl.cz](http://www.sukl.cz), 2020).

Bylo zkoumáno užití do 24 hodin po TIA či ischemické CMP a bylo zjištěno, že by mohl být efektivnější než aspirin, bez zvýšení rizika krvácivých komplikací (Vališ M. et al., 2021).

### **9. Elinogrel, Cangrelor**

Preparáty jsou dalšími z reverzibilních inhibitorů ADP receptorů P2Y<sub>12</sub>. Výhodou by mohla být možnost parenterální aplikace zajišťující velmi rychlý nástup účinku.

**10. Skupina antagonistů glykoproteinových receptorů IIb/IIIa:** abciximab, tirofiban, eptifibatide (parenterálně) a xemilofiban, orbofiban, sibrafiban a lotrafiban (p.o.)

**11. Další reverzibilní COX -1 inhibitory:** sulfinpyrazon, indobufen, flurbiprofen (Peisker T. et al., 2017).

## **1.6 ANTITROMBOTICKÝ EFEKT ASA A ZÁVISLOST NA DÁVCE**

K dosažení optimální klinické účinnosti ASA je třeba stanovit optimální dávku ASA s maximem účinku a minimální toxicitou.

Z meta-analýzy 287 randomizovaných protideštičkových studií provedené Antitrombotic Trialists' Collaboration vyplývá, že protideštičková terapie redukuje riziko závažných cévních událostí u vysoce rizikových pacientů o 22 % ve srovnání s kontrolami. Jiná meta-regresní analýza 11 randomizovaných placebem kontrolovaných studií ukázala, že ASA redukuje

riziko CMP u pacientů s předchozí TIA či CMP o 15 % (relativní redukce rizika) (Sztriha LK et al., 2005).

Z velkých placebem kontrolovaných randomizovaných studií vyplývá, že ASA je efektivním protitrombotickým lékem pokud je užívána dlouhodobě v dávkách od 50 do 100 mg na den a jsou i některá doporučení, která považují za efektivní již dávku 30 mg na den. 75 mg ASA na den se ukázalo dostačující pro redukci rizika akutního infarktu myokardu nebo smrti u pacientů s nestabilní anginou pectoris a chronickou stabilní anginou, stejně jako u pacientů s transitorní ischemickou atakou (TIA) v redukci rizika CMP či smrti a v redukci rizika pooperační CMP po karotické endarterektomii. V European Stroke Prevention Study 2 (ESPS-2) bylo 25 mg ASA efektivní v redukci rizika iktu u pacientů s předchozí CMP či TIA. Proto byly stanoveny nejnižší efektivní dávky ASA pro jednotlivá onemocnění. Pro TIA a ischemický iktus 50 mg ASA denně a pro akutní CMP 160 mg na den; vyšší dávky nebyly shledány efektivnějšími. Z četných randomizovaných studií, které porovnávaly různé dávky ASA, nebyl nalezen přesvědčivý důkaz, že by vyšší dávky byly efektivnější v redukci rizika cévních příhod.

Naopak v přehledu Antitrombotic Trialists'(ATT) Collaboration přes limitaci nepřímým porovnáváním bylo zjištěno, že antitrombotický efekt je při vyšších dávkách ASA nižší, což koreluje s inhibicí  $\text{PGI}_2$  závislé na dávce léčiva. Tato inhibice může být potenciálním mechanismem, kterým COX-2 inhibitory zvyšují riziko infarktu myokardu. V různých studiích byl testován antitrombotický efekt ASA v širokém rozmezí dávek a byla srovnávána kontrolní skupina s pacienty s trombotickými cévními příhodami. Bylo zjištěno, že pro TIA jsou účinné dávky ASA od 50-1200 mg / den a pro akutní mozkovou příhodu dávky od 160-300 mg / den. Tyto dávky redukují časnou mortalitu a recidivu iktu.

Je prokázáno, že dávky ASA kolem 300 mg denně mají méně nežádoucích gastrointestinálních účinků než dávky kolem 1200 mg denně. Bylo i prezentováno, že dávka 30 mg má méně nežádoucích účinků než 300 mg denně. V rámci Clopidogrel In Unstable Angina To Prevent Recurrent Events (CURE) byl retrospektivně vyšetřován vztah mezi dávkou ASA (75-325 mg) a rizikem závažného krvácení. Tato randomizovaná studie porovnávala klopido-grel a placebo „na pozadí“ ASA terapie. Pacienti s akutním koronárním syndromem, kteří dostávali ASA v dávce 100 mg na den a méně, měli nejmenší riziko závažných život ohrožujících komplikací v placebo i v klopido-grelové větvi. Riziko narůstalo s navyšováním dávky ASA samostatně i s klopido-grelem.

Vezmeme-li v úvahu saturabilitu protideštičkového účinku ASA při nízkých dávkách, nedostatek závislosti dávky na antitrombotickém efektu v klinických studiích a na dávce závislé nežádoucí účinky, vše podporuje užívání co nejnižších dávek, které byly shledány efektivními v léčbě jednotlivých trombembolických onemocnění. Nejnižší efektivní dávka ASA je 50-100 mg denně pro dlouhodobou léčbu a je v současné době nejlepší strategií k minimalizaci toxicity a k dosažení maximálního efektu (Patrono C. et al., 2008; Connolly et al., 2009).

## **1.7 WARFARIN A NOVÉ ORÁLNÍ ANTIKOAGULAČNÍ LÉKY**

### **Warfarin**

Warfarin (sodná sůl warfarinu) je kumarinový derivát, který inhibuje konverzi vitamínu K na redukovanou formu. Ta je potřeba pro tvorbu aktivních karboxylovaných koagulačních faktorů II, VII, IX a X. Pouze koagulační faktory, které jsou karboxylovány v gama pozici na

glutamátových zbytcích, jsou schopny vázat  $\text{Ca}^{2+}$  a vykazují koagulační vlastnosti. Warfarin inhibuje enzym epoxid reduktázu, který regeneruje redukovanou formu vitamínu K z epoxidového derivátu vitamínu K. Při účinné léčbě warfarinem tak vznikají částečně dekarboxylované koagulační faktory s redukovanou koagulační aktivitou.

Nástup účinku warfarinu je s několikadenní latencí, během které musí z plazmy vymizet již vytvořené koagulační faktory. Antikoagulační účinek se projeví za 3 - 4 dny, což je určeno vymizením protrombinu s nejdelším poločasem eliminace.

Ke sledování účinnosti léčby se provádí monitorování krevního srážení Quickovým testem – INR ( international normalized ratio).

Absorpce z GIT je velmi dobrá, vazba na plasmatické bílkoviny je velmi silná (90 – 99 %). Poločas warfarinu je asi 40 hodin a proto je dostačující jeho podání jedenkrát denně.

Nejzávažnějšími nežádoucími účinky je krvácení z různých orgánů a tkání, jejichž nejčastější příčinou je předávkování při nedostatečné laboratorní kontrole účinku nebo jako důsledek interakcí s jinými léky.

Warfarin je doporučen k prevenci a léčbě žilní, tepenné a nitrosrdeční trombózy a k redukci rizika ischemické cévní mozkové příhody u pacientů s fibrilací síní či flutterem síní nebo se srdeční chlopenní vadou (Hynie S., 2001).

**Přímá perorální antikoagulancia ( direct oral anticoagulants - DOAC nebo stále užívaný termín new oral anticoagulants NOAC, nová perorální antikoagulancia)**

Patří sem inhibitory faktoru Xa apixaban, rivaroxaban nebo přímý inhibitor trombinu dabigatran. Jsou indikovány pro sekundární prevenci ischemického iktu u pacientů s chronickou nebo paroxysmální fibrilací síní (Peisker T. et al., 2017).

## 1.8 METODY MĚŘENÍ AGREGACE

Od objevení krevních destiček v 80. letech 19. století bylo navrženo a prováděno mnoho testů ve snaze změřit agregaci destiček.

Metody měření agregace destiček se uplatňují:

- a) při detekci vrozených nebo získaných destičkových dysfunkcí vedoucích ke zvýšenému riziku krvácení
- b) při monitorování protideštičkové terapie, identifikaci případné destičkové hyperfunkce a tím predikce trombózy u pacientů léčených antiagregačními léky (zejména aspirin, klopidoogrel a další)
- c) v rámci perioperačního monitoringu k predikci rizika krvácení
- d) v transfuzní medicíně
- e) pro výzkumné účely (studium krevních destiček, agregace) (Paniccia R. et al., 2015).

*Záměr většiny metod měření agregace je založen na faktu, že při podávání antiagregační látky se vyskytuje široká interindividuální variabilita. Pokud nemůžeme objektivizovat účinek léku tím, že kvantitativně změříme ovlivnění samotné agregace, je velmi obtížné posoudit míru benefitu ve smyslu antitrombotického účinku oproti riziku krvácení. Aby bylo dosaženo optimálního terapeutického efektu během epizod vysokého trombotického rizika, je důležité zajistit adekvátní blokádu destičkové funkce. Při chronické terapii je zase potřeba dosáhnout požadovaného antitrombotického efektu bez zvýšeného rizika krvácení. Cílem tedy je dosáhnout terapeutického okna blokády agregace, analogicky jako při monitorování*

*antikoagulační terapie. Je zřejmé, že rychlá a jednoduchá metoda, která by byla schopna zachytit funkční následky blokády agregace, by byla velmi užitečná v monitoraci léčby a při eventuálních úpravách dávkování k dosažení optimálního výsledku terapie.*

### ***Přehled metod:***

#### ***Test krvácivosti***

V roce 1910 W. W. Duke poprvé použil test nazývaný čas krvácivosti (bleeding time - BT), který byl pro svou snadnost a rychlost používán rutinně až do počátku 90. let 20. století. Princip spočíval v nafouknutí manžety na paži na 40 mm Hg, provedení řezu standardní délky a hloubky na volární straně předloktí a sledování doby potřebné k zastavení krvácení. Čas krvácivosti představuje čas potřebný k vytvoření hemostatické zátky a zastavení krvácení. Normální doba potřebná k zastavení krvácení se pohybuje od 2 do 10 minut, přičemž závažné destičkové defekty mohou mít čas krvácivosti i přes 30 minut. Výhodou je studium přirozené hemostázy a role cév v tomto procesu. Limitací testu je nejen invazivita, ale i nepřesný výsledek, jež je ovlivněn např. změnou teploty, počtem destiček, červených krvinek, cévní stěnou, trofickou kůže a především nemožností standardizace. Byl používán především jako screeningový test k identifikaci kongenitálních a získaných defektů destiček. V současnosti je správná anamnéza ohledně krvácivých příhod hodnotnější než tento test (Harrison P., 2005, Paniccia R. et al., 2015, Harrison P. et al., 2007, Pamukcu B., 2007, Tousoulis D. et al., 2009).

#### **Optická agregometrie**

Roku 1960 byl představen dosud zlatý standard testování funkce destiček tedy optická agregometrie (light transmission aggregometry - LTA). Objevitelé Gustav Born a John O'Brien využili modifikované spektrofotometrické techniky turbidimetrickým měřením změn optické hustoty. Principem je vzestup propustnosti světla po indukci agregace destiček vybraným agonistou neboli induktorem. Provedení spočívá nejprve v centrifugaci citrátové krve, tak získáme plazmu bohatou na destičky (platelet rich plasma - PRP), tu inkubujeme při teplotě 37 °C mezi zdrojem světla a detektorem. Po přidání různých koncentrací destičkových agonistů, destičky agregují a prostup světla stoupá.

Jako agonisté se nejčastěji používá kolagen, adenosin-difosfát (ADP), ristocetin, kyselina arachidonová a epinefrin. Z novějších agonistů je nejznámější trombinový receptor aktivující peptid (TRAP), k méně obvyklým agonistům patří tromboxanové A<sub>2</sub> mimetikum U46619 nebo kalciový ionofor A23187.

Fotometr detekuje vzestup propustnosti světla skrze PRP po přidání exogenních agonistů, dochází k agregaci, projasnění PRP a tím k vzestupu propustnosti světla. Mezní hodnoty představuje 0% při maximální optické hustotě PRP a 100% při nulové optické hustotě plazmy chudé na destičky (platelet poor plasma - PPP). Výsledek je zobrazen graficky, popisuje se tvar křivky, obraz primární a sekundární agregace. Číselně lze vyjádřit procento agregace – tedy maximální amplitudu a fázi zpoždění. Metoda poskytuje data o různých cestách aktivace destiček a jejich ovlivnění. Přes mnohé výhody se přesto jedná o poměrně nefyziologickou metodu, kdy dochází k smíchání separovaných destiček za nízko-třecích podmínek a k tvorbě agregátů po přidání agonisty. Metoda je ovlivněna jak preanalytickými procedurami (například typem antikoagulace v odběrové zkumavce, obsahem lipidů v plazmě, hemolýzou nebo nízkým počtem destiček), tak různými procedurálními metodami (příprava PRP, výběr a koncentrace agonisty, centrifugace). Vzorek musí být zpracován do 2 hodin a je potřeba větší objem krve. Provedení a zejména interpretace testu je obtížná, časově náročná a vyžaduje

zkušenosti. Metoda je nicméně postupně standardizována a jsou k dispozici podrobná doporučení.

V současnosti je tato metoda nejrozšířenější metodou testování destičkových funkcí a je k dispozici ve větších laboratořích (Harrison P., 2005, Paniccia R. et al., 2015, Harrison P. et al., 2007, Pamukcu B., 2007, Haubelt H. et al., 2005, Michelson AD, 2009). Monitorování protideštičkové terapie pomocí LTA umožňuje dle některých studií u pacientů ve vysokém riziku predikci závažných kardiovaskulárních událostí. Reziduální destičková aktivita přes antiagregační terapii vedla dle některých prací u těchto pacientů k dalším ischemickým příhodám (Paniccia R. et al., 2015).

### **Impedanční agregometrie z plné krve**

Tento test impedanční agregometrie z plné krve (impedance whole blood aggregometry - WBA) byl vyvinut ve snaze simulovat přirozenou hemostázu in vitro. Umožňuje studium destičkových funkcí v plné, nesrážlivé krvi. Aktivované destičky se lepí přes své povrchové receptory k umělým povrchům dvou elektrod. Vzorek plné krve je umístěn do určené vzdálenosti mezi elektrodami. Princip spočívá v měření zvýšení elektrické impedance mezi dvěma elektrodami v průběhu adheze a agregace destiček po přidání klasických agonistů. Výsledek je zaznamenán v Ohmech. K výhodám patří možnost fyziologického stanovení z plné krve za účasti ostatních krevních elementů ovlivňujících destičkové funkce, navíc k vyšetření stačí menší objemy krve. Analýza je možná okamžitě, není nutná centrifugace zkreslující výsledek. Nevýhodou zůstává časová náročnost vyšetření, nutnost kvalifikace pracovníka a finanční náročnost (Paniccia R. et al., 2015, Harrison P. et al., 2007, Michelson AD, 2009). Novou variantou WBA je Multiple Electrode Aggregometry (MEA), respektive Multiple Platelet Function Analyzer - Dynabyte - Roche Diagnostics. Jedná se o pěti kanálový

přístroj s počítačovým zpracováním, jednorázovými nádobami na vzorek, automatickou pipetou využívající různé agonisty a citlivými senzory. Automaticky je počítána oblast pod křivkou (area under curve - AUC).

Metoda je vhodná pro diagnostiku krvácivých chorob i k monitorování protideštičkové terapie. Zejména se osvědčila při monitorování rizika perioperačního krvácení. Test je méně náročný na provedení i interpretaci a vzhledem k užití více agonistů poskytuje mnohá data srovnatelná s optickou agregometrií. Dle některých studií je metoda schopna rozlišit pacienty neodpovídající na protideštičkovou léčbu, kteří jsou ve zvýšeném riziku kardiovaskulárních příhod a dokonce pak odlišit pacienty se zvýšenou inhibicí destičkových funkcí a osoby s rizikem krvácení (Paniccia R. et al., 2015).

### **Lumiagregometrie**

Metoda je založená na konverzi ADP uvolněného z destičkových granul na ATP, který reaguje s luciferin-luciferázovým reagentem. Uvolňované světlo odpovídá koncentraci ATP a je detekováno lumi-agregometrem. Aktivace destiček probíhá různými agonisty a to jak v PRP, v plné krvi nebo ve vzorku tzv. washed platelets (promyté destičky po odstranění plasmu). Technika je používána pro detekci specifických defektů v počtu a obsahu denzních granul. Může být užita i jako screeningový test destičkových dysfunkcí a ke zhodnocení destičkových funkcí při trombocytopenii (Paniccia R. et al., 2015).

### **VerifyNow**

V 90. letech 20. století byla představena nová metoda měření agregace nazývaná Rapid Platelet – Function Assay (RPFA), nyní již známá spíše pod názvem The VerifyNow® (VN). Jedná se o plně automatický „point of care test“, který z plné krve měří agonisty indukovanou

agregaci destiček. Přístroj obsahuje optický detektor založený na turbidimetrii a náplně k jednorázovému užití (Smith JW et al., 1999, User manual VerifyNow, 2006).

Vyšetření agregace je zahájeno vložení náplně do přístroje a přidáním zkumavky s 2ml antikoagulované plné krve do komory náplně. Ta obsahuje fibrinogenem obalené partikule a destičkový aktivátor. Pro kontrolu účinnosti ASA je jako induktor používána kyselina arachidonová. Původně byly používány i kationty kovů, propyl gallate, peptid aktivující trombinový receptor a ADP. Aktivované GP IIb/IIIa receptory na destičkách se vážou přes fibrinogen na partikule a způsobují aglutinaci destiček a partikulí. Je měřena prostupnost světla přes komoru a její vzestup jak aglutinované destičky vypadávají z roztoku.

Podáním antiagregačních léků dochází k přímé bloádě GP IIb/IIIa receptorů (GP IIb/IIIa antagonisty) nebo k inhibici tvorby kyseliny arachidonové a ADP a tím ke snížení exprese GP IIb/IIIa receptorů (ASA, thienopyridiny aj.). Dojde ke zmenšení aglutinace destiček, úměrně podle dosažené destičkové inhibice.

Původně byl přístroj vyvinut k monitorování antagonistů receptoru GP IIb/IIIa (abciximab, eptifibatide). Jako agonista se používal peptid aktivující trombinový receptor (iso-TRAP). Výsledky se vyjadřovaly v platelet aggregation units (PAU).

Nyní jsou k dispozici náplně pro měření destičkové odpovědi na Aspirin (VerifyNow® Aspirin) s kyselinou arachidonovou jako agonistou a výsledkem vyjádřeným v aspirin reakčních jednotkách (ARU).

Další variantou je měření pro P2Y<sub>12</sub> antagonisty (VerifyNow® P2Y<sub>12</sub>), tedy pro thienopyridiny, zejména klopidoogrel. Zde je jako agonista používán ADP a dále je navíc přítomen PGE1 jako supresor volného kalcia k oslabení nespecifické vazby ADP na P2Y<sub>12</sub> receptory. Výsledky jsou udávány v reakčních jednotkách P2Y<sub>12</sub> (PRU).

K výhodám metody patří plně automatické provedení, rychlost, jednoduchost, není potřeba vzorek transportovat, není nutná specializovaná laboratoř a stačí malý vzorek krve.

Nevýhodou zůstává částečné ovlivnění výsledku hematokritem a počtem destiček a použití náplní vždy pouze jednorázově a pro specifické léčivo (Harrison P. et al., 2007, Michelson AD, 2009, Gurbel PA et al., 2007).

Test vykazuje mírnou shodu s ostatními testy destičkových funkcí. Opakovaně bylo v literatuře diskutováno nastavení specificity a senzitivity a tím vhodné hraniční hodnoty. Opakovaným testováním s měnícími se agonisty byla stanovena a potvrzena hraniční hodnota pro respondéry na aspirin 550 ARU, resp. na tienopyridiny 550 PRU.

Cílem je bezesporu klasifikace pacientů ve vysokém riziku cévních příhod a tím klinické zhodnocení efektu antiagregační léčby. Paralelně je test využíván k predikci pooperačního krvácení (Paniccia R. et al., 2015).

### **Plateletworks systém**

Jedná se o částečně automatizovanou metodu, kde je měřen počet destiček z plné krve před a po agregaci. Zkumavky s EDTA a citrátem obsahují jako agonisty ADP nebo AA. Dále je využíván tzv. Ichor blood counter (Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA). Metoda porovnává počet destiček v kontrolním vzorku s EDTA se vzorkem agregované citrátové krve po indukci agonisty. Pokles počtu destiček je obrazem rozsahu agregace. Test je rychlý, nevyžaduje přípravu vzorku a výsledek je znám během několika minut. Nevýhodou je nutnost provedení do několika minut po odběru.

Test se využívá při kardiologických invazivních výkonech a slouží k rychlé orientaci o počtu destiček a o jejich funkcích. Spolehlivost byla korelována s ostatními metodami (VN, LTA, trombelastografie), nicméně ověření klinického výstupu zatím chybí (Panicea R. et al., 2015).

### **The Platelet Function Analyzer - PFA 100 /Innovance PFA 200 (Siemens)**

Test byl vyvinut ve snaze napodobit procesy probíhající během poškození cévní stěny a původně měl být použit jako standardizace času krvácivosti.

Přístroj měří pokles průtoku destiček v plné citrátové krvi, které jsou aspirovány pod stálým negativním tlakem do tenké kapiláry s membránou s mikroskopickým otvorem o velikosti 147  $\mu\text{m}$ . Membrána je obalena agonisty (kolagen a epinefrin – tzv. CEPI náplň nebo kolagen a ADP – tzv. CADP náplň). Přítomnost destičkových aktivátorů a smykové napětí ( $5000\text{--}6000\text{ s}^{-1}$ ) za standardizovaných podmínek vedou k adhezi destiček, aktivaci a agregaci, která vede k formaci destičkové zátky v otvoru membrány. Přístroj měří tzv. closure time (CT), čas, po který trvá, než destičky uzavřou otvor v membráně a koreluje ho s celkovým objemem krve použité pro test. Test bývá také nazýván “in vitro bleeding time“, neboť v podstatě napodobuje fyziologické třecí podmínky. Metoda je jednoduchá, rychle odečitatelná (maximální closure time je 300s), nevyžaduje náročnou přípravu vzorků (vyšetření z plné krve) a stačí malé objemy (0,8ml krve na jeden test). Zpracování vzorku je nutné do 4 hodin. PFA-100 je senzitivní k mnohým variabilitám ovlivňujícím destičkovou funkci jako počet destiček, hematokrit, hladina fibrinogenu, lékové a dietní vlivy, defekty destičkových receptorů, defekty vWF a defekty granul.

Metoda je doporučována jako screeningový test, je charakteristická vysokou negativní prediktivní hodnotou, při normálním CT není doporučeno další testování destičkových funkcí.

Dále je využívána i pro management ev. pooperační transfuze krve. Byla pomocí ní vyhodnocována i rizika poporodního krvácení.

Kromě detekce destičkových defektů, je možné test užít k monitoraci protideštičkové terapie. Za typické je považováno prodloužení času při užití CEPI náplně při užívání ASA. Naopak zkrácení CEPI, přes užívání ASA, může být známkou zvýšené destičkové reaktivity a může tak předpovídat vyšší riziko trombotických událostí. To bylo demonstrováno u pacientů s akutním koronárním syndromem a potvrzeno i výsledky LTA (Paniccia R. et al., 2015).

Nová inovace PFA-200 má k dispozici náplně k monitorování terapie thienopyridiny. Bude však potřeba další výzkum ohledně využití metody v predikci trombotických a krvácivých komplikací u různých skupin pacientů (Harrison P., 2005, Harrison P. et al., 2007).

### **IMPACT : Cone and Plate (Let) Analyzer**

Tento nový inovativní test je založen na in vitro aktivaci a adhezi destiček na standardizované desce pokrytém polystyrenem. Rotací kužele na desce je vytvářeno smykové napětí. Používá se plná citrátová krev, automatizované barvicí zařízení a software analyzující obraz. Agregace destiček odpovídá ploše desky pokryté agregáty a velikosti agregátů. Přidáním AA a ADP lze hodnotit i efekt protideštičkové terapie (Paniccia R. et al., 2015).

### **The Global thrombosis test**

Test se přibližuje fyziologickým podmínkám užitím plné krve, bez použití agonistů. Destičky jsou aktivovány smykovým napětím. Plná krev teče do systému plastové trubice, která má

kuželovou část, a kde jsou umístěny dva keramické míče. Výsledkem testu je čas okluze a čas spontánní lýzy trombu. Test ukazuje pacientův trombotický čas (Paniccia R. et al., 2015).

### **Trombelastografie (TEG, neboli platelet mapping system) a trombelastometrie (dříve nazývaná rotační trombelastografie - ROTEM platelet test), Sonoclot analysis**

Tato skupina testů měří fyzikální vlastnosti formace zátky. Principem je graficky zaznamenaná oscilace předmětu ve srážlivé krvi na rozdíl od krve nesrážlivé. Používá se plná krev, výsledek je rychlý a poskytuje data vztahující se k tvorbě zátky. U Sonoclotu je předmět rozkmitáván ultrazvukem. Novější verze měří nejen funkci destiček, ale zároveň podíl destiček na pevnosti zátky a sleduje tak propojení destičkových funkcí, koagulace a fibrinolýzy. Test je modifikován přidáním různých agonistů. Klinické využití v monitorování protideštičkové terapie a v ostatních indikacích vyžaduje další výzkum.

Nově je zkoušena i modifikace ROTEM s impedanční agregometrií (Harrison P., 2005, Paniccia R. et al., 2015, Harrison P. et al., 2007, Michelson AD et al., 2009)

### **Průtoková cytometrie**

Dalším nástrojem, vyvíjejícím se v posledních 30 letech, je průtoková cytometrie. Používá nesrážlivou krev, která reaguje s různými fluorescenčně značenými reagensy. Tato činidla, se specificky vážou k individuálním destičkovým proteinům, granulím a membránovým lipidům, což umožňuje analýzu destičkových funkcí, i destičkových subpopulací, například rozsah jejich aktivace, přítomnost destičkových a leukocyt-destičkových agregátů a podobně (Harrison P. et al., 2007). Po aktivaci destiček dochází ke změnám na jejich povrchu. Protilátky navázané na fluorescenční barviva, mohou vázat specifické proteiny na buněčné

membráně nebo uvnitř, čímž se zviditelní. Světelný zdroj, který prochází přes označené destičky, excituje do vyššího energetického stavu fluorescenční molekuly barviva. Když se fluorochromy vrátí do klidového stavu, vyzařují světelnou energii o různých vlnových délkách. Použití více fluorochromů s podobnou excitační vlnovou délkou, ale různou emisní vlnovou délkou umožňuje měřit více destičkových parametrů (Paniccia R. et al., 2015). Nejčastěji měříme P-selectin na destičkovém povrchu, aktivovaný integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  (GP IIb/IIIa) a leukocytové-destičkové agregáty. Výhodou metody je dostačující malý vzorek plné krve, analýza ve fyziologickém stavu plné krve a možnost standardizace vyšetření. Nevýhodou je jistě cenová a technická náročnost, nutné zkušenosti laboranta a obtížná příprava vzorku s rizikem vzniku artefaktů (Harrison P. et al. 2007).

Nejčastěji je metoda používána pro diagnózu dědičných a získaných destičkových dysfunkcí. Navíc umožňuje rozpoznat prokoagulační stav aktivity destiček, například u akutního koronárního syndromu nebo kardiopulmonálního bypassu, kde je zvýrazněná sekrece fosfatidylserinu na aktivovaných destičkách (použití označeného annexinu V) (Paniccia R. et al., 2015).

Metoda je také využívána ke zhodnocení stavu krevních destiček uložených v krevních bankách (Harrison et al., 2007).

Zcela specifickou metodou v rámci průtokové cytometrie je Phosphorylation of vasodilator – stimulated phospho-protein (VASP) (BioCytex, Marseilles, France), která využívá přímo receptoru  $\text{P2Y}_{12}$ , tedy místa účinku klopidoogrelu (Paniccia R. et al., 2015).

### **Tromboxanové metabolity**

Za fyziologických okolností, pokud jsou destičky stimulovány agonistou je TXA<sub>2</sub> syntetizován a uvolňován z destiček v místě cévního poranění. TXA<sub>2</sub> akcentuje destičkovou aktivaci a zvýrazňuje nábor dalších destiček k místu tvorby destičkové zátky, indukuje vasokonstrikci a akceleruje tak proces hemostázy. TXA<sub>2</sub> a jeho hlavní produkt metabolismu kyselina arachidonová je hydrolyzována na TXB<sub>2</sub>, což je biologicky neaktivní a stabilní produkt. TXB<sub>2</sub> je vyloučen močí po beta-oxidaci nebo dehydrataci, buď jako 2,3-dinor- TXB<sub>2</sub> nebo jako 11- dehydro-TXB<sub>2</sub>. V případě zánětlivého stavu může být TXA<sub>2</sub> produkován nejen destičkami, ale na významu nabývají i mimo destičkové zdroje. ASA, která interferuje s COX-1 aktivitou, způsobuje pokles sérové koncentrace TXB<sub>2</sub> a 11- dehydro-TXB<sub>2</sub> v moči.

Měření metabolitů TXA<sub>2</sub> umožňuje zhodnotit stav aktivace destiček. Sérové a močové TXB<sub>2</sub> metabolity jsou odrazem TXA<sub>2</sub> syntézy a slouží ke zhodnocení destičkové funkce, odhalení defektů tromboxanové produkce a k monitorování aspirinové terapie. Nejčastěji je používána metoda vazby enzymů a protilátek tzv. ELISA (Paniccia R. et al., 2015).

Nevýhodu představuje nepřímé měření, neboť destičky nejsou vyšetřovány přímo. Stanovením v moči přibývá také možné ovlivnění ledvinnými funkcemi a proto je nutná korelace s kreatininem. V moči stanovujeme 11- dehydro-TXB<sub>2</sub> pomocí AspirinWorks®test (Harrison P. et al., 2007, Michelson AD, 2009).

### **Výhledy do budoucna**

Do budoucna jsou zvažovány nové testy používající biochipy a různé adheze. Nabízí se také větší uplatnění fluorescenční mikroskopie a elektronové mikroskopie. Rozšíření imunologických esejí, chromatografie, fluorescenční a průtokové cytometrie umožňuje stanovení jednotlivých metabolitů a molekul na povrchu destiček (např. ATP, ADP, -HT, CXCL12, CD 34, P-selectin a tromboxan) (Paniccia R. et al., 2015).

Přehled nejčastěji používaných testů je uveden v tab. 1.

**Tab. 1.**

**Přehled nejčastěji používaných testů pro monitorování protideštičkové terapie (Michelson AD, 2009).**

| název testu                    | Princip                                                                                                       |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| doba krvácení                  | doba potřebná k zastavení krvácení ze standardního kožního řezu či vpichu                                     |
| optická agregometrie           | změna propustnosti světla jako výsledek agregace indukované agonistou, po centrifugaci a koncentraci destiček |
| VerifyNow®                     | změna propustnosti světla jako výsledek agregace indukované agonistou, z plné krve, automatický test          |
| impedanční agregometrie        | impedance mezi dvěma elektrodami v průběhu adheze a agregace destiček indukované agonisty                     |
| Platelet Function Analyzer-100 | rychlost uzavěru otvoru v membráně destičkovou zátkou za indukce agonisty a smykovým napětím                  |
| Trombelastografie,             |                                                                                                               |
| Platelet Mapping systém.       | testování pevnosti destičkové zátky, změna oscilace předmětu v různě srážlivé krvi                            |
| průtoková cytometrie           | detekce značených glykoproteinů a markerů aktivace destiček při agregaci                                      |
| AspirinWorks®test              | stanovení 11- dehydro-TXB <sub>2</sub> v moči, imunoassay                                                     |

## **Úskalí testování destičkových funkcí**

Při testování destičkových funkcí překonáváme mnohé překážky, abychom získali pokud možno přesné a smysluplné výsledky. Mnoho testů destičkových funkcí není dostatečně standardizováno. Různé laboratoře často používají panely různých agonistů v různých koncentracích. Standardní rozmezí jsou stanovována různě. Normální destičkové funkce jsou závislé na kalciumu, takže antikoagulace krevního vzorku kalciovou chelací může výrazně ovlivnit výsledek. Většina laboratoří používá testy, které vyžadují citrátové krevní vzorky v úzkém časovém okně, cca do 2 hodin. Kvalita vzorku, teplota, stáří a manipulace s ním mohou při analýze způsobit významné artefakty. Destičky jsou citlivé k arteficiální aktivaci, ale též je možná desenzitizace. Je důležité minimalizovat tato rizika při odběru krve, antikoagulaci, transportu vzorku a analýze v laboratoři. Zajištění kvality vzorku je velmi důležité před prováděním jakéhokoliv testu destičkové funkce (Harrison P., 2005).

Klíčové je též vytvoření doporučení, která umožní standardizaci jednotlivých metod.

## **Volba testu agregace destiček**

Byly stanoveny referenční testy pro stanovení agregace v závislosti na ASA. Jsou to nejspecifičtější metody závislé přímo na COX-1 a tvorbě tromboxanu, které užívají jako agonistu kyselinu arachidonovou. Patří sem tyto metody: AA indukovaná LTA, impedanční agregometrie, trombelastografie, Platelet Mapping systém a VerifyNow. Pro tyto metody byly stanoveny hraniční hodnoty, které klasifikují pacienty na respondéry a non-respondéry. Většina těchto hraničních hodnot je stažena k optické či impedanční agregometrii indukované arachidonovou kyselinou. Nízká odpověď na ASA je definovaná jako hodnota nad 10-20 %

měřeno optickou agregometrií nebo nad  $0\Omega$  cestou impedanční agregometrie. Nicméně dosud nebylo potvrzeno, že jsou nastavené hraniční hodnoty schopny identifikovat populace s jiným rizikem cévních komplikací.

Nejpřesvědčivějším testem pro stanovení biologického efektu ASA je měření sérových koncentrací  $TXB_2$ . Je indexem maximální kapacity destiček produkovat tromboxan a je tak senzitivní k biochemickému efektu ASA. Nicméně destičková agregace závisí na TX cestě v různé míře, podle typu aktivačního stimulu a roli hraje též interindividuální variabilita. Navíc tromboxan stanovený v moči částečně reflektuje mimodeštičkovou produkci TX, kterou ASA neovlivňuje. Proto nemůže být test používán ke klinické identifikaci malé odpovědi destiček na ASA.

Některé testy stanovují agregaci jako celek a mohou být pouze přibližně aplikovány na zjištění konkrétní blokády dráhy protideštičkovým lékem. Jiné testy cíleně ověřují blokádu konkrétní dráhy daným lékem.

Biochemické testy tak odhalí, zda lék dosáhl svého molekulárního cíle, funkční testy odhalí rozsah, s jakým změnil destičkovou funkci. Obě otázky jsou jistě správné, ale nejsou dostatečně komplexní k terapeutickému rozhodnutí.

Termín laboratorní rezistence je doporučeno používat v situacích, kdy očekávaný efekt protideštičkového léku není dosažen kvůli změnám, v cílovém receptoru či enzymu, tedy ve smyslu farmakodynamické rezistence. Pro výsledky nespecifických testů je doporučen termín zvýšená destičková reaktivita při léčbě a je doporučeno výsledek ověřit specifickými testy (Kuliczowski W. et al., 2009).

V současné době není shoda na použití jednoho destičkového testu, který by mohl být užíván v rutinní denní praxi pro monitoraci destičkových funkcí. Navrhuje se kombinace více testů jako screeningová metoda efektivity protideštičkové terapie, což výrazně zvyšuje náklady na

léčbu. Je například možné navýšit dávku ASA při zjištění laboratorní rezistence nebo přidat agonisty ADP receptoru či novější protideštičkové léky. Je však známo, že pacienti hůře reagující na ASA (podle testů agregability destiček) často neodpovídají ani na klopidoogrel. Není jasné, zda je laboratorní rezistence absolutní nebo variabilní v čase (Pamukcu B., 2007).

## **1.9 ASPIRINOVÁ REZISTENCE (AR) NEBO LI INTERINDIVIDUÁLNÍ VARIABILITA**

### **Definice a dělení**

Aspirinovou rezistenci (AR), tedy v podstatě nedostatečný protideštičkový efekt ASA, můžeme definovat různě (Fauknerová M. et al., 2011). Obecně termín rezistence znamená, že látka není schopná ovlivnit svůj farmakologický cíl, ať už vzhledem k neschopnosti ho dosáhnout či vzhledem k alteraci cíle (Tousoulis D et al., 2009). Termín aspirinová rezistence byl nicméně využíván k popisu množství různých fenoménů včetně neschopnosti ASA ochránit jedince před trombotickými komplikacemi, neschopnosti prodloužit čas krvácivosti, redukovat produkci TXA<sub>2</sub> nebo vyvolat typický efekt na jeden nebo více in vitro testů destičkových funkcí (Patrono C. et al., 2008).

V poslední době je mnohými autory tento termín považován za zavádějící, neinformující o příčině. Doporučuje se proto používat spíše termín interindividuální variability, jako vyjádření různé individuální odpovědi na protideštičkovou léčbu (Rocca B., Patrono C., 2005).

Nejrozšířenější je dělení rezistence na klinickou a laboratorní. Za klinickou AR je považována přítomnost trombotických a embolických projevů přes ASA terapii. Laboratorní AR je definována jako in vitro nedostatečně blokováná destičková reaktivita přes užívání protideštičkových léků neboli neschopnost ASA inhibovat COX-1 dependentní produkci

TXA<sub>2</sub> a tím redukovat destičkové funkce závislé na TXA<sub>2</sub> (Pamukcu B., 2007, Tousoulis D. et al., 2009).

### **Mechanismy aspirinové rezistence**

Mechanismy aspirinové rezistence můžeme rozdělit na dvě větší skupiny. V první skupině jsou možné vnější faktory vyvolávající aspirinovou rezistenci a druhá velká skupina reprezentuje faktory vnitřní.

- 1) Z vnějších faktorů, které způsobují rezistenci, jsou nejdůležitější „non-compliance“, tedy nedisciplinované narušování léčby (nicméně pokud pacient lék neužívá, nemůžeme očekávat jeho efekt a nejedná se o rezistenci v pravém slova smyslu). Dále je to kuřáctví, které zvyšuje destičkovou reaktivitu, případně i snižuje sekreci oxidu dusnatého. Rezistence na ASA byla častěji pozorována u žen a u starších osob (Sztriha LK et al., 2004). Průběžně vyšší ochota k agregaci je způsobena nižší hladinou testosteronu (Biller J., 2008) a vyšším počtem destiček v cirkulaci (Tousoulis D., 2009).
- 2) Faktory vnitřní rozdělujeme na farmakokinetické a farmakodynamické mechanismy vzniku rezistence.
  - a) První překážkou může být neadekvátní absorpce ASA při podání enterických obalovaných tablet. Kromě vrozených dispozic ve střevní stěně, nastává podobná indispozice také při současném podání nesteroidních antirevmatik (NSA). Např. ibuprofen či naproxen interagují s ASA kompeticí o cíl acetylace COX. To se stane kompeticí o běžné vazebné místo arginin-120, ke kterému se ASA váže s menší afinitou před ireverzibilní acetylací serinu-529. Tato farmakodynamická interakce se neobjevuje u rofecoxibu,

celecoxibu a diclofenacu, tedy léků se selektivitou ke COX-2. Pro pacienty na ASA se proto doporučuje užívat z NSA diclofenac, nebo selektivní inhibitory COX-2. Inhibiční efekt samotných NSA na agregaci se liší podle dávky a studie o jeho efektu si protiřečí (Patrono C. et al., 2008, Pamukcu B., 2007, Sztriha LK et al., 2005).

b) Aspirinová rezistence může být též důsledkem zvýšené produkce nových, aktivnějších destiček, na něž jedna dávka ASA denně nestačí (Gurbel PA. et al., 2007). Zvýšený destičkový obrat je přítomen například u myeloproliferativních onemocnění či při větších chirurgických výkonech (Tousoulis D. et al., 2009). Rezistence je zde způsobena přechodnou expresí COX-2 v nově formovaných destičkách.

c)  $\text{TXA}_2$  produkovaný z monocytů či makrofágů může též přispět ke zvýšené agregaci při akutních koronárních syndromech a byl zaznamenán i u pacientů s demencí po CMP (Patrono C. et al., 2008, Patrono C., 2003, Rocca B., Patrono C., 2005). Navíc monocyty, makrofágy a endotelové buňky poskytují prostaglandin  $\text{H}_2$  transcelulárně destičkám a obcházejí tak COX-1. Existuje i studie, demonstrující zvýšenou tvorbu destičkových eikosanoidů, které podporují uvolňování komponent destičkových granul a indukují nábor destiček z mikroprostředí k tvorbě trombu na základě indukce erytrocyty (Pamukcu B., 2007).

d) Některé studie tvrdí, že destičky ASA non-responderů jsou citlivější ke kolagenu a hypersenzitivní k ADP (Kawasaki T. et al., 2000, Macchi L. et al., 2006). Tedy převažují zde na ASA nereagující dráhy aktivace agregace.

e) ASA nedokáže ovlivnit agregaci indukovanou katecholaminy; indukce agregace cvičením či mentálním stresem zůstává tedy ASA neovlivnitelná (Pamukcu B., 2007).

f) Ateroskleróza jako zánětlivé onemocnění zvyšuje expresi COX-2 stimulací endotelových buněk a monocyto-makrofágového systému. Vzhledem k tomu, že je COX-2 méně senzitivní k ASA, může její větší exprese vést k rezistenci. Navíc destičky, obsahující COX-2, mohou za určitých podmínek amplifikovat její expresi (Kuliczkowski W. et al., 2009, Sztriha LK. et al. 2004).

g) Velkou skupinu mezi ASA rezistentními osobami představují genetické polymorfismy COX, tzv. single nucleotide polymorphisms (SNPs). Jsou to polymorfismy COX-1 genu, které ovlivňují část agregace, závislou na arachidonové kyselině. Také geny kódující hlavní destičkové glykoproteinové receptory jsou variabilní a jejich polymorfismus může způsobit pokles inhibičního efektu. Projeví se tak např. zvýšenou destičkovou odpovědí na kolagen nebo poklesem prahu pro aktivaci destiček a uvolňování obsahu z granul (Sztriha LK. et al., 2005).

h) Aktivátory agregace nezávislé na tromboxanu (ADP, serotonin, trombin, smykové napětí a prozánětlivé proteiny např. CD40L) mohou též způsobit, že se ASA neprosadí. Podobně isoprostany, produkované z kyseliny arachidonové neenzymatickým procesem peroxidace lipidů, nezávislým na ASA, též zvyšují agregaci a navíc způsobují vazokonstrikci (Pamukcu B., 2007).

- i) Popisuje se též menší účinnost ASA při hypertenzi nad 145 mm Hg systoly, při vyšších koncentracích cholesterolu, u pacientů s diabetem a obezitou (metabolický syndrom) (Sztriha LK. et al., 2005) (Tab.2).

**Tab. 2**

---

**Přehled hlavních mechanismů aspirinové rezistence**

---

1.vnější

faktory: non-compliance

---

Kouření

---

2. vnitřní

faktory: neadekvátní absorpce ASA (např. při užití NSA)

---

zvýšená produkce nových destiček s expresí COX-2 (např. chirurgický výkon)

---

---

produkce TXA<sub>2</sub> monocyty a makrofágy (např. při akutním koronárním syndromu)

---

---

ateroskleróza - stimulace monocyto-makrofágového systému a endotelu, exprese COX-2

---

---

převaha aktivátorů agregace nezávislých na tromboxanu (ADP, serotonin, trombin, smykové napětí, katecholaminy atd.)

---

---

ateroskleróza - stimulace monocyto-makrofágového systému a endotelu, exprese COX-2

---

|                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------|
| genetické polymorfismy COX-1, glykoproteinových receptorů         |
| indukce agregace erytrocyty                                       |
| oxidativní stres - neenzymatická tvorba isoprostanů               |
| obezita, diabetes mellitus, arteriální hypertenze, hyperlipidémie |

### **Vznik fenoménu aspirinové rezistence**

Přes chronickou protidestičkovou terapii, kterou užívají miliony pacientů po celém světě, se stále u části těchto nemocných objevují nové aterotrombotické příhody. Antiagregační léčba rozvoj aterosklerotických komplikací pouze zpomalí. Důležité je zjistit, u kterých nemocných antiagregace nepůsobí.

Původní studie popisovala skupinu 180 pacientů po iktu, která užívala 500 mg ASA třikrát denně. Jedenáct procent z těchto pacientů mělo tzv. zvýšenou destičkovou reaktivitu (high platelet reactivity – HPR). Při dvouletém sledování se objevila významná cévní příhoda u 4 % pacientů bez HPR a u 40 % pacientů s HPR (Grote Meyer KH. et al., 1993). Následovaly podobné studie u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, ukazující na možnou souvislost mezi reziduální destičkovou aktivitou, měřenou laboratorně a klinickým nezdarem. Tak vznikl fenomén aspirinové rezistence založený na teorii, že laboratorně zjištěná rezistence k protidestičkové terapii může být podkladem klinických recidiv (Fontana P et al., 2020).

Ateroskleróza, jak ji známe, je natolik komplexní proces, že bloádou pouze jednoho jejího mechanismu, tedy vlivu na destičkové funkce, nemůžeme anulovat celý proces a jeho konsekvence. Proto nelze očekávat, že protidestičkové léky ochrání všechny pacienty od aterotrombotických komplikací. To samé platí analogicky i pro hypotenziva nebo hypolipidemika. Nicméně tyto léky můžeme lépe klinicky a laboratorně monitorovat a dávky

léků titrovat dle efektu. Měření antiagregace nedosáhlo plné standardizace a je stále pouze pomocným nástrojem i po více než 40 letech intenzivního výzkumu.

### **Prevalence a variabilita AR**

Prevalence aspirinové rezistence je udávána v rozmezí od 0 - 57 %. Extrémní variabilita v prevalenci rezistence je odrazem variability definic, variací v laboratorních testech, pravděpodobnosti pre-analytických a analytických chyb, dále v heterogenitě různých studovaných skupin, rozdílech v používaných protokolech, dávkování léků a v nedostatku předdefinovaných hraničních hodnot.

Pokud redukuje data pouze na ta, vycházející ze studií, vyšetřujících agregaci indukovanou arachidonovou kyselinou anebo měřením TX, pohybuje se průměrná prevalence AR na ASA kolem 6 %. Byla publikována 6 % prevalence současné rezistence na ASA a klopido-grel. Nicméně nelze přesně stanovit prevalenci rezistence. Je nutno si uvědomit, že v současnosti užívané protidestičkové léky nevynulují agregaci a destičky nejsou jedinou příčinou recidivy cévních příhod (Kuliczowski W., 2009). Navíc kompletní likvidace agregace není ani žádoucí, protože agregační schopnost pacienta musí být v jeho protikrvácivé bezpečnosti zachována.

### **Variabilita protidestičkového efektu ASA v čase.**

Protidestičkový efekt fixní dávky ASA se může v průběhu času měnit. Byla například pozorována eskalace naměřených hodnot z částečné do kompletní inhibice agregace. Mimo to byla zjištěna i vyšší destičková reaktivita v akutní fázi cévních onemocnění, ale není jasné, zda je tento fenomén příčinou, či následkem akutní příhody (Gurbel PA., et al., 2007).

## **Vztah dávky a rezistence**

Z terapeutického hlediska by bylo žádoucí ověřit, zda rezistence na ASA může být překonána zvýšením dávky. V některých případech bylo publikováno překonání rezistence vyššími dávkami léčiva. Například dle studie Aspirin Induced Platelet Effect Study (ASPECT) byl zaznamenán pokles agregace závislý na dávce u pacientů se stabilní ICHS (Sztriha LK. et al., 2005). Vysvětlením však může být i možná variabilita ve farmakokinetice léku a ne pravá farmakodynamická rezistence.

Různé laboratorní metody ukázaly, že určité procento pacientů nedosáhne předdefinované úrovně inhibice destičkové agregace přes užívání protideštičkových léků. I při testování odpovědi na lék u zdravých jedinců většina pacientů na lék reaguje, malé procento reaguje více než ostatní a někteří pacienti odpovídají na lék méně. Počet málo odpovídajících jedinců klesá s navýšením dávky, ovšem zde také stoupají nežádoucí účinky.

Dostatečný efekt ASA vyžaduje blokádu 95 % destičkové COX-1 aktivity. Toho lze u mnohých dosáhnout již při podání 30 mg ASA denně. U respondérů není zvyšování na 80 – 100 mg zapotřebí, neboť více než kompletní inhibice COX-1 dependentní tvorby TX nelze dosáhnout. COX-2 závislá tvorba tromboxanu ve zralých destičkách není dostatečná k inhibici destičkové funkce. Laboratorně měřená nekompletní odpověď na ASA by měla být vzácná. Problémem je dosažení efektivní a klinicky relevantní destičkové inhibice s akceptovatelnou bezpečností.

Ač laboratorně stanovené hodnoty po zvýšení dávky ASA u původně rezistentních či inkompletně reagujících jedinců potvrzují v určitém procentu překonání rezistence, nebyl tento efekt potvrzen ve velkých populačních studiích (Sztriha LK. et al., 2005, Fontana P., et al., 2020). Narážíme zde na rozdíl mezi laboratorní a klinickou rezistencí.

## **Klinická vs. laboratorní rezistence**

Klasifikovat tzv. „selhání léčby“ při mozkovém iktu za léčby ASA nemá své logické opodstatnění. Podobně jako není zaručeno vymýcení iktů normalizací krevního tlaku nebo cholesterolu, nemůže v celém multifaktoriálním komplexu ani úspěšná antiagregace zaručit trvalé zdraví. Laboratorní rezistence nemusí končit ischemickými příhodami a pacienti s ischemickou příhodou přes protidestičkovou terapii nemusí být laboratorně rezistentní. Nicméně v určitém variabilním procentu dochází přesto k překryvu těchto pacientů. Nelze proto propojit termín klinické a obecné aspirinové rezistence (Gurbel PA. et al., 2007).

Jsou ASA rezistentní osoby více ohroženy mozkovým ischemickým iktem? Ano, existují studie, potvrzující vyšší riziko vaskulárních událostí či smrti. Nicméně, tyto studie zvažují častěji spíše celková vaskulární rizika, obsahují malá množství pacientů a často používají nereferenční metody měření agregace a různé dávky ASA (Patrono C. et al., 2008, Sztriha LK. et al., 2005, Grottemeyer KH. et al., 1993, Eikelboom JW. et al., 2002, Gum PA. et al., 2003, Grundmann K. et al., 2003).

Selhání léčby pak v kontextu multifaktoriální etiologie aterotrombózy není důvodem ke změně léčby. Navíc, druhá cévní ischemická příhoda může mít zcela jinou příčinu než první, a výměna léčby není prokázána jako efektivnější než stávající terapie (Rocca B. and Patrono C., 2005).

## **1.10 SOUČASNÁ DOPORUČENÍ STRAN ANTIAGREGAČNÍ TERAPIE V PRIMÁRNÍ, SEKUNDÁRNÍ A SPECIFICKÉ LÉČBĚ CMP**

### **Antiagregace v primární prevenci CMP**

U žen ve věku 45 a více let, u kterých není zvýšené riziko intracerebrální hemoragie a které mají dobrou gastrointestinální toleranci, je doporučena nízká dávka ASA. Její účinnost je ale nízká (třída I, úroveň A).

Je doporučeno, aby podávání nízké dávky ASA bylo zváženo u mužů v primární prevenci infarktu myokardu (IM). ASA však nesnižuje riziko ischemického iktu (třída I, úroveň A).

Jiné antiagregační látky než ASA nejsou v primární prevenci iktu doporučeny (třída IV, GCP).

ASA může být doporučena pacientům s nevalvulární fibrilací síní (FS) mladším 65 let, u kterých nejsou přítomny vaskulární rizikové faktory (třída I, úroveň A).

U pacientů s nevalvulární FS ve věku 65 - 75 let, u kterých nejsou přítomny vaskulární rizikové faktory, je doporučena ASA nebo perorální antikoagulace (INR 2,0 – 3,0) (třída I, úroveň A).

Je doporučeno, aby pacientům s FS, kteří nemohou užívat antikoagulancia, byla podávána ASA (třída I, úroveň A).

U pacientů s asymptomatickou stenózou arteria carotis interna > 50 % je doporučena nízká dávka ASA s cílem snížení rizika cévních mozkových příhod (třída II, úroveň B).

### **Antiagregační léčba v sekundární prevenci**

Je doporučeno, aby byla pacientům podávána antitrombotická terapie (třída I, úroveň A).

Je doporučeno, aby pacientům nevyžadujícím antikoagulaci, byla podávána antiagregační terapie (třída I, úroveň A). Má být podávána kombinace ASA a dipyridamolu nebo samotný klopido­grel. Alternativně je možno použít samostatně ASA nebo triflusal (třída I, úroveň A).

Kombinace ASA a klopido­grelu není u pacientů s nedávným ischemickým iktem doporučena, s výjimkou pacientů se specifickými indikacemi (např. nestabilní angina pectoris nebo non-Q IM nebo nedávno provedený stenting). Léčba má být podávána po dobu až 9 měsíců po příhodě (třída I, úroveň A). U pacientů s rozvojem iktu při užívání antiagregační terapie je doporučeno znovu posoudit patofyziologii vzniku iktu a vliv rizikových faktorů (třída IV, GCP).

Pokud je kontraindikovaná perorální antikoagulace, je doporučeno podání kombinace nízké dávky ASA a dipyridamolu (Třída IV, GCP).

Léčba pacientů s recidivou cévní mozkové příhody na antiagregační terapii zůstává nejasná. Je třeba hledat příčiny iktu a vliv rizikových faktorů. Mohou být zváženy další terapeutické strategie: ponechat léčbu beze změny, převést na jiné antiagregancium, přidat další antiagregancium nebo použít perorální antikoagulaci.

### **Antiagregační terapie v rámci specifické akutní léčby CMP**

Je doporučeno podání ASA (úvodní dávka 160 - 325 mg) během 48 hodin po ischemickém iktu (třída I, úroveň A).

Je doporučeno, aby v případě plánování nebo podání trombolytické léčby, nebyla zahájena terapie ASA nebo jinými antiagregancii v průběhu prvních 24 hodin (třída IV, GCP).

Užití jiných antiagregancií (samostatně nebo v kombinaci) není u akutního ischemického iktu doporučeno (třída III, úroveň C).

Podání inhibitorů glykoproteinu IIb-IIIa není doporučeno (třída I, úroveň A). (ESO guidelines 2008).

## 2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Podle výsledků Antithrombotic Trialists' Collaboration je ASA protektivní u většiny pacientů, kteří jsou ve zvýšeném riziku aterosklerotických cévních příhod; ASA redukuje kombinovaný outcome pro jakoukoliv vážnou cévní příhodu o jednu čtvrtinu, speciálně pro infarkt myokardu o jednu třetinu, pro nefatální CMP o jednu čtvrtinu a cévní mortalita je redukována o jednu šestinu (bez zvýšení nežádoucích účinků či jiné smrti) (Antithrombotic trialists'collaboration, 2002, 1994). Tyto výsledky se obvykle chápou jako počet neproběhlých srdečních infarktů a ischemických iktů na terapii ASA ve srovnání s jedinci užívajícími placebo. Nicméně nejedná se o vyjádření účinku ASA na hemostázu jako takovou. Na rozdíl od dobře zavedeného měření a sledování efektu antikoagulační léčby (Bauer J., 2010), je sledování farmakoefektivity, farmakodynamiky a ev. farmakorezistence při podávání ASA obtížné. Problematická je zejména závislost trombocytů na mnohých humorálních a fyzikálních faktorech, možné změny agregace v čase, rozdíly v agregaci stanovené různými metodami a závislost výsledků na způsobu podání ASA. Stále nám tak chybí dostatečné informace pro volbu správné dávky a cesty podání ASA a stejně tak pro detekci a zvládnutí různých reaktivit na zvolené léčbě.

V rámci studia agregometrie, efektivity léčby ischemických iktů a možnosti monitoringu léčby jsme blíže prozkoumali 3 oblasti:

1. Prvním cílem naší práce bylo ověřit reprodukovatelnost naměřené agregace, prozkoumat efekt podání různých dávek a různých forem ASA na destičkovou agregaci a zároveň srovnat destičkovou agregaci po jednotlivé nebo po opakované dávce ASA u zdravých dobrovolníků a u pacientů po ischemickém iktu. K těmto měřením jsme zvolili bed-side metodu VerifyNow. Zajímalo nás především, zda je efekt běžně podávané ASA v akutní či chronické terapii iktů dostatečný, zda je

efektivnější perorální či intravenózní podání a jaký vliv má dávka a opakované podání ASA na agregabilitu.

2. Vlastní monitorování antiagregační terapie je stále přes mnohaletý výzkum velmi problematickou oblastí. Za druhý cíl, jsme proto u našich pacientů zvolili srovnání agregací měřených dvěma různými metodami. Jako zlatý standard jsme použili optickou agregometrii a porovnávali jsme získaná data s již dříve zmiňovanou bedside metodou, fungující též na optickém principu, tedy s metodou VerifyNow. Měření jsme prováděli u pacientů po ischemickém iktu. Zajímalo nás, zda budou výsledky korelovat a zároveň zda kombinace dvou metod dokáže přinést spolehlivější výsledky agregace destiček.

Použití více induktorů u klasické optické agregometrie navíc nabízí možnost zkoumat různé cesty agregace a jejich ovlivnění. Umožňuje tak nahlédnout více do patofyziologie agregace. Nabízí se průzkum agregability po indukci různými induktory u pacientů užívajících antiagregační léčbu, v našem případě ASA. Hledali jsme odpověď na otázku, zda existuje typický obecný vzorec ovlivnění agregace po jednotlivých induktorech.

3. Dodatečně nás při studiu možností monitorování antiagregační léčby zaujala problematika pacientů na antikoagulační léčbě a možnosti stanovení dopadu léčby na jejich agregabilitu. Použitím metody klasické optické agregometrie s vybranými agonisty a VerifyNow s AA jako induktorem jsme i u těchto pacientů zjišťovali, zda je možno zjistit efekt antikoagulační terapie na ovlivnění agregace jako takové.

Warfarin je kumarinový derivát, který inhibuje konverzi vitamínu K na redukovanou formu. Ta je nezbytná pro tvorbu aktivních karboxylovaných koagulačních faktorů II, VII, IX a X (Hirsh et al., 2003). Při účinné léčbě warfarinem tak vznikají částečně dekarboxylované koagulační faktory s redukovanou koagulační aktivitou. Warfarin je

doporučen k prevenci a léčbě žilní, tepenné a nitrosrdeční trombózy a k redukci rizika ischemické cévní mozkové příhody u pacientů s fibrilací či flutterem síní nebo srdeční chlopenní vadou (Wigle P. et al. 2013).

Předpokládali jsme, že pokud je warfarinem narušen mechanismus koagulace a je tak omezena tvorba fibrinu jako konečného produktu v koagulační kaskádě, bude i agregace snížena narušením vzájemné adheze trombocytů přes chybějící fibrinové můstky.

Nečetné publikované studie z literatury odkazují spíše na stimulační či žádný efekt warfarinu při testování agregace u warfarinizovaných pacientů (MieszczaK a Winther K., 1996, Ferreira CN. et al., 2002, Kawahito K. et al., 2002). Více zkušeností s ovlivněním agregace antikoagulancii pochází z poslední doby ve studiích s použitím nových orálních antikoagulancií (NOAC). I zde nejsou ovšem výsledky jednoznačné, část z nich sice poukazuje na sníženou agregaci destiček spolu se sníženou koagulací (Sokol J. et al., 2018, Nehaj F. et al., 2018, Shimizu M. et al., 2020, Nehaj J. et al. 2018), ale jiné opět prokazují zvýšenou agregabilitu nebo žádný efekt (Olivier CB. et al., 2016, Martischnig AM. et al., 2015, Olivier CB. et al., 2016). Porovnání studií je složité, jednotlivé práce se liší použitými metodami, agonisty, jejich koncentrací i rozdílnými skupinami zvolených pacientů.

Zda je možné dle výsledků agregace tzv. přizpůsobit léčbu na míru danému pacientovi, eventuálně ho zařadit mezi pacienty s vysokou nebo nízkou reaktivitou na léčbě ASA, je stále problematická otázka vyžadující průzkum. Názory odborníků se v průběhu let vyvíjely a zejména výsledky velkých populačních studií v posledních letech nejvíce přispěly k současným mezinárodním doporučením v této oblasti.

Nesporné zůstává, že cévní události vzniklé během léčby aspirinem, nemohou být považovány za ukazatel rezistence na danou léčbu. Rizikové faktory vedoucí k recidivě cévní

události jsou komplexní a účinnost antiagregační léčby je pouze jedním z mnoha faktorů. Neodpovídavost na ASA by tak měla být klasifikovaná podle agregometrického, eventuálně biochemického, měření získaného spolehlivou metodou, jistě ne počítáním ischemických událostí.

### **3. MATERIÁL A METODIKA**

Studie byly schváleny etickou komisí Fakultní nemocnice královské Vinohrady a probíhaly podle principů Helsinské deklarace. Všichni účastníci podepsali informovaný souhlas

#### **3.1 STUDIE 1 (Chýlová M. et al., 2015)**

Studie 1 se zúčastnilo 22 zdravých dobrovolníků a 30 pacientů po ischemickém iktu v anamnéze. Základní charakteristiky studované populace jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tabulka 3. Základní charakteristiky studovaných zdravých dobrovolníků a pacientů**

#### **Zdraví dobrovolníci (N = 22)**

|                        |             |
|------------------------|-------------|
| Průměrný věk (rozmezí) | 36 (21- 65) |
| Muži/ ženy             | 9/ 13       |
| Hyperlipidemie         | 7 (35 %)    |
| Kouření                | 6 (27 %)    |

#### **Pacienti (N = 30)**

|                        |            |
|------------------------|------------|
| Průměrný věk (rozmezí) | 64 (48-74) |
|------------------------|------------|

|                               |                                |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Muži/ ženy                    | 14/ 16                         |
| Arteriální hypertenze         | 24 (80 %)                      |
| Onemocnění koronárních tepen  | 7 (23 %)                       |
| Diabetes mellitus             | 6 (20 %)                       |
| Hyperlipidemie                | 16 (53 %)                      |
| Chronické ledvinné onemocnění | 2 (7 %)                        |
| Kouření                       | 3 (10 %)                       |
| Počet trombocytů: průměr (SD) | 238 x 10 <sup>9</sup> / l (62) |

Poznámka:

N = celkový počet, SD = směrodatná  
odchylka

Ke zhodnocení tíže postižení způsobeného ischemickým iktem jsme používali National Institutes Health Stroke Scale (NIHSS). Čtyřicet procent (12) pacientů mělo při propuštění z nemocnice NIHSS 0, tedy normální neurologický nález. Dvacet procent (6) pacientů mělo NIHSS 1, 30 % (9) NIHSS 2, 6,7 % (2) NIHSS 3 a 3,3 % (1) NIHSS 4. U všech pacientů se tedy jednalo o lehčí deficit a vzhledem k tomu jsme korelaci aspirinové reaktivity a tíže iktu nebo velikosti ischemie neprováděli.

Zdraví dobrovolníci byli starší 18 let a bez jiných onemocnění. Vyloučeny byly osoby s intolerancí ASA, těhotné, osoby užívající jiné léky se známým vlivem na agregaci (např. NSA), osoby s trombocytopenií (méně než  $100 \times 10^9 / l$ ), s hemoglobinem pod 80 g/l, hematokritem pod 25 %, kreatininem nad 4 mg/dl nebo s krvácivými chorobami, gastrointestinálním krvácením a koagulopatiemi v anamnéze. Také osoby, které prodělaly chirurgický výkon v předcházejícím týdnu, byly vyloučeny.

Pacienti byli starší 18 ti let a více než měsíc po ischemickém iktu a byli léčeni 100 mg ASA denně. Pacienti neužívali jiné antikoagulační léky a netrpěli jiným akutním onemocněním.

#### Podání ASA ve studii 1

U zdravých dobrovolníků byla agregace měřena dvakrát před podáním ASA (s  $24 \pm 4$  hodinovým odstupem mezi testy) a poté 2 hodiny po podání rozdílné jednotlivé dávky ASA. Podávali jsme 500 mg ASA perorálně, 500 mg ASA intravenózně a 100 mg ASA perorálně. Navíc byla měřena agregace po podání 100 mg ASA denně a to 5 dní po sobě, u zdravých dobrovolníků a poté u pacientů na chronické terapii 100 mg ASA denně. Intervaly mezi jednotlivými testy byly delší než 10 dní, abychom vyloučili vliv předchozí dávky ASA (Alušík Š. et al., 2010).

#### **3.2 STUDIE 2 (Chýlová M. et al., 2014).**

Studie 2 se zúčastnilo 30 pacientů s anamnézou ischemického iktu, před více než měsícem. Pacienti užívali dlouhodobě 100mg ASA denně. Poslední dávka ASA byla podána v obvyklý čas, kdy pacient lék užívá. Pacienti užívající jiné antiagregační léky nebo pacienti s jiným akutním onemocněním byli vyloučeni. Základní charakteristika skupiny pacientů je uvedena v tabulce 4.

**Tabulka 4. Základní charakteristika pacientů na chronické terapii ASA (N = 30)**

|                                                |                                |
|------------------------------------------------|--------------------------------|
| Průměrný věk (rozmezí)                         | 64 (48-74)                     |
| Muži/ženy                                      | 14/ 16                         |
| Arterialní hypertenze                          | 24 (80%)                       |
| Onemocnění koronárních tepen                   | 7 (23%)                        |
| Diabetes mellitus                              | 6 (20%)                        |
| Hyperlipidémie                                 | 16 (53%)                       |
| Chronické onemocnění ledvin                    | 2 (7%)                         |
| Průměrný počet trombocytů (SD)                 | 238 x 10 <sup>9</sup> / l (63) |
| Průměrná počet trombocytů po centrifugaci (SD) | 263x 10 <sup>9</sup> / l (77)  |

Poznámka: N = celkový počet, SD = směrodatná odchylka

### **3.3 STUDIE 3 (Chýlová M. et al., 2021)**

Studie 3 se týkala pacientů na dlouhodobé antikoagulační terapii warfarinem. Celkem bylo zařazeno 24 pacientů s kardiostimulátorem nebo defibrilátorem, s chronickou ischemickou chorobou srdeční. Pravidelné kontroly INR probíhaly dvakrát měsíčně. Pacienti neužívali jiné antiagregační či antikoagulační léky, neprodělali recentně ischemickou příhodu a netrpěli žádným akutním onemocněním. Základní charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 5.

**Tabulka 5. Základní charakteristika pacientů na dlouhodobé terapii warfarinem (N = 24)**

|                                                 |                                 |
|-------------------------------------------------|---------------------------------|
| Průměrný věk (rozmezí)                          | 79 (58–92)                      |
| Muži/ženy                                       | 14/ 10                          |
| Arterialní hypertenze                           | 11 (46 %)                       |
| Kardiostimulátor nebo implantovaný defibrilátor | 24 (100 %)                      |
| Arytmie                                         | 19 (79 %)                       |
| Chlopenní vady                                  | 6 (25 %)                        |
| Onemocnění koronárních tepen                    | 9 (38 %)                        |
| Onemocnění periferních tepen                    | 3 (13 %)                        |
| Diabetes mellitus                               | 8 (33 %)                        |
| Hyperlipidémie                                  | 16 (67 %)                       |
| Počet trombocytů(SD)                            | 187.5 (SD 60.6) $\times 10^9/l$ |

Poznámka: N = celkový počet, SD = směrodatná odchylka

Pomocí dvou metod měření agregace jsme zjišťovali, zda byla při antikoagulační léčbě ovlivněna též agregace a zda jsem schopni tuto změnu zaznamenat.

Compliance byla ve všech studiích zajišťována a kontrolována osobním rozhovorem.

### **3.4 ODBĚRY KRVE A NAKLÁDÁNÍ SE VZORKY**

Pro měření metodou VerifyNow jsme odebírali krev do 2 ml zkumavek (Greiner Bio-One Vacuette®). Vzorky byly odebírány atraumaticky za standardních podmínek, přímou punkcí žíly a s maximální snahou se vyhnout kontaminaci tkáňovými faktory (volná končetina, bez

zaškrcení), s jehlou o průměru 21 a více. První 2 ml krve nebyly použity. Druhá zkumavka s 2 ml krve byla vždy pětkrát opatrně obrácena, aby došlo k důkladnému promíšení obsahu. Vzorky s patrným strážením krve nebyly použity. Inkubace vzorků probíhala při pokojové teplotě 30 minut po odběru. Vyšetření agregace bylo provedeno dle manuálu do 2-3 hodin po odběru (User Manual VerifyNow system, 2006). K vyloučení diurnálních změn jsme odběry prováděli v dopoledních hodinách. Před odběry krve byli účastníci nalačno a v den odběru nekouřili.

Pro měření metodou klasické optické agregometrie (light transmisson aggregometry - LTA) jsme odebírali krev do 5ml zkumavek obsahujících v 1/ 10 obsahu 3.8 g/ dl citrátu sodného. Odběry probíhaly za stejných pravidel jako u předchozí metody, ale odebírali jsme celkem tři zkumavky po 5 ml. Každá zkumavka byla vždy nejméně pětkrát opatrně obrácena, aby došlo k důkladnému promíšení obsahu. Inkubace vzorků probíhala při pokojové teplotě 30 minut po odběru. Vyšetření agregace bylo provedeno dle manuálu do 1 hodiny po odběru ([www.practical-haemostasis.com](http://www.practical-haemostasis.com), User manual APACT 4004, 2004). K vyloučení diurnálních změn jsme odběry prováděli v dopoledních hodinách.

Pro odběry krevního obrazu jsme použili vakuové zkumavky s ethylendiaminetetraacetovou kyselinou (EDTA), pro biochemické odběry (zejména lipidogram, jaterní a ledvinné funkce a markery zánětu) byly použity vakuové zkumavky bez aditiv a pro odběry koagulační vakuové zkumavky s 3,2 % citrátem sodným.

### **3.5 MĚŘENÍ AGREGACE DESTIČEK**

Ve studiích jsme používali různé metody měření agregace destiček. Ve studii 1 jsme použili metodu VerifyNow. Ve studiích 2 a 3 jsme použili metodu VerifyNow a současně klasickou optickou agregometrii, tedy light transmission aggregometry (LTA).

1. VerifyNow systém (Accumetrics Inc, San Diego, Calif) představuje bed-side metodu optické agregometrie, stanovení probíhá z plné krve, v našem případě s použitím AA jako induktoru. Výsledky jsou vyjádřeny v aspirin reakčních jednotkách (ARU).

Vzorky byly vždy lehce promíchány a vloženy do náplně, předem upevněné do přístroje. Agregace indukovaná agonistou, byla monitorována prostupem světla přes dvě dvojité reakční komory v každé náplni. Náplně pro ASA obsahují AA jako aktivátor destiček a fibrinogenem obalené partikule.

Výsledek vyšetření je znám během několika minut a zobrazí se na displeji přístroje (Harrisom P. et al., 2007). Výsledky v ARU v rozmezí 350 až 700 vyjadřují míru agregace. Hodnoty nižší než 550 ARU, reprezentují agregaci redukovanou ASA, hodnoty nad 550 ARU jsou obrazem neovlivněné agregace, kdy efekt ASA nebyl zaznamenán nebo se jedná o tzv. zvýšenou destičkovou reaktivitu, přes podávanou léčbu ASA (Smith JW. et al., 1999).

2. Light transmission aggregometry (APACT LPC Software, Version 1.21c, Fa. LABiTec) neboli klasická optická agregometrie, je metodou fungující též na optickém principu, stanovení neprobíhá z plné krve, ale z plasmy bohaté na destičky (platelet rich plasma - PRP). Jako induktory agregace jsme používali AA, kolagen, epinefrin a adenosin difosfát (ADP). Ve studii 2 byl navíc jako induktor použit ristocetin. Výsledky se vyjadřují v procentech (Harrison P. et al., 2007, [www.practical-haemostasis.com](http://www.practical-haemostasis.com), User manual APACT 4004, 2004).

Z odebrané krve byla preanalytickými procedurami připravena PRP. Toho bylo dosaženo centrifugací po dobu 15 minut při 163 g. Cílem je zkoncentrovat destičky na doporučené hodnoty mezi 200- 400 x 10<sup>9</sup>/ l (Merolla M. et al., 2012). Plasma chudá na destičky (platelet poor plasma - PPP) byla připravena další 15 minutovou centrifugací při 2500 g. Dle literatury počty destiček pod 200 x 10<sup>9</sup>/ l mohou vést ke

snížení agregační odpovědi a proto byly počty destiček kontrolovány. Pro vyšší počty destiček je doporučeno naředění PPP ([www.practical-haemostasis.com](http://www.practical-haemostasis.com)).

V PPP je stanovena dle průniku světla hladina na 100 %, u PRP je hladina 0 %, oboje před přidáním induktorů. Vzorek PRP umístíme v 200 µL kyvetě, při 37.4°C mezi zdroj světla a fotobuňku. Po přidání destičkového agonisty – induktoru, dojde k aktivaci destiček, změně jejich tvaru z diskoidního do kulovitěho s trny a dojde k redukci absorpce světla destičkami. Tím vzroste průnik světla přes vzorek, což je detekováno fotobuňkou ([www.practical-haemostasis.com](http://www.practical-haemostasis.com)). Jako induktory byly postupně použity: AA, kolagen, epinefrin a ADP (v koncentracích 0.5 mg/ ml, 10 µg/ ml, 10 µmol/ L, and 20 µmol/ L).

Zaznamenáván byl tvar křivek a procento agregace (Gum PA. et al., 2003, [www.practical-haemostasis.com](http://www.practical-haemostasis.com), User manual APACT 4004, 2004, Harrison P. et al., 2005). Hraniční hodnota je stanovena na 55 %, pro všechny agonisty. Hodnota pod 55 % je známkou signifikantně snížené agregace destiček ([www.practical-haemostasis.com](http://www.practical-haemostasis.com), User manual APACT 4004, 2004, Hayward CP. et al., 2010).

### 3.6 STATISTICKÁ ANALÝZA

#### Studie 1 a 2

Statistická analýza probíhala v statistickém program SPSS, verze 19. Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty (směrodatné odchylky) s 95 % intervaly spolehlivosti. Pro kontrolu normality dat byl proveden Komogorov-Smirnovův test. Skupiny byly porovnávány pomocí dvou-výběrového t-testu. K porovnání dat jednotlivců byl použit model opakovaného měření. Hodnota p pod 0,05 představuje statisticky signifikantní výsledek.

#### Studie 3.

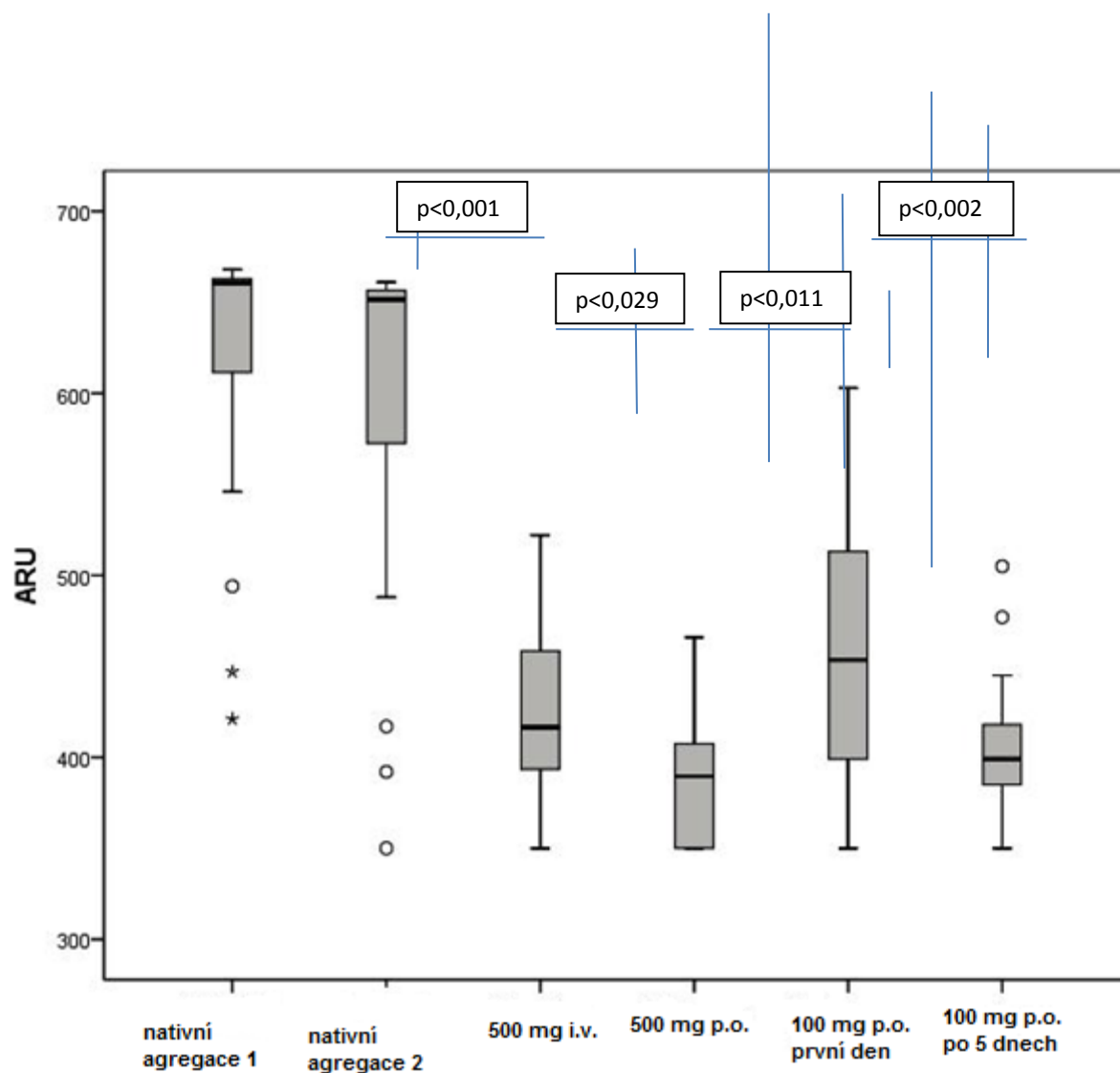
Data byla zpracována programem IBM SPSS Statistics for Windows, version 24 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). Nejprve jsme porovnávali průměry celých skupin při měření jednotlivými agregometrickými metodami. Dále byly provedeny regresní modely k testování lineární závislosti mezi agregací při použití 4 různých induktorů jako závislé proměnné a INR jako nezávislé proměnné. K odhalení odlehlých hodnot byl před statistickým testováním proveden Dean-Dixon test. Jako druhý regresor v modelech byl přidán věk. Ke stanovení stupně asociace byl použit Pearsonův korelační koeficient  $r$  a koeficient determinace  $R^2$ . ANOVA a t-test byly použity k testování signifikance lineárních regresních modelů. Statistická významnost byla stanovena na 5 %.

## **4. VÝSLEDKY**

### **4.1 STUDIE 1**

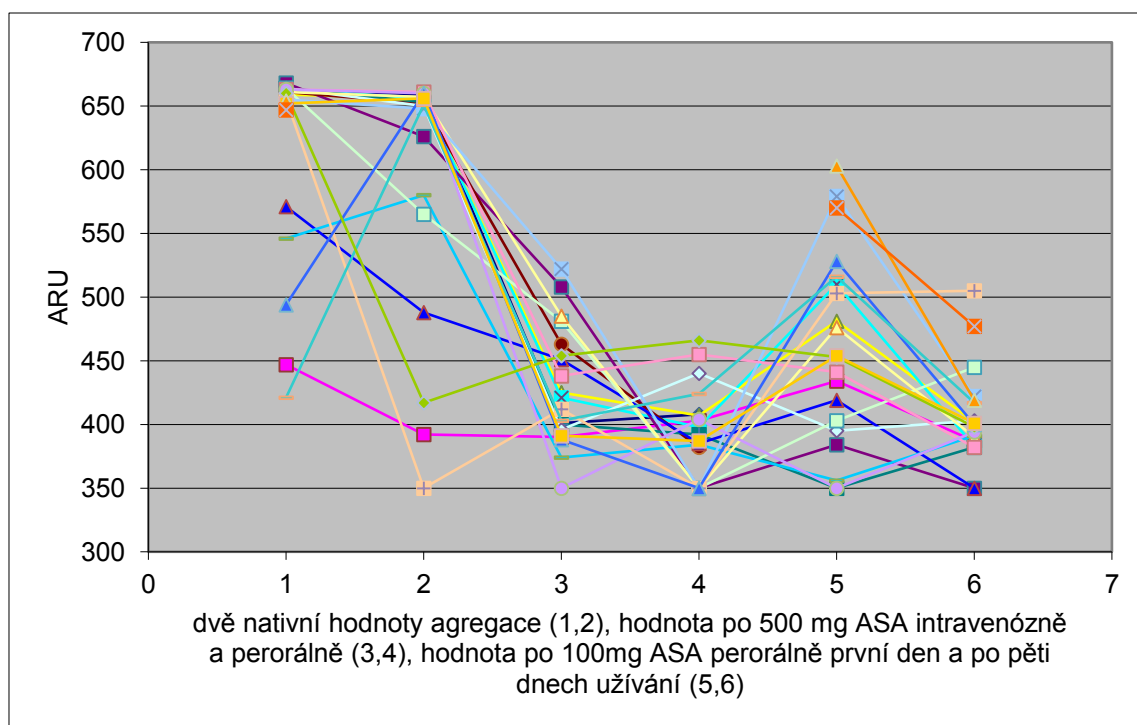
Původní destičková agregace měřená dvakrát před podáním ASA činila [průměr (SD)] 620 (79) ARU a 597 (101) ARU s variabilitou 12 %.

U zdravých dobrovolníků, 500 mg ASA perorálně signifikantně redukovalo průměrnou agregaci na [průměr (SD)] 392 (36) ARU ( $p < 0,001$ ). Podobně 500 mg ASA intravenózně redukovalo agregaci na průměrnou hodnotu 428 (46) ARU ( $p < 0,001$ ) a 100 mg ASA perorálně dosáhlo redukce na 460 (76) ARU ( $p < 0,001$ ). Suprese destičkové agregace po dvou hodinách od podání 500 mg ASA byla signifikantně vyšší po perorálním podání oproti intravenóznímu ( $p = 0,029$ ). Taktéž suprese agregace po jednotlivé dávce 500 mg ASA je signifikantně větší než po jednotlivé dávce 100 mg ASA ( $p = 0,011$ ) (Obr. 6 a 7, tab. 6).



**Obr. 6. Agregabilita destiček nativní (neovlivněná ASA) a po podání různých dávek a forem ASA**

Hodnoty nativní agregace u zdravých dobrovolníků bez terapie (1 a 2). Hodnoty agregace po podání 500 mg ASA i.v., perorálně, 100 mg ASA perorálně po jednorázové dávce a po 5 dnech užívání. Výsledky jsou vyjádřeny v ARU. Je vyznačena signifikance rozdílů mezi jednotlivými skupinami.



**Obr. 7. Destičková agregabilita**

Agregabilita destiček před (nativní) (1,2) a po podání čtyř různých dávek a forem ASA : 500 mg intravenózně (3), 500 mg perorálně (4), 100 mg perorálně v jedné dávce (5) a 100 mg perorálně v pěti po sobě následujících dnech (6). Každá křivka představuje individuální hodnoty jednotlivců, s propojením dat do křivky. Výsledky jsou vyjádřeny v ARU.

**Tab. 6. Agregabilita destiček po podání různých dávek a forem ASA u zdravých dobrovolníků a u pacientů po ischemickém iktu na dávce 100 mg ASA denně.**

|                                                                | Průměr (SD) | 95 % intervaly<br>spolehlivosti | p hodnota<br>(verzus nativní agregace) |
|----------------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Zdraví dobrovolníci</b>                                     |             |                                 |                                        |
| 500 mg ASA perorálně                                           | 392 (36)    | 374-410                         | p<0,001                                |
| 500 mg ASA intravenózně                                        | 428 (46)    | 407-452                         | p<0,001                                |
| 100 mg ASA perorálně                                           | 460 (76)    | 425-496                         | p<0,001                                |
| 100 mg ASA perorálně po<br>pěti po sobě následujících<br>dnech | 405 (37)    | 388-422                         | p<0,002                                |

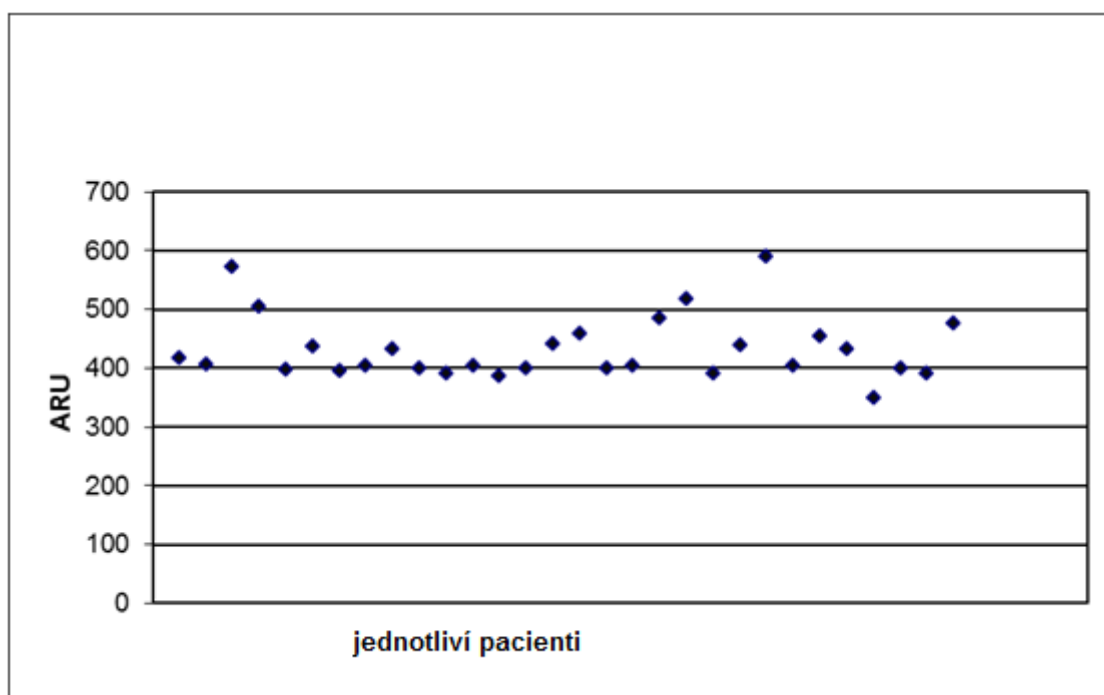
|                     | průměr (SD) | 95 % intervaly<br>spolehlivosti |
|---------------------|-------------|---------------------------------|
| <b>Pacienti</b>     |             |                                 |
| chronická léčba ASA |             |                                 |
| 100 mg denně        | 433 (55)    | 413-452                         |

Průměrné hodnoty,

směrodatné odchylky (SD), 95 % intervaly spolehlivosti a hodnoty statistické významnosti p.

Denní podání 100 mg ASA pět po sobě následujících dnů u zdravých dobrovolníků následně redukovalo destičkovou agregaci na průměr (SD) 405 (37) ARU ( $p < 0,002$ ). U pacientů, užívajících dlouhodobě 100 mg ASA denně, byla průměrná agregace potlačena na 433 (55) ARU (Obr. 6 a 7). Úroveň destičkové inhibice se nelišila u zdravých dobrovolníků a pacientů po ischemickém iktu na dlouhodobé ASA terapii ( $p$ - NS). Chronická medikace 100 mg ASA potlačila destičkovou agregaci na 71,2 % hodnot pozorovaných u neléčených, zdravých dobrovolníků.

Všichni zdraví dobrovolníci odpovídali na ASA, dva pacienti (7 %) vykazovali tzv. zvýšenou reaktivitu na léčbě, tedy jejich agregace nebyla dostatečně potlačena (Obr. 8). U kuřáků nebyla zvýšená reaktivita na léčbě pozorována (Chýlová M. et al., 2015).



**Obr. 8. Agregabilita jednotlivých pacientů užívajících 100 mg ASA denně**

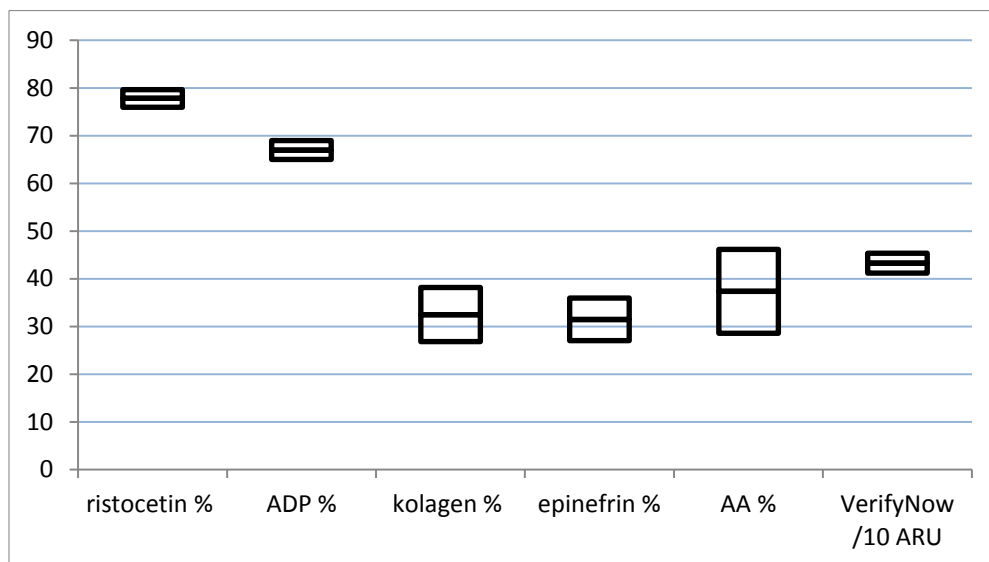
Dva pacienti mají hodnoty nad 550 ARU, tedy jsou tzv. ASA rezistentní. Výsledky jsou vyjádřeny v ARU.

## 4.2 STUDIE 2

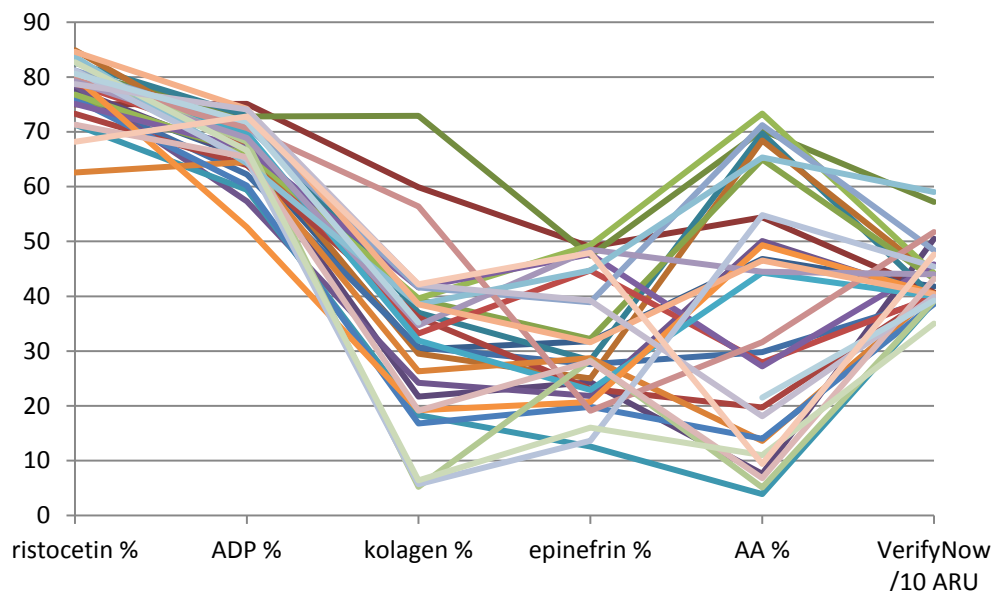
U pacientů po ischemickém iktu na dlouhodobé terapii 100 mg ASA, byla při měření pomocí LTA agregace destiček redukována na tyto průměrné hodnoty (SD): po indukci AA na 37 % (24), po indukci kolagenem na 33 % (15), po epinefrinu na 32 % (24), po ristocetinu na 78 % (5) a konečně po indukci ADP na 67 % (5).

Při respektování hraniční hodnoty 55 % byla nedostatečně snížená reaktivita přes léčbu aspirinem zachycena u 9 osob po indukci AA a u 3 osob po indukci kolagenem. Žádný pacient nebyl rezistentní k terapii po indukci epinefrinem. Při indukci ristocetinem a ADP nedošlo k požadovanému poklesu agregace pod 55 % u žádného pacienta.

Destičková agregace měřená u těchto pacientů pomocí VerifyNow byla potlačena na průměr (SD) 433 (54) ARU. U dvou pacientů neklesla destičková reaktivita přes léčbu, tedy hodnota zůstala vyšší než 550 ARU (Obr. 9 a 10).



**Obr. 9. Agregabilita u pacientů po ischemickém iktu na chronické terapii 100 mg ASA denně.** Box graf, průměrné hodnoty s 95 % intervaly spolehlivosti. Hodnoty agregace stanovené pomocí LTA po indukci různými agonisty (ristocetin, ADP, kolagen, epinefrin a AA); v posledním sloupci hodnoty agregace stanovené metodou VerifyNow, pro grafické porovnání hodnoty v ARU/ 10.



**Obr. 10. Porovnání efektu ASA na agregaci měřenou pomocí LTA po indukci pěti agonisty (ristocetin, ADP, kolagen, epinefrin a AA) a pomocí VerifyNow s induktorem AA. Každá křivka představuje individuální hodnoty jednotlivců, s propojením dat do křivky. Výsledky jsou vyjádřeny v % u LTA agonistů a ARU/ 10 u VerifyNow.**

Korelace mezi jednotlivými agonisty s ohledem na schopnost odhalit redukovanou destičkovou agregaci byla nejlepší mezi kolagenem a 3 dalšími induktory: epinefrinem, ADP a AA. Kolagen, epinefrin a AA korelovaly signifikantně s výsledky z VerifyNow (Tab.7) (Chýlová M. et al., 2014).

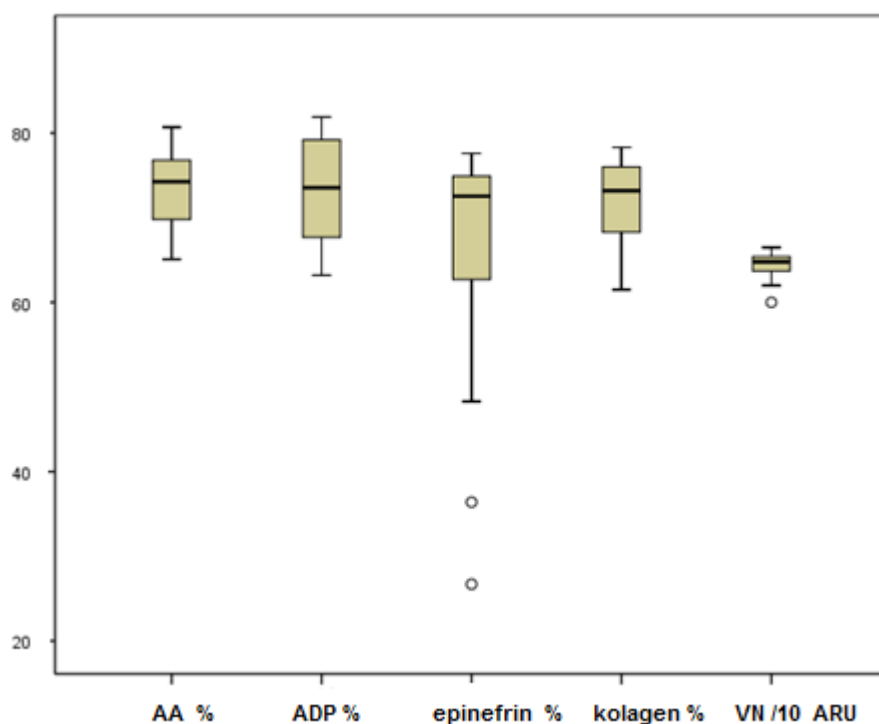
**Tab. 7. Statisticky signifikantní korelace mezi metodami a jednotlivými induktory**

|                               | p       |
|-------------------------------|---------|
| VerifyNow vs. LTA (kolagen)   | p=0,004 |
| VerifyNow vs. LTA (epinefrin) | p=0,034 |
| VerifyNow vs. LTA (AA)        | p=0,047 |
| LTA: kolagen vs. epinefrin    | p<0,001 |
| LTA: kolagen vs. ADP          | p=0,001 |
| LTA: kolagen vs. AA           | p=0,014 |

### **4.3 STUDIE 3**

Všichni pacienti měli účinné INR, průměrná hodnota 2.07 (SD 0.6).

Průměrná destičková agregace u pacientů na dlouhodobé terapii warfarinem, stanovená VerifyNow, byla 637.5 (SD 36.6) ARU. Při měření u těchto pacientů pomocí LTA byla agregabilita v průměru 73.3 % (SD 4.5 %) po indukci AA, 73.2 % (SD 6) po indukci ADP, 72.1 % (SD 4.8) po indukci kolagenem a 65.3 % (SD 14.7) v případě epinefrinu. Tyto hodnoty nedosahují signifikance předepsané naší laboratoří, kdy až na hodnotách pod 55 % je agregace považována za signifikantně redukovanou (Obr. 11)



**Obr. 11. Redukce průchodu světla indukci agregace u pacientů na chronické terapii warfarinem.** Výsledky LTA po užití čtyř různých induktorů (AA, ADP, epinefrin a kolagen). Výsledky jsou vyjádřeny v procentech redukce průchodu světla u LTA. Poslední sloupec v ARU jednotkách pro VerifyNow, pro grafickou přehlednost jsou výsledky vyjádřeny jako ARU/ 10 (značeno jako VN/10).

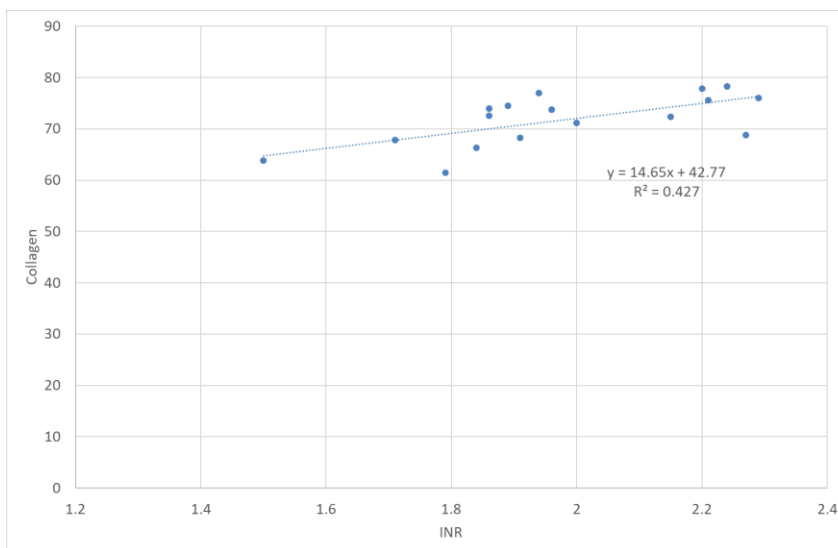
K detailnějšímu objasnění vazby mezi antikoagulační léčbou warfarinem a agregabilitou jsme doplnili regresní analýzu pro jednotlivé pacienty. Zatímco u VerifyNow a LTA při indukci AA a ADP nebyla signifikantní korelace nalezena, u agregace indukované kolagenem a ještě více po indukci epinefrinem byla patrná signifikantní závislost na warfarinu, potažmo na hodnotě INR (Tab.8).

**Tab. 8. Pearsonův korelační koeficient mezi INR a agregací.** Pearsonův korelační koeficient mezi INR a agregací v regresní analýze jednotlivců. Agregace měřená LTA po indukci čtyřmi různými induktory (ADP, kolagen, epinefrin a AA) a pomocí VerifyNow (VN) s AA jako induktorem. Korelace mezi INR a věkem nebyla nalezena.

|           | INR   |                | Věk    |           |
|-----------|-------|----------------|--------|-----------|
|           | R     | p-hodnota      | R      | p-hodnota |
| ADP       | 0.450 | 0.070          | 0.201  | 0.440     |
| Kolagen   | 0.654 | <b>0.004**</b> | -0.059 | 0.821     |
| Epinefrin | 0.575 | <b>0.016*</b>  | -0.097 | 0.710     |
| AA        | 0.425 | 0.089          | 0.011  | 0.966     |
| VN        | 0.110 | 0.636          | -0.304 | 0.181     |

\* signifikantní na úrovni 0.05, \*\* signifikantní na úrovni 0.01

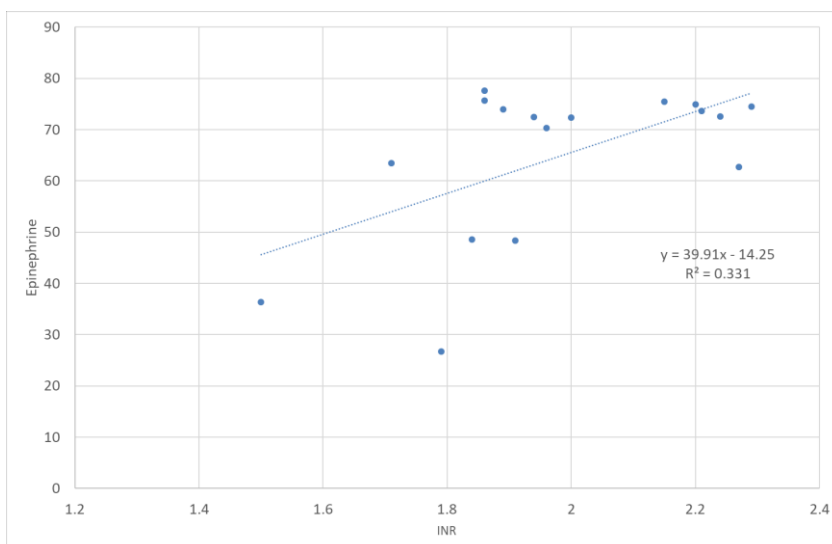
Model vysvětluje 42.7 % variabilitu dat po indukci kolagenem a 33.1 % pokud použijeme epinefrin. Každý vzestup INR o 0,1 vede ke statisticky signifikantnímu vzestupu kolagenem indukované agregace o 1,5 ( $p=0.004$ ). Podobně každý vzestup INR o 0,1 vede k vzestupu epinefrinem indukované agregace o 4,0 ( $p=0.016$ ) (Obr. 12, 13) (Chýlová M. et al., 2021).



**Obr. 12. Lineární regresní vazba mezi epinefrinem indukovanou agregací a INR.**

Výsledky LTA při užití kolagenu jako induktoru ukazují procento redukce průchodu světla.

INR hodnoty jsou zaznamenány na ose x.



**Obr. 13. Lineární regresní vazba mezi kolagenem indukovanou agregací a INR.**

Výsledky LTA při užití epinefrinu jako induktoru ukazují procento redukce průchodu světla.

INR hodnoty jsou zaznamenány na ose x.

## **5. DISKUSE**

### **5.1 STUDIE 1**

#### **Reproducibilita**

VerifyNow je považován za test s velmi dobrou reprodukcibilitou, s variačním koeficientem kolem 3 % (Grove EL., 2012). Variační koeficient při našich opakovaných nativních měřeních se pohyboval kolem 12 %. Na vyšším variačním koeficientu u našich měření se podílí též intra-individuální variabilita (Chýlová M. et al., 2015). Antiagregační efekt ASA se v čase může měnit. Je popisováno široké spektrum odpovědí od částečné ke kompletní inhibici agregace. Spekuluje se o vlivu genetiky, aktuálního stavu organismu s ohledem na probíhající infekce, funkce orgánů a metabolismus a zvažují se i vnější vlivy. Vyšší reaktivita trombocytů je popisována u akutní CMP (Gurbel PA. et al., 2007, Hohlfeld T. et al., 2007), není ovšem stále jasné, zda se jedná o příčinu či důsledek CMP.

#### **VerifyNow a jeho užití v praxi**

Jsme si vědomi toho, že výsledky měření agregace neodpovídají plně globální agregaci in vivo. Vždy blokuje a vyšetřujeme pouze jednu konkrétní dráhu, induktor nebo receptor. VerifyNow se jeví jako praktický test pro své jednoduché a rychlé provedení a poskytuje jednoznačný a rychlý výsledek. Za limitaci považujeme stanovené minimální a maximální hodnoty, které spíše znemožňují měření extrémních hodnot agregace (Chýlová M. et al., 2021).

#### **Intravenózní verus perorální podání ASA**

Agregaci destiček měříme u pacientů s cerebro- a kardiovaskulárními onemocněními, abychom ověřili účinnost jejich léčby ASA. Zajímala nás proto redukce agregace v určeném čase po podání ASA (Patrono C. et al., 2004). Ve studii 1 jsme pozorovali jasnou redukci

agregace na 216 a následně na 180 ARU a to 2 hodiny po podání 500 mg ASA perorálně a následně intravenózně. Při léčbě akutního infarktu myokardu (IM) či CMP očekáváme rychlý efekt léčby po podání ASA. Intravenózní podání léku je považováno za rychlejší v nástupu účinku léku ve srovnání s perorálním. Intravenózní ASA je podávána jako lyzinová sůl kyseliny acetylsalicylové a musí tak disociovat na lyzin a ASA a až následně je ASA hydrolyzována na kyselinu salicylovou. Přesto z našich výsledků není patrný rozdíl v působení lysinové soli acetylsalicylové kyseliny a vlastní ASA, s ohledem na intenzitu inhibice destičkové agregace v daném čase po podání. Efekt lysinové soli ASA je odvozen z efektu ASA samotné (Hamm CW. et al., 2011). Intravenózní podání ASA, by tak mělo být rezervováno pouze pro pacienty, u nichž není perorální podání možné (například v případě nauzey a zvracení).

### **Jednorázové verus opakované podání ASA**

U zdravých dobrovolníků jsme pozorovali signifikantní rozdíl v redukci destičkové agregace po jednorázové dávce 100 mg ASA ve srovnání s chronickým užíváním 100 mg ASA po 5 dnech ( $p=0,002$ ).

### **Destičková agregace verus různé dávky ASA**

Rozdíl v destičkové agregaci zdravých dobrovolníků užívajících jednotlivou dávku 500 a 100 mg ASA byl též signifikantní ( $p=0,011$ ) (Obr. 1, 2).

Z toho vyplývá, že by léčba měla být zahájena 500 mg ASA, abychom dosáhli efektivní inhibice destičkové agregace již první den podání. Podle našich výsledků je inhibice destičkové agregace po 5 dnech podání 100 mg ASA stejně efektivní jako po jednorázovém podání 500 mg ASA. Sto mg ASA denně je tedy dostatečně účinná dávka.

### **Zvýšená reaktivita na léčbě (high on treatment reactivity - HTR)**

Mezi zdravými dobrovolníky se zvýšená reaktivita na léčbě nevyskytovala. Naopak u pacientů na chronické dávce 100 mg ASA denně, jsme u 7 % zjistili HTR. Při zajištěné compliance tak došlo k nedostatečné redukci destičkových funkcí (Chýlová M. et al., 2015).

Naše pozorování se shodují s prací Nielsen a kol. (Nielsen HL. et al., 2008), kteří také pozorovali nižší výskyt HTR mezi zdravými lidmi ve srovnání s pacienty s cévními onemocněními. Podobné výsledky popisuje Fontana a kol. (Fontana P. et al., 2006). Předpokládáme tedy, že komorbiditý ovlivňují destičkovou agregaci.

### **Laboratorní verus klinická aspirinová rezistence**

Při nálezů ASA non responderů mezi pacienty se nabízí otázka, zda jsou tyto pacienti ve vyšším riziku recidivy CMP. Podle literatury jsou laboratorně stanovení ASA non respondeři náchylnější k recidivě kardiovaskulárních příhod ve srovnání s porovnatelnou skupinou ASA senzitivních individuí (Snoep JD., 2007). Zajímavé je, že ASA rezistentní jedinci neprofitují ani z jiných protideštičkových léků (Krasopoulos G. et al., 2008). V rozporu s těmito pozitivními výsledky, prezentujícími důležitost agregometrických měření, byly ale publikovány mnohé studie s negativními výsledky. Sztriha a kol. vyšetřovali agregaci u 241 pacientů s cerebro- a kardiovaskulárními onemocněními, užívajícími ASA nejméně 30 dní. Restrospektivně byla získána data o recidivě cévních příhod a rizikových faktorech. Zjistili, že výsledky agregometrie nejsou určující pro frekvenci recidiv cévních příhod v porovnání s konvenčními rizikovými faktory (Sztriha LK. et al., 2008).

Dle našich závěrů je zvýšená agregabilita vzdor léčbě rizikovým faktorem cévních příhod, ale pouze jedním z mnoha. Agregabilita destiček je dynamický proces, který je silně propojen s celkovým zdravím jedince (Chýlová M. et al., 2015).

## **5.2 STUDIE 2**

### **Volba metody měření agregace desiček**

Neexistuje jedna unikátní metoda ke zhodnocení antiagregačního efektu ASA. Navíc se data o účinnosti ASA liší právě podle metody, kterou byla získána. Za spolehlivé jsou považovány laboratorní výsledky těch testů, kdy detekujeme selhání ASA inhibovat produkci TXA<sup>2</sup>. Proto jsou i testy, měřící agregaci indukovanou kyselinou arachidonovou (AA), považovány za nejspolehlivější (Kuliczowski W. et al., 2009). V našich pozorováních jsme proto srovnávali optickou metodu VerifyNow, stanovující agregaci z plné krve, s klasickou optickou agregometrií (LTA) vyšetřující agregaci z PRP. Obě metody používají jako induktora právě AA. U LTA jsme navíc použili další běžné induktory agregace a porovnávali jsme získané výsledky.

### **VerifyNow**

Dle našich výsledků je VerifyNow test vhodný pro rychlou orientaci v praxi. Největší výhodou testu je bed-side provedení, kdy po vložení zkumavky do náplně získáme rychle a jednoduše jednoznačný výsledek. Dlouhodobá medikace 100 mg ASA denně potlačila agregaci na 71,2 % hodnot pozorovaných u zdravých dobrovolníků z naší předchozí studie (Chýlová M. et al., 2015). Průměrná hodnota 433 ARU byla jasně pod limitem stanoveným výrobcem na 550 ARU a odpovídala úspěšně potlačené agregaci. Pouze dvěma pacientům agregace při léčbě neklesla.

### **LTA**

Praktické použití LTA je limitováno vysokými nároky na čas, většími krevními objemy vzorků, potřebou speciální laboratoře, preanalytickými a analytickými procedurami (včetně centrifugace) a použitím různých agonistů a nutností interpretace odborníkem (Harrison P. et

al., 2007). Metoda však nabízí nejen procento míry redukce agregace, ale i kvalitativní aspekt, tedy rozdílné výsledky po indukci agregace jednotlivými agonisty s ohledem na užitý antiagregační lék.

Dle literatury dochází u uživatelů ASA ke změně agregačních křivek: chybí nebo je výrazně redukována agregace indukovaná AA a kolagenem, po indukci ADP a epinefrinem je detekována pouze primární vlna agregace a agregace po ristocetinu zůstává intaktní ([www.practical-haemostis.com](http://www.practical-haemostis.com), User manual APACT 4004, 2004, Hayward CP., 2010). Naopak, například u pacientů léčených klopido-grelem, dochází k supresi ADP indukované agregace ([www.practical-haemostis.com](http://www.practical-haemostis.com)).

U našich pacientů docházelo po indukci AA k redukci agregace na 37 %. Suprese agregace indukované kolagenem a epinefrinem byla dle našich pozorování dokonce efektivnější a konzistentnější ve srovnání s AA indukcí. Agregace indukovaná ristocetinem a ADP zůstala předpokládaně neovlivněna.

Statisticky signifikantní korelace mezi jednotlivými LTA induktory byla pozorována mezi kolagenem a třemi dalšími induktory: epinefrinem, ADP a AA. Neodpovídavost na ADP na jedné straně a konzistentní reakce po indukci kolagenem na straně druhé byla tak uniformní, že individuální korelace mezi ADP, kolagenem a epinefrinem byly významně signifikantní.

### **Srovnání VerifyNow a LTA**

Dle našich výsledků je statisticky významná korelace mezi VerifyNow a LTA při užití induktoru kolagenu ( $P=0,004$ ), epinefrinu ( $p=0,034$ ) a AA ( $p=0,047$ ).

### **Zvýšená reaktivita na léčbě**

Nedostatečně potlačenou reaktivitu na léčbě ASA jsme pozorovali pomocí VerifyNow u 2 osob (7 %) a pomocí LTA u 9 osob (30 %). Mezi těmito 9 pacienty byla ovšem zvýšená

reaktivita na léčbě pozorována po vyšetření 2 induktory pouze u jedné osoby, v ostatních případech se jednalo o zvýšenou reaktivitu na léčbě po indukci pouze jedním z agonistů. Induktoři u nichž není efekt na agregaci při léčbě ASA očekáván (ADP, ristocetin) nebyli zavzati. Z uvedeného vyplývá, že pokud bereme při určování zvýšené reaktivity na léčbě metodou LTA v úvahu více induktorů je korelace s metodou VerifyNow dobrá.

### **Volba induktorů agregace**

Hodnocení výsledků LTA po indukci jednotlivými induktory umožňuje nahlédnout do variability možností ovlivnění destičkové agregace s ohledem na užitý antiagregační lék a ovlivněnou konkrétní jednotlivou dráhu agregace. LTA byla původně vyvinuta k měření genetických defektů destičkových funkcí, např. trombastenie či deficitu von Willebrandova faktoru. Podobně, pokud narušíme funkce destiček různými antiagregačními léky, narušíme tak jednotlivé funkční dráhy agregace. Destičky tak mohou být in vivo necitlivé ke stimulaci obnaženým kolagenem cévní stěny po podání ASA, ale stále reagují na indukci například ADP. Naopak klopidoogrel potlačí senzitivitu k ADP, ale zůstává intaktní dráha stimulace agregace přes AA. Navíc potlačení agregace není nikdy kompletní, jistá funkce dráhy zůstává obvykle zachována.

## **5.3 STUDIE 3**

### **Agregace verzus koagulace**

Otázka vztahu mezi agregací destiček a koagulací je předmětem výzkumu již více než 80 let (Solandt DY a Best CH., 1940). Přesto zatím propojení těchto dvou závislých a propletených procesů zatím nebylo plně objasněno. V praxi se koagulace obvykle měří odděleně, a to, na rozdíl od agregace destiček, se spolehlivými výsledky.

Z meta- analytických studií je dobře známo, že u pacientů s fibrilací síní je warfarin schopen redukovat výskyt CMP o 60 %, zatímco protidestičkové léky dosahují jen 20 % redukce (Hart RG et al., 2007).

Mnoho pacientů s fibrilací síní a ischemickou chorobou srdeční, kteří užívají antikoagulační léky, též potřebují antiagregační léčbu vzhledem k ostatním komorbiditám (aterotrombosa a riziko ischemické CMP či infarktu myokardu). Ve většině případů však antiagregační léčbu těmto pacientům nepřidáváme s ohledem na potenciálně vysoké riziko krvácivých komplikací. V naší studii nás proto zajímalo, zda je destičková agregace u antikoagulovaných pacientů ovlivněna a zda jsme schopni tento vliv na agregaci měřit.

### **Měření agregace u antikoagulovaných pacientů**

Naše předchozí zkušenosti s agregometrií ukazují, že se nejedná o jednoduchý a jednocestný proces (Chýlová M. et al., 2015, 2014). Metody neměří agregaci spontánní, ale indukovanou různými induktory. Naměřené průměrné hodnoty agregace v naší skupině antikoagulovaných pacientů se nelišily od hodnot naměřených u zdravých dobrovolníků v předchozí studii (Chýlová M. et al., 2015, 2014). Podání warfarinu tedy nevedlo k detekovatelné signifikantní redukci destičkové agregace v žádné ze zvolených metod. V literatuře již podobné výsledky byly popisovány (Ho LL a Brighton T., 2002).

U warfarinizovaných pacientů se tedy po přidání agonisty při optické agregometrii destičky shlukují, cesta agonisty není zablokována. Předpokládáme sice na konci méně fibrinových mřížek, ale přesto agregace proběhne, hodnoty mezi 60 a 80 % v PRP jsou podobné jako u zdravých jedinců. Nedochozí k signifikantnímu poklesu pod normy (pod 55 %). Podobně je tomu u výsledků z VerifyNow (Chýlová M. et al., 2021).

## **Korelace INR s jednotlivými induktory**

Po statistickém zpracování pomocí regresního modelu intraindividuálních výsledků se v našich výsledcích objevily některé korelace. Při indukci agregace kolagenem a epinefrinem byl pozorován jasný efekt: čím vyšší INR tím vyšší agregabilita destiček. Překvapivě se tedy spíše potvrdilo, že pokud je agregace indukována stresem (epinefrin) nebo poškozením cévní stěny (kolagen), není u antikoagulovaných pacientů tato dráha ovlivněna, ale naopak je agregace vyšší a funguje jako záchraný mechanismus v ochraně organismu před krvácením. V případě indukce ADP a AA nebyla nalezena signifikantní závislost. Zdá se, že tyto dráhy hrají roli při užití jiných léků, jak je již výše uvedeno a podáním warfarinu nejsou ovlivněny.

Tyto výsledky nás opět odkazují na komplexnost agregace, která probíhá přes více induktorů, z nichž různé jsou ovlivněny v různých situacích. Epinefrin jako induktor agregace při stresu a kolagen jako marker poškození cévní stěny nejsou působením warfarinu ovlivněny, tyto dráhy zřejmě preferenčně chrání organismus svojí intaktností, ve specifických situacích.

Mnohocestnost ovlivnění agregace různými induktory vede i k různorodosti ve výsledcích. To vede k inkonsistentním výsledkům nejen v naší studii, ale i v mnohých studiích popisovaných v literatuře (Chýlová M. et al., 2021).

## **Volba induktoru a redukce agregace verus globální pokles agregace**

Domníváme se, že problém není v použité metodě, ale spíše ve volbě správného agonisty. Zdá se, že ne všechny cesty agregace destiček jsou warfarinem ovlivněny, i přes předpokládané snížení vazby destiček přes fibrinové můstky, nedochází ke globálnímu poklesu agregace, ovlivnění probíhá zřejmě přes vybrané dráhy. Zajímavé se zdá přidání peptidu aktivujícího trombinový receptor (TRAP), který by jako agonista při provedení optické agregometrie mohl v případě warfarinizovaných pacientů prokázat redukci agregace. Trombinový receptor aktivující peptid (TRAP), jako destičkový agonista působící cestou proteasou aktivovaných

receptorů 1 (PAR 1) a 4. Trombin, jako induktor agregace destiček a zároveň klíčový peptid ovlivněný warfarinem v koagulační kaskádě, se zdá ideálním kandidátem. Podkladem pro naše úvahy jsou i četné studie s NOAC (Sokol J. et al., 2018, Nehaj F. et al., 2018, Shimizu M. et al., 2020, Nehaj F. et al., 2018, Eller T. et al., 2014). Použití TRAP jako induktora metodou LTA u warfarinizovaných pacientů a ověření, zda je tento induktor vhodný k monitoraci léčby, je jistě oblast vhodná k dalšímu průzkumu.

Je zřejmé, že volba spolehlivé a prověřené metody je kruciólní a schopnost detekovat požadované změny agregace se mezi jednotlivými metodami, ale i použitými induktory značně liší. Komplexní systém indukce a suprese agregace umožňuje, že některé dráhy zůstávají i přes ovlivnění agregace jinou cestou zcela intaktní. Navíc nelze říci, zda je suprese jedné dráhy účinnější než jiné, v kontextu globální in vivo agregace.

#### **5.4 TESTY DESTIČKOVÝCH FUNKCÍ VE VELKÝCH KLINICKÝCH STUDIÍCH**

Výsledky velkých klinických randomizovaných studií (GRAVITAS – Gauging Responsiveness with a VerifyNow Assay-Impact on Thrombosis And Safety; TRIGGER- The testing Platelet Reactivity in Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy with Prasugrel; ARCTIC- The Assessment by a Double Randomization of a Conventional Antiplatelet Strategy for Drug-Eluting Stent Implantation and of Treatment Interruption vs. Continuation 1 Year after Stenting), které zkoumaly použití monitorace destičkových funkcí, nepodpořily jejich rutinní užití v běžné klinické praxi. U pacientů po perkutánní koronární intervenci na terapii thienopyridiny se nepodařilo získat lepší výsledky po přizpůsobení léčby dle výsledků testů destičkových funkcí. K dalším cévním příhodám docházelo stejně často, jako v případě léčby nepřizpůsobované. Rutinní testování

před nebo po elektivním stentingu a následná úprava terapie dle výsledku, tak nejsou doporučeny.

Na druhé straně studie TROPICAL- ACS (The randomized trial Testing Responsiveness to Platelet Inhibition on Chronic Antiplatelet Treatment for Acute Coronary Syndromes) a TOPIC (timing of platelet inhibition after acute coronary syndrome) ukazují, že testy destičkových funkcí se mohou u pacientů s akutním koronárním syndromem účastnit při rozhodnutí o deeskalaci z novějších účinnějších thienopyridinů na klopidoogrel. Podle stupně laboratorně zjištěné reaktivity, lze přistoupit k deeskalaci a snížit tak riziko krvácivých komplikací, bez navýšení rizika dalších cévních příhod.

Dále může být dle doporučení testování zvaženo ve specifických rizikových situacích (např. při anamnéze trombotického stavu, komplikacích, podezření na rezistenci a při zvýšeném riziku krvácení). Zvláštní situací je monitorování přerušování protideštičkové léčby u akutního koronárního syndromu u pacientů indikovaných ke kardiochirurgickému výkonu

Další možností použití testů destičkových funkcí, zůstává dle doporučení ověření adherence k léčbě (Deharo P. a Cuisset T., 2018, Ostrowska M. et al., 2019).

Velké klinické studie analyzující dopad monitorování protideštičkové terapie u pacientů s cévní mozkovou příhodou chybějí.

## **6. ZÁVĚRY**

### **6.1 ZHODNOCENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ**

#### **Studie 1**

Reprodukovatelnost měření pomocí optické agregometrie VerifyNow je vyhovující.

V našich pozorováních všechny dávky ASA, podané jak perorální tak intravenózní formou, signifikantně redukovaly destičkovou agregaci. Nepotvrdila se převaha intravenózní oproti perorální aplikaci; naopak jsme pozorovali signifikantně vyšší redukci v destičkové agregaci po podání ASA perorálně. Potvrdili jsme, že i malá dávka ASA jako je 100 mg, s dobrým bezpečnostním profilem (s ohledem na nežádoucí události, zejména krvácení) je vysoce efektivní a plně dostačující. Pět dní užívání nízké dávky ASA bylo stejně efektivní, jako jednorázové užití 500 mg ASA k dosažení inhibice destičkových funkcí. Inhibice destičkové agregace mezi zdravými dobrovolníky a pacienty po iktu na nízkodávkové chronické terapii ASA se nelišila. U pacientů s vaskulárními onemocněními byla pozorována vyšší frekvence na léčbě zvýšené reaktivity destiček ve srovnání se zdravými dobrovolníky bez komorbidit.

#### **Studie 2**

Kombinace dvou metod (VerifyNow a LTA) a použití různých induktorů přináší podrobnější výsledky o skutečném ovlivnění a potlačení agregace. Použitím více různých induktorů při LTA jsme schopni přesněji identifikovat, která konkrétní dráha agregace je blokována daným lékem a které dráhy zůstávají neovlivněné. Pro testování funkce ASA dobře korelují tyto induktory: AA, kolagen a epinefrin.

Nicméně stále si musíme být vědomi, že měříme agregaci indukovanou in vitro různými indukory a změnu agregace způsobenou vybraným antiagregačním lékem. Neměříme tedy in vivo spontánní agregaci. Navíc s použitím více metod roste finanční náročnost.

### **Studie 3**

Z našich výsledků tedy nebyl patrný signifikantní pokles agregace u pacientů na chronické terapii warfarinem při užití optické agregometrie a VerifyNow po žádném z použitých agonistů.

V rozporu s naší hypotézou jsme nebyli schopni prokázat efekt antikoagulační léčby na redukci agregace pomocí laboratorní detekce. Podání warfarinu nevede k signifikantní redukci destičkové agregace. Korelace INR a agregace indukované kolagenem a epinefrinem je opačná, oproti našim původním očekáváním. Každé zvýšení INR vede k mírnému vzestupu agregace destiček, což vyjadřuje minimální efekt warfarinu na tyto dráhy. Námi vyšetřené dráhy agregace zvolenými metodami u warfarinizovaných pacientů zůstaly beze změny s ohledem na vyšetřenou agregabilitu destiček.

Závislost agregace na zvoleném induktoru nás vede ke spekulaci, zda by aplikace TRAP jako agonisty při LTA mohla vést k očekávanému potlačení agregability u warfarinizovaných pacientů (Chýlová M. et al., 2021).

### **Obecné závěry**

Rutiní testování pacientů s cévní mozkovou příhodou a následná úprava terapie dle výsledku, není doporučena. Testování může být zváženo ve specifických rizikových situacích a při ověření adherence k léčbě. Klinické randomizované studie s pacienty s CMP na protideštičkové terapii, které by ověřily možnosti využití testování destičkových funkcí v praxi, chybějí. Individualizace protideštičkové léčby tak v současné době není možná.

## 6.2 VÝHLEDY DO BUDOUCNA

Stále čekáme na spolehlivý test destičkových funkcí; je možné, že některé modernější testy budou lépe splňovat naše požadavky na komplexní testování agregace současně s ověřením konkrétní dráhy určitého léku.

Jsou potřeba klinické randomizované studie nejen u kardiologických pacientů na antiagregační léčbě, ale i u pacientů s CMP. Bez výsledků z těchto studií, není individualizace léčby a přizpůsobení terapie, dle výsledku testů destičkových funkcí, možná.

Nabízí se například ověření potřeby duální antiagregační léčby u intrakraniálních stenóz a vhodné načasování deeskalace této terapie k zachování optimálního poměru rizika ischemických událostí verus krvácení.

Ovlivnění agregace u antikoagulovaných pacientů a volba vhodné metody a induktoru jistě vyžaduje další průzkum. Například aplikace TRAP jako agonisty při LTA, by mohla vést k detekci potlačené agregability u warfarinizovaných pacientů.

Přes negativní výsledky z klinických randomizovaných studií zpochybňující použití testů destičkových funkcí v klinické praxi, se v poslední době opět ukazuje, že tyto metody mají i v budoucnu své místo. Použití testů destičkových funkcí při deeskalační terapii je jasným důkazem. Podobné aplikace se dají očekávat i v dalších odvětvích a vyžadují další výzkum.

## 7. SOUHRN

Disertační práce nabízí přehled poznatků o krevních destičkách, jejich roli v hemostáze a hemokoagulaci a fibrinolýze. Podrobně popisujeme principy agregace destiček, možnosti ovlivnění agregace antiagregačními a antikoagulačními léky, s důrazem na kyselinu acetylsalicylovou (ASA). Uvádíme dostupné metody měření agregace destiček, úskalí při volbě metody a interpretaci výsledků. Podrobně diskutujeme fenomén aspirinové rezistence. V obecné praxi se účinek ASA na snížení srdečních infarktů, ischemických iktů a dalších vážných cévních příhod odvozuje obvykle nepřímě, ze srovnání s jedinci užívajícími placebo. Nikoliv tedy z výsledků agregometrických metod. Volba spolehlivé metody měření agregace destiček, průzkum jejích možností při monitorování antiagregační léčby a následné uplatnění v prevenci a léčbě cévních mozkových příhod tak stále vyžaduje další výzkum.

Cílem disertační práce bylo zejména ověřit agregaci destiček po podání různých dávek a forem podání ASA a zároveň porovnat vliv jednotlivého a opakovaného podání ASA u zdravých dobrovolníků a u pacientů po ischemickém iktu.

U pacientů po ischemickém iktu na chronické terapii ASA jsme dále porovnávali agregaci destiček s použitím dvou různých metod. Hodnotili jsme i možnosti kombinace metod a různých induktorů.

Prověřovali jsme také, zda antikoagulační léčba u pacientů s ischemickou chorobou srdeční vyvolává detekovatelné změny v agregaci destiček

Z práce vyplynuly následující hlavní poznatky.

Reprodukovatelnost měření pomocí optické agregometrie VerifyNow je vyhovující. Všechny zkoumané dávky ASA signifikantně redukovaly agregaci destiček. Nebyla zjištěna výhoda intravenózního vůči perorálnímu podání ASA. U pacientů s vaskulárními onemocněními byla

pozorována vyšší frekvence nepotlačené reaktivity destiček, ve srovnání se zdravými dobrovolníky.

Při testování účinku ASA na agregaci destiček jsme pozorovali dobrou korelaci mezi některými použitými agonisty; jednalo se o kolagen, AA a epinefrin. Kombinace metod a agonistů vede ke spolehlivějším výsledkům, ovšem při vyšší finanční náročnosti.

VerifyNow je metoda vhodná k praktickému užití. Umožňuje získat rychlý, spolehlivý výsledek, bez složitého laboratorního stanovení. Nevýhodou představuje specifické užití metody a zvoleného induktoru k monitorování konkrétního léku, s danými limity naměřené agregace.

LTA nabízí podrobnější orientaci v agregabilitě u vyšetřovaného pacienta, především volbou různých induktorů. Získaný profil agregace po jednotlivých induktorech nám umožňuje nahlédnout do míry ovlivnění agregace jedince při různých antiagregačních léčích. Nevýhodou je jednoznačně náročnost metody a interpretace výsledků.

Zvolenými metodami a agonisty jsme nebyli schopni detekovat signifikantní snížení agregace u pacientů na chronické antikoagulační terapii warfarinem. Předpokládáme, že přidání peptidu aktivujícího trombinový receptor (TRAP) mezi agonisty, by mohlo docílit manifestace zredukované agregace. Signifikantní zvýšení agregace indukované kolagenem a epinefrinem korelující s vyšším INR, potvrzuje, že efekt warfarinu na tyto dráhy agregace je minimální. Účinek warfarinu na agregaci není zřejmě kompletní, některé dráhy zůstávají neovlivněné. Paradoxní zvýšení zasluhuje ověření dalšími testy, doplněné o kontrolní skupinu.

Individualizace léčby u pacientů po CMP dle výsledků testů destičkových funkcí není možná.

Chybí potřebná data z velkých randomizovaných studií.

Metody měření agregace mají dle našich znalostí a dostupných poznatků z literatury své místo v prevenci cévních mozkových příhod. Použití testů destičkových funkcí v konkrétních situacích však stále vyžaduje další výzkum. Nejnadějněji se jeví použití testů destičkových

funkcí při deeskalační terapii, ve snaze zachovat optimální poměr rizika ischemie a krvácení u pacientů léčených kombinovanou antiagregační a antikoagulační léčbou.

## **8. SUMMARY**

This dissertation offers an overview of knowledge about platelets, their role i hemostasis, hemocoagulation and fibrinolysis. We describe in detail the principle of platelet aggregation and the possibility of influencing aggregation by and antiplatelet drugs and anticoagulation, with emphasis on acetylsalicylic acid (ASA). We present available methods of measuring platelet aggregation, difficulties in their choice and pitfalls in the interpretation of results obtained. We discuss in detail current views on resistance to acetylsalicylic acid.

The effectiveness of ASA in prevention of heart attacks, stroke and other serious vascular events is usually derived indirectly from comparison of individuals taking placebo; not from the results of aggregometric methods. The choice of a reliable platelet aggregation method, exploring its possibilities in monitoring antiaggregation treatment, and its subsequent application in the prevention of stroke requires further reseach.

The main purpose of our work was to assess the effect of different doses and different routes of acetylsalicylic acid (ASA) administration on platelet aggregation and to compare platelet aggregation after a single versus repetitive administration of ASA in healthy individuals and in patients after ischemic stroke.

We compared results of two different aggregometry methods in stroke survivors on chronic ASA treatment and we evaluated the possibilities of combining different methods and agonists.

We were also interested to investigate chances to assess the effect of anticoagulation on platelet aggregation in patients with chronic ischemic heart disease

The research revealed the following main findings.

The reproducibility of measurements of platelet aggregation with the optical aggregometry VerifyNow system is acceptable. All doses of ASA have produced a significant reduction of platelet aggregation. Preference of the parenteral to oral application has not been established.

A higher frequency of an enduring high on-ASA platelet reactivity was observed in patients with vascular disease compared to healthy people.

For testing ASA effects on platelets three inducers are acting in good mutual correlation: AA, collagen and epinephrine. The combination of methods and agonists achieves higher reliability, but at a higher financial level.

We regard VerifyNow a suitable test for practical orientation. The method enables to achieve rapid and reliable results, without difficulties in laboratory measurements. The limitations of VerifyNow are in its specificity and in the need to choose a specific inducer to monitor the effect of the drug, with maximal and minimal thresholds.

LTA offers detailed orientation in aggregability of examined patient, especially by choosing different inductors. The acquired aggregation profile on different inductors enables to determine the level of aggregation on different drugs. Its limitation is in the difficulty of the method and its correct interpretation.

We were not able to detect significant suppression of mean aggregation in patients on long-term warfarin therapy using selected methods and agonists. We assume that the addition of thrombin receptor activating peptide (TRAP) as an agonist in LTA could entail a significant reduction of mean aggregation.

A significant correlation between higher platelet aggregation induced by collagen, epinephrine and higher INR levels, confirms minimal effect of warfarin on these aggregation pathways. The effect of warfarin is not comprehensive: some ways of aggregation remain

uninfluenced. The paradoxical increase deserves verification by further tests, supplemented by a control group.

A optimal individualization of treatment in stroke patients is not possible. Data from randomized trials are missing.

According to our knowledge and the available information from literature the platelet aggregation methods have all applied in stroke prevention. Platelet function testing in concrete situations still requires further research. The usage of platelet function testing in deescalation therapy and in inhibiting the risk benefit ratio of bleeding vs ischemia in patients on combined antiaggregation/ anticoagulation treatment appears promising.

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Alušík Š, Jedličková V, Paluch Z, Lejsková M. Determination of Plasma Salicylic Acid Levels to Assess Compliance to Acetylsalicylic Acid Therapy. *Chem. Listy* 2010; 104(8): 803-806.
2. Antiplatelet trialists collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy. Prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br Med J* 1994; 308(6921): 81-106.
3. Antithrombotic trialists' collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction and stroke in high risk patients. *Br Med J* 2002; 324(7329): 71-86. doi: 10.1136/bmj.324.7329.71.
4. Bauer J. Antikoagulační terapie v prevenci a léčbě ischemických iktů. *Cesk Slov Neurol N* 2010; 73/106(5): 480-491.
5. Biller J. Aspirin nonresponse in patients with arterial causes of ischemic stroke: considerations in detection and management. *J Neurol Sci* 2008; 272(1-2): 1-7.
6. Connolly, S. J.; Yusuf, S.; Camm, J.; et al. Effect of Clopidogrel Added to Aspirin in Patients with Atrial Fibrillation . *N Engl J Med* 2009; 20(360): 2066-2078.
7. Deharo P, Cuisset T. Monitoring platelet functions: what have we learned from randomized clinical trials? *Cardiovasc Diagn Ther* 2018; 8(5):621-629. doi: 10.21037/cdt.2018.10.10.
8. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105(14): 1650-1655.

9. Eller T, Busse J, Dittrich M, Flieder T, Alban S, Knabbe C, et al. Dabigatran, rivaroxaban, apixaban, argatroban and fondaparinux and their effects on coagulation POC and platelet function tests. Clin Chem Lab Med 2014; 52(6):835-44.
10. Farmakologie v kostce. Sixtus Hynie. Praha: Triton 2001.
11. Faulknerová M, Osmančík P, Špaček M, Kejst L, Kalvach P. Agregometrie v sekundární prevenci cévních mozkových příhod. Aspirinová rezistence. Cesk Slov Neurol N 2011; 107(5): 527-532.
12. Ferreira CN, Vieira LM, Dusse LMS, Reis CV, Amaral FS, Esteves WAM, et al. Evaluation of the blood coagulation mechanism and platelet aggregation in individuals with mechanical or biological heart prostheses. Blood Coagul Fibrinolysis 2002; 13(2): 129-134.
13. Fontana P, Nolli S, Reber G, de Moerloose P. Biological effect of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 healthy volunteers. J Thromb Haemost 2006; 4(4): 813-819.
14. Fontana P, Roffi M, Reny JL. Platelet function test use for patients with coronary artery disease in the early 2020s. J Clin Med 2020; 9(1): 194. doi: 10.3390/jcm9010194.
15. Grotemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW. Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot – study including 180 post-stroke patients. Thromb Res 1993; 71(5): 397-403.
16. Grove EL. Antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease. Dan Med J 2012; 59(9): B4506.
17. Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B, Dichgans J, Topka H. Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. J Neurol 2003; 250(1): 63-66.

18. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(6): 961-5.
19. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, Newcomer J, Weng W, Neerchal NK, et al. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation* 2007; 115(25): 3156-3164.
20. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, 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: 2999-3054.
21. Harrison P, Frelinger AL 3rd, Furman MI, Michelson AD. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thromb Res* 2007; 120(3): 323-336.
22. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev* 2005; 19(2): 111-23. doi: 10.1016/j.blre.2004.05.002.
23. Harrison P, Segal H, Blasbery K, Furtado C, Siver L, Rothwell PM. 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(5): 1001-5.
24. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med* 2007; 146(12): 857-67.
25. Haubelt H, Anders C, Hellstern P. Can platelet function tests predict the clinical efficacy of aspirin? *Semin Thromb Hemost* 2005; 31(4):404-410.

26. Hayward CP, Moffat KA, Raby A, Israels S, Plumhoff E, Flynn G, et al. Development of North American consensus guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using light transmission aggregometry. *Am J Clin Pathol* 2010; 134(6):955-63.
27. Helgason CM, Hoff JA, Kondos GT, Brace LD. Platelet aggregation in patients with atrial fibrillation taking aspirin or warfarin. *Stroke* 1993; 24(10):1458-1461.
28. Hirsh J, Fuster V, Ansell J and Halperin JL. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Guide to Warfarin Therapy. *Circulation* 2003; 107(12): 1692-1711.
29. Hohlfeld T, Weber AA, Junghans U, Schumacher M, Boucher M, Schrör K, et al. Variable platelet response to aspirin in patients with ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2007; 24(1): 43-50.
30. Ho LL, Brighton T. Warfarin, antiplatelet drugs and their interactions. *Australian Prescriber* 2002; 25(4): 81-84.
31. <http://www.aspirin.cz>
32. [http://www.cmp.cz/public/6a/c0/8a/4056\\_16946\\_ESO\\_Guidelines\\_CZ\\_revize.pdf](http://www.cmp.cz/public/6a/c0/8a/4056_16946_ESO_Guidelines_CZ_revize.pdf)
33. [http://www.practical-haemostasis.com/Platelets/platelet\\_function\\_testing\\_lta.html](http://www.practical-haemostasis.com/Platelets/platelet_function_testing_lta.html)
34. <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>, databáze léků.
35. Chýlová M, Kejst L, Procházka B, Kalvach P. Combination of two Optic Platelet Aggregometry Methods in Detection of Aspirin Effectivity. *Experimental and Clinical Cardiology* 2014; 20: 800-811.
36. Chýlová M, Mořovská Z, Fialová A, Štětkářová I, Peisker T, Kalvach P. The effect of warfarin administration on platelet aggregation. *Bratislava Medical Journal* 2021; 122 (5): 328-332. doi 10.4149/BLL\_2021\_54

37. Chýlová M, Mořovská Z, Osmančík P, Procházka B, Kalvach P. The effect of different doses and different routes of acetylsalicylic acid administration on platelet aggregation in healthy volunteers and ischemic stroke patients. *Transl Stroke Res* 2015; 6(2): 160-5. doi: 10.1007/s12975-014-0382-6.
38. Jack DB. Sto let aspirinu. *The Lancet* 1997; 350(9075): 437-439.
39. Kalvach P. et al. *Mozkové ischemie a hemoragie*. 3. vydání. Praha, Grada Publishing, 2010
40. Kawahito K, Adachi H, Ino T. Platelet aggregation in patients taking anticoagulants after valvular surgery: evaluation by a laser light-scattering method. *Journal of artificial organs* 2002; 5(3): 188-192.
41. Kawasaki T, Ozeki Y, Igawa T, Kambayashi J. Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low-dose aspirin. *Stroke* 2000; 31(3): 591-595.
42. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin „resistance“ and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *Br Med J* 2008; 336 (7637): 195-198. doi: 10.1136/bmj.39430.529549.BE.
43. Kulickowski W, Witkowski A, Polonski L, Watala C, Filipiak K, Budaj A, et al. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by The Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2009; 30(4): 426-435.
44. Lincová D, Hassan F, et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén 2007.
45. Macchi L, Sorel N, Christiaens L. Aspirin resistance: definitions, mechanisms, prevalence, and clinical significance. *Curr Pharm Des* 2006; 12(2): 251-8.

46. Malinin AI, Atar D, Callahan KP, McKenzie ME, Sebruany VL. Effect of a single dose aspirin on platelets in humans with multiple risk factors for coronary disease. *Eur J Pharmacol* 2003; 462(1-3): 139-143.
47. Management ischemické cévní mozkové příhody a tranzitorní ischemické ataky - doporučení European Stroke Organisation (ESO) 2008, aktualizace leden 2009. The European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee a the ESO Writing Committee.
48. Martínková J. Látky ovlivňující hemostázu a trombózu. LF UK Hradec Králové, 2008.
49. Martischnig AM, Mehili J, Pollak J, Petzold T, Fiedler AK, Mayer K, et al. Impact of dabigatran versus phenprocoumon on ADP induced platelet aggregation on patients with atrial fibrillation with or without concomitant clopidogrel therapy (the Dabi-ADP-1 and Dabi-ADP-2 Trials). *Biomed Res Int* 2015; 2015: 798486. <https://doi.org/10.1155/2015/798486>.
50. Mehta JL, Mohandas B. Aspirin resistance: Fact or fiction? A point of view. *World J Cardiol* 2010; 2(9): 280-288.
51. Merolla M, Nardi MA, Berger JS. Centrifugation speed affects light transmission aggregometry. *Int J Lab Hematol* 2012; 34(1): 81-5. doi: 10.1111/j.1751-553X.2011.01360.x.
52. Michelson AD. Methods for the Measurement of Platelet Function. *Am J Cardiol* 2009; 103(3 suppl): 20A-26A.
53. Mieszcza C, Winther K. Does warfarin enhance platelet activity? *Thromb Res* 1996; 84(4): 285-287. doi: 10.1016/s0049-3848(96)00188-0.
54. Montague SJ, Lim YJ, Lee WM, Gardiner EE. Imaging Platelet Processes and Function-Current and Emerging Approaches for Imaging in vitro and in vivo. *Front Immunol*. 2020; 11:78. doi: 10.3389/fimmu.2020.00078.

55. Nehaj F, Sokol J, Ivankova J, Mogan M, Kovar F, Stasko J, et al. First Evidence: TRAP – induced platelet aggregation is reduced in patients receiving xabans. Clin Appl Thromb Hemost 2018; 24(6):914-919. doi: 10.1177/1076029617734310.
56. Nehaj F, Sokol J, Mogan M et al. Thrombin receptor agonist peptide-induced platelet aggregation is reduced in patients receiving dabigatran. Clin Appl Thromb Hemost 2018; 24(2): 268-272. doi: 10.1177/1076029617713871
57. Nielsen HL, Kristensen SD, Thygesen SS, Mortensen J, Pedersen SB, Grove EL, et al. Aspirin response evaluated by the VerifyNow Aspirin System and light transmission aggregometry. Thromb Res 2008; 123(2): 267-273. doi: 10.1016/j.thromres.2008.03.023.
58. Olivier CB, Weik P, Meyer M, Weber S, Anto-Michel N, Diehl P, et al. TRAP-induced platelet aggregation is enhanced in cardiovascular patients receiving dabigatran. Thromb Res 2016; 138: 63-6. doi: 10.1016/j.thromres.2015.10.038.
59. Olivier CB, Weik P, Meyer M, Weber S, Diehl P, Bode C, et al. Dabigatran and rivaroxaban do not affect AA- and ADP-induced platelet aggregation in patients receiving concomitant platelet inhibitors. J Thromb Thrombolysis 2016; 42(2): 161-6. doi: 10.1007/s11239-016-1350-7.
60. Ostrowska M, Kubica J, Adamski P, Kubica A, Eyileten C, Postula M, et al. Stratified approaches to antiplatelet therapies based on platelet reactivity testing. Front Cardiovasc Med 2019; 6:176. doi 10.3389/fcvm.2019.00176.
61. Pamukcu B: A review of aspirin resistance, definition, possible mechanisms, detection with platelet function tests, clinical outcomes. J Thromb Thrombolysis 2007; 23(3): 213-22.
62. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. Vasc Health Risk Manag 2015; 11: 133-48. doi: 10.2147/VHRM.S44469.

63. Patrono C. Aspirin continues to attract research and debate, 115 years after its synthesis. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2013; 66(4): 251-4. doi: 10.1016/j.rec.2012.07.016.
64. Patrono C. Aspirin resistance : definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost* 2003; 1(8): 1710-3. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00284.x.
65. Patrono C, Bachmann F, Baigent C, Bode C, De Caterina R, Charbonnier B, et al. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European society of cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25: 166-81.
66. Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet Drugs: American College of Chest Physicians Evidence - Based Clinical Practice Guidelines (8th edition). *Chest* 2008; 133(6 Suppl): 199S-233S. doi: 10.1378/chest.08-0672.
67. Peisker T, Chýlová M, Škoda O, Štětkářová I. Cerebrovaskulární onemocnění. V: Štětkářová, I. a kol.: *Moderní farmakoterapie v neurologii*. 2. rozšíř. vyd. Praha: Maxdorf, 2017, s. 17-41. Edice: Jessenius
68. Peisker Tomáš, Kalvach Pavel, Škoda Ondřej. Kapitola 19. Farmakoterapie cerebrovaskulárních poruch. In Josef Marek a Michal Vráblík. *Markova Farmakoterapie vnitřních nemocí*, 2019, 16 stran. ISBN: 978-80-247-5078-1
69. Rocca B, Patrono C. Determinants of interindividual variability in response to antiplatelets drugs. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8): 1597-602. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01380.x.
70. Shimizu M, Natori T, Tsuda K, Yoshida M, Kamada A, Oi K et al. Thrombin-induced platelet aggregation-effect of dabigatran using automated platelet aggregometry. *Platelets* 2020; 31(3): 360-364. doi: 10.1080/09537104.2019.1624707.

71. S. I. Obydenny, Sveshnikova AN, Ataulakhanov FI, Pantelev MA. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J Thromb Haemost* 2016; 14(9): 167-81. doi: 10.1111/jth.13395.
72. Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, et al. Rapid Platelet –Function Assay: An Automated and Quantitative Cartridge-Based Method. *Circulation* 1999; 99(5): 620-625.
73. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Huisman MV. Association of laboratory- defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167(15):1593-1599.
74. Sokol J, Nehaj F, Ivankova J, Mogan M, Mogan M, Stasko J. Dabigatran affects thrombin-dependent platelet aggregation after a week-long therapy. *Scand Cardiovasc J* 2018; 52(4): 227-231. doi: 10.1080/14017431.2018.1480798.
75. Solandt DY, Best CH. Time relation of heparin action on blood clotting and platelet agglutination. *Lancet* 1940; 235(6093): P1042-1044.
76. Sztriha LK, Sas K, Seres E, Boda K, Lenti L, Csifcsak G, et al. Optical platelet aggregometry does not appear useful as a means of assessing the risk of recurrent vascular events in aspirin-treated patients. *Acta Neurol Scand* 2008; 117(4): 250-254. doi: 10.1111/j.1600-0404.2007.00937.x.
77. Sztriha LK, Sas K, Vecsei L. Aspirin resistance in stroke 2004. *J Neurol Sci* 2005; 229-230: 163-169. doi: 10.1016/j.jns.2004.11.023.
78. Tomek A, Maťoška V, Frýdmanová A, Magerová H, Šrámek M, Paulasova-Schwabová J et al. Impact of CYP2C19 Polymorphisms on Clinical Outcomes and

Antiplatelet Potency of Clopidogrel in Caucasian Poststroke Survivors. *Am J Ther* 2018; 25(2):e202-e212. doi: 10.1097/MJT.0000000000000416.

79. Tousoulis D, Siasos G, Stefanadis C. Aspirin resistance: What the cardiologist needs to know? *Int J Cardiol* 2009; 132(2): 153-156.
80. Travníčková E. Fyziologie krve. V: Trojan S. Lékařská fyziologie. 2. přepracované a rozšířené vydání. Praha: Grada 1996: 73-106.
81. User manual, APACT 4004, four channels aggregometer for assesing aggregation of platelets in vitro, Biogenix s.r.o., Prague, Czech Republic.
82. User manual, Verify Now system. Accumetrics Inc., USA 2006; 1-122.
83. Vališ M, Klímová B, Novotný M, Herzig R. Antiplatelet Therapy in the Secondary Prevention of Non-cardioembolic Ischemic Stroke and Transient Ischemic Attack : A Mini-Review. *Front.Neurol.* 2021; 12:626106. doi: 10.3389/fneur.2021.6261
84. Wigle P, Hein B, Bloomfield HE, Tubb M, Doherty M. Updated Guidelines on Outpatient Anticoagulation. *Am Fam Physician* 2013; 87(8):556-66.