

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program

Vnitřní nemoci

**Rezistence na antiagregační léčbu v terapii onemocnění
kardiovaskulárního systému**

**Resistance to antiplatelet therapy in cardiovascular diseases
management**

MUDr.Hana Ševčíková

Školitel: prof. MUDr.Jan Vojáček, DrSC.

Hradec Králové, 2014

Obhajoba dne:

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 2014

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem spolupracovníkům a kolegům za jejich pomoc, především školiteli prof. MUDr. Janu Vojáčkovi, pod jehož odborným vedením celá práce vznikala. Další poděkování patří pracovníkům laboratorní části Oddělení klinické hematologie 4. interní kliniky, jmenovitě potom paní Mgr. Iloně Fátorové, bez jejíž obětavé práce a pomoci (včetně řady odborných rad) by tato práce nemohla být sepsána. Stejně tak by práce nemohla vzniknout bez laskavé pomoci paní RNDr. Evy Čermákové, která se významnou měrou podílela na statistickém zpracování výsledků. Zásadní byla podpora ze strany vedoucího Oborové rady pana prof. Jana Bureše, kterému velice děkuji. A nechci opomenout velikou podporu a trpělivost ze strany mé rodiny.

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZČR NR/9174-4.

Obsah

1. ÚVOD	10
2. ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ	11
2.1. Základní pojmy:	11
2.2. Akutní koronární syndromy:.....	11
2.2.1. Definice:.....	11
2.2.2. Etiopatogeneze:.....	12
2.2.3. Léčebná strategie:	13
2.3. Chronická ischemická choroba srdeční	14
2.3.1. Definice, patofyziologie, klinika:.....	14
2.3.2. Prevence a léčebná strategie:	14
3. Koagulační kaskáda	15
4. Tkáňový faktor a aterotrombóza:.....	17
5. Destičky, jejich funkce a role v procesu hemostázy a (atero)trombózy.....	18
6. Protidestičková terapie	20
6.1. Kyselina acetylsalicylová.....	20
6.2. Thienopyridiny.....	21
6.3. Nové protidestičkové léky (blokátory P2Y ₁₂ receptoru)	22
6.3.1. Klinická účinnost/bezpečnost nových protidestičkových léků (prasugrel, ticagrelor) v léčbě akutních koronárních syndromů.....	22
6.3.2. Prasugrel.....	23
6.3.3. Ticagrelor a Cangrelor	24
6.4. IIb/IIIa blokátory	25
7. Rezistence na protidestičkovou terapii x vysoká reziduální destičková aktivita x neúčinná protidestičková terapie	27
7.1. Definice.....	27
7.2. Etiologie.....	28

8.	Laboratorní měření destičkové aktivity.....	34
8.1.	Úvod do problematiky.....	34
8.2.	Dostupné metody pro měření destičkových funkcí	34
8.2.1.	Průtoková cytometrie.....	35
8.2.2.	Optická agregometrie.....	35
8.2.3.	Poloautomatické metody	40
8.3.	Možný význam jednotlivých metod v klinické praxi.....	42
9.	Cíl práce:.....	50
10.	Metodika:	51
10.1.	Soubor pacientů:	51
10.2.	Odběr vzorků a jejich zpracování:	51
10.3.	Statistické zpracování:.....	52
11.	Výsledky:.....	54
11.1.	Demografické složení a klinická charakteristika souboru:	54
11.2.	Výsledky vyhodnocení destičkové reaktivity a grafické zpracování.....	56
12.	Diskuze:	79
12.1.	Význam protideštičkové terapie.....	79
12.2.	Úskalí fenoménu „rezistence“ na antiagregační terapii a testování destičkových funkcí v praxi	80
12.3.	Laboratorně měřená destičková reaktivita v kardiologii – čím, kdy a proč	82
12.4.	Testování destičkových funkcí v kardiologii a limitace metod používaných k monitorování destičkové aktivity	84
12.5.	TF, TFPI, destičková reaktivita – pojítka mezi trombotickým a zánětlivým procesem?	88
12.6.	Otázka významu genových polymorfismů.....	89
12.7.	Jak léčit v případech vysoké reziduální destičkové reaktivity	90
12.8.	Další úskalí	90
12.9.	Limitace práce	93
13.	Závěr:.....	94

14.	Citace:.....	97
15.	Přílohy.....	111

Seznam použitých zkratk:

EKG - elektrokardiogram

PCI – perkutánní koronární intervence

STEMI – akutní infarkt myokardu s elevacemi ST úseků

NSTEMI – akutní infarkt myokardu bez elevací ST úseků

LDL – nízkodenzitní lipoproteiny (low density lipoproteins)

LK – levá komora srdeční

ADP – adenosindifosfát

TF – tkáňový faktor

TFPI – inhibitor tkáňového faktoru

GP – glykoprotein

ASA – kyselina acetylsalicylová

CRP – C reaktivní protein

TNF – faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis faktor)

vWf – von Willebrandtův faktor

PAR – destičkový trombinový receptor (protease activated receptor)

COX – cyklooxygenáza

TxA₂, B – tromboxan A₂, B

PGF₂, PGH₂ – prostaglandin F₂, H₂

CYP 450 – cytochrom P 450

MACE – hlavní nežádoucí kardiovaskulární příhody (major adverse cardiac events) – úmrtí, myokardiální infarkt, cévní mozková příhoda, revaskularizace

RNA – ribonukleová kyselina

NSAID – nesteroidní protizánětlivé léky

CABG – aortokoronární bypass

ELISA – imunologická metoda sloužící k detekci protilátek (enzyme linked immunosorbent assay)

VASP – vasodilatator-stimulated-phosphoprotein

LTA – optická agregometrie (light transmitted aggregometry)

AA – kyselina arachidonová (arachidonic acid)

PFA-100 – platelet function analyzer 100

CEPI – kolagen/epinefrin

CADP – kolagen/adenosindifosfát

PRU – platelet reactivity unit

ARU – aspirin reactivity unit

AU – arbitrární agregační jednotky

AUC – plocha pod křivkou (area under curve)

MULTIPLATE (MEA) – multiple platelet analyzer

ACS – akutní koronární syndromy

HPR – vysoká reziduální destičková reaktivita (high platelet reactivity)

KVS – kardiovaskulární

DES – lékové stenty (drug eluting stents)

CMP – cévní mozková příhoda

ACC – American College of Cardiology

SCAI – Society of Cardiovascular Angiography and Interventions

DAPT – duální protidestičková léčba (dual antiplatelet therapy)

t-PA – tkáňový aktivátor plazminogenu

PAI 1,2 – inhibitor aktivátoru plazminogenu (plazminogen activator inhibitor)

df- destičkový faktor

CK - kreatinkináza

CK-MB – kreatinkináza, myokardiální izoenzym

CPG – kationický propylgalát

IM – infarkt myokardu

NYHA klasifikace – New York Heart Association klasifikace

ACE-i – inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu

VIIa – aktivovaný srážecí faktor VII

1. ÚVOD

Ischemická choroba srdeční je jednou z hlavních příčin mortality a morbidit v populaci. Svou roli v procesu atherotrombózy hrají spolu s dalšími faktory krevní destičky a proto nezastupitelnou roli v terapii ischemické choroby srdeční má protideštičková terapie. Trvalá terapie kyselinou acetylsalicylovou je vhodná pro všechny pacienty s ischemickou chorobou srdeční pokud nemají kontraindikace. Metaanalýzy klinických studií poukazují na snížení rizika nežádoucích vaskulárních příhod u osob léčených ASA. I přes zavedenou antiagregační terapii ovšem u některých pacientů dochází k recidivám atherotrombotických příhod (akutní koronární syndromy, ischemické cévní mozkové příhody, periferní cévní komplikace...), což vedlo k otázce účinnosti/neúčinnosti podávané protideštičkové terapie a možnostem jejího monitorování. V souvislosti s recidivami KVS příhod navzdory zavedené antiagregační terapii se v literatuře objevil termín „aspirinová/clopidogrelová rezistence“, který se zdá být ovšem zavádějící a v současné době se častěji setkáváme s označením selhání protideštičkové léčby nebo vysoká reziduální destičková aktivita. Etiologie daného fenoménu je komplexní. K měření destičkových funkcí je dostupná celá řada testů, které ale nesplňují podmínky pro ideální test a mají řadu limitací. V současné době vedle klasických rizikových faktorů aterosklerotického procesu byl popsán vztah mezi trombotickým a zánětlivým procesem a vztah mezi vysokou reziduální destičkovou aktivitou při terapii a kardiovaskulárním rizikem. Vyjádřit se ke klinickému významu monitorace destičkových funkcí je problematické vzhledem k velké variabilitě dostupných dat. Používané testy mají variabilní prediktivní sílu pro výskyt kardiovaskulárních příhod. Problematika vysoké reziduální destičkové reaktivity zůstává ožehavým tématem. Zejména v době, kdy máme k dispozici celou řadu nových protideštičkových léků. Pochopení této problematiky by mohlo zlepšit léčebnou strategii a prognózu pacientů s atherotrombotickými kardiovaskulárními chorobami.

2. ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ

2.1. *Základní pojmy:*

Ischemie srdečního svalu je způsobena nepoměrem mezi zásobením myokardu kyslíkem a spotřebou kyslíku. Etiopatogeneticky se na ischemii podílí vedle stupně zúžení cévy rovněž porucha vazodilatace či abnormální vazokonstrikce věnčitých tepen a nasedající koronární trombóza. Za fyziologických podmínek při zvýšení spotřeby kyslíku myokardem dokáže vazodilatace zvýšit průtok koronárním řečištěm (koronární rezerva). Porušení rovnováhy mechanismů ovlivňujících průtok různými částmi koronárního řečiště se může projevit konkrétními klinickými manifestacemi. Vazoaktivitu věnčitých tepen ovlivňuje řada látek pocházejících z různých zdrojů. Jedná se o látky volně cirkulující v krevním řečišti i látky tvořené v krevních elementech (například v krevních destičkách) či v endoteliálních buňkách. Nejčastější příčinou ischemie myokardu je ateroskleróza koronárních tepen. Mezi méně časté příčiny ischemie myokardu patří například embolie do koronární tepny, spazmy koronární, vaskulitidy, vrozené anomálie koronárních tepen. Rozlišujeme několik klinických forem ischemické choroby srdeční - první skupinu představují akutní formy ischemické choroby srdeční, druhou skupinu pak formy chronické a poslední skupinu tzv. zvláštní formy ischemické choroby srdeční. Mezi akutní formy se řadí náhlá srdeční smrt v důsledku myokardiální ischemie a akutní koronární syndromy (s elevacemi ST úseků nebo bez elevací ST úseků). Hovoříme-li o chronických formách, máme na mysli stabilní anginu pectoris, němou ischemii myokardu, stavy po proběhlém myokardiálním infarktu, které mohou být provázeny srdečním selháváním či poruchami srdečního rytmu, anginu pectoris s normálním koronarogramem, syndrom X či mikrovaskulární anginu pectoris. Mezi tzv. zvláštní formy patří variantní (vazospastická) angina pectoris, poinfarktová angina pectoris či recidiva anginózní symptomatologie po předchozí koronární intervenci (ať už chirurgické či endovaskulární).⁽¹⁾

2.2. *Akutní koronární syndromy:*

2.2.1. *Definice:*

Pod pojmem akutní koronární syndromy se rozumí všechny stavy patofyziologicky spojené s nestabilním plátem a na něj nasedající trombózou v koronární cévě. Infarkt myokardu je definován jako akutní ložisková ischemická nekróza myokardu vzniklá na podkladě náhlého

uzávěru či progresivního zúžení věnčité tepny. Ve více než v 90% je příčinou koronární ateroskleróza s rupturou intimy a nasedající trombózou. V časně fázi dle EKG nálezu rozlišujeme dvě hlavní skupiny akutních koronárních syndromů s ST elevacemi či bez ST elevací na EKG. Akutní infarkt myokardu je definován jako typický vzestup/anebo pokles kardiomarkerů (troponin, CK-MB frakce) při současné přítomnosti alespoň jednoho z následujících kritérií: 1) klinické příznaky ischemie, 2) EKG změny, 3) průkaz nové regionální poruchy kinetiky nebo nové ztráty viability myokardu zobrazovací metodou, průkaz koronárního trombu (angiograficky či sekčně), 4) souvislost s předchozí revaskularizací (PCI, aortokoronární bypass).⁽²⁾ Nyní nejnovější používanou definicí je třetí univerzální definice infarktu myokardu (která byla prezentována na sjezdu Evropské Kardiologické Společnosti v Mnichově 2012 a je součástí doporučených postupů kardiologických společností) – patologicky definuje myokardiální infarkt jako nekrózu myokardiálních buněk v důsledku protrahované ischemie. Kritéria akutního myokardiálního infarktu zůstávají prakticky stejná – průkaz typického vzestupu anebo poklesu kardiomarkerů (preferenčně troponinu) provázený alespoň jedním z následujících znaků (symptomy ischemie, nové ischemické změny na EKG, nová regionální porucha kinetiky či ztráta viability srdečního svalu, intrakoronární trombus nalezený při nekropsii či angiografickém vyšetření). Univerzální klasifikace infarktu myokardu rozlišuje 5 typů myokardiálního infarktu. Typ 1 spontánní myokardiální infarkt při nestabilním aterosklerotickém plátu a nasedající intrakoronární trombóze, typ 2 v důsledku nerovnováhy mezi nároky a zásobením myokardu kyslíkem (v důsledku endoteliální dysfunkce, koronárního spazmu či embolizace do koronárního řečiště, arytmií, hypo- či hypertenze s nebo bez hypertofie myokardu, respiračního selhání, sepse ...), typ 3 náhlá srdeční smrt s ischemickými změnami na EKG s nevyšetřenými hodnotami kardiomarkerů, typ 4 po předchozí endovaskulární koronární intervenci a typ 5 po chirurgické revaskularizaci myokardu. Tato definice hovoří ještě o 3 dalších speciálních typech – reinfarkt (do 28 dní od předchozí ischemické příhody), rekurující myokardiální infarkt (po 28 dnech od předchozí příhody), „němý“ myokardiální infarkt (asymptomatictí nemocní s typickými ischemickými změnami na EKG či na zobrazovacích metodách).⁽³⁾

2.2.2. Etiopatogeneze:

V současné době je ateroskleróza považována za primárně zánětlivé onemocnění charakterizované specifickými buněčnými reakcemi a změnami v cévní stěně. Dochází buď k

postupnému pomalému zvětšování lézí s postupným zužováním koronárního lumina (klinicky se manifestující zpravidla jako chronická stabilní angina pectoris) anebo na vulnerabilní plát v cévě nasedá trombus (a rozvíjí se akutní koronární syndrom). Vulnerabilní aterosklerotický plát je považován za hlavní patofyziologický podklad vzniku akutních koronárních syndromů. Jako vulnerabilní plát potom označujeme plát s takovými histologickými změnami, které jsou charakteristické pro zvýšené riziko ruptury (velké lipidové jádro, tenká fibrózní čepička, velké množství zánětlivých elementů a přítomnost kalcifikací, pozitivní remodelace a přítomnost krvácení, ateromatózní hmota obsahující velké množství makrofágů a tkáňového faktoru, který je vysoce trombogenní a spouští koagulační kaskádu). Ruptura plátu pak vzniká z vnitřních a zevních příčin, kdy právě ty vnitřní jsou dány histologickým složením plátu.⁽²⁾ Nestabilní plát nemusí být hemodynamicky významný. U všech forem akutních koronárních syndromů dochází k různému stupni koronární trombózy (trombus neokluzivní či okluzivní v závislosti na poměru prokoagulačních a protikoagulačních mechanismů), prvotním impulzem je ruptura koronárního plátu (část ruptur koronárních plátů ovšem probíhá zcela asymptoticky a hojí se jizvou). Na tvorbě trombu na nestabilním aterosklerotickém plátu se podílí celá řada působků a buněk – vytvořené oxidované formy LDL způsobují apoptózu monocytů, makrofágy vlivem účinku oxidovaných forem LDL produkují metaloproteinázy a právě zánět v oblasti plátu (s tenkou fibrózní čepičkou, která jej dělí od cirkulující krve) a produkce metaloproteináz jsou dávány do souvislosti s rupturou těchto plátů. Při ruptuře plátu se uvolňuje tkáňový faktor, který aktivuje koagulační kaskádu.⁽¹⁾

2.2.3. Léčebná strategie:

Diagnostické a léčebné algoritmy u pacientů s akutními koronárními syndromy se odvíjejí od nálezu na vstupní EKG křivce. Základem léčby akutního koronárního syndromu s ST elevacemi je časná reperfúze. Léčba nemocného se STEMI zahrnuje přednemocniční opatření, vlastní koronární intervenci (přímá koronární angioplastika), léčbu na jednotce intenzivní péče a posléze na standardním oddělení s následnou dlouhodobou medikamentózní léčbou a kontrolou rizikových faktorů ambulantně.⁽¹⁾ V přednemocniční fázi velkou roli hraje podání antitrombotické a antikoagulační léčby, nutná je rovněž analgetická terapie. Dále je nutná znalost řešení možných komplikací souvisejících s akutními koronárními syndromy (srdeční selhání, kardiogenní šok, oběhové zhroucení, arytmie...). Každý nemocný se STEMI by měl být indikován k reperfúzní léčbě, studie potvrzují přednosti

přímé koronární angioplastiky.^(1,4) U pacientů s akutními koronárními syndromy bez ST elevací je urgentní koronarografie indikovaná v případě vysokého rizika (u pacientů s přetrvávající anginou pectoris a dynamickými změnami ST úseků, hemodynamickou nestabilitou, srdečním selháním, život ohrožujícími arytmiemi), časná koronarografie (do 72hod od vzniku obtíží) potom u nemocných se středním rizikem (nad 70let, s již známou anamnézou ischemické choroby srdeční, předcházející protrahovaná či klidová bolest na hrudníku již odeznělá, abnormity repolarizace na EKG, mírná pozitivita troponinu). Iniciální zajištění pacienta s akutním koronárním syndromem spočívá v kontinuální monitoraci EKG a vitálních funkcí, podání analgosedace (opiáty), antiagregační terapie (kyselina acetylsalicylová, v indikovaných případech clopidogrel/prasugrel/ticagrelol), antikoagulace (heparin, nízkomolekulární heparin, fondaparinux, bivalirudin).⁽²⁾

2.3. Chronická ischemická choroba srdeční

2.3.1. Definice, patofyziologie, klinika:

Mezi nejčastější příčiny patří koronární ateroskleróza. Aterosklerotický proces je komplexní proces, jehož příčina není zcela známá. Mezi hlavní rizikové faktory patří pozitivní rodinná anamnéza výskytu kardiovaskulárních chorob, kouření, obezita, diabetes mellitus, hyperlipidémie, arteriální hypertenze.⁽¹⁾

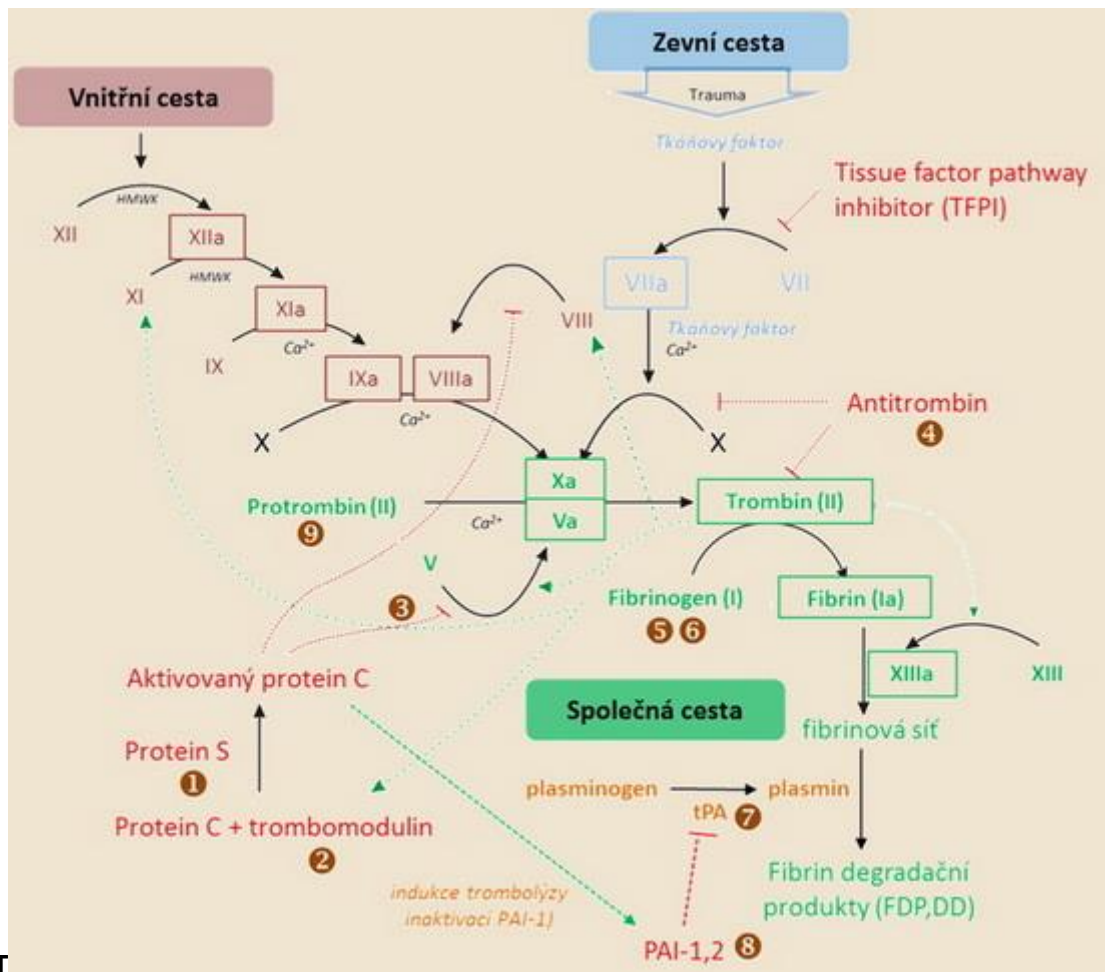
2.3.2. Prevence a léčebná strategie:

Prognóza je závislá zejména na závažnosti dysfunkce LK a na závažnosti koronárního postižení. Farmakoterapie dokáže ovlivnit prognózu i symptomy. Základem léčby zůstává farmakoterapie a revaskularizace.⁽¹⁾ Standardně jsou ischemici léčeni nízkými dávkami kyseliny acetylosalicylové, statiny, inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu a betablokátory.

3. KOAGULAČNÍ KASKÁDA

Společným patofyziologickým mechanismem koronárních syndromů je vznik různého stupně koronární trombózy nasedající na rupturu aterosklerotického plátu. Pokud dojde k ruptuře aterosklerotického plátu, je uvolňováno velké množství tkáňového faktoru, který zahajuje aktivaci koagulační kaskády.⁽¹⁾ Aktivace koagulační kaskády může probíhat dvěma směry. V případě, že je spouštěcím mechanismem reakce na abnormální cévní stěnu nebo omezení toku krve, potom se uplatňuje tzv. vnitřní systém, v případě, že je mechanismem poškození tkání, pak se uplatňuje cesta zevní. Oba systémy se potom sbíhají do společného systému, který pak vede k tvorbě fibrinové zátky. Jde o reparační ochranný mechanismus, který při nepoměru mezi pro a protikoagulačními pochody je patologicky vystupňován až do kompletní obliterace cévy. V zevním systému při poškození cévní stěny se plazma dostává do styku s tkáňovým faktorem, který je kofaktorem faktoru VII v reakci při níž je aktivován faktor X. Vnitřní cesta začíná stykem s „aktivačním povrchem“ – kterým je např. obnažený kolagen stěny cévní, při styku dojde k aktivaci faktoru XII proteolytickým působením kalikreinu. Aktivovaný faktor XII dále aktivuje faktor IX, kromě toho štěpí prekalikrein na kalikrein a z kininogenu uvolňuje vazodilatačně působící bradykinin. Aktivovaný faktor IX v reakci, ve které jsou kofaktorem ionty vápníku a aktivovaný faktor VIII, aktivuje faktor X. Poté už koagulační kaskáda pokračuje společnou cestou. Aktivovaný faktor X štěpí protrombin na trombin, aktivace probíhá na povrchu aktivovaných destiček a vyžaduje vznik protrombinázového komplexu - aktivátoru protrombinu, který se skládá z destičkových fosfolipidů, iontů kalcia, aktivovaného faktoru V, X a protrombinu. Aktivovaný trombin štěpí fibrinogen na monomery, které polymerizují, aktivují faktor XIII, který stabilizuje vzniklou sraženinu. Proces srážení je regulován, trombin se váže na trombomodulin na povrchu endotelových buněk, což aktivuje protein C, který spolu s proteinem S degraduje aktivovaný faktor V a VIII. Nejvýznamnějším inhibítozem trombinu v plazmě je antitrombin, který rovněž inaktivuje faktory IX, X, XI, XII. Plazmin degraduje fibrinogen a fibrin. Známe dva modely spouštění koagulační kaskády cestou tkáňového faktoru – spouštění extravaskulárně uloženým tkáňovým faktorem (prosakování srážecích faktorů z krve do cévní stěny nebo únik po minimálním poranění cévy) či intravaskulární aktivace tkáňovým faktorem (srážecí kaskáda je spouštěna cirkulujícím tkáňovým faktorem, který je v malém množství přítomen v krvi, většinou z prasklého plátu). Schema zobrazeno na obrázku 1.

Obrázek 1 (převzato z cmp-manual.wbs.cz) :



T

Legenda:

TFPI – tissue factor pathway inhibitor (inhibitor tkáňového faktoru)

tPA – tkáňový aktivátor plazminogenu

PAI – inhibitor aktivátoru plazminogenu

FDP – fibrin degradační produkty

DD – d-dimery

4. TKÁŇOVÝ FAKTOR A ATEROTROMBÓZA:

Tkáňový faktor je transmembránový lipoprotein a je klíčovou molekulou v aktivaci koagulační kaskády. Má krátkou cytoplazmatickou a transmembránovou doménu a dlouhou doménu extracelulární, která tvoří komplex s faktorem VII/VIIa a následně aktivuje faktory X,IX. TF je tvořen monocyty, fibroblasty, destičkami, v jádru plátu makrofágy, při stimulaci je exprimován na povrchu endotelií, monocytů, subendoteliálně uložených myocytů a fibroblastů⁽⁵⁾ a v řadě jiných buněk. V normálních tepnách se tvoří pouze v adventicii⁽⁶⁾ a malé množství cirkulujícího tkáňového faktoru je přítomno v plné krvi a v séru zdravých osob.⁽⁷⁾ Má rovněž nezastupitelnou roli v signálních cestách, podílí se na regulaci různých buněčných funkcí a patofyziologických procesů.⁽⁸⁾ V krvi je část aktivního TF vázáno na fragmenty membrán - TF cirkulující v této podobě má vysokou prokoagulační aktivitu,⁽⁹⁾ zatímco solubilní TF je inaktivní.⁽¹⁰⁾ Infiltrace intimálních vrstev monocyty a jejich transformace na makrofágy a pěnové buňky reprezentuje zánětlivý původ aterosklerozy, tvorba zánětlivých cytokinů jako TNF- α a interleukinů vede k uvolnění a zvýšení indukce exprese TF. U pacientů s akutními koronárními syndromy jsou popisovány zvýšené hladiny TF.^(11,12) Plazmatické hladiny TF mají tendenci k nesignifikantnímu poklesu sedmý den akutního koronárního syndromu.⁽¹³⁾ TF může sloužit jako prognostický marker u pacientů s myokardiálním infarktem.⁽¹⁴⁻¹⁸⁾ Zvýšené množství mikroparticulí s TF bylo nalezeno u pacientů se STEMI v místě okluze koronární cévy⁽¹⁹⁾ a aktivita TF koreluje se selháním fibrinolýzy u těchto pacientů.⁽²⁰⁾ Inhibitor tkáňového faktoru (TFPI) zajišťuje regulaci koagulačních mechanismů. TFPI je proteázový inhibitor, který blokuje jak fXa tak komplex TF/VIIa⁽²¹⁾, je syntetizován endotelovými buňkami a je přítomen buď na endotelovém povrchu nebo v malém množství stádná v destičkových granulích.^(22,23) TFPI je v malých koncentracích rovněž přítomen volně v plazmě nebo ve vazbě na lipoproteiny.⁽²⁴⁾

5. DESTIČKY, JEJICH FUNKCE A ROLE V PROCESU HEMOSTÁZY A (ATERO)TROMBÓZY

Trombocyty jsou nejmenší bezjaderné krevní elementy, které mají ale nezastupitelnou roli v procesu hemostázy a hemokoagulace. Patofyziologicky hrají rovněž jednu z rolí v procesu aterotrombózy.⁽²⁵⁾ Iničiálním krokem primární hemostázy je adheze trombocytů k extracelulární matrix.^(26,27) V místě poškození endotelu dochází k interakci mezi destičkovým glykoproteinovým integrinovým receptorem Ib, von Willebrandtovým faktorem a kolagenem.^(1,26) Krevní destičky jsou aktivovány celou řadou slabých či silných aktivátorů.⁽¹⁾ Silnými aktivátory jsou kolagen, adenosindifosfát, tromboxan A₂, slabými aktivátory jsou epinefrin, serotonin či platelet activating factor.^(1,26-30) Aktivované destičky mění tvar, exprimují prozánětlivé molekuly (P-selektin, solubilní ligandu CD 40).⁽²⁶⁾ Všechny tyto cesty vedou k externalizaci destičkového receptoru IIb/IIIa, který má klíčovou roli pro agregaci. Navázáním na fibrinogen dochází k agregaci a ke vzniku tzv. bílého trombu, který se následně mění na červený v důsledku vzniku fibrinového polymeru a účasti ostatních cirkulujících krevních elementů.⁽¹⁾ Cesty aktivace trombocytů jsou různé. ADP je ve vysokých koncentracích střádán v denzích granulech trombocytů, ze kterých se uvolňuje v průběhu destičkové aktivace, uvolnění tromboxanu A₂ adherujícími destičkami dále agregaci potencuje. Kolagen je silně trombogenním substrátem, destičky adherují díky vazbě von Willebrandtova faktoru (zachyceného na povrchu aktivovaných destiček či na kolagenu) na GP Ib, což vede k aktivaci IIb/IIIa receptoru.⁽²⁹⁾ Nejsilnějším aktivátorem destiček je trombin, jehož velmi nízké koncentrace stačí k aktivaci destiček.^(31,32) Trombin se váže na PAR-1 (protease activated) receptor na destičkovém povrchu.⁽³³⁻³⁷⁾ Aktivace destiček a koagulační kaskáda jsou dva spolu související procesy.^(38,39) Koagulační faktory se váží na destičkové receptory exprimované na povrchu destiček v průběhu aktivace trombocytů. ADP navíc stimuluje destičkovou prokoagulační aktivitu přes P₂Y₁ a P₂Y₁₂.⁽⁴⁰⁾ Sekreční produkty destiček potom přispívají k prokoagulační aktivitě (poskytují f V, VIII a fibrinogen).⁽³⁰⁾ Aktivované destičky exprimují vazebná místa pro f XI a protrombin a podílejí se tak na iniciaci koagulační kaskády.⁽²⁶⁾ Otázkou zůstává role zánětu ve vztahu k destičkové aktivitě, která dosud nebyla zcela objasněna.⁽⁴¹⁾ Destičky a některé jejich aktivátory mohou být ovlivněny zánětlivým procesem.⁽⁴²⁾ Složení aterosklerotického plátu může rovněž regulovat aktivaci destiček.⁽⁴³⁾ Při ruptuře plátu dochází k interakci mezi tkáňovým faktorem (trombogenicita koreluje s

obsahem tkáňového faktoru) a protékající krví, dochází k aktivaci koagulační kaskády.^(44,45) Makrofágy mohou být zdrojem cirkulujícího tkáňového faktoru. Stimulace Toll-like receptorů přítomných na destičkovém povrchu a v místech zánětu vede k aktivaci trombocytů.^(42,46) Zvýšené hladiny zánětlivých markerů (CRP, liganda CD40, interleukiny, TNF, adhezivní molekuly) jsou spojeny s horší prognózou u pacientů s koronárním postižením. Otázkou je souvislost mezi zvýšenými hladinami zánětlivých markerů a vysokou reziduální destičkovou aktivitou u pacientů s koronární aterosklerózou.⁽⁴⁷⁾ Byl popsán možný vztah mezi nedostatečnou supresí destičkové aktivity při terapii kyselinou acetylsalicylovou a časným uzávěrem žilního bypassu po chirurgické revaskularizaci⁽⁴⁸⁾ Snaha o zlepšení průchodnosti bypassu použitím aprotininu byla spojena se snížením výskytu pooperačně popisované “rezistence na ASA” a současně se snížením reaktivity destiček na trombin a snížením aktivity tkáňového faktoru.⁽⁴⁸⁾ To by mohlo svědčit o možném vztahu mezi vysokou reziduální destičkovou aktivitou (při ASA terapii) a aktivitou tkáňového faktoru.

6. PROTIDESTIČKOVÁ TERAPIE

Nezastupitelnou úlohu v primární i v sekundární prevenci ischemické choroby srdeční má antiagregační terapie.

6.1. *Kyselina acetylsalicylová*

Kyselina acetylsalicylová patří mezi nejstarší a nejčastěji používané látky s antiagregačním efektem v kardiologické praxi. Salicylová kyselina byla objevena v roce 1838, ale měla řadu nežádoucích efektů, pro které nebyla široce používána. Kyselina acetylsalicylová (stabilní a lépe tolerovaná forma kyseliny salicylové) byla v roce 1899 nazvána Aspirinem. Antiagregační efekt ASA byl popsán v roce 1971. Byl popsán dvojí mechanismus antiagregačního efektu ASA - ve vysokých dávkách (nad 6 g denně) má ASA přímý hypoprotrombinový efekt, v nižších dávkách působí mechanismem irreverzibilní acetylace destičkové cyklooxygenázy.^(49,50) Vysoké dávky ASA mohou mít antitrombotický účinek rovněž jinými mechanismy – posílením fibrinolytické aktivity, zlepšením endoteliální funkce a obecně protizánětlivým účinkem. V osmdesátých letech minulého století byly objeveny dvě izoformy COX - COX-1 a COX-2. ASA je neselektivním inhibitorem obou izoform COX^(49,50) (kdy citlivost COX-2 k ASA je 170× menší v porovnání s COX-1).^(50,51) Acetylsalicylová kyselina irreverzibilně inhibuje acetylaci cyklooxygenázu-1, čímž blokuje produkci tromboxanu A₂⁽²⁶⁾ (cyklooxygenáza katalyzuje transformaci kyseliny arachidonové uvolněné z fosfolipidové vrstvy buněčné membrány endotelií na intermediární produkt prostaglandin H₂, následně se tento meziprodukt přetváří působením tromboxansyntetázy na tromboxan A₂, který je mohutným induktorem agregace trombocytů). Aktivita COX se restituuje až s novotvorbou trombocytů. Aspirin ve vysokých dávkách inhibuje rovněž cyklooxygenázu-2 a tím působí protizánětlivě. Tento izoenzym (COX-2) se stává aktivním zejména po zánětlivé aktivaci endotelu nebo v situacích zvýšeného obratu trombocytů. ASA minimálně blokuje jiné cesty destičkové aktivity.⁽²⁶⁾ Tvorbu tromboxanu A₂ kompletně zablokuje jednorázová dávka 160mg ASA či chronické užívání dávky 75mg/den.⁽⁵²⁾ Klinické studie dokumentují benefit ASA v terapii akutních koronárních syndromů, u pacientů podstupujících perkutánní koronární intervence a v primární a sekundární prevenci ischemických příhod. Physician's Health Study v letech 1988–1989 prokázala 44% snížení incidence prvního infarktu myokardu u mužů

léčených aspirinem proti placebo.^(50,53) Podávání ASA u pacientů s akutním infarktem myokardu snižuje mortalitu o 23 % (ISIS-2).^(50,53) V sekundární prevenci ischemické choroby srdeční ASA snižuje riziko vaskulárních příhod o 23 % u osob s vysokým kardiovaskulárním rizikem.^(50,53) Metaanalýzy u pacientů s akutním infarktem myokardu prokázaly přibližně 25% snížení závažných vaskulárních komplikací.⁽⁵⁴⁾ Účinnost kyseliny acetylsalicylové v primární prevenci koronárních příhod testovalo 5 velkých studií.⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾ V žádné ze studií nedošlo vlivem podávání ASA k poklesu mortality nebo rizika cerebrovaskulárních příhod. Na druhé straně žádná z těchto studií neměla dostatečnou statistickou sílu. Podle metaanalýzy těchto studií léčba ASA snižuje riziko kardiovaskulární příhody, ale je spojena se zvýšením rizika krvácení. Efekt ASA v sekundární prevenci byl ověřován řadou randomizovaných multicentrických studií. Metaanalýza odborníků z Antithrombotic Trialist's Collaboration analyzovala data od více než 200 000 pacientů randomizovaných do studií do roku 1997. Antitrombotická léčba (převážně ASA) vedla k 25% redukci incidence významné vaskulární příhody u širokého spektra pacientů (s předchozím akutním koronárním syndromem, mozkovou příhodou, ale i u pacientů se stabilní anginou pectoris, ischemickou chorobou dolních končetin, s diabetem mellitem i s fibrilací síní). Data metaanalýzy upozornila na srovnatelnou efektivitu nízkých a vysokých dávek ASA v dlouhodobé léčbě.

6.2. Thienopyridiny

U pacientů se STEMI (podstupujících PCI) mají nezastupitelnou roli thienopyridiny a zejména pak duální antiagregace (kombinace ASA a thienopyridinu).⁽⁵⁴⁾ Mechanismem účinku je blokáda vazby adenosindifosfátu na destičkový receptor, která brání aktivaci destičky. Antagonisté P_{2Y₁₂} ADP receptoru blokují agregaci destiček zprostředkovanou ADP. Tato skupina léků zahrnuje ticlopidin a clopidogrel.⁽²⁶⁾ Účinnost těchto léků byla demonstrována v řadě studií. Ticlopidin a clopidogrel jsou selektivními inhibitory ADP indukované agregace trombocytů, neovlivňují metabolismus kyseliny arachidonové. Oba léky se metabolizují v játrech na aktivní metabolity, které irreverzibilně blokují receptory P_{2Y₁₂}.⁽⁵⁹⁾ Po ticlopidinu byly popsány případy život ohrožující neutropenie, proto byl nahrazen clopidogrelem. Clopidogrel patří mezi tzv. prodrug – aktivován je prostřednictvím cytochromu P-450 v játrech. Hladiny aktivního metabolitu v séru několik hodin po požití značně kolísají, což souvisí s mírou aktivity hepatického cytochromu P-450 3A4. Účinek clopidogrelu je

zprostředkován P2 receptory na povrchu destiček (konkrétně přes receptor P2Y₁₂), nezasahuje do procesů mobilizace intracelulárního kalcia ani neovlivňuje změnu tvaru trombocytů ADP indukovanou, přechodně může snižovat agregaci indukovanou trombinem či kolagenem. Do skupiny tzv. nových thienopyridinů patří prasugrel, který je rovněž v játrech metabolizován na aktivní formu, která blokuje P2Y₁₂ receptor. Je účinnější než clopidogrel, s rychlejším nástupem protideštičkového účinku a jeho delším trváním.⁽⁵⁹⁾ Bývá popisována menší variabilita v destičkové odpovědi než po podání clopidogrelu.⁽⁵⁹⁾ Cangrelor je P2Y₁₂ antagonistou pro i.v. podání, má rychlý nástup účinku a působí reverzibilně, nevyžaduje přeměnu na aktivní metabolit v játrech. Více bude uvedeno v dalším textu.

6.3. Nové protideštičkové léky (blokátory P2Y₁₂ receptoru)

Limitace známých protideštičkových léků (nedostatečný efekt a rekurence trombotických příhod, riziko krvácivých komplikací při chirurgii při irreverzibilním účinku, ...) vedla ke hledání nových léků s antiagregačním účinkem.⁽⁵⁴⁾ Vzhledem k vysoké interindividuální variabilitě v odpovědi na clopidogrel, k pomalému nástupu jeho účinku a k nutnosti konverze na aktivní metabolit byly vyvinuty nové inhibitory ADP receptoru. Mezi které patří prasugrel (řazený do skupiny thienopyridinů), cangrelor a ticagrelor, které jsou řazeny mezi tzv. nonthienopyridiny. Prasugrel a ticagrelor bývají označovány jako inhibitory P2Y₁₂ 3.generace, přestože jejich působení je rozdílné. Prasugrel je prodrug vyžadující přeměnu na aktivní metabolit v játrech, ale proces enzymatické přeměny je pouze jednostupňový a lépe predikovatelný než u clopidogrelu. Maximální inhibice destičkové aktivity je dosaženo za 2-4 hodiny po podání, inhibice destičkové aktivity trvá 5-7 dní.⁽⁶⁰⁾ Ticagrelor je již aktivní látkou, po vstřebání přímo a reverzibilně inhibuje destičkovou aktivitu, maximální inhibice destičkové aktivity je dosaženo za 1-3 hod po podání, plazmatický poločas je 6-13 h, proto se ticagrelor podává 2x denně. Po vysazení ticagreloru se destičková aktivita vrací k normě v průběhu 120-168 h.⁽⁶⁰⁾

6.3.1. Klinická účinnost/bezpečnost nových protideštičkových léků (prasugrel, ticagrelor) v léčbě akutních koronárních syndromů

Oba léky (prasugrel i ticagrelor) jsou z hlediska klinické účinnosti v léčbě akutních koronárních syndromů srovnatelné (studie TRITON-TIMI 38, PLATO).⁽⁶⁰⁾ Liší se z hlediska bezpečnosti

léčby (krvácivého rizika). Riziko závažného krvácení nesouvisející se srdeční operací je podobné pro oba léky, ale při srdeční operaci se zdá výhodnější podávání ticagreloru, léčba ticagrelorem ve srovnání s prasugrelem nezvyšovala pravděpodobnost vážného krvácení při kardiologickém výkonu. Je popisováno více fatálních krvácivých komplikací při léčbě prasugrelem.⁽⁶⁰⁾ Ticagrelor na rozdíl od prasugrelu vedl ke snížení kardiovaskulární a celkové mortality.⁽⁶⁰⁾ Prasugrel se zdá vysoce efektivním v akutní fázi koronárního syndromu (prvních 30dní), u ticagreloru (studie PLATO) je snížení výskytu ischemických příhod prokazatelné jak v prvních 30 dnech, tak mezi 30. dnem a 12. měsícem koronárního syndromu.

6.3.2. Prasugrel

Výhodou v porovnání s clopidogrelem je popisovaný rychlejší nástup účinku, inhibice destičkových funkcí s nižším stupněm variability v odpovědi. Nevýhodou prasugrelu je popisované vyšší riziko krvácivých komplikací ve srovnání s ostatními thienopyridiny. Popisované výhody prasugrelu v porovnání s clopidogrelem souvisí s jeho chemickou strukturou, která umožňuje konverzi na aktivní metabolit méně závislou na CYP450. Aktivní metabolit prasugrelu se v cirkulaci objevuje již za 15 min po podání a maximálních plazmatických koncentrací dosahuje v 30 minutách po podání, je popisována vyšší míra inhibice trombocytů, rychlejší a vyšší stupeň inhibice destičkové aktivity po podání loading dose 60mg a následné udržovací dávky 10mg v porovnání s clopidogrelem, minimální vliv genotypu CYP a tudíž menší interindividuální variabilita.⁽⁶¹⁾ S ohledem na lepší farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti má prasugrel lepší klinické výsledky v porovnání s clopidogrelem (popsané např. klinickou studií TRITON TIMI 38). Z použití prasugrelu by mohli profitovat vysoce riziková pacienta. Na druhé straně riziková pro podání prasugrelu jsou pacienti s předchozí cévní mozkovou příhodou, nad 75let, s hmotností pod 60kg.⁽⁶¹⁾ Aktivní metabolit jak clopidogrelu tak prasugrelu má stejnou účinnost popisovanou v in vitro studiích. Rozdílnou klinickou účinnost clopidogrelu a prasugrelu nevysvětlíme rozdílnou aktivitou metabolitů, rozdíl je ve farmakokinetice.⁽⁶¹⁾ Použití prasugrelu ale neřeší problém irreverzibility blokády destičkových funkcí (stejně jako clopidogrel je i prasugrel irreverzibilním inhibitorem destičkových funkcí), což je problematické zejména u pacientů podstupujících urgentní chirurgický výkon.⁽⁶¹⁾ V průběhu léčby prasugrelem byl popsán vyšší výskyt tumorů.⁽⁶⁰⁾

6.3.3. Ticagrelor a Cangrelor

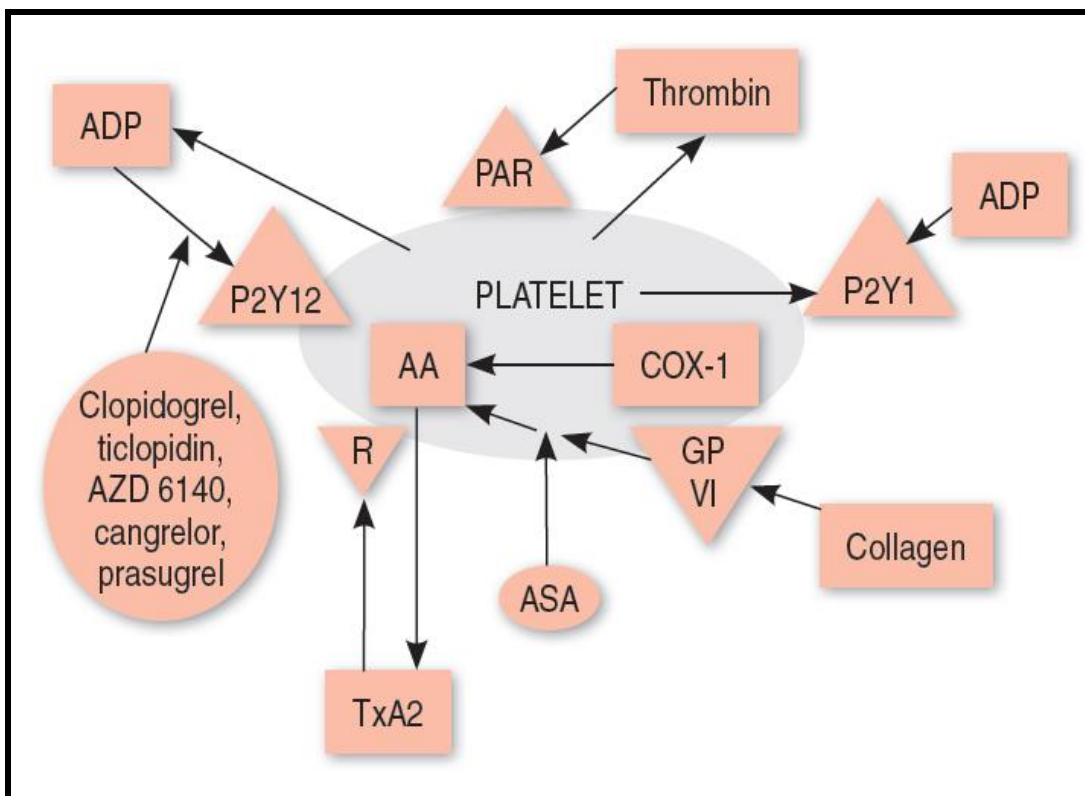
Patří mezi přímé reverzibilní antagonisty P2Y₁₂ receptoru, jsou charakterizovány rychlým nástupem účinku a reverzibilitou destičkové inhibice. Cangrelor je lékem pro intravenózní použití. Rychlý nástup účinku souvisí s tím, že nevyžaduje konverzi na aktivní metabolit. Cangrelor patří do skupiny antagonistů ADP a vykazuje vysokou afinitu k receptorům P2Y₁₂. Je potentním inhibítozem ADP indukované agregace trombocytů, nevyžaduje konverzi na aktivní metabolit, po intravenózním podání je aktivní a jeho biologický poločas je 3-6min.⁽⁶¹⁾ Výhodou je reverzibilita blokády destičkové aktivity, reverzibilita účinku v průběhu 20min po ukončení infúze. Použití cangreloru u pacientů podstupujících urgentní chirurgické zákroky je předmětem dalších studií. U pacientů podstupujících PCI není cangrelor nadřazený clopidogrelu.⁽⁶¹⁾ Ticagrelor je perorálním inhibítozem P2Y₁₂ receptoru, existují data, že ticagrelor snižuje incidenci MACE. Patří do skupiny cyklo-pentyl-triazolo-pyrimidinů. Ticagrelor je méně potentním antagonistou P2Y₁₂ receptorů než cangrelor, ve srovnání s clopidogrelem ale i ticagrelor má popisovaný rychlejší nástup požadovaného inhibičního efektu a menší variabilitu v destičkové odpovědi. Mezi nežádoucí efekty ticagreloru patří vyšší krvácivé riziko, bývá udávaná častější dušnost a bradykardie.⁽⁶¹⁾ Elinogrel je reverzibilním P2Y₁₂ inhibítozem jak pro perorální tak pro intravenózní podání, bez jasných klinicky dokumentovaných závažných nežádoucích účinků.⁽⁶¹⁾ Biologický poločas elinogrelu se udává 12h. Otázkou možnosti použití elinogrelu v klinické praxi se zabývají klinické studie (ERASE-MI, INNOVATE-PCI).⁽⁶¹⁾

6.4. IIb/IIIa blokátory

Dalším mechanismem inhibice destičkové agregace je blokáda interakce mezi fibrinogenem a IIb/IIIa glykoproteinovými receptory. GP IIb/IIIa receptory mají svou roli ve finální části cesty destičkové agregace. Mezi používané léky z této skupiny patří abciximab, eptifibatid, tirofiban (všechny pro intravenózní podání). Prvním blokátorem IIb/IIIa receptorů pro klinické použití byl abciximab. Abciximab je fragmentem rekombinantních chimerických monoklonálních protilátek, které inhibují GP IIb/IIIa receptory v závislosti na dávce.⁽⁶²⁾ Nevýhodou abciximabu je potenciální imunogenicita a irreverzibilita efektu. Proto byly vyvinuty mikromolekulární inhibitory IIb/IIIa receptorů (eptifibatid, tirofiban), které nemají takový imunogenní potenciál. I přesto je abciximab dosud nejúčinnější inhibitor destičkových funkcí, má mimo antiagregačních vlastností i některé další příznivé účinky a minimální krvácivé komplikace, jeho účinek trvá po dobu života destiček, okamžitě se vyloučí a nemá žádnou reziduální hladinu v krvi, proto jej lze zrušit náplavem destiček. Naproti tomu eptifibatid a tirofiban působí jen po dobu infuze a když mají dostatečnou hladinu, jsou podstatně méně účinné a jejich účinek nelze zrušit náplavem destiček. Velké klinické studie popsaly jasný klinický efekt těchto intravenózních léků ve snížení ischemických příhod u akutních koronárních syndromů, ale byly popsány i nežádoucí efekty v podobě trombotických či krvácivých komplikací.⁽⁶²⁾ Bylo popsáno zlepšení výsledků při použití blokátorů glykoproteinových receptorů u pacientů s koronárními syndromy⁽⁵⁴⁾, snižují incidenci úmrtí či rekurence myokardiálního infarktu u vysoce rizikových pacientů podstupujících PCI.⁽⁵²⁾ Metaanalýza 11 klinických studií zahrnujících 27 115 pacientů se STEMI ukázala, že podání abciximabu snížilo rekurenci infarktu ve 30 dnech, ale nebylo prokázáno 30-denní ani jednoroční snížení mortality (s výjimkou pacientů podstupujících primární koronární angioplastiku).⁽⁵⁴⁾ Použitím GP inhibitorů u pacientů s akutními koronárními syndromy bez ST elevací se zabývaly velké klinické studie. GUSTO-IV-ACS (na 7800 pacientech s akutními koronárními syndromy bez ST elevací, nepodstupujících koronární intervenci) neprokázala benefit z podávání abciximabu. PURSUIT studie prokázala snížení 30-denní mortality či nefatálního myokardiálního infarktu u pacientů s akutními koronárními syndromy bez ST elevací léčených eptifibatidem. Bylo popsáno zlepšení klinických výstupů při podání GP inhibitorů u pacientů podstupujících koronární angioplastiku (ISAR-REACT 2, ESPRIT, TARGET).⁽⁵⁴⁾ IIb/IIIa inhibitory ztratily širší použití v

době možnosti duální antiagregační terapie, pro jejich podání ale zůstávají specifické indikace (průkaz intrakoronárního trombu, distální intrakoronární embolizace ...).

Schema mechanismů aktivace trombocytu a místa účinku jednotlivých protidestičkových léků



Vysvětlivky: ADP – adenosindifosfát, AA- kyselina arachidonová, GPVI-glykoprotein VI, TxA₂ - Tromboxan A₂, PAR-receptor pro trombin, P2Y₁₂, P2Y₁ – receptory pro ADP, COX-1 – cyklooxygenáza-1

7. REZISTENCE NA PROTIDESTIČKOVOU TERAPII X VYSOKÁ REZIDUÁLNÍ DESTIČKOVÁ AKTIVITA X NEÚČINNÁ PROTIDESTIČKOVÁ TERAPIE

7.1. *Definice*

V souvislosti s recidivami koronárních příhod navzdory zavedené antiagregační terapii se v literatuře objevil termín „aspirinová/clopidogrelová rezistence“. Pojem „rezistence“ se zdá být ovšem poněkud zavádějící, v současné době se častěji setkáváme s označením selhání protidestičkové léčby („treatment failure“) nebo vysoká reziduální destičková aktivita („high residual on-treatment reactivity“). Nelze říct, že vysoká reziduální destičková aktivita při terapii (zjištěná laboratorně) je projevem právě rezistence na daný lék. Je proto tolik problematické tento výše uvedený fenomén definovat. Můžeme hovořit o klinickém fenoménu, kdy i přes pravidelné užívání ASA (či clopidogrelu) dochází k rozvoji kardiovaskulárních trombotických příhod. Vedle klinické definice stojí definice laboratorní (kdy nedojde i přes podávání ASA či clopidogrelu k vyvolání požadovaného laboratorního efektu ve smyslu inhibice agregace trombocytů).^(51,59,63) O rezistenci na daný lék lze hovořit pouze v případě, že není dosaženo požadovaného farmakologického cíle. V případě aspirinu tedy o rezistenci můžeme hovořit pouze v případě, že není potlačena COX-1 indukovaná tvorba tromboxanu, u thienopyridinů potom, pokud selže schopnost blokovat P2Y₁₂ receptory.⁽⁶⁴⁾ Na základě výsledků laboratorního in vitro sledování destičkové aktivity můžeme pouze hovořit o nekompletní blokádě destičkových funkcí či o vysoké reziduální destičkové aktivitě při terapii.⁽⁶⁴⁾ Vysoká destičková aktivita při antiagregační terapii je spojována s vyšším kardiovaskulárním rizikem. Proběhla řada studií zabývajících se otázkou vysoké reziduální destičkové aktivity při terapii kyselinou acetylsalicylovou - byla stanovována její prevalence např. ve skupinách pacientů s ischemickou chorobou srdeční, po aortokoronárním bypassu či po cévní mozkové příhodě. Prevalence se lišila v závislosti na použité metodice sledování efektu protidestičkové terapie.⁽⁶⁵⁾ Clopidogrelová rezistence byla studována zejména u pacientů s akutním infarktem myokardu a koronární angioplastikou.

7.2. **Etiologie**

Etiologie nedostatečné efektivity protideštičkové terapie je komplexní. Faktory ovlivňující účinnost protideštičkové léčby můžeme rozdělit do tří základních skupin (genetické, buněčné a klinické). Z genetických faktorů ovlivňují ASA účinnost polymorfismy enzymů zúčastněných v metabolismu kyseliny arachidonové, polymorfismy destičkových glykoproteinových receptorů (GPIa/IIa, Ib/V/IX, IIb/III), polymorfismy kolagenového receptoru či receptoru pro von Willebrandtův faktor (vWf) či polymorfismy faktoru XIII (Val 34 Leu).^(51,53,63,66-67) Z buněčných faktorů jmenujme aktivaci trombocytů nezávislou na ASA (erytrocyty, trombinem, kolagenem, adrenalinem či ADP indukovanou), zvýšenou senzitivitu destiček na kolagen či ADP. Dalšími buněčnými faktory jsou overexprese COX-2 a COX-2 mRNA při zvýšeném obratu trombocytů (COX-2 je asi 170× méně citlivá vůči ASA než COX-1), tvorba prostaglandinů (8-iso-PGF) neenzymatickou peroxidací. Hladina resolvinů (metabolitů mastných kyselin), prostaglandinů (PGH₂) či regenerace COX-1 v jaderných buňkách rovněž ovlivňuje trombocytární reaktivitu.^(51,53,63,66-67) Z exogenních (klinických) faktorů nelze opomenout zejména nespolečnosti v terapii, lékové interakce (např. abúzus nesteroidních protizánětlivých léků, které interagují s vazebným místem pro ASA na COX-1), malabsorpci (jako příčinu snížené biologické dostupnosti léku).^(51,53,63,66-67) Rovněž fyzická zátěž, stres, poloha či cigaretový kouř mohou ovlivňovat trombocytární reaktivitu. Zvýšený obrat trombocytů (reakce na stres, stav po aortokoronárním bypassu atd.) vede k vyplavování většího počtu trombocytů dosud neovlivněných ASA. Z klinických faktorů nelze vyloučit ani možný vliv věku či pohlaví. U akutních koronárních syndromů je popisován hyperkoagulační stav spojený se sníženou odpovědí na antiagregační léky v prvních 7 dnech až 3 měsících po příhodě.⁽⁶³⁾ U pacientů s akutním koronárním syndromem, s hyperlipidemií, diabetem a u kuřáků byla vyšší reziduální destičková reaktivita při ASA terapii popisována častěji v porovnání se zdravými dobrovolníky. Ve čtyřletém sledování měly osoby s nedostatečně účinnou terapií ASA 88% incidenci kardiovaskulární příhody oproti 44% incidenci koronární příhody u ASA-respondérů.⁽⁶⁸⁾ Klinickou příčinou selhání terapie ASA je rovněž jiný patofyziologický podklad základního onemocnění (arteriitida, embolizace).^(51,53,63,66-67) Byla zvažována i souvislost ASA rezistence s nedostatečnou dávkou léku (nicméně tento fenomén byl popsán i při dávkách 1300mg ASA).⁽⁵³⁾ Stejně lze rozdělit faktory ovlivňující účinnost terapie clopidogrelem. Na faktory: genetické (polymorfismy CYP, polymorfismus GP Ia,

polymorfismus P2Y₁₂, polymorfismus GP IIIa), buněčné (akcelerovaný obrat trombocytů, snížená aktivita CYP 3A, up-regulace P2Y₁₂ a P2Y₁ receptorů, kolagenem, epinefrinem či trombinem indukovaná agregace) a klinické (malcompliance, malabsorpce, lékové interakce na úrovni CYP 3A4, komorbidity).⁽⁶⁹⁾ V současné době se zdá, že na významu nabývá sledování genetických aspektů destičkové reaktivity a to zejména u léků s popisovanou vysokou interindividuální variabilitou účinku (závislou na enzymatické aktivaci) jako je clopidogrel.⁽⁷⁰⁾ Během PCI dochází k poranění tepny, s následnou expresí tkáňového faktoru, který aktivuje koagulační kaskádu a indukuje tvorbu trombinu, proto lokální poranění cévy během PCI a tím spuštěná koagulační kaskáda může být jednou z možných příčin nedostatečné suprese destičkové aktivity protideštičkovými léky, které nejsou schopné potlačit takto indukovanou nadměrnou tvorbu trombinu.⁽⁷¹⁾ Některé choroby jsou provázeny větší destičkovou reaktivitou a popisovanou nedostatečnou účinností protideštičkové terapie – srdeční selhávání, arteriální hypertenze, zánětlivé choroby, diabetes mellitus (jedná se o stavy spojené se systémovou zánětlivou odpovědí a indukovaným hyperkoagulačním stavem). Ani navýšení dávky léku pak nemá na léčbu vliv, protože není schopno potlačit zánětlivým procesem spouštěnou aktivaci trombinu. Nelze vyloučit, že variabilita v destičkové odpovědi na protideštičkové léky může spíše souviset s rozdílnou „prahovou“ aktivitou destiček před léčbou, než že by byla zapříčiněna rozdílným účinkem vlastních protideštičkových léků.⁽⁷²⁾ Nebyl prokázán vztah mezi vyšší destičkovou reaktivitou a ukazateli aktivace koagulace (ukazateli fibrinolýzy či endotelové dysfunkce).⁽⁷²⁾ Nebylo prokázáno, že podávání některých léků (inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu, sartany či statiny) by ovlivňovalo výsledky testů destičkových funkcí.⁽⁷²⁾ Fenomén aspirinové rezistence je popisován rovněž v kardiouchirurgii – z analýzy menších prací vyplývá, že prevalence aspirinové rezistence klesá s dobou od operace, tudíž že se pravděpodobně jedná o přechodný fenomén navozený operačním výkonem.⁽⁷³⁾ Patogeneze aspirinové rezistence po CABG (aortokoronárním bypassu) souvisí s vlastním operačním výkonem a jedná se o získaný a přechodný stav. Mechanismem může být snížení biologické dostupnosti a ovlivnění funkce destiček a jejich interakce (mimotělní oběh, masivní regenerace destiček v prvních dnech po CABG, zvýšená produkce trombinu, vliv vysokých dávek heparinu).⁽⁷³⁾ Některé práce popisují zvýšené riziko trombotické okluze žilních bypassů u pacientů s prokázaným fenoménem rezistence. Aspirinová rezistence první pooperační den byla stanovena jako nezávislý prediktor trombózy žilního bypassu.⁽⁷³⁾ Méně dat již existuje o

vysoké reziduální destičkové aktivitě při duální antiagregační terapii (ASA+clopidogrel). Individuální odpověď na oba protideštičkové léky je heterogenní. Mechanismy zodpovídající za vysokou variabilitu zahrnují individuální variabilitu v prahové destičkové reaktivitě, genové polymorfismy a řadu klinických faktorů. Je popsáno, že pacienti, kteří vykazují vysokou reziduální destičkovou aktivitu při terapii clopidogrelem, vykazují zpravidla rovněž vysokou destičkovou reaktivitu i při terapii ASA. Vysvětlením by mohla být vzájemná závislost mezi jednotlivými cestami aktivace trombocytů (např. tvorba tromboxanu A2 potencovaná přes receptory P2Y₁₂), nebo prahový („baseline“) stav destičkové aktivity spojený s vyšší vstupní destičkovou reaktivitou u některých osob, popřípadě by vysvětlením daného faktu mohl být vyšší destičkový obrat.⁽⁷⁴⁾ Možnou cestou k překonání tohoto fenoménu je použití nových protideštičkových léků, vlastní navýšení dávky clopidogrelu zpravidla nepřináší požadovaný efekt, ale „léčebná“ strategie není dosud přesně známá. Vysoká reziduální destičková aktivita u pacientů na duální antiagregaci je považována za stav provázený vysokým kardiovaskulárním rizikem. Shrnutí výše v textu uvedených možných příčin vysoké reziduální destičkové reaktivity při protideštičkové terapii viz tabulka 1-3.

Tabulka 1: Přehled nejčastěji popisovaných tzv. endogenních příčin vysoké reziduální destičkové aktivity při terapii kyselinou acetylsalicylovou (podle 50)

Tabulka 1. Endogenní příčiny ASA rezistence	
BUNĚČNÉ	GENETICKÉ
cesty neblokované ASA (indukce agre-gace erythrocyty, trombinem, kolagenem, adrenalinem, ADP, cytokiny)	polymorfismus COX-1,COX-2, TxA2 syntetázy
☒ senzitivita trombo na kolagen a ADP	polymorfismus GPIa/IIa, Ib/V/IX, IIb/IIIa R
overexprese COX-2 (rychlá regenerace trombo), overexprese COX-2 mRNA	polymorfismus receptoru pro kolagen, vWf
regenerovaná COX-1 (Mo, Ma, endotelie)	polymorfismus f XIII (val 34 leu)
resolviny	
8-iso-PGF	

Legenda:

ASA – kyselina acetylosalicylová

ADP - adenosindifosfát

COX-1,2 - cyklooxygenáza

vWf – von Willebrandtův faktor

GP - glykoprotein

RNA – ribonukleová kyselina

Mo - monocyty

Ma - makrofágy

PGF – prostaglandin F

Tabulka 2: Přehled nejčastěji popisovaných tzv. exogenních příčin vysoké reziduální destičkové aktivity při terapii kyselinou acetylsalicylovou (podle 50)

Tabulka 2. Exogenní příčiny ASA rezistence
noncompliance
malabsorpce
lékové interakce (NSAID)
kouření
fyzická zátěž, posturální reakce, stres
věk, pohlaví
zvýšený obrat trombocytů
hyperlipidémie, hyperglykémie
netrombotická etiologie cévního uzávěru (arteriitida, embolizace)
hyperkoagulační stav u akutních koronárních syndromů
dose dependence

Legenda:

NSAID – nesteroidní antiflogistika

Tabulka 3: Přehled obecně udávaných příčin vysoké reziduální destičkové aktivity při terapii clopidogrelem (podle 50)

Tabulka 3. Příčiny clopidogrelové rezistence
noncompliance
lékové interakce
BMI, diabetes, inzulínorezistence, stres
interindividuální a intraindividuální variabilita v aktivitě CYP 45
akcelerovaný obrat trombocytů
genové polymorfismy CYP 450

Legenda:

BMI – body mass index

CYP - cytochromy

8. LABORATORNÍ MĚŘENÍ DESTIČKOVÉ AKTIVITY

8.1. *Úvod do problematiky*

Vzhledem k popisovanému vztahu mezi vysokou reziduální destičkovou aktivitou a vyšším rizikem nežádoucích kardiovaskulárních příhod je pozornost zaměřena ke hledání vhodné metody testování destičkových funkcí. Myšlenka monitorace antiagregační terapie je logická, podobně jako sledování účinnosti warfarinizace. Za optimální metodu je v současné době považována taková, která je jednoduchá (navíc levná), snadno proveditelná s rychle dostupnými výsledky, reprodučibilní, standardizovaná s přesně stanovenými referenčními rozmezími (kdy výsledky jsou porovnatelné mezi jednotlivými centry danou metodu používajícími), metoda by měla být rovněž specifická, výsledky by měly korelovat s klinickými výstupy.⁽⁷⁵⁾ K měření destičkových funkcí je dostupná celá řada testů, které ale jistě nesplňují výše uvedené podmínky pro ideální test.

8.2. *Dostupné metody pro měření destičkových funkcí*

Metody používané ke stanovení účinnosti protideštičkové terapie lze schematicky rozdělit na metody in vivo či in vitro. Poprvé destičkové funkce testoval Duke v roce 1910 stanovením krvácivosti, která byla používána až do 90.let minulého století. Stanovení krvácivosti je nejjednodušší, ale z dnešního pohledu zcela nespecifické, málo senzitivní, závislé na řadě koincidujících faktorů. In vivo je možné stanovovat za použití ELISA metod hladinu β -tromboglobulinu, destičkového faktoru 4 či solubilního P-selektinu v séru či metabolitu tromboxanu (11-dehydrotromboxan B2) v moči, ale ani tyto metody nejsou vhodné k monitoraci účinku protideštičkových funkcí, otázná v klinické praxi je pouze měření hladin metabolitů tromboxanu. Vyšší riziko myokardiálního infarktu a obecně náhlé srdeční smrti popisuje Eikelboom u pacientů, kde není při ASA terapii dosaženo odpovídajícího snížení hladin 11-dehydrothromboxanu B2 v moči. Měření sérové hladiny TXB2 (stabilního hydrolytického metabolitu TXA2) je považováno za senzitivní ukazatel biochemického efektu ASA, ale použití v klinické praxi je limitováno a spíše se v praxi rutinně nepoužívá.⁽⁷⁶⁾ Ostatní

metody (které jsou v laboratořích dostupné k testování destičkových funkcí) jsou uvedeny podrobněji v dalším textu níže.

8.2.1. Průtoková cytometrie

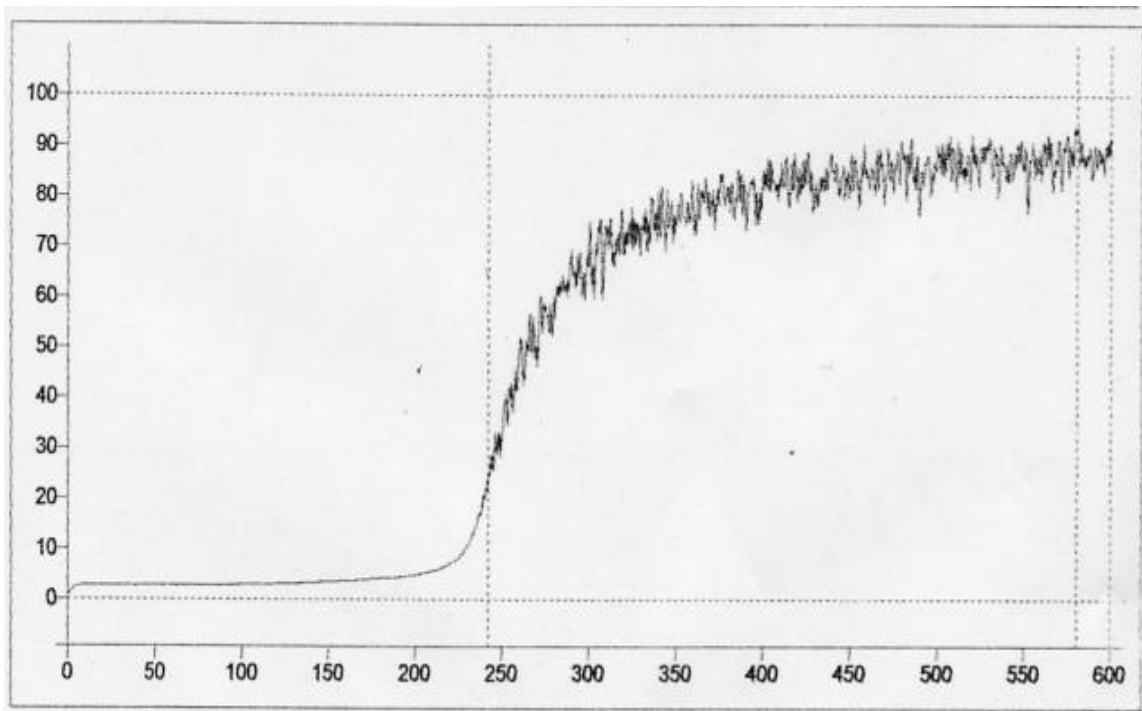
Průtoková cytometrie s použitím značených protilátek se využívá k detekci destičkových glykoproteinových receptorů. Pomocí ní můžeme měřit denzitu konkrétního proteinu na membráně buňky – suspenze je konjugována s monoklonální protilátkou proti měřenému antigenu, molekuly monoklonální protilátky jsou potaženy fluorochromem, po inkubaci prochází suspenze buněk přes komoru, kde je každá buňka ozářena paprskem laseru.⁽⁷⁷⁾ Dle množství emitovaného záření o vlnové délce fluorochromu určíme množství navázaných monoklonálních protilátek s fluorochromem a to koreluje s denzitou antigenů na povrchu buněk, výsledek se vyjadřuje jako průměrná fluorescenční intenzita.⁽⁷⁷⁾ Nejčastěji se používá při měření membránového destičkového selektinu. Nepoužívá se k testování účinku protideštičkové terapie, ale ke stanovení aktivity destiček.⁽⁷⁷⁾ Na principu průtokové cytometrie pracuje VASP (Vasodilatator-Stimulated-Phosphoprotein) assay - VASP je intracelulární protein, jehož fosforylace je inaktivována adenosinem přes receptory P2Y₁₂.⁽⁷⁷⁾ Používá se protilátek specifických pro fosforylovanou formu VASP, míra fosforylace koreluje s mírou aktivity thienopyridinů.⁽⁷⁷⁾ Výhodou je možnost stanovení i dva dny po náběru,⁽⁷⁷⁾ na rozdíl od jiných metod (kdy je nutné bezprostřední hodnocení destičkové aktivity).

8.2.2. Optická agregometrie

Optická agregometrie (vynalezená G. Bornem 1962)⁽⁷⁷⁾ byla používaná zejména v hematologii v diagnostice vrozených a získaných poruch destičkových funkcí a dlouhou dobu byla považována za zlatý standard v testování destičkových funkcí.⁽⁷⁵⁾ K vyšetření se používá citrátová krev, respektive na destičky bohatá (po centrifugaci) citrátová plazma. Agregace trombocytů je indukována přidáním agonisty a vyhodnocuje se agregační křivka. Agregometrické metody jsou založené na vyhodnocení změny optické hustoty při agregaci trombocytů v optickém agregometru po přidání induktoru.⁽⁷⁸⁾ Destičková inhibice je počítána jako $(1 - \text{reziduální agregace} / \text{baseline agregace}) \times 100$.⁽⁷⁹⁾ Za optimální dobu k vyšetření destičkových funkcí po odběru krve se udává doba do tří hodin po odběru (ne déle).⁽⁷⁵⁾ Jako induktorů agregace se používá řada agens – ADP, adrenalin, kolagen, trombin, AA, ristocetin,

katonický propylgalát.⁽⁷⁵⁾ Induktory můžeme rozdělit na endogenní (adrenalin, kolagen, ADP) a exogenní (katonický propylgalát).⁽⁷⁷⁾ Nebyla stanovena optimální koncentrace induktoru, která by vedla k reproduci agregaci trombocytů a minimalizaci variability získaných výsledků.⁽⁸⁰⁾ Pro hodnocení efektivity protidestičkové terapie při použití LTA s kyselinou arachidonovou jako induktoru agregace byla popsána nízká prevalence rezistence na ASA, AA se tedy jeví jako nejvhodnější induktor agregace k monitoraci efektivity protidestičkové terapie.⁽⁸⁰⁾ Problémem je variabilita výsledků v závislosti na použitém induktoru a jeho koncentraci, nedostatečná specifita, nejasná senzitivita (vzhledem k nestabilitě trombocytů a chybějícím standardům pro srovnání, výrobcem agregometrů bývá senzitivita udávána jako 10% odchylka od maximální amplitudy agregační křivky, rovněž není zcela jasná korelace výsledků agregometrie s klinikou).⁽⁶³⁾ K vyšetření je navíc třeba použít velký vzorek plazmy a proto je časově náročné, vyžaduje velkou erudici pracovníka a přípravu vzorků.⁽⁷⁷⁾ Metoda optické agregometrie je relativně nefyziologická, podmínky zcela neodpovídají fyziologickým podmínkám destičkové adheze, aktivace a agregace.⁽⁸¹⁾ Lze ji použít ke sledování jak účinku ASA tak clopidogrelu (podle použitého induktoru agregace). LTA stále zůstává nejčastěji a široce používanou metodou ke sledování destičkových funkcí, problémem je nedostatečná standardizace a tudíž nemožnost porovnání výsledků.⁽⁷⁹⁾ Jak již bylo uvedeno, podstatou vyšetření je vyhodnocování křivky po přidání induktoru agregace. Na agregační křivce hodnotíme maximální amplitudu agregace, strmost – slope – nástupu agregační křivky, změny tvaru křivky a maximum v určitém bodě (a to k posouzení vrozených či získaných defektů destičkových funkcí či k posouzení účinku protidestičkových léků).⁽⁷⁵⁾ Pro lepší představu do textu vkládám 3 typické křivky z optického agregometru, první z křivek zobrazuje agregaci trombocytů neovlivněnou protidestičkovou terapií, druhá z křivek potom zobrazuje vysokou reziduální destičkovou aktivitu při terapii ASA a poslední z křivek odpovídá účinné inhibici destičkových funkcí při léčbě ASA.

Obrázek 1: Typický průběh agregační křivky bez medikace s protideštičkovým účinkem



Legenda:

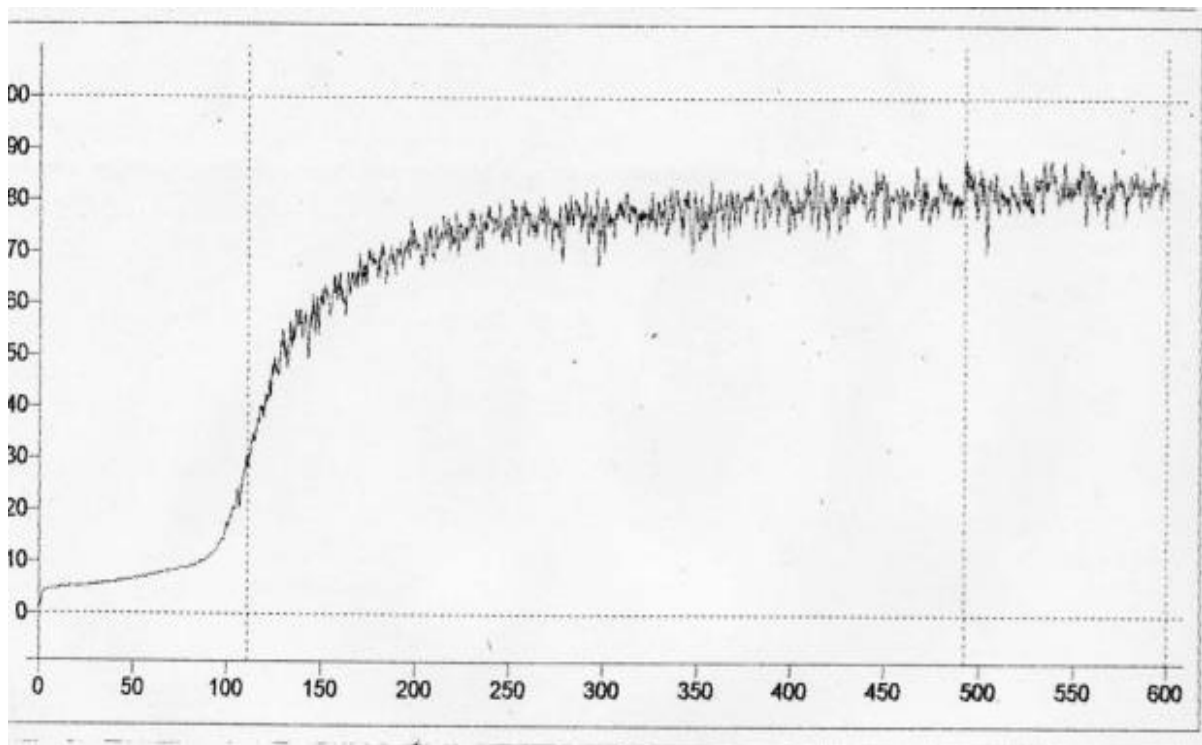
Na ose x je čas (10 minut)

Na ose y je maximální agregační amplituda v %

Principem měření je změna transmitance světelného paprsku v prostředí plazmy bohaté na destičky po přidání induktoru (kterým je v tomto případě kationický propylgalát), jako stoprocentní agregace se bere transmitance světelného paprsku v prostředí plazmy chudé na destičky, dále se hodnotí i tzv. slope (strmost agregační křivky) v %/min

Obrázek 2: AgregáčnÍ křivka zobrazující vysokou reziduální destičkovou aktivitu při terapii

ASA

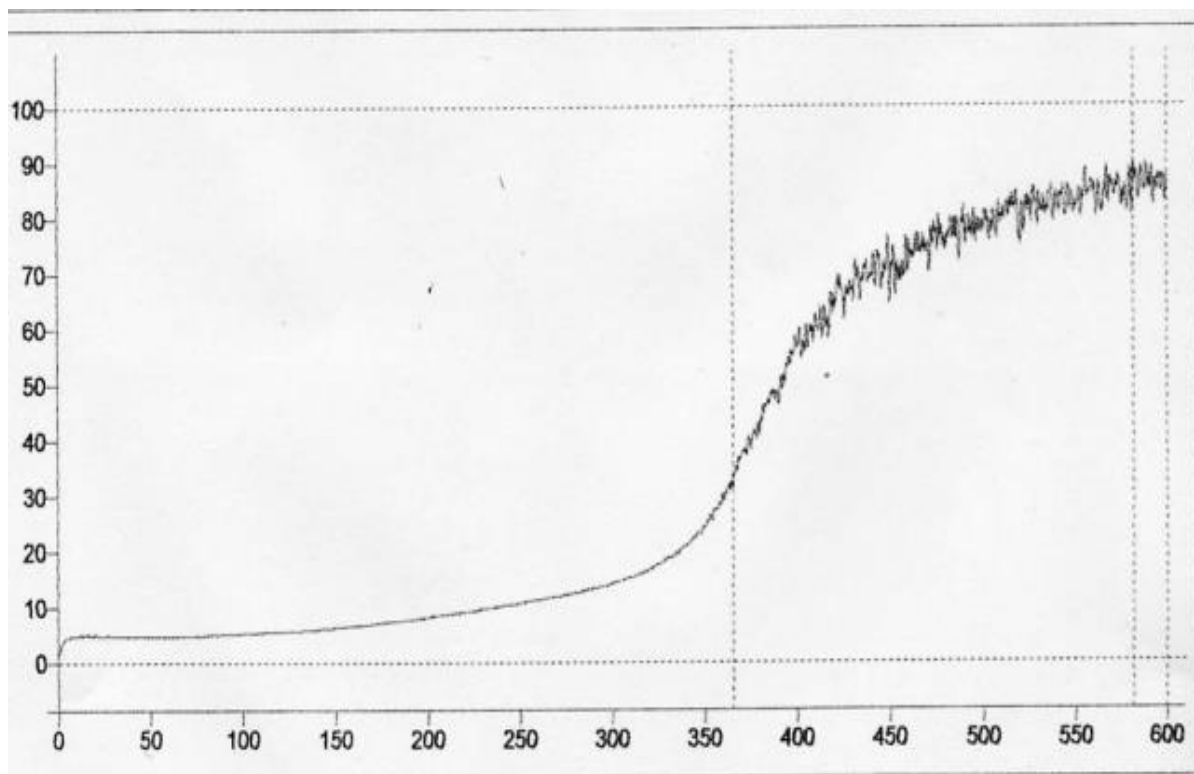


Legenda:

Na ose x je čas (10 minut)

Na ose y je maximální agregáčnÍ amplituda v %

Obrázek 3: Agregáční křivka vyjadřující dostatečný stupeň inhibice destičkové aktivity při terapii ASA



Legenda:

Na ose x je čas (10 minut)

Na ose y je maximální agregační amplituda v %

8.2.3. Poloautomatické metody

K testování efektu protideštičkové terapie lze využít poloautomatické analyzátoři (PFA-100 – platelet function analyser 100, ULTEGRA/VerifyNow – rapid platelet function assay). Výhodou těchto metod je jednoduchost a rychlost. Vhodnost pro testování efektivity protideštičkové terapie je otazná.

8.2.3.1. VerifyNow

VerifyNow™ byla vyvinuta jako poloautomatická metoda využívající k testování plné krve. Podstatou je měření aglutinace fibrinogenem potažených částic po přidání induktoru.⁽⁷⁵⁾ Měří absorpci světelného paprsku vzorkem poté, co se aktivované destičky shlukují s fibrinogenem na mikroparticulích a tím se mění opacita vzorku.⁽⁷⁷⁾ Tuto metodu lze použít k testování účinku ASA, antagonistů ADP i blokátorů IIb/IIIa a to v závislosti na použitém induktoru.⁽⁷⁷⁾ Původně se tato metoda vyvinula k testování účinku blokátorů IIb/IIIa inhibitorů, nicméně VerifyNow aspirin se používá k testování účinku ASA a VerifyNow clopidogrel k testování účinku clopidogrelu. Opět se používá citrátové krve. Jako antagonistu při měření účinku thienopyridinů se používá ADP + prostaglandin E2, který zablokuje aktivaci P2Y₁ receptorů a tím zvyšuje specifitu výsledků. Výsledek je udáván v PRU (platelet reactivity units). K testování účinku ASA se jako agonisty užívá kyseliny arachidonové a výsledky jsou udávány v ARU (aspirin reactivity units).⁽⁷⁷⁾ Jako agonistu agregace k posouzení účinku IIb/IIIa blokátorů se používá TRAP (trombin-receptor-activating protein) – velikost efektu se vyjadřuje jako procento inhibice v porovnání se základním stavem.⁽⁷⁷⁾ Metoda je poloautomatizovaná, jednoduchá, rychlá a stačí malé vzorky krve.^(75,77)

8.2.3.2. PFA-100

Další metodou, která by mohla být k testování účinků protideštičkových léků použita, je PFA-100. I v tomto případě se k vyšetření používá citrátové krve.⁽⁷⁷⁾ Cartridge obsahují biologicky aktivní membránu, která je kryta buď kolagenem a epinefrinem (CEPI) nebo kolagenem a ADP (CADP). Destičky jsou aktivovány střížnou silou a při průchodu malým lumenem pokrytým membránou s kolagenem a agonisty agregace dochází k postupné adhezi destiček na membránu a postupně se tak lumen uzavírá destičkovými agregáty.⁽⁷⁷⁾ Stanovuje se tzv.

closure time (čas potřebný k úplnému uzavření mikroskopického otvoru v důsledku indukce agregace trombocytů v souvislosti s přítomností induktoru agregace a střížných sil indukovaných konstantním průtokem krve kapilárou), closure time pro CEPI je 120–130 s, pro CADP pak 90–100s.⁽⁷⁸⁾ Jedná se o velmi jednoduchou metodu, rychlou a automatizovanou.⁽⁷⁵⁾ Nevýhodou je velká závislost výsledků na hematokritu a hladině vonWillebrandtova faktoru.⁽⁷⁷⁾ PFA-100 je metoda senzitivní a vhodná pro diagnostiku zejména vonWillebrandtovy choroby, těžkých destičkových poruch (typu Glanzmann thrombastenia nebo Bernard Soullierův syndrom).⁽⁷⁵⁾ Uvádí se, že PFA-100 není metodou vhodnou k měření účinku protideštičkových léků a nemá žádné studie, které by prokazovaly její význam. PFA-100 měří destičkovou aktivitu ovlivněnou vedle medikace ještě řadou jiných faktorů (shear stres, stimulací kolagenem či epinefrinem).^(75,80)

8.2.3.3. Multiplate

Další z poloautomatických metod je MULTIPLE analyzer – pracující na principu impedanční agregometrie - multiple electrode aggregometry).⁽⁸²⁾ Pracuje s plnou krví, což je považováno za více fyziologické při testování destičkových funkcí.⁽⁸²⁾ Principem testu je adheze a agregace trombocytů na povrchu senzoru, což zesiluje elektrickou impedanci mezi 2 elektrodami.⁽⁸²⁾ A měří se tak změny impedance způsobené adhezí destiček na senzory /elektrody po přidání induktoru agregace.⁽⁶⁴⁾ MULTIPLATE tak měří na čase závislý vzestup impedance mezi dvěma elektrodami jako výsledek agregace na elektrodách po podání induktoru.⁽⁸³⁾ Vzestup impedance v důsledku kontaktu destiček s elektrodou je transformován do arbitrárních agregačních jednotek (AU), které jsou vztahovány k času (AU*min).⁽⁸²⁾ Vlastní agregabilita je hodnocena jako plocha pod křivkou (AUC).⁽⁸²⁾ Podle použité reagentie je možno testovat účinek ASA, thienopyridinů i IIb/IIIa blokátorů.⁽⁶⁴⁾ Poprvé byla tato metoda popsána Cardinalem a Flowerem.⁽⁸³⁾ Stejně jako agregometrie optická i výsledky MULTIPLATE jsou ovlivněné počtem trombocytů.⁽⁸³⁾ Studie Siller – Matuly popisuje, že na základě výsledků MEA (MULTIPLATE) můžeme identifikovat pacienty s vyšším rizikem trombózy ve stentu.⁽⁷⁴⁾

8.3. Možný význam jednotlivých metod v klinické praxi

Dosud nemáme jasné důkazy z velkých prospektivních multicentrických studií, že úprava terapie dle výsledku monitorování destičkových funkcí jasně a prokazatelně zlepšuje klinické výstupy. Výsledky testů závisejí na použitém induktoru agregace a jeho koncentraci. Udává se, že nejlepším agonistou agregace k testování účinku ASA je kyselina arachidonová.⁽⁷⁵⁾ Testy používající kyselinu arachidonovou (agregometrie, Verify Now Aspirin) jsou považovány za jediné relevantní k monitoraci účinku ASA.⁽⁷⁵⁾ VerifyNow, MULTIPLATE a VASP (flowcytometrická analýza) jsou tři metody ověřené v klinických studiích a získané výsledky by mohly stratifikovat riziko u nemocných léčených antiagregační terapií. Jsou doklady jak pro vyšší výskyt trombotických komplikací při vysoké reziduální agregabilitě při léčbě, tak jsou již doklady pro vyšší výskyt krvácivých komplikací při abnormálně nízké aktivitě trombocytů. Pro ASA není nutné měření před zahájením terapie (destičková odpověď typu vše nebo nic). Thienopyridiny mají jiný mechanismus účinku a odpověď na léčbu není typu vše nebo nic. U osob léčených clopidogrelem by bylo vhodné měřit destičkové funkce před zahájením terapie (otázka prahové destičkové reaktivity) a následně při terapii (z rozdílu zjištěných hodnot agregace před léčbou a po léčbě se dá zjistit absolutní změna v agregaci a procento inhibice). Nutno poznamenat, že testování před a po léčbě není v rutinní klinické praxi možné.⁽⁷⁵⁾ Některé studie uvádějí vyšší prevalenci rezistence na ASA – příčinou vedle noncompliance pacientů může být rovněž použití nevhodné metody, nebo nevhodného induktoru agregace.⁽⁷⁵⁾ Při použití optické agregometrie ke sledování adekvátnosti suprese destičkové aktivity clopidogrelem jako induktoru užíváme ADP, výsledky jsou ovšem variabilní. Neodpovídavost na terapii je definována jako méně než 10% snížení v agregaci trombocytů u léčených osob. Další používanou metodou je Verify Now P2Y₁₂, která jako agonisty využívá ADP a prostaglandin E1. Limitací je neznalost cut-off mezi pacienty dostatečně a nedostatečně reagujícími na léčbu, výsledky jsou rovněž ovlivňovány současnou léčbou blokátory IIb/IIIa.⁽⁷⁵⁾ Udává se, že zlatým standardem monitorace efektu ADP blokátorů je VASP assay, výhodou je selektivita testování pro P2Y₁₂, není nutná znalost hodnot destičkové aktivity před léčbou.⁽⁷⁵⁾ Oproti optické agregometrii mají metody používající plné krve řadu výhod – menší objem vyšetřované krve, okamžitá analýza bez výrazně složité manipulace s krevními vzorky, nevyžaduje centrifugaci.⁽⁸¹⁾ Výsledky jednotlivých testů (LTA, VerifyNow, PFA-100) mezi sebou korelují jen slabě.^(79,81) PFA-100 se používá k detekování defektů v primární hemostáze, lze použít ke sledování efektivity terapie

desmopressinem či ASA, ale není vhodný pro testování efektivity terapie thienopyridiny, výsledky v porovnání s výsledky VerifyNow či VASP nekorelují.⁽⁶⁴⁾ Prospektivně byl sledován klinický význam nedostatečné laboratorní odpovědi na ASA či na clopidogrel v několika studiích (s použitím různých metod ke sledování účinku protidestičkové terapie).⁽⁷⁷⁾

Tabulka 4: Shrnutí hlavních výhod a nevýhod nejčastěji používaných metod k testování účinnosti protidestičkové terapie (podle 50)

Tabulka 4. Metody sledování účinnosti protidestičková terapie		
METODA	POZITIVA	NEGATIVA
krváčovost	jednoduché	nespecifické nesenzitivní závislé na řadě faktorů
β -tromboglobulin, df 4, solubilní P elektin v sé- ru, 11-dehydrotromboxan B2 v moči	korelace s klinikou	mimodestičkové zdroje tromboxanu závislost na renálních funkcích nejasná specifická a senzitivita
Cytoflowmetrie pomocí značených protilátek		
Optická agregometrie	zlatý standard	nejasná specifická a senzitivita variabilita výsledků
PFA-100 (CEPI, CADP)	jednoduché rychlé plná krev senzitivita 96,1 % specifická 88,6 %	nejasná korelace s klinikou
ULTEGRA (rapid platelet function assay)	jednoduché rychlé plná krev	

Legenda:

Df – destičkový faktor

PFA-100 – platelet function analyzer

CEPI – kolagen/epinefrin

CADP – kolagen/ADP

Tabulka 5. Přehled vybraných metod používaných k monitorování efektu clopidogrelu (převzato a upraveno podle 74):

	princip	výhody	nevýhody	vhodné pro clopidogrel	korelace s klinikou
LTA	změna optické hustoty po agregaci trombo	zlatý standard, dostupná	náročnost zpracování vzorků	ano	ano
Verifynow	aglutinace fibrinogenem potažených částic	jednoduchá, z plně krve	vyšší cena	ano	ano
PFA-100	"high shear stress"	jednoduchá, z plně krve	vliv vWf, hematokritu	ne	ne
MULTIPLATE	změna impedance po agregaci trombo	jednoduchá, z plně krve	náročnost zpracování vzorků	ano	ano
VASP	VASP fosforylace	biochemický zlatý standard pro clopidogrel	laboratorní náročnost	ano	ano

Problematikou vysoké reziduální destičkové aktivity při terapii kyselinou acetylsalicylovou a její prevalence (v různých populacích za využití různých metod měření destičkové aktivity) se zabývala řada menších studií:^(53,67,84) v populaci pacientů podstupujících aortokoronární bypass (s použitím testu krvácivosti) byla popsána 43% prevalence ASA rezistence, v populaci osob se stabilními formami ischemické choroby srdeční pak 5,5% (při použití optické agregometrie s ADP a kyselinou arachidonovou jako induktoru agregace) a 9,5% (při použití PFA-100), v populaci osob s postižením periferních cév dokonce až 60% (při použití ADP a kolagenu jako induktorů agregace). Z výše uvedeného vyplývá, že prevalence aspirinové rezistence je udávána v relativně širokém rozmezí mezi 5-60% (jak bylo uvedeno výše) a to v závislosti na použité metodě. Při použití kombinace různých laboratorních metod je popisována nižší prevalence ASA rezistence (kolem 2%) v porovnání s použitím každé metody samostatně.⁽⁸⁴⁾ V řadě menších prací je poukazováno na klinickou významnost aspirinové rezistence – u pacientů s CMP či onemocněním periferních tepen byla zjištěná rezistence na ASA spojena s více než 80% rizikem opakované vaskulární příhody ve dvouletém sledování, u pacientů s akutními koronárními syndromy bez ST elevací u pacientů aspirin rezistentních se koronární příhoda v průběhu 6-měsíců opakovala častěji, u pacientů léčených ASA s vyššími hladinami 11-dehydro thromboxanu B2 v moči bylo popsáno vyšší riziko myokardiálního infarktu či úmrtí z kardiovaskulárních příčin.⁽⁶⁷⁾ Většina studií zaměřených na testování destičkových funkcí proběhla na populaci dospělých osob, ale existují i studie u dětí užívajících

ASA z různých indikací. I u dětí je reaktivita na destičkovou terapii variabilní a prevalence vysoké reziduální destičkové aktivity je odlišná v závislosti na použité metodě.⁽⁸⁴⁾ Obdobně pak nedostatečný účinek clopidogrelu byl spojen s horší prognózou a signifikantně častějším výskytem MACE při použití LTA k testování účinku clopidogrelu.⁽⁷⁷⁾ Patrně největší soubor pacientů léčených clopidogrelem a testovaných na účinnost této terapie má Serebruary, rovněž využívající LTA k testování efektu terapie clopidogrelem. V této studii ale laboratorní data nekorelovala s klinickými dopady.⁽⁷⁷⁾ Další poměrně velká řada studií k testování účinku clopidogrelu používala VerifyNow. Studie se shodují v tom, že „laboratorní rezistence“ (nedostatečná odpověď na clopidogrel, vyšší reziduální destičková aktivita při clopidogrelu) je spojena s horším klinickým osudem pacientů.⁽⁷⁷⁾

Tabulka 6. Studie se zaměřením na vysokou reziduální destičkovou reaktivitu (při terapii clopidogrelem) ve vztahu s trombotickými komplikacemi (převzato a upraveno podle 74)

studie	n	použitý test	populace	klinické výstupy
Matetzky 2004	60	LTA s ADP	STEMI, PCI	Kardiovaskulární příhody, 6měsíců
Gurbel 2005	192	LTA s ADP ve vyšší koncentraci	PCI	MACE, 6 měsíců
Gurbel 2005	120	LTA s ADP	elektivní PCI	Periprocedurální myokardiální nekróza
Hochholzer 2006	802	LTA s ADP	elektivní PCI	30-denní MACE
Geisler 2006	379	LTA s ADP ve vyšší koncentraci	PCI	3 měsíční MACE
Buonamici 2007	804	LTA s ADP	PCI s DES	Trombóza ve stentu, 6 měsíců
Frere 2007	195	LTA s ADP	PCI u ACS	Rekurence ischemie ve 30dnech
Bliden 2007	100	LTA s ADP	elektivní PCI	1roční MACE
Cuisset 2007	190	LTA s ADP	PCI u ACS	Periprocedurální myokardiální nekróza
Cuisset 2009	598	LTA s ADP	PCI u NSTEMI	Trombóza ve stentu, 30 denní
Gurbel 2006	200	LTA s ADP	elektivní PCI	Periprocedurální myokardiální nekróza
Breet 2009	1049, 1051	LTA s ADP v různých koncentracích	elektivní PCI	MACE, 1 rok

Blindt 2007	99	VASP	high risk PCI	Trombóza ve stentu, 6 měsíců
Frere 2007	195	VASP	PCI u ACS	Rekurentní ischemie, 30denní
Bonello 2007	144	VASP	PCI	6měsíční MACE
Bonello 2007	162	VASP	PCI	1 měsíční MACE
Bonello 2009	429	VASP	PCI	Trombóza ve stentu, 30denní
Siller-Matula 2009	416	VASP	PCI	Trombóza ve stentu, 6 měsíců
Price 2008	380	VerifyNow P2Y ₁₂	PCI s DES	Trombóza ve stentu, 6 měsíců, kardiovaskulární úmrtí, nefatální infarkt
Patti 2008	160	VerifyNow P2Y ₁₂	PCI	30denní MACE
Marcucci 2009	683	VerifyNowP2Y ₁₂	PCI u ACS	Kardiovaskulární úmrtí/nefatální IM, 1 rok
Valgimigli 2009	147	VerifyNowP2Y ₁₂	PCI	Periprocedurální myokardiální nekróza
Breet 2009	1052	VerifyNow P2Y ₁₂	elektivní PCI	MACE, 1 rok
Sibbing 2009	1608	Multiplate	PCI s DES	Trombóza ve stentu, 30denní
Siller-Matula 2009	416	Multiplate	PCI	Trombóza ve stentu, 6 měsíců
Matetzky 2004	60	IMPACT-R	PCI u STEMI	Kardiovaskulární příhody, 6 měsíců
Breet 2009	606	Plateletworks	elektivní PCI	MACE 1 rok

Tabulka 7. Studie vyjadřující se ke strategii (úpravě) protideštičkové terapie na základě testování destičkových funkcí pomocí VerifyNow (převzato a upraveno podle 74)

	n	charakteristika	Endpointy
GRAVITAS	2783	HPR, PCI s implantací DES, 450mg/75mg clopidogrelu x 900mg/150mg clopidogrelu	KVS příhoda, nefatální IM, možná trombóza ve stentu
DANTE	422	HPR, akutní koronární syndromy, PCI, 75mg clopidogrelux150mg clopidogrelu v udržovací dávce	6-12měsíční MACE
ARCTIC	2500	PCI s implantací DES, 75mg clopidogrelu x 150mg clopidogrelu	KVS smrt, myokardiální infarkt, trombóza ve stentu, CMP, urgentní revaskularizace
TRIGGER-PCI	2150	elektivní PCI s implantací DES, 75mg clopidogrelu x60mg/10mg prasugrelu	KVS smrt, myokardiální infarkt, 6 měsíců

9. CÍL PRÁCE:

Cílem naší práce bylo:

1. zpracování podrobné charakteristiky získaného souboru se zaměřením se na výskyt vysoké reziduální destičkové aktivity při terapii ASA v jednotlivých sledovaných populacích souboru a potažmo pak tedy hledání možného vztahu rizikových faktorů aterosklerózy a destičkové hyperreaktivity či možného vlivu konkomitantní medikace na destičkovou aktivitu
2. posouzení případné variability destičkové aktivity v čase a vyjádření se tak k reproducibilitě výsledků námi použité optické agregometrie při měření destičkových funkcí ovlivněných podáním kyseliny acetylsalicylové při střednědobém sledování (sledování v několikaměsíčním intervalu)
3. v neposlední řadě měla naše práce podat stručný přehled současných možností sledování destičkové aktivity při zavedené antiagregační terapii a jejího významu v klinické kardiologické praxi s řadou neopominutelných úskalí

Z nesplněných cílů (blíže v závěru práce):

1. posouzení vztahu mezi laboratorně zjištěnými výsledky testování destičkové aktivity při terapii a klinickými dopady (manifestací v podobě kardiovaskulárních či cerebrovaskulárních komplikací)

10. METODIKA:

10.1. *Soubor pacientů:*

Sledován byl soubor pacientů I. Interní kardioangiologické kliniky léčených kyselinou acetylsalicylovou (v dávce 100mg/den minimálně 5 dní před zařazením do studie). Sledovanou populací byli pacienti s ischemickou chorobou srdeční (jak s akutními koronárními syndromy, tak se stabilními formami). Celkem bylo zařazeno 207 pacientů s ischemickou chorobou srdeční (konsekutivně přijatých na oddělení akutní kardiologie nebo na standardní oddělení I. Interní kardioangiologické kliniky), z nichž bylo 56 žen a 151 mužů ve věku 43-85 let (průměrný věk 67 ± 9 let). Vylučovacími kritérii byla: kontraindikace podávání protidestičkové terapie, trombocytopenie, trombocytóza, anémie, polycytemie či jiné hematologické choroby, malignity, závažná jaterní insuficience či postižení ledvin, end-stage chronických chorob, noncompliance v terapii či nemožnost podpisu informovaného souhlasu. Reziduální destičková aktivita byla stanovována za použití LTA vstupně a při kontrole (medián 9 měsíců). Od všech zařazených pacientů byla získána základní klinická data, klidové EKG a odebrány krevní vzorky ke zpracování. U všech osob byla ověřena compliance v medikaci (užití léků za hospitalizace pod dohledem středního zdravotnického personálu). Dávka léku nebyla měněna, destičková aktivita byla při kontrole stanovována pouze u pacientů, kteří potvrdili chronické užívání protidestičkové terapie. Charakteristiky souboru uvedeny níže v tabulce č.8.

10.2. *Odběr vzorků a jejich zpracování:*

V našem projektu jsme zvolili k monitorování destičkových funkcí optickou agregometrii (která byla považována za zlatý standard). Pro monitorování efektu kyseliny acetylsalicylové v organismu byl hematologickou laboratoří zvolen kationický propylgalát sodný v koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ (udává se, že v této koncentraci je propylgalát velmi citlivý na přítomnost nízkých dávek ASA v organismu). Odebírali jsme pro vyšetření účinku kyseliny acetylsalicylové 2 zkumavky krve (3ml), jako protisrážlivého činidla bylo využíváno citrátu sodného (3,2%, $c=0,109\text{mmol/l}$). Dodané krevní vzorky se zpracovaly pomocí centrifugace. Plazma bohatá na destičky se získává centrifugací na 800-900 otáček/min a počet krvinek se ověřuje na

analyzátoru. Plazma chudá na destičky se připravuje centrifugací na 3500-4000 otáček/min. Nastavení optického agregometru se provádí pomocí kyvety s plazmou chudou na destičky („nastavení 100% agregace“). Po přidání induktoru agregace se vyhodnocuje agregační odpověď. Do kyvety s plazmou bohatou na destičky přidáme 25 μ mol/l reagentie kationického propylgalátu, agregace probíhá 10 minut, poté se monitorování ukončí. V programu se automaticky vyhodnocuje agregační odpověď (maximální amplituda agregační křivky a strmost nástupu agregační křivky – tzv. slope). Referenční (léčebné rozmezí) pro slope bylo stanoveno na 35-65%/min, hodnoty pod 35%/min informují o nadměrné účinnosti terapie ASA, hodnoty nad 65%/min jsou považovány za léčbu nedostatečnou. Vyšetření agregace trombocytů se neprovádí, pokud počet trombocytů v dodaném vzorku klesne pod 100×10^9 . Stanovení agregační křivky se provádí na optických agregometrech AFACT. Centrifugace krevních vzorků se provádí na centrifugách JOUAN CR3i. Stejným postupem byly zpracovány vzorky i při kontrolním ambulantním vyšetření. Všechny vzorky odebrané krve byly dopraveny do laboratoře (a to buď potrubní poštou na pomalý chod nebo osobní donáškou vzorku do laboratoře). Před vyšetřením je vzorek uchováván při laboratorní teplotě, plazma je separována do 30 minut od příjmu do laboratoře, stabilita separované plazmy je potom dvě hodiny při laboratorní teplotě. Pro úplnost uvádím ještě metodiku stanovení účinnosti terapie clopidogrelem. Používá se rovněž optická agregometrie s adenosindifosfátem (ADP) jako induktorem agregace. ADP reagentie (lyofilizovaná o koncentraci 200 μ mol/l), jejíž finální koncentrace v testu po naředění je 20 μ mol/l. Zkumavku s materiálem pro přípravu plazmy bohaté na trombocyty stáčíme asi 10 min na 800-900 otáček za minutu, počet trombocytů musí přesáhnout 100×10^9 /l. Maximální amplituda agregační křivky se pohybuje mezi 60-100%. U clopidogrelu se jako vhodnější k hodnocení míry suprese destičkové aktivity jeví maximální amplituda agregační křivky než strmost jejího nástupu (za dostatečnou míru suprese destičkových funkcí clopidogrelem jsou potom považovány hodnoty maximální amplitudy agregační křivky pod 60%).

10.3. Statistické zpracování:

Data byla zpracovávána pomocí statistického programu Microsoft Excel a v programu NCSS 2007, Statistica. Kategorická data (nominální – tj. nabývající jen jednotlivých hodnot) byla prezentována četnostmi a procentuálními četnostmi. Kvantitativní data byla vyjádřena jako

průměrné hodnoty a směrodatná odchylka, popř. (vzhledem k odchylce od normality) medián a k vyjádření míry variability minimum či maximum nebo 1. a 3. kvartil. Při zpracování dat bylo použito metod deskriptivní statistiky, dvouvýběrového t-testu, případně neparametrického Mann-Whitney nebo Kolmogorov-Smirnov testu (u dat, která nevykazovala normalitu rozdělení). Dále byly použity kontingenční tabulky, chí kvadrát test nezávislosti případně Fisherův exaktní test a McNemarův test. Ke grafickému znázornění byly použity sloupkové a krabičkové grafy. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,05$. Byla kalkulována reproducibilita získaných výsledků. Grafické zobrazení shody/reproducibility je vyjádřeno pomocí Bland-Altmanova grafu (vynáší rozdíly hodnot mezi vstupním a kontrolním měřením proti průměru těchto dvou měření). Ukazuje schematicky chyby měření a non-uniformitu dat. Horizontální linie grafu vyjadřují limity shody, které jsou definovány jako průměrný rozdíl $\pm 1,96$ směrodatné odchylky rozdílů měření. Ve statistickém zpracování byl použit Bland Altmanův test, který se standardně používá k porovnání výsledků dvou různých metod měření, ale existuje Bland Altmanův test v modifikaci pro analýzu opakovaného měření za stabilních nebo měnících se podmínek, kde opakovaná data byla sbírána za časovou periodu.⁽⁸⁵⁾

11. VÝSLEDKY:

11.1. *Demografické složení a klinická charakteristika souboru:*

Sledovaná skupina zahrnovala 207 pacientů, z toho 56 žen (27,1%) a 151 mužů (72,9%) . Průměrný věk skupiny byl 67±9let. Z přidružených chorob – diabetem trpělo 89 pacientů (43,0%), arteriální hypertenze se objevila u 157 pacientů (75,8%), hyperlipidémie u 129 pacientů (62,3%), postižení periferních tepen u 58 pacientů (28,0%), obézních bylo 65 osob (31,4%), fibrilace síní u 39 pacientů (18,8%), onemocnění ledvin a chronická obstrukční plicní nemoc u 34 pacientů (16,4%). Koronarografické vyšetření popsalo postižení 1 tepny u 41 osob (19,8%), postižení 2 tepen u 54 osob (26,1%), postižení 3 tepen u 57 osob (27,5%), bez závažnějšího koronárního nálezu na věnčitých cévách bylo 32 osob (15,5%), srdeční selhání (NYHA II-III) bylo manifestní u 63 osob (30,4%). Ve sledované skupině byli jak pacienti s akutními koronárními syndromy (n=86, 41,5%), tak pacienti se stabilními formami ischemické choroby srdeční (n=90, 45,5%). Všichni byli léčeni kyselinou acetylsalicylovou, duální antiagregaci mělo 83 pacientů (40,1%), z ostatní medikace betablokátoři mělo 181 osob (87,4%), ACEi 178 osob (86,0%), statiny 184 osob (88,9%), antidiabetickou medikaci ať už perorálními antidiabetiky či inzulinem mělo 56 osob (27,1%), diuretika 119 osob (57,5%), kalciové blokátoři 43 osob (20,8%) a nitráty 31 osob (15,0%), PPI (inhibitory protonové pumpy) 31 osob (15,0%), současně antikoagulační terapie (nízkomolekulární hepariny, warfarin) byla 28 osob (13,5%).

Charakteristika souboru je uvedena v tabulce č.8.

Tabulka 8. Charakteristika souboru

	N	%
Muži	151	72.9
Ženy	56	27.1
věk	67±9	
diabetes mellitus	89	43.0
hypertenze	157	75.8
hyperlipidemie	129	62.3
chronická ischemická choroba srdeční	90	43.5
akutní koronární syndrom	86	41.5
postižení tří cév	57	27.5
postižení dvou cév	54	26.1
postižení jedné cévy	41	19.8
postižení 0 cév	32	15.5
nemoc periferních cév	58	28.0
Obesita	65	31.4
srdeční selhání (NYHA II-III)	63	30.4
fibrilace síní	39	18.8
onemocnění ledvin	34	16.4
chronická obstrukční nemoc plicní	34	16.4
antikoagulancia	28	13.5
betablokátory	181	87.4
ACEi	178	86.0
statiny	184	88.9
antidiabetika/inzulin	56	27.1
duální antiagregace	83	40.1
kalciové blokátory	43	20.8
diuretika	119	57.5
nitráty	31	15.0
inhibitory protonové pumpy	31	15.0

11.2. Výsledky vyhodnocení destičkové reaktivity a grafické zpracování

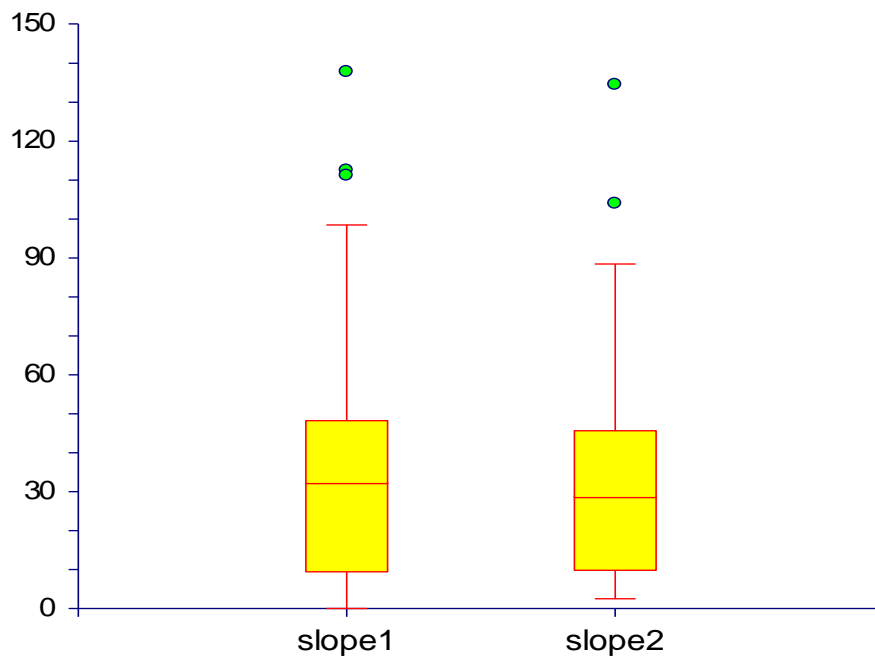
U všech 207 zařazených osob bylo provedeno opakované testování míry suprese destičkové aktivity za použití optické agregometrie s kationickým propylgalátem. Hlavní hodnocenou veličinou na agregační křivce byla slope (strmost nástupu agregační křivky vyjádřená v %/min). Hodnoty slope nad 65%/min byly stanoveny jako vyjádření nedostatečné míry suprese destičkové reaktivity při terapii ASA, hodnoty slope pod 65%/min byly považovány za hodnoty vyjadřující adekvátní supresi destičkové aktivity při terapii ASA.

171 osob (82,1%) vykazovalo v obou měřeních adekvátní supresi agregace při stávající antiagregační terapii, 24 osob (11,6%) vykazovalo nedostatečnou míru suprese destičkových funkcí při prvním měření, 11 osob (5,3%) při kontrolním měření, pouze u 2 pacientů (1,0%) byla opakovaně prokázána vyšší reziduální destičková reaktivita. Naše výsledky tudíž ukazují, že pouze 1,0% z našich sledovaných pacientů vykazovalo setrvale vysokou reziduální destičkovou aktivitu a že setrvale vysoká destičková reaktivita je relativně vzácným fenoménem při standardně vedené antiagregační terapii. V průběhu našeho střednědobého sledování 82,1% ze sledovaného souboru vykazovalo při obou měřeních adekvátní míru suprese destičkové reaktivity při stávající terapii, 16,9% z vyšetřovaného souboru vykazovalo nedostatečnou míru suprese destičkových funkcí alespoň při jednom z provedených měření. Můžeme tedy říci, že výsledky se v 82,1% případů shodují v dostatečné míře suprese destičkové aktivity a v 1,0% se shodují ve vysoké reziduální destičkové reaktivitě, v 16,9% se výsledky neshodují a tudíž naše výsledky poukazují na značnou variabilitu destičkových funkcí v čase při stejné vedené terapii. Fisherovým přesným testem nebyla zamítnuta hypotéza nezávislosti výsledků ($p=0,67$).

Kvantitativně jsme zpracovali hodnoty slope 1 a slope 2 (hodnoty strmosti nástupu agregační křivky po přidání induktoru agregace v %/min, které vyjadřují míru dostatečné/nedostatečné suprese destičkové aktivity při terapii ASA), zda se liší mezi pohlavími, či v závislosti na komorbiditách nebo medikaci (byla testována hypotéza shody vůči alternativě neshody pro rozdíl hodnot slope). Zajímaly nás skupiny osob s akutními koronárními syndromy, s chronickými formami ischemické choroby srdeční, hypertonici, diabetici, osoby s hyperlipidemií, obézní, se srdečním selháním (NYHA II-III). Stejně tak nás zajímala

konkomitantní podávaná medikace (zejména ACE-i, betablokátory, statiny ve vztahu k destičkové reaktivitě). Byl použit dvouvýběrový t-test, u dat nesplňujících normální rozdělení potom neparametrický Mann-Whitney test nebo Kolmogorov-Smirnov test. Statisticky nevýznamné rozdíly v destičkové reaktivitě vyšly ve skupině pacientů s akutními koronárními syndromy ($p=0,37$) i chronickými formami ischemické choroby srdeční ($p=0,70$), přestože bychom mohli ve skupině akutních koronárních syndromů očekávat častěji destičkovou hyperreaktivitu v souvislosti se známým a literárně popisovaným hyperkoagulačním stavem v tomto období. Ve skupinách s komorbiditami (které považujeme za klasické rizikové faktory aterosklerózy) rovněž nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v reaktivitě destiček při ASA terapii: u hypertoniků ($p=0,30$), u diabetiků ($p=0,30$), u obézních osob ($p=0,48$). Ani pacienti se srdečním selháním v anamnéze (NYHA II-III) neměli statisticky významně vyšší destičkovou reaktivitu i přesto, že srdeční selhání je uváděno jako jedna z možných příčin vysoké reziduální destičkové reaktivity ($p=0,21$). V našem souboru nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ani v závislosti na pohlaví ($p=0,99$). Stejně tak nebyl prokázán statisticky významný vliv podávané konkomitantní medikace ve vztahu k destičkové aktivitě: pro ACE-i ($p=0,86$), betablokátory ($p=0,12$) a statiny ($p=0,47$). Naopak statisticky významný rozdíl v destičkových funkcích byl v našem souboru zjištěn ve skupině pacientů s hyperlipidemií ($p=0,007$), ale vzhledem k nízké síle testu nezamítáme nulovou hypotézu (nenalezli jsme relevantní rozdíl). Ke grafickému znázornění vybraných výsledků jsme použili krabičkové grafy.

Graf 1. Grafické vyjádření hodnot účinnosti/neúčinnosti terapie ASA (dle optické agregometrie) ze vstupního měření (slope1) a z kontrolního měření (slope2) v celém sledovaném souboru (bez selekce na jednotlivé podskupiny)

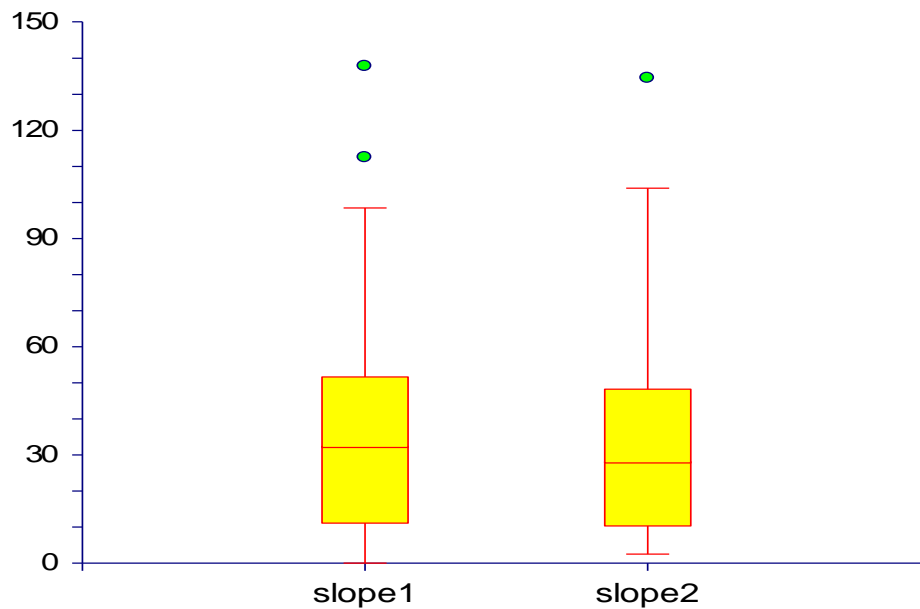


Legenda:

Na ose y jsou vyneseny hodnoty strmosti nástupu agregační křivky v %/min, které informují o účinnosti či neúčinnosti ASA terapie (35-65%/min považováno za tzv. terapeutické rozmezí), v krabičkovém grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu, prvního a třetího kvartilu, maxima a minima i hodnoty odlehlé

Hodnoty slope 1 a 2 se statisticky významně neliší ($p=NS$)

Graf 2. Grafické vyjádření hodnot účinnosti/neúčinnosti terapie ASA (dle optické agregometrie) ze vstupního měření (slope1) a z kontrolního měření (slope2) podle pohlaví – muži

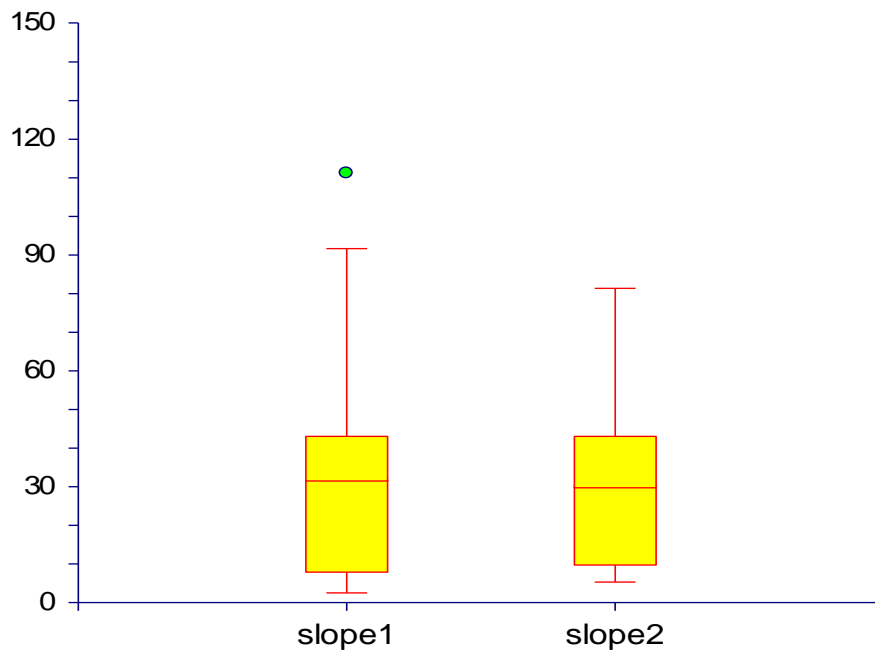


Legenda:

Na ose y jsou vyneseny hodnoty strmosti nástupu agregační křivky v %/min, které informují o účinnosti či neúčinnosti ASA terapie (35-65%/min považováno za tzv. terapeutické rozmezí), v krabičkovém grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu, prvního a třetího kvartilu, maxima a minima i hodnoty odlehlé

Hodnoty slope 1 a 2 se statisticky významně neliší ($p=NS$)

Graf 3. Grafické vyjádření hodnot účinnosti/neúčinnosti terapie ASA (dle optické agregometrie) ze vstupního měření (slope1) a z kontrolního měření (slope2) podle pohlaví - ženy

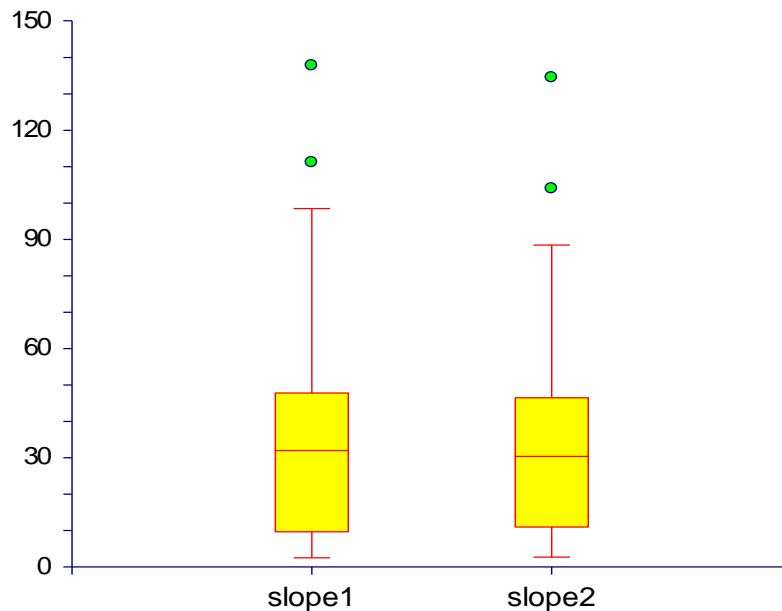


Legenda:

Na ose y jsou vyneseny hodnoty strmosti nástupu agregační křivky v %/min, které informují o účinnosti či neúčinnosti ASA terapie (35-65%/min považováno za tzv. terapeutické rozmezí), v krabičkovém grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu, prvního a třetího kvartilu, maxima a minima i hodnoty odlehlé

Hodnoty slope 1 a 2 se statisticky významně neliší (p=NS)

Graf 4. Grafické vyjádření hodnot účinnosti/neúčinnosti terapie ASA (dle optické agregometrie) ze vstupního měření (slope1) a z kontrolního měření (slope2) ve skupině hypertoniků

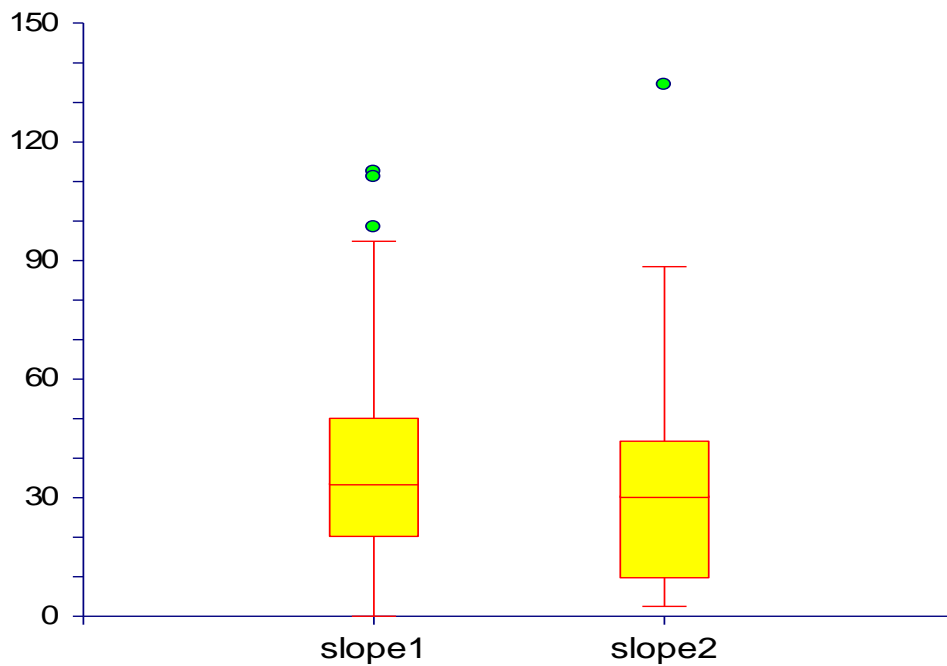


Legenda:

Na ose y jsou vyneseny hodnoty strmosti nástupu agregační křivky v %/min, které informují o účinnosti či neúčinnosti ASA terapie (35-65%/min považováno za tzv. terapeutické rozmezí), v krabičkovém grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu, prvního a třetího kvartilu, maxima a minima i hodnoty odlehlé

Hodnoty slope 1 a 2 se statisticky významně neliší (p=NS)

Graf 5. Grafické vyjádření hodnot účinnosti/neúčinnosti terapie ASA (dle optické agregometrie) ze vstupního měření (slope1) a z kontrolního měření (slope2) ve skupině diabetiků

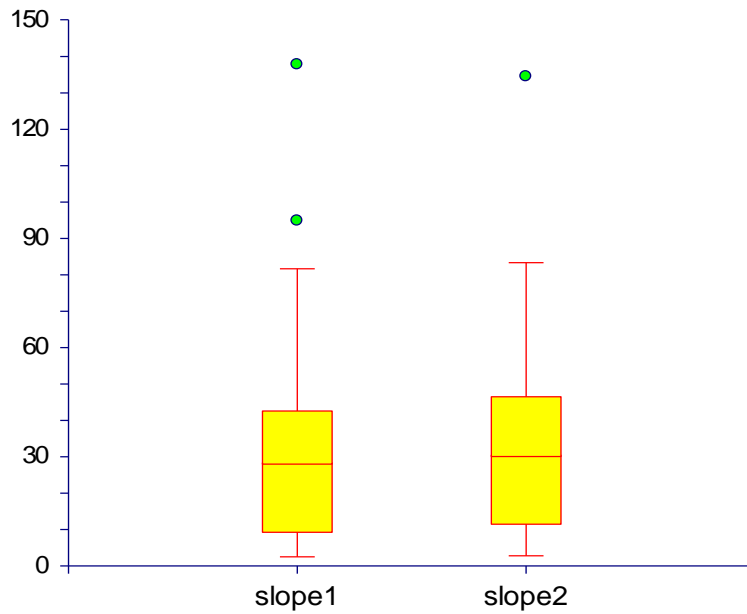


Legenda:

Na ose y jsou vyneseny hodnoty strmosti nástupu agregační křivky v %/min, které informují o účinnosti či neúčinnosti ASA terapie (35-65%/min považováno za tzv. terapeutické rozmezí), v krabčkovém grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu, prvního a třetího kvartilu, maxima a minima i hodnoty odlehlé

Hodnoty slope 1 a 2 se statisticky významně neliší (p=NS)

Graf 6. Grafické vyjádření hodnot účinnosti/neúčinnosti terapie ASA (dle optické agregometrie) ze vstupního měření (slope1) a z kontrolního měření (slope2) ve skupině hyperlipidemiků

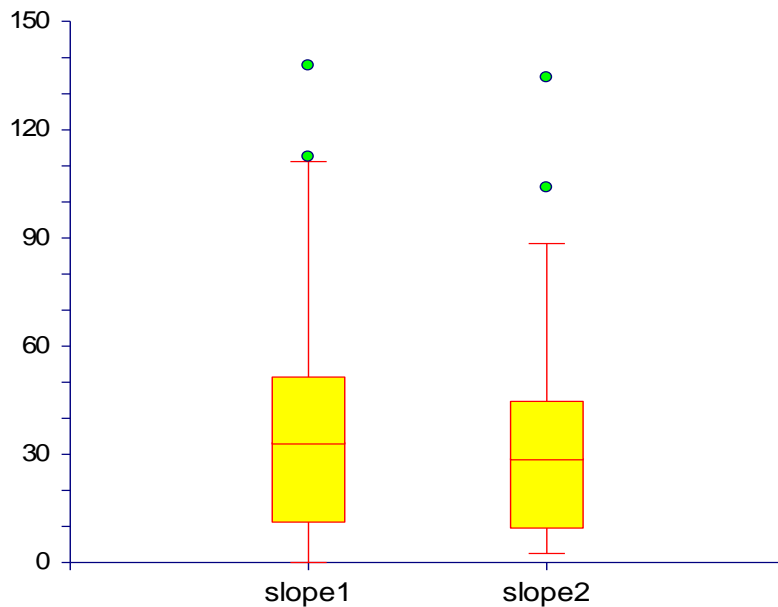


Legenda:

Na ose y jsou vyneseny hodnoty strmosti nástupu agregační křivky v %/min, které informují o účinnosti či neúčinnosti ASA terapie (35-65%/min považováno za tzv. terapeutické rozmezí), v krabičkovém grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu, prvního a třetího kvartilu, maxima a minima i hodnoty odlehlé

Hodnoty slope 1 a 2 se statisticky významně liší ($p < 0,05$)

Graf 7. Grafické vyjádření hodnot účinnosti/neúčinnosti terapie ASA (dle optické agregometrie) ze vstupního měření (slope1) a z kontrolního měření (slope2) ve skupině osob léčených betablokátry

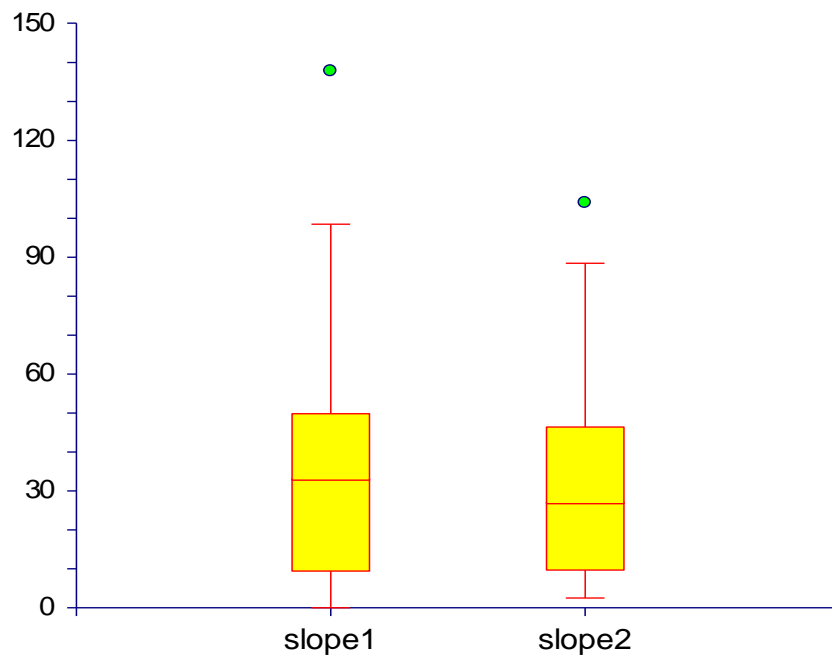


Legenda:

Na ose y jsou vyneseny hodnoty strmosti nástupu agregační křivky v %/min, které informují o účinnosti či neúčinnosti ASA terapie (35-65%/min považováno za tzv. terapeutické rozmezí), v krabičkovém grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu, prvního a třetího kvartilu, maxima a minima i hodnoty odlehlé

Hodnoty slope 1 a 2 se statisticky významně neliší ($p=NS$)

Graf 8. Grafické vyjádření hodnot účinnosti/neúčinnosti terapie ASA (dle optické agregometrie) ze vstupního měření (slope1) a z kontrolního měření (slope2) ve skupině osob léčených ACEi

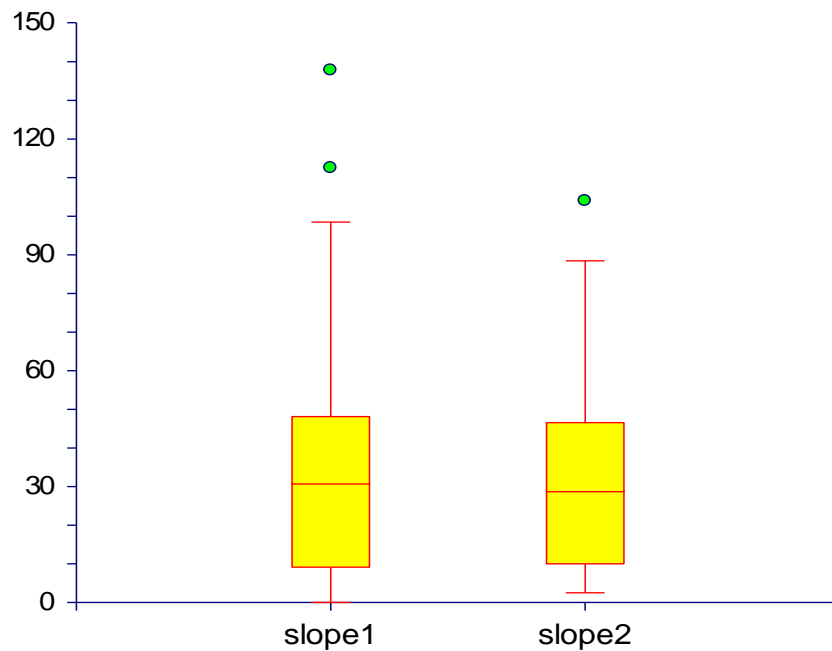


Legenda:

Na ose y jsou vyneseny hodnoty strmosti nástupu agregační křivky v %/min, které informují o účinnosti či neúčinnosti ASA terapie (35-65%/min považováno za tzv. terapeutické rozmezí), v krabičkovém grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu, prvního a třetího kvartilu, maxima a minima i hodnoty odlehlé

Hodnoty slope 1 a 2 se statisticky významně neliší ($p=NS$)

Graf 9. Grafické vyjádření hodnot účinnosti/neúčinnosti terapie ASA (dle optické agregometrie) ze vstupního měření (slope1) a z kontrolního měření (slope2) ve skupině osob léčených statiny



Legenda:

Na ose y jsou vyneseny hodnoty strmosti nástupu agregační křivky v %/min, které informují o účinnosti či neúčinnosti ASA terapie (35-65%/min považováno za tzv. terapeutické rozmezí), v krabičkovém grafu jsou znázorněny hodnoty mediánu, prvního a třetího kvartilu, maxima a minima i hodnoty odlehlé

Hodnoty slope 1 a 2 se statisticky významně neliší ($p=NS$)

Ke grafickému vyjádření procentuální četnosti (zastoupení) osob s vysokou reziduální destičkovou reaktivitou při terapii ASA v jednotlivých sledovaných podskupinách (jinými slovy zastoupení osob tzv. účinně a neúčinně léčených kyselinou acetylsalicylovou) v obou našich měřeních (vstupní a kontrolní) byly použity sloupcové grafy.

Ve skupině pacientů s akutními koronárními syndromy jsme v obou odběrech zaznamenali relativně vysoké procentuální zastoupení osob účinně léčených ASA (84,9% pro odběr 1, 87,2% pro odběr 2), což se statisticky významně neliší od procentuálního zastoupení osob účinně léčených ve skupině bez akutního koronárního syndromu (89,3% pro odběr 1, 98,3% pro odběr 2). Procento osob s vysokou reziduální destičkovou reaktivitou v obou měřeních je v souladu s literárně popisovanými údaji (15,1% pro odběr 1, 12,8% pro odběr 2). Zdá se být trend k nárůstu procenta osob účinně léčených a k poklesu procenta osob léčených neúčinně (i když statisticky nevýznamný) v čase. Tento trend by byl v souladu s literárně popisovaným údajem vyšší prevalence nedostatečné odpovídavosti na protideštičkové léky v akutní fázi koronárního syndromu, kdy po odeznění akutní fáze dochází k normalizaci koagulačních podmínek a destičkové reaktivity. Nicméně stejný trend můžeme vysledovat i ve skupině bez akutního koronárního syndromu.

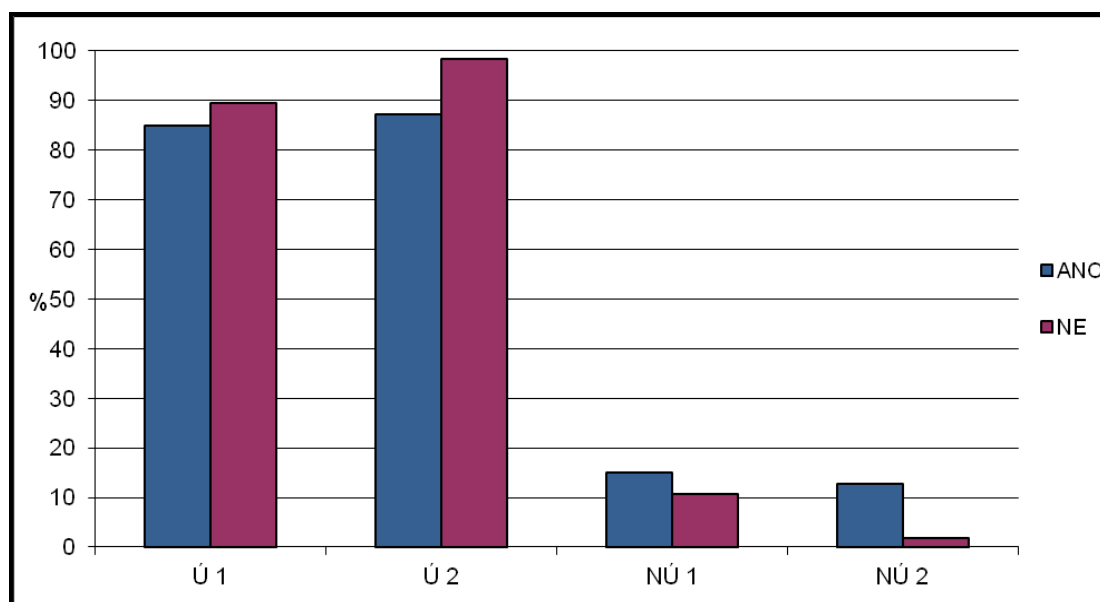
Destičková reaktivita a tudíž efektivita ASA terapie se nelišila ve skupinách diabetiků, hypertoniků či osob se srdečním selháním. Lze tedy říci, že dané choroby (v našem souboru) neměly vliv na variabilitu destičkových funkcí. Ve skupině diabetiků jsme nezjistili statisticky významný rozdíl v účinnosti (85,1% pro odběr 1, 94,4% pro odběr 2) respektive neúčinnosti (14,6% pro odběr 1, 5,6% pro odběr 2) ASA terapie. Statisticky významně se nelišila účinnost (89,0% pro první odběr, 93,2% pro druhý odběr) respektive neúčinnost (11,0% pro první odběr, 6,8% pro druhý odběr) ASA terapie ani ve skupině nediabetiků. Ani ve skupině hypertoniků a pacientů se srdečním selháním nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v účinnosti/neúčinnosti ASA terapie v jednotlivých měřeních v porovnání se skupinou normotoniků a osob bez srdečního selhání (viz níže).

Jedinou sledovanou podskupinou, ve které jsme v našem sledování našli statisticky významný rozdíl, byli pacienti s hyperlipidemií. Byl nalezen statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v účinnosti ASA terapie mezi pacienty s hyperlipidemií a bez hyperlipidemie pro

odběr 1 (91,5% rep. 80,8%). S ohledem na nízkou sílu testu nelze ale nulovou hypotézu (že se hodnoty neliší) zamítnout, nebyl nalezen relevantní rozdíl. Může se jednat o náhodný jev, proto ani hyperlipidémii nepovažujeme v našem souboru za faktor výrazně ovlivňující destičkové funkce.

Vedle známých rizikových faktorů (a jejich možného vlivu na destičkové funkce) nás zajímal i vliv podávané konkomitantní medikace, zejména léků, které bývají dle literárních údajů dávány do souvislosti s možnou ASA rezistencí (nedostatečnou odpovědí na ASA terapii). Jedná se zejména o inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu a statiny. V jednotlivých měřeních nebyl pro žádnou ze sledovaných podskupin nalezen statisticky významný rozdíl. Účinnost ASA terapie se nelišila při terapii ACEI v porovnání se skupinou bez ACEI v odběru 1 (87,6%, 86,2%) i v odběru 2 (93,3%, 96,6%). Stejně tak se účinnost ASA terapie statisticky významně nelišila při terapii statiny v porovnání se skupinou bez statinu v obou odběrech (viz níže).

Graf 10. Vyjádření procentuálních četností osob účinně léčených ASA a osob neúčinně léčených (dle výsledků LTA) pro skupinu akutních koronárních syndromů



Legenda:

Ú1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ (strmosti nástupu agregační křivky) při LTA v tzv. terapeutickém rozmezí (mezi 35-65%/min, považované za účinnou léčbu ASA) pro vstupní odběr (odběr 1)

NÚ 1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (nad 65%/min, považované za léčbu nedostatečně účinnou) pro odběr 1

Ú2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ v tzv. terapeutickém rozmezí (účinná léčba) pro kontrolní odběr (odběr 2)

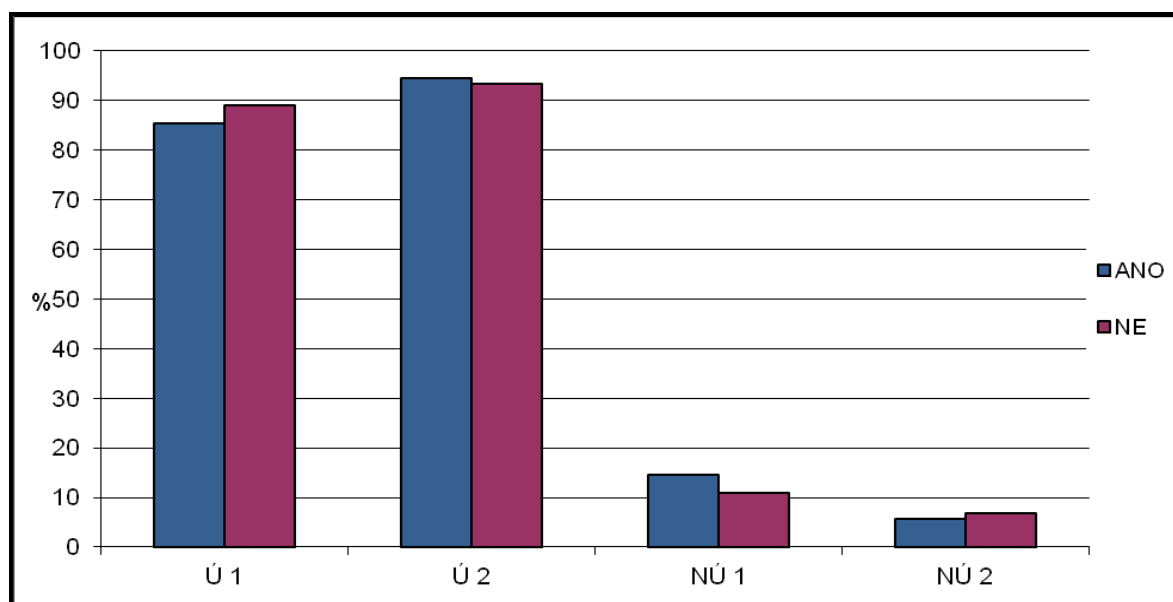
NÚ 2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (neúčinná léčba) pro odběr 2

Barevně odlišena podskupina s akutními koronárními syndromy (modrá, „ANO“) a podskupina bez akutního koronárního syndromu (fialová, „NE“)

Mezi těmito podskupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ($p=NS$).

	ANO	NE
Ú 1	84,9	89,3
Ú 2	87,2	98,3
NÚ 1	15,1	10,7
NÚ 2	12,8	1,7

Graf 11. Vyjádření procentuálních četností osob účinně léčených ASA a osob neúčinně léčených (dle výsledků LTA) pro skupinu diabetiků



Legenda:

Ú1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ (strmosti nástupu agregační křivky) při LTA v tzv. terapeutickém rozmezí (mezi 35-65%/min, považované za účinnou léčbu ASA) pro vstupní odběr (odběr 1)

NÚ 1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (nad 65%/min, považované za léčbu nedostatečně účinnou) pro odběr 1

Ú2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ v tzv. terapeutickém rozmezí (účinná léčba) pro kontrolní odběr (odběr 2)

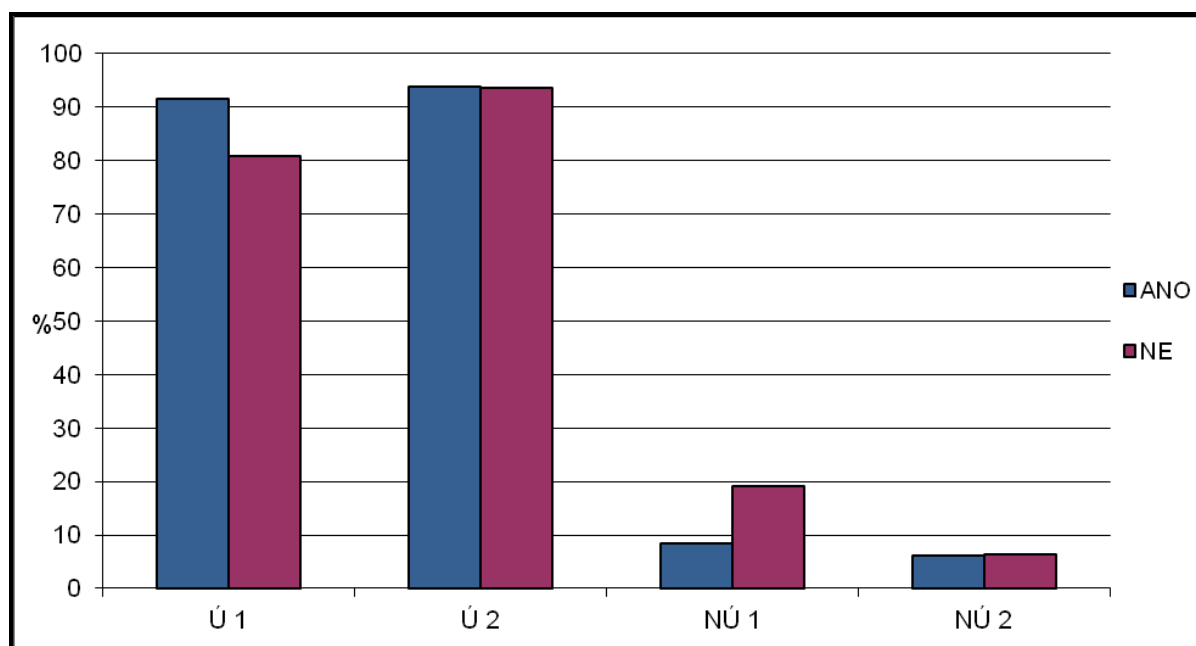
NÚ 2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (neúčinná léčba) pro odběr 2

Barevně odlišena podskupina diabetiků (modrá, „ANO“) a nediabetiků (fialová, „NE“).

Mezi těmito podskupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ($p=NS$).

	ANO	NE
Ú 1	85,4	89
Ú 2	94,4	93,2
NÚ 1	14,6	11
NÚ 2	5,6	6,8

Graf 12. Vyjádření procentuálních četností osob účinně léčených ASA a osob neúčinně léčených (dle výsledků LTA) pro skupinu pacientů s hyperlipidemií



Legenda:

Ú 1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ (strmosti nástupu agregační křivky) při LTA v tzv. terapeutickém rozmezí (mezi 35-65%/min, považované za účinnou léčbu ASA) pro vstupní odběr (odběr 1)

NÚ 1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (nad 65%/min, považované za léčbu nedostatečně účinnou) pro odběr 1

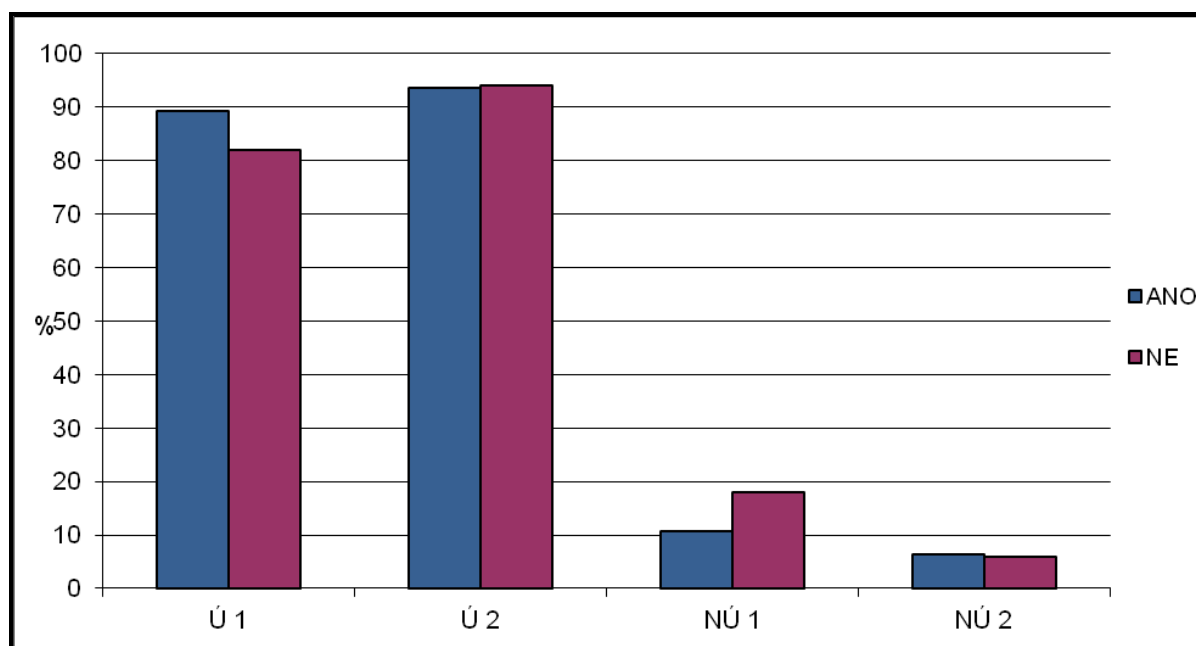
Ú 2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ v tzv. terapeutickém rozmezí (účinná léčba) pro kontrolní odběr (odběr 2)

NÚ 2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (neúčinná léčba) pro odběr 2

Barevně odlišena podskupina s hyperlipidemií (modrá, „ANO“) a bez hyperlipidémie (fialová, „NE“). Mezi podskupinami s hyperlipidemií a bez hyperlipidémie byl pro první odběr nalezen statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

	ANO	NE
Ú 1	91,5	80,8
Ú 2	93,8	93,6
NÚ 1	8,5	19,2
NÚ 2	6,2	6,4

Graf 13. Vyjádření procentuálních četností osob účinně léčených ASA a osob neúčinně léčených (dle výsledků LTA) pro skupinu hypertoniků



Legenda:

Ú 1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ (strmosti nástupu agregační křivky) při LTA v tzv. terapeutickém rozmezí (mezi 35-65%/min, považované za účinnou léčbu ASA) pro vstupní odběr (odběr 1)

NÚ 1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (nad 65%/min, považované za léčbu nedostatečně účinnou) pro odběr 1

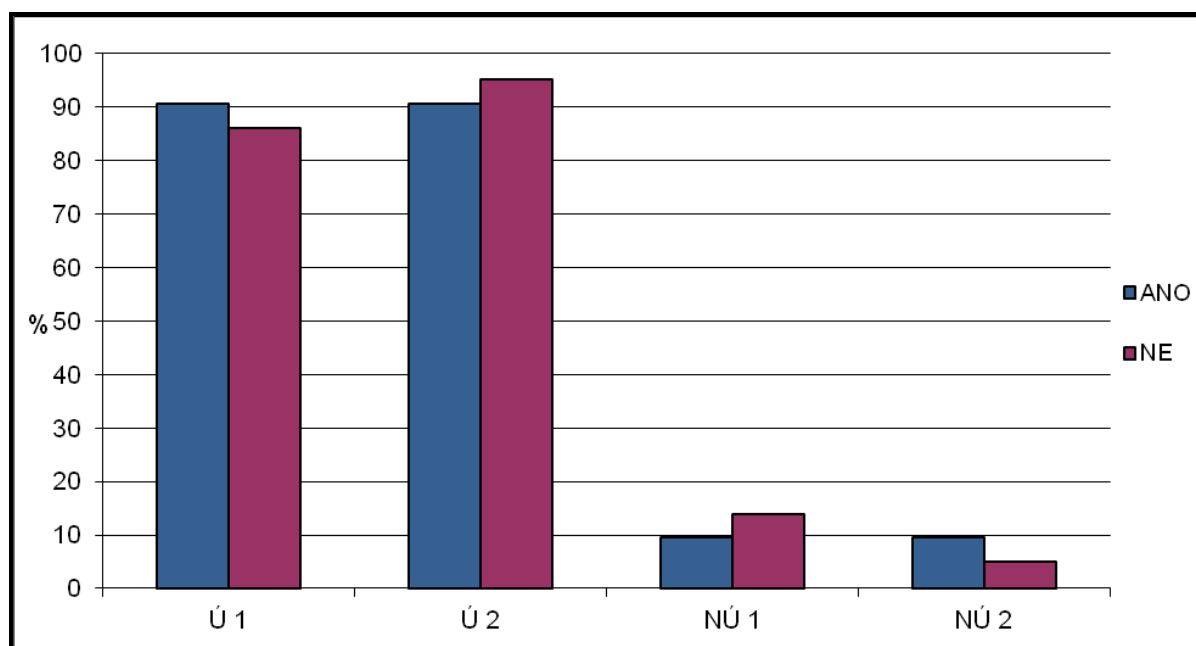
Ú 2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ v tzv. terapeutickém rozmezí (účinná léčba) pro kontrolní odběr (odběr 2)

NÚ 2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (neúčinná léčba) pro odběr 2

Barevně odlišena podskupina hypertoniků (modrá, „ANO“) a normotoniků (fialová, „NE“). Mezi těmito podskupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ($p=NS$).

	ANO	NE
Ú 1	89,2	82
Ú 2	93,6	94
NÚ 1	10,8	18
NÚ 2	6,4	6

Graf 14. Vyjádření procentuálních četností osob účinně léčených ASA a osob neúčinně léčených (dle výsledků LTA) pro skupinu pacientů se srdečním selháním



Ú1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ (strmosti nástupu agregační křivky) při LTA v tzv. terapeutickém rozmezí (mezi 35-65%/min, považované za účinnou léčbu ASA) pro vstupní odběr (odběr 1)

NÚ 1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (nad 65%/min, považované za léčbu nedostatečně účinnou) pro odběr 1

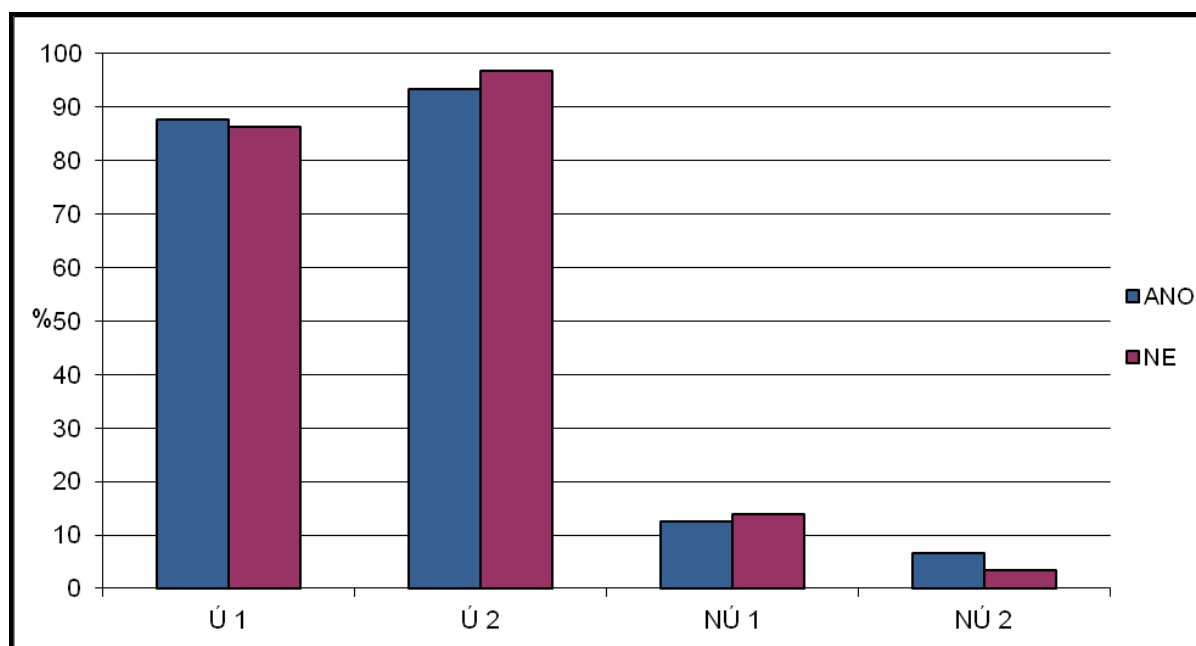
Ú2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ v tzv. terapeutickém rozmezí (účinná léčba) pro kontrolní odběr (odběr 2)

NÚ 2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (neúčinná léčba) pro odběr 2

Barevně odlišena podskupina osob se srdečním selháním (modrá, „ANO“) a bez srdečního selhávání (fialová, „NE“). Mezi těmito podskupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ($p=NS$).

	ANO	NE
Ú 1	90,5	86,1
Ú 2	90,5	95,1
NÚ 1	9,5	13,9
NÚ 2	9,5	4,9

Graf 15. Vyjádření procentuálních četností osob účinně léčených ASA a osob neúčinně léčených (dle výsledků LTA) při terapii ACEi



Ú1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ (strmosti nástupu agregační křivky) při LTA v tzv. terapeutickém rozmezí (mezi 35-65%/min, považované za účinnou léčbu ASA) pro vstupní odběr (odběr 1)

NÚ 1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (nad 65%/min, považované za léčbu nedostatečně účinnou) pro odběr 1

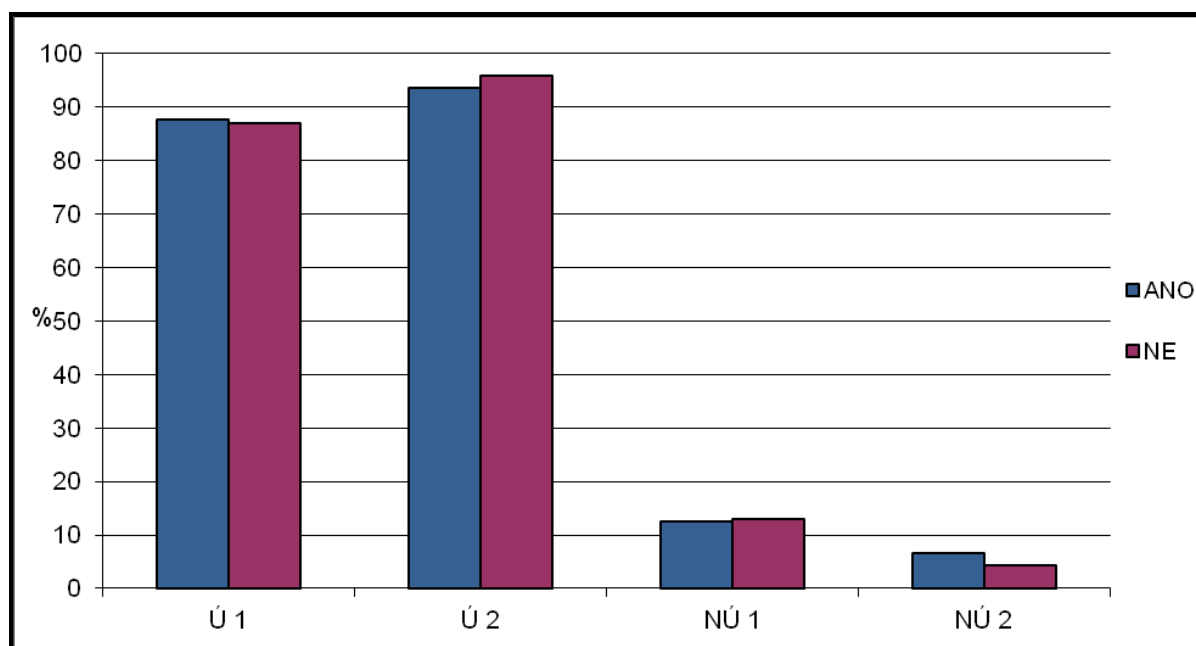
Ú2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ v tzv. terapeutickém rozmezí (účinná léčba) pro kontrolní odběr (odběr 2)

NÚ 2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (neúčinná léčba) pro odběr 2

Barevně odlišena podskupina osob s ACEi v terapii (modrá, „ANO“) a bez ACEi v terapii (fialová, „NE“). Mezi těmito podskupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ($p=NS$).

	ANO	NE
Ú 1	87,6	86,2
Ú 2	93,3	96,6
NÚ 1	12,4	13,8
NÚ 2	6,7	3,4

Graf 16. Vyjádření procentuálních četností osob účinně léčených ASA a osob neúčinně léčených (dle výsledků LTA) při terapii statiny



Ú1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ (strmosti nástupu agregační křivky) při LTA v tzv. terapeutickém rozmezí (mezi 35-65%/min, považované za účinnou léčbu ASA) pro vstupní odběr (odběr 1)

NÚ 1 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (nad 65%/min, považované za léčbu nedostatečně účinnou) pro odběr 1

Ú2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ v tzv. terapeutickém rozmezí (účinná léčba) pro kontrolní odběr (odběr 2)

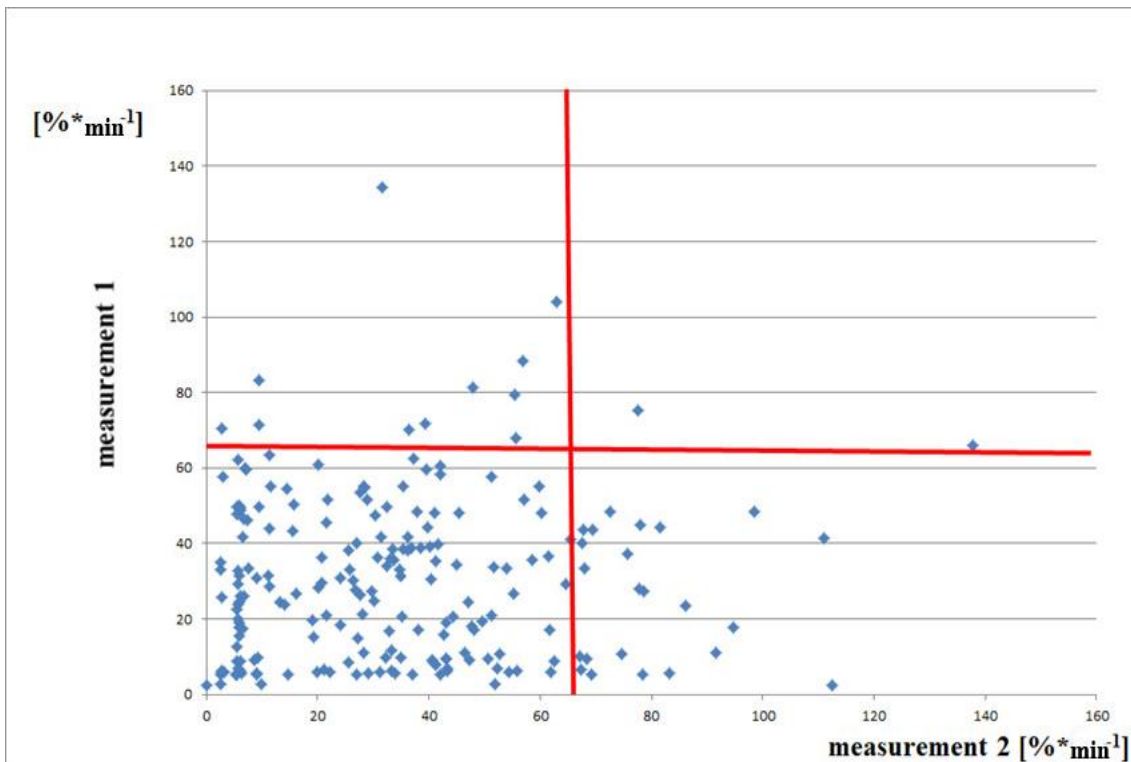
NÚ 2 – procentuální zastoupení osob s hodnotami „slope“ mimo tzv. terapeutické rozmezí (neúčinná léčba) pro odběr 2

Barevně odlišena podskupina osob se statiny v terapii (modrá, „ANO“) a bez statinů v terapii (fialová, „NE“). Mezi těmito podskupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ($p=NS$).

	ANO	NE
Ú 1	87,5	87
Ú 2	93,5	95,7
NÚ 1	12,5	13
NÚ 2	6,5	4,3

V neposlední řadě jsme se pokusili vyjádřit se k reproducibilitě získaných dat respektive výsledků získaných při měření pomocí optické agregometrie. Zvolili jsme Bland-Altmanův test a grafické znázornění v podobě Bland-Altman plotu. Z pohledu statistika z výsledků Bland Altmanova testu a jeho grafického znázornění vyplývá, že testovaná veličina (slope) oplývá nízkou mírou opakovatelnosti a vysokou mírou variability, podle čehož lze předpokládat, že existuje ještě řada jiných faktorů, které výslednou hodnotu ovlivňují.

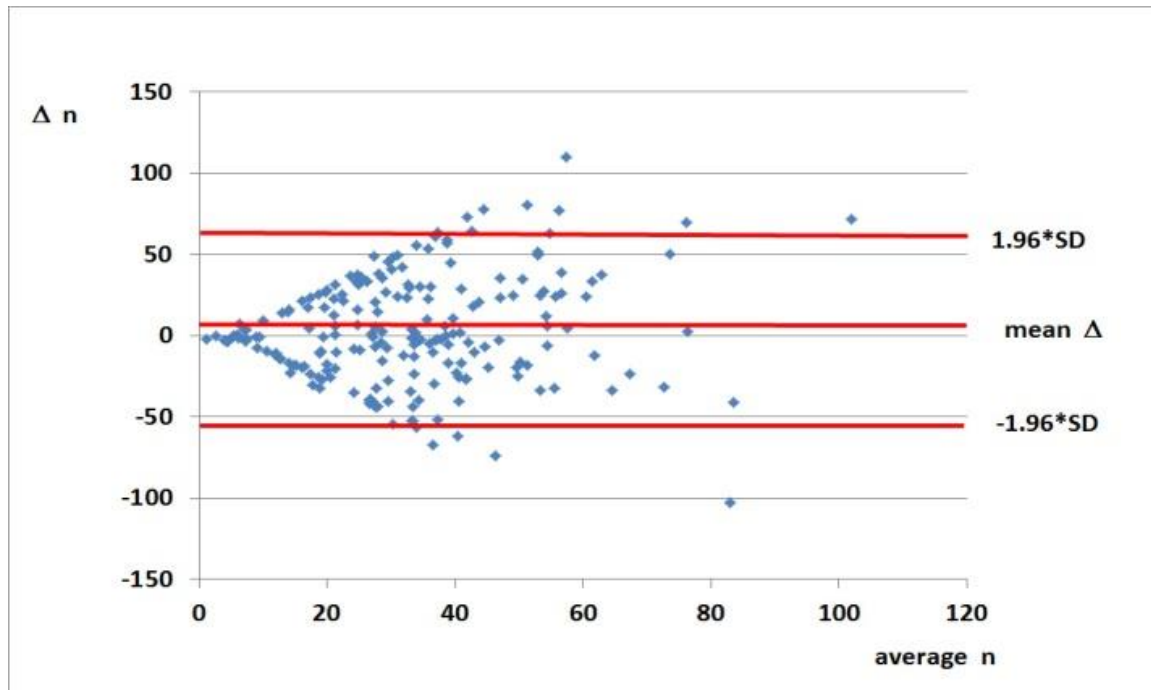
Graf 17. Bland Altmanovo grafické zobrazení vztahu míry suprese destičkové aktivity při vstupním a kontrolním měření (slope 1, slope 2) (v pravém horním kvadrantu 1% osob se setrvale neadekvátní mírou suprese destičkové aktivity, oproti levému dolnímu kvadrantu, kde je 82,1% osob s adekvátní mírou suprese destičkových funkcí při obou měřeních)



Legenda:

Na ose y (označené jako measurement 1) jsou vyneseny hodnoty slope (strmosti nástupu agregační křivky v %/min) z prvního měření, na ose x (označené jako measurement 2) jsou vyneseny hodnoty slope (strmosti nástupu agregační křivky v %/min) z kontrolního měření

Graf 18. Bland-Altman plot (průměr rozdílu je 3,32, SD=32,67, $1,96 \cdot SD=64,02$, limity shody jsou potom -60,71 a 67,34)



Legenda:

Grafické zobrazení shody/reproducibility je vyjádřeno pomocí Bland-Altmanova grafu (vynáší rozdíly hodnot mezi vstupním a kontrolním měřením proti průměru těchto dvou měření). Ukazuje schematicky chyby měření a non-uniformitu dat. Horizontální linie grafu vyjadřují limity shody, které jsou definovány jako průměrný rozdíl $\pm 1,96$ směrodatné odchylky rozdílů měření.

Z charakteru křivky v grafu 18 lze usuzovat na non-uniformitu a diverzifikaci dat (zvyšující se se zvyšujícím se počtem měření). Pouze pokud se hodnoty rozdílů v Bland Altmanově grafickém znázornění pohybují symetricky kolem nuly, lze usuzovat na absenci systematických chyb.

12. DISKUZE:

12.1. Význam protidestičkové terapie

Trvalá terapie kyselinou acetylsalicylovou je vhodná pro všechny pacienty s ischemickou chorobou srdeční pokud nemají kontraindikace. Jako účinné se jeví dávky ASA mezi 75-100mg, vyšší dávky zpravidla zvyšují riziko krvácivých komplikací.⁽⁵⁴⁾ I přes existenci řady nových protidestičkových léků aspirin je stále široce používaným protidestičkovým lékem v prevenci a terapii kardiovaskulárních onemocnění. Výsledky studie ISIS-2 popsaly snížení mortality u akutních myokardiálních infarktů. Metaanalýzy klinických studií poukazují na 25-44% snížení rizika nežádoucích vaskulárních příhod u osob léčených ASA (ASPECT). Efektem duální protidestičkové terapie se zabývaly např. studie CAPRIE, CURE, CREDO, CLARITY-TIMI-28.^(50,69) U pacientů léčených clopidogrelem bylo prokázáno statisticky významné snížení relativního rizika mozkové příhody, infarktu myokardu či náhlé smrti (CAPRIE). Ve studii CURE byl prokázán efekt duální antiagregace u pacientů s akutním koronárním syndromem na snížení rekurence koronárních příhod ve srovnání s ASA v monoterapii. CREDO popsalo snížení relativního kardiovaskulárního rizika a efektivitu podávání clopidogrelu u pacientů podstupujících perkutánní koronární intervenci. Efekt clopidogrelu v porovnání s placebem na snížení relativního rizika náhlé smrti, rekurence myokardiálního infarktu či ischemie popisuje CLARITY-TIMI-28.⁽⁵⁰⁾ Prasugrel s clopidogrelem u vysoce rizikových pacientů s koronárním syndromem podstupujících PCI porovnávala studie TRITON-TIMI 38.⁽⁵²⁾ V této studii bylo léčeno 3534 nemocných se STEMI a příznivým rizikovým profilem, snížení rizika ischemických příhod pro všechny akutní koronární syndromy bylo při léčbě prasugrelem prokazatelné pouze v prvních 30dnech.⁽⁶⁰⁾ PLATO studie se zabývala 7544 pacienty se STEMI a podáním ticagreloru. Léčba ticagrelorem u STEMI vykazuje shodně snížení výskytu ischemických příhod (prokazatelné jak v prvních 30dnech, tak mezi 30.dnem a 12.měsícem), rovněž vykazuje i snížení mortality. Bylo prokázáno jasné snížení výskytu MACE u pacientů léčených duální antiagregací.⁽⁸⁶⁾

Lze tedy říci, že protidestičková terapie je zcela nezastupitelná u pacientů s kardiovaskulárními chorobami a její význam je podložen řadou velkých klinických studií. Tudíž snaha o její optimalizaci má své opodstatnění. Proto považujeme za vhodné se

problematice vysoké reziduální destičkové aktivity při antiagregační terapii věnovat a zmínit úskalí týkající se možnosti testování destičkových funkcí a výstupů pro klinickou kardiologickou praxi.

12.2. Úskalí fenoménu „rezistence“ na antiagregační terapii a testování destičkových funkcí v praxi

Téma destiček a jejich reaktivity v souvislosti s antiagregační terapií je komplexním problémem. Na prvním místě i nadále zůstává potřeba správné definice v případě zjištěné nedostatečné odpovídavosti na protideštičkovou terapii, která není i nadále jednoznačná.⁽⁸⁷⁾ Zdá se, že nejvhodnějším termínem pro použití v klinické praxi není rezistence na protideštičkovou terapii ale vysoká reziduální destičková reaktivita při antiagregační terapii. I přesto se v literatuře nadále používají termíny jako rezistence klinická či laboratorní, které ale nejsou identické.⁽⁷⁶⁾ Problémem zůstává, že „rezistence“ je definována na základě in vitro sledování destičkových funkcí a tudíž nelze říct, že in vitro zjištěné destičkové funkce vypovídají o selhání léčby.⁽⁷²⁾ Vedle fenoménu vysoké reziduální destičkové aktivity můžeme nalézt i pojem destičková hyperreaktivita (jako vystupňovaná destičková odpověď na podání agonisty u pacientů dosud bez protideštičkové terapie).⁽⁸⁶⁾ Destičková hyperreaktivita byla popsána jako nezávislý rizikový faktor pro vaskulární komplikace u zdravých dobrovolníků, u pacientů s akutními koronárními syndromy, s hyperlipidemií, hypertenzí a diabetem, u kuřáků a u osob s revmatoidní artritidou.⁽⁸⁶⁾ Vyšší prahová („baseline“) destičková aktivita by mohla tudíž souviset s nedostatečnou mírou inhibice agregace při terapii protideštičkovými léky. Prevalence vyšší reziduální destičkové reaktivity při zavedené antiagregační terapii se značně liší v závislosti na použitém testu ke sledování destičkových funkcí – u ASA terapie se prevalence nedostatečné míry suprese destičkové odpovědi pohybuje mezi 5-60%, u clopidogrelu pak mezi 4-30% (jak bývá uváděno v literatuře). V našem souboru byla neadekvátní míra suprese destičkové aktivity při terapii kyselinou acetylsalicylovou alespoň při jednom z měření zjištěna v 16,9%, což je v souladu s literárními údaji, nicméně setrvale vysoká reziduální destičková aktivita zjištěna pouze u 1% v našem souboru. Zdá se, že „pravá rezistence“ na protideštičkové léky je při použití specifických testů velmi vzácným fenoménem.⁽⁷²⁾ K monitoraci destičkových funkcí jsme použili optickou agregometrii s kationickým propylgalátem a jako terapeutické rozmezí (ve kterém lze považovat

protidestičkovou terapii za účinnou) byly stanoveny hodnoty slope (strmosti nástupu agregační křivky po přidání induktoru agregace) 35-65%/min. Je otázkou, zda zvolený induktor agregace v dané koncentraci je vhodný pro testování efektivity protidestičkové terapie, patří mezi slabé induktory agregace a na rozdíl od AA nemá přesvědčivá data z větších studií (bude diskutováno ještě níže). Slabou stránkou naší práce je absence monitorování efektivity duální antiagregační terapie (ASA+clopidogrel), přesto, že 40,1% z naší populace mělo alespoň při jednom měření duální antiagregaci. Dat o nedostatečné míře suprese destičkové aktivity při duální antiagregaci je méně, je popisován možný vztah mezi vysokou reziduální destičkovou aktivitou při terapii clopidogrelem a ASA.⁽⁷⁴⁾

Uvádí se, že destičková reaktivita je ovlivňována řadou faktorů, včetně přidružených chorob či konkomitantní medikace. Je popisovaná interindividuální variabilita a heterogenita v destičkové odpovědi a je snaha popsat faktory ovlivňující destičkovou reaktivitu a zapříčiňující variabilitu v destičkové odpovědi. Heterogenita v destičkové odpovědi na aspirin je popsána v různých populacích. Bývá popisována vyšší prahová destičková reaktivita u ženského pohlaví.⁽⁸⁸⁾ Freedman popisuje větší supresi destičkové aktivity při ASA terapii u žen v porovnání s muži. V našem souboru osob léčených ASA nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v destičkové reaktivitě mezi muži a ženami ($p=NS$). V literatuře nebyl popsán vztah mezi destičkovou reaktivitou a markery generace trombinu, endotelové dysfunkce či fibrinolytické aktivity.⁽⁷²⁾ Je uváděn vztah vyšší lačné glykémie na agregabilitu destiček.⁽⁷²⁾ Jiní autoři uvádějí vliv hypercholesterolémie (která je zpravidla provázána zvýšenou tvorbou trombinu), BMI, špatné kompenzace diabetu. Nelze opominout ani vliv konkomitantní medikace, uvádí se, že řada léků (zejména inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu, sartany či statiny) mohou ovlivňovat destičkovou aktivaci a koagulaci, ale nebyl popsán jejich vliv na výsledky agregačních testů.⁽⁷²⁾ Gupta a Wang popisují vyšší výskyt neadekvátní/nedostatečné odpovědi na protidestičkové léky u osob se srdečním selháváním. K otázce vlivu přidružených chorob na destičkovou reaktivitu jsme se pokusili vyjádřit i v našem souboru. V obou našich měřeních se výsledky agregometrie vyjadřující míru suprese destičkové aktivity statisticky významně nelišily ve sledovaných podskupinách (pacienti s akutními koronárními syndromy, s diabetem, s hypertenzí, pacienti s anamnézou srdečního selhání). Jedinou sledovanou podskupinou, ve které jsme v našem souboru našli rozdíl byli pacienti s hyperlipidemií - byl nalezen statisticky významný rozdíl

($p < 0,05$) v míře suprese destičkové aktivity při ASA terapii mezi pacienty s hyperlipidémií a bez hyperlipidémie pro vstupní vyšetření (91,5% resp. 80,8%), při kontrolním odběru se výsledky již statisticky významně nelišily ani v této podskupině. Ale s ohledem na nízkou sílu testu nelze ani tento výsledek považovat za relevantní. I v naší práci jsme posuzovali vliv konkomitantní medikace na destičkovou reaktivitu. Účinnost ASA terapie se nelišila při terapii ACEI či statiny.

12.3. Laboratorně měřená destičková reaktivita v kardiologii – čím, kdy a proč

Vyjádřit se ke klinickému významu monitorace destičkových funkcí je poněkud problematické. Incidence je popisována mezi 14,7-26,9% při použití optické agregometrie s odpovídajícími silnými induktory agregace či VerifyNow.⁽⁷⁴⁾ Ve studiích je popisována korelace mezi nedostatečnou odpovídavostí na protideštičkové léky a výskytem MACE, ale je velká variabilita dat (v definování rezistence, v použité metodě, v použitých induktorech agregace a definovaném stupni inhibice destičkové aktivity, v definovaném sledovaném souboru), navíc chybí jasně dokumentovaný vztah mezi vysokou reziduální destičkovou aktivitou a klinickými příhodami.⁽⁸⁶⁾ Používané testy mají variabilní prediktivní sílu pro výskyt kardiovaskulárních příhod. Pro měření destičkové aktivity lze použít optickou agregometrii využívající na destičky bohatou plazmu, impedanční agregometrii z plné krve či VerifyNow.⁽⁷⁶⁾ Tyto metody jsou považovány za vhodné pro monitoraci účinnosti ASA a jsou pro ně stanoveny cut-off meze pro účinnost/neúčinnost terapie. Ostatní metody jsou považovány za méně specifické.⁽⁷⁶⁾ V rutinní praxi (zejména pokud bychom chtěli zasahovat do protideštičkové terapie na základě laboratorně získaných výsledků) je nutno znát klinické dopady. Proběhla a probíhá řada studií zaměřených na pacienty s neadekvátní inhibicí destičkové aktivity při terapii. Většinou se jednalo o menší studie, na heterogenní populaci, s použitím různých metod monitorace, s různými koncentracemi induktorů agregace, chyběly velké randomizované klinické studie. Proto přišly další studie - studie ADAPT-DES – prospektivní, observační, hodnotící výsledky VerifyNow ve vztahu k riziku trombózy ve stentu, studie GRAVITAS sleduje, zda úprava antiagregační terapie ve smyslu navýšení dávky či výměny clopidogrelu za prasugrel povede ke snížení MACE po implantaci DES.⁽⁷⁷⁾ Data ze studie ARCTIC říkají, že úprava protideštičkové terapie na základě výsledků monitorování

funkce destiček nepřináší lepší klinické výstupy. Jedná se o studii na 2440 pacientech, kteří podstoupili PCI s implantací DES stentu. Jedna skupina byla léčena na základě výsledku monitorování destičkových funkcí pomocí VerifyNow P2Y₁₂ (testování se provádělo před PCI a za 2-4 týdny po výkonu), druhá skupina sledovaných osob byla léčena konvenčně. Primární endpointy (úmrť, infarkt myokardu, trombóza ve stentu, CMP či nutnost urgentní revaskularizace) se nelišily ve sledovaných skupinách. Nebyl rozdíl ani v sekundárních endpointech (trombóza ve stentu, nutnost urgentní revaskularizace), nebyly ani rozdílně vyšší krvácivé komplikace.^(74,89) Existují důvody, proč nadále není monitorování destičkové aktivity zavedeno do rutinní klinické praxe: není jasný důkaz, že popisovaný vztah mezi laboratorně zjištěnou vysokou reziduální destičkovou aktivitou a trombotickými komplikacemi je způsoben rezistencí na lék, neexistuje konzistentní a uniformní metoda na testování destičkových funkcí, při testování není zohledňována problematika primární hemostázy, je vhodné se více zaměřit na klasické rizikové faktory, prakticky vůbec není brán v potaz průběh PCI (techniká náročnost, velikost a počty stentů, rozsah stentovaného úseku...). Nevíme ani, kdy je nejlepší čas na otestování destičkových funkcí a ani nevíme, který test nejlépe predikuje riziko trombotických příhod. U pacientů s trombózou ve stentu je popisována vyšší reziduální destičková reaktivita při terapii ASA či clopidogrelem či při duální antiagregační terapii, problémem ale zůstává interpretace výsledků testování destičkových funkcí, kdy testování bylo prováděno příliš časně po trombóze ve stentu a kdy u akutních příhod (zejména v prvních 30 dnech) je popisován hyperkoagulační stav, nelze se tudíž spolehlivě vyjádřit, zda popisovaná souvislost mezi trombózou ve stentu a vysokou reziduální destičkovou reaktivitou není jen důsledkem špatného načasování měření destičkových funkcí. U pacientů s pozdní trombózou ve stentu popisovaná vysoká reziduální destičková reaktivita při terapii clopidogrelem hraje menší roli (bývá spíše popisována u pacientů s časnou trombózou ve stentu), jako rizikový faktor má význam spíše vysoká reziduální destičková reaktivita při duální antiagregační terapii.^(64,74) Vzhledem k výše uvedeným problémům v souvislosti s měřením destičkových funkcí není zcela jasné, jak u pacientů se zjištěnou vysokou reziduální destičkovou reaktivitou postupovat. V doporučených postupech ACC (American College of Cardiology), AHA (American Heart Association) a SCAI (Society for Cardiovascular Angiography and Interventions) je doporučeno (třída IIb/ úroveň C) monitorovat účinnost protideštičkové terapie u pacientů, u kterých by potenciální trombóza ve stentu mohla být letální (postižení kmene, poslední

průchodná koronární céva....) a v případě méně než 50% inhibice destičkových funkcí navýšit dávku clopidogrelu na 150mg /den.⁽⁷⁴⁾ V doporučených postupech naší kardiologické společnosti se zatím o rutinním monitorování destičkové aktivity a optimalizaci protideštičkové terapie na základě získaných výsledků nehovoří. Některé menší studie poukazují na možnost zlepšení klinických dopadů v případě individualizace protideštičkové terapie na základě získaných výsledků (ať už navýšením dávky clopidogrelu nebo použitím nového protideštičkového léku). Z větších randomizovaných klinických studií zabývajících se strategií protideštičkové terapie na základě výsledků testování destičkových funkcí jsou to GRAVITAS, TRIGGER-PCI, ARCTIC, DANTE.⁽⁷⁴⁾ Stále ale chybí jasný důkaz o zlepšení klinického výstupu po optimalizaci destičkové terapie na základě měření stupně destičkové inhibice a získaných výsledků.⁽⁸⁶⁾ Pouze malé práce popisují, že individualizace protideštičkové terapie na základě výsledků monitorování destičkových funkcí může snížit MACE.⁽⁸⁶⁾

12.4. Testování destičkových funkcí v kardiologii a limitace metod používaných k monitorování destičkové aktivity

Dosud bylo zvykem podávat protideštičkové léky ve standardním dávkování. Vzhledem k popisované problematice velké variability v odpovědi na protideštičkové léky mezi jednotlivými pacienty a problematice trombotických komplikací i při terapii je snaha začít monitorovat účinek protideštičkových léků. Řada používaných testů nemá vysokou prediktivní hodnotu pro klinické výstupy v souvislosti se zjištěnou laboratorní vysokou reziduální destičkovou aktivitou. K významu úpravy protideštičkové terapie dle získaných výsledků není jednoznačný přístup. Z literatury vyplývá, že test ideální pro monitoraci destičkových funkcí by měl detekovat prahovou destičkovou hyperreaktivitu (týkající se osob dosud neléčených), predikovat riziko trombotických komplikací a tudíž umožnit individualizaci protideštičkové terapie na základě získaných výsledků a zároveň predikovat i krvácivé riziko.⁽⁸⁶⁾ Od testování destičkových funkcí očekáváme detekci destičkové reaktivity jak v normální populaci (neléčené) tak u osob s koronárním postižením, detekci individuální variability v destičkové reaktivitě na fixní dávky protideštičkových léků s ev. možností optimalizace protideštičkové terapie na základě získaných výsledků.⁽⁸⁶⁾ Poloautomatické testy, které máme k dispozici (a které by splnily požadavek snadnosti na zpracování, rychlosti a dostupnosti) nejsou schopny spolehlivě predikovat destičkovou hyperreaktivitu a

protrombotické riziko.⁽⁸⁶⁾ Individuální destičková odpověď na nízké dávky aspirinu je heterogenní.⁽⁷⁴⁾ Porovnání výsledků jednotlivých používaných laboratorních metod vykazuje velmi slabou nebo žádnou korelaci.^(86,90) Je popisována řada faktorů ovlivňujících výsledky a stejně tak je popisována velká variabilita získaných výsledků v průběhu střednědobého a dlouhodobého sledování v dostupné literatuře (práce popisují destičkovou reaktivitu v heterogenních souborech, za použití různých metod, s různou koncentrací induktoru, bez objektivního posouzení compliance v terapii). Při použití Bland-Altmanova testu a grafického znázornění i naše práce prokázala, že testovaná veličina (slope) oplývá nízkou mírou opakovatelnosti a vysokou mírou variability, podle čehož lze předpokládat, že existuje řada faktorů, které ji ovlivňují. Nepodařilo se nám ale vysledovat jednoznačné faktory, které by vysvětlovaly individuální změny v destičkové aktivitě v průběhu střednědobého sledování našich pacientů.

Při volbě vhodného testu je nutno zamyslet se nad řadou otázek. První otázkou je volba vhodného protisrážlivého činidla při odběru vzorků krve k vyšetření destičkových funkcí, použité protisrážlivé činidlo může totiž výsledky destičkových testů modifikovat. Dalším problémem je závislost a variabilita získaných výsledků na použitém induktoru a jeho koncentraci, proto otázkou zůstává volba vhodného stimulu k testování destičkové aktivity. Ve snaze o snížení interindividuální variability ve výsledcích je používáno vyšší koncentrace vybraného agonisty, což vede ke snížení interindividuální variability v destičkové odpovědi na medikaci, ale nedetekuje vlastní destičkovou hyperreaktivitu.⁽⁸⁶⁾ Pro možnost rutinního klinického použití chybí rovněž stanovení reproducibility používaných metod (pro stanovení reproducibility je podstatné rozlišit mezi náhodnou fluktuací výsledků a možnými stavy ovlivňujícími variabilitu výsledků).

Pro klinickou praxi jistě hraje roli správné načasování testování destičkových funkcí. U pacientů s akutními koronárními syndromy není možné stanovení prahové hyperreaktivity destiček (dosud neovlivněných antitrombotickou medikací), protože pacienti jsou léčeni kombinací protideštičkových a antikoagulačních léků již v terénu. Testování destičkových funkcí v prvních 4-6týdnech akutního koronárního syndromu může být ale značně zkresleno (v souvislosti s hyperkoagulačním stavem a koronární intervencí), přesto právě v tomto období jsou pacienti v nejvyšším riziku trombotických komplikací.⁽⁸⁶⁾ Otázkou pak je zda

testovat destičkové funkce v akutní fázi (kdy nejpíše nelze hovořit o selhání protideštičkové terapie, protože destičky jsou aktivovány jinými mechanismy, ne zcela blokovatelnými ASA) či měřit destičkové funkce nejdříve po 6 týdnech od akutní příhody, kdy dochází postupně k normalizaci hyperkoagulačního stavu a akutní zánětlivé odpovědi organismu (na druhou stranu tito pacienti ale již nejsou v nejvyšším trombotickém riziku a tudíž by tolik neprofitovali z případné úpravy terapie).⁽⁸⁶⁾ V klinické praxi není dost dobře možné demonstrovat význam úpravy protideštičkové terapie na základě výsledků testování destičkových funkcí v populaci osob se stabilními formami koronární nemoci, protože v dané skupině je velmi malý výskyt komplikujících akutních příhod.⁽⁸⁶⁾

Jednotlivé používané metody mají své limitace. Vzhledem k tomu, že v naší práci jsme použili optické agregometrie, budu se dále věnovat právě limitacím použití optické agregometrie v klinické praxi. Optická agregometrie i při použití kyseliny arachidonové jako induktoru agregace (která je specifickým agonistou pro ASA) je určité riziko nadhodnocení prevalence vysoké reziduální destičkové aktivity při terapii.⁽⁹⁰⁾ Jedná se o metodu, která není standardizovaná, protokoly se mezi jednotlivými laboratořemi liší, navíc laboratorní zpracování vzorků je dost náročné. Až donedávna byla právě optická agregometrie považována za zlatý standard k testování efektu protideštičkových léků. Mnohé studie prokazují, že výsledky optické agregometrie korelují s klinikou. Prospektivní studie Hochholzera a spolupracovníků u pacientů podstupujících elektivní koronární angioplastiku prokázala, že pacienti s vysokou reziduální destičkovou reaktivitou při terapii clopidogrelem (testovanou LTA s ADP jako induktorem agregace) mají častější nežádoucí kardiovaskulární příhody (srdeční smrt, akutní infarkt myokardu, koronární revaskularizace v následujících 30 dnech). Obdobné výsledky, kdy vysoká reziduální destičková reaktivita při terapii (měřená LTA) u pacientů s ischemickou chorobou srdeční podstupujících koronární angioplastiku byla spojena s vyšším rizikem kardiovaskulárních příhod (smrt, infarkt myokardu, cévní mozková příhoda), popisuje Geisler se svými spolupracovníky. Bounoamici s kolektivem testoval destičkové funkce pomocí LTA u pacientů podstupujících koronární angioplastiku s implantací lékového stentu, vysoká reziduální destičková reaktivita byla silným prediktorem pro trombózu ve stentu.⁽⁷⁴⁾ Je otázné, zda i pro vyšetřování efektu protideštičkových léků je nutnost pracovat s plazmou bohatou na destičky (tak jak bylo dosud zavedeno), kdy je vyšetření prováděno při stanoveném počtu trombocytů v plazmě bohaté na destičky.⁽⁷⁴⁾ Při

testování destičkové reaktivity není zcela jasné, který parametr na agregační křivce hodnotit - při měření účinnosti terapie ASA se hodnotí strmost nástupu agregační křivky po přidání induktoru a maximální amplituda, při hodnocení suprese destičkové aktivity po podání clopidogrelu je otázkou zda místo maximální agregace nesledovat pozdní fázi agregační křivky, ale nebyl prokázán rozdíl v dosažených výsledcích.⁽⁷⁵⁾ Velmi diskutabilní je použití kationického propylgalátu (který byl použit v naší práci) jako induktoru agregace k testování efektivity terapie kyselinou acetylsalicylovou. Byla popsána nízká prevalence nedostatečné účinnosti terapie ASA při použití specifických induktorů agregace (kolem 5%), zatímco při použití méně specifických induktorů agregace (mezi které kationický propylgalát patří) může prevalence ASA rezistence stoupat. Uvádí se, že vysoká reziduální destičková aktivita navzdory COX-1 inhibici, měřená pomocí agregometrie využívající kyselinu arachidonovou jako agonistu, koreluje s výskytem aterotrombotických komplikací.⁽⁷⁵⁾ Na tomto místě je vhodné zmínit se o postavení ostatních metod v testování destičkových funkcí v klinické praxi. V porovnání s agregometrií při použití metod založených na principu shear stresu (PFA-100) nelze dle výsledků usuzovat na riziko nežádoucích trombotických komplikací.⁽⁷⁴⁾ PFA-100 má v testování efektu protideštičkových léků řadu limitací – jen částečná dependence na COX-1, s tím související nižší prediktivní hodnota pro aterotrombotické příhody v porovnání s použitím COX-1 specifických testů, závislost na hladině vWf, pro tyto limitace se spíše nehodí pro monitorování efektivity protideštičkové terapie. Vedle optické agregometrie nejlepší prediktivní hodnotu stran výskytu aterotrombotických komplikací vykazovala VerifyNow Aspirin Assay.⁽⁷⁴⁾ Optická agregometrie, VerifyNow a PFA-100 poskytují obdobné výsledky, ale výsledky mezi sebou nekorelují.⁽⁹¹⁾ Rovněž při stanovení střednědobé reproducibility bylo prokázáno, že je nedostatečná při použití výše uvedených testů.⁽⁹¹⁾ I přes řadu studií rutinnímu zavedení do klinické praxe brání i nadále řada výše uvedených otázek/limitací – pokud je shrnu, jedná se zejména o neznalost prahové destičkové reaktivity před zahájením terapie (což hraje větší roli při terapii clopidogrelem než při terapii ASA), problematika definice optimálního stupně destičkové inhibice a posouzení trombotického a krvácivého rizika, absence stanovení compliance v terapii.⁽⁹²⁾ Nelze se zcela jasně vyjádřit k prognostickému potenciálu použitých metod. Limitací téměř všech prací na téma rezistence na protideštičkovou terapii je jejich nejednotná metodika, rozdílná doba, kdy se měřil účinek léku po jeho podání, různé množství použitého induktoru.⁽⁷⁷⁾

12.5. TF, TFPI, destičková reaktivita – pojítka mezi trombotickým a zánětlivým procesem?

Vzhledem k zánětlivé etiologii aterosklerózy se nabízí otázka vztahu mezi destičkovou aktivitou, trombotickým a zánětlivým procesem. Arteriální trombóza je důsledkem komplexní interakce mezi řadou komponent – aktivace destiček, koagulační/fibrinolytická aktivita, endoteliální dysfunkce a průtok krve.⁽⁷²⁾ Zánětlivé mediátory mohou aktivovat koagulační kaskádu indukci exprese TF (exprese TF je částí signalizačního procesu zánětlivé odpovědi).⁽⁸⁾ Trombogenní vliv zánětlivého procesu může být vysvětlen zvýšením aktivity TF, komplex TF/VIIa nevede přímo k aktivaci destiček, ale působí přes koagulační faktory (např. trombin...), což zvyšuje destičkovou aktivitu.⁽⁹³⁻⁹⁵⁾ Destičky ale syntetizují a exprimují TF, byl nalezen na membráně destiček i v matrix alfa granulí⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾ a byla popsána translokace a aktivace existujícího TF z intracelulárních kompartmentů na povrch trombocytů a vychytávání TF z jiných zdrojů (monocyty, polymorfonukleáry...) cestou mikropartikulí.^(12,96-98) Schwertz a kolektiv publikoval, že lidské trombocyty exprimují TF-pre-RNA, která v odpovědi na aktivaci trombocytů dozrává do mRNA, což má za následek zvýšenou expresi TF, prokoagulační aktivitu a rychlejší formaci trombu.⁽⁹⁹⁾ Svou roli hraje i hladina TFPI - snížená hladina plazmatického TFPI je spojená se zvýšeným rizikem žilní trombózy^(24,100-103) a je známo, že pacienti s akutními koronárními syndromy (v porovnání se zdravými jedinci či pacienty se stabilními formami koronární nemoci) mají zvýšené hladiny TFPI a to jak v systémové krvi, tak v krvi z koronárního sinu.⁽¹⁵⁾ Data z jiných prací (kde v souboru u pacientů se zvýšenými hladinami TF a sníženými hladinami TFPI bylo větší zastoupení osob s vysokou reziduální destičkovou aktivitou při ASA terapii)⁽¹⁰⁴⁾ rovněž podporují myšlenku, že hladiny TF a TFPI mohou být pojítkem mezi trombotickým a zánětlivým procesem. Trombogenní efekt zánětu může být vysvětlován zvýšením hladiny TF a snížením hladiny TFPI, což je provázáno zvýšením destičkové aktivity. Dosud není ale znám přesný mechanismus, kterým TF a TFPI ovlivňují účinnost protideštičkové terapie.

12.6. *Otázka významu genových polymorfismů*

Individuální odpověď na protidestičkové léky může být rovněž podmíněna geneticky. Za potenciálně protrombotické varianty, které by mohly souviset se sníženou odpovědí na terapii ASA jsou považovány a v literatuře uváděny zejména polymorfismus genu pro COX-1 (v oblasti Ser529), overexprese COX-2 mRNA na destičkách a endotelových buňkách, polymorfismus PLA1/A2 genu kódujícího IIIa (GPIIIa) a homozygoti v 807T (873A) polymorfismu, který je spojen s vyšší hustotou genů pro destičkové GP Ia/IIa kolagenové receptory. Vztah výše popsaných genových polymorfismů k nedostatečné odpovědi na ASA terapii a potažmo ke klinickým dopadům stran optimalizace terapie by mohl mít svůj význam zejména v populaci osob s vysokým kardiovaskulárním rizikem.⁽¹⁰⁵⁾ Byla nalezena silná asociace mezi polymorfismem P1a membránového receptoru GPIIIa a byl popsán i vztah mezi tímto polymorfismem a akutní koronární trombózou.⁽⁷⁰⁾ Více než otázka genových polymorfismů a ASA terapie v popředí zájmu stojí problematika genových polymorfismů (a to zejména polymorfismus CYP 2C1) a terapie clopidogrelem. Je vyšší procento osob s vysokou reziduální destičkovou aktivitou u pacientů, kteří jsou heterozygoty a homozygoty pro CYP2C19*2. Naopak více krvácivých komplikací bylo popsáno u nositelů mutace CYP2C19*17. Zatím ale je otazná souvislost mezi daným sledovaným polymorfismem, neoptimálním metabolismem a sníženou účinností clopidogrelu a klinickými dopady. Genomická podstudie v rámci studie CHARISMA prokázala vyšší riziko nežádoucích kardiovaskulárních příhod u homozygotů mutace CYP2C19 a tudíž pomalých metabolizátorů léčených clopidogrelem. Dále se udává, že nositelé P1A2 vykazují nižší stupeň inhibice destičkové aktivity po podání loading dose clopidogrelu v dávce 300mg, proto u těchto pacientů je oprávněné podání loading dose v dávce 600mg, pacienti s tímto polymorfismem jsou ve vyšším riziku trombotických komplikací po PCI.⁽⁷⁰⁾ Zcela neznámá je otázka smyslu úpravy protidestičkové terapie na základě výsledků genového testování. Sledované genové polymorfismy CYP2C19*2 jsou zodpovědné za variabilitu destičkové odpovědi pouze asi ve 12%.⁽¹⁰⁶⁾ Vzhledem k tomu, že bioaktivace prasugrelu je méně závislá na CYP systému a ticagrelol nevyžaduje bioaktivaci, je v tomto případě role genových polymorfismů méně významná. Význam testování genových polymorfismů by mohl být tam, kde je v plánu vysoce vysoce riziková koronární intervence (kmen levé koronární tepny, poslední průchodná tepna...) s cílem optimalizovat terapii se znalostí rizikového genového profilu.

12.7. Jak léčit v případě vysoké reziduální destičkové reaktivity

Aspirin byl dlouhou dobu jediným dostupným protideštičkovým lékem, bylo popsáno, že dávka 75mg/den blokuje více než z 90% tvorbu tromboxanu A₂, proto byla stanovena jako obecně účinná dávka ASA 75-150mg. Vzhledem k laboratorně popisované vysoké reziduální destičkové aktivitě při terapii ASA další otázkou do diskuze je, jak postupovat v terapii v případě, že detekujeme nedostatečnou míru suprese destičkové aktivity při zavedené terapii. Pomýšlelo se, že nedostatečnou míru suprese destičkové aktivity by mohlo překonat navýšení dávky, ale byla popsána nedostatečná odpovídavost na terapii i při dávce ASA 1300mg/den. Další možností jak překonat vysokou reziduální destičkovou reaktivitu je přidání jiného protideštičkového léku. Ani přidání clopidogrelu do terapie u pacientů se sníženou odpovídavostí na ASA nemusí vést k lepším výsledkům, protože existuje fenomén rezistence na duální antiagregaci,⁽⁷⁴⁾ pacienti s vyšší reziduální destičkovou aktivitou při terapii ASA mívají zpravidla vyšší reziduální destičkovou aktivitu při terapii clopidogrelem. V takovém případě by možností bylo použití nových P2Y₁₂ inhibitorů, kdy nově dostupné léky by měly být potentními inhibitory agregace trombocytů (měly by vykazovat rychlejší nástup a větší míru antiagregačního účinku). Ukazují se jako vysoce účinné zejména v akutní fázi infarktu myokardu.⁽⁶⁰⁾ A mají již své postavení v terapii akutních koronárních syndromů i dle doporučení Evropské kardiologické společnosti. Otázkou individualizace protideštičkové terapie na základě testování destičkových funkcí se zabývají některé klinické studie (z nichž některé byly již uvedeny výše) - GRAVITAS, RECLOSE 2 ACS, TRIGGER-PCI, DANTE, ARCTIC.⁽⁷⁴⁾ GRAVITAS prokázala, že u pacientů s vysokou reziduální destičkovou aktivitou navýšení dávky clopidogrelu nesnížilo výskyt MACE.^(90,107) RECLOSE 2 ACS studie rovněž prokázala, že navýšení dávky clopidogrelu nemá klinický dopad. Nová data ze studie ARCTIC říkají, že úprava protideštičkové terapie na základě výsledků monitorování funkce destiček nepřináší lepší klinické výstupy.⁽⁸⁹⁾ Dosud tedy nejsou k dispozici data z velkých multicentrických studií, která by podporovala teorii úpravy protideštičkové terapie na základě výsledků monitorování destičkových funkcí.

12.8. Další úskalí

Na závěr diskuze považuji za vhodné shrnout podrobněji další úskalí (o kterých jsem se již krátce zmínila výše) při monitoraci destičkových funkcí. Velmi podstatnou otázkou je správné

načasování testování destičkových funkcí. Je nutno posoudit nakolik sledování reziduální destičkové aktivity při terapii v časové souvislosti s prováděním perkutánní koronární intervence (kdy je trombogenní potenciál nejvyšší právě v souvislosti s možným poškozením cévní stěny při intervenci a uvolněním trombinu jako mohutného induktoru agregace destiček) vyjadřuje míru účinnosti/neúčinnosti protideštičkové terapie. Je obecně známo, že trombinem indukovaná agregace destiček je fenomén neblokovatelný protideštičkovými léky. Proto nejspíše nelze hovořit o selhání protideštičkové léčby, vysoká reziduální destičková reaktivita může být pouhým projevem hyperkoagulačního stavu obecně.

Pro rutinní klinické monitorování destičkových funkcí je potřeba zvolit/najít optimální test k měření destičkových funkcí (pokud nějaký takový vůbec existuje). Je obecně známo, že destičky jsou velmi citlivé na nejrůznější zevní podněty, které by mohly ovlivnit jejich aktivitu. Při odběru krevních vzorků je běžně používané antikoagulační činidlo citrát, který ale může ovlivňovat intracelulární koncentraci kalcia (a kalcium má vliv na destičkové funkce), proto pak je vhodné zamyslet se nad tím, zda nepoužívat spíše hirudin (který je jako antikoagulant používán při sledování destičkových funkcí metodou MULTIPLATE), jiným možným antikoagulačním činidlem k použití je chloromethyl keton.⁽¹⁰⁸⁾ Dalším problémem je vhodný stimulus agregace, který by co nejvíce napodoboval fyziologickou stimulaci trombocytů in vivo.

Není zcela jasné, zda je vysoká reziduální reaktivita destiček modifikovatelným faktorem, zda je možné ji překonat použitím jiných protideštičkových léků či navýšením dávky léku. Zcela chybí testování prahové hodnoty destičkové aktivity před zahájením antiagregační terapie. Otázka prahové destičkové reaktivity je podstatná zejména pro terapii clopidogrelem, ne tolik pro terapii ASA. Posouzením prahové destičkové aktivity před podáním clopidogrelu se zabývala studie PRINCIPLE-TIMI 44. Byl popsán vztah prahové (intrinsické) destičkové aktivity po podání ADP před podáním blokátoru P2Y₁₂ receptoru a reziduální destičkové aktivity po blokádě P2Y₁₂ – hyper-respondéři na ADP před zahájením terapie (ať už clopidogrelem či prasugrelem) zůstávají hyper-respondéry i při zavedené protideštičkové terapii.⁽¹⁰⁶⁾ Jedná se o dvojitě zaslepenou kontrolovanou studii u pacientů podstupujících elektivní PCI a porovnáván je prasugrel a vyšší sytící a udržovací dávka clopidogrelu. K testování destičkových funkcí bylo použito optické agregometrie. Byla popsána korelace mezi destičkovou reaktivitou před zahájením terapie ADP blokátory a destičkovou reaktivitou při

terapii.⁽¹⁰⁶⁾ U pacientů podstupujících plánovanou koronární intervenci pak bylo prokázáno, že vlastní vnitřní reaktivita destiček na ADP před podáním blokátoru P2Y₁₂ koreluje s reziduální destičkovou reaktivitou při terapii. Pacienti s vyšší intrinickou destičkovou reaktivitou vykazují setrvale vyšší reziduální destičkovou reaktivitu i při terapii clopidogrelem ve vyšší dávce ve srovnání a pacienty s nižší intrinickou destičkovou aktivitou.⁽¹⁰⁶⁾ Naopak u pacientů léčených prasugrelem je stupeň inhibice destičkové reaktivity nezávislý na vnitřní destičkové reaktivitě před terapií.⁽¹⁰⁶⁾ Výsledky z této studie byly reprodučibilní při použití různých metod a v čase (v průběhu 15 dní).⁽¹⁰⁶⁾ Čímž se prasugrel stává lékem s výhodnějším farmakologickým profilem v porovnání s clopidogrelem. Pacienti s destičkami, jejichž reaktivita je vyšší již před zahájením protideštičkové terapie jsou tedy v možném vyšším riziku trombotické komplikace a tudíž by mohli profitovat z agresivnější protideštičkové terapie.⁽¹⁰⁶⁾

A jaké je tedy postavení testování destičkových funkcí v současné klinické praxi?

Mají velmi limitovanou schopnost detekovat destičkovou hyperreaktivitu, protrombotické či krvácivé riziko u dosud neléčených (zdravých) jedinců. Popisovaná vysoká reziduální destičková reaktivita je vysoce závislá na použitém testu a použitém agonistovi. Zatím chybí test, který by napodoboval fyziologické podmínky stimulace destičkové agregace a zároveň by byl vhodný pro klinické použití.⁽⁸⁶⁾ A stejně tak v dostupných studiích chybí i objektivizované posouzení compliance (jako jedné z nejčastějších příčin vysoké reziduální destičkové aktivity při terapii). Je sporné zda na základě výsledků monitorování destičkových funkcí můžeme predikovat výskyt MACE a měnit protideštičkovou terapii.⁽⁸⁶⁾

12.9. Limitace práce

Optická agregometrie byla dosud považována za zlatý standard k monitorování destičkových funkcí. Problémem je absence standardizovaného protokolu vyšetření, metoda nenapodobuje fyziologické podmínky aktivace trombocytů, otazná je rovněž volba vhodného induktoru agregace (kationický propylgalát dle literárně uváděných údajů není považován za dostatečně specifický pro monitorování efektu ASA, je řazen mezi tzv. slabé a nespecifické induktory agregace) a proto je vysoké riziko falešně pozitivních výsledků. Další jistou limitací naší práce je použití pouze jedné metody k testování efektivity protideštičkové terapie, získané výsledky nebyly porovnávány s jinou používanou metodou. Za další limitaci studie považuji, že nebyla věnována dostatečná pozornost fenoménu vysoké reziduální destičkové reaktivity při duální antiagregaci. V naší práci jsme se zameřili zejména na sledování destičkové reaktivity při terapii kyselinou acetylsalicylovou ve standardním dávkování, přestože, že část naší sledované populace byla na duální antiagregační terapii v době prováděných vyšetření. Problematika destičkové aktivity při terapii clopidogrelem je mnohem komplexnější (a zejména u clopidogrelu se nabízí v současné době otázka významu genových polymorfismů v souvislosti s optimalizací antiagregační terapie, v managementu a terapii se nabízí rovněž možnost použití nových blokátorů receptoru P2Y₁₂). Další limitací je otázka načasování vyšetření destičkových funkcí (dosud nevíme, zda testování destičkových funkcí v akutní fázi koronárního syndromu není poněkud zavádějící a zda zjištěná vyšší reziduální destičková reaktivita v tomto období není důsledkem probíhajícího hyperkoagulačního stavu než projevem „neúčinnosti“ podávaných léků). Další limitací a možnou příčinou variability výsledků je testování pacientů v časové návaznosti na perkutánní koronární intervenci (kdy v důsledku poranění cévní stěny dochází k uvolnění trombinu), kdy je agregace trombocytů indukována řadou jiných mechanismů, které nejsou blokovatelné protideštičkovými léky. Další neopominutelnou limitací studie je absence objektivního průkazu pravidelného užívání protideštičkových léků při kontrolním odběru (s nutností spolehnout se pouze na údaj o užívání daného léku ze strany pacienta), protože noncompliance v terapii je nadále jednou z nejčastějších příčin nedostatečného efektu protideštičkové terapie. Možností jak tuto skutečnost objektivizovat by jistě bylo sledování hladiny metabolitů kyseliny acetylsalicylové v moči, které bohužel nebylo prováděno.

13. ZÁVĚR:

Vedle intervenčních metod má nadále v léčbě ischemické choroby srdeční nezastupitelné postavení farmakoterapie. Jedním z pilířů terapie, který má dopad na mortalitu (mortalitní data jsou podpořena výsledky řady velkých randomizovaných studií), je protideštičková terapie. Avšak i přes standardně vedenou protideštičkovou terapii nejsme schopni predikovat výskyt trombotických komplikací. Předpokladem dobré léčebné strategie je porozumění patofyziologickým mechanismům aterotrombózy a koagulační kaskády a mechanismu účinku protideštičkových léků. V současné době vedle klasických rizikových faktorů aterosklerotického procesu (hypertenze, diabetes mellitus, dyslipidémie, kouření, pozitivní rodinná zátěž) byl popsán vztah mezi trombotickým a zánětlivým procesem a vztah mezi vysokou reziduální destičkovou aktivitou při terapii a kardiovaskulárním rizikem. Trombogenní efekt zánětu může být vysvětlován zvýšením hladiny TF a snížením hladiny TFPI provázeným zvýšením destičkové aktivity. Přesný mechanismus jakým hladiny TF olivňují účinnost protideštičkové terapie není ovšem dosud znám. V souvislosti s protideštičkovou terapií byla snaha o její optimalizaci a byly hledány možnosti jejího monitorování (podobně jako například u warfarinu). Do popředí se tudíž dostal fenomén nedostatečné odpovídavosti na protideštičkové léky a myšlenka, že vysoká reziduální destičková reaktivita při standardně vedené protideštičkové terapii je dalším nezávislým rizikovým faktorem trombotických komplikací. Problematika vysoké reziduální destičkové reaktivity zůstává i nadále ožehavým tématem. Zejména v době, kdy máme k dispozici celou řadu nových protideštičkových léků, jejichž výhodou by měla být lepší inhibice destičkových funkcí, zpravidla s rychlejším nástupem účinku a komplexnějším protideštičkovým působením. V řadě studií byl popsán častější výskyt trombotických komplikací u osob s laboratorně zjištěnou vysokou reziduální destičkovou aktivitou. Jak již bylo uvedeno hlavní limitací všech studií byla absence jednotné definice problému, absence standardizované metody k testování destičkových funkcí (která by napodobovala fyziologické mechanismy aktivace trombocytů, která by měla přesně definovanou koncentraci použitého induktoru agregace, která by byla standardizovaná pro všechny laboratoře a zároveň by byla jednoduchá, rychle dostupná, časově nenáročná, s jednoduše stanovitelnou specificitou a senzitivitou), rovněž absence jasné korelace mezi laboratorně zjištěnými výsledky měření destičkových funkcí a klinickým dopadem (problémem byly malé studijní populace, testované rozdílnými nestandardizovanými

metodami, kdy nebyly dobře posuzovány všechny možné faktory, které by mohly být příčinou trombotické komplikace – kupříkladu vlastní průběh koronární intervence s možnými technickými příčinami vedoucími k trombotické komplikaci). Zároveň zcela chybí objektivní průkaz compliance v terapii. Názory na úpravu protideštičkové terapie podle výsledků laboratorního monitorování destičkových funkcí se různí. Dosud nebyly zcela jednoznačně prokázány výhody optimalizace terapie na základě získaných laboratorních výsledků. Dosud není rutinní monitorování destičkových funkcí součástí doporučených postupů české kardiologické ani Evropské kardiologické společnosti, pouze v doporučených postupech americké kardiologické společnosti se objevuje zmínka o úpravě protideštičkové terapie na základě měření destičkových funkcí u vysoce rizikových pacientů. I z našich závěrů pro klinickou praxi vyplývá, že rutinní zavedení testování destičkových funkcí do klinické praxe naráží na řadu úskalí. Jedním z nich je potřeba správné definice daného problému (rezistence na terapii, či reziduální destičková aktivita či selhání léčby), čímž se ale naše práce nezabývala. Rovněž se naše práce nezabývala hledáním vhodné metody ke sledování destičkové reaktivity při zavedené terapii, byla zvolena optická agregometrie. Optická agregometrie by měla dle dostupných literárních údajů být jednou ze tří metod, jejichž výsledky při měření destičkové aktivity korelují s klinickými dopady. Jedním z cílů naší práce mělo být i posouzení klinického dopadu laboratorně změřené destičkové aktivity při terapii ASA. Naši vyšetření pacienti byli ve druhé době písemně formou dotazníku osloveni s cílem zjištění případných kardiovaskulárních příhod (známky a příznaky koronárních či cerebrovaskulárních příhod či kardiálního selhávání, hospitalizace pro kardiovaskulární komplikace – akutní koronární syndromy, onemocnění periferních cév či cévní mozkové příhody, úmrtí z kardiovaskulárních příčin). Bohužel návratnost rozeslaných dotazníků byla příliš nízká pro další možné statistické zpracování a relevantní posouzení vztahu laboratorních výsledků a klinického stavu, proto tento původně vytyčený cíl zůstal nesplněn a ani v naší práci se nedokážeme vyjádřit ke korelaci mezi laboratorním měřením a získanými laboratorními výsledky a klinikou. Ze splněných cílů jsme charakterizovali sledovaný soubor pacientů z pohledu možného vztahu mezi vysokou reziduální destičkovou aktivitou a komorbiditami či konkomitující medikací. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v destičkové aktivitě mezi pohlavími či v závislosti na jiných chorobách (akutní koronární

syndromy, diabetes mellitus, arteriální hypertenze, hyperlipidémie, srdeční selhání). Ani v souvislosti se současně podávanými léky nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v destičkové reaktivitě. Dalším ze splněných cílů bylo vyjádření se k variabilitě získaných výsledků. Při střednědobém sledování (v průběhu měsíců) naše výsledky vykazují vysokou míru variability a malou míru reproducibility při použití optické agregometrie s kationickým propylgalátem. Navíc získané výsledky se v čase mění i bez zásahu do terapie (respektive po celou dobu byli pacienti na standardní dáce ASA 100mg/den, dávka nebyla měněna, nicméně objektivní posouzení compliance v terapii pacientů chybí, museli jsme se spolehnout pouze na údaj o užívání léků ze strany pacienta). V naší práci tak nebyl nalezen jednoznačný vysvětlující a potenciálně ovlivnitelný faktor daného fenoménu, problém jistě vyžaduje další podrobnější výzkum. Při podrobnějším sledování získaných dat pro jednotlivé sledované podskupiny souboru lze vyzorovat jistý trend v čase (byť nebylo dosaženo statistické významnosti). Při kontrole se zdá trend k poklesu procentuálního zastoupení osob s vysokou reziduální destičkovou aktivitou a to jak ve skupině osob s akutními koronárními syndromy, tak u diabetiků, hypertoniků a osob s hyperlipidémií, obdobně je tomu pro zastoupení naopak osob s dostatečnou supresí destičkové aktivity při terapii ASA v čase. Obecně lze říci, že naše práce poukazuje na značnou interindividuální variabilitu destičkových funkcí (aniž by byl nalezen jednoznačný vysvětlující faktor), na problematiku otázku možnosti testování destičkových funkcí (s řadou výše uvedených limitací) a zejména pak na velmi ožehavou otázku, zda na základě laboratorních výsledků zasahovat do zavedené terapie. Měla by přispět k lepšímu pochopení komplexní problematiky ischemické choroby srdeční a optimalizace strategie její léčby.

14. CITACE:

1. VOJÁČEK J, KETTNER J. *Klinická kardiologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus, 2009. 932s. ISBN-13: 978-80-87009-58-1. Kapitola 2, Ischemická choroba srdeční, s. 93-209.
2. BĚLOHLÁVEK J, ASCHERMANN M. Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu akutních koronárních syndromů bez elevací ST úseků na EKG. *Cor Vasa*, 2008, vol 50 (Suppl), s. 1S7–1S23.
3. THYGESEN K, ALPERT JS, JAFFE AS et al.: theWriting Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third universal definition of myocardial infarction European. *Heart Journal*, 2012, vol. 33, s. 2551–2567.
4. WIDIMSKÝ P, HLINOMAZ O, KALA P et al. Diagnostika a léčba akutního infarktu myokardu s elevacemi ST. *Cor Vasa*, 2009, vol. 51, no. 10, s. 724-740.
5. SCHOENBECK U, MACH F, SUKHOVA GK et al. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol*, 2000, vol. 156, no. 1, s. 7-14.
6. WILCOX JN, SMITH KM, SCHWARTZ SM et al. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, vol. 86, no. 8, s.2839-2843.
7. GIESEN PL, NEMERSON Y. Tissue factor on the loose. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2000, vol. 26, no. 4, s. 379-384.

8. RAO LV, PENDURTHI UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, vol. 25, no. 1, s. 47-56.
9. MALLAT Z, HUGEL B, OHAN J et al. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: A role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*, 1999, vol. 99, no. 3, s. 48-53
10. STEPPICH BA, BRAUN SL, STEIN A et al. Plasma TF activity predicts cardiovascular mortality in patients with acute myocardial infarction. *Thrombosis Journal*, 2009, vol. 7, s. 11-19.
11. VOJACEK J, DUSEK J, BIS J et al. Plasma tissue factor in coronary artery disease: further step to the understanding of the basic mechanisms of coronary artery thrombosis. *Physiol Res*, 2008, vol. 57, no. 1, s. 1-5.
12. BREITENSTEIN A, TANNER FC, LÜSCHER TF. Tissue Factor and Cardiovascular Disease: Quo Vadis? *Circ J*, 2010, vol. 74, no. 1, s. 3-12.
13. BIS J, VOJACEK J, DUSEK J et al. Time-course of tissue factor plasma level in patients with acute coronary syndrome. *Physiol Res*, 2009, vol. 58, no. 5, s. 661-667.
14. MORANGE PE, BLANKENBERG S, ALESSI MC et al. Prognostic value of plasma tissue factor and tissue factor pathway inhibitor for cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. *J Thromb Haemost*, 2007, vol. 5, no. 3, s. 475-482.

15. CAMPO G, VALGIMIGLI M, FERRARESI P et al. Tissue factor and coagulation factor VII levels during acute myocardial infarction: association with genotype and adverse events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, vol. 26, no. 12, s. 2800-2806.
16. SELJEFLOT I, HURLEN M, HOLE T et al. Soluble tissue factor as predictor of future events in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Res*, 2003, vol. 111, no. 6, s. 369-372.
17. ROLDAN V, MARIN F, FERNANDEZ P et al. Tissue factor/tissue factor pathway inhibitor system and long-term prognosis after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 2001, vol. 78, no. 2, s. 115-119.
18. MALARSTIG A, TENNO T, JOHNSTON N et al. Genetic variations in the tissue factor gene are associated with clinical outcome in acute coronary syndrome and expression levels in human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, vol. 25, no. 12, s. 2667-2672.
19. MOREL O, PEREIRA B, AVEROUS G et al. Increased levels of procoagulant tissue factor-bearing microparticles within the occluded coronary artery of patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Role of endothelial damage and leukocyte activation. *Atherosclerosis*, 2009, vol. 204, no. 2, s. 636-641.
20. HUISSE MG, AJZENBERG N, FELDMAN L et al. Microparticle-linked tissue factor activity and increased thrombin activity play a potential role in fibrinolysis failure in ST-segment elevation myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 2009, vol. 101, s. 734-740.

21. BROZE GJ Jr, GIRARD TJ, NOVOTNY WF. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, no. 33, s. 7539-7546.
22. NOVOTNY WF, GIRARD TJ, MILETICH JP et al. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood*, 1988, vol. 72, no. 6, s. 2020-2025.
23. MARONEY SA, HABERICHTER SL, FRIESE P et al. Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 5, s. 1931-1937.
24. BROZE GJ Jr, LANGE GW, DUFFIN KL et al. Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1994, vol. 5, no. 4, s. 551-559.
25. POUL H. Protidestičková terapie. *Klin Farmakol Farm*, 2012, vol. 26, no. 2, s. 79–82.
26. JENNINGS LK. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 2009, vol. 102, no. 2, s. 248–257.
27. BRASS LF. Thrombin and platelet activation. *Chest*, 2003, vol. 124 (3 Suppl), s. 18S-25S.
28. DAVI G, PATRONO C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*, 2007, vol. 357, no. 24, s. 2482–2494.
29. VARGA-SZABO D, PLEINES I, NIESWANDT B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, vol. 28, no. 3, s. 403–412.

30. OFFERMANN S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*, 2006, vol. 99, no. 12, s. 1293–1304.
31. MANN KG. Thrombin formation. *Chest*, 2003, vol. 124 (3 Suppl), s. 4S-10S.
32. BRUMMEL KE, PARADIS SG, BUTENAS S et al. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*, 2002, vol. 100, no. 1, s. 148–152.
33. VU TK, HUNG DT, WHEATON VI et al. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991, vol. 64, s. 1057–1068.
34. COUGHLIN SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, 2005, vol. 3, no. 8, s. 1800–1814.
35. LEGER AJ, COVIC L, KULIOPULOS A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation*, 2006, vol. 114, no. 10, s. 1070–1077.
36. LANDIS RC. Protease activated receptors: clinical relevance to hemostasis and inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007, vol. 21, no. 1, s. 103–113.
37. MARTORELL L, MARTINEZ-GONZALES J, RODRIGUEZ C et al. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 2008, vol. 99, no. 2, s. 305–315.
38. BOUCHARD BA, TRACY PB. Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol*, 2001, vol. 8, no. 5, s. 263–269.
39. HEEMSKERK JW, BEVERS EM, LINDHOUT T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*, 2002, vol. 88, no. 2, s. 186–193.

40. STOREY RF, SANDERSON HM, WHITE AE et al. The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *Br J Haematol*, 2000, vol. 110, no. 4, s. 925–934.
41. ZIEGLER S, POULSEN TS, MICKLEY H et al. Von Willebrand factor release induced by endotoxin. *J Laborat Clin Medicine*, 1989, vol. 113, s. 118–122.
42. REX S, BEAULIEU LM, PERLMAN DH et al. Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signaling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release. *Thromb Haemost*, 2009, vol. 102, no.1, s. 97-110.
43. FITZGERALD DJ, ROY L, CATELLA F et al. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med*, 1986, vol. 315, no.16, s. 983-989.
44. KAIKITA K, OGAWA H, YASUE H et al. Tissue factor expression on macrophages in coronary plaques in patients with unstable angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, vol. 17, no. 10, s. 2232-2237.
45. TOSCHI V, GALLO R, LETTINO M et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 1997, vol. 95, no. 3, s. 594-599.
46. SHIRAKI R, INOUE N, KAWASAKI S et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res*, 2004, vol. 113, no.6, s. 379–85
47. GURBEL PA, BLIDEN KP, KREUTZ RP ET AL. The link between heightened thrombogenicity and inflammation: Pre-procedure characterization of the patient at high risk for recurrent events after stenting. *Platelets*, 2009, vol.20, no. 2, s. 97-104.

48. POSTON R, GU J, WHITE C et al. Perioperative management of aspirin resistance after off-pump coronary artery bypass grafting: possible role for aprotinin. *Transfusion*, 2008, vol. 48(1 Suppl), s. S39–S46.
49. Kol. autorů. Nesteroidní protizánětlivé léky, *Pace News* 2/2002
50. ŠEVČÍKOVÁ H, VOJÁČEK J, PUDIL R et al. Rezistence na protidestičkovou terapii v kardiologické praxi. *Interv Akut kardiol*, 2006, vol. 5, s. 256-258.
51. KARETOVÁ D, BULTAS J. Rezistence na aspirin – laboratorní odchylka nebo klinický problém? *Interní Med*, 2005, vol. 1, s. 10–13.
52. BODE Ch, HUBER K. Antiplatelet therapy in percutaneous coronary intervention. *European Heart Journal Supplements*, 2008, vol. 10 (A Suppl), s. A13-A20.
53. McKEE SA, SANE DC, DELIARGYRIS EN. Aspirin resistance in cardiovascular disease: A review of prevalence, mechanismus and clinical significance. *Thromb Haemost*, 2002, vol. 88, no. 5, s. 711–715.
54. GITT AK, BETRIU A. Antiplatelet therapy in acute coronary syndromes. *European Heart Journal Supplements*, 2008, vol. 10 (A Suppl), s. A4-A12.
55. PETO R, GRAY R, COLLINS R et al. Randomised trial of prophylactic daily aspirin in British male doctors. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1988, 296, s 313-316.
56. The Medical Research Council's General Practice Research Framework Thrombosis Prevention Trial: randomised trial of low-intensity oral anticoagulation with warfarin and low-dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men in increased risk. *Lancet*, 1998, 351, s 233-241.

57. HANSSON L, ZANCHETTI A, CARRUTHERS SG et al. Effects of intensive blood pressure lowering and low dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. *Lancet*, 1998, 351, s 1755-1762.
58. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. Low dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. *Lancet*, 2001, 357, s 89-95.
59. STOREY RF. Variability of response to antiplatelet therapy. *European Heart Journal Supplements*, 2008, vol. 10 (A Suppl), s. A21-A27.
60. VARVAŘOVSKÝ I. Uvidíte brzy i v našich kinech: prasugrel, ticagrelor a STEMI. *Interv Akut Kardiol*, 2012, vol. 11, no. 5-6, s. 197-200.
61. CATTANEO M. Update on antithrombotic therapy, new P2Y₁₂inhibitors. *Circulation*, 2010, vol. 121, s. 171-179.
62. JI X, HOU M. Novel agents for anti-platelet therapy. *Journal of Hematology and Oncology*, 2011, vol. 4, s. 44.
63. MALÝ J. Rezistence na kyselinu acetylsalicylovou. *Interv Akut Kardiol*, 2005, vol. 4, no. 4, s. 192–193.
64. SEIDEL H, RAHMAN MM, SCHARF RE. Monitoring of antiplatelet therapy Current limitations, challenges, and perspectives. *Haemostaseologie*, 2011, vol. 31, no. 1, s. 41-51.
65. EIKELBOOM JW, HIRSH J, WEITZ JI et al. Aspirin resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation*, 2002, vol. 105, no. 14, s. 1650-1655.

66. WANG TH, BHATT DL, TOPOL EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eurheartj*, 2006, 27, s 647-654.
67. DELIARGYRIS EN, BOUDOLAS H. Aspirin resistance. *Hellenic Journal of Cardiology*, 2004, vol. 45, s 1-5.
68. STEJSKAL D, VÁCLAVÍK J, LAČŇÁK B et al. Aspirin resistance measured by cationic propylgallate platelet aggregometry and recurrent cardiovascular event during 4 years of follow-up. *Eur J Intern Med*, 2006, 17 (5), s 349-354.
69. MICHOS ED, ARDEHALI R, BLUMENTHAL RS et al. Aspirin and clopidogrel resistance. *Mayo Clin Proc*, 2006, vol. 81, no. 4, s. 518–526.
70. MOTOVSKA Z, WIDIMSKY P, KVASNICKA J et al. High loading dose of clopidogrel in unable to satisfactorily inhibit platelet reactivity in patients with glycoprotein IIIA gene polymorphism: a genetic substudy of PRAGUE-8 trial. *Blood Coagulation and fibrinolysis*, 2009, vol. 20, no. 4, s. 257-262.
71. KAMPHUISEN PW. Thrombogenicity in patients with percutaneous coronary artery intervention and dual antiplatelet treatment. *Eur Heart J*, 2008, vol. 29, no. 14, s. 1699-1700.
72. YANO Y, OHMORI T, HOSHIDE S et al. Determinants of thrombin generation, fibrinolytic activity, and endothelial dysfunction in patients on dual antiplatelet therapy: involvement of factors other than platelet aggregability in Virchow's triad. *Eur Heart J*, 2008, vol. 29, no. 14, s. 1729-1738.
73. BEDNÁŘ F, OSMANČÍK P, VANĚK T et al. Aspirinová rezistence po aortokoronárním bypasmu. *Cor Vasa*, 2010, vol. 52 (1 Suppl), s. S52-S58.
74. BREET NJ et al. *Monitoring Antiplatelet Therapy in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention* [online]. c 2011, ISBN: 978-90-9026116-4

75. GACHET CH, ALEIL B. Testing antiplatelet therapy. *European Heart Journal Supplements*, 2008, vol. 10 (A Suppl), s. A28-A34
76. KULICZKOWSKI W, WITKOWSKI A, POLONSKY L et al. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working group on thrombosis of the European Society of cardiology. *European Heart Journal*, 2009, vol. 30, s. 426-435.
77. OSMANČÍK P, PAULŮ P, TOUŠEK P et al. Měření aktivity trombocytů a účinnosti antiagregační léčby. *Cor Vasa*, 2010, vol. 52 (1 Suppl), s. S15-S21.
78. VOJÁČEK J, MALÝ M et al. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. 276 s. ISBN 80-247-0501-X. Kapitola 5, Funkce krevních destiček, s. 64-66.
79. LORDKIPANIDZÉ M, PHARAND C, NGUYEN TA et al. Comparison of four tests to assess inhibition of platelet function by clopidogrel in stable coronary artery disease patients. *Eur Heart J*, 2008, vol. 29, no. 23, s.2877-2885.
80. LORDKIPANIDZÉ M, PHARAND CH, SCHMAPAERT E et al. A comparison of six major platelet function test to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*, 2007, vol. 28, no. 14, s. 1702-1708.
81. HARRISON P, FRELINGER AL, FURMAN MI et al. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thrombosis Research*, 2007, vol. 120, no. 3, s. 323-336.
82. PANICCIA R, ANTONUCCI E, MAGGINI N et al. Assessment of platelet fiction on whole blood by multiple electrode aggregometry in high- risk patients with coronary artery

- disease receiving antiplatelet therapy. *Am J Clin Pathol*, 2009, vol. 131, no. 6, s. 834-842.
83. HANKE AA, ROBERG K, MONACA E et al. Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate). *J Med Res*, 2010, vol. 15, no. 5, s. 214-219.
84. MANSOUR K, TAHER AT, MUSALLAM KM et al. Aspirin resistance. *Advances in Hematology*, 2009, 937352.
85. BLAND JM, ALTMAN DG. Measuring agreements in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*, 1999, vol. 8, no. 2, s. 135-160.
86. GOROG DA, FUSTER V. Platelet function tests in clinical cardiology. *J Am Cardiol*, 2013, vol. 61, no. 21, s. 2015-2029.
87. GURBEL PA, MAHLA E, ANTONIO MJ et al. Response variability and the role of platelet function testing. *The Journal of invasive cardiology*, 2009, vol. 21, no. 4, s. 172-178.
88. FREEDMAN JE. The Aspirin resistance controversy. Clinical entity or platelet heterogeneity. *Circulation*, 2006, vol. 113, no. 25, s. 2865-2867.
89. COLLET JP, CUISSET T, RANGÉ G et al. Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting. *N Engl J Med*, 2012, vol. 367, no. 22, s. 2100-2109.
90. CATTANEO M. The clinical relevance of response variability to antiplatelet therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, s. 70-75.
91. HARRISON P, SEGAL HM, SILVER L et al. Lack of reproducibility of assessment of aspirin responsiveness by optical aggregometry and two platelet function tests. *Platelets*, 2008, vol. 19, no. 2, s. 119-124.

92. SEREBRUARY VL, GOTO S. The challenge of monitoring platelet response after clopidogrel. *Eur Heart J*, 2008, vol. 29, no. 23, s. 2833-2834.
93. ALTMAN R, LUCIARDI HL, MUNTANER J et al. The antithrombotic profile of aspirin. Aspirin resistance, or simply failure? *Thromb J*, 2004, vol. 2, no.1, s. 1.
94. ESMON CT. Inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2003, vol. 1, no. 7, s. 1343-1348.
95. ESMON CT. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturita*, 2008, vol. 61, no. 1-2, s. 122-131.
96. PANES O, MATUS V, SAEZ CG et al. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood*, 2007, vol. 109, no. 12, s. 5242 – 5250.
97. PEREZ- PUJOL S, ARAS O, LOZANO M et al. Stored platelets contain residual amounts of tissue factor: Evidence from studies on platelet concentrates stored for prolonged periods. *Transfusion*, 2005, vol. 45, no. 4, s. 572 – 579.
98. RAUCH U, BONDERMAN D, BOHRMANN B et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood*, 2000, vol. 96, no. 1, s. 170 – 175.
99. SCHWERTZ H, TOLLEY ND, FOULKES JM et al. Signal-dependent splicing of tissue factor premRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med*, 2006, vol. 203, no. 11, s. 2433-2440.

100. DUCKERS C, SIMIONI P, SPIEZIA L et al. Low plasma levels of tissue factor pathway inhibitor in patients with congenital factor V deficiency. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 9, s. 3615-3623.
101. DAHM A, Van HYLCKAMA, VLIEG A et al. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood*, 2003, vol. 101, no. 11, s. 4387-4392.
102. ARIENS RA, ALBERIO G, MOIA M et al. Low levels of heparin-releasable tissue factor pathway inhibitor in young patients with thrombosis. *Thromb Haemost*, 1999, vol. 81, no. 2, s. 203-207.
103. AMINI-NEKOO A, FUTERS TS, MOIA M et al. Analysis of the tissue factor pathway inhibitor gene and antigen levels in relation to venous thrombosis. *Br J Haematol*, 2001, vol. 113, no. 2, s. 537-543.
104. VOJACEK J, SEVCIKOVA H, SEVCIK R et al. Increased platelet residual activity in patients treated with acetosalicylic acid is associated with increased tissue factor and decreased tissue factor pathway inhibitor plasma levels. *Int J Cardiol*, 2011, vol. 146, no. 3, s. 479-481.
105. CAMBRIA-KIELY JA, SANDHI J. Aspirin resistance and genetic polymorphisms. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 2002, vol. 14, no. 1, s. 51-58.
106. FRELINGER AL, MICHELSON AD, WIVIOT SD et al. Intrinsic platelet reactivity before P2Y₁₂ blockade contributes to residual platelet reactivity despite high-level

P2Y₁₂ blockade by prasugrel or high-dose clopidogrel. *Thrombosis and Haemostasis*, 2011, vol. 106, no. 2, s. 219-226.

107. TRENK D, KRISTENSEN SD, HOCHHOLZER W et al. High on-treatment platelet reactivity and P2Y₁₂ antagonists in clinical trials. *Thrombosis and Haemostasis*, 2013, vol. 109, no. 5, s. 834-845.

108. BONELLO L, TANTRY US, MARCUCCI R et al. Consensus and future directions in the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol*, 2010, vol. 56, no. 12, s. 919-933.

15. PŘÍLOHY