

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Autoreferát dizertační práce

Význam genetického testování v prevenci krvácivých komplikací invazivních výkonů v kardiologii

MUDr. Magdalena Sionová

Praha 2015

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Studijní obor:	Preventivní medicína
Předseda oborové rady:	doc. MUDr. Alexander Čelko, CSc.
Školicí pracoviště:	III. interní – kardiologická klinika FNKV a 3.LF, Šrobárova 50, Praha 10, 10034
Autor:	MUDr. Magdalena Sionová
Školitel:	doc. MUDr. Zuzana Moťovská, Ph.D.
Oponenti:	

Autoreferát byl rozeslán dne....

Obhajoba se koná dne...v...hod. kde....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

OBSAH

SOUHRN	4
SUMMARY	5
1. ÚVOD	6
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	8
3. MATERIÁL A METODIKA	9
4. VÝSLEDKY	12
5. DISKUZE	15
6. ZÁVĚR	20
POUŽITÁ LITERATURA	22
SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	27

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AKS	akutní koronární syndrom
ATP	adenosintrifosfát
BARC	Bleeding Academic Research Consortium
BMI	body mass index
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CI	interval spolehlivosti (confidence interval)
CMP	cévní mozková příhoda
COX	cyklooxygenáza
EF	ejekční frakce
GOF	gain of function
GP	glykoprotein
GWAS	genome-wide association study
HR	hazard ratio
ICHS	ischemická choroba srdeční
IM	infarkt myokardu
INR	international normalized ratio
LDL	low-density lipoprotein
LMWH	nízkomolekulární heparin
NYHA	New York Heart Association
OR	odds ratio
NAP	nestabilní angina pectoris
Non-STE AKS	akutní koronární syndrom bez elevací ST
Non-STE IM	infarkt myokardu bez elevací ST
NCDR	National Cardiovascular Data Registry
NOAC	nová (non vitamin K) orální antikoagulancia
NRKI	Národní registr koronárních intervencí
PAR	proteázu aktivující protein
PCI	perkutánní koronární intervence
PTGS	prostaglandin G syntáza
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SKG	selektivní koronarografie
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
STE IM	infarkt myokardu s ST elevacemi
TF	tkáňový faktor
TIA	tranzitorní ischemická ataka
TXA ₂	tromboxan A ₂
UFH	nefrakcionovaný heparin
VWF	von Willebrandův faktor

SOUHRN

Periprocedurální krvácení je nejčastější komplikací v souvislosti s invazivními výkony (SKG/PCI) u pacientů s ICHS a je jednoznačně spojeno s horší prognózou. S rozvojem nových technologií intervenční léčby a s vývojem nových účinnějších antiagregačních a antikoagulačních léků, se snaha o efektivní snížení jejich výskytu dostává do popředí zájmu. V rámci prevence vzniku krvácení je známa řada opatření, kterými je možné riziko krvácení snížit. Tyto opatření jsou neúčinnější, pokud jsou použity u pacientů nejvíce ohrožených rozvojem periprocedurálního krvácení.

Jedním z cílů naší práce bylo identifikovat rizikové faktory spojené s vyšším rizikem periprocedurálních krvácivých komplikací SKG/PCI u neselektované populace pacientů s akutní nebo chronickou formou ICHS. V analýze klinických, laboratorních a procedurálních dat jsme stanovili, že s vyšším rizikem krvácení je nezávisle spojeno podání ADP antagonistů v periprocedurálním období, podání LMWH po výkonu, nižší vstupní hodnota hematokritu, přítomnost akutního koronárního syndromu a vyšší tepová frekvence. Souhrnně byly tedy za nejvýznamnějšími faktory spojené s rizikem krvácení po SKG/PCI v běžné klinické praxi označeny podaná antitrombotická terapie a klinický stav při přijetí.

V další části jsme se reciproční aplikací algoritmů ke stratifikaci rizika krvácení vycházejících z registrů CRUSADE a NCDR pokusili ověřit jejich prediktivní hodnotu. U obou algoritmů jsme zjistili jejich dobrou schopnost identifikovat pacienty s nízkým a s vysokým rizikem rozvoje periprocedurálního krvácení.

Stěžejní částí naší práce byla snaha najít vazbu mezi některými jednonukleotidovými polymorfismy klíčových destičkových regulačních proteinů a rizikem krvácení. Ve vztahu ke genetické variabilitě a krvácení jsou přesvědčivé důkazy pouze o vyšším riziku krvácení při užívání clopidogrelu a přítomnosti GOF alely CYP2C19*17. Výsledky prací o jiných genetických polymorfismech v souvislosti s krvácením vykazují značnou heterogenitu a často nalézáme protichůdné výsledky. Na základě dostupných dat a významu v primární hemostáze jsme analyzovali výskyt jednonukleotidových polymorfismů pro GPIa (807C/T), GPVI (13254C/T), COX1 (-842A/G), COX-1 (50C/T), P2Y12 (H1/H2 haplotyp) a P2Y12 (32C/T). Ani v jednom polymorfismu se nepodařilo prokázat signifikantní vztah k riziku krvácení. V selektivní analýze zahrnující pouze homozygotní formy byl vyšší výskyt haplotypu H2/H2 genu pro receptor P2Y12. Variantní alela pro polymorfismus COX-1 (-842A/G) se častěji vyskytovala u pacientů s krvácením podstupujících PCI. Vzhledem k nízké prevalenci těchto polymorfismů v populaci však nedosahovala data statistické významnosti.

SUMMARY

Periprocedural bleeding is the most common complication related to invasive procedures in patients with ischemic heart disease (CAG/PCI) and it is definitely associated with a worse prognosis. With the development of new technology of interventional treatment and more efficient new antiplatelet and anticoagulant drugs, the efforts to reduce their occurrence are gaining interest. A series of avoidance bleeding strategies are known. These measures are most effective when used in patients at highest risk of periprocedural bleeding.

One of the purposes of our study was to identify risk factors associated with a higher risk of periprocedural bleeding complications (CAG/ PCI) in unselected population of patients with acute or chronic forms of ischemic heart disease. Clinical, laboratory and procedural data were evaluated. The higher bleeding risk is independently associated with ADP antagonists therapy in periprocedural period, administration of LMWH after the procedure, lower baseline hematocrit value, presence of acute coronary syndrome and increased heart rate. Summarized, the most important factors associated with the high risk of bleeding after invasive procedure in routine clinical practice are antiplatelet and anticoagulant therapy administration and clinical condition at the admission.

In the next section we verified the predictive value of the stratification algorithms for bleeding risk from the CRUSADE a NCDR registry. In both algorithms, we found great ability to identify patients in low and high risk of bleeding.

The fundamental part of our work was to find association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of key regulatory platelet proteins and the bleeding risk. There is an evidence of increased risk of bleeding in patients with GOF allele of CYP2C19*17 treated with clopidogrel. The results of other studies examining presence of SNPs related to bleeding exhibit considerable heterogeneity and often found conflicting results. Based on the available data and the importance in primary hemostasis, we analysed the occurrence of SNPs for GPIa (807C/T), GPVI (13254C/T), COX1 (-842A/G), COX-1 (50C/T), P2Y12 (H1/H2 haplotype) and P2Y12 (32C/T). We did not find significant relationship of the presence of those SNPs to the risk of periprocedural bleeding. The analysis including only homozygous forms found higher incidence of haplotype H2/H2 in receptor P2Y12 gene in bleeding group. Variant allele polymorphism of COX-1 (-842A/G) were more frequent in patients with bleeding undergoing PCI. Due to the low prevalence of these polymorphisms in population the findings did not reach statistical significance.

1. ÚVOD

Přes pokroky v prevenci, diagnostice a léčbě zůstávají v České republice i v ostatních ekonomicky vyspělých zemích kardiovaskulární onemocnění na prvním místě v příčině nemocnosti (morbidity) i úmrtnosti (mortality). Ischemická choroba srdeční (ICHS) tvoří téměř polovinu všech úmrtí na kardiovaskulární onemocnění, cévní mozková příhoda téměř třetinu (Cífková 2006). Invazivní výkony, selektivní koronarografie (SKG) a perkutánní koronární intervence (PCI), se staly běžnou součástí diagnostiky a léčby pacientů s ICHS. Jedním s klíčových aspektů v léčbě pacientů s ICHS umožňující implantaci stentu do koronární tepny je adjuvantní antitrombotická (protidestičková a antitrombinovaná) terapie. S vývojem účinných antikoagulačních a protidestičkových léků se podařilo u pacientů s ICHS výrazně snížit riziko úmrtí z ischemických příčin a riziko periprocedurálních ischemických komplikací (periprocedurální IM, ischemická cévní mozková příhoda) (Fox et al. 2007). S užíváním účinnějších protisrážlivých léků je spojeno vyšší riziko krvácení (Eikelboom et al. 2006).

Periprocedurální krvácivé komplikace jsou v současné době nejčastějšími komplikacemi invazivních procedur v kardiologii. (Lauer, Karweit et al. 2002). Incidence krvácivých komplikací uváděná v souvislosti invazivními výkony u pacientů s ICHS výrazně kolísá v závislosti na studované populaci, typu výkonu (PCI/SKG), lékových režimech, odlišných arteriálních přístupech, technice srdeční katerizace a v neposlední řadě použitím různých klasifikací k hodnocení krvácivých komplikací (Steg et al. 2011). I přes významné rozdíly v incidenci krvácivých příhod v jednotlivých studiích byla pro všechny pacienty s krvácením napříč studiemi prokázána horší krátkodobá i dlouhodobá prognóza (Segev et al. 2005, Eikelboom et al. 2006, Doyle et al. 2008, Doyle et al. 2009). S ohledem na komplikovanou léčbu a zhoršenou prognózu pacientů s krvácivými komplikacemi je zásadním přístupem k periprocedurálnímu krvácení jeho prevence. Při rozhodování o vhodné terapii pro pacienta s AKS a zejména pro pacienty se stabilní formou ICHS je vždy velice důležité pečlivě zvážit riziko krvácení. (Dauerman et al.). Stoupající význam určení rizika krvácení před invazivním výkonem je v současné době patrný i z toho, že jeho provádění u každého pacienta před invazivním výkonem se stalo součástí nových doporučených postupů Evropské kardiologické společnosti pro léčbu pacientů s ICHS (Windecker et al. 2014).

V minulosti bylo identifikováno několik faktorů, v jejichž souvislosti je prokázáno vyšší riziko vzniku krvácivých komplikací. Mezi tyto faktory patří věk, pohlaví, tělesná hmotnost, renální insuficience a také technika invazivní procedury (Alexander et al. 2005). Na

základě analýzy anamnestických dat, vstupního klinického stavu, laboratorních dat, podané medikace a procedurální faktorů pacientů z velkých klinických studií a registrů (REPLACE, ACUITY a HORIZONS-AMI, CRUSADE, NCDR) byly vytvořeny jednoduché skórovací systémy pro individuální určení rizika krvácení.

Při dnešním trendu individualizace péče o pacienty, který se uplatňuje napříč všemi medicínskými obory, je výrazný nárůst zájmu o zmapování a nalezení genetické podstaty v souvislosti s onemocněními a jeho rizikovými faktory. Ve vztahu k ICHS byla identifikována za poslední desetiletí celá řada genetických jednonukleotidových variability, které jsou spojeny s vyšším rizikem jejího vzniku (Kessler et al. 2015). Na podkladě odlišné genetické informace může docházet ke změnám ve struktuře a funkci kteréhokoliv z regulačních proteinů účastnících se hemostázy, a tím zvyšovat jak riziko trombotické, tak riziko krvácení. Na rozdíl od genetických odchylek s Mendelovským typem dědičnosti je fenotypový projev variability jednonukleotidových polymorfismů komplexní a podílí se na něm i vliv prostředí. Pokud se taková genetická odchylka vyskytne v oblasti genů kódujících zásadní destičkové regulační proteiny, může být narušena jejich hemostatická funkce, která se ovšem za normálních okolností neprojeví významnými epizodami krvácení, ale projeví se až při působení dalšího rizikového faktoru, čímž bezpochyby každý invazivní výkon je (Muehlschlegel a Body 2008). Vyšší riziko krvácení bylo jednoznačně prokázáno u nositelů GOF (gain of function) alely CYP2C19*17 užívajících clopidogrel (Sibbing et al. 2010). Využití poznatků genetického testování se dostává postupně do klinické praxe, nejen v oblasti farmakogenomiky (individualizace medikamentózní terapie na podkladě genetických variabilit), ale i v oblasti prevence. U nosičů GOF alely genu pro PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9), zodpovědného za degradaci LDL receptorů na povrchu buněk, byla nalezena vyšší hladina LDL cholesterolu a akcelerovaná ateroskleróza (Cameron et al. 2006). V současné době je ve stádiu II klinického testování protilátka (evolocumab) proti PCSK9, s níž se se podařilo účinně snížit hladinu LDL cholesterolu o 40-50% (Stein et al. 2014). Pokud by se podařilo identifikovat jednonukleotidové polymorfismy, které jsou spojené s vyšším rizikem krvácení v souvislosti s SKG/PCI, mohly by se využít k přesnější stratifikaci pacientů nejvíce ohrožených rizikem periprocedurálního krvácení.

V této oblasti nebyly dosud provedené žádné velké celogenomové asociační studie (GWAS), které by jednoznačně analyzovaly a charakterizovaly na tisících jednotlivých jednonukleotidové polymorfismy spojené s periprocedurálním krvácením. Dosavadní výsledky vychází pouze z několika malých klinických studií. Podkladem pro výběr vhodných polymorfismů tedy zůstává detailní znalost faktorů účastnících se hemostázy a aterotrombózy.

Zásadní úlohu v těchto procesech mají krevní destičky a jejich regulační proteiny. V případě poškození cévní stěny, destičky rozpoznají místo poškození, adherují k obnaženému endoteliálnímu matrix, dochází k jejich aktivaci, následné agregaci a formování primárního trombu. V iniciální fázi interakce krevních destiček s poškozeným endotelem hraje hlavní roli obnažení subendoteliálních struktur a to zejména kolagenu, lamininu a von Willebrandova faktoru (VWF). Vazbou pomocí glykoproteinu (GP) Ib, který je součástí komplexu GP Ib-IX-V, exprimovaného na povrchu krevních destiček k VWF dochází ke zpomalení toku (“rolování“) krevních destiček a k jejich adhezi. Následně dochází pomocí GPVI a komplexu GP Ia/IIa k vazbě na kolagen a k aktivaci destiček. Při aktivaci destiček se mění cytoskeletální struktura trombocytů, jejich tvar, degranulují se sekreční granula (denzní a alfa granula) s destičkovými agonisty (adenosindifosfát - ADP, serotonin, fibrinogen, VWF, fibronektin, selektin P a mnoho dalších), probíhá syntéza tromboxanu A₂ a exprese dalších regulačních proteinů na jejich povrchu. Vazba ADP na destičkové receptory P₂Y₁₂ a P₂Y₁ spouští řadu intracelulárních signálních procesů, které potencují aktivaci a agregaci destiček (Dorsam a Kunapuli 2004). Expresí glykoproteinu IIb/IIIa dochází vazbou s VWF a fibrinogenem k navázání destiček mezi sebou (agregaci) a tím ke vzniku primárního trombu (Meadows a Bhatt 2007). Aktivace koagulační kaskády a zpevnění primární zátky fibrinem vede k finální stabilizaci trombu. Na klíčové regulační receptory a enzymy zodpovědné za adhezi, agregaci a aktivaci destiček v primární hemostáze a jejich jednonukleotidové polymorfismy (GPIa 807C/T, GPVI 12354C/T, COX-1-842A/G, COX-1 50C/T, P₂Y₁₂ H1/H2 haplotyp a P₂Y₁₂ 32C/T) se zaměřila naše analýza.

2. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

Krvácení je nejčastější komplikací u pacientů podstupujících selektivní koronarografii (SKG) či perkutánní koronární intervenci (PCI), které ovlivňuje jejich prognózu. Individualizace péče a snížení rizika periprocedurálního krvácení je jedním z hlavních cílů soudobé kardiologie. Analýzou vstupních klinických a laboratorních parametrů byly nalezeny faktory, které jsou spojeny s vyšším rizikem vzniku periprocedurálního krvácení. Ke snadnější identifikaci pacientů nejvíce ohrožených vznikem krvácení bylo vytvořeno několik stratifikačních algoritmů vycházejících z dat velkých randomizovaných klinických studií nebo registrů. Zároveň byla identifikována preventivní opatření, kterými lze výskyt krvácení v souvislosti s invazivním výkonem účinně snížit (procedurální, volba medikamentózní

terapie, jiná specifická opatření). Ze zavedení těchto postupů nejvíce profitují pacienti, kteří jsou ve vysokém či velmi vysokém riziku rozvoje periprocedurálního krvácení.

Přítomnost genetických jednonukleotidových polymorfismů může modulovat strukturu a funkci proteinů, jež jsou těmito geny kódovány. U pacientů s přítomností variantní alely CYP2C19*17, genu pro enzym komplexu cytochromu P450, je prokázáno vyšší riziko krvácení při užívání clopidogrelu. Pokud se taková genetická odchylka vyskytne v místě kódujícím klíčové destičkové regulační proteiny, může být v kombinaci s dalšími rizikovými faktory prostředí narušena jejich hemostatická funkce. Určení jednonukleotidových polymorfismů genů pro zásadní destičkové proteiny spojených s vyšším rizikem krvácení v souvislosti s SKG/PCI, lze využít k přesnější identifikaci pacientů nejvíce ohrožených rozvojem periprocedurálního krvácení. U těchto jedinců by vhodně zvolenou strategií léčby bylo možné rozvoji krvácení předcházet a zlepšit tak jejich krátkodobou i dlouhodobou prognózu.

Cíle práce:

- stanovit klinické, laboratorní a procedurální faktory, které jsou spojeny s vyšším rizikem periprocedurálního krvácení u neselektovaných pacientů z klinické praxe podstupujících invazivní výkon (SKG/PCI) pro akutní či chronickou formu ischemické choroby srdeční
- určit validitu CRUSADE a NCDR stratifikace rizika krvácení v reálné klinické praxi
- analyzovat vztah přítomnosti jednonukleotidových polymorfismů genů pro významné destičkové receptory GP Ia (807C>T), GP VI (13254T>C), P2Y₁₂ (34C>T a H1/H2 haplotyp) a genů kódující cyklooxygenázu-1 (-842A>G a 50C>T) k vyššímu riziku periprocedurálního krvácení

3. MATERIÁL A METODIKA

Zařazení pacientů

Práce byla provedena jako studie případů a kontrol. Do studie byli zařazeni pacienti z pěti katetrizujících center v České republice (FN Královské Vinohrady, FN Ostrava, FN Plzeň, FN Olomouc, KN Tomáše Bati), kteří v roce 2010 až 2014 podstoupili SKG nebo PCI pro akutní nebo chronickou formu ischemické choroby srdeční, a u kterých došlo v průběhu 30 dní po výkonu k rozvoji krvácivé komplikace. Vznik krvácivé komplikace a podepsání informovaného souhlasu byla jediná vstupní kritéria, nebyla žádná vylučovací kritéria. Celá studie i informovaný souhlas byly schváleny Etickou komisí FN Královské Vinohrady.

U všech pacientů byly zaznamenány základní demografická data, anamnéza, kardiovaskulární rizikové faktory, významné komorbidity, chronicky užívaná medikace a vstupní data o klinickém stavu. Tato data byla odebrána při osobním rozhovoru nebo z dostupné lékařské dokumentace. Klinický stav byl hodnocen při přijetí pacienta a jeho změny zaznamenávány v průběhu hospitalizace. Byla zaznamenána veškerá podaná medikace v přednemocniční péči i v průběhu hospitalizace a data související s invazivním výkonem (arteriální přístup, koronarografický nálezn, provedení PCI, podaná medikace). Veškerá medikace byla podána v souladu s aktuálními doporučeními.

Kontrolní skupinu tvořilo 331 pacientů z genetické subanalýzy studie PRAGUE-8, jež podstoupili invazivní diagnostickou srdeční katetrizaci a/nebo PCI, nebyli předlčeni clopidogrelem, a u kterých nedošlo k rozvoji periprocedurálního krváčení.

Evaluace krvácivých komplikací

Krvácivá komplikace byla definovaná jako: a) podkožní hematom v místě vpichu o průměru více jak 5cm b) krváčení do jiných tkání v místě vpichu než podkoží (stehenní svalstvo, svalstvo předloktí, retroperitoneum) c) gastrointestinální krváčení, krváčení z močového ústrojí či zřejmé krváčení z jiného zdroje (hemoptýza, gynekologické krváčení, epistaxe) d) perikardiální krváčení e) intrakraniální krváčení.

Pokud se po výkonu objevila některá výše popsaná krvácivá komplikace, byl její charakter a rozsah popsán ve zdravotnické dokumentaci, byla zaznamenána změna v klinickém stavu pacienta, ev. nutnost monitorace na jednotce intenzivní péče, způsob terapie či podání krevních transfuzí. Pokud to bylo možné, lokalizace krváčení se upřesňovala dostupnými zobrazovacími metodami (ultrazvuk, počítačová tomografie).

Krvácivé komplikace jsme vyhodnocovali i) podle lokalizace ii) podle změn klinického stavu iii) podle standardních klasifikací krvácivých komplikací. Při analýze změn v klinickém stavu v souvislosti s krvácivou komplikací bylo stanoveno 7 kategorií podle závažnosti: a) bez nutnosti terapie b) s nutností lokální terapi c) s nutností podání krevní transfuse d) s nutností chirurgické revise e) vedoucí k hemodynamické nestabilitě (definované jako pokles krevního tlaku afektující funkci některého orgánu vedoucí k nutnosti podání tekutin nebo jiných podpůrných preparátů intravenózně, nesplňující kritéria pro hemoragický šok) f) hemoragický šok v důsledku krváčení (definovaný, pokud jsou splněna alespoň tři z následujících kritérií: systolický tlak < 90mmHg, tachykardie > 120/min, anurie, tachypnoe > 30/min, kvantitativní nebo kvalitativní porucha vědomí) g) fatální krváčení.

Dále byla závažnost krvácivých komplikací hodnocena s použitím čtyř klasifikací krvácivých komplikací: TIMI, GUSTO, PLATO a BARC.

Dle kritérií hodnocení rizika periprocedurálního krvácení dle registru CRUSADE a NCDR bylo recipročně určeno riziko vzniku krvácení v obou skupinách.

Laboratorní analýza serologická a krevního obrazu

Analýza základního biochemického vyšetření krevní plazmy a vyšetření krevního obrazu bylo provedeno jako součást rutinního vstupního vyšetření při nástupu k hospitalizaci. Zaznamenávány u každého pacienta byly hodnoty kreatininu, hemoglobinu, hematokritu, počet bílých krvinek, počet krevních destiček, jejich objem a INR. Clearance kreatininu byla počítána pomocí Cockcroft-Gaultovi formule. U pacientů s krvácením byla zaznamenávána nejnižší hodnota hemoglobinu po epizodě krvácení.

Odběr vzorků na genetickou analýzu

U každého pacienta se po podepsání informovaného souhlasu odebíral vzorek žilní krve do zkumavky s protisrážlivým činidlem. Vzorek byl zamrazen a uchován v mrazicím boxu při -75°C a následně odeslán do laboratoře na genetickou analýzu.

Genetická analýza

V genetické laboratoři byla analyzována přítomnost genetických polymorfismů pro destičkové receptory GP Ia (807C>T, rs1126643), GP VI (13254T>C, rs1613662), P2Y12 (34C>T, rs6785930 a H1/H2 haplotyp, rs2046934) a pro geny kódující COX-1 ($-842\text{A}>\text{G}$, rs10306114 a 50C>T, rs3842787). Testování bylo založeno na PCR amplifikaci specifických DNA sekvencí kódujících vybrané proteiny. DNA byla extrahována z 200 μl periferní krve použitím standardní kolonkové metody DNA izolujícího kitu JetQuick (GENOMED GmbH, Loehne, Germany). Sekvence PCR amplikonů byly analyzovány pomocí denaturační kapilární elektroforézy (DCE), která může odhalit přítomnost odchylky v cílové oblasti. S použitím standardního DNA sekvenátoru (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) byly fluorescentně označené PCR amplikony za přesné teploty rozděleny na homo- a heteroduplexy. Tato technika označí relativní podíl mutovaných alel. Všechny detekované DNA variability byly následně potvrzeny přímým sekvenováním s použitím stejného DNA sekvenátoru.

Statistické zpracování dat

Pro kategorizované proměnné jsou vyčísleny absolutní četnosti s relativním zastoupením v procentech a testovány použitím testu závislosti χ^2 (chí-kvadrát). U kvantitativních proměnných byl počítán průměr se směrodatnými odchylkami a pro testování kvantitativních parametrů bylo použito neparametrického Mann-Whitneyova testu. Proměnné, které byly mezi skupinami s a bez krvácení signifikantně odlišné ($p < 0,05$) či jejichž rozdíl byl blízký statistické významnosti, byly dále zahrnuty do multivariantní analýzy za účelem

stanovení těch, které jsou nezávisle spojeny s výskytem krvácení. U vícerozměrné metody byla použita logistická regresivní analýza. Vztah genetických polymorfismů k riziku krvácení byl vyjádřen pomocí odds ratio s odpovídajícím 95% intervalem spolehlivosti. Všechny statistické testy byly posuzovány k hladině významnosti $p < 0,05$. K vyhodnocování byl použit statistický software SPSS verze 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Veškerá statistická analýza byla provedena statistikem se zkušeností v biomedicínské statistice.

4. VÝSLEDKY

Analýza základních parametrů souboru a dat souvisejících s výkonem

Celkem byla analyzována data 404 pacientů. Průměrný věk celého souboru byl $66,8 \pm 9,57$. Soubor tvořilo 243 (60,1 %) mužů a 161 (39,9 %) žen. Průměrné BMI bylo $28,7 \pm 4,37$, kuřáků byla necelá pětina (18,4 %), podíl bývalých kuřáků tvořil 8 %. Ischemickou chorobu srdeční v anamnéze měla třetina pacientů (34,3 %), arteriální hypertenzi dvě třetiny (66,1%) pacientů, podobně jako dyslipidémii (61,8 %). Diabetiků bylo více jak čtvrtina (27,5 %), pacientů po CMP nebo TIA 7,2 % a onemocnění periferních cév mělo 9,3 % pacientů.

Pacientů s krvácivou komplikací po invazivním výkonu bylo do studie zařazeno 73. Kontrolní skupinu tvořilo 331 pacientů bez krvácení. Porovnání základních charakteristik souboru s krvácením a kontrolní skupiny ukázalo, že pacienti s krvácením byli starší ($p = 0,002$), měli častěji renální selhání ($p = 0,003$), arteriální hypertenzi ($p = 0,037$), nižší hmotnost ($p = 0,027$), BMI ($p = 0,017$) a anamnézu krvácení ($p = 0,017$), vyšší vstupní tepovou frekvenci ($p = 0,001$), horší projevy stenokardií dle CCS klasifikace ($p = 0,001$) a nižší ejekční frakci ($p = 0,025$). Pacienti, kteří krváceli, se častěji prezentovali akutní formou ICHS při přijetí ($p = 0,001$) a častěji podstoupili PCI ($p = 0,001$). Laboratorně měli ve skupině s krvácením vstupně vyšší počet leukocytů ($p = 0,002$), INR ($p = 0,001$) a nižší hodnotu hematokritu ($p = 0,001$). Při hodnocení periprocedurální medikace byla u pacientů, kteří krváceli, častěji podáván Warfarin před výkonem ($p = 0,033$) a LMWH před a po výkonu ($p = 0,001$; $p = 0,001$). V průběhu výkonu byl v krvácející skupině více podáván UFH ($p = 0,001$), inhibitor GP IIb/IIIa ($p = 0,001$) a ADP antagonist ($p = 0,001$).

Do vícerozměrné logistické regresivní analýzy byly zahrnuty základní charakteristiky pacientů, vstupní klinická data, laboratorní parametry a data související s výkonem popsané výše, které se v základní jednorozměrné analýze mezi jednotlivými skupinami statisticky významně lišili. Výsledné parametry nezávisle spojené s rizikem periprocedurálního krvácení byly

- a) podání ADP antagonisty periprocedurálně ($p = 0,001$)
- b) podání LMWH po výkonu ($p = 0,002$)
- c) nižší hodnota hematokritu ($p = 0,007$),
- d) přítomnost akutního koronárního syndromu ($p = 0,015$)
- e) vstupní tepová frekvence ($p = 0,028$).

Analýza krvácivých komplikací

Perikardiální krvácení bylo zaznamenáno ve 4 %, krvácení do trávicího a gastrointestinálního traktu shodně v 1 %. Ve 3 % se jednalo o krvácení retroperitoneální stejně jako 3 % krváceli z nosu. 82 % krvácivých komplikací po invazivním výkonu bylo v místě vpichu. Při posuzování vlivu na hemodynamický stav vedlo krvácení v 1 % k hemoragickému šoku a 8 % se projevilo hemodynamickou nestabilitou. V 10 % bylo nutné podání transfúze a ve 4 % chirurgická revize. Lokální terapie byla dostačující u 22 % pacientů s krvácením a u 55 % nebyla třeba žádná specifická terapie kromě zvýšeného klidového režimu. Pokud byly krvácivé komplikace hodnoceny na základě známých klasifikací krvácivých komplikací, byl podíl velkého krvácení dle TIMI klasifikace 1, 6%, dle GUSTO 11,1%. PLATO klasifikace označila velké krvácení ve 27,9% případů a v 8,8% se jednalo o život ohrožující krvácení. Při použití BARC klasifikace bylo 32,9% krvácení zařazeno do třídy 1, 34,2%, do třídy 2, 23,3% do třídy 3a a 5,5% do třídy 3b.

Predikce rizika krvácení podle algoritmů z registrů CRUSADE a NCDR

Na skupinu s krvácením i na kontrolní skupinu byl recipročně aplikována stratifikace vycházející z registru CRUSADE a NCDR. Byl porovnán podíl pacientů v jednotlivých skupinách podle dosaženého bodového výsledku, který určuje míru rizika krvácení. Dle CRUSADE algoritmu bylo do skupiny s velmi nízkým rizikem krvácení zařazeno 15,4% pacientů, pacientů bez krvácení byl v této skupině dvojnásobek ($p=0,029$). Pacientů zařazených do menšího a středního rizika krvácení byl v obou skupinách srovnatelný podíl. Vysoké a velmi vysoké riziko dle CRUSADE bylo naopak významně více určeno u pacientů, u kterých se rozvinulo periprocedurální krvácení ($p= 0,041$ pro vysoké riziko, $p=0,059$ pro velmi vysoké riziko). Riziková stratifikace z registru NCDR má tři kategorie určující riziko krvácení. Statisticky významně na hladině významnosti 0,001 bylo v krvácivém souboru méně pacientů s nízkým rizikem (4,5% oproti 31,6 % u kontrol) a více pacientů s vysokým rizikem (43,3 % oproti 5,3 %). Střední riziko bylo obdobné v kontrolní skupině (63,1 %) i ve skupině s krvácením (52,2%).

Vztah genetických polymorfismů k riziku krvácení

Při sledování prevalence daných polymorfismů ve sledované populaci byla nejčastěji se vyskytující variantní alela (současně ve své homozygotní i heterozygotní formě) 807T v genu pro GP Ia (u 56,7 % sledovaných jedinců) a variantní alela 34T pro gen kódující receptor P2Y12 (56,2 %). U těchto polymorfismů byl i nejčastěji výskyt variantní alely v homozygotní formě (12,4 % a 10,2 %). Haplotyp H2 pro P2Y12 se v heterozygotní či homozygotní formě vyskytoval u 24,3 % respondentů, alela 12354C pro GPVI ve 20,3 %, polymorfismus COX-1 -842G u 9,9% a 50T u 9,6 % respondentů. Homozygotní forma P2Y12 H2/H2 a GPVI 12354CC se vyskytovala s velmi malou četností (2 % a 1,5 %), pro polymorfismy COX-1 nebyl nalezen žádný homozygot pro variantní alelu ani v kontrolní skupině ani ve skupině s krvácením.

Analýza vztahu sledovaných genetických polymorfismů v homozygotní i heterozygotní formě k riziku krvácení jsme vyjádřily pomocí odds ratio, které dosahuje nejvyšší míry statistické významnosti pro výskyt sledovaného polymorfismu k riziku krvácení pro GPIa 807C/T (**OR 1,29**, 95% CI 0,75–2,24, $p=0,334$). Pro COX-1 (-842A/G) je **OR 1,15** (95% CI 0,46–2,76, $p=0,738$). Ostatní polymorfismy mají OR nižší nebo se blíží jedné. GPVI 12354T/C (**OR 0,82**, 95% CI 0,40–1,64, $p=0,551$), P2Y12 H1/H2 haplotyp (**OR 0,69**, 95% CI 0,35–1,36, $p=0,258$), P2Y12 34C/T (**OR 0,71**, 95% CI 0,42–1,22, $p=0,189$), COX-1 50C/T (**OR 0,88**, 95% CI 0,31–2,32, $p=0,780$). Při analýze polymorfismů v jejich homozygotní formě nebyl nalezen žádný homozygot ani pro jednu ze sledovaných variantních alel COX-1, pro GPVI 12354 T/C byl nalezen pouze jeden případ homozygotní formy ve skupině s krvácením a ve vztahu k riziku krvácení bylo OR 0,91 ($p=0,928$). Zajímavé je OR pro P2Y12 (H2/H2 haplotyp), jehož hodnota je 2,79, ovšem vzhledem k celkově malému počtu jedinců s homozygotní formou variantních alel je široký 95% interval spolehlivosti (0,51 – 13,77) a tudíž nedosahuje statistické významnosti ($p=0,161$). Při sledování rozložení výskytu sledovaných polymorfismů mezi mužským a ženským pohlavím se u všech sledovaných polymorfismů odds ratio blíží 1. Pacienti podstupující SKG a PCI mají různý stupeň trombotického rizika, který může modifikovat fenotypový projev jednonukleotidových polymorfismů, proto jsme analyzovali vztah sledovaných polymorfismů k riziku krvácení v těchto skupinách separátně. Vyšší podíl výskytu variantní alely je patrný pro COX-1 (-842A/G) ve skupině pacientů podstupujících PCI (OR 2,4, 95% CI 0,60 – 9,75, $p=0,157$). Ve výskytu ostatních polymorfismů se významně neliší.

5. DISKUZE

Ve snaze předcházet krvácivým komplikacím u pacientů s ICHS podstupujících invazivní výkon se identifikaci rizikových faktorů krvácení věnovalo několik významných prací. Z některých těchto analýz byly následně vyvinuty skórovací systémy k určení rizika periprocedurálního krvácení.

Rizikové faktory krvácení se výsledky nejvýznamnějších studií zabývajících jejich identifikací v dílčích parametrech nejsou identické, což vyplývá z rozdílných sledovaných populací. V analýze registru akutních koronárních syndromů GRACE byly jako nezávislé prediktory krvácivých komplikací určeny vyšší věk, ženské pohlaví, renální insuficience a anamnéza předchozího krvácení (Moscucci et al. 2003). V metaanalýze Eikelbooma et al. zahrnující 34 146 pacientů byly současně s vyšším věkem jako významné prediktory krvácení označeny renální insuficience a předchozí cévní mozková příhoda (Eikelboom et al. 2006). Práce analyzující rizikové faktory spojené s krvácením u pacientů po PCI ze studie ACUITY určila jako nezávislé rizikové faktory vyšší věk, renální insuficienci, ženské pohlaví, arteriální hypertenzi, anémii a elevaci kardiomarkerů (Manoukian et al. 2007). Ve studii TRITON-TIMI 38 bylo vyšší riziko krvácení spojeno s věkem, ženským pohlavím, clearance kreatininu, arteriální hypertenzí a hypercholesterolémií (Hochholzer et al. 2011). Analýza recentní studie ACCOAST identifikovala asociaci rizika krvácení s věkem, ženským pohlavím, femorálním přístupem, provedením PCI, terapií inhibitory GP IIb/IIIa a předlčení prasugrelem (Widimsky et al. 2015).

Všechny dosud uvedené práce analyzující rizikové faktory spojené s periprocedurálním krvácením vycházejí z retrospektivní analýzy dat velkých randomizovaných klinických studií nebo registrů zahrnující přesně definovanou a vysoce selektovanou skupinu pacientů. Naše výsledky multivariantní analýzy ukazují, že v neselektované populaci pacientů s ischemickou chorobou srdečních podstupujících SKG/PCI (tak jak se s nimi setkáváme na klinickém pracovišti) je jeden z nejvýznamnějších prediktorů rozvoje krvácení po výkonu podaná medikace v periprocedurálním období. Vyšší riziko krvácení je spojeno s podáním ADP antagonistů v periprocedurálním období a s podáváním LMWH po výkonu. Právě z podávání jakýchkoliv protisrážlivých léků plyne zvýšené riziko krvácení u pacientů podstupujících invazivní výkony v kardiologii. Ovšem antitrombotické preparáty jsou u pacientů s ischemickou chorobou srdeční klíčové pro snížení ischemického rizika a vývoj duální antiagregační terapie umožnil implantaci stentu do koronární tepny. Ke snížení rizika krvácení je tak vždy nutná volba vhodné kombinace ve vztahu k ostatním komorbiditám,

kontraindikacím jednotlivých protisrážlivých léků a optimalizace jejich dávkování (Steg et al. 2011).

LMWH po SKG/PCI je podáván u pacientů indikovaných k antikoagulační terapii pro riziko tromboembolických příhod (chlopenní náhrada, fibrilace síní, trombus v srdečních oddílech, anamnéza recidivující plicní embolie aj.). Pacienti s nutností chronické antikoagulační léčby podstupující invazivní výkon mají několikanásobně vyšší riziko krvácení (DeEugenio et al. 2007). Donedávna se užívání perorální antikoagulace před SKG/PCI přerušovalo (což platí i pro naši sledovanou populaci). Není překvapující, že zatímco podávání warfarinu po výkonu v naší práci riziko krvácení nezvyšovalo, podávání LMWH bylo spojeno s vyšším rizikem krvácení. Tato skutečnost vychází z rozdílné farmakokinetiky těchto preparátů, kdy plný účinek warfarinu je dosahován až za několik dní po jeho nasazení a LMWH se v tomto období se používá u pacientů s nutností antikoagulace jako tzv. „přemostňující“ terapie. V nejnovějších studiích bylo prokázáno, že tento postup vede k častějším krvácivým i ischemickým komplikacím (Ruiz-Nodar et al. 2008), a proto se v nejnovějších doporučeních Evropské kardiologické společnosti pro revaskularizaci z roku 2014 vysazování orálních antikoagulancií nedoporučuje (Windecker et al. 2014).

Z nemodifikovatelných rizikových faktorů s rizikem krvácení nezávisle spojeny vyšší vstupní tepová frekvence a přítomnost akutního koronárního syndrom, tedy parametry určující vstupní klinický stav pacienta. Výsledky souhrnně ukazují, že pacienti se závažnějšími projevy ischemické choroby srdeční a horším klinickým stavem při přijetí, jsou při indikaci invazivního výkonu více ohroženi rozvojem krvácení. Závažnější vstupní klinický stav i přítomnost akutního koronárního syndromu spouští řadu buněčných i nebuněčných adaptivních fyziologických mechanismů včetně aktivace sympato-adrenálního systému, aktivaci renin – angiotenzin II – aldosteronového systému a zánětlivé odpovědi organismu. Aktivace těchto systémů vede k mobilizaci energie nutné ke zvládnutí akutní stresové situace, ovšem při delším působení mají kompenzační mechanismy nepříznivé účinky na metabolismus a hemodynamický stav. To vede zpětně k dalšímu zhoršení klinického stavu a dále prohlubuje nerovnováhu organismu (Steptoe a Kivimaki 2012). Výsledkem působení všech těchto faktorů je narušení delikátní rovnováhy prokoagulačních a antikoagulačních mechanismů a vyšší pohotovost organismu k rozvoji ischemických a krvácivých příhod.

Laboratorní parametr, který byl v naší sledované populaci nezávisle spojen s vyšším rizikem periprocedurálního krvácení, je nižší vstupní hodnota hematokritu. Nižší hodnota hematokritu, resp. hemoglobinu, byla shodně onačena jako rizikový faktor krvácení napříč významnými klinickými studiemi (Kinnaird et al. 2003, Manoukian et al. 2007). Je také

prokázán vztah mezi anémií a celkově zhoršenou krátkodobou i dlouhodobou prognózou pacientů s ICHS (Turner et al. 2008). Přítomnost anémie způsobuje snížení dostupnosti kyslíku ke tkáním vedoucí k řadě hemodynamických změn (tachykardii, zkrácení diastoly, prohloubení ischémie myokardu, až k srdečnímu selhání nebo maligním arytmiím) (Hébert et al. 2004). Tyto změny následně aktivují regulační mechanismy, jak byly popsány výše, které dále prohlubují nerovnováhu mezi prokoagulačním a antikoagulačním stavem organismu (Weiss a Goodnough 2005). Na horší prognóze pacientů s anémií se může odrážet i větší přítomnost komorbidit, které se na anémii podílí, a nutnost podání krevních transfuzí.

V žádné z dostupných prací ani v našem porovnání nebyla prokázána souvislost mezi počtem trombocytů a rizikem krvácení. To podporuje naši hypotézu, že k defektu hemostázy u pacientů s krvácením dochází na molekulární úrovni změnou ve struktuře a charakteru působení signálních peptidů zodpovědných za srážení krve, což se neodrazí ve změně počtu krevních destiček, ale v narušení jejich hemostatické funkce.

Z dosud analyzovaných dat vyplynulo, že pokud se pacienti cíleně nestratifikovali podle rizika krvácení, byla preventivní opatření ke snížení krvácivých komplikací aplikována zejména na ty, kteří byli zpětně zařazeni do skupiny s nižším rizikem. Pacienti s nižším rizikem krvácení ze zavedených opatření neměli tak významný prospěch, jako by tomu bylo u pacientů s rizikem vyšším (Spertus et al. 2015). K tomuto účelu bylo vyvinuto několik algoritmů. Všechna tato schémata také vycházejí z vysoce selektovaných skupin pacientů. Algoritmus CRUSADE vychází z dat pacientů s non-ST AKS, algoritmus NCDR z dat pacientů podstupujících PCI. Dobrá prediktivní hodnota CRUSADE stratifikačního schématu byla prokázána v několika studiích, z nichž některé zahrnovaly i pacienty s STE IM (Abu-Assi et al. 2010, Ariza-Solé et al. 2014, Jinatongthai et al. 2014). Riziková stratifikace podle NCDR nebyla dosud testována na větším souboru. U pacientů stratifikovaných dle BMI ve studii Dobies et al. byla její prediktivní hodnota nízká (Dobies et al. 2015). My jsme se pokusily tyto dvě schémata aplikovat na neselektovanou populaci pacientů, jaká je běžná na všech klinických pracovištích. Výsledky aplikací obou algoritmů ukazují na jejich velmi dobrou prediktivní hodnotu ve vztahu k nízkému a vysokému riziku krvácení. Při porovnání obou algoritmů mezi sebou vykazuje v těchto kategoriích ještě o poznání lepší míru určení krvácivého rizika algoritmus NCDR.

Zásadní částí naší práce bylo analyzovat vztah jednonukleotidových polymorfismů genů kódujících klíčové destičkové receptory GP Ia (807C>T, rs1126643), GP VI (13254T>C, rs1613662), P2Y₁₂ (34C>T, rs6785930 a H1/H2 haplotyp, rs2046934) a genu kódujícího cyklooxygenázu-1, rs10306114 a 50C>T, rs3842787) k riziku periprocedurálního krvácení.

Nejvyšší prevalenci výskytu polymorfní alely v její homozygotní i heterozygotní formě jsme v naší práci prokázali u GPIa 807C/T (56,7%), přičemž výskyt homozygotní formy TT byl nalezen ve 12,4% případů. GP Ia jako součást GPIa/IIa je zodpovědný za vazbu destiček ke kolagenu a jejich aktivaci. Některé práce spojují přítomnost T alely v oblasti 807 genu pro GPIa s vyšší expresí receptoru GPIa/IIa na povrchu destiček a vyššímu sklonu k riziku ischemických příhod a to zejména u mladých pacientů s IM (Lewandowski et al. 2005, Zotz et al. 2005). Velká metaanalýza dostupných dat z roku 2007 souvislost ICHS a polymorfismu 807C/T nepotvrdila (Tsantes et al. 2007). V nejnovější práci Zenga et al. byla naopak přítomnost T alely spojena vyšším rizikem intrakraniálního krvácení (Zeng et al. 2015). V naší práci byl výskyt alely 807T (v heterozygotní a homozygotní formě) častější u pacientů kteří krváceli, ovšem nedosahuje statistické významnosti (OR 1,29, 95% CI 0,75–2,24, p=0,334). Výskyt homozygotní formy 807 TT je srovnatelný ve skupině s krvácením i v kontrolní skupině.

Druhým nejčastěji se vyskytující polymorfismus byl v genu pro receptor P2Y12, 34C>T. V námi studované populaci byl výskyt variantní alely T 56,2%, z čehož v homozygotní formě se vyskytovala v 10,2%. Výsledky korelují s dostupnými daty, i když práce o tomto polymorfismu nejsou početné. Jena z prací sledující laboratorní destičkovou aktivitu udává frekvenci výskytu CT 41,8%, TT 5,7%. V této studii nebyl prokázán vliv variantní alely T na maximální ADP-indukovanou destičkovou agregaci (Kim et al. 2013). Nejnovější studie zabývající se klinickým dopadem polymorfismu P2Y12 (34C > T) zjistila, že nosičství minoritní alely bylo spojeno se signifikantně vyšším rizikem krvácení po PCI u pacientů se STE IM (OR 2.71, 95% CI 1.298-5.659, p = 0.008) (Zhang et al. 2015). V naší práci, která zahrnovala neselektovanou populaci s ICHS podstupující jak SKG, tak PCI, jsme neprokázali spojitost vyššího rizika periprocedurálního krvácení s výskytem variantní alely T (OR 0,71, 95% CI 0,42–1,22, p= 0,189) a tato spojitost nebyla nalezena ani u selektovaných pacientů podstupujících PCI (OR 0,69, 95% CI 0,32-1,47, p=0,293).

Kromě polymorfismu 34T >C, byly v genu kódujícím P2Y12 identifikovány další čtyři které vykazují silnou vazebnou nerovnováhu, tvořící majoritní haplotyp H1 a minoritní haplotyp H2 (Fontana et al. 2003). V analýze Kvasničky a spol. byla frekvence H2 haplotypu v heterozygotní formě 25,92 %, homozygoti pro H2 haplotyp se ve zdravé populaci vyskytovali v 2,63 % (Kvasnicka et al. 2008). V námi sledované populaci byla vysledovaná obdobná prevalence; H1/H2 haplotyp byl nalezen ve 22,4 %, H2/H2 haplotyp ve 2 %. Při porovnání výskytu pouze homozygotní formy, u které se předpokládá větší fenotypová penetrace, sice nedosáhly výsledky statistické významnosti, ale výskyt nositelů H2/H2 byl ve

skupině s krvácením četnější (OR 2,79, 95% CI 0,51 – 13,77, p=0,161). Tento klinický nález podporuje laboratorní měření destičkové aktivity a agregace, které bylo významně sníženo u nositelů haplotypu H2 a speciálně nositelé homozygotní formy H2/H2 vykazovaly signifikantně nižší míru aktivity destiček indukované pomocí TRAP (trombinový receptor aktivující peptid) (Oestreich et al. 2014).

Stejně tak byl v naší práci zaznamenán vyšší výskyt variantní alely -842G pro významný destičkový enzym COX-1 u pacientů, kteří podstoupili PCI (OR 2,40, 95% CI 0,6-9,75, p=0,157). Vzhledem k celkově nízké prevalenci výskytu obou polymorfismů pro COX-1 v populaci nedosáhl nález statistické významnosti. Frekvence výskytu COX-1 (-842A/G) polymorfismu, který je s polymorfismem 50C>T v kompletní vazebné nerovnováze, u náhodně vybraných 1450 dárců krve v české populaci byla 12 % heterozygotů a 0,41 % homozygotů (Kvasnicka et al. 2008). V našem souboru pacientů byla frekvence výskytu variantní alely pro COX-1 (-842A/G) 9,9 % a COX-1(50C/T) 9,6 %. Nebyl zaznamenán žádný výskyt homozygotů. Signifikantně vyšší riziko krvácení bylo v minulosti neleženo v genetické subanalýze studie PRAGUE-8 u nositelů polymorfismu COX-1 (- 842>G a 50C>T), kteří podstupovali plánovanou selektivní koronární angiografii (Motovska et al. 2010).

Další významný receptor zodpovědný za vazbu destiček ke kolagenu a jejich aktivaci je GP VI. V naší práci jsme sledovali lokus 13254 genu pro GP VI a jeho polymorfismus T>C. Odlišná báze v této oblasti vede k substituci prolinu za serin na pozici 219 a může tak afektovat funkci GP VI při vazbě na kolagen. Prevalence variantní alely je v dostupných pracích udávána v rozmezí 22% až 32%, homozygotní forma CC se vyskytuje s nízkou frekvencí 1-4 % (Croft et al. 2001, Best et al. 2003). Výskyt C alely byl při porovnání v jednotlivých skupinách srovnatelný v obou skupinách (OR 0,82, 95% CI 0,40–1,64, p= 0,551) a rozdíl nebyl ani patrný ani při selektivní analýze pacientů podstupujících PCI (OR 0,97, 95% CI 0,37-2,48, p= 0,943). Homozygotní forma byla vzácná a vyskytla se pouze u 6 jedinců (1,5%) se stejným podílem četnosti ve skupině s krvácením a kontrolní skupině (OR 0,91, 95% CI nelze, p=0,928). Afinita vnější části receptoru GP VI ke kolagenu, kde dochází k záměně aminokyselin, není daným polymorfismem pravděpodobně ovlivněna natolik, aby samostatně způsobila klinicky významný defekt hemostázy.

I když byly patrné trendy ve vyšším výskytu haplotypu H2/H2 receptoru P2Y12 a polymorfismu COX-1 (-842A/G) u pacientů s krvácením, nedosáhly výsledky vzhledem k nízké prevalenci těchto polymorfismů v populaci statistické významnosti. Na rozdíl od kardiovaskulárních onemocnění, která jsou nejčastější příčinou morbidit a mortality

v rozvinutých zemích, je počet pacientů podstupujících invazivní výkon komplikovaný krvácením omezený. Většina prací na toto téma vychází z velmi malého počtu pacientů, z čehož pramení i řada protichůdných nálezů. Významné jsou i rozdíly pokud se sledují klinická data a pokud se analyzuje pouze laboratorní destičková aktivita. Počet pacientů v naší práci odpovídá několika tisícům katetrizovaných jedinců a řadí se mezi pracemi s touto tematikou k jedné z největších. Dalším faktorem podílejícím se na složitosti této problematiky je komplexnost fenotypového projevu jednonukleotidových polymorfismů, což ještě zvyšuje nároky na početnost souboru a statistickou prokazatelnost jednoznačné vazby na riziko krvácení. Přesto je tento směr jistě správný a v budoucnu přispěje k přesnější identifikaci pacientů ohrožených rizikem krvácením, čímž při optimálně zvolené strategii léčby a zavedením preventivních opatření u těchto jedinců povede k zlepšení jejich krátkodobé i dlouhodobé prognózy.

6. ZÁVĚR

Jako nezávislý faktor spojený s vyšším rizikem periprocedurálního krvácení v neselektované skupině pacientů s akutní či chronickou formou ICHS podstupující SKG/PCI bylo stanoveno podání ADP antagonistů v periprocedurálním období a podání LMWH po výkonu. Vyšším rizikem krvácení jsou ohroženi pacienti se závažnějším vstupním klinickým stavem, prezentujícím se akutním koronárním syndromem a vyšší vstupní tepovou frekvencí. Laboratorní parametr identifikovaný jako nezávislý prediktor krvácení v souvislosti s invazivním výkonem je nižší vstupní hodnota hematokritu.

Prokázali jsme velmi dobrou prediktivní hodnotu algoritmů CRUSADE a NCDR k identifikaci pacientů ve vysokém a velmi vysokém riziku periprocedurálního krvácení.

Nepodařilo se prokázat, že by některý ze sledovaných polymorfismů genů pro významné destičkové receptory GP Ia (807C>T, rs1126643), GP VI (13254T>C, rs1613662), P2Y₁₂ (34C>T, rs6785930 a H1/H2 haplotyp, rs2046934) a genu kódujícího cyklooxygenázu-1, (-842A/G, rs10306114 a 50C>T, rs3842787) byl jednoznačně spojen s vyšším rizikem krvácení po invazivních výkonech v kardiologii. Vyšší frekvenci výskytu krvácení vykazovali pacienti s variantní alelou pro COX-1 (-842A/G) podstupující PCI (OR 2,40, 95% CI 0,6-9,75, p=0,157) a u pacientů s krvácením byla nalezena vyšší frekvence výskytu P2Y₁₂ haplotypu H2 ve své homozygotní formě (OR 2,79, 95% CI 0,51 – 13,77, p=0,161). Vzhledem k nízké prevalenci těchto variabilit v populaci (9,9% pro COX-1 -842G a 2% pro

P2Y12 H2/H2 haplotyp) nedosahovaly výsledky statistické významnosti a vztah musí být ověřen v dalších studiích.

I přesto, že se v naší práci nepovedlo najít genetické jednonukleotidové polymorfismy, které by jednoznačně vedly k vyššímu riziku krvácivých komplikací, podařilo se identifikovat některé klinické a laboratorní faktory, které jsou s vyšším rizikem krvácení spojené. Také se nám podařilo ověřit, že pomocí dostupných algoritmů k rizikové stratifikaci lze identifikovat pacienty nejvíce ohrožené krvácením v běžné klinické praxi. Jejich využití s následnou aplikací optimální strategie léčby a postupů, s nimiž lze krvácení předcházet, se tak v současné době jeví v prevenci vzniku krvácivých komplikací jako stěžejní.

7. POUŽITÁ LITERATURA

ABU-ASSI, E. et al. Evaluating the Performance of the Can Rapid Risk Stratification of Unstable Angina Patients Suppress Adverse Outcomes With Early Implementation of the ACC/AHA Guidelines (CRUSADE) bleeding score in a contemporary Spanish cohort of patients with non-ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Circulation*, 2010, **121**(22), 2419-2426.

ALEXANDER, K. P. et al. Excess dosing of antiplatelet and antithrombin agents in the treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *JAMA*, 2005, **294**(24), 3108-3116.

ARIZA-SOLÉ, A. et al. Is it possible to separate ischemic and bleeding risk in patients with non-ST segment elevation acute coronary syndromes? *International Journal of Cardiology*, 2014, **171**(3), 448-450.

BEST, D. et al. GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear. *Blood*, 2003, **102**(8), 2811-8.

CAMERON, J. et al. Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Human Molecular Genetics*, 2006, **15**(9), 1551-1558.

CÍFKOVÁ, R. Epidemiologie kardiovaskulárních onemocnění. *Postgraduální medicína*, 2006. Mimořádná příloha.

CROFT, S. A. et al. Novel Platelet Membrane Glycoprotein VI Dimorphism Is a Risk Factor for Myocardial Infarction. *Circulation*, 2001, **104**(13), 1459-1463.

DAUERMAN, H. L. et al. Bleeding avoidance strategies. Consensus and controversy. *Journal of the American College of Cardiology*, 2011, **58**(1), 1-10.

DOBIES, D. R., BARBER, K. R. a COHOON, A. L. Validity of a PCI Bleeding Risk Score in patient subsets stratified for body mass index. *Open Heart*, 2015, **2**(1), e000088.

DORSAM, R. T. a KUNAPULI, S. P. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, **113**(3), 340-345.

DOYLE, B. J. et al. Bleeding, blood transfusion, and increased mortality after percutaneous coronary intervention: implications for contemporary practice. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009, **53**(22), 2019-2027.

DOYLE, B. J. et al. Major femoral bleeding complications after percutaneous coronary intervention: incidence, predictors, and impact on long-term survival among 17,901 patients treated at the Mayo Clinic from 1994 to 2005. *JACC. Cardiovascular Interventions*, 2008, **1**(2), 202-209.

EIKELBOOM, J. W. et al. Adverse impact of bleeding on prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2006, **114**(8), 774-782.

FONTANA, P. et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*, 2003, **108**(8), 989-995.

FOX, K. A. et al. Decline in rates of death and heart failure in acute coronary syndromes, 1999-2006. *JAMA*, 2007, **297**(17), 1892-1900.

HÉBERT, P. C. et al. Physiologic aspects of anemia. *Critical Care Clinics*, 2004, **20**(2), 187-212.

HOCHHOLZER, W. et al. Predictors of bleeding and time dependence of association of bleeding with mortality: insights from the Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition With Prasugrel--Thrombolysis in Myocardial Infarction 38 (TRITON-TIMI 38). *Circulation*, 2011, **123**(23), 2681-2689.

JINATONGTHAI, P. et al. Use of the CRUSADE Bleeding Risk Score in the Prediction of Major Bleeding for Patients with Acute Coronary Syndrome Receiving Enoxaparin in Thailand. *Heart, Lung and Circulation*, 2014, **23**(11), 1051-1058.

KESSLER, T. et al. Shared genetic aetiology of coronary artery disease and atherosclerotic stroke - 2015. *Current Atherosclerosis Reports*, 2015, **17**(4), 498.

KIM, K.-A. et al. Effect of P2Y1 and P2Y12 genetic polymorphisms on the ADP-induced platelet aggregation in a Korean population. *Thrombosis Research*, 2013, **132**(2), 221-226.

KINNAIRD, T. D. et al. Incidence, predictors, and prognostic implications of bleeding and blood transfusion following percutaneous coronary interventions. *The American Journal of Cardiology*, 2003, **92**(8), 930-935.

KVASNIČKA, J. et al. Polymorfismy krevních destiček a možnosti monitorace účinku protideštičkové léčby. *Intervenční a akutní kardiologie*, 2008, **7**(6), 215-218.

LAUER, M. A. et al. Practice patterns and outcomes of percutaneous coronary interventions in the United States: 1995 to 1997. *The American Journal of Cardiology*, 2002, **89**(8), 924-929.

LEWANDOWSKI, K. et al. The prevalence of C807T mutation of glycoprotein Ia gene among young male survivors of myocardial infarction: a relation with coronary angiography results. *Kardiologia Polska*, 2005, **63**(2), 107-113; discussion 114.

MANOUKIAN, S. V. et al. Impact of major bleeding on 30-day mortality and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes: an analysis from the ACUTY Trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 2007, **49**(12), 1362-1368.

MANOUKIAN, S. V., VOELTZ, M. D. a J. EIKELBOOM, J. Bleeding complications in acute coronary syndromes and percutaneous coronary intervention: predictors, prognostic significance, and paradigms for reducing risk. *Clinical Cardiology*, 2007, **30**(10 Suppl 2), Ii24-34.

MEADOWS, T. A. a BHATT, D. L. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circulation Research*, 2007, **100**(9), 1261-1275.

MOSCUCCI, M. et al. Predictors of major bleeding in acute coronary syndromes: the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *European Heart Journal*, 2003, **24**(20), 1815-1823.

MOŤOVSKÁ, Z. et al. Platelet gene polymorphisms and risk of bleeding in patients undergoing elective coronary angiography: a genetic substudy of the PRAGUE-8 trial. *Atherosclerosis*, 2010b, **212**(2), 548-552.

MUEHLSCHLEGEL, J. D. a BODY, S. C. Impact of genetic variation on perioperative bleeding. *American Journal of Hematology*, 2008, **83**(9), 732-737.

OESTREICH, J. et al. Effect of genetic variation in P2Y12 on TRAP-stimulated platelet response in healthy subjects. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2014, **38**(3), 372-379.

RUIZ-NODAR, J. M. et al. Anticoagulant and antiplatelet therapy use in 426 patients with atrial fibrillation undergoing percutaneous coronary intervention and stent implantation implications for bleeding risk and prognosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, **51**(8), 818-825.

SEGEV, A. et al. Predictors and 1-year outcome of major bleeding in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: insights from the Canadian Acute Coronary Syndrome Registries. *American Heart Journal*, 2005, **150**(4), 690-694.

SIBBING, D. et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation*, 2010, **121**(4), 512-518.

SPERTUS, J. A. et al. Precision medicine to improve use of bleeding avoidance strategies and reduce bleeding in patients undergoing percutaneous coronary intervention: prospective cohort study before and after implementation of personalized bleeding risks. *BMJ (Clinical Research ed.)*, 2015, **350**, h1302.

STEG, P. G. et al. Bleeding in acute coronary syndromes and percutaneous coronary interventions: position paper by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*, 2011, **32**(15), 1854-1864.

STEIN, E. A. et al. Efficacy and safety of evolocumab (AMG 145), a fully human monoclonal antibody to PCSK9, in hyperlipidaemic patients on various background lipid therapies: pooled analysis of 1359 patients in four phase 2 trials. *European Heart Journal*, 2014, **35**(33), 2249-2259.

STEPTOE, A. a KIVIMAKI, M. Stress and cardiovascular disease. *Nature Reviews. Cardiology*, 2012, **9**(6), 360-370.

TSANTES, A. E. et al. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and coronary artery disease: A meta-analysis. *International Journal of Cardiology*, 2007, **118**(2), 189-196.

TURNER, S. J. et al. Routine hematologic clinical tests as prognostic markers in patients with acute coronary syndromes. *American Heart Journal*, 2008, **155**(5), 806-816.

WEISS, G. and GOODNOUHG, L. T. Anemia of chronic disease. *New England Journal of Medicine*, 2010, 352(10), 1011-1023.

WIDIMSKÝ, P. et al. Predictors of bleeding in patients with acute coronary syndromes treated with prasugrel. *Heart*, 2015, **101**(15), 1219-1224.

WINDECKER, S. et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the

special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *European Heart Journal*, 2014, **35**(37), 2541-2619.

ZENG, Y. et al. 807C/T polymorphism of platelet glycoprotein Ia gene is associated with cerebral hemorrhage in a Chinese population. *The International Journal of Neuroscience*, 2015, **1**, 1-16.

ZOTZ, R. B. et al. Association of polymorphisms of platelet membrane integrins α IIb β 3 (HPA-1b/PIA2) and α 2 β 1 (α 2807TT) with premature myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005, **3**(7), 1522-1529.

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Publikace vztahující se k tématu dizertace

SIONOVÁ, M., BLASKO, P., JIROUS, S., VINDIS, D., ROKYTA, R., POSCH, L., MOŤOVSKÁ, Z. Number of severe bleeding complications according to classification used: is unified classification of bleeding complications really necessary? *Cardiology Journal*, 2015, ISSN 1898-018x. **IF 1,062**

DOKTOROVÁ, M. a MOŤOVSKÁ, Z. Clinical review: Bleeding - a notable complication of treatment in patients with acute coronary syndromes: incidence, predictors, classification, impact on prognosis, and management. *Critical Care*, 2013, **17(5)**, 239. ISSN 1364-8535. **IF 4,72**

Prezentace na kongresech, sympoziích:

2015, London, European Society of Cardiology Congress 2015

- Number of severe bleeding complications according to classification used: is unified classification of bleeding complications really necessary?

M. Sionová, Z. Moťovská, poster

2014, Brno, XXII. výroční sjezd České kardiologické společnosti

- Porovnání průměrné doby hospitalizace u pacientů podstupující elektivně selektivní koronarografii ± PCI komplikovanou výskytem krvácivé komplikace a u pacientů bez této komplikace

M. Doktorová, R. Petr, D. Bílková, P. Toušek, Z. Moťovská, poster

2013, Brno, XXI. výroční sjezd České kardiologické společnosti

- Srovnání výskytu významného periprocedurálního krvácení z celkového počtu krvácivých komplikací při použití různých klasifikací, které jsou využívány k hodnocení krvácivých komplikací ve velkých randomizovaných studiích,

M. Doktorová, Z. Moťovská, V. Kočka, P. Toušek, L. Lisa, P. Widimský, poster

- Periprocedural bleeding is a strong independent predictor of long-term prognosis after elective percutaneous coronary intervention. Long-term follow-up analysis of the prospective, multicenter, randomized Prague-8 trial,

Z. Mořovská, R. Miklík, D. Bílková, H. Skalická, R. Petr, M. Doktorová, M. Malý, P. Kala, S. Šimek, P. Widimský, ústní sdělení

2011, Paris, ESC Congress

- Periprocedural bleeding is a strong independent predictor of long-term prognosis after elective percutaneous coronary intervention,

Z. Mořovská , R. Miklík , D. Bílková, H. Skalická , R. Petr, M. Doktorová, M. Malý, P. Kala, S. Šimek , P. Widimský, prezentace

Publikace nevztahující se k tématu dizertace

MOŘOVSKÁ, Z., VÍCHOVÁ, T., **DOKTOROVÁ, M.**, LABOŠ, M., MALÝ, M., WIDIMSKÝ, P. Serum Dickkopf-1 signaling and calcium deposition in aortic valve are significantly related to the presence of concomitant coronary atherosclerosis in patients with symptomatic calcified aortic stenosis. *Journal of Translational Medicine*, 2015, **13**, 63. ISSN 1479-5876. **IF 3,93**

MOŘOVSKÁ, Z., ONDRÁKOVÁ, M., **DOKTOROVÁ, M.**, WIDIMSKÝ, P. Severe Left Ventricular Systolic Dysfunction is Independently Associated with High On-Clopidogrel Platelet Reactivity. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 2014, **14**(4) 313-318. ISSN 1175-3277. **IF 2,069**

Prezentace na kongresech, sympoziích:

2012, Brno, XX. výroční sjezd České kardiologické společnosti

- Vasospastická angina pectoris provázená maligními arytmiemi řešená perkutánní koronární intervencí: kazuistika,

M. Doktorová, J. Knot, Z. Mořovská, poster