

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**POROVNANIE AGREGÁCIE DOŠTIČIEK U ZDRAVÝCH DOBROVOĽNÍKOV**

Comparison of platelet aggregation in healthy population

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, PhD.

Konzultant: Mgr. Lukáš Konečný

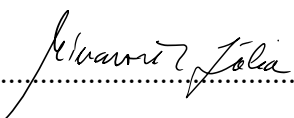
Hradec Králové 2023

Júlia Minarovičová

## Čestné prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetky literárne a ďalšie zdroje, z ktorých som pri jej vypracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.“

Hradec Králové 2023



.....

Minarovičová Júlia

## Pod'akovanie

Veľmi rada by som touto cestou pod'akovala pánovi prof. Přemyslovi Mladěnkovi, PhD. za jeho rady a pomoc pri vypracovávaní tejto diplomovej práce. Taktiež by som rada pod'akovala pánovi Mgr. Lukášovi Konečnému za jeho pomoc pri písaní tejto diplomovej práce a taktiež každému, kto sa na jej vypracovávaní akýmkoľvek spôsobom podieľal. V neposlednom rade by som chcela tiež pod'akovať mojej rodine za podporu počas celého štúdia.

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakológie a toxikológie**

**Študentka:** Júlia Minarovičová

**Školiteľ:** prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

**Názov diplomovej práce:** Porovnanie agregácie doštičiek u zdravých dobrovoľníkov

Krvné doštičky majú nezastupiteľnú úlohu v procese agregácie. Na druhej strane, je ale ich zvýšená aktivita spojená s rozvojom kardiovaskulárnych ochorení. Tento dej možno ovplyvniť klinicky používanými látkami zo skupiny protidoštičkových liečiv, ktoré sa odlišujú svojou účinnosťou v rámci populácie. Počas tejto práce bola agregácia krvných doštičiek testovaná s využitím impedačnej agregometrie, ktorej princípom je zmena elektrickej impedancie medzi elektródami spôsobená adhéziou aktivovaných krvných doštičiek. Najskôr bola plná krv inkubovaná s klinicky používanými protidoštičkovými liečivami (tikagrelor, vorapaxar a kyselina acetylsalicylová) a flavonoidným metabolitom, 4-metylkatecholom. Následne bol pridaný zodpovedajúci induktor agregácie krvných doštičiek (ADP, trombinový receptor aktivujúci peptid 6 /TRAP/, kolagén, kyselina arachidonová, ristocetin, U-46619 a doštičky aktivujúci faktor /PAF/) a proces bol monitorovaný po dobu 6 minút. Najpotentnejší inhibítor agregácie indukovanej kyselinou arachidonovou bola kyselina acetylsalicylová v koncentráciách 70  $\mu\text{M}$ , v prípade kolagénom indukovanej agregácie to bol 4-metylkatechol v rovnakej koncentráciách. Tikagrelor sa preukázal ako potentný a konzistentný inhibítor ADP-indukovanej agregácie u všetkých darcov. U vorapaxaru, antagonistu na trombinových receptoroch, bol jeho účinok výrazne závislý na veku a dávke. Ženy vykazovali vyššiu odpoveď na niektoré induktory agregácie (ADP a TRAP), avšak v prípade agregácie vyvolanej kolagénom a kyselinou arachidonovou neboli medzi pohlaviami pozorované žiadne významné rozdiely. U žien bola taktiež preukázaná nižšia odpoveď na podanie niektorých liečiv, ako je kyselina acetylsalicylová a vorapaxar. U oboch pohlaví bola taktiež preukázaná znižujúca sa odpoveď doštičiek na agregáciu vyvolanú kyselinou arachidonovou a TRAP s narastajúcim vekom darcov. U žien s vekom klesala odpoveď aj na agregáciu vyvolanú ďalšími induktormi (ADP, U-46619 a PAF). Výsledky tejto práce, aj napriek relatívne malej skupine zdravých jedincov, poukazujú na významné rozdiely v odpovedi trombocytov na podané liečivá a potrebu individualizácie terapie.

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacology & Toxicology**

**Student:** Júlia Minarovičová

**Supervisor:** prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Comparison of platelet aggregation in healthy population

Platelets have an irreplaceable role in the process of aggregation. Nevertheless, their increased activity is associated with the development of many cardiovascular diseases. This process can be influenced by clinically used substances from the group of antiplatelet drugs, which differ in their effectiveness within the population. Within this study, platelet aggregation was tested using impedance aggregometry, whose principle is the change in electrical impedance between electrodes caused by the adhesion of activated platelets. Firstly, whole blood was incubated with clinically used antiplatelet drugs (ticagrelor, vorapaxar, and acetylsalicylic acid) and a flavonoid metabolite, 4-methylcatechol. Subsequently, a platelet aggregation inducer (ADP, thrombin receptor activating peptide 6 /TRAP/, collagen, arachidonic acid, ristocetin, U-46619, and platelet-activating factor /PAF/) was added, and the process was monitored for 6 minutes. The most potent inhibitor of the aggregation induced by arachidonic acid was acetylsalicylic acid in a concentration of 70  $\mu$ M while in the case of the aggregation induced by collagen, it was 4-methylcatechol in the same concentration. Ticagrelor has proven to be effective and consistent inhibitor of ADP-triggered platelet aggregation in all donors. For vorapaxar, an antagonist at thrombin receptors, its effect was significantly dependent on age and dose. Women also showed a higher response to some inducers of aggregation (ADP and TRAP), however, no differences were observed between male and female donors in the case of aggregation induced by collagen and arachidonic acid. In women, there was a lower response to the administration of certain drugs, such as acetylsalicylic acid and vorapaxar. Increasing age was also associated with lowering the responses to aggregation induced by arachidonic acid and TRAP in both sexes. In women, the response to aggregation induced by some other inducers (ADP, U-46619, and PAF) also decreased with age. The results of this work, despite the relatively small number of healthy individuals, point to significant differences in the responses of thrombocytes to administered drugs and the need for individualized therapy.

# Obsah

1	Zoznam skratiek .....	9
2	Úvod.....	11
3	Teoretická časť.....	12
3.1	Trombocyty .....	12
3.1.1	Stavba trombocytov.....	12
3.1.2	Vývoj trombocytov .....	13
3.1.3	Receptory a látky, ktoré sa zúčastňujú procesu agregácie .....	14
3.1.4	Proces agregácie trombocytov .....	17
3.2	Klinicky používané protidoštičkové liečivá .....	19
3.2.1	Kyselina acetylsalicylová.....	20
3.2.2	Tiklopidín.....	21
3.2.3	Klopidogrel.....	22
3.2.4	Prasugrel.....	23
3.2.5	Tikagrelor .....	24
3.2.6	Kangrelor.....	25
3.2.7	Vorapaxar .....	27
3.2.8	Abciximab .....	28
3.2.9	Tirofiban.....	29
3.2.10	Eptifibatid.....	30
3.3	Nové protidoštičkové liečivá .....	31
3.3.1	Inhibítory fosfotydylinostil-3-kinázy B .....	31
3.3.2	Antagonisti PAR-4 .....	31
3.3.3	Inhibítory 12-lipooxygenázy .....	31
3.3.4	Nové inhibítory purinérnych receptorov .....	32
3.3.5	Inhibítory GP Ib/IX/V .....	32

3.3.6	Inhibítory GP VI.....	32
3.3.7	Inhibítory proteín-disulfid isomerázy.....	33
3.3.8	4-metylkatechol.....	33
3.4	Rezistencia na protidoštičkovú liečbu .....	34
3.4.1	Rezistencia na ASA.....	34
3.4.2	Rezistencia na klopidogrel .....	35
3.4.3	Rezistencia na ďalšie inhibítory receptora P2Y12.....	35
3.5	Metódy merania agregácie trombocytov .....	36
3.5.1	<i>Ex vivo</i> metódy .....	36
3.5.2	<i>In vivo</i> metódy .....	38
4	Cieľ práce.....	40
5	Experimentálna časť .....	41
5.1	Odber krvi.....	41
5.1.1	Etické aspekty .....	41
5.1.2	Vlastný odber .....	41
5.1.3	Charakteristika dobrovoľníkov .....	42
5.2	Induktory, protideštičkové liečivá a ďalšie chemikálie.....	46
5.3	Príprava činidiel pred experimentom .....	46
5.4	Vlastný experiment.....	49
6	Matematická a štatistická analýza.....	55
7	Výsledky .....	56
7.1	Agregácia indukovaná kyselinou arachidonovou.....	56
7.2	Agregácia indukovaná kolagénom .....	57
7.3	Agregácia indukovaná ADP .....	59
7.4	Agregácia indukovaná TRAP.....	60
7.5	Rozdiely v agregácií medzi pohlaviami .....	61

7.6	Rozdiely v agregácií v závislosti na veku .....	72
8	Diskusia.....	79
9	Záver .....	82
10	Zoznam použitej literatúry .....	83



## 1 Zoznam skratiek

<b>AA</b>	Kyselina arachidonová (z angl. <b>arachidonic acid</b> )
<b>ADP</b>	Adenozíndifosfát (z angl. <b>adenosindiphosphate</b> )
<b>ASA</b>	Kyselina acetylsalicylová (z angl. <b>acetylsalicylic acid</b> )
<b>ATP</b>	Adenozíntrifosfát (z angl. <b>adenosintriphosphate</b> )
<b>AUC</b>	Plocha pod krivkou (z angl. <b>area under the curve</b> )
<b>BMI</b>	Index telesnej hmotnosti (z angl. <b>body mass index</b> )
<b>cAMP</b>	Cyklický adenozínmonofosfát (z angl. <b>cyclic adenosinmonophosphate</b> )
<b>COX</b>	Cyklooxygenáza
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>GP</b>	Glykoproteín
<b>GPCR</b>	Receptor sprážený s G-proteínom (z angl. <b>G-protein coupled receptor</b> )
<b>5-HT</b>	5- hydroxytryptamín (serotonín)
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltrifosfát (z angl. <b>inositoltriphosphate</b> )
<b>4-MC</b>	4- methylkatechol
<b>NSAID</b>	Nesteroidné antiflogistiká (z angl. <b>non-steroidal anti-inflammatory drugs</b> )
<b>PAF</b>	Faktor aktivujúci doštičky (z angl. <b>platelet-activating factor</b> )
<b>PAR</b>	Proteázou aktivované receptory (z angl. <b>protease-activated receptor</b> )
<b>PCI</b>	Perkutánná koronárna intervencia (z angl. <b>percutaneous coronary intervention</b> )
<b>PDEi</b>	Inhibitory fosfodiesterázy (z angl. <b>phosphodiesterase inhibitors</b> )

<b>PGG<sub>2</sub></b>	Prostaglandín G <sub>2</sub>
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Prostaglandín H <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandín I <sub>2</sub> (prostacyklín)
<b>PRP</b>	Plazma s vysokým obsahom trombocytov (z angl. <b>p</b> latelet- <b>r</b> ich <b>p</b> lasma)
<b>TRAP</b>	Peptid aktivujúci receptor pre trombín (z angl. <b>t</b> hrombin <b>r</b> eceptor <b>a</b> ctivating <b>p</b> eptide)
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxán A <sub>2</sub>
<b>TXB<sub>2</sub></b>	Tromboxán B <sub>2</sub>
<b>vWF</b>	Von Willebrandov faktor

## 2 Úvod

Krvné doštičky sú bezjadrové špecializované krvné elementy, ktoré hrajú ústrednú úlohu vo fyziologických a patologických procesoch hemostázy, zápalu, hojenia rán a obranyschopnosti organizmu. Vznikajú z megakaryocytov v kostnej dreni s počtom  $150-450 \times 10^3$  v  $1 \mu\text{l}$  krvi. V procese tvorby hemostatickej zátky vstupujú vďaka reakciám odhalených subendotelových štruktúr s receptami na ich povrchu, čo spúšťa kaskádu dejov, ktorých výsledkov je zástava krvácania.

Táto práca je zameraná na porovnanie účinnosti protidoštičkových liečiv, teda látok, ktoré interferujú s funkciou trombocytov s využitím impedačnej agregometrie. V populácii zdravých dobrovoľníkov bola testovaná účinnosť troch klinicky využívaných protidoštičkových liečiv, kyseliny acetylsalicylovej, tikagreloru, vorapaxaru a flavonoidného metabolitu 4-metylkatecholu. Agregácia bola vyvolaná jedným zo siedmich použitých induktorov agregácie. Výsledky poukazujú na významné rozdiely v účinnosti týchto liečiv a potrebu individualizácie protidoštičkovej terapie, ktorá má nezastúpiteľnú úlohu v liečbe kardiovaskulárnych ochorení.

## 3 Teoretická časť

### 3.1 Trombocyty

Krvné doštičky boli objavené v roku 1882 Giulio Bizzozzerom. (Ghoshal a Bhattacharyya 2014) Tento taliansky lekár a vedec ich opísal ako „spherules piastriane“ (malé doštičky), ktoré sa zhlukujú v mieste poranenia cievy. Popísal tiež, že sa jedná o krvné elementy, ktorým chýba jadro. (Twomey et al. 2019)

Sú to najmenšie krvné bunky, ktoré hrajú dôležitú úlohu v procese hemostázy a trombózy. (Jurk a Kehrel 2005) Priemerná veľkosť zreých krvných doštičiek je približne  $6\mu\text{m}^3$  s priemerom asi  $2,3\mu\text{m}$ . Podiel krvných doštičiek v celkovom objeme krvi je 3%. (Nikolic et al. 2016) Normálny počet trombocytov je  $150\text{--}450 \times 10^3$  v  $1\mu\text{l}$  krvi, čo z nich robí, hneď po erytrocytoch, druhý najrozšírenejší typ krvných elementov. (Twomey et al. 2019)

Krvné doštičky sa v ľudskom tele zúčastňujú viacerých procesov. Okrem úlohy v procese zástavy krvácania, trombocyty prispievajú k modulácii zápalu a k imunitnej reakcii organizmu pomocou toll-like receptorov. (Theofilis et al. 2022)

#### 3.1.1 Stavba trombocytov

Bez predchádzajúcej aktivácie sa krvné doštičky javia ako hladké, diskoidné bunky s otvoreným kanalikulárnym systémom a vonkajším glykokalyxom. V cytoplazme krvných doštičiek sa nachádzajú tri typy granúl:  $\alpha$ -granuly, denzné granuly a lyzozómy. (Wiviott 2009)  $\alpha$ -granuly tvoria najväčšiu skupinu granúl, v cytoplazme každej krvnej doštičky je ich približne 50 až 80. Obsahujú adhezívne glykoproteíny, ako je P-selektín, fibrinogén a von Willebrandov faktor (vWF), koagulačné faktory, mitogénne faktory, angiogenetické faktory, fibrinolytické inhibítory, imunoglobulíny, špecifické membránové proteíny a rôzne ďalšie chemokíny. (Yun et al. 2016) Denzné granuly majú menšie rozmery v porovnaní s  $\alpha$ -granulami. Ich počet je približne 3 až 8 v každej krvnej doštičke. (Twomey et al. 2019) Uchovávajú rôzne hemostaticky aktívne molekuly, ktoré sú vylučované počas aktivácie trombocytov ako katecholamíny, serotonín (5-HT), vápnik, adenosíntrifosfát (ADP) a adenosíntrifosfát (ATP). (Ghoshal a Bhattacharyya 2014) Poslednou doteraz objavenou skupinou sú lyzozomálne granuly, obsahujúce enzýmy, ako sú kyslé hydrolázy a proteázy. Sekrécia lyzozomálneho obsahu má kľúčové extracelulárne funkcie, vrátane štiepenia receptorov či fibrinolýzy. (Twomey et al. 2019)

V cytoplazme krvných doštičiek sa vyskytujú aj molekuly aktínu a myozínu, ktoré sú podobné tým, ktoré sú esenciálne pre proces kontrakcie svalstva, taktiež kontraktilný proteín trombosťenín, ktorý spôsobuje kontrakciu krvných doštičiek. (Hall 2016)

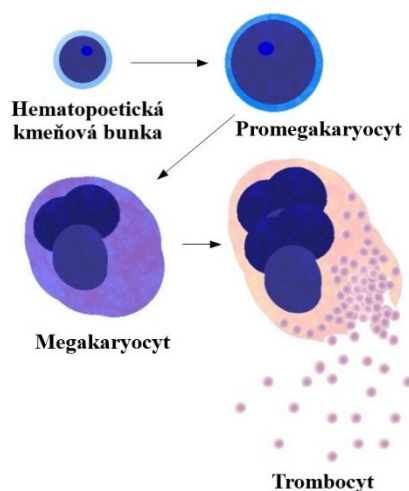
Obsahujú taktiež bunkové organely, ako je hladké endoplazmatické retikulum, ktoré sa u doštičiek nazýva denzný tubulárny systém a Golgiho aparát, ktorých hlavnou úlohou je syntéza rôznych enzýmov a uchovávanie veľkého množstva vápnika. (Hall 2016) Obsahujú aj malý počet funkčných mitochondrií. Aj napriek nízkemu počtu sú nadmerne metabolicky aktívne, dochádza v nich k veľkému obratu ATP, ktoré zásobuje krvné doštičky energiou pre plnenie primárnych funkcií. (Twomey et al. 2019)

### 3.1.2 Vývoj trombocytov

Vývoj krvných doštičiek je jedinečný proces. (George 2000) Denne dochádza k tvorbe až  $1 \times 10^{11}$  nových trombocytov. (Wiviott 2009) Proces ich genézy prebieha za špecifických podmienok v prostredí kostnej drene a je regulovaný prostredníctvom rôznych chemokínov, rastových faktorov, vápnika, kyslíka a adhezívnych interakcií, ktoré sprostredkujú megakaryocytopoézu a migráciu megakaryocytov s následnou tvorbou trombocytov. (Yang et al. 2021)

Kľúčovým regulátorom syntézy trombocytov je trombopoetín, hormón produkovaný pečeňou a detskou žľazou. Jeho vplyvom dochádza k diferenciácií hematopoetických kmeňových buniek na megakaryocyty. (Twomey et al. 2019) V ich tvorbe zohrávajú ale dôležitú úlohu aj iné cytokíny, ako sú interleukíny 3,6 a 11. (George 2000) Zrenie megakaryocytu zahŕňa duplikáciu jadra bez delenia bunky. Výsledkom tohto procesu sú bunky obrovských rozmerov. Cytoplazmatické organely organizované do domén, ktoré reprezentujú vznikajúce trombocyty, sú ohraničené sieťou invaginovaných plazmatických membrán. (George 2000) Následne megakaryocyty migrujú do sínusových krvných ciev vo vaskulárnom výklenku. (Twomey et al. 2019) Fragmentácia cytoplazmy megakaryocytov na jednotlivé krvné doštičky prebieha až v krvnom obehu vplyvom smykových síl cirkulujúcej krvi. (George 2000) Schematické znázornenie tohto procesu sa nachádza na Obr. 1.

Krvné doštičky majú priemernú životnosť 8 až 10 dní. Následne sú vychytávané makrofágmi v slezine. (Gyulkhandanyan et al. 2013) Konštantný počet trombocytov v obehu je tak zabezpečený rovnováhou medzi ich produkciou a deštrukciou. (Twomey et al. 2019)



**Obr. 1 Trombocytopoéza**

Prevzaté a modifikované z: WikiSkripta

### 3.1.3 Receptory a látky, ktoré sa zúčastňujú procesu agregácie

Krvné doštičky exprimujú na svojom povrchu širokú škálu receptorov, ktorých stimulácia je spojená s ich aktiváciou, adhéziou či agregáciou. (Nikolic et al. 2016) Veľké množstvo týchto receptorov je sprážených s G-proteínom. Medzi hlavné receptory sprážené s G-proteínom (GPCR) prítomné na krvných doštičkách patria proteázou aktivované receptory (PAR), receptory pre ADP a tromboxánové receptory. Ďalším významným typom receptorov účastniacich sa procesu agregácie sú glykoproteínové receptory. (Twomey et al. 2019)

Glykoproteínové (GP) receptory prítomné na membráne trombocytov, sprostredkujú adhéziu k subendotelovým štruktúram a následne agregáciu za vzniku primárnej hemostatickej zátky. Glykoproteín Ib/IX/V je receptor pre vWF, ktorého aktivácia spôsobuje okamžité prichytenie krvných doštičiek k exponovanému vWF. Glykoproteín Ia/IIa, konštitutívne aktívny receptor pre kolagén, sa podieľa na počiatkovej adhézii krvných doštičiek k subendoteliálnej matrici. Najrozšírenejší povrchový glykoproteínový receptor, glykoproteín IIb/IIIa, podstupuje konformačnú zmenu počas aktivácie trombocytov. Následne je pomocou väzby receptoru s fibrinogénom sprostredkovaná agregácia krvných doštičiek. (George 2000)

Kolagén je najviac trombogénnou zložkou subendotelu. Po poškodení ciev je vystavený cirkulujúcim krvným doštičkám a pôsobí ako substrát pre ich adhéziu a aktiváciu. Do interakcie medzi kolagénom a krvnými doštičkami sú zapojené najmä 2 druhy receptorov: GP Ia/IIa, ktorý

zabezpečí príľnutie ku kolagénu a glykoproteínový receptor VI zodpovedný za aktiváciu doštičiek. (Roberts et al. 2004) Pri vysokých koncentráciách kolagénu ich aktivácia vedie k stimulácii fosfolipázy C s následným štiepením fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu na inositoltrifosfát (IP<sub>3</sub>) a 1,2-diacylglycerol. IP<sub>3</sub> podnecuje uvoľnenie Ca<sup>2+</sup> z hustého tubulárneho systému trombocytov a diacylglycerol stimuluje proteinkinázu C. Kolagénom indukované zvýšenie koncentrácie IP<sub>3</sub> vedie aj k prílevu vápnika z extracelulárneho priestoru. Diacylglycerol, spolu s Ca<sup>2+</sup>, vedie k sekrécii granúl a zmene tvaru trombocytov. (Roberts et al. 2004) Glykoproteínový receptorový komplex Ia/IIa je považovaný za hlavný doštičkový receptor interagujúci s kolagénom v procese adhézie na poškodený vaskulárny endotel. (Siljander a Lassila 1999) Aktivácia krvných doštičiek kolagénom prebieha pomocou detekcie špecifickej sekvencie Gly-Pro-Hyp doštičkovým glykoproteínom VI. Rozpoznanie GP Ia/IIa nie je dostatočným signálom pre proces aktivácie. Interakcia medzi kolagénom a glykoproteínom VI je jedinečná, pretože sekvencia Gly-Pro-Hyp je síce bežne vyskytujúca sa v molekulách kolagénu, avšak pre iné proteíny je jej výskyt len zriedkavý. (Graham Knight et al. 1999)

Ďalším typom GPCR, ktoré sa nachádzajú na povrchu trombocytov sú dva typy purinérnych receptorov: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> a P2X<sub>1</sub>. Agonistom prvých dvoch je ADP. (De Meyer et al. 2008) ADP sa uvoľňuje z aktivovaných krvných doštičiek, erytrocytov a endotelových buniek a pôsobí ako významný induktor adhézie a agregácie trombocytov. (Kam a Nethery 2003) Receptor P2Y<sub>1</sub> je proteín tvorený 373 aminokyselinami, pozostávajúci zo siedmich transmembránových domén. Je exprimovaný v srdci, hladkom svalstve, nervovom tkanive, semenníkoch, prostate, vaječníkoch a na povrchu trombocytov. Dve molekuly arginínu v karboxyterminálnej doméne tohto receptora sú nevyhnutné pre aktiváciu G<sub>q</sub> proteínu. (Kahner et al. 2006) Jeho stimulácia vedie k aktivácii fosfolipázy C s následnou tvorbou IP<sub>3</sub>, diacylglycerolu a uvoľneniu Ca<sup>2+</sup> ktoré sú potrebné na aktiváciu proteinkinázy C. P2Y<sub>1</sub> je zodpovedný za zmenu tvaru trombocytov a ich reverzibilnú agregáciu. Receptor P2Y<sub>12</sub> je spojený s G<sub>i</sub> proteínom, takže stimuláciou tohto receptora dochádza k inhibícii adenylátcyklázy. ADP-indukovaná aktivácia a následná agregácia trombocytov je podmienená stimuláciou oboch receptorov, avšak každý z nich plní v tomto procese inú funkciu. Aktivácia receptora P2Y<sub>12</sub> vedie k trvalej agregácii bez predchádzajúcej zmeny tvaru. V klinickej praxi je najčastejším cieľom práve receptor P2Y<sub>12</sub>, keďže na rozdiel od iných purinérnych receptorov, je exprimovaný len na krvných doštičkách a v mozgu, čo predstavuje selektívnejší cieľ pre pôsobenie liečiv. Posledný typ purinérnych receptorov, P2X<sub>1</sub> sa skladaná minimálne

z troch monomérov tvoriacich ATP neselektívny katiónový kanál, ktorý po aktivácii trombocytov vedie k rýchlemu prílivu  $\text{Ca}^{2+}$  z extracelulárneho priestoru. (De Meyer et al. 2008)

Trombín pôsobí ako aktivátor krvných doštičiek prostredníctvom jeho agonistického účinku na svoje špecifické receptory. Posilňuje aktiváciu krvných doštičiek a konverziu fibrinogénu na fibrín, hrá hlavnú úlohu v procese sekundárnej hemostázy. Na doštičky pôsobí prostredníctvom PAR, čo je skupina proteolyticky aktivovaných receptorov sprážených s G-proteínom. (Clemetson 2012) Doteraz boli identifikované štyri typy PAR: PAR-1 až PAR-4, z ktorých tri (PAR-1, PAR-2, PAR-4) sú aktivované nízkymi koncentráciami trombínu. Všetky typy sú exprimované na endoteliálnych bunkách, myocytoch či astrocytoch, avšak na povrchu ľudských trombocytov sú prítomne len PAR-1 a PAR-4 receptory. Za dominantný typ je považovaný práve PAR-1, ktorý je aktivovaný už 100x nižšou koncentráciou trombínu ako PAR-4. (Airoidi a Campanini 2013) Väzba medzi trombínom a PAR-1 je sprostredkovaná pomocou fibrínového miesta trombínu, ktoré je rozpoznané extracelulárnou amino-doménou receptoru. Po spojení, trombín proteolyticky štiepi túto doménu medzi Arg-41 a Ser-42. Nový amino-koniec (Ser-42-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn) pôsobí ako viazaný ligand a aktivuje transmembránovu slučku receptoru, čo vedie k aktivácii G-proteínu. (Airoidi a Campanini 2013, Olivier et al. 2013) Aktiváciou G-proteínu dochádza k stimulácii proteínkinázy C. (Airoidi a Campanini 2013) Signalizácia prostredníctvom PAR-4 slúži aj ako ochranný mechanizmus v situáciách vyvolávajúcich traumy, čo prispieva k zástave krvácania. (Clemetson 2012)

Tromboxán  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) bol prvýkrát identifikovaný v roku 1975 ako látka vytváraná aktivovanými krvnými doštičkami. Po uvoľnení kyseliny arachidonovej (AA) pomocou fosfolipázy  $\text{A}_2$ , je táto následne metabolizovaná prostredníctvom cyklooxygenázy (COX) za vzniku prostaglandínu  $\text{H}_2$  (PGH<sub>2</sub>). PGH<sub>2</sub> je metabolizovaný terminálnym enzýmom,  $\text{TXA}_2$  syntázou, za vzniku  $\text{TXA}_2$ . (Ashton et al. 2022)  $\text{TXA}_2$  pôsobí prostredníctvom tromboxánových receptorov (TP), ktoré sú u ľudí kódované génom  $\text{TBXA}2\text{R}$ . Aktiváciou týchto receptorov dochádza k aktivácii, sekrécií a agregácii krvných doštičiek, ktoré hrajú kľúčovú úlohu v procese hemostázy. (Capra et al. 2014)

Ďalším typom receptorov, ktoré sa vyskytujú na membráne trombocytov sú receptory pre serotonín (5-HT). Rozlišujeme 7 typov serotonínových receptorov (5-HT<sub>1</sub> až 5-HT<sub>7</sub>), z ktorých väčšina má niekoľko podtypov. Na trombocytoch nájdeme len receptor 5-HT<sub>2A</sub>, ktorý je ale prítomný aj v hladkej svalovine ciev a v centrálnom nervovom systéme. Jedná sa o typ receptoru spojený s G<sub>q</sub> proteínom. Jeho aktivácia vedie k aktivácii krvných doštičiek,



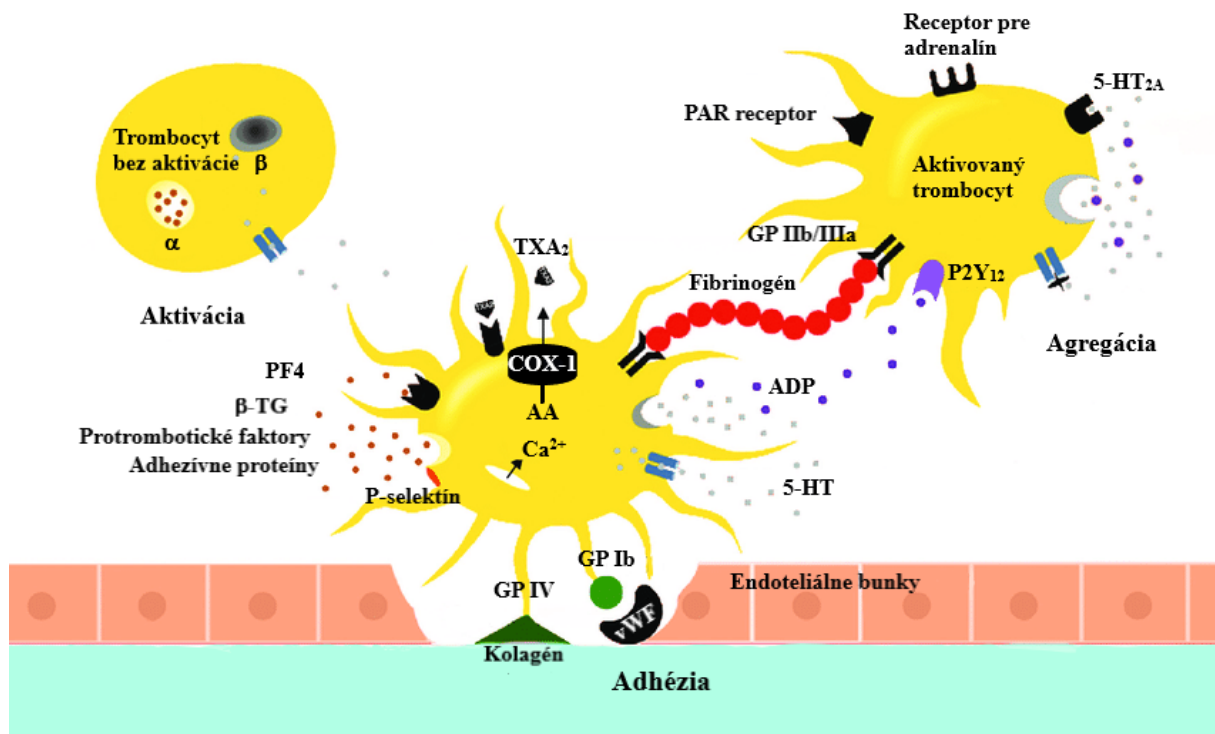
uvoľneniu serotonínu z denzných granúl a následná prehĺbená aktivácia tohto receptora vedie k zmene tvaru a oslabeniu agregácie. (De Meyer et al. 2008) 5-HT je sám o sebe považovaný za slabého induktora agregácie, avšak veľmi potentne zosilňuje agregáciu vyvolanú ADP, adrenálnom či kolagénom. (de Abajo 2011) K zástave krvácania prispieva aj aktivácia 5-HT<sub>2A</sub> receptora v stene ciev, čo potencuje tvorbu trombu a oklúziu ciev. (De Meyer et al. 2008)

### 3.1.4 Proces agregácie trombocytov

Proces primárnej hemostázy sa týka skorých štádií procesu zastavenie krvácania, ešte pred začiatkom koagulácie. (Clemetson 2012) Prebieha v troch fázach: iniciácia, elongácia a perpetuácia. (Michelson 2003)

Adhélia trombocytov je základnou reakciou na vaskulárne poškodenie, ktorú považujeme za prvý krok v procese hemostázy. Krvné doštičky cirkulujúce v krvi, nevykazujú žiadnu interakciu s endotelom cievy, až do momentu, kedy sú jej endotelové štruktúry vystavené na povrch. (Ruggeri a Mendolicchio 2007) Po poranení cievnej steny je tvorba zátky iniciovaná reakciou cirkulujúcich krvných doštičiek s exponovaným subendoteliálnym kolagénom a vWF. (Michelson 2003, Sangkuhl et al. 2011) Interakcia medzi vWF a kolagénom je sprostredkovaná špecifickými receptormi na povrchu trombocytov (viď vyššie). (Michelson 2003) Najskôr dochádza k zabrzdzeniu doštičiek interakciou s vWF, ktorý je viazaný na kolagén. Väzba s kolagénom je sprostredkovaná priamo pomocou glykoproteínového receptorového komplexu. (Sangkuhl et al. 2011) Stimulácia týchto receptorov je spojená s aktiváciou kaskády fosfolipázy C, čo vedie k mobilizácii vápnika z hustého tubulárneho systému trombocytov. Zvýšená koncentrácia intracelulárneho vápnika je spojená s aktivitou kináz, ktoré sú nevyhnutné pre morfológické zmeny, sekréciu obsahu granúl trombocytov, aktiváciu fosfolipázy A<sub>2</sub> a nakoniec GP komplexu. (Sangkuhl et al. 2011) Akonáhle dôjde k priľnutiu krvných doštičiek k endotelu cievy, dochádza k ich aktivácii, s čím je spojená dramatická zmena tvaru. (Hosseinzadegan a Tafti 2017) Nasleduje proces elongácie, ktorý je charakterizovaný nahromadením ďalších trombocytov. (Michelson 2003) Okrem vzostupu koncentrácie kalcia dochádza aj k reorganizácii cytoskeletu trombocytov či vylúčeniu sekundárnych metabolitov. (Baker-Groberg et al. 2016) Aktivované krvné doštičky uvoľňujú obsah svojich granúl, čo vedie k modelácii funkcie interagujúcich trombocytov a vaskulárnych buniek. Tieto látky stimulujú cirkulujúce krvné doštičky k tvorbe agregátu. ADP je považovaný za najvýznamnejšiu zložku zosilňujúcu aktiváciu doštičiek. 5-HT sa taktiež pomocou

stimulácie svojich 5-HT<sub>2A</sub> receptorov účasti aktivačného procesu. (Jurk a Kehrel 2005) Enzýmy, ktorých funkcia je riadená aktivovanou fosfolipázou A<sub>2</sub> uvoľňujú kyselinu arachidonovú, ktorej premena cez PGG<sub>2</sub> na PGH<sub>2</sub> je katalyzovaná prostagladín-syntázou (známou ako cyklooxygenáza (COX), v doštičkách len cyklooxygenáza 1). PGH<sub>2</sub> je následne pôsobením TXA<sub>2</sub>-syntázy premenené na TXA<sub>2</sub>. (Sangkuhl et al. 2011) Po aktivácii trombocytov dochádza ku konformačnej zmene GP komplexu, čo umožňuje väzbu vWF a neskôr aj fibrinogénu. Krvné doštičky sa zhlukujú prostredníctvom interakcie medzi fibrinogénom a GP komplexom. Súbežne dochádza k aktivácii koagulačnej kaskády, čo vedie k syntéze trombínu, ktorý štiepi fibrinogén na fibrín, čo vedie k vytvoreniu hemostatickej zátky. (Baker-Groberg et al. 2016). Stručné zobrazenie celého procesu sa nachádza na Obr. 2.



Obr. 2 Proces agregácie trombocytov

Prevzaté a modifikované z: De Abajo (2011)

### 3.2 Klinicky používané protidoštičkové liečivá

Kardiovaskulárne ochorenia sú najčastejšou príčinou úmrtí na svete. Vzhľadom na to, že trombocyty hrajú kľúčovú úlohu pri tvorbe arteriálneho trombu, protidoštičkové liečivá sú jednou z najčastejšie predpisovaných skupín liečiv súčasnosti. (Jourdi et al. 2022) Jedná sa o veľkú skupinu farmakologicky účinných látok, ktoré interferujú s aktivitou krvných doštičiek a zabraňujú tvorbe krvných zrazenín. Majú široké spektrum použitia, najmä u pacientov s ischemickou chorobou srdca vrátane najzávažnejšieho stavu, ktorým je srdcový infarkt. Využívajú sa pri angioplastikách s, alebo bez zavedenia stentu, či aortokoronárnych premosteniach na prevenciu stenózy. (Ren et al. 2010) Do skupiny protidoštičkových liečiv patrí množstvo látok, ktoré môžu ovplyvňovať rôzne fázy procesu primárnej hemostázy, od adhézie až po vznik agregátu trombocytov s ich následnou retrakciou. (Penka 2012)

Liečivá blokujúce prvú fázu, t. j. adhéziu doštičiek k subendotelovým štruktúram, najmä ku kolagénu, sú stále vo fáze klinického testovania. (Švihovec et al. 2018)

Dominantná skupina liečiv pôsobí v procese aktivácie a degranulácie trombocytov rôznymi mechanizmami. (Švihovec et al. 2018) Zabraňujú tvorbe druhých poslov inhibíciou COX-1, ktorá je zodpovedná u doštičiek za konverziu kyseliny arachidonovej na prostaglandín, s následnou produkciou TXA<sup>2</sup>. (Jourdi et al. 2021, Latif Sarah et al. 2020) Iné liečivá zasahujú do priebehu niektorých intracelulárnych dráh. Jedná sa o inhibítory fosfodiesterázy (PDEi) či analógy prostacyklínu. Ďalšie skupiny pôsobia blokádou membránových receptorov trombocytov. (Jourdi et al. 2021) Skupina thienopyridínov zahŕňa 3 generácie liečiv: tiklopidín, klopidogrel a prasugrel. Všetky liečivá z tejto skupiny sú proliečivá, ktorých aktívna forma vzniká konverziou katalyzovanou pečeňovým systémom CYP450. (Latif Sarah et al. 2020) Ich aktívne metabolity s krátkou životnosťou, obsahujú vo svojej štruktúre voľnú thiolovú skupinu, ktorá vytvára disulfidické mostíky s oboma extracelulárnymi molekulami cysteínu (Cys17 a Cys270), čo vedie k ireverzibilnej inhibícii receptora P2Y<sub>12</sub>. (Ren et al. 2010) Reverzibilnou blokádou receptora P2Y<sub>12</sub> pôsobia liečivá zo skupiny analógov ATP. (Jourdi et al. 2021)

Vzhľadom na fakt, že v súčasnosti je len jedna skupina protidoštičkových liečiv pôsobiaca na úrovni agregácie, je starší názov antiagregancia, postupne nahrádzaný moderným pojmom protidoštičkové liečivá. (Švihovec et al. 2018) Jedinou klinicky používanou skupinou, ktorá pôsobí na úrovni agregácie, sú blokátory glykoproteínových receptorov IIb/IIIa. Obsadením väzbových miest glykoproteínového receptora je znemožnená väzba bivaletných proteínov, čím dochádza k inhibícii posledného kroku hemostázy. (Švihovec et al. 2018)

### 3.2.1 Kyselina acetylsalicylová

Vrbová kôra a iné rastliny obsahujúce salicyláty sa používali na úľavu od bolesti už od staroveku. V roku 1853 Charles Frederic Gerhardt modifikoval kyselinu salicylovú na kyselinu acetylsalicylovú (ASA, Obr. 3) prvý krát, avšak táto forma nebola nijakým spôsobom uvedená na trh. Až v roku 1897, po syntéze vykonanej chemikom z firmy Bayer, Dr. Felixom Hoffmanom bola na trh zavedená. (Miner a Hoffhines 2007) Aterotrombotické účinky boli prvý krát popísane Lawrencom Cravenom v polovici 20. storočia, čo viedlo k jej použitiu v prevencii infarktu myokardu a iných kardiovaskulárnych príhod. (Singal a Karthikeyan 2019)

Mechanizmom účinku ASA je inhibícia COX-1, čo vedie v trombocytoch k zastaveniu tvorby TXA<sub>2</sub>. (Hankey a Eikelboom 2003) ASA inhibuje COX-1 difúziou cez jej membránu ku katalytickému miestu enzýmu a následnou acetyláciou Ser-529 (v COX-1), čo bráni prístupu kyseliny arachidonovej. Analogicky pôsobí aj na COX-2, avšak v tomto prípade tvorí väzbu so Ser-516. (Hall a Mazer 2011) Vzhľadom na fakt, že trombocyty sú anukleárne bunky, syntéza TXA<sub>2</sub> je zablokovaná ireverzibilne, takže antitrombotický účinok pretrváva po celú dobu života trombocytov, aj napriek pomerne krátkemu polčasu eliminácie ASA, ktorý je približne 5-20 minút. (De Meyer et al. 2008, Ren et al. 2010)

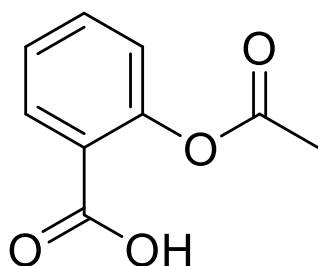
ASA sa rýchlo absorbuje po perorálnom podaní zo žalúdka a apikálnej časti tenkého čreva. Maximálnu koncentráciu v plazme dosahuje počas 30-40 minút a k inhibícií agregácie krvných doštičiek dochádza už po 60 minútach od jej podania. (Latif Sarah et al. 2020) Jej plný účinok je prítomný už pri dennej dávke 75-100 mg. (Pultar et al. 2019) Perorálna biologická dostupnosť klasických tabliet s obsahom ASA je 40% až 50%. Nižšia biologická dostupnosť je charakteristická pre enterosolvetné liekové formy, či pre iné liekové formy s predĺženým uvoľňovaním a mikroenkapsulované prípravky. (Eikelboom et al. 2012) Tieto formy nie sú, podľa súčasných znalostí, vhodné pre podanie ako protidoštičkové liečivá.

Relatívne jednoduchá farmakokinetika kyseliny acetylsalicylovej sa odráža v malom počte farmakokinetických interakcií. Mutagenetické štúdie potvrdili, že Arg-120 prítomný v COX-1 je miestom, na ktorom nesteroidné antiflogistiká (NSAID) obsahujúce karboxylovú funkčnú skupinu kompetujú s ASA. Čo sa farmakodynamických interakcií týka, súčasné podávanie niektorých liečiv zo skupiny NSAID (napr. ibuprofenu) a nízkych dávok ASA, môže viesť k zvýšeniu kardiovaskulárneho rizika spojeného s užívaním NSAID. (Patrono et al. 2017)

Dominantným nežiadúcim účinkom je zvýšené riziko krvácania. Mierne formy (vznik modrín či epistaxia) sú prítomné u 5-10% pacientov. Závažnejšie formy, ako je intrakraniálne

krvácenie či krvácanie do tráviaceho traktu sa vyskytujú vzácnejšie. Medzi ďalšie špecifické nežiadúce účinky patrí nauzea, zvracanie, pyróza, vzácne aj vznik žalúdočného či duodenálneho vredu. Možný je aj rozvoj hypersenzitívnych reakcií, ktoré sú nebezpečné zvlášť u pacientov s astmou bronchiale, kedy môže podanie ASA spôsobiť stav nazývaný „aspirínová astma“. (Švihovec et al. 2018) Zo závažnejších nežiadúcich účinkov bola nahlásená trombocytopenia a pancytopenia. (Cheng-Ching et al. 2012)

Kyselina acetylsalicylová je v západných krajinách liekom voľby na srdcovo-cievne ochorenia najmä vďaka svojmu výhodnému finančnému profilu. (Varon a Spectre 2009)



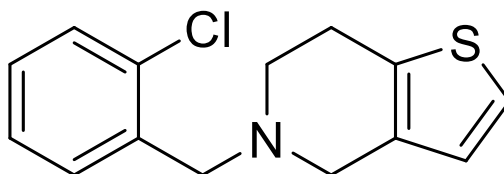
Obr. 3 Kyselina acetylsalicylová

### 3.2.2 Tiklopidín

Zástupcom prvej generácie thienopyridínov je tiklopidín – Obr. 4. (Kei et al. 2011) Rýchlo a vo veľkej miere dochádza k jeho absorpcii z gastrointestinálneho traktu s perorálnou biologickou dostupnosťou približne 80%. (Kam a Nethery 2003) Viac ako 98 % tiklopidínu sa reverzibilne viaže na plazmatické bielkoviny, prevažne na albumín. (Eikelboom et al. 2012)

Je to proliečivo, ktorého aktivácia na účinný metabolit je katalyzovaná pečevným enzymatickým komplexom CYP450, najmä jeho izoformami CYP2C19 a CYP2C6. (Kei et al. 2011) Celkovo bolo identifikovaných 13 metabolitov, z ktorých len 2-keto derivát spôsobuje silnejšiu inhibíciu ADP-indikovanej agregácie ako materské liečivo. Počas eliminácie tiklopidínu je 24 až 36 hodín po jednorazovej perorálnej dávke a až 96 hodín po 14 dňoch opakovaného dávkovania. (Eikelboom et al. 2012) Významná inhibícia agregácie krvných doštičiek však nastáva až po približne 4 dňoch po podaní liečiva perorálnou cestou, s maximálnou inhibíciou až za 8-11 dní. (Kei et al. 2011) Udržiavacia dávka tiklopidínu je 250 mg dva krát denne. (Ibanez et al. 2006)

Jeho použitie je dnes z dôvodu závažných nežiadúcich účinkov, ako je toxický účinok na kostnú dreň, neutropénia, aplastická anémia a trombocytopenická purpura, veľmi obmedzené. (Latif Sarah et al. 2020) V klinickej praxi je takmer úplne nahradený thienopyridínmi vyšších generácií alebo novšími antagonistami na P2Y12 receptoroch. (Kei et al. 2011)



Obr. 4 Tiklopidín

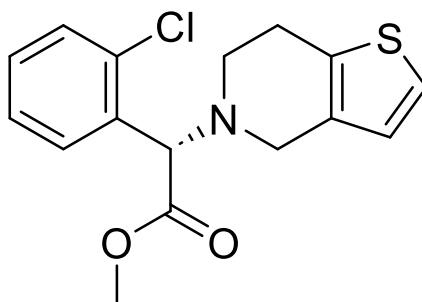
### 3.2.3 Klopido­grel

Klopido­grel (Obr. 5) je zástupcom druhej generácie thienopyridínov. (Kei et al. 2011) Asi polovica perorálne podaného klopido­grelu sa rýchlo absorbuje z gastrointestinálneho traktu a jeho biologická dostupnosť nie je ovplyvnená jedlom či antacidami. (Kam a Nethery 2003)

Rovnako ako ostatné thienopyridíny, jedná sa o proliečivo, ktoré je aktivované pomocou CYP450, najmä jeho izoformami CYP3A4 a CYP2C19 na aktívnu formu, ktorá pôsobí ako inhibítor receptora P2Y12 na povrchu trombocytov. Z dôvodu nutnej metabolickej aktivácie, klopido­grel vykazuje relatívne pomalý nástup účinku. Jeho efekt však pretrváva niekoľko dní, keďže pôsobí ako ireverzibilný blokátor tohto purinérgneho receptora na membráne trombocytov. (Kei et al. 2011) Jeho farmakokinetický profil nie je úplne optimálny. 85% klopido­grelu je inaktivovaného karboxylesterázami ešte pred prvým prechodom pečeňou a zároveň sa jedná o substrát p-glykoproteínu. Polymorfizmy CYP2C19 a p-glykoproteínu významne ovplyvňujú koncentráciu aktívneho metabolitu klopido­grelu a tým, samozrejme, aj jeho výslednú klinickú účinnosť. Dráhy p-glykoproteínu a CYP3A4, 2B6, 2C9 a 2C19 zodpovedajú za klinicky relevantné liekové interakcie klopido­grelu s omeprazolom, statínmi a silnými induktormi či inhibítormi CYP3A4 či p-glykoproteínu. (Patrono et al. 2017)

Na rozdiel od tiklopidínu, zástupcu prvej generácie thienopyridínov, je bežná dávka klopido­grelu 75 mg 1x denne, s výnimkou prvej dávky, ktorá sa pohybuje medzi 300-600 mg denne. Takáto dávka vedie k významnej inhibícii aktivácie krvných doštičiek indukovanej ADP už 2 hodiny po podaní, s maximálnou inhibičnou aktivitou po 6 hodinách. (Ibanez et al. 2006)

Klopidogrel má pozitívny bezpečnostný profil s výrazne nižším rizikom neutropénie a trombocytopenie v porovnaní so zástupcom prvej generácie thienopyridínov. (Cheng-Ching et al. 2012) Liečba klopidogrelom je zaťažená rovnakým rizikom výskytu krvácania ako pri použití ASA. Špecifickým nežiadúcim účinkom, ktorý sa objavuje asi u 10% pacientov, je dusnosť. (Švihovec et al. 2018)



Obr. 5 Klopidogrel

### 3.2.4 Prasugrel

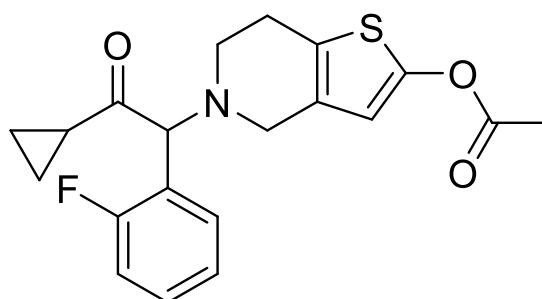
Prasugrel (Obr. 6) je perorálny thienopyridín tretej generácie, ktorý pôsobí ako selektívny a ireverzibilný inhibítor receptora P2Y<sub>12</sub>. (Siller-Matula et al. 2010) Rovnako ako ostatní zástupcovia zo skupiny thienopyridínov, jedná sa o proliečivo, ktorého konverzia na aktívny metabolit je katalyzovaná pečňovým cytochrómom CYP450. Dominantnými izoformami, ktoré sa zúčastňujú tejto metabolickej premeny sú CYP3A4 a CYP2B6. (Siller-Matula et al. 2010) Aktívny metabolit má polčas eliminácie 4 hodiny. Renálna exkrécia je hlavnou cestou eliminácie metabolitov. Aktívny metabolit podlieha premene na neaktívne látky S-metyláciou a konjugáciou s molekulami cysteínu. (Eikelboom et al. 2012)

Aj napriek faktu, že aktívne metabolity prasugrelu a klopidogrelu vykazujú podobnú afinitu k P2Y<sub>12</sub> receptorom *in vitro*, konverzia prasugrelu je účinnejšia, čo vedie k vyššej biologickej dostupnosti a odlišnému účinku *in vivo*. Vyznačuje sa rýchlejšim nástupom účinku, potentnejším antiagregačným pôsobením a zníženou variabilitou účinku. (Capodanno et al. 2013) Genetický polymorfizmus ovplyvňuje metabolizmus prasugrelu len minimálne. Farmakokinetické liekové interakcie prebiehajúce na CYP450 neboli popísané. (Koenig-Oberhuber a Filipovic 2016)

Nástup účinku prasugrelu je do 15 minút od podania a jeho maximálny inhibičný účinok je dosiahnutý do 60 minút. (Gelbenegger a Jilma 2022) Prasugrel sa podáva v nasycovacej dávke 60 mg. Jeho udržiavacia dávka je väčšinou 10 mg denne. (Latif Sarah et al. 2020)

Ukázalo sa, že jedinci s nedostatočnou odpoveďou na klopido-grel vykazujú vyššiu inhibíciu agregácie ako odpoveď na prasugrel. Podávanie prasugrelu je spojené s vyššou redukciou výskytu kardiovaskulárnych úmrtí, nefatálneho infarktu myokardu a rehospitalizácie v dôsledku recidívy ischemických príhod. (Remková a Remko 2014)

Pre zvýšené riziko krvácania, zvlášť u starších pacientov s akútnym koronárnym syndrómom sa neodporúča podávať prasugrel vo vekovej skupine  $\geq 75$  rokov. (Remková a Remko 2014)



Obr. 6 Prasugrel

### 3.2.5 Tikagrelor

Tikagrelor (Obr. 7) je liečivo zo skupiny cyklopentyltriazolopyrimidínov, ktorý pôsobí ako reverzibilný alosterický antagonist P2Y<sub>12</sub> receptora. (Hall a Mazer 2011, Steiner et al. 2013) Má tiež inhibičný účinok na ekvilibračný nukleosidový transportér typu 1 (angl. equilibrative nucleoside transporter 1, ENT1), čím dochádza k inhibícií spätného vychytávania adenzínu. Zvýšená koncentrácia extracelulárneho adenzínu má pleiotropné priaznivé účinky vo vaskulatúre. (Gachet 2015)

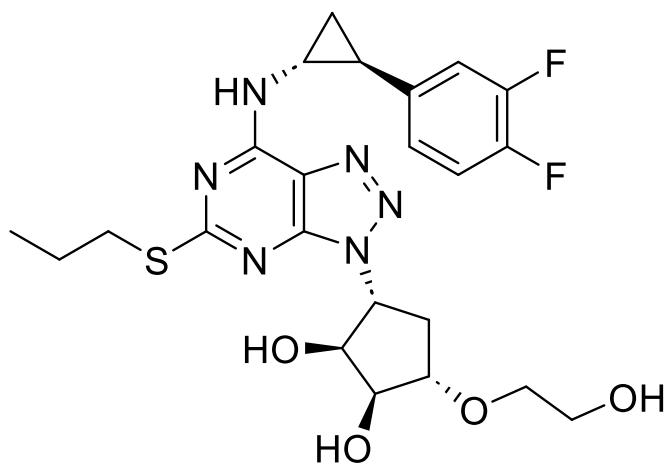
Na rozdiel od ostatných zástupcov zo skupiny thienopyridínov, ktoré pôsobia ako antagonisti rovnakého receptora, tikagrelor nepodstupuje metabolickú aktiváciu v pečeni, takže pre neho neplatia farmakogenetické obmedzenia ako pre ostatných zástupcov z tejto skupiny. Má rýchlejší nástup účinku a v porovnaní s klopido-grelom, sa jedná o potentnejší inhibítor ADP-indukovanej agregácie trombocytov. (Kei et al. 2011)



Biotransformácia tikagreloru prebieha najmä katalytickou aktivitou CYP3A4 a CYP3A5 za vzniku aktívneho (AR-C124910XX) a neaktívneho (AR-C133913XX) metabolitu. Aktívny metabolit má podobnú farmakokinetiku ako materské liečivo a jeho príspevok do plného protidoštičkového účinku je približne 30%. Podávanie tikagreloru so silnými inhibítormi či induktormi CYP3A4 čo môže viesť ku klinicky relevantným interakciám, je kontraindikované. Na úrovni p-glykoproteínu je popísaný výskyt interakcií s digoxínom, vzhľadom na jeho úzke terapeutické okno. (Patrono et al. 2017)

Po perorálnom podaní dochádza k jeho rýchlej absorpcii s maximálnym účinkom na inhibíciu krvných doštičiek za 2-4 hodiny. Eliminačný polčas tohto liečiva je 7 hodín. (Latif Sarah et al. 2020) 24 hodín po podaní klesne protidoštičkový efekt tikagreloru o 50%. 20% zvyškovej antiagregačnej aktivity stále pretrváva po dobu 3 dní. (Koenig-Oberhuber a Filipovic 2016) Je podávaný v nárazovej dávke 180-270 mg denne a v udržiavacej dávke 90 mg dva krát denne, čo vedie k optimalizácii účinnosti, bezpečnosti a znášanlivosti. (Latif Sarah et al. 2020)

Riziko krvácania pri podaní tikagreloru je asi o tretinu vyššie v porovnaní s klopidoogrelom. Mierne poruchy sieňokomorového vedenia, ktoré boli popísané, nemajú závažný klinický význam. (Švihovec et al. 2018)



Obr. 7 Tikagrelor

### 3.2.6 Kangrelor

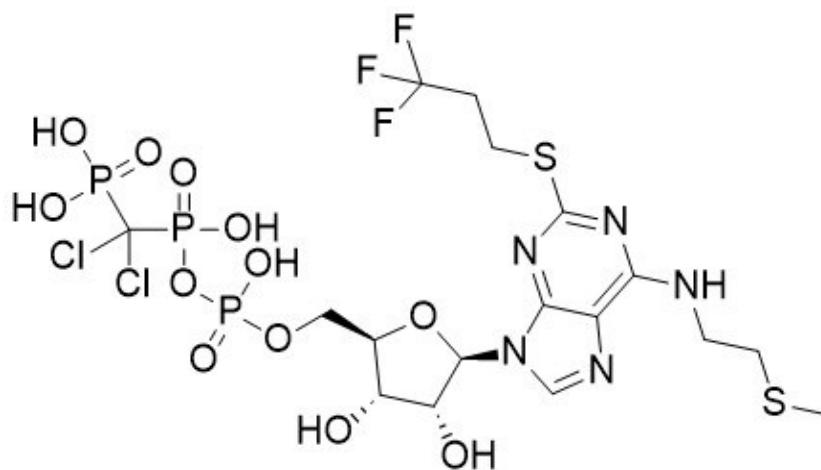
Kangrelor (Obr. 8) je netienopyridínový analóg ATP, ktorý pôsobí ako priamy reverzibilný antagonist receptoru P2Y12. Maximálne koncentrácie kangreloru, ktoré sú

spojené s rozsiahlou blokádou krvných doštičiek, sú rýchlo dosiahnuté použitím intravenózneho bolusu, po ktorom nasleduje kontinuálna infúzia. (De Luca et al. 2021) Podávaný je v dávke 0,4 µg/kg. (Minárik et al. 2011) Vyznačuje sa nástupom účinku do niekoľkých sekúnd a polčasom eliminácie približne 60 minút. (Ferreiro a Angiolillo 2012) Inhibuje funkciu krvných doštičiek o viac ako 90%. (Koenig-Oberhuber a Filipovic 2016)

Kangrelor nepodlieha žiadnej aktivácií v pečeni. (Siller-Matula et al. 2010) Metabolizuje sa sekvenčnou defosforyláciou priamo v plazme, preto je vhodný aj u pacientov s poruchami funkcie obličiek či pečene. (Latif Sarah et al. 2020) 60 minút po zastavení infúzie je funkcia trombocytov opäť obnovená. (Koenig-Oberhuber a Filipovic 2016)

Podávanie kangreloru je spojené s vyšším rizikom krvácania a prechodným zvýšením aktivity pečenejých enzýmov. Jeho použitie je taktiež asociované so zvýšeným výskytom dyspnoe, ktorého výskyt pravdepodobne súvisí s podobnosťou jeho štruktúry s adenosínom a následnou väzbou na jeho receptory. (Hall a Mazer 2011)

Vzhľadom na jeho jedinečné vlastnosti, ako rýchly nástup účinku a krátky polčas eliminácie, je vhodný pre akútne situácie. (Gachet 2015) Predstavuje terapeutickú možnosť u pacientov s akútnym koronárnym syndrómom, ktorí neboli liečení perorálnymi antagonistami P2Y12 s nutnosťou vykonania perkutánnej koronárnej intervencie (PCI). Vzhľadom na jeho parenterálne podanie, je taktiež vhodnou alternatívou u pacientov, ktorí majú problémy s prehĺtaním. (Jourdi et al. 2021)



Obr. 8 Kangrelor

### 3.2.7 Vorapaxar

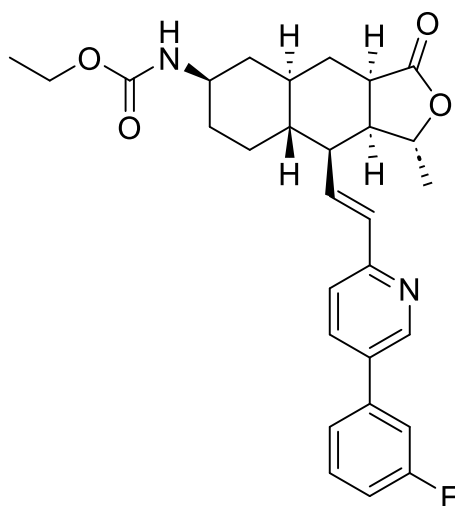
Vorapaxar (Obr. 9) pôsobí ako perorálny reverzibilný a vysoko selektívny antagonista PAR-1 na povrchu krvných doštičiek. (Pultar et al. 2019) Na rozdiel od široko používaných inhibítorov COX-1 a antagonistov P2Y<sub>12</sub> receptoru, blokuje trombínom indukovanú aktiváciu krvných doštičiek a je účinný taktiež v sekundárnej prevencii aterosklerotických ochorení. (Magnani et al. 2015) Z chemického hľadiska sa jedná o syntetický tricyklický 3-fenylpyridínový analóg himbacínu, čo je prírodný alkaloid izolovaný z kôry magnólie austrálskej. (Airoldi a Campanini 2013, Tello-Montoliu et al. 2011) Okrem inhibičného účinku na krvné doštičky, vykazuje aj protizápalové účinky. (Gelbenegger a Jilma 2022)

Liečivo sa po perorálnom podaní rýchlo vstrebáva, má biologickú dostupnosť  $\geq 90\%$  a polčas eliminácie 126–269 hodín. (Pultar et al. 2019) Maximálnu plazmatickú koncentráciu dosahuje po 1-2 hodinách. Biologická dostupnosť nie je ovplyvnená príjmom potravy. Podlieha rozsiahlej transformácii v pečeni za vzniku dvoch hlavných metabolitov: M19 (neaktívny amín, vznikajú najmä vplyvom CYP4A4, v menšom rozsahu aj pomocou CYP1A1 a CYP2C19) a M20 (monohydroxyvorapaxar, produkovaný pomocou CYP3A4 a CYP2J2, ktorý má rovnaké farmakologické vlastnosti ako materské liečivo). (Airoldi a Campanini 2013) Vzhľadom na jeho biotransformáciu, podávanie so silnými induktormi či inhibítormi CYP3A4 môže viesť ku klinicky významným interakciám. (Patrono et al. 2017)

Jediná 20 mg alebo 40 mg dávka vorapaxaru je asociovaná s úplnou ( $> 80\%$ ) inhibíciou PAR receptora do 1 hodiny od podania, s trvalým antiagregačným pôsobením po dobu 72 hodín. (Gelbenegger a Jilma 2022)

Vorapaxar predstavuje prínos v sekundárnej prevencii kardiovaskulárnych ochorení. Avšak, jeho použitie je obmedzené najmä z dôvodu zvýšenej mierny krvácania a vzhľadom na jeho kontraindikované použitie u pacientov s mozgovou mŕtvicou, tranzitórnou ischemickou atakou či intrakraniálnym krvácaním v anamnéze. (McFadyen et al. 2018)

Jeho použitie v klinickej praxi je zriedkavé, v ČR nie je momentálne vôbec používaný. Podáva sa v nárazovej dávke 40 mg, ktorá je nasledovaná udržiavacou dávkou 2,5 mg 1x denne, v kombinácii s duálnou antiagregačnou terapiou ASA a klopidogrelom. (Jourdi et al. 2021)



Obr. 9 Vorapaxar

### 3.2.8 Abciximab

Abciximab (Obr. 10) je chimérický (myš'í/ľudský) fragment monoklonálnej protilátky, ktorý bol vyvinutý v roku 1985. (Ren et al. 2010) Táto monoklonálna protilátka inhibuje nielen receptor GP IIb/IIIa, ale aj receptor GP Ib pre vWF na trombocytoch, čím dochádza k zníženiu agregácie prostredníctvom fibrinogénu a adhézie prostredníctvom vWF. (Latif Sarah et al. 2020) Približne 40 000 molekúl protilátok sa viaže na povrch každej doštičky bivaletným spôsobom, čo znamená že každý trombocyt ma približne 80 000 receptorov GP IIb/IIIa.

Farmakokinetické údaje po intravenóznom bolusovom podaní abciximabu ukazujú, že voľná plazmatická koncentrácia rýchlo klesá, s počiatočným polčasom eliminácie približne 30 minút. (Eikelboom et al. 2012)

Hlavným vedľajším účinkom je krvácanie. Frekvencia výskytu masívneho krvácania je 1-10%. Trombocytopenia bola pozorovaná u približne 2 % pacientov. (Cheng-Ching et al. 2012)

V súčasnosti je používaný najmä ako tzv. „záchranná terapia“ v prípade angiografického dôkazu významného trombu, pomalého či žiadneho spätného toku a iných trombotických komplikácií pri infarkte myokardu s ST eleváciami u pacientov, ktorí podstupujú PCI alebo u pacientov s akútnym koronárnym syndrómom bez ST elevácií s vysoko rizikovou PCI bez predchádzajúcej terapie perorálnym antagonistom P2Y12 receptoru. (Jourdi et al. 2022)



**Obr. 10 Abciximab**

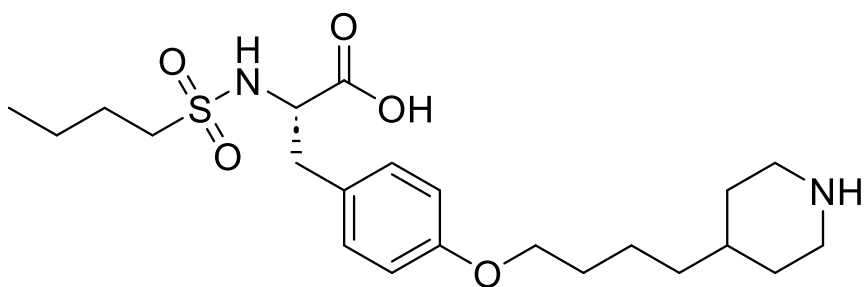
Prevzaté z: DrugBank (Wishart et al. 2005)

### 3.2.9 Tirofiban

Tirofiban (Obr. 11) pôsobí ako nepeptidový antagonistu GP IIb/IIIa receptoru. Používa sa v terapii nestabilnej angíny pectoris a non-Q infarktu myokardu. (De Meyer et al. 2008)

Plazmatický polčas tirofibanu je 1,5 až 2 hodiny. Úprava dávky je potrebná u pacientov s renálnou insuficienciou, keďže v prípade clearance pod 30 ml/min dochádza až k trojnásobnému predĺženiu polčasu eliminácie. (Eikelboom et al. 2012)

Závažná, avšak reverzibilná trombocytopenia bola hlásená u pacientov liečených tirofibanom. Predpokladá sa, že jej vznik je na základe konformačnej zmeny GP IIb/IIIa receptoru väzbou tirofibanu, čo vedie k tvorbe protilátok k novo exponovanému epitopu. (Eikelboom et al. 2012)

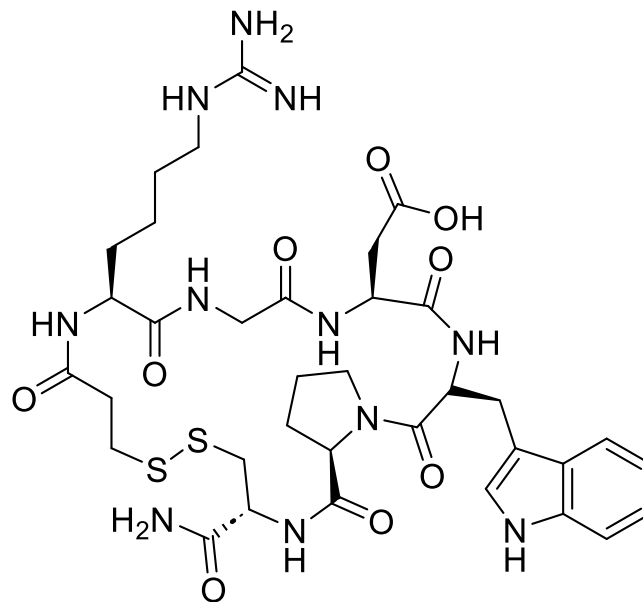


**Obr. 11 Tirofiban**

### 3.2.10 Eptifibatid

Eptifibatid (Obr. 12) je syntetický cyklický heptapeptid pripomínajúci sekvenciu KGD (lysin-glycin-aspartová kyselina) nachádzajúcu sa v dezintegríne hadieho jedu získaného z *Sistrurus miliarius barbouri* s vysokou špecifickosťou pre GP IIb/IIIa. (Eikelboom et al. 2012) Eptifibatid, podobne ako tirofiban, kompetuje s fibrinogénom o väzbu s GP IIb/IIIa, avšak s nižšou afinitiou. (Koenig-Oberhuber a Filipovic 2016) Je účinný a bezpečný u pacientov podstupujúcich PCI, či u pacientov s diagnostikovanou nestabilnou angínou pectoris. (De Meyer et al. 2008)

Vzhľadom na jeho renálnu exkréciu je nutná úprava dávky u pacientov s renálnou nedostatočnosťou. (Eikelboom et al. 2012)



Obr. 12 Eptifibatid

### **3.3 Nové protidoštičkové liečivá**

Budúcnosť protidoštičkovej liečby spočíva vo vývoji nových protidoštičkových látok, v tvorbe nových liečebných stratégií a individualizácií protidoštičkovej terapie. (Gelbenegger a Jilma 2022) Na dosiahnutie tohto cieľa možno použiť liečbu „na mieru“, ktorú možno pre každého pacienta nastaviť na základe výsledkov laboratórných testov. (Remková a Remko 2014) Dôležitý je aj vývoj antidot, ktoré možno použiť pre ukončenie účinku jednotlivých protidoštičkových liečiv. (Gelbenegger a Jilma 2022)

Keďže závažným problémom asociovaným s novšími a účinnejšími protidoštičkovými liečivami je vyššie riziko krvácania, ich ďalší vývoj by mal smerovať k snahám o vyváženosť medzi potentnejším účinkom a výhodným bezpečnostným profilom. (Remková a Remko 2014)

#### **3.3.1 Inhibítory fosfitydylinozil-3-kinázy B**

Fosfatidylinositol-3-kináza B (PI3KB) je lipidová kináza, ktorá je dôležitá v signálnych dráhach vedúcich k aktivácii krvných doštičiek. AZD6482 je nové liečivo zo skupiny inhibítorov tohto enzýmu, ktoré je aktuálne súčasťou prebiehajúceho klinického testovania. (Majithia a Bhatt 2019)

#### **3.3.2 Antagonisti PAR-4**

PAR-4 je receptor s nízkou afinitou pre väzbu trombínu. BMS-986120 je liečivo zo skupiny antagonistov PAR-4, ktoré je v súčasnosti v prvej fáze klinického testovania. Výsledkom doteraz prebehnutých farmakokinetických štúdií bol zistený polčas eliminácie, ktorý je 4 hodiny. (Chen et al. 2019)

#### **3.3.3 Inhibítory 12-lipoxygenázy**

12-lipoxygenáza je enzým, ktorý katalyzuje oxygenáciu kyseliny arachidonovej za vzniku 12(S)-hydroperoxykosa-5,8,10,14-tetraenovej kyseliny, ktorá rýchlo podlieha redukcií za vzniku kyseliny 12-hydroxyeikozatetraénovej. 12-hydroxyeikozatetraénová kyselina pôsobí ako ligand viacerých receptorov sprážených s G-proteínom. 12-lipoxygenáza je nevyhnutná pre aktiváciu GP IIa/IIIb receptorov, PAR-4 či receptoru GP VI. Keďže sa 12-lipoxygenáza podieľa na regulácii procesov vedúcich k aktivácii krvných doštičiek, predstavuje potenciálny

nový cieľ protidoštičkovej terapie. (Shpakova et al. 2022) ML355, prvé liečivo z tejto skupiny, vykazuje na základe nedávnych štúdií na dávke závislú inhibíciu agregácie trombocytov. (Majithia a Bhatt 2019)

### **3.3.4 Nové inhibítory purinérgnych receptorov**

Selatogrel (ACT-246475) je 2-fenylpyrimidín-4-karboxamidový derivát, ktorý je zástupcom nových reverzibilných inhibítorov receptoru P2Y<sub>12</sub>. Je v súčasnosti vo vývoji ako liečivo pre subkutánne podanie, vhodné pre okamžitú prednemocničnú liečbu. (Storey et al. 2020)

Vzhľadom na to, že všetky doteraz schválené inhibítory receptoru pre ADP pôsobia antagonizmom na receptore P2Y<sub>12</sub>, liečivá za skupiny inhibítorov receptoru P2Y<sub>1</sub> sú aktuálne vo vývoji. GLS-409, blokátor tohto receptoru, je momentálne predmetom predklinického testovania. (Smolensky Koganov et al. 2018)

Predmetom výskumu je aj kombinovaná terapia s využitím inhibítorov P2Y<sub>12</sub> a P2Y<sub>1</sub>. (Majithia a Bhatt 2019)

### **3.3.5 Inhibítory GP Ib/IX/V**

Caplacizumab je humanizovaný imunoglobulínový fragment proti A1 doméne vWF. V roku 2018 bol schválený Európskou liekovou agentúrou na terapiu trombotickej trombocytopenickej purpury. (Scully et al. 2019)

### **3.3.6 Inhibítory GP VI**

Revacept je fúzny proteín proti receptoru GP VI. Viaže sa na obnažené molekuly subendoteliálneho kolagénu, čím pôsobí ako fyzická bariéra, čo vedie k zníženiu aktivácie krvných doštičiek. Vzhľadom na jeho dlhý eliminačný polčas, predstavuje alternatívu v terapii u pacientov s vysokým rizikom recidívy cerebrovaskulárnych príhod. (Uphaus et al. 2022)

ACT017 je nová, monoklonálna protilátka proti GP VI, so selektívnym efektom na trombocyty, ktorá je v súčasnosti stále predmetom klinického testovania. (Voors-Pette et al. 2019)



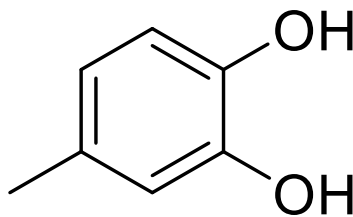
### 3.3.7 Inhibítory proteín-disulfid isomerázy

PDI (proteín disulfid-izomerása) sa nachádza v granulách a na povrchu krvných doštičiek a účastní sa procesu trombózy. Do skupiny inhibítorov tohto enzýmu patrí látka podstupujúce klinické testovanie, isoquercetin. (Majithia a Bhatt 2019)

### 3.3.8 4-metylkatechol

4-metylkatechol (4-MC, Obr. 13) je flavonoidný derivát, ktorý sa ukázal ako veľmi silná protidoštičková zlúčenina, ktorá vykazuje 10-krát vyššiu účinnosť ako najpoužívanejšie protidoštičkové liečivo, ASA. (Applova et al. 2019)

4-MC vykazuje okrem výrazného efektu na agregáciu krvných doštičiek aj pozitívne účinky na stav kardiovaskulárneho systému. Podľa výsledkov štúdií je 4-MC schopný blokovať agregáciu krvných doštičiek, ktorá je spôsobená stimuláciou rôznych ciest (stimuláciou receptorov pre vWF, PAF, GP IIb/IIIa, či stimuláciou proteínkinázy C a zvýšením intracelulárneho vápnika). (Hrubska et al. 2022)



Obr. 13 Štruktúra 4-metylkatecholu

### 3.4 Rezistencia na protidoštičkovú liečbu

Termín „rezistencia voči liečivu“ možno definovať ako nemožnosť liečiva dosiahnuť svoj farmakologický cieľ, či už z dôvodu neschopnosti zasiahnúť ho, v dôsledku zníženej biologickej dostupnosti *in vivo* spôsobenej inaktiváciou liečiva, negatívnou interakciou s inými látkami alebo zmenou cieľa. Definícia výrazu „rezistencia na protidoštičkovú liečbu“ by mala byť obmedzená len na situácie, kedy došlo k zlyhaniu farmakologickej liečby, ktoré možno potvrdiť špecifickým laboratórnym testom. (Cattaneo 2007)

Tradične nebola protidoštičková terapia, na rozdiel od antikoagulačnej liečby, sledovaná s využitím laboratórných testov. Nedávne štúdie však ukázali rezistenciu, či nedostatočnú reakciu na farmakologický účinok protidoštičkových liečiv u niektorých pacientov, čo vyvolalo potrebu laboratórneho monitoringu antiagregačnej liečby. (Cattaneo 2007) Nedostatočná odpoveď na protidoštičkovú terapiu predstavuje závažný rizikový faktor recidív ischemických príhod. (Remková a Remko 2014)

#### 3.4.1 Rezistencia na ASA

Termín „aspirínová rezistencia“ označuje stav, kedy pacient opakovane prekonal trombotickú príhodu aj napriek vhodnému použitiu ASA a tento stav možno potvrdiť s využitím laboratórných metód. (De Meyer et al. 2008)

Doteraz bolo popísaných niekoľko mechanizmov, ktoré môžu byť samostatne, alebo v kombinácií zodpovedné za rezistenciu na ASA. Znížená biologická dostupnosť a slabá absorpcia z prostredia s vyšším pH môže viesť k nedostatočnej inhibícii trombocytov, najmä u pacientov s vysokým indexom telesnej hmotnosti (BMI). Podľa výsledkov niektorých štúdií, sú však aj bežne podávané dávky ASA nedostatočné k vyvolaniu uspokojivej inhibície agregácie u istej skupiny pacientov. Interakcie s inými liečivami, najmä zo skupiny NSAID, ktorej podstatou je zabránenie prístupu ASA k Ser-530 (v COX-1) pôsobením NSAID či rýchly obrat krvných doštičiek, môže viesť k skráteniu účinku ASA. Okrem tohto, potenciálnym mechanizmom môže dochádzať aj k transcelulárnej syntéze TXA<sub>2</sub> z prostagladínu H<sub>2</sub> vaskulárnymi bunkami. Produkcia TXA<sub>2</sub> pomocou COX-2, ktorá nie je citlivá na aspirín, dodnes nebola úplne potvrdená. Prítomnosť iných izoforiem COX-1, ktorých citlivosť na účinky ASA môže byť jedným z ďalších mechanizmov vzniku rezistencie. Nedostatočná compliance pacienta sa však javí ako najčastejšia príčina rezistencie na ASA. (Cattaneo 2007)

### 3.4.2 Rezistencia na klopidogrel

Ako bolo uvedené vyššie, klopidogrel je podávaný ako neaktívne proliečivo, ktoré sa metabolizuje na aktívnu formu pôsobením pečeneového cytochrómu. Vzniká aktívny metabolit, ktorý inhibuje agregáciu krvných doštičiek vytvorením kovalentnej väzby s P2Y<sub>12</sub> receptorom, čo vedie k jeho ireverzibilnej blokáde. (Kam a Nethery 2003)

Najčastejším spôsobom merania odozvy na liečbu klopidogrelom je turbidimetrický test agregácie krvných doštičiek s ADP. Za rezistenciu je považovaná menej ako 10% inhibícia agregácie s využitím 5  $\mu$ M ADP. Ako semirespondéri sú opísaní pacienti s inhibíciou medzi 10% a 29%. Za dostatočnú odpoveď je považovaná inhibícia agregácie o viac ako 30% od pôvodnej hodnoty. (Guthikonda et al. 2005)

Medzi možné mechanizmy spôsobujúce rezistenciu na liečbu klopidogrelom patrí znížená biologická dostupnosť, ktorá je spôsobená nedostatečnou compliance, nesprávnym dávkovacím režimom, interferenciou s metabolizmom klopidogrelu či génovým polymorfizmom jednotlivých izoform CYP450, ktoré sa účastnia premeny klopidogrelu na aktívnu formu. Podľa výsledkov viacerých štúdií je však prítomná značná interindividuálna variabilita medzi odpoveďami krvných doštičiek na ADP, ktorej príčinou môže byť zmena hustoty povrchových receptorov pre ADP či genetický polymorfizmus, z čoho vyplýva, že rezistencia je často spôsobená už variabilitou odpovede na ADP a nie priamo rezistenciou na podávanie klopidogrelu. (Michelson et al. 2006)

Okrem genetických polymorfizmov izoenzýmov CYP450 môžu byť variabilné hladiny aktívneho metabolitu dôsledkom iných faktorov ako je fajčenia, genetické polymorfizmy izoenzýmov ABCB1 či génu transportéra p-glykoproteínu potrebného na gastrointestinálnu absorpciu klopidogrelu. (Remková a Remko 2014)

### 3.4.3 Rezistencia na ďalšie inhibítory receptoru P2Y<sub>12</sub>

Liečivá z vyšších generácií, ako je prasugrel a tikagrelor sú v porovnaní s klopidogrelom asociované s nižšou prevalenciou výskytu rezistencie. (Tantry et al. 2014) Medzi potenciálne mechanizmy, ktoré sú zodpovedné za rezistenciu na terapiu prasugrelom, patrí najmä nízka compliance, poruchy absorpcie či zvýšený obrat krvných doštičiek. (Alexopoulos 2012) Rezistencia na tikagrelor je hlásená len veľmi zriedkavo. (Malik 2021)

### 3.5 Metódy merania agregácie trombocytov

Inhibícia funkcie krvných doštičiek pomocou antiagregačnej liečby sa stala základom prevencie ischemických príhod u pacientov s ochoreniami kardiovaskulárneho systému. Viaceré klinické štúdie však poukázali na značnú interindividuálnu variabilitu odpovede na antiagregačnú liečbu. Fakt, že niektorí pacienti nedostatočne profitujú z protidoštičkovej liečby vedie k potrebe hodnotenia odpovede trombocytov na podávanú terapiu. (Kotuličová et al. 2011) Testy agregácie krvných doštičiek majú uplatnenie najmä na analýzu funkcie trombocytov, ale ich použitie môže byť špecializované aj so zameraním na výskum účinkov protidoštičkových liečiv a terapiu týmito liečivami. (Tsoupras et al. 2019) V posledných rokoch sa tieto testy stávajú čoraz dôležitejšími a majú využitie v rôznych oblastiach, ako je identifikácia pacientov s krvácajúcimi poruchami, monitorovanie odpovede na antiagregačnú terapiu, pri hodnotení perioperačnej hemostázy či v transfuziológií. (Paniccia et al. 2015) V súčasnosti existuje niekoľko rôznych testov, pomocou ktorých možno hodnotiť agregáciu krvných doštičiek. Ideálna laboratórna metóda však dodnes nebola nájdená. Laboratórne metódy možno rozdeliť do dvoch skupín: *ex vivo* metódy a *in vivo* metódy. (Kotuličová et al. 2011)

#### 3.5.1 *Ex vivo* metódy

##### Svetelná transmisná agregometria

Svetelná transmisná agregometria bola vyvinutá v 60. rokoch 20. storočia. Táto metóda je považovaná za zlatý štandard pre testovanie funkcie krvných doštičiek. Princípom, ktorý využíva, je meranie prestupu svetla cez vzorku trombocytov v suspenzii. Prienik svetla vzorkou je vyšší pri zvýšenej agregácii krvných doštičiek vyvolanej agonistami agregácie ako je faktor aktivujúci doštičky (PAF), trombín, AA či kolagén. Nevýhodou je však fakt, že sa jedná o časovo a finančne náročnú metódu, ktorej výsledky sú veľmi jednoducho ovplyvnené rôznymi premennými. (Tsoupras et al. 2019)

##### PFA-100

Princípom tejto metódy je sledovanie tvorby doštičkového trombu v podmienkach arteficiálnej cievy v podobe biologickej membrány s centrálnym otvorom, ktorý je pokrytý

kolagénom a ADP, poprípade kolagénom a adrenalínom. So vznikajúcim trombom dochádza postupne k uzatváraniu cievy, čím klesá prietok. Čas, ktorý ubehne kým sa prietok cievy úplne zastaví je zaznamenávaný ako tzv. closure time. (Kotuličová et al. 2011)

## **VerifyNow**

VerifyNow je agregáčny test, ktorý bol pôvodne vyvinutý na meranie účinkov inhibítorov GP receptoru IIb/IIIa. Je to turbidimetrická optická metóda, ktorá funguje na princípe merania aglutinácie guľčiek, ktoré sú potiahnuté fibrinogénom a krvných doštičiek po stimulácii induktorom v plnej krvi. (Gachet a Aleil 2008)

## **Impedačná agregometria**

Impedačná agregometria využíva päťkanálový agregometer Multiplate, čo je počítačový systém, do ktorého sú vkladané jednorázové kyvety. (Paniccia et al. 2015) Jedna testovacia bunka obsahuje dve nezávislé senzorové jednotky, pričom každá z nich pozostáva z 2 postriebrených vysoko-vodivých medených drôtov s dĺžkou 3,2 mm. (Wadowski et al. 2021) Adhézia krvných doštičiek, ktoré sú aktivované pridaním induktora agregácie na elektródy vedie k zvýšeniu impedancie. Táto zmena je zaznamenávaná samostatne každou senzorovou jednotkou. (Wadowski et al. 2021) Prístroj zaznamenáva nasledujúce tri parametre. Agregácia meraná v AU (agregačných jednotkách), je definovaná ako zvýšenie impedancie alebo zmena elektrického odporu medzi elektródami. Plocha pod krivkou (AUC) v AU\*min [1U=10AU\*min], ktorá je určená najvyššou hodnotu agregáčnej krivky a jej sklonom znázorňuje celkovú aktivitu trombocytov a jedná sa o preferovaný výstupný parameter pre interpretáciu získaných výsledkov. Rýchlosť meraná v AU/min, je maximálny sklon agregácie. (Dugan et al. 2015) Celý proces je zaznamenávaný aj graficky, pričom pre každú senzorovú jednotku je v grafe prítomná samostatná krivka. (Pluta et al. 2018)

## **Impact-R**

Analyzátor Impact R (DiaMed, Cressier, Švajčiarsko) slúži k hodnoteniu funkcie trombocytov za prietokových podmienok. (Shenkman et al. 2008) Prístroj testuje adhéziu a agregáciu trombocytov v antikoagulovanej krvi za fyziologických podmienok. (Koltai et al. 2017) Vzorka krvi je umiestnená do polystyrénovej jamky a podrobená prietoku pri  $1800 \text{ s}^{-1}$  po

dobu 2 minút. Následne je premytá s použitím fosfátového pufru, zafarbená s využitím farbiva MayGruenwald a analyzovaná. (Shenkman et al. 2008) Po aplikácii vzorky do polystyrénovej jamky plazmatické proteíny okamžite priľnú na jej povrch, čo vedie k adhézii a agregácií trombocytov. Analyzátor kvantifikuje priľnuté krvné doštičky. Výsledok je vyjadrený ako % povrchu jamky pokrytej agregátom ako index adhézie a priemerná veľkosť agregátu ako index agregácie. (Koltai et al. 2017)

### **Lumiagregometria**

Jedná sa o metódu, ktorá umožňuje súčasne merať uvoľnenie adenosín nukleotidfosfátu z granúl trombocytov a ich agregáciu. Je založená na hodnotení ATP uvoľneného z trombocytov, ktoré sú aktivované rôznymi agonistami s využitím luminiscenčnej techniky v PRP (platelet-rich plasma), WP (washed platelets) alebo v plnej krvi. Test detekuje premenu ADP, uvoľneného z granúl trombocytov na ATP, ktoré reaguje s luciferín-luciferázovým činidlom. Vyžarované svetlo, ktoré je priamo úmerné koncentrácií ATP je kvantifikované pomocou lumiagregometru. (Paniccia et al. 2015)

### **3.5.2 *In vivo* metódy**

#### **Metabolity tromboxánu A<sub>2</sub>**

TXA<sub>2</sub> je hlavný produkt metabolizmu kyseliny arachidovej. Hydrolýzou dochádza k jeho premene na biologicky neaktívny tromboxán B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), ktorý je následne transformovaný na 2 hlavné metabolity: 2,3-dinor-TXB<sub>3</sub> a 11-dehydro-TXB<sub>2</sub>. Druhý spomínaný metabolit, 11-dehydro-TXB<sub>2</sub>, sa vylučuje močom a jeho hladina koreluje so schopnosťou trombocytov syntetizovať TXA<sub>2</sub>. Inhibíciou COX dochádza k zníženiu koncentrácie 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> v moči. Táto metóda umožňuje monitorovanie účinku protidoštičkovej liečby. (Koltai et al. 2017)

#### **Prietoková cytometria**

Funkciu trombocytov, ich schopnosť adhézie, degranulácie a agregácie možno monitorovať aj s využitím prietokovej cytometrie. Jedná sa o metódu, ktorá umožňuje

hodnotenie ich aktivity *in vivo*, aj *in vitro*. (Kotuličová et al. 2011) Funguje na princípe merania protilátok konjugovaných s fluorescenčnými farbivami, ktoré sa špecificky viažu na proteíny prítomné na membránach buniek alebo v ich vnútri. (Koltai et al. 2017)

### **Stanovenie solubilného P-selektínu**

P-selektín je adhezívny proteín, ktorá je exprimovaný počas aktivácie a degranulácie trombocytov. Jeho zvýšená koncentrácia nasvedčuje zvýšenej aktivite krvných doštičiek. Jeho množstvo v plazme možno stanoviť s využitím metódy ELISA. (Kotuličová et al. 2011)

## 4 Cieľ práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo porovnanie agregácie krvných doštičiek v plnej krvi v skupine zdravých dospelých jedincov s rôznym vekovým rozložením s využitím impedačnej agregometrie.

Konkrétne bola agregácia doštičiek porovnávaná po jej stimulácií 7 induktormi, s alebo bez premedikácie 3 klinicky používanými protidoštičkovými liečivami a flavonoidným metabolitom 4-MC.

Sekundárnym cieľom bolo tiež porovnať rozdiely v agregácií trombocytov medzi pohlaviami a určiť vplyv veku dobrovoľníkov na tento proces.



## 5 Experimentálna časť

### 5.1 Odber krvi

#### 5.1.1 Etické aspekty

Štúdia bola schválená Etickou komisiou Fakultnej nemocnice v Hradci Králové (číslo 202007 S01P z 18. júna 2020) a všetky experimenty boli vykonané v súlade s princípmi aktuálneho znenia Helsinskej deklarácie. Každý pacient podpísal informovaný súhlas aj GDPR dokument.

#### 5.1.2 Vlastný odber

Všetci pacienti prišli nalačno. Doporučený im bola najmä zvýšený príjem tekutín, ale len vody, príp. minerálnej vody. Večer pred odberom im taktiež bolo doporučené zdržať sa konzumácie alkoholických nápojov. Minimálne 48 hodín pred časom odberu pacienti nemohli užiť žiadne liečivo zo skupiny NSAID. Pacienti si so sebou priniesli na odber aj ranný moč.

Odbery krvi prebiehali vždy v ranných hodinách (7:00-8:30) a boli vykonané zdravotnou sestrou vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové v nasledujúcom poradí: 6 ml zrážanlivej krvi na sérum do skúmavky s akcelerátorom koagulácie pre stanovenie biochemických parametrov, 2x4,5 ml krvi do citrátových skúmaviek (3,2% citrát sodný, pre stanovenie koagulácie, nie je súčasťou tejto diplomovej práce) a 2x10 ml krvi do heparinizovaných skúmaviek (17 IU/ml heparínu) na testovanie agregácie krvných doštičiek. Krv bola následne transportovaná na farmaceutickú fakultu a experiment bol zahájený presne 30 minút po odbere krvi.

### 5.1.3 Charakteristika dobrovoľníkov

Celkový počet darcov bol 53. V Tab. 1 sa nachádza základná charakteristika študovanej skupiny. Detailné informácie o jednotlivých pacientoch sa nachádzajú v Tab. 2.

Tab. 1 Charakteristika skupiny

		Muži	%	Ženy	%	Celkovo	%
<b>Počet, n</b>		28	52,83	25	47,17	53	100,0
<b>Vek</b>	20-29	5	9,43	4	7,55	9	17,0
	30-39	7	13,21	6	11,32	13	24,5
	40-49	8	15,09	6	11,32	14	26,4
	40-59	5	9,43	8	15,09	13	24,5
	60+	3	5,66	1	1,89	4	7,5
<b>BMI</b>	18,5-24,9	10	18,87	12	22,64	22	41,5
	25,0-29,9	12	22,64	5	9,43	17	32,1
	30+	6	11,32	8	15,09	14	26,4
<b>Covid-19</b>	A	11	20,75	7	13,21	18	34,0
<b>Fajčenie</b>	A	6	11,32	5	9,43	11	20,8
<b>Ochorenie</b>	Hypertenzia	4	7,55	5	9,43	9	17,0
	Hypotyreóza	0	0	5	9,43	5	9,4
	AB	3	5,66	4	7,55	7	13,2
	Alergia	5	9,43	0	0	5	9,4
	Ostatné	2	3,77	4	7,55	6	11,3
<b>Farmakoterapia</b>	BKK	3	5,66	2	3,77	5	9,4
	ARB	2	3,77	3	5,66	5	9,4
	IKS	4	7,55	0	0,00	4	7,5
	Hormóny ŠŽ	0	0	5	9,43	5	9,4
	HA	0	0	4	7,55	4	7,5
	Ostatné	7	13,21	10	18,87	17	32,1

Skratky: **A**:áno, **AB**: astma bronchiálne, **ARB**: blokátory receptora pre angiotenzín II, **IKS**: inhalačné kortikostreoidy, **HA**: hormonálna antikoncepcia, **ŠŽ**: štítna žľaza

**Tab. 2 Detailná charakteristika dobrovoľníkov**

Poradie	Vek	Pohlavie	Výška (cm)	Váha (kg)	BMI	Fajčenie	Covid-19	Ostatné ochorenie	Užívaná farmakoterapia
1	44	M	183	79	23,59	N	A	N	N
2	40	M	173	80	26,73	A	A	N	N
3	47	M	178	89	28,09	N	A	N	N
4	45	Ž	166	87	31,57	N	N	Hypotyreóza, nefrolitiáza, hypertenzia, obezita	Levotyroxín, Ataralgin (paracetamol, guajfenezín, kofeín)
5	35	Ž	175	68	22,20	N	A	N	Lindynette (gestoden, etinylestradiol)
6	43	Ž	170	89	30,80	N	-	Hypotyreóza, GERD	Vnútromaternicový inzert vylučujúci progestín, levotyroxín, omeprazol, cholekalciferol
7	47	Ž	168	68	24,09	A	N	-	-
8	51	M	182	87	26,26	N	A	Glaukóm, problémy s pečeňou	Mesalazín, kyselina ursodeoxychlová, lanoprost
9	31	Ž	165	73	26,81	N	N	Chronická glomerulonefritída	N
10	42	Ž	172	57	19,27	N	N	Hypotyreóza	Levotyroxín
11	59	Ž	168	90	31,89	A	N	Hypertenzia, alergia (včely, med, ASA), GERD, chronická rinosinusitída	Desloratadín, estradiol, omeprazol
12	66	M	183	91	27,17	N	A	Hypertenzia, alergia (trávy, palina), AB	Levocetirizín, Seretide Diskus (salmeterol, flutikazón), amlodipín
13	28	M	187	99	28,31	A	N	-	Bilastín
14	44	Ž	171	64	21,89	N	N	N	N
15	44	Ž	163	85	31,99	N	A	Hypotyreóza, alergia	Levotyroxín, levocetirizín, Biosil (biotín, kyselina pantoténová, zinok, oxid kremičitý)

<b>16</b>	26	M	167	72	25,82	N	N	N	N
<b>17</b>	57	Ž	164	64	23,80	N	A	N	Sumatriptan (zriedkavo)
<b>18</b>	58	Ž	175	90	29,39	A	A	Hypertenzia	Telmisartan
<b>19</b>	59	Ž	165	60	22,04	N	N	N	N
<b>20</b>	54	Ž	163	83	31,24	N	N	Hypertenzia, prediabetes	Telmisartan, amlodipín
<b>21</b>	64	Ž	171	89	30,44	N	N	Hypertenzia, alergia	Telmisartan, amilorid, alopurinol, fenofenadín
<b>22</b>	67	M	182	102	30,79	A	N	Hypertenzia, AB	Losartan, amlodipín, salmeterol, flutikazón, diklofenak
<b>23</b>	33	M	192	84	22,79	A	N	N	-
<b>24</b>	59	Ž	168	70	24,80	N	N	N	N
<b>25</b>	55	Ž	174	70	23,12	N	A	N	N
<b>26</b>	54	Ž	165	94	34,53	N	N	Hypertenzia	Amlodipín
<b>27</b>	41	M	177	75	23,94	N	N	N	-
<b>28</b>	29	M	178	82	25,88	N	N	GERD	-
<b>29</b>	51	M	186	90	26,01	N	A	N	N
<b>30</b>	58	M	178	105	33,14	N	A	N	N
<b>31</b>	61	M	178	81	25,56	A	N	N	N
<b>32</b>	44	M	183	103	30,76	A	N	Hypertenzia	Telmisartan
<b>33</b>	32	M	173	72	24,06	N	N	N	Paracetamol
<b>34</b>	47	M	176	110		N	N	N	n
<b>35</b>	35	M	180	72	22,22	N	A	Alergia	Levocetirizín
<b>36</b>	32	M	192	90	24,41	N	N	AB, alergia (jarné trávy)	Budenosid, formoterol
<b>37</b>	32	Ž	161	62	23,92	N	N	-	-
<b>38</b>	39	M	182	84	25,36	N	N	-	-
<b>39</b>	30	Ž	175	74	24,16	N	N	Alergia	Loratadín
<b>40</b>	35	M	185	84	24,54	N	N	-	-
<b>41</b>	33	Ž	161	70	27,01	A	A	-	-

<b>42</b>	30	Ž	173	92	30,74	N	A	Hypotyreóza	Euthyrox (levotyroxín), HA
<b>43</b>	46	M	180	102	31,48	N	A	-	Detralex (flavonoidná purifikovaná frakcia)
<b>44</b>	32	M	171	86	29,41	N	N	Hypertenzia, AB, alergia (orechy, mak sezam)	Amlodipín, Flutikazón+vilanterol
<b>45</b>	47	M	187	99	28,31	N	N	N	N
<b>46</b>	59	M	178	70	22,09	A	N	-	N
<b>47</b>	24	Ž	175	80	26,12	A	N	N	N
<b>48</b>	53	M	183	80	23,89	N	A	N	N
<b>49</b>	24	M	188	125	35,37	N	N	Alergia (peľ, jód, niektoré druhy ovocia, srst')	-
<b>50</b>	25	Ž	169	65	22,76	N	N	N	Nimesulid (týždeň pred odberom)
<b>51</b>	23	Ž	173	60	20,05	A	N	N	Diosmín, kombinovaná HA (gestodén a etinylestradiol)
<b>52</b>	21	M	179	73	22,78	N	A	N	N
<b>53</b>	24	Ž	165	80	29,38	N	N	N	železo, vitamín C, omega-3 mastné kyseliny

Skratky: **M**: muž, **Ž**: žena, **N**: nie, **A**: áno, **GERD**: gastroezofágová refluxná choroba, **AB**: astma bronchiale, **HA**: hormonálna antikoncepcia

## 5.2 Induktory, protideštičkové liečivá a ďalšie chemikálie

DMSO, ristocetin, PAF-16 (v ďalšom texte pro zjednodušenie uvádzané len ako PAF), ASA, tikagrelor, 4-MC a U-46619 boli zakúpené zo Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). AA, ADP a TRAP-6 (v ďalšom texte pro zjednodušenie uvádzané len ako TRAP) pochádzali od Roche (Basel, Švajčiarsko). Fyziologický roztok bol od B. Braun (Melsungen, Nemecko), kolagén z Diagnostica, a.s. (Praha, ČR) a vorapaxar zo Selleck Chemicals GmbH (Mníchov, Nemecko).

## 5.3 Príprava činidiel pred experimentom

Väčšina činidiel bola predpipetovaná a uchovávaná v mrazničke (-20°C, Tab. 3), konkrétne AA (15 mM), ADP (0,2 mM), TRAP (1 mM), vorapaxar (1 mM a 10 mM), tikagrelor (0,625 mM). AA, ADP a TRAP boli po rozmrazení pripravené na použitie. U-46619 (1 mM) sa uchovával až do použitia v chladničke. V hlbokoj mrazničke (-80°C) sa nachádzali zásoby PAF. Zásobné roztoky ASA a 4-MC boli pripravované každý deň čerstvé v DMSO o koncentrácií 30 mM. Detaily na riedenie (Tab. 4).

Tab. 3 Základné informácie o použitých reagensiach

Induktor	Zásobná koncentrácia	Zásobný objem	Miesto skladovania	Proces prípravy pracovného roztoku	Koncentrácia pracovného roztoku
AA	15 mM	-	Mraznička (-20 °C)	Pripravené na použitie po rozmrazení	15 mM
Kolagén	1 mg/ml	20 µl	Chladnička	Pridať 180 µl roztoku na riedenie kolagénu R2	100 µg/ml
	100 µg/ml	20 µl	Príprava pred zriedením	Pridať 80 µl roztoku na riedenie kolagénu (od výrobcu)	20 µg/ml

<b>ADP</b>	0,2 mM	-	Mraznička (-20 °C)	Pripravené na použitie po rozmrazení	0,2 mM
<b>TRAP</b>	1 mM	-	Mraznička (-20 °C)	Pripravené na použitie po rozmrazení	1 mM
<b>Ristocetin</b>	12,5 mM	-	Chladnička	Pripravené na použitie	12,5 mM
	12,5 mM	10 µl	Chladnička	Pridať 240 µl fyziologického roztoku	0,5 mM
<b>PAF</b>	2 mM	10 µl	Mraznička (-80 °C)	Pridať 90 µl etanolu	200 µM
	200 µM	10 µl	Príprava pred zriedením	Pridať 790 µl fyziologického roztoku (maximálne 10 minút pred začatím experimentu)	2,5 µM
<b>U-46619</b>	1 mM	10 µl	Mraznička (-20 °C)	Pridať 990 µl fyziologického roztoku (počas inkubácie v 1.sérii)	10 µM

**Tab. 4 Riedenie štandardov pred experimentom**

<b>Štandard</b>	<b>Zásobná koncentrácia</b>	<b>Zásobný objem</b>	<b>Miesto skladovania</b>	<b>Proces prípravy pracovného roztoku</b>	<b>Koncentrácia pracovného roztoku</b>
<b>Vorapaxar</b>	1,25 mM	10 µl	Mraznička (-20 °C)	Pridať 90 µl DMSO	0,125 mM
<b>Vorapaxar</b>	1,25 mM	25 µl	Mraznička (-20 °C)	Zmiešať 25 µl VOR 1,25mM a 25 µl DMSO	0,625 mM
<b>Vorapaxar</b>	10 mM	10 µl	Mraznička (-20 °C)	Pridať 70 µl DMSO	1,25 mM
<b>Tikargelor</b>	0,625 mM	10 µl	Mraznička (-20 °C)	Pridať 90 µl DMSO	0,065 mM
<b>4-MC</b>	30 mM	20 µl	Izbová teplota	Pridať 51 µl DMSO	8,5 mM
<b>4-MC</b>	30 mM	20 µl	Izbová teplota	Pridať 230 µl DMSO	2,4 mM
<b>4-MC</b>	30 mM	20 µl	Izbová teplota	Pridať 480 µl DMSO	1,2 mM
<b>ASA</b>	30 mM	85 µl	Izbová teplota	Pridať 215 µl DMSO	8,5 mM
<b>ASA</b>	30 mM	37 µl	Izbová teplota	Pridať 263 µl DMSO	3,7 mM



## 5.4 Vlastný experiment

300  $\mu$ l plnej krvi bolo zriedené rovnakým množstvom 0,9% fyziologického roztoku, ktorý bol predhriaty na 37°C. Následne sa pridalo 5  $\mu$ l testovanej zlúčeniny v DMSO, poprípade čisté DMSO, pre získanie porovnávacej vzorky. Inkubácia prebiehala 3 minúty. Následne bola vyvolaná agregácia krvných doštičiek pomocou kolagénu, AA, TRAP, U-46619, PAF, ADP a ristocetinu. Jej priebeh bol zaznamenávaný po dobu 6 minút. (Hrubsa et al. 2022)

Postupovali sme podľa nižšie stanoveného protokolu (Tab. 5-13), pričom každá séria začala presne 15 minút po predchádzajúcej.

Tab. 5 Prvá séria

Poradové číslo	Krveta	Rozpúšťadlo/ inhibítor			Induktor		
		Rozpúšťadlo/ inhibítor	Objem	Koncentrácia	Induktor	Objem	Koncentrácia
Dátum-1	1	DMSO	5 $\mu$ l	-	U-46619	5 $\mu$ l	0,01 mM
Dátum-2	2	DMSO	5 $\mu$ l	-	PAF	5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ M
Dátum-3	3	DMSO	5 $\mu$ l	-	PAF	5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ M
Dátum-4	4	DMSO	5 $\mu$ l	-	Kolagén	5 $\mu$ l	20 $\mu$ g/ml
Dátum-5	5	DMSO	5 $\mu$ l	-	Kolagén	5 $\mu$ l	20 $\mu$ g/ml

Tab. 6 Druhá séria

Poradové číslo	Kyveta	Rozpúšťadlo/ inhibítor			Induktor		
		Rozpúšťadlo/ inhibítor	Objem	Koncentrácia	Induktor	Objem	Koncentrácia
Dátum-6	1	DMSO	5 µl	-	Kolagén	6 µl	100 µg/ml
Dátum-7	2	ASA	5 µl	8,5 mM	Kolagén	6 µl	100 µg/ml
Dátum-8	3	ASA	5 µl	8,5 mM	Kolagén	6 µl	100 µg/ml
Dátum-9	4	4-MC	5 µl	2,4 mM	Kolagén	6 µl	100 µg/ml
Dátum-10	5	DMSO	5 µl	-	U-46619	5 µl	0,01 mM

Tab. 7 Tretia séria

Poradové číslo	Kyveta	Rozpúšťadlo/ inhibítor			Induktor		
		Rozpúšťadlo/ inhibítor	Objem	Koncentrácia	Induktor	Objem	Koncentrácia
Dátum-11	1	4-MC	5 µl	2,4 mM	Kolagén	6 µl	100 µg/ml
Dátum-12	2	DMSO	5 µl	-	Kolagén	6 µl	100 µg/ml
Dátum-13	3	DMSO	5 µl	-	AA	8 µl	15 mM
Dátum-14	4	ASA	5	8,5 mM	AA	8	15 mM
Dátum-15	5	4-MC	5	1,2 mM	AA	8	15 mM

Tab. 8 Štvrtá séria

Poradové číslo	Kyveta	Rozpúšťadlo/ inhibítor			Induktor		
		Rozpúšťadlo/ inhibítor	Objem	Koncentrácia	Induktor	Objem	Koncentrácia
Dátum-16	1	DMSO	5 µl	-	AA	8 µl	15 mM
Dátum-17	2	ASA	5 µl	3,7 mM	AA	8 µl	15 mM
Dátum-18	3	ASA	5 µl	3,7 mM	AA	8 µl	15 mM
Dátum-19	4	4-MC	5 µl	1,2 mM	AA	8 µl	15 mM
Dátum-20	5	ASA	5 µl	8,5 mM	AA	8 µl	15 mM

Tab. 9 Piata séria

Poradové číslo	Kyveta	Rozpúšťadlo/ inhibítor			Induktor		
		Rozpúšťadlo/ inhibítor	Objem	Koncentrácia	Induktor	Objem	Koncentrácia
Dátum-21	1	DMSO	5 µl	-	AA	2,5 µl	15 mM
Dátum-22	2	DMSO	5 µl	-	AA	2,5 µl	15 mM
Dátum-23	3						
Dátum-24	4						
Dátum-25	5						

Experiment 23-25 bol vykonaný v prípade rozdielov (viac ako 30%) v niektorých predchádzajúcich experimentoch medzi vzorkami.

Tab. 10 Šiesta séria

Poradové číslo	Kyveta	Rozpúšťadlo/ inhibítor			Induktor		
		Rozpúšťadlo/ inhibítor	Objem	Koncentrácia	Induktor	Objem	Koncentrácia
Dátum-26	1	4-MC	5 µl	30 mM	Ristocetin	20 µl	15 mM
Dátum-27	2	DMSO	5 µl	-	Ristocetin	20 µl	15 mM
Dátum-28	3	DMSO	5 µl	-	TRAP	6 µl	1 mM
Dátum-29	4	Vorapaxar	5 µl	0,125 mM	TRAP	6 µl	1 mM
Dátum-30	5	DMSO	5 µl	-	TRAP	6 µl	1 mM

Tab. 11 Siedma séria

Poradové číslo	Kyveta	Rozpúšťadlo/ inhibítor			Induktor		
		Rozpúšťadlo/ inhibítor	Objem	Koncentrácia	Induktor	Objem	Koncentrácia
Dátum-31	1	Vorapaxar	5 µl	0,625 mM	TRAP	6 µl	1 mM
Dátum-32	2	4-MC	5 µl	30 mM	Ristocetin	20 µl	12,5 mM
Dátum-33	3	DMSO	5 µl	-	Ristocetin	20 µl	12,5 mM
Dátum-34	4	DMSO	5 µl	-	ADP	15 µl	0,2 mM
Dátum-35	5	Tikagrelor	5 µl	0,0625 mM	ADP	15 µl	0,2 mM

Tab. 12 Ôsma s3ria

Poradov3e 3islo	Kyveta	Rozp3sťadlo/ inhib3tor			Induktor		
		Rozp3sťadlo/ inhib3tor	Objem	Koncentr3cia	Induktor	Objem	Koncentr3cia
D3tum-36	1	Tikagrelor	5 $\mu$ l	0,0625 mM	ADP	15 $\mu$ l	0,2 mM
D3tum-37	2	DMSO	5 $\mu$ l	-	ADP	15 $\mu$ l	0,2 mM
D3tum-38	3	DMSO	5 $\mu$ l	-	Ristocetin	5 $\mu$ l	0,5 mM
D3tum-39	4	Vorapaxar	5 $\mu$ l	0,625 mM	TRAP	6 $\mu$ l	1 mM

Tab. 13 Deviata s3ria

Poradov3e 3islo	Kyveta	Rozp3sťadlo/ inhib3tor			Induktor		
		Rozp3sťadlo/ inhib3tor	Objem	Koncentr3cia	Induktor	Objem	Koncentr3cia
D3tum-40	1	4-MC	5 $\mu$ l	8,5 mM	Kolag3n	6 $\mu$ l	100 $\mu$ g/ml
D3tum-41	2	4-MC	5 $\mu$ l	8,5 mM	Kolag3n	6 $\mu$ l	100 $\mu$ g/ml
D3tum-42	3	DMSO	5 $\mu$ l	-	Kolag3n	6 $\mu$ l	100 $\mu$ g/ml
D3tum-43	4	DMSO	5 $\mu$ l	-	Ristocetin	5 $\mu$ l	0,5 mM

Voľn3e vzorky boli ur3en3 na pr3padn3e zopakovanie nejasn3ch v3sledkov.

Ako bolo uveden3 v legende tabuľky 9, vzorky s poradov3m 3islom 23-25 sa pou3ili len v pr3pade veľk3ho rozdielu (>30 %) vo v3sledkoch niektor3ch identick3ch vzoriek. Ak bol AUC vorapaxaru (vzorka 3. 29)  $\geq$  ako priemern3 AUC slep3ch pokusov (vzorky 3. 28 a 30), potom sa otestovala koncentr3cia vorapaxaru 0,625 mM, inak sa opakovalo pou3itie vorapaxaru 0,125 mM.

Ak vzorka č.31 vykazovala inhibíciu agregácie pomocou TRAP viac ako 50%, opakovala sa koncentrácia 0,625 mM. V opačnom prípade sa testovala koncentrácia 1,25 mM dvakrát.

Séria č.9 bola vykonaná, ak bolo dostatočné množstvo krvi a 4-MC nebol schopný blokovat' agregáciu spôsobenú kolagénom. V prípade, že AUC vzorky číslo 38 bola vyššia ako 20 AUC, bola táto vzorka opakovaná ako vzorka č. 43.

## 6 Matematická a štatistická analýza

Namerané výsledky boli spracované ako priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka vypočítaná podľa vzorca  $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$ . Výsledky sledovanej populácie sú prezentované ako medián a 95% konfidenčné intervaly. Rozdiely v agregácií boli vyhodnotené pomocou analýzy rozptylu (ANOVA) s následným využitím Dunnettovej metódy mnohonásobného porovnávania pre analýzu zistených rozdielov, alebo bol použitý nepárový t-test (Studentovo t-rozdelenie) v závislosti na počte premenných.

Inhibícia bola vypočítaná podľa vzorca:  $\frac{AUC(\text{slepá vzorka})}{AUC(\text{inhibitor})} \times 100$ . Výsledkom bola agregácie v %. Odčítaním výslednej hodnoty od 100, sme dostali level inhibície agregácie daným inhibítorom v %.

V prípade vplyvu veku na agregáciu trombocytov boli výsledky najskôr zanalyzované pomocou Pearsonovho korelačného testu. V prípade štatistickej významnosti bola vykonaná lineárna regresia.

Na vykonanie štatistickej analýzy po použitý program GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA).

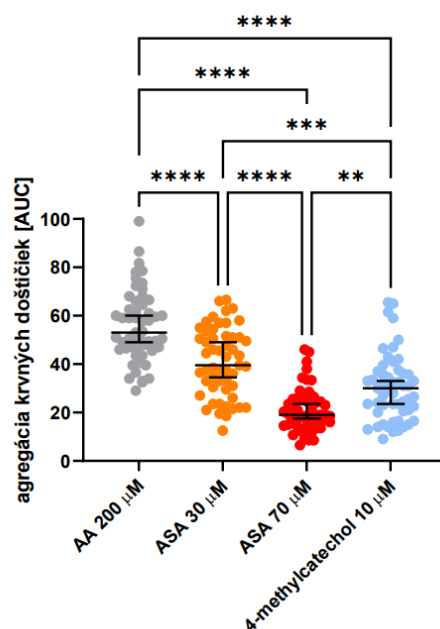
## 7 Výsledky

Na porovnanie agregácie krvných doštičiek v tejto skupine zdravých jedincov bolo použitých 7 rôznych induktorov agregácie. Ako inhibítory agregáčného procesu boli využité 3 klinicky používané liečivá a 4-MC, flavonoidný metabolit, ktorý bol na základe predchádzajúceho výskumu popísaný (Applova et al. 2019) ako potentný inhibítor agregácie trombocytov.

V prvom kroku bol zanalyzovaný vplyv inhibítorov agregácie krvných doštičiek.

### 7.1 Agregácia indukovaná kyselinou arachidonovou

Agregácia vyvolaná kyselinou arachidonovou v koncentrácií 200  $\mu\text{M}$  bola významne inhibovaná pridaním ASA v nižšej, 30  $\mu\text{M}$  a vyššej, 70  $\mu\text{M}$  koncentrácií. V prípade 4-MC s koncentráciou 10  $\mu\text{M}$ , bola agregácia indukovaná kyselinou arachidonovou taktiež významne inhibovaná. Na základe výsledkov, sa preukázala ASA vo vyššej koncentrácií ako najpotentnejší inhibítor agregácie. Menší účinok mala 10  $\mu\text{M}$  koncentrácia 4-MC, ktorá bola ale stále účinnjšia ako 30  $\mu\text{M}$  koncentrácia ASA (Obr. 14). Percentuálna inhibícia agregácie doštičiek, ktorá bola vyvolaná AA, je zhrnutá na Obr. 15.

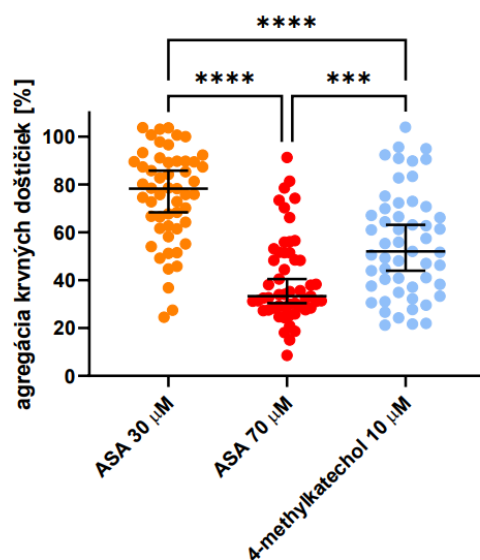


Obr. 14 Agregácia indukovaná kyselinou arachidonovou.

Výsledky sú zobrazené ako absolútna hodnota agregácie meraná pomocou plochy po krivkou (AUC).

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$



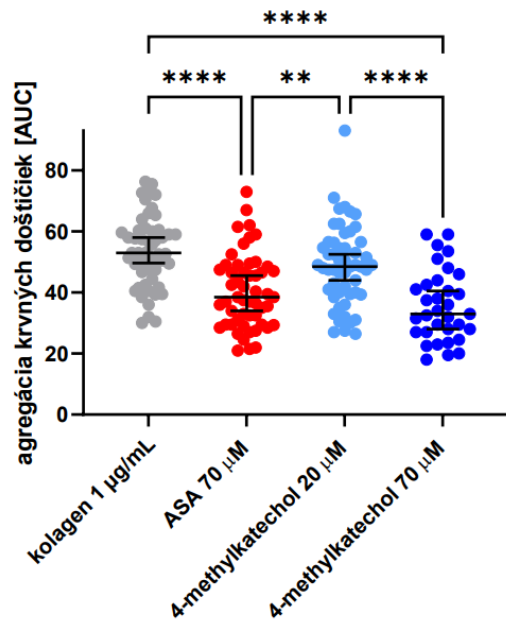


Obr. 15 Agregácia indukovaná kyselinou arachidonovou zobrazená v percentách inhibície oproti negatívnej vzorke s DMSO.

\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

## 7.2 Agregácia indukovaná kolagénom

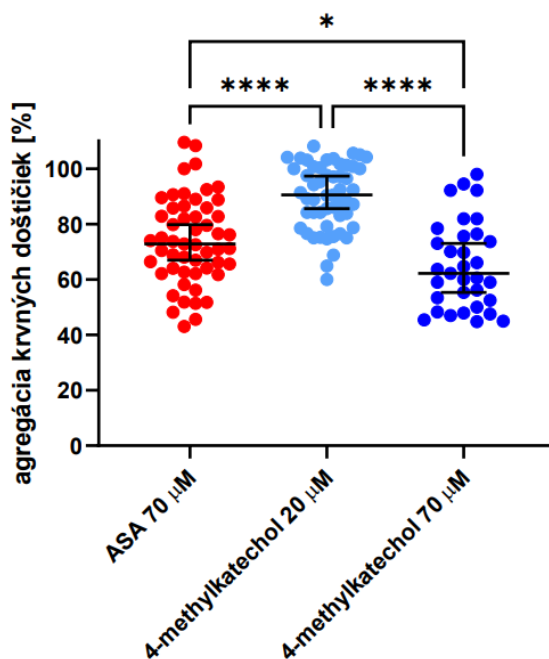
Agregácia doštičiek bola indukovaná kolagénom vo finálnej koncentrácii 1 µg/ml. Táto bola následne významne inhibovaná ASA vo vyššej, 70 µM koncentrácii a 4-MC v dvoch rôznych koncentráciách, 20 µM a 70 µM. Ako najpotentnejší inhibítor sa ukázal 4-MC vo vyššej koncentrácii. Druhá najsilnejšia inhibícia bola navodená rovnakou koncentraciou ASA. Najslabšia, avšak stále významná inhibícia bola dosiahnutá 20 µM koncentraciou 4-MC. (Obr. 16). Percentuálna inhibícia je zobrazená na Obr. 17.



Obr. 16 Agregácia indukovaná kolagénom.

Výsledky sú zobrazené ako absolútna hodnota agregácie meraná pomocou plochy pod krivkou (AUC).

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

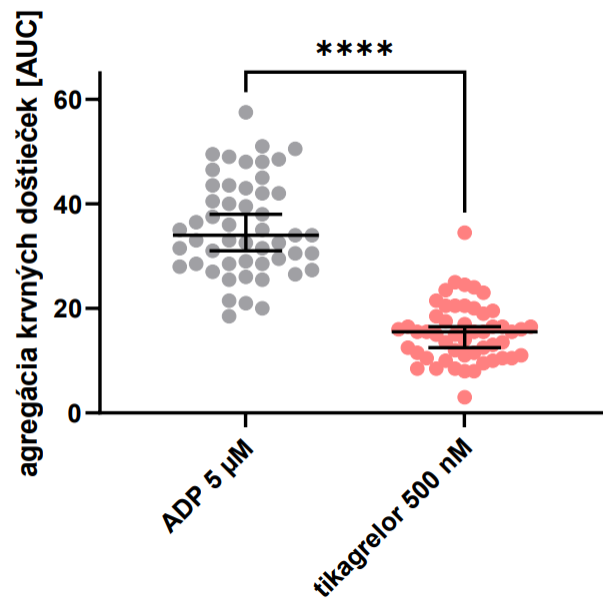


Obr. 17 Agregácia indukovaná kolagénom zobrazená v percentách inhibície oproti negatívnej vzorke s DMSO.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

### 7.3 Agregácia indukovaná ADP

ADP, ako induktor agregácie, bol použitý v koncentrácii 5  $\mu\text{M}$ . Podľa predchádzajúcich experimentov, bola táto koncentrácia určená ako najnižšia, ktorá vyvolala maximálnu odpoveď trombocytov. (Carazo et al. 2022) Tikagrelor inhiboval ADP-indukovanú agregáciu veľmi konzistentne (Obr. 18).

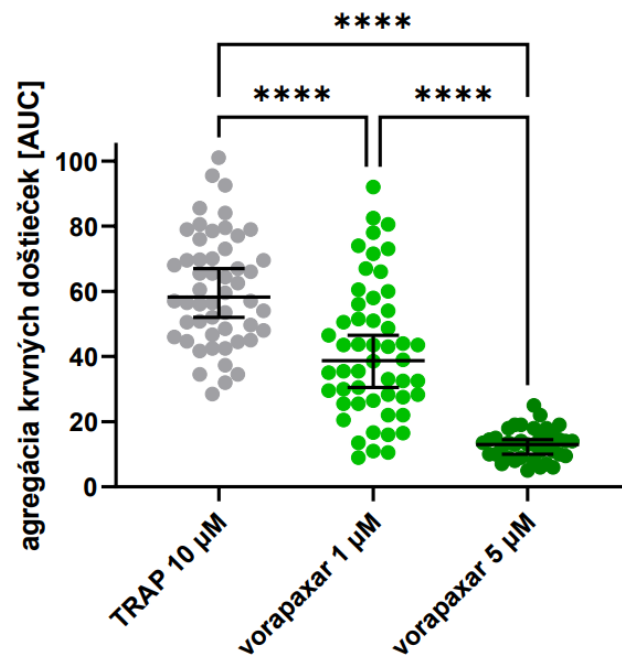


Obr. 18 Agregácia vyvolaná ADP a inhibovaná tikagrelorom.

Výsledky sú zobrazené ako absolútna hodnota agregácie meraná pomocou plochy pod krivkou (AUC). \*\*\*\*  $p < 0,0001$

## 7.4 Agregácia indukovaná TRAP

Účinok TRAP, ktorý bol použitý ako induktor agregácie, s koncentráciou 10  $\mu\text{M}$ , bol inhibovaný použitím vorapaxaru, ktorý bol použitý v dvoch koncentráciách, 1  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ . Efekt vorapaxaru, najmä vo vyššej použitej koncentrácii viedol k značne konzistentnej odpovedi u všetkých darcov a bol významne vyšší, ako pri nižšej použitej koncentrácii, ktorá bola avšak tiež schopná významne inhibovať agregáciu trombocytov navodenú analógom trombínu. (Obr. 19).



Obr. 19 Agregácia vyvolaná TRAP a inhibovaná vorapaxarom.

Výsledky sú zobrazené ako absolútne hodnoty agregácie krvných doštičiek merané pomocou plochy po krivkou (AUC). \*\*\*\*:  $p < 0,0001$

## 7.5 Rozdiely v agregácií medzi pohlaviami

V ďalšom kroku bol hodnotený vplyv pohlavia na agregáciu trombocytov. Koncentrácie vyššie uvedených induktorov a inhibítorov zostali rovnaké ako v predchádzajúcich experimentoch.

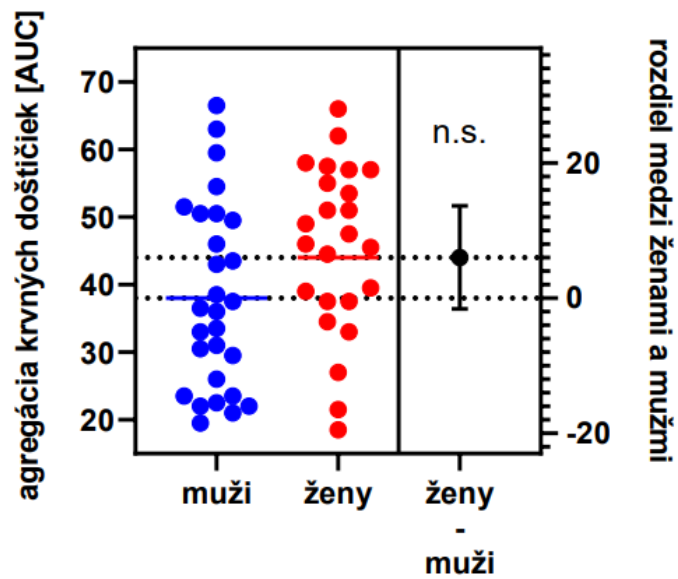
V prípade agregácie navodenej AA, s či bez použitia inhibítora, neboli pozorované žiadne významné rozdiely medzi pohlaviami. (Obr. 20-24)

U agregácie navodenej kolagénom v nižšej (Obr. 25), aj vyššej (Obr. 26) koncentrácií neboli bez použitia inhibítorov nájdené rozdiely, avšak pri inhibícií tejto agregácie ASA reagovali muži silnejšie ako ženy (Obr. 27), z čoho vyplýva, že ASA vykazuje nižší efekt u darcov ženského pohlavia. Pri inhibícií kolagénom-indukovanej agregácie použitím 4-MC v nižšej, 20  $\mu\text{M}$  (Obr. 28) a vyššej, 70  $\mu\text{M}$  (Obr. 29) koncentrácií nebol pozorovaný významný rozdiel v odpovedi trombocytov medzi pohlaviami. Ani pri agregácií krvných doštičiek navodenej ristocetinom (Obr. 30), či jej následnou inhibíciou 4-MC (Obr. 31) nebol pozorovaný rozdiel v odpovedi medzi pohlaviami.

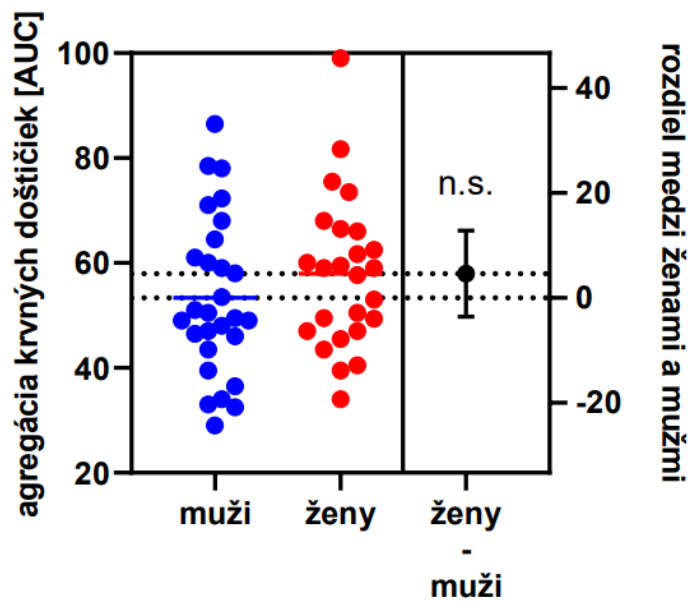
Trombocyty žien vykazovali výrazne vyššiu reakciu na agregáciu indukovanú ADP v koncentrácií 5  $\mu\text{M}$ . (Obr. 32) Avšak, pri inhibícií ADP-indukovanej agregácie použitím tikagreloru neboli nájdené žiadne významne rozdiely medzi ženami a mužmi. (Obr. 33)

V prípade použitia TRAP ako induktora agregácie, bola opäť pozorovaná štatisticky významne vyššia odpoveď doštičiek u žien. (Obr. 34) Po inhibícií agregácie vorapaxarom v nižšej, 1  $\mu\text{M}$  (Obr. 35) koncentrácií vykazovali trombocyty mužov vyššiu odpoveď na podaný inhibítor. Avšak vo vyššej, 5  $\mu\text{M}$  (Obr. 36) koncentrácií, nebol tento rozdiel pozorovaný.

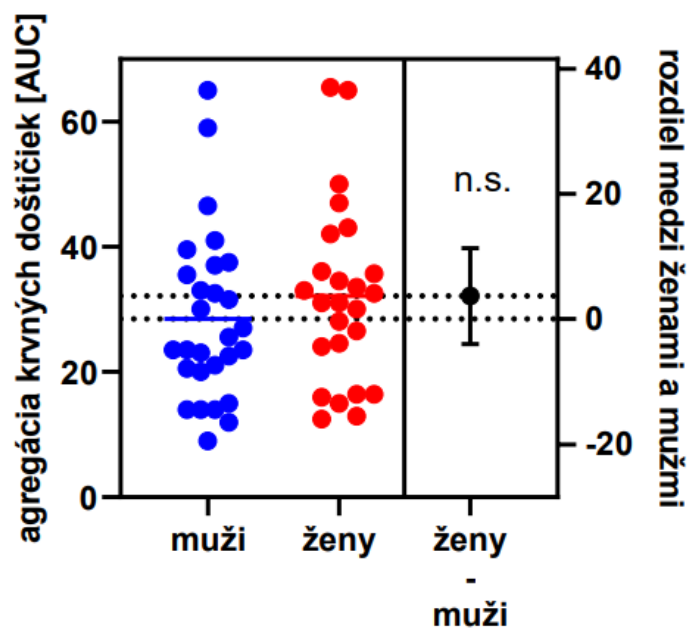
Trombocyty darcov ženského aj mužského pohlavia nevykazovali žiadne významne rozdiely v odpovedi na 2 posledné induktory agregácie: PAF (Obr. 37) a U-46619 (Obr. 38).



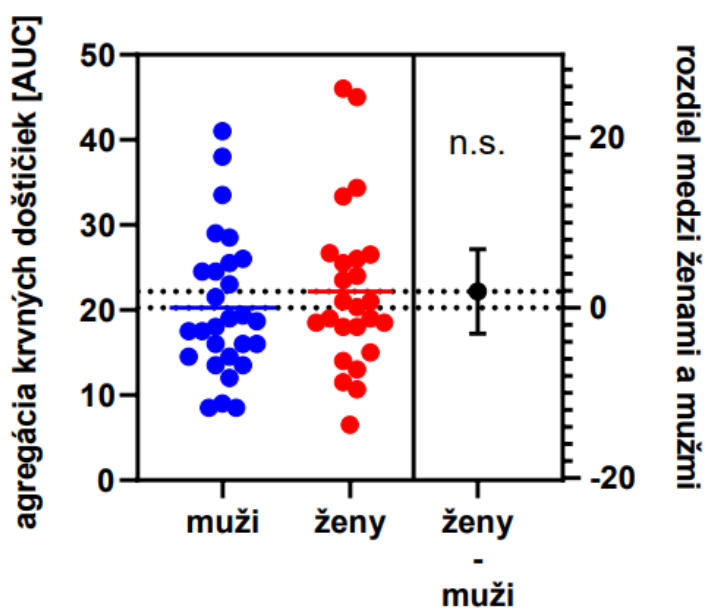
Obr. 20 Rozdiely v agregácii indukovanej AA v koncentrácií 60  $\mu$ M medzi ženami a mužmi.



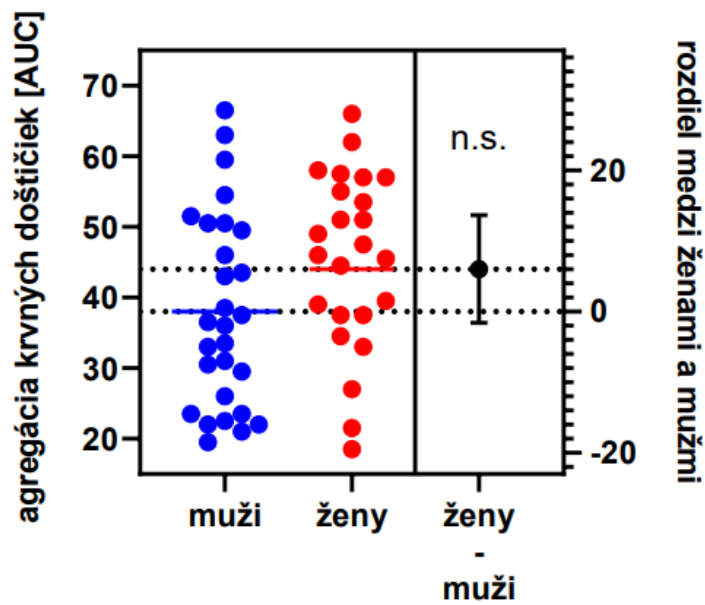
Obr. 21 Rozdiely v agregácii indukovanej AA v koncentrácií 200  $\mu$ M medzi ženami a mužmi.



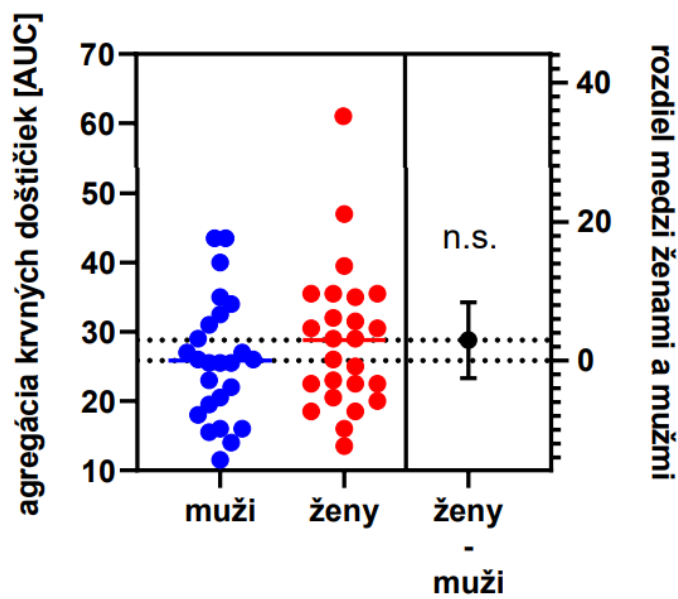
Obr. 22 Rozdiely v agregácií inhibovanej ASA (30  $\mu$ M) po indukcií AA (200  $\mu$ M) medzi ženami a mužmi.



Obr. 23 Rozdiely v agregácií inhibovanej ASA (70  $\mu$ M) po indukcií AA (200  $\mu$ M) medzi ženami a mužmi.

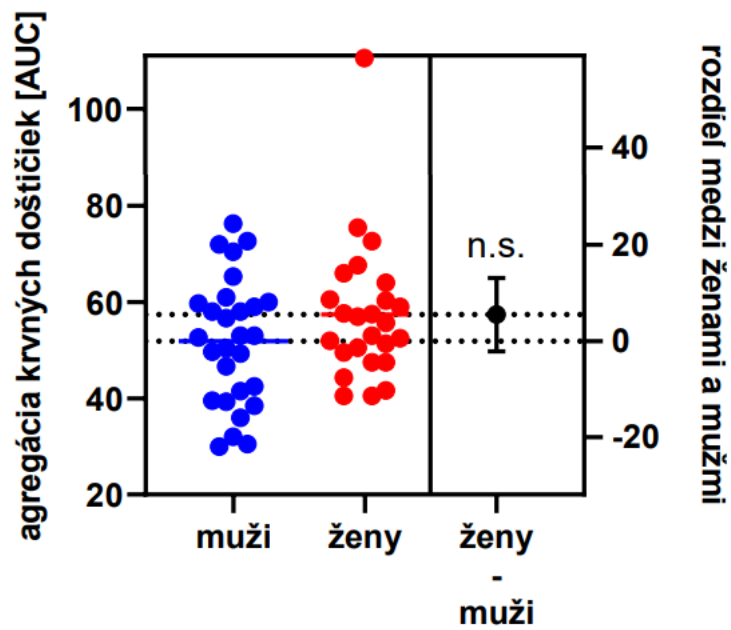


Obr. 24 Rozdiely v agregácii inhibovanej 4-MC po indukcii AA (200  $\mu$ M) medzi ženami a mužmi.

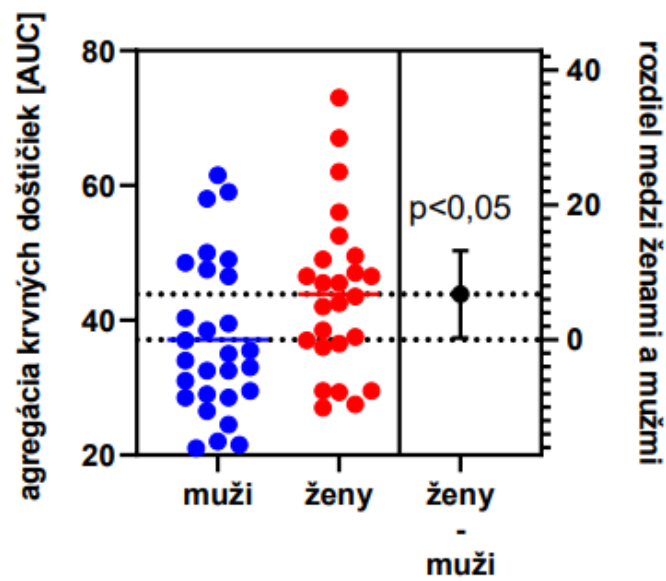


Obr. 25 Rozdiely v agregácii indukovanej kolagénom v koncentracii 0,16  $\mu$ g/ml medzi ženami a mužmi.

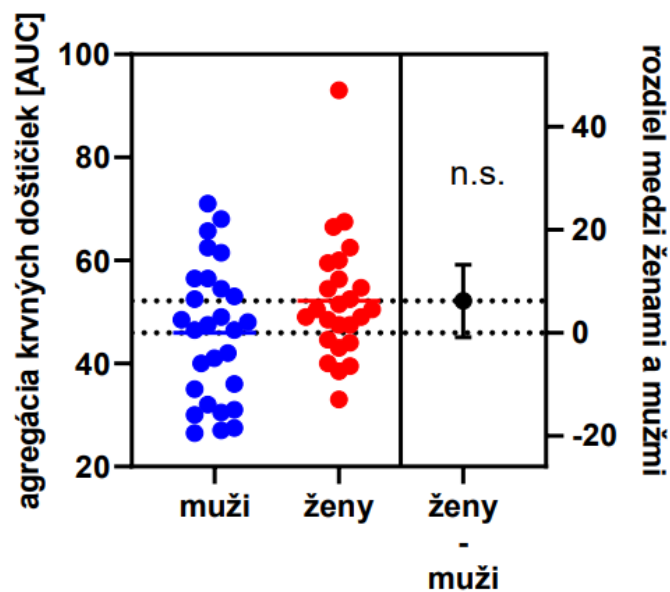




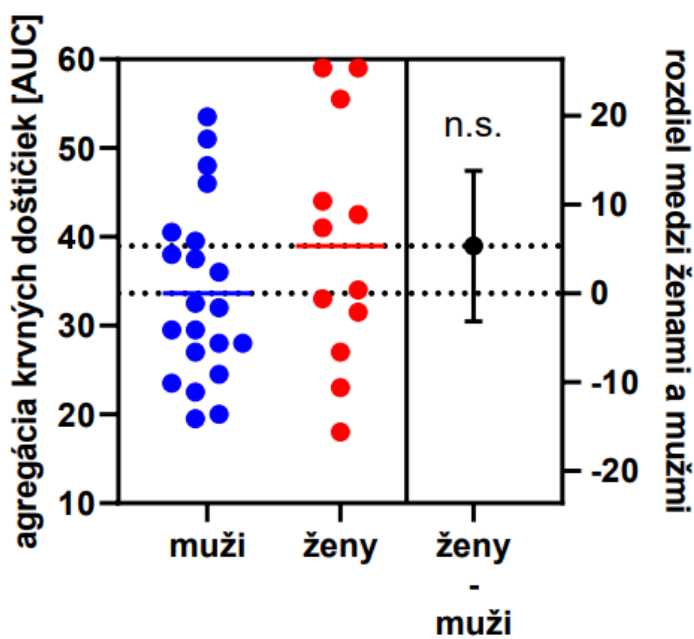
Obr. 26 Rozdiely v agregácii indukovanej kolagénom v koncentrácií 1 µg/ml medzi ženami a mužmi.



Obr. 27 Rozdiely v agregácii inhibovanej ASA (70 µM) po indukcii kolagénom (1 µg/ml) medzi ženami a mužmi.

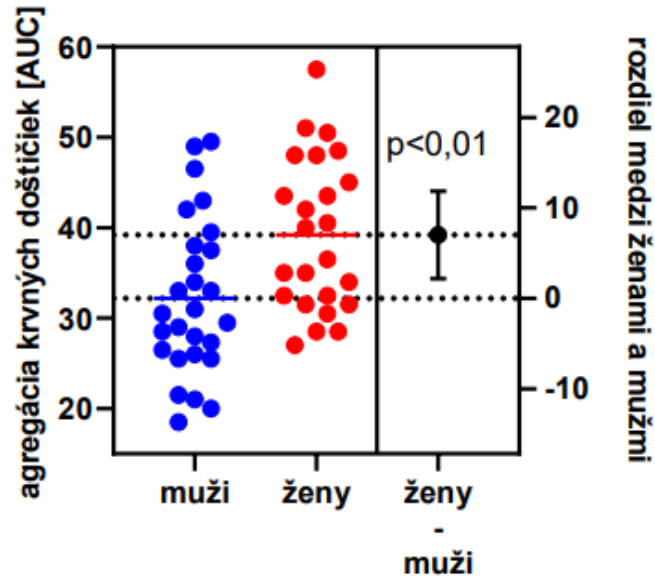


Obr. 28 Rozdiely v agregácií inhibovanej 4-MC (20 µM) po indukcií kolagénom (1 µg/ml) medzi ženami a mužmi.

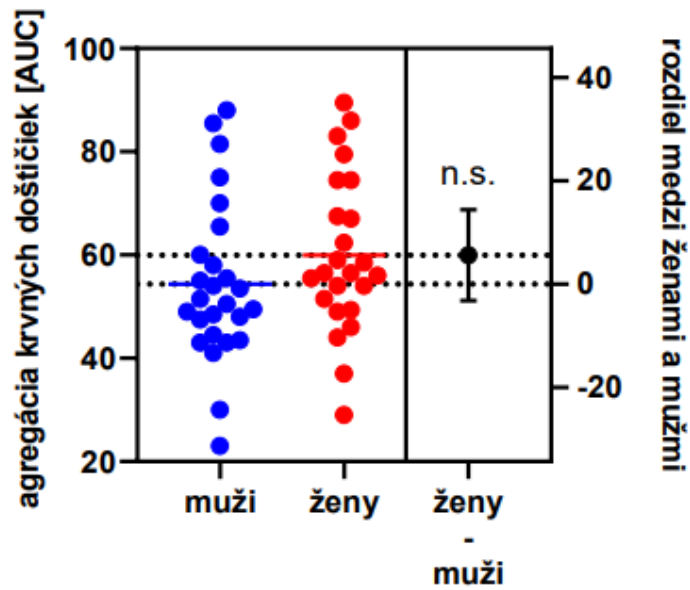


Obr. 29 Rozdiely v agregácií inhibovanej 4-MC (70 µM) po indukcií kolagénom (1 µg/ml) medzi ženami a mužmi.

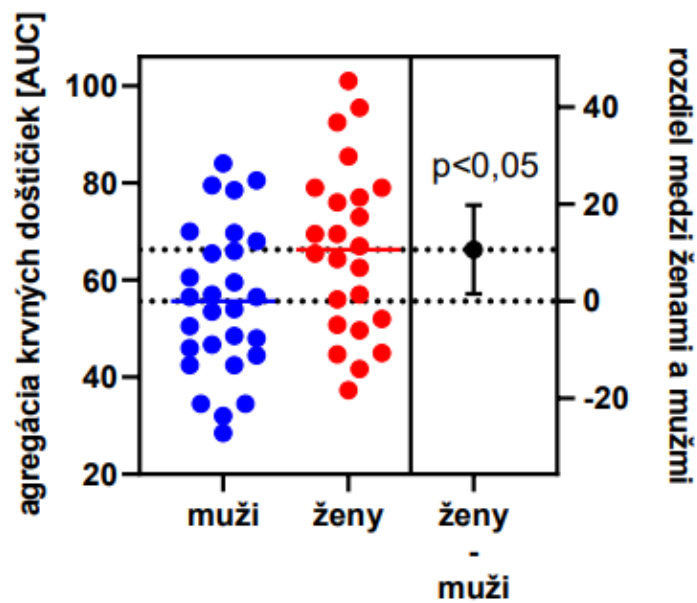
Tieto experimenty neprebíhali od začiatku, boli zahájené po analýze prvých výsledkov s malou účinnosťou nižšej dávky 4-MC.



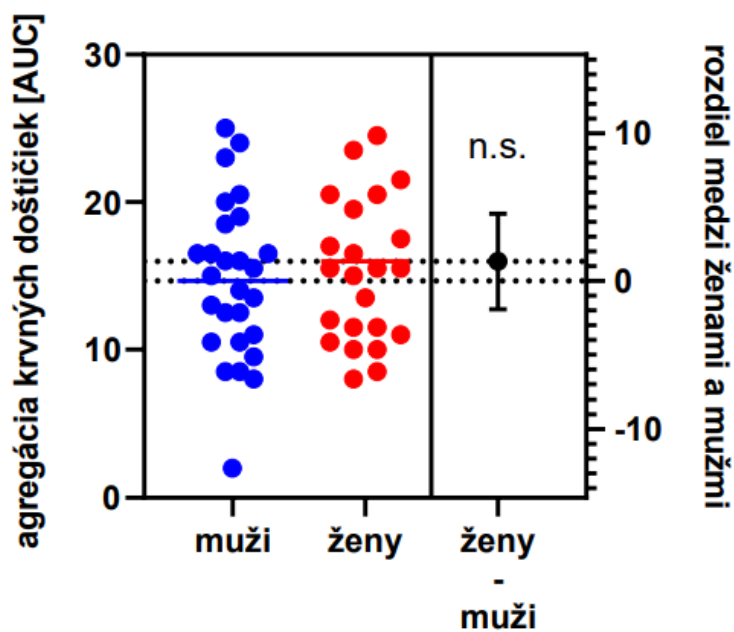
Obr. 30 Rozdiely v agregácii indukovanej ristocetinom medzi ženami a mužmi.



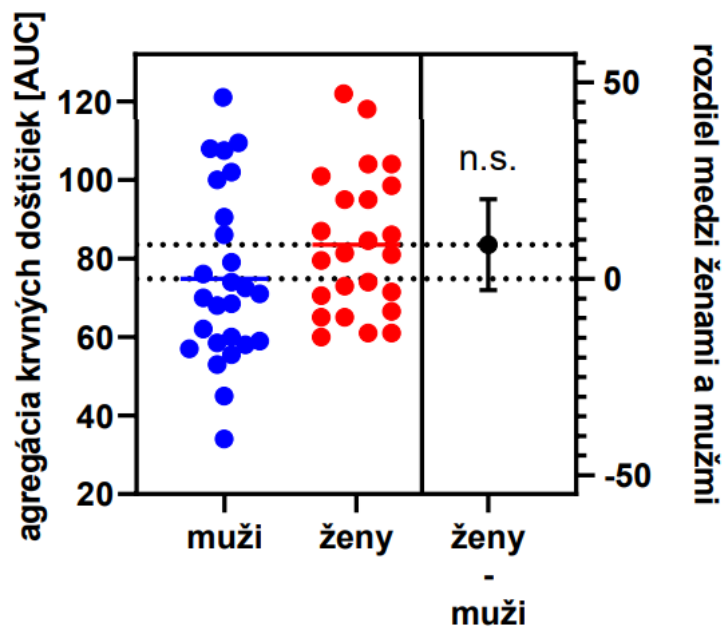
Obr. 31 Rozdiely v agregácii inhibovanej 4-MC (240  $\mu$ M) po indukcií ristocetinom medzi ženami a mužmi.



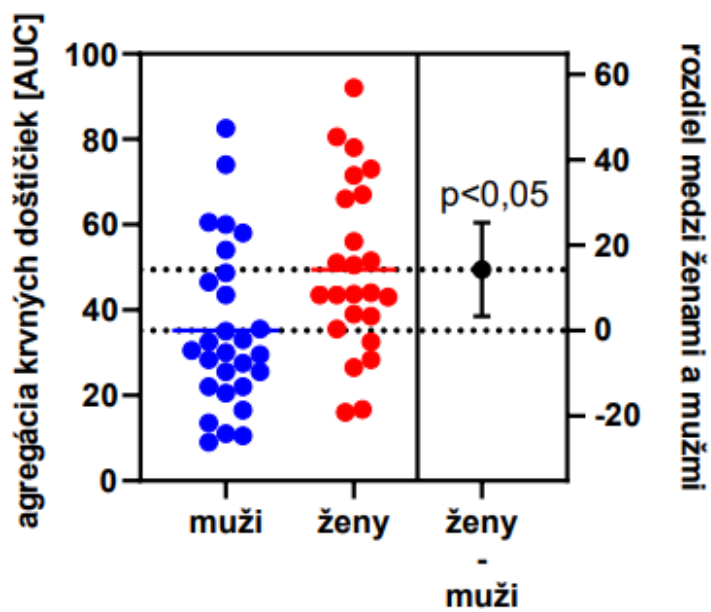
Obr. 32 Rozdiely v agregácii indukovanej ADP medzi ženami a mužmi.



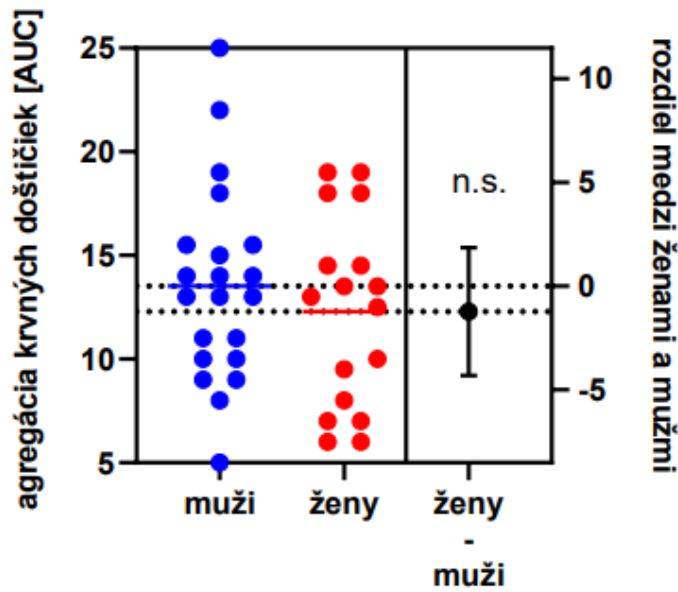
Obr. 33 Rozdiely v agregácii inhibovanej tikagrelorom po indukcii ADP medzi ženami a mužmi.



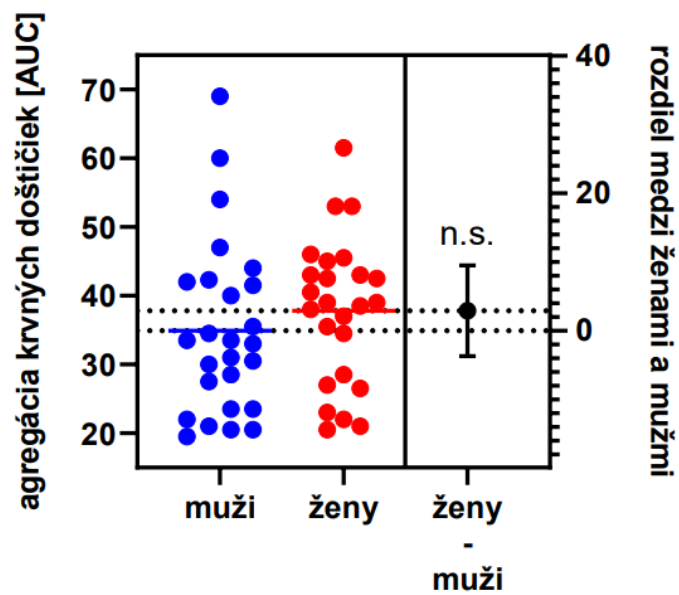
Obr. 34 Rozdiely v agregácii indukovanej TRAP medzi ženami a mužmi.



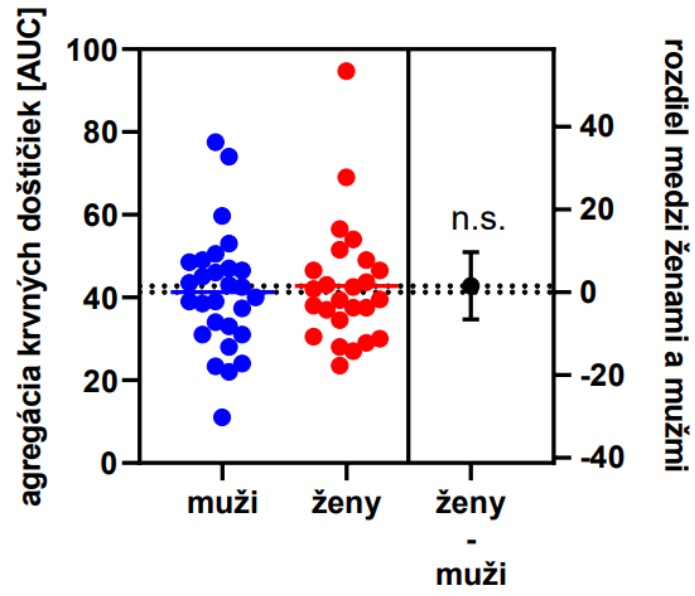
Obr. 35 Rozdiely v TRAP indukovanej agregácii inhibovanej vorapaxarom (1 $\mu$ M) medzi ženami a mužmi.



Obr. 36 Rozdiely v TRAP indukovanej agregácii inhibovanej vorapaxarom (5µM) medzi ženami a mužmi.



Obr. 37 Rozdiely v agregácii indukovanej PAF medzi ženami a mužmi.



Obr. 38 Rozdiely v agregácii indukovanej U-46619 medzi ženami a mužmi.

## 7.6 Rozdiely v agregácií v závislosti na veku

V poslednom kroku bol tiež zanalyzovaný vplyv veku na agregáciu.

V nižšej, 60  $\mu\text{M}$  koncentrácií AA nebol nájdený žiadny vzťah medzi silou agregácie a vekom, zatiaľ čo pri vyššej (200  $\mu\text{M}$ ) koncentrácií, s vekom miera agregácia trombocytov klesala. (Obr. 39)

V prípade odpovede doštičiek na ADP nebol u mužov nájdený vzťah s vekom darcov. U žien sa s vekom značne znižovala reakcia trombocytov na podaný induktor agregácie. (Obr. 40)

V odpovedi krvných doštičiek na kolagénom-indukovanú agregáciu nebol pozorovaný žiadny vzťah s vekom darcov pri nižšej, či vyššej koncentrácií kolagénu. (Obr. 41)

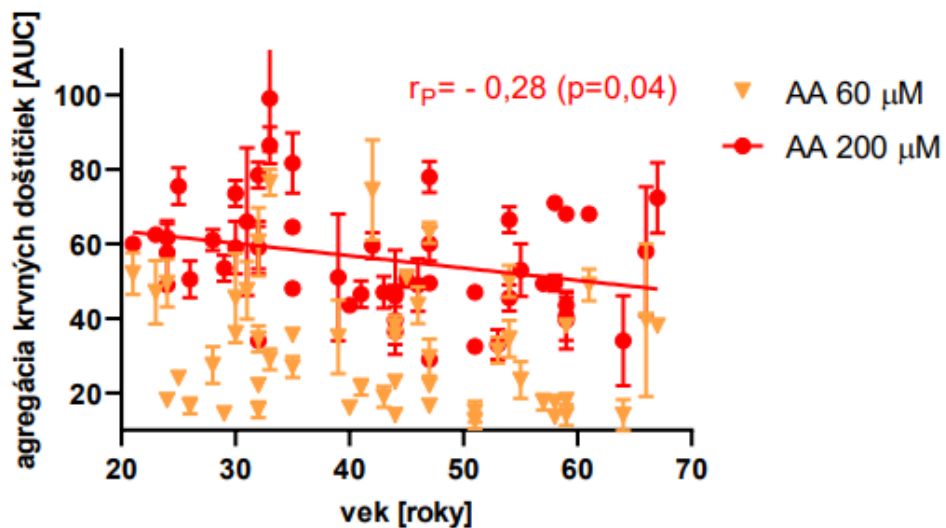
Reakcia krvných doštičiek na nižšiu a vyššiu koncentráciu ristocetinu nebola závislá na veku pacientov. (Obr. 42) V prípade použitia TRAP, bol podobne ako pri AA, nájdený vzťah medzi vekom a reakciou trombocytov. Odpoveď doštičiek na tento induktor agregácie klesala s narastajúcim vekom. (Obr. 43). Odozva na antagonistu trombínových receptorov bola paradoxne obrátená. U nižšej dávky sa odpoveď znižovala s vekom, pričom u troch najstarších pacientov bola táto koncentrácia evidentne neúčinná v inhibícii agregácie doštičiek. Avšak, reakcia na vyššiu, 5  $\mu\text{M}$ , bola konštatná a nemenila sa s pribúdajúcim vekom. (Obr. 44)

Odpoveď na PAF, ktorý bol použitý v koncentrácií 20 nM ako induktor agregácie, bola u mužov konzistentná, bez akejkolvek korelácie s vekom darcov. U žien odpoveď s vyšším vekom klesala. (Obr. 45)

Analogická odozva trombocytov bola pozorovaná na U-46619. U darcov mužského pohlavia bola úplne nezávislá na veku, u žien s narastajúcim vekom klesala. (Obr. 46)

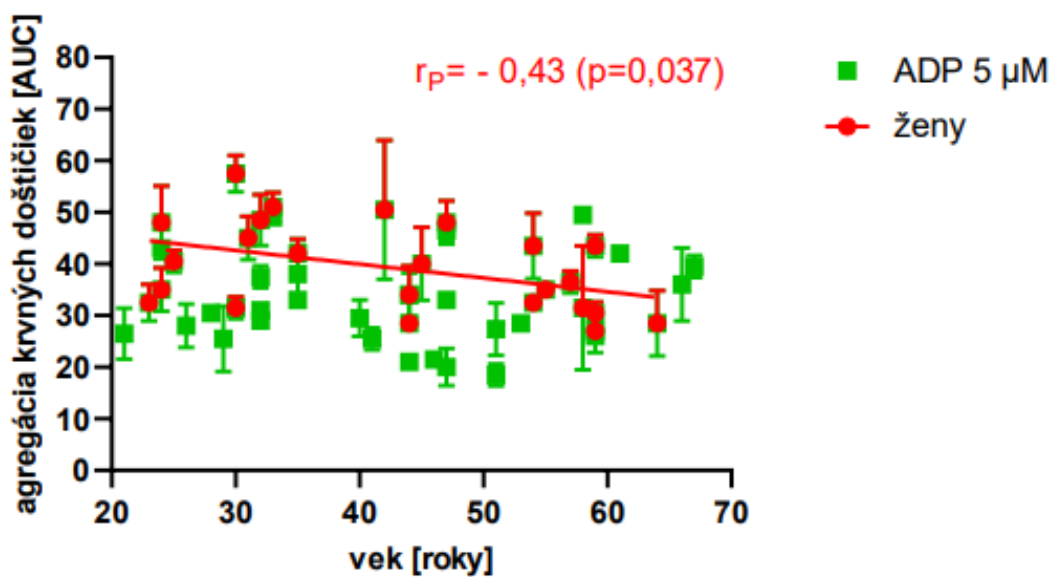
Rozdiely v reakciách na ďalšie inhibítory agregácie vo vzťahu k veku pacientov neboli pozorované. (Obr. 47-49)



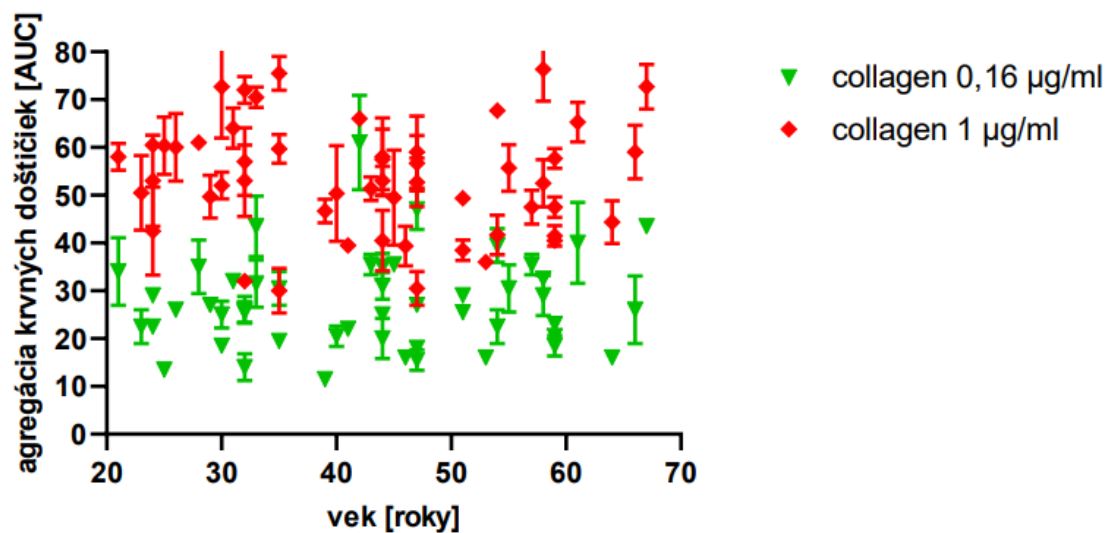


Obr. 39 Vzťah medzi agregáciou indukovanou AA a vekom.

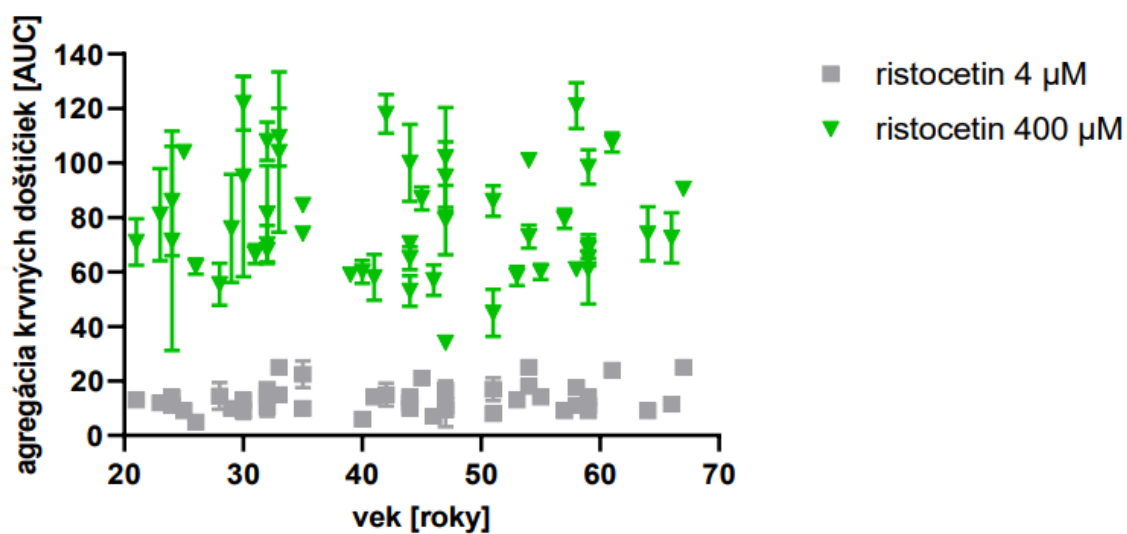
$r_p$  = Pearsonov korelačný faktor



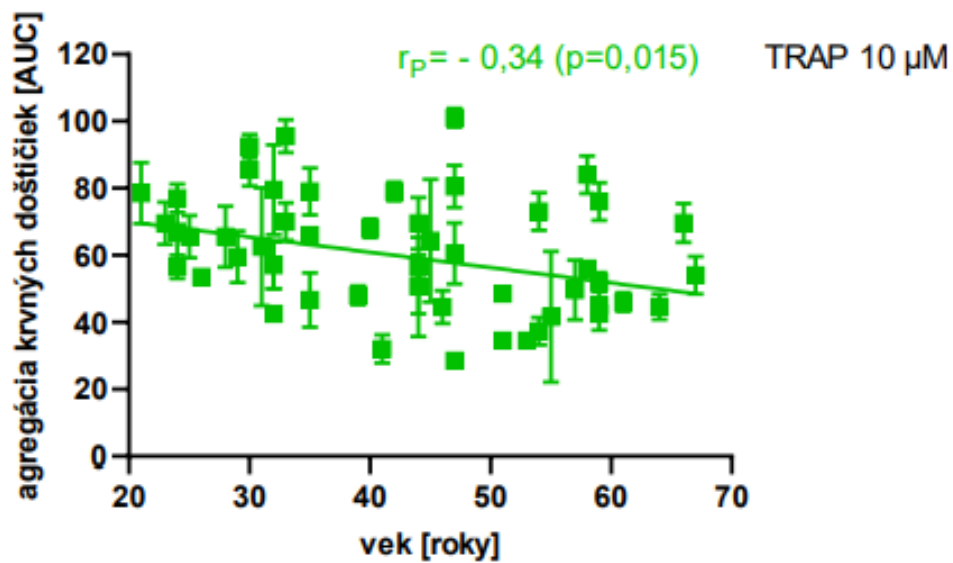
Obr. 40 Vzťah medzi agregáciou indukovanou ADP a vekom a rozdiel medzi pohlaviami.



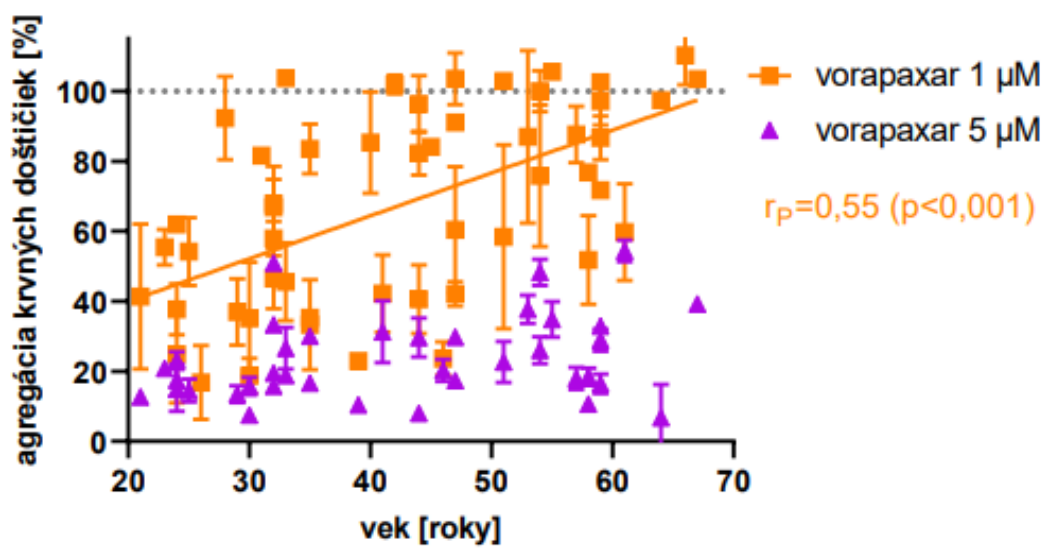
Obr. 41 Vzťah medzi agregáciou indukovanou kolagénom a vekom.



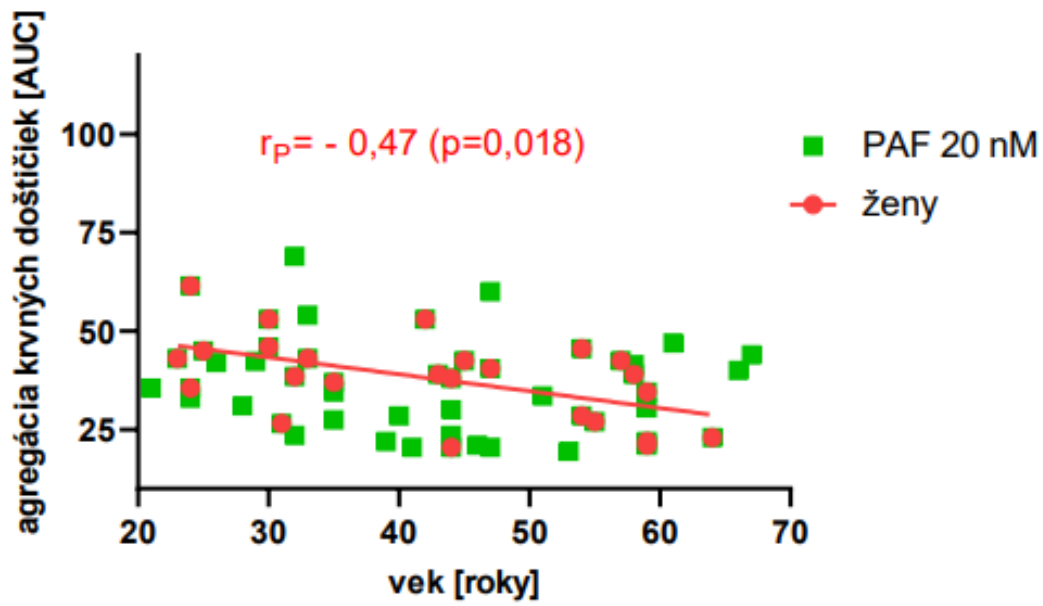
Obr. 42 Vzťah medzi agregáciou indukovanou ristocetinom a vekom.



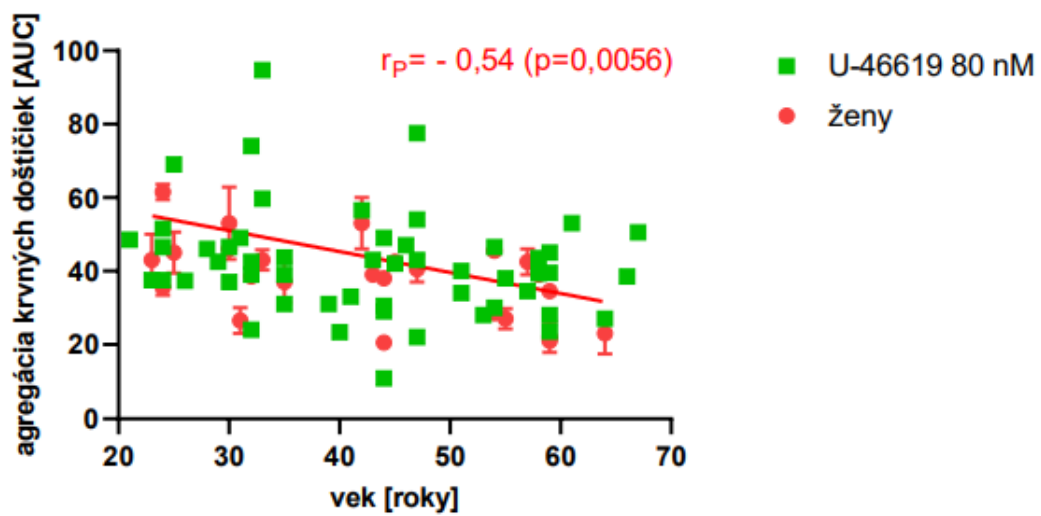
Obr. 43 Vzťah medzi agregáciou indukovanou TRAP a vekom.



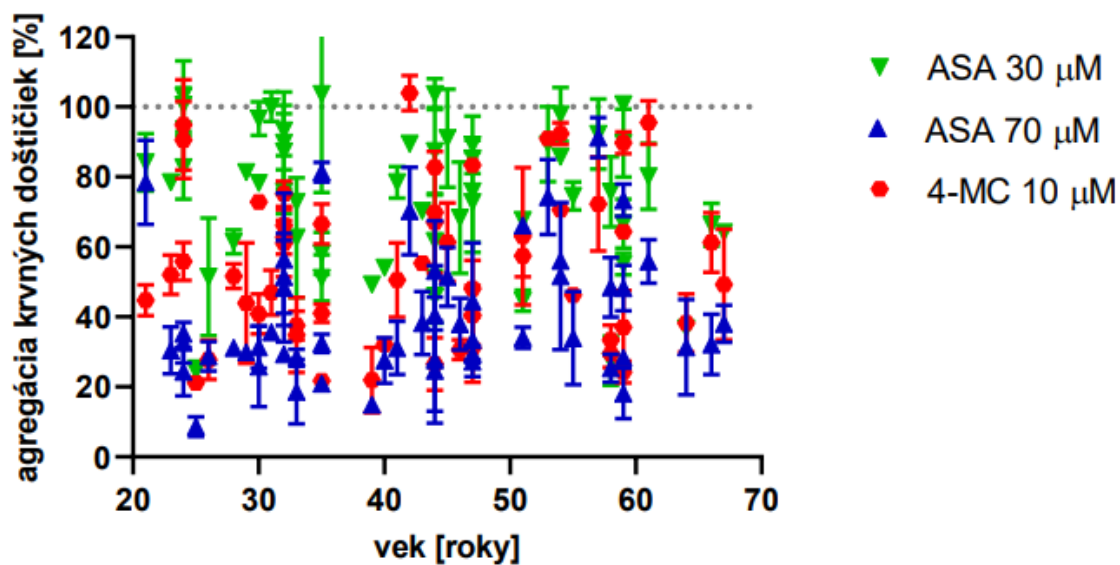
Obr. 44 Vzťah medzi odpoveďou na vorapaxar po indukcii agregácie pomocou TRAP a vekom.



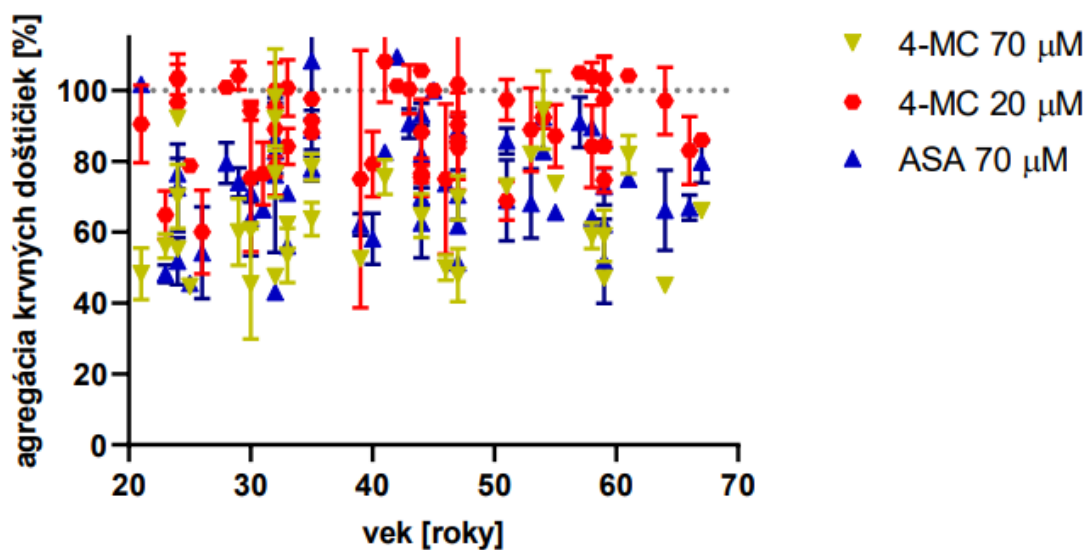
Obr. 45 Vzťah medzi agregáciou indukovanou PAF a vekom a rozdiely medzi pohlaviami.



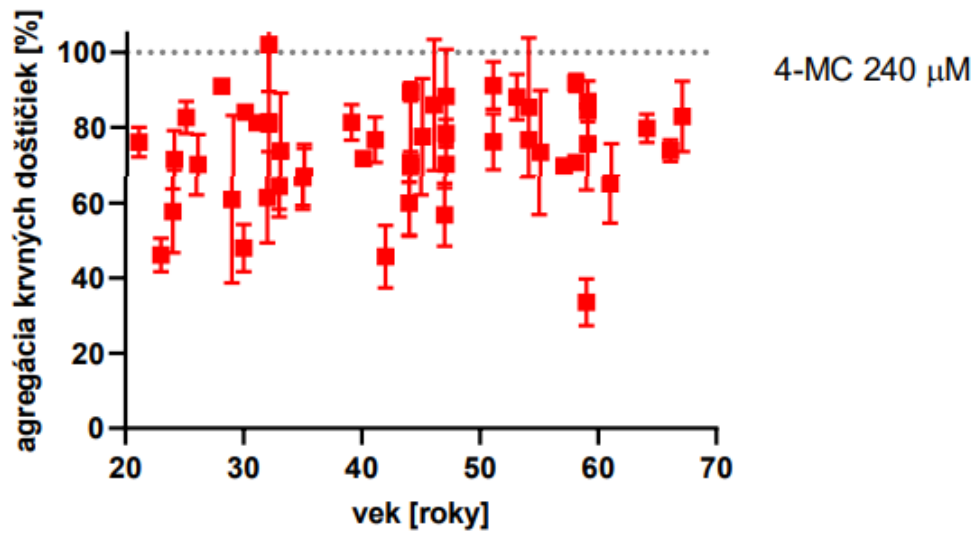
Obr. 46 Vzťah medzi agregáciou indukovanou U-46619 a vekom a rozdiely medzi pohlaviami.



Obr. 47 Vzťah medzi agregáciou inhibovanou ASA (30  $\mu\text{M}$  a 70  $\mu\text{M}$ ) a 4-MC (10  $\mu\text{M}$ ) a vekom darcov.



Obr. 48 Vzťah medzi agregáciou inhibovanou ASA (70  $\mu\text{M}$ ) a 4-MC (20  $\mu\text{M}$  a 70  $\mu\text{M}$ ) a vekom darcov.



Obr. 49 Vzťah medzi agregáciou inhibovanou 4-MC (240  $\mu$ M) a vekom darcov.

## 8 Diskusia

Trombocyty sú špecializované krvné bunky, ktoré hrajú ústrednú úlohu vo fyziologických, ale aj patologických procesoch. Aktivácia krvných doštičiek spúšťa zložitý proces, ktorého výsledkom je zástava krvácania. (Jurk a Kehrel 2005) Tento dej možno rozdeliť do troch fáz: iniciácia, elongácia a perpetuácia. (Michelson 2003) Doštičky sú spomalené interakciou s vWF, ktorý je viazaný na exponované molekuly kolagénu a následne sú úplne zastavené prostredníctvom interakcie GP komplexu s kolagénom. (Sangkuhl et al. 2011) Proces elongácie je charakterizovaný nahromadením ďalším trombocytov, ktoré reagujú na lokálne uvoľnené molekuly agregčných faktorov. Posledným krokom tvorby doštičkového trombu je perpetuácia. Zahŕňa najmä stabilizáciu krvnej zátky a zabraňuje predčasnému rozpadu. (Michelson 2003) Súbežným procesom je aj aktivácia koagulačnej kaskády, čo vedie k syntéze trombínu, ktorý štiepi fibrinogén na fibrín, s následnou tvorbou hemostickej zátky. (Baker-Groberg et al. 2016)

Protidoštičkové lieky tvoria veľkú skupinu farmakologicky účinných látok, ktoré interferujú s fyziologickou funkciou krvných doštičiek a zabraňujú tvorbe krvných zrazenín. (Ren et al. 2010) Indikáciou pre podanie týchto liečiv je profylaxia trombotických komplikácií pri aktivácii procesu primárnej hemostázy či zabránenie rastu už vzniknutého trombu. Najčastejšie sa využívajú v liečbe, ale aj profylaxii akútnych aj chronických foriem ischemickej choroby srdca, cievnej mozgovej príhody, ale aj pri aterosklerotickom postihnutí inej časti tela, napr. pri ischemickej chorobe dolných končatín. Pôsobia v rôznych fázach tvorby doštičkového trombu, pričom väčšina liečiv zasahuje do procesu aktivácie a degranulácie trombocytov. Patria tu inhibítory COX, antagonisti purinérgnych či PAR receptorov. Jedinou skupinou liečiv, ktorá interferujú priamo s agregáciou (tzv. vlastné antiagregancia) sú blokátory glykoproteínových receptorov. (Švihovec et al. 2018)

Liečba protidoštičkovými liečivami čelí v súčasnosti viacerým problémom, z ktorých, zdá sa najväčnejší, je vysoká variabilita odpovedí pacientov aj pri bežne používaných liečivách ako je kyselina acetylsalicylová či klopidogrel. (Carazo et al. 2022) Rezistencia na protidoštičkovú liečbu označuje stav, kedy je možné zlyhanie terapie dokázať príslušným laboratórnym testom. (Cattaneo 2007) Aktivita trombocytov môže byť kvantifikovaná na základe hodnotenia tendencie k agregácií, vyšetrením expresie špecifických štruktúr na povrchu trombocytov či metabolitov v plazme, v plnej krvi či v moči pacienta. (Kotuličová et al. 2011)

Hlavným cieľom tejto práce bolo porovnať agregáciu krvných doštičiek vyvolanú 7 rôznymi induktormi agregácie, s alebo bez premedikácie 3 klinicky používanými liečivami a 4-metylkatecholom. Bola využitá metóda impedačnej agregometrie, ktorá umožňuje merať agregáciu doštičiek v plnej krvi, čo vedie k čo najprirodzenejšej stimulácii agregácie. Jej princípom je nárast elektrickej impedancie, ktorý je generovaný prítlutím aktivovaných krvných doštičiek na elektródy. (Paniccia et al. 2015)

Po schválení štúdie Etickou komisiou boli na základe dohody s lekármi Fakultnej nemocnice v Hradci Králové naplánované odbery krvi zdravých dobrovoľníkov. Vzhľadom na snahu o čo najdetailnejšie pochopenie danej problematiky, bolo zvolených 7 rôznych induktorov agregácie. Ich koncentrácie použité v tejto práci boli stanovené na základe predchádzajúceho výskumu v tejto vedeckej skupine (Carazo et al., 2022). Prekrytie jednotlivých dráh vedúcich k agregácii doštičiek je dôvodom, prečo bola pozorovaná podobnosť medzi odpoveďami na rôzne induktory agregácie aj napriek rôznemu mechanizmu ich pôsobenia. Následne boli určené 3 klinicky používané protidoštičkové liečivá, ASA, tikagrelor a vorapaxar, ktoré zasahujú do kaskád vyvolaných vybranými induktormi agregácie. Ako posledný blokátor agregácie bol použitý aj flavonoidný metabolit 4-MC, ktorý sa preukázal ako potentný inhibítor na podklade predchádzajúceho výskumu. (Applova et al. 2019, Hrubsa et al. 2022) V prípade agregácie indukovanej AA sa ako najpotentnejší inhibítor preukázala ASA vo vyššej použitej koncentrácii. 4-MC tiež inhiboval AA-indukovanú agregáciu veľmi potentne a preukázal najväčší efekt v prípade agregácie vyvolanej kolagénom. Je nutné ale zdôrazniť, že z hľadiska použitých koncentrácií, bolo v tejto relatívne rozsiahlej skupine preukázané, že 4-MC je účinnejší ako ASA, a to aj u agregácie indukovanej AA, pretože 10  $\mu\text{M}$  koncentrácia 4-MC mala účinok medzi 30 a 70  $\mu\text{M}$  ASA. Tikagrelor sa preukázal ako potentný inhibítor, keďže blokoval agregáciu indukovanú ADP veľmi konzistentne u všetkých darcov. Podobne sa prejavil aj vorapaxar vo vyššej testovanej koncentrácii, ktorého efekt taktiež vyvolal konzistentnú odpoveď u všetkých darcov.

Vedľajším cieľom bolo taktiež porovnať rozdiely v agregácii medzi mužmi a ženami. Ukázalo sa, že medzi pohlaviami sa vyskytujú značné rozdiely v odpovedi doštičiek na podané induktory či inhibitory agregácie. Trombocyty žien vo všeobecnosti vykazovali vyššiu citlivosť na niektoré induktory agregácie. Toto zistenie koreluje aj s výsledkami iných štúdií, aj na väčšom počte jedincov, avšak s menším množstvom použitých induktorov. (Otahbachi et al. 2010, Patti et al. 2014, Sabetta et al. 2022) Doštičky u žien však vykazovali nižšiu odpoveď na podávané klinicky používané protidoštičkové liečivá aj 4-MC.



Výrazným faktorom ovplyvňujúcim agregáciu krvných doštičiek je aj vek. So zvyšujúcim sa vekom, najmä u žien, klesala odpoveď trombocytov na podané induktory. Vek, na základe výsledkov, nebol však faktorom pre ovplyvnenie odpovede na podané protidoštičkové liečivá. Jedinou výnimkou je zníženie odpovede na antagonistu trombínových receptorov, vorapaxar, kedy bola pri nižšej použitej koncentrácii pozorovaná nižšia odpoveď doštičiek s narastajúcim vekom. Toto zistenie je však v rozpore so štúdiami vykonanými v minulosti, ktoré v závere nepotvrdzujú jasnú koreláciu medzi vyšším vekom a nižšou účinnosťou. (Serebruany a Fortmann 2015)

Aj napriek faktu, že štúdia bola vykonaná na pomerne malej skupine zdravých dobrovoľníkov, jej výsledky poukazujú na vysokú variabilitu odpovede v populácii. Budúcnosť protidoštičkovej liečby preto spočíva vo vývoji nových protidoštičkových látok, nových liečebných stratégií, ale aj snahách o individualizáciu terapie založenej na testovaní funkcie krvných doštičiek. (Gelbenegger a Jilma 2022)

## 9 Záver

Na záver možno konštatovať, že ciele tejto diplomovej práce boli naplnené.

Na základe výsledkov, sa preukázala vyššia koncentrácia ASA ako najpotentnejší inhibítor agregácie indukovanej AA. Na molekulárnej úrovni je ale vzhľadom k použitým koncentráciám účinnejší účinnější 4-MC. V prípade agregácie indukovanej kolagénom, boli priamo pozorované rovnaké koncentrácie ASA a 4-MC, druhý menovaný bol účinnejším protidoštičkovým liečivom aj za týchto podmienok. Tikagrelor inhiboval ADP-indukovanú agregáciu veľmi konzistentne. Efekt vorapaxaru, najmä vo vyššej použitej koncentracii viedol k značne konzistentnej odpovedi u všetkým darcov a bol významne vyšší, ako pri nižšej použitej koncentracii, ktorá bola avšak tiež schopná inhibovať agregáciu trombocytov navodenú analógom trombínu, ale zlyhala u troch najstarších pacientov.

V ďalšom kroku bol hodnotený vplyv pohlavia na agregáciu trombocytov s nasledujúcimi výsledkami. Výrazne rozdiely boli pozorované v prípade kolagénom-indukovanej agregácie s inhibíciou ASA. Ženy sa vyznačovali nižšou odpoveďou na toto protidoštičkové liečivo. Trombocyty žien sa taktiež vyznačovali vyššou citlivosťou na TRAP a ADP.

V poslednom kroku bol tiež zanalyzovaný vplyv veku na agregáciu. S vekom sa znižovala odpoveď doštičiek na vyššiu koncentráciu AA a TRAP u oboch pohlaví. U žien sa s vekom taktiež znižovala aj odpoveď na iné inductory, ako je ADP, PAF a U-46619. Rozdiely v reakciách na jednotlivé inhibítory agregácie závislé na veku pacientov neboli pozorované.

## 10 Zoznam použitej literatúry

Airoidi G, Campanini M. Vorapaxar. *Ital J Med* 2013;88-95.

Alexopoulos D. Prasugrel resistance: fact or fiction. *Platelets*. 2012;23(2):83-90.

Applova L, Karlickova J, Warncke P, Macakova K, Hrubsa M, Machacek M, et al. 4-Methylcatechol, a Flavonoid Metabolite with Potent Antiplatelet Effects. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(20):e1900261.

Ashton AW, Zhang Y, Cazzolli R, Honn KV. The Role and Regulation of Thromboxane A(2) Signaling in Cancer-Trojan Horses and Misdirection. *Molecules*. 2022;27(19).

Baker-Groberg SM, Lattimore S, Recht M, McCarty OJ, Haley KM. Assessment of neonatal platelet adhesion, activation, and aggregation. *J Thromb Haemost*. 2016;14(4):815-27.

Capodanno D, Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Antiplatelet therapy: new pharmacological agents and changing paradigms. *J Thromb Haemost*. 2013;11 Suppl 1:316-29.

Capra V, Back M, Angiolillo DJ, Cattaneo M, Sakariassen KS. Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation. *J Thromb Haemost*. 2014;12(2):126-37.

Carazo A, Hrubša M, Konečný L, Skořepa P, Pačliková M, Musil F, et al. Sex-Related Differences in Platelet Aggregation: A Literature Review Supplemented with Local Data from a Group of Generally Healthy Individuals. *Semin Thromb Hemost*. 2022 (in press, doi: 10.1055/s-0042-1756703).

Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost*. 2007;5:230-7.

Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res*. 2012;129(3):220-4.

de Abajo FJ. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet function: mechanisms, clinical outcomes and implications for use in elderly patients. *Drugs Aging*. 2011;28(5):345-67.

De Luca L, Steg PG, Bhatt DL, Capodanno D, Angiolillo DJ. Cangrelor: Clinical Data, Contemporary Use, and Future Perspectives. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(13):e022125.

De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Broos K, Salles, II, Deckmyn H. Antiplatelet drugs. *Br J Haematol*. 2008;142(4):515-28.

Dugan G, O'Donnell L, Hanbury DB, Cline JM, Caudell DL. Assessment of Multiplate platelet aggregometry using citrate, heparin or hirudin in Rhesus macaques. *Platelets*. 2015;26(8):730-5.

Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI. Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(2 Suppl):e89S-e119S.

Ferreiro JL, Angiolillo DJ. New directions in antiplatelet therapy. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012;5(3):433-45.

Gachet C. Antiplatelet drugs: which targets for which treatments? *J Thromb Haemost*. 2015;13 Suppl 1:S313-22.

Gachet C, Aleil B. Testing antiplatelet therapy. *Eur Heart J Suppl*. 2008;10(suppl\_A):A28-A34.

Gelbenegger G, Gilma B. Clinical pharmacology of antiplatelet drugs. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2022:1-21.

George JN. Platelets. *The Lancet*. 2000;355(9214):1531-9.

Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *Sci World J*. 2014;2014:781857.

Graham Knight C, Morton LF, Onley DJ, Peachey AR, Ichinohe T, Okuma M, et al. Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet 1 Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res*. 1999;41:450-7.

Guthikonda S, Lev EI, Kleiman NS. Resistance to Antiplatelet Therapy. *Curr Cardiol Rep*. 2005;7:242-8.

Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *Br J Haematol*. 2013;161(2):245-54.

Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 13 ed. London, England: W B Saunders; 2016. 1168 p.

Hall R, Mazer CD. Antiplatelet drugs: a review of their pharmacology and management in the perioperative period. *Anesth Analg*. 2011;112(2):292-318.

Hankey GJ, Eikelboom JW. Antiplatelet drugs. *Med J Aust*. 2003;178:568-74.

Hosseinzadegan H, Tafti DK. Mechanisms of Platelet Activation, Adhesion and Aggregation. *Thromb Haemost Res* 2017;1(2):1008.

Hrubsa M, Alva R, Parvin MS, Macakova K, Karlickova J, Fadraersada J, et al. Comparison of Antiplatelet Effects of Phenol Derivatives in Humans. *Biomolecules*. 2022;12(1).

Hrubsa M, Konecny L, Paclikova M, Parvin MS, Skorepa P, Musil F, et al. The Antiplatelet Effect of 4-Methylcatechol in a Real Population Sample and Determination of the Mechanism of Action. *Nutrients*. 2022;14(22).

Chen P, Ren S, Song H, Chen C, Chen F, Xu Q, et al. Synthesis and biological evaluation of BMS-986120 and its deuterated derivatives as PAR4 antagonists. *Bioorg Med Chem*. 2019;27(1):116-24.

Cheng-Ching E, Samaniego EA, Reddy Naravetla B, Zaidat OO, Hussain MS. Update on pharmacology of antiplatelets, anticoagulants, and thrombolytics. *Neurology*. 2012;79(1):68-76.

Ibanez B, Vilahur G, Badimon JJ. Pharmacology of thienopyridines: rationale for dual pathway inhibition. *Eur Heart J Suppl*. 2006;8(suppl\_G):G3-G9.

Jourdi G, Godier A, Lordkipanidze M, Marquis-Gravel G, Gaussem P. Antiplatelet Therapy for Atherothrombotic Disease in 2022-From Population to Patient-Centered Approaches. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:805525.

Jourdi G, Lordkipanidze M, Philippe A, Bachelot-Loza C, Gaussem P. Current and Novel Antiplatelet Therapies for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23).

Jourdi G, Marquis-Gravel G, Martin AC, Lordkipanidze M, Godier A, Gaussem P. Antiplatelet Therapy in Atherothrombotic Diseases: Similarities and Differences Across Guidelines. *Front Pharmacol*. 2022;13:878416.

Jurk K, Kehrel BK. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31(4):381-92.

Kahner BN, Shankar H, Murugappan S, Prasad GL, Kunapuli SP. Nucleotide receptor signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2317-26.

Kam PC, Nethery CM. The thienopyridine derivatives (platelet adenosine diphosphate receptor antagonists), pharmacology and clinical developments. *Anaesthesia*. 2003;58(1):28-35.

Kei AA, Florentin M, Mikhailidis DP, Elisaf MS, Liberopoulos EN. Review: Antiplatelet drugs: what comes next? *Clin Appl Thromb Hemost*. 2011;17(1):9-26.

Koenig-Oberhuber V, Filipovic M. New antiplatelet drugs and new oral anticoagulants. *Br J Anaesth*. 2016;117 Suppl 2:ii74-ii84.

Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8).

Kotuličová D, Chudý P, Chudej J, Staško J, Kubisz P. Monitorovanie protidoštičkovej liečby. *Vask Med.* 2011;3(1):21-5.

Latif Sarah Y, Issa Mustafa M, Hassan Tabark N, Ali Murtadha H. Antiplatelet drugs overview. *GSC Biol Pharm Sci.* 2020;10(1):081-9.

Magnani G, Bonaca MP, Braunwald E, Dalby AJ, Fox KA, Murphy SA, et al. Efficacy and safety of vorapaxar as approved for clinical use in the United States. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(3):e001505.

Majithia A, Bhatt DL. Novel Antiplatelet Therapies for Atherothrombotic Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(4):546-57.

Malik J. A Case of Ticagrelor Resistance. *Eur J Case Rep Intern Med.* 2021;8(7):002719.

McFadyen JD, Schaff M, Peter K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(3):181-91.

Michelson AD. How platelets work: platelet function and dysfunction. *J Thromb Thrombolysis.* 2003;16(1-2):7-12.

Michelson AD, Frelinger AL, Furman MI. Resistance to antiplatelet drugs. *Eur Heart J Suppl.* 2006;8(suppl\_G):G53-G8.

Minárik P, Mináriková J, Hoppan M. Nové perspektívne antiagreganciá pre klinickú prax. *Vask med* 2011;4(1-2):25-7.

Miner J, Hoffhines A. The Discovery of Aspirin's Antithrombotic Effects. *Tex Heart Inst J.* 2007;34:179-86.

Nikolic LI, Suvajdžić Vuković ND, Bugarinović SM, Plećaš DV. Platelets (thrombocytes) – the other recognized functions. *Hosp Pharm-Inter Multidisc J.* 2016;3(2):447-53.

Olivier C, Diehl P, Bode C, Moser M. Thrombin receptor antagonism in antiplatelet therapy. *Cardiol Ther.* 2013;2(1):57-68.

Otahbachi M, Simoni J, Simoni G, Moeller JF, Cevik C, Meyerrose GE, et al. Gender differences in platelet aggregation in healthy individuals. *J Thromb Thrombolysis.* 2010;30(2):184-91.

Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:133-48.

Patrono C, Morais J, Baigent C, Collet JP, Fitzgerald D, Halvorsen S, et al. Antiplatelet Agents for the Treatment and Prevention of Coronary Atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(14):1760-76.

Patti G, De Caterina R, Abbate R, Andreotti F, Biasucci LM, Calabro P, et al. Platelet function and long-term antiplatelet therapy in women: is there a gender-specificity? A 'state-of-the-art' paper. *Eur Heart J*. 2014;35(33):2213-23b.

Penka M. Antiagregační a antikoagulační léčba – základní principy. *Kardiol Rev Int Med*. 2012;14(2):63-7.

Pluta J, Nicińska B, Trzebicki J. Multiple electrode aggregometry as a method for platelet function assessment according to the European guidelines. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2018;50(3):230-3.

Pultar J, Wadowski PP, Panzer S, Gremmel T. Oral antiplatelet agents in cardiovascular disease. *Vasa*. 2019;48(4):291-302.

Remková A, Remko M. Je protidoštičková léčba vždy účinná? *Interná Med*. 2014;14(2):70-5.

Ren Y, Patel K, Crane T. A Review of Antiplatelet Drugs, Coronary Artery Diseases and Cardiopulmonary Bypass. *J Extra Corpor Technol*. 2010;42:103-13.

Roberts DE, McNicol A, Bose R. Mechanism of collagen activation in human platelets. *J Biol Chem*. 2004;279(19):19421-30.

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res*. 2007;100(12):1673-85.

Sabetta A, Lombardi L, Stefanini L. Sex differences at the platelet-vascular interface. *Intern Emerg Med*. 2022;17(5):1267-76.

Sangkuhl K, Shuldiner AR, Klein TE, Altman RB. Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(8):516-21.

Scully M, Cataland SR, Peyvandi F, Coppo P, Knobl P, Kremer Hovinga JA, et al. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*. 2019;380(4):335-46.

Serebruany VL, Fortmann SD. The FDA report on vorapaxar in the elderly: A convoluted dilemma. *Int J Cardiol*. 2015;201:601-3.

Shenkman B, Einav Y, Salomon O, Varon D, Savion N. Testing agonist-induced platelet aggregation by the Impact-R [Cone and plate(let) analyzer (CPA)]. *Platelets*. 2008;19(6):440-6.

Shpakova V, Rukoyatkina N, Al Arawe N, Prilepskaya A, Kharazova A, Sharina I, et al. ML355 Modulates Platelet Activation and Prevents ABT-737 Induced Apoptosis in Platelets. *J Pharmacol Exp Ther.* 2022;381(2):164-75.

Siljander P, Lassila R. Studies of Adhesion: Dependent Platelet Activation Distinct Roles for Different Participating Receptors Can Be Dissociated by Proteolysis of Collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:3033-43.

Siller-Matula JM, Krumphuber J, Jilma B. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical profile of novel antiplatelet drugs targeting vascular diseases. *Br J Pharmacol.* 2010;159(3):502-17.

Singal AK, Karthikeyan G. Aspirin for primary prevention: Is this the end of the road? *Indian Heart J.* 2019;71(2):113-7.

Smolensky Koganov E, Michelson AD, Yanachkov IB, Yanachkova MI, Wright GE, Przyklenk K, et al. GLS-409, an Antagonist of Both P2Y(1) and P2Y(12), Potently Inhibits Canine Coronary Artery Thrombosis and Reversibly Inhibits Human Platelet Activation. *Sci Rep.* 2018;8(1):14529.

Steiner JB, Wu Z, Ren J. Ticagrelor: positive, negative and misunderstood properties as a new antiplatelet agent. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2013;40(7):398-403.

Storey RF, Gurbel PA, Ten Berg J, Bernaud C, Dangas GD, Frenoux JM, et al. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of single-dose subcutaneous administration of selatogrel, a novel P2Y12 receptor antagonist, in patients with chronic coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2020;41(33):3132-40.

Švihovec J, Bultas J, Anzenbacher P, Chládek J, Příborský J, Slíva J, et al. *Farmakologie.* Praha: Grada; 2018. 1008 p.

Tantry US, Gesheff M, Liu F, Bliden KP, Gurbel PA. Resistance to antiplatelet drugs: what progress has been made? *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(17):2553-64.

Tello-Montoliu A, Tomasello SD, Ueno M, Angiolillo DJ. Antiplatelet therapy: thrombin receptor antagonists. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(4):658-71.

Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, Antonopoulos AS, Tsioufis K, Tousoulis D. Factors Associated with Platelet Activation-Recent Pharmaceutical Approaches. *Int J Mol Sci.* 2022;23(6).

Tsoupras A, Zabetakis I, Lordan R. Platelet aggregometry assay for evaluating the effects of platelet agonists and antiplatelet compounds on platelet function in vitro. *MethodsX.* 2019;6:63-70.



Twomey L, G. Wallace R, M. Cummins P, Degryse B, Sheridan S, Harrison M, et al. Platelets: From Formation to Function. Homeostasis - An Integrated Vision. London: Intechopen; 2019.

Uphaus T, Richards T, Weimar C, Neugebauer H, Poli S, Weissenborn K, et al. Revacept, an Inhibitor of Platelet Adhesion in Symptomatic Carotid Stenosis: A Multicenter Randomized Phase II Trial. *Stroke*. 2022;53(9):2718-29.

Varon D, Spectre G. Antiplatelet agents. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:267-72.

Voors-Pette C, Lebozec K, Dogterom P, Jullien L, Billiald P, Ferlan P, et al. Safety and Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of ACT017, an Antiplatelet GPVI (Glycoprotein VI) Fab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(5):956-64.

Wadowski PP, Pultar J, Weikert C, Eichelberger B, Lang IM, Koppensteiner R, et al. Comparison of Light Transmission Aggregometry With Impedance Aggregometry in Patients on Potent P2Y<sub>12</sub> Inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2021;26(3):260-8.

Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, et al. Abciximab 2005 [Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00054>].

Wiviott SD. Antiplatelet Therapy In Ischemic Heart Disease. New Jersey, USA: Wiley-Blackwell; 2009. 3-10 p.

Yang J, Luan J, Shen Y, Chen B. Developments in the production of platelets from stem cells (Review). *Mol Med Rep*. 2021;23(1).

Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9060143.