

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**MOŽNOSTI STANOVENÍ FUNKCE TROMBOCYTŮ  
POMOCÍ OPTICKÉ A IMPEDANČNÍ AGREGOMETRIE**

The Assessment of Platelet Function by Optical and Impedance  
Aggregometry

Lenka Malíková

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.

Praha 2012

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí bakalářské práce, paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. a školiteli, panu prof. MUDr. Janu Kvasničkovi, DrSc. Velké poděkování patří paní Ing. Janě Bílkové a kolektivu z Centrální hematologické laboratoře Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za pomoc při provádění laboratorních měření, poskytnutí studijních materiálů a věcné připomínky k mé práci.

## Abstrakt

**Úvod:** Krevní destičky hrají klíčovou roli v procesu zástavy krvácení tvorbou primární destičkové hemostatické zátky. Za určitých okolností je však tato role krevních destiček nežádoucí a podáváním lékových preparátů kyseliny acetylsalicylové (ASA) a clopidogrelu je záměrně zasahováno do mechanismu primární hemostasy a funkce destiček je potlačována nebo zmírňována. Tento proces však musí být řízený a dobře kontrolovatelný.

Clopidogrel je antiagregační lék úspěšně používaný k prevenci trombotických komplikací. Aktivní metabolit vzniká z clopidogrelu in-vivo účinkem cytochromu P450 3A4 a váže se selektivně a ireversibilně na receptor P2Y<sub>12</sub>, čímž blokuje aktivaci destiček prostřednictvím ADP. Účinek clopidogrelu je značně variabilní. Je známo, že neodpovídavost na léčbu se objevuje u 5–30 % pacientů.

ASA ireversibilně acetyluje destičkovou cyklooxygenasu (COX), čímž blokuje přeměnu arachidonové kyseliny (AA) na tromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), a zabraňuje tak aktivaci destiček. Léčba aspirinem je efektivní, avšak u některých pacientů se vyskytuje tzv. aspirinová rezistence (AR), tedy neodpovídavost na léčbu ASA.

**Cíl studie:** V naší práci jsme se zaměřili na stanovení referenčních rozmezí pomocí měření funkce krevních destiček u zdravých dárců. Dalším cílem bylo stanovit účinnost clopidogrelu a ASA dostupnými metodami pro hodnocení agregace destiček a porovnat účinnost léčby clopidogrelem a ASA stanovenou impedanční agregometrií (MEA, analyzátor „Multiplate“, Dynabyte, Germany) s výsledky standardní optické agregometrie (LTA, analyzátor PAP 4, Bio Data Corporation, USA).

**Výsledky:** Ze zjištěných hodnot souboru pacientů s duální protideštičkovou léčbou byly posuzovány z hlediska účinnosti léčby tyto parametry: pro optickou agregometrii (LTA) – účinnost léčby daná inhibicí agregace po indukci ADP 68 %, procentuální desagregací po indukci ADP 64 %, inhibicí agregace po indukci epinefrinem (EPI) 80 %, kyselinou arachidonovou (AA) 84 % a účinnost daná změnou polovičního času agregace (CPG T 50) 72 % a změnou strmosti křivky po indukci kationickým propylgalátem (CPG slope) 96 %.; pro impedanční agregometrii (MEA) – účinnost pro ADP test 54 % a pro ASPI test 82 %.

**Závěr:** Optická i impedanční agregometrie je vhodná pro stanovení účinnosti léčby ASA i clopidogrelem, která je daná změnou všech výše uvedených parametrů. Velkou výhodou MEA je možnost odhalení případné nezodpovědnosti pacientů při užívání léků.

**Klíčová slova:** krevní destičky – trombocyty, agregace, ASA, clopidogrel, agonisté – induktory.

## Abstract

**Introduction:** Platelets have an important role in the process of haemostasis in which they form blood clot generation. In some cases it is necessary to suppress activity of platelets by antiplatelet drugs to prevent life threatening states. Acetylsalicylic acid (ASA) and clopidogrel can influence the mechanism of primary haemostasis by inhibition of platelet function. This process has to be controlled.

Clopidogrel is used for prevention of thrombotic states. The active form of clopidogrel is formed by cytochrome P450 3A4. Clopidogrel binds to the receptor P2Y<sub>12</sub> instead of ADP, so platelets cannot be activated. The effect of clopidogrel is very variable. It is known that there is unresponsiveness to clopidogrel in 5–30 % patients.

Acetylsalicylic acid acetylates cyclooxygenase and blocks the conversion of arachidonic acid to tromboxan A<sub>2</sub>, so platelets cannot be activated. ASA treatment is effective, but in some patients can appear so called aspirin resistance (AR).

Possible unresponsiveness to the therapy is the reason why it is suitable to monitor antiplatelet therapy, which may be provided by various methods.

**Thesis target:** To detect normal range in measurement of healthy control group, evaluate efficiency of clopidogrel and ASA and to determine which method (LTA – Light Transmission Aggregometry or MEA – Multiplate Electrode Aggregometry) is better for evaluation of platelet aggregation.

**Results:** Efficiency of therapy determined by platelet aggregation inhibition in a group of patients with dual antiplatelet therapy: LTA – therapy efficiency determined by aggregation inhibition after ADP induction 68 %, by percent disaggregation after ADP induction 64 %, after epinefrin (EPI) induction 80 %, after arachidonic acid (AA) induction 84 % and after cationic propylgallate (CPG) induction – CPG slope 96 % and CPG T 50 72 %. With respect to MEA, the therapy efficiency was for the ADP test 54 % and for the ASPI test 82 %.

**Conclusion:** Light Transmission Aggregometry and Multiplate Electrode Aggregometry are suitable for determination of ASA and clopidogrel efficiency. MEA can also be used for detection of non-compliance.

**Key words:** platelets – trombocytes, aggregation, ASA, clopidogrel, agonists – inductors.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>5</b>
1.1 Krev .....	5
1.1.1 Složení krve .....	5
1.1.2 Krvetvorba .....	6
1.2 Hemostasa.....	7
1.3 Cévní stěna.....	7
1.4 Krevní destičky .....	8
1.4.1 Vznik a vývoj.....	8
1.4.2 Morfologie .....	8
1.4.3 Metabolismus.....	10
1.4.4 Životnost.....	10
1.4.5 Funkce trombocytů v organismu.....	10
1.5 Induktory agregace trombocytů .....	13
1.5.1 Vyvolání agregace adenosindifosfátem.....	13
1.5.2 Vyvolání agregace tromboxanem A <sub>2</sub> .....	13
1.5.3 Faktor aktivující destičky .....	14
1.5.4 Vyvolání agregace adrenalinem.....	14
1.5.5 Vyvolání agregace kolagenem .....	14
1.5.6 Vyvolání agregace trombinem .....	14
1.5.7 Vyvolání agregace ristocetinem.....	15
1.5.8 Vyvolání agregace pomocí kationického propylgalátu .....	15
1.6 Protideštičková léčba.....	15
1.6.1 Ovlivnění tromboxanové cesty působením kyseliny acetylsalicylové .....	16
1.6.2 Inhibice membránových receptorů pro ADP působením clopidogrelu .....	17
1.7 Cíl bakalářské práce .....	19
<b>2. Experimentální část</b> .....	<b>20</b>
2.1 Definice souboru .....	20
2.1.1 Kontrolní soubor .....	20
2.1.2 Pacienti s protideštičkovou léčbou .....	20
2.2 Použitý materiál .....	20
2.2.1 Diagnostika .....	20
2.2.2 Biologický materiál .....	21
2.3 Přístroje.....	21
2.3.1 „Platelet Aggregation Profiler“ (PAP4) .....	21
2.3.2 „Multiplate“ (MEA – Multiplate Electrode Aggregometry).....	21
2.3.3 Další přístroje.....	21

2.4	Metody.....	21
2.4.1	Odběr vzorků krve.....	21
2.4.2	Příprava krve pro měření agregace destiček na „Multiplate“ .....	22
2.4.3	Příprava plasmy bohaté na destičky .....	22
2.4.4	Příprava plasmy chudé na destičky .....	22
2.4.5	Měření agregace destiček na „Multiplate“ .....	22
2.4.6	Provedení testů funkce krevních destiček optickou agregometrií .....	24
<b>3.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>26</b>
3.1	Stanovení normálního rozmezí hodnot měření agregace krevních destiček po jednotlivých induktorech u kontrolní skupiny.....	26
3.1.1	Normální rozmezí hodnot pro měření agregace krevních destiček optickou agregometrií .....	26
3.1.2	Normální rozmezí hodnot pro měření agregace krevních destiček impedanční agregometrií .....	26
3.1.3	Statistické porovnání hodnot měření agregace destiček po jednotlivých induktorech mezi pohlavími.....	27
3.1.4	Korelace hodnot měření agregace krevních destiček po jednotlivých induktorech v kontrolním souboru .....	27
3.2	Definice zbytkové aktivity destiček a účinnosti duální léčby .....	28
3.2.1	Účinnost léčby měřená optickou agregometrií .....	28
3.2.2	Účinnost léčby měřená impedanční agregometrií .....	28
3.3	Deskriptivní statistika zjištěných hodnot agregace krevních destiček po přidání jednotlivých induktorů .....	29
3.3.1	Hodnoty agregace trombocytů zjištěné u kontrolního souboru .....	29
3.3.2	Hodnoty agregace trombocytů zjištěné u souboru pacientů .....	30
3.4	Vyjádření účinnosti léčby .....	31
3.5	Statistické porovnání pacientů a kontrol .....	31
3.5.1	Parametry stanovené pro sledování účinnosti clopidogrelu.....	32
3.5.2	Parametry stanovené pro sledování účinnosti kyseliny acetylsalicylové .....	33
<b>4.</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>34</b>
<b>5.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>37</b>

## Seznam použitých zkratk

AA	kyselina arachidonová
ADP	adenosindifosfát
AR	aspirinová restistence
ASA	kyselina acetylsalicylová
ATP	adenosintrifosfát
AU	agregační jednotky (Aggregation Units)
AUC	plocha pod křivkou
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CHL	Centrální hematologická laboratoř
COL	kolagen
COX	cyklooxygenasa
CPG	kationický propylgalát
CRP	C reaktivní protein
CYP3A4	cytochrom P450 3A4
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
EPI	epinefrin
F V Leiden	Leidenská mutace faktoru V
GP Ib/IX	glykoproteinový komplex Ib/IX
GP IIb/IIIa	glykoproteinový komplex IIb/IIIa
IU	mezinárodní jednotky (International Units)
LTA	optická agregometrie (Light Transmission Aggregometry)
MEA	impedanční agregometrie (Multiplate Electrode Aggregometry)
PAF	faktor aktivující destičky
PAP 4	platelet aggregation profiler
PGI <sub>2</sub>	prostacyklin (prostaglandin I <sub>2</sub> )
PPP	plasma chudá na destičky
PRP	plasma bohatá na destičky
P2Y	destičkový membránový receptor pro ADP
RIS	ristocetin
TRAP-6	peptid aktivující trombinový receptor 6



TXA<sub>2</sub>

VFN

vWF

tromboxan A<sub>2</sub>

Všeobecná fakultní nemocnice

von Willebrandův faktor

## 1. Úvod

Hemostasa je složitý a životně důležitý proces, který představuje ochranu organismu proti přirozeným ztrátám krve, které mohou vznikat při nejrůznějších poraněních. Jedná se o složitý mechanismus spojený s celou řadou pozitivních a negativních zpětných vazeb. Krevní destičky hrají klíčovou roli v procesu zástavy krvácení, tzv. primární hemostasy. Primární hemostasa je proces tvorby primární destičkové hemostatické zátky. Za určitých okolností je však tato role trombocytů nežádoucí a podáváním lékových preparátů je záměrně zasahováno do mechanismu primární hemostasy a funkce destiček je potlačována nebo zmírňována. Tento proces však musí být řízený a dobře kontrolovatelný.

### 1.1 Krev

Krev je vysoce specializovaná tělní tekutina člověka a vyšších organismů. Při proudění v uzavřeném cévním systému se dostává do různých částí těla, kde zprostředkovává výměnu látek mezi buňkami, odevzdává buňkám kyslík a odvádí z nich oxid uhličitý a pomáhá udržovat stálost vnitřního prostředí. Svou roli hraje také při obranných mechanismech organismu.<sup>1</sup>

#### 1.1.1 Složení krve

Lidská krev tvoří asi 8 % tělesné hmotnosti. Obsahuje buňky a buněčné fragmenty, které jsou rozptýlené v tekutém médiu – krevní plasmě.<sup>1</sup>

Krevní plasma zaujímá asi 55 % z celkového objemu krve. Tato nažloutlá extracelulární tekutina má slabě zásaditý charakter a je z velké části tvořena vodou (zhruba 80 %). Ionty sodíku a draslíku udržují rovnováhu mezi intra a extracelulární tekutinou, vápník a hořčík jsou důležité pro správnou funkci nervů a kosterního svalstva, při srážení krve a obranyschopnosti. Železo, měď a kobalt jsou nezbytné pro krvetvorbu. Z organických látek jsou v plasmě nejvíce zastoupeny bílkoviny (albuminy, globuliny, fibrinogen), dále pak sacharidy, lipidy, hormony, vitaminy a enzymy.<sup>2</sup>

Pevná část krevní plasmy je tvořena krevními elementy. Červené krvinky (erytrocyty), jsou bezjaderné krevní buňky, jejichž vnitřek je vyplněn hemoglobinem. Jejich hlavní funkcí je přenos kyslíku a oxidu uhličitého. Bílé krvinky (leukocyty) se

účastní metabolických pochodů a hrají důležitou roli v obranyschopnosti organismu. Podle své funkce jsou rozděleny na více druhů. Krevní destičky (trombocyty), jsou buněčné částice, které se účastní fyziologických dějů zejména při krevním srážení.<sup>1</sup>

### 1.1.2 Krvetvorba

Krvetvorba neboli hemopoesa je proces, při kterém dochází k tvorbě buněčných součástí krve v krvetvorných orgánech.<sup>2</sup> Je řízena složitými mechanismy, nepřímo pomocí nervové a hormonální regulace, přímo pak díky cytokinům, což jsou hemopoetické růstové faktory ze skupiny glykosylovaných polypeptidů, které svoji aktivitu uplatňují pomocí vazby na specifický receptor cílové buňky.<sup>1,3</sup>

Krvetvorba je v průběhu vývoje organismu rozdělena do fází, jež se navzájem liší místem vzniku krevních elementů i samotným průběhem. Fáze prenatální krvetvorby na sebe plynule navazují. V období mezoblastovém dochází k tvorbě prvních krevních buněk a v embryu se vytváří první cévní systém. Tato část hemopoesy je převážně erytroidní povahy. Hepatolienální období je příznačné tvorbou krevních buněk především v játrech a kromě erytrocytů se zde začínají tvořit i mateřské buňky bílých krvinek a krevních destiček. V medulárním období se pak krvetvorba přesune převážně do kostní dřeně, kde se již tvoří všechny druhy krvinek přítomných v krvi. S tím, jak dřevňová krvetvorba roste, mimodřevňová tvorba krve postupně zaniká a po narození se za normálních okolností jinde než v kostní dřeni krevní buňky prakticky netvoří.<sup>1,2</sup>

Kostní dřeň je měkká gelovitá tkáň, která vyplňuje vnitřek kostí. Je tvořena krvetvornou a lymfatickou tkání, cévami a nervovými vlákny. V průběhu života je stále větší část krvetvorné tkáně nahrazována tkání tukovou.<sup>3</sup>

V kostní dřeni z jednotlivých zárodečných mateřských buněk dělením (proliferací) a zráním (maturací) vznikají nové krvetvorné buňky. Ty se od původních mateřských buněk liší morfologicky, funkčně i strukturně.<sup>1</sup>

Zralé krevní buňky se z kostní dřeně dostávají skrze tenkou vrstvu endotelových buněk – sinusoid. Mechanismus je odlišný pro jednotlivé typy krevních buněk. Nezralé erytrocyty se snadno zdeformují a mohou projít i velmi malým otvorem. Bílé krvinky prochází do cév aktivním pohybem zvaným diapedesa, vytvoří totiž výběžky cytoplasmy, díky kterým se dostanou mezi endotelové buňky. Krevní destičky se uvolňují z výběžků

megakaryocytů, které prorůstají mezi endotelovými buňkami, a jsou odplavovány protékající krví. <sup>1,3</sup>

## **1.2 Hemostasa**

Hemostasa je schopnost organismu zastavit krvácení. Jde o komplexní proces, na kterém se podílí řada složek a mechanismů s rozdílnými vstupy a účinky. Srážení krve představuje ochranu organismu proti přirozeným ztrátám krve, jež vznikají při nejrůznějších poraněních. Je to proces životně důležitý. <sup>4</sup>

V případě porušení endotelu dochází k vytvoření krevní sraženiny, která je různými kontrolními mechanismy omezena pouze na místo poranění. I přes přísné regulace tohoto systému se však objevují situace ohrožující život, při kterých je rovnováha mezi srážením a krvácením vychýlena a může dojít např. ke vzniku trombosy v neporušených cévách. <sup>5</sup>

Za koagulační odpověď je zodpovědný především systém cévní stěny, krevních destiček a plasmatických faktorů. Svou úlohu v ní dále hrají i proteiny komplementu, lipoproteiny a bílé a červené krvinky, které tvoří látky aktivující koagulaci. Tyto reakce jsou sjednoceny tak, aby v poškozeném místě došlo k vytvoření jak destičkového agregátu, tak pevných fibrinových vláken, a aby se zároveň aktivoval děj, který takto vytvořenou sraženinu rozpustí. <sup>5,6</sup>

## **1.3 Cévní stěna**

Cévy neslouží pouze k rozvodu okysličené krve k orgánům a jejímu opětovnému sběru. Cévní stěna se aktivně podílí na hemostatických dějích. <sup>5</sup>

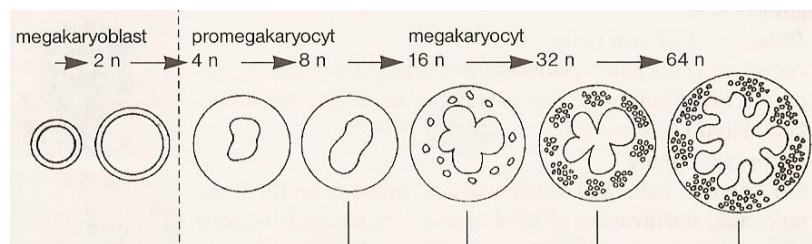
Endoteliální buňky, které vystylají vnitřní stranu cév, tvoří aktivní povrch mezi krví a cévní stěnou. Tyto buňky hrají důležitou roli v cévní hemostase, udržují rovnováhu prostředí tím, že kontrolují látkovou výměnu mezi krví a tkání. <sup>6</sup> Při krevním srážení mají úlohu mechanickou (vasokonstrikce) a zároveň slouží jako místo syntézy a uložení celé řady látek, které se na hemostase podílejí. <sup>5</sup>

## 1.4 Krevní destičky

### 1.4.1 Vznik a vývoj

Krevní destičky vznikají v kostní dřeni fragmentací nebo odštěpováním periferní cytoplasy megakaryocytů. Megakaryocyty, podobně jako ostatní typy dřevných buněk, vznikají z pluripotentní kmenové buňky. Působením růstových faktorů se z této buňky vytvoří buňka unipotentní, která prochází jednotlivými stádii megakaryocytárního dozrávání.<sup>7</sup>

První morfologicky rozlišitelnou buňkou je megakaryoblast. Tato diploidní buňka v průběhu zrání opakovaně prochází atypickou mitosou – endomitosou, při které nedochází k úplnému rozdělení jádra ani cytoplasy, při každém dělení se však zdvojnásobí počet chromosomů. Po ukončení reduplikací jádra dochází ke zrání cytoplasy, která se stává objemnější a zvyšuje se v ní počet granulí, a vzniká promegakaryocyt. Dalším zráním pak dojde k vytvoření samotného megakaryocytu.<sup>1,2</sup>



Obr. 1 Polyploidie u jednotlivých vývojových stádií megakaryocytární linie<sup>1</sup>

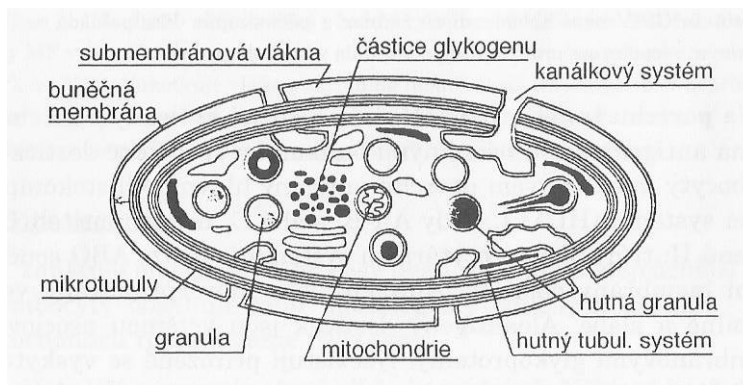
Polyploidní megakaryocyty mohou fragmentací tvořit krevní destičky zhruba od 8 n. Čím více ploidní však buňky jsou, tím více destiček o větší velikosti produkují. Trombocyty se mohou vytvořit také přímým rozpadem megakaryocytů. I zde platí, čím větší megakaryocyt, tím více destiček vzniká.<sup>1</sup>

Celý proces tvorby destiček trvá přibližně 8 dní, samotný rozpad zralého megakaryocytu trvá přibližně pět hodin. Během rozpadu jednoho megakaryocytu může vzniknout až několik tisíc trombocytů.<sup>1,3</sup>

### 1.4.2 Morfologie

Trombocyty nemají jádro, lze je tedy, podobně jako erytrocyty, zařadit mezi tzv. neúplné buňky.<sup>6</sup> Tato oválná tělíska mají velikost přibližně 2–4  $\mu\text{m}$ , tloušťku okolo 0,5  $\mu\text{m}$  a objem 7–11 fl.<sup>8</sup> Jejich průměrný počet v krvi se pohybuje okolo  $250 \cdot 10^9/\text{l}$ .<sup>6</sup>

Podle anatomických znaků lze v krevní destičce vyčlenit čtyři oblasti: periferní zónu, zónu solubilního gelu, zónu organel a oblast membránových systémů.



Obr. 2 Morfologie krevní destičky<sup>5</sup>

Periferní zóna se skládá z destičkové membrány a submembránové oblasti. Zevní vrstvu membrány tvoří plášť – glykokalyx, složený převážně z glykolipidů a glykoproteinů, které jsou součástí povrchových receptorů pro aktivaci destiček nebo inhibici agregace.<sup>3</sup> Vlastní membrána je složena z dvojvrstvy fosfolipidů, hrajících důležitou roli v plasmatické koagulaci, a cholesterolu, který udržuje pružnost membrány, ovlivňuje transport přes membránu a její propustnost. Submembránová oblast obsahuje krátká aktinová vlákna. Ta jsou spojena s plasmatickou membránou, pomáhají destičce udržovat tvar a podílejí se na změnách při její aktivaci.<sup>5</sup>

Cytoskelet, nebo také zóna solubilního gelu, je složen z intracelulárních proteinových struktur, které určují a zajišťují změnu tvaru buněk.<sup>2</sup> Podstatnou část cytoskeletu tvoří mikrofilamenta, složená z komplexu aktinu a myosinu, jehož aktivace vede ke změně tvaru destiček a tvorby výběžků – pseudopodií.<sup>3</sup>

Zóna organel zajišťuje metabolické procesy trombocytů. Obsahuje mitochondrie, které slouží jako energetický zdroj buňky, a řadu morfologicky odlišných granulí, které jsou v neaktivované destičce volně rozptýleny a teprve při aktivaci se začínají seskupovat směrem k centrální části destičky.<sup>6</sup>  $\alpha$ -granula obsahují řadu proteinů, které hrají důležitou roli v interakci trombocytů s cévní stěnou nebo slouží jako růstové faktory či jsou složkou extracelulární matrix.<sup>5</sup>  $\delta$ -granula se vyskytují v destičce v menším počtu než  $\alpha$ -granula a jejich obsah se na rozdíl od  $\alpha$ -granulí po aktivaci destiček vyprazdňuje přímo do okolí trombocytu.<sup>3</sup> Mezi granula lze zařadit ještě peroxisomy a lysosomy.

V trombocytech se vyskytují dva membránové systémy. Otevřený kanalikulární systém je tvořen invaginací částí plasmatické membrány do nitra buňky. Umožňuje obsahu

$\alpha$ -granulí, aby se dostal na povrch buňky, dále pak vychytává tekuté látky a částice z okolí.<sup>5</sup> Densní tubulární systém, odvozený z endoplasmatického retikula megakaryocytu, vytváří souvislou síť úzkých kanálků. Jsou zde uloženy některé enzymy, např. cyklooxygenasa 1 nezbytná pro syntézu prostaglandinů. Tento systém také slouží jako zásoba vápenatých iontů a podílí se na jejich přesunech uvnitř buňky.<sup>3,6</sup>

### **1.4.3 Metabolismus**

Protože krevní destička nemá jádro, nemůže syntetizovat DNA a neprobíhá v ní buněčné dělení. Jinak je schopná s využitím velkého množství energie vykonávat většinu buněčných funkcí. Hlavním zdrojem energetické přeměny, probíhající v mitochondriích, je glykogen, jehož má krevní destička dostatek. Glykogen se glykolyticky štěpí a produkt je následně oxidován za vzniku ATP, které se ze 2/3 ukládá v zásobním poolu a z 1/3 je přítomno v poolu metabolickém.<sup>6</sup>

### **1.4.4 Životnost**

V krevním oběhu se běžně nachází okolo 70 % destiček, 30 % je uloženo ve slezině a je využito až v případě větších krevních ztrát.<sup>8</sup>

Po vyplavení z kostní dřeně jsou mladé destičky jeden až dva dny zadržovány ve slezině. Po uvolnění z megakaryocytů krevní destičky podléhají procesu stárnutí. Za normálních okolností přežívají v krevním oběhu okolo deseti dní. Zestárlé nefunkční trombocyty jsou pak fagocytárním systémem odbourávány ve slezině, játrech a kostní dřeni.<sup>6,8</sup>

Mladší destičky mají oproti starším odlišnou strukturu, metabolismus i funkci. Jsou větší, mají objemnější cytoplasmu a vyšší obsah granulí. Na membráně mají větší počet vazebných míst. Starší destičky jsou menší a méně funkční. Stárnutím se snižuje jejich densita a klesá aktivita nitrobuněčných procesů.<sup>6</sup>

### **1.4.5 Funkce trombocytů v organismu**

Krevní destičky jsou v organismu součástí krve a za normálních okolností jsou obklopeny mimobuněčnou tekutinou. Díky své hemostatické specifičnosti mají na rozdíl od ostatních krevních buněk některé metabolické a strukturální zvláštnosti.<sup>6</sup>

Trombocyty podléhají řadě interakcí buď s rozpustnými složkami krevní plasmy, nebo s narušeným povrchem endotelu. Výsledkem těchto interakcí může být jejich aktivace, při které se mění tvar destičky, metabolismus i jejich látková přeměna.<sup>9</sup>

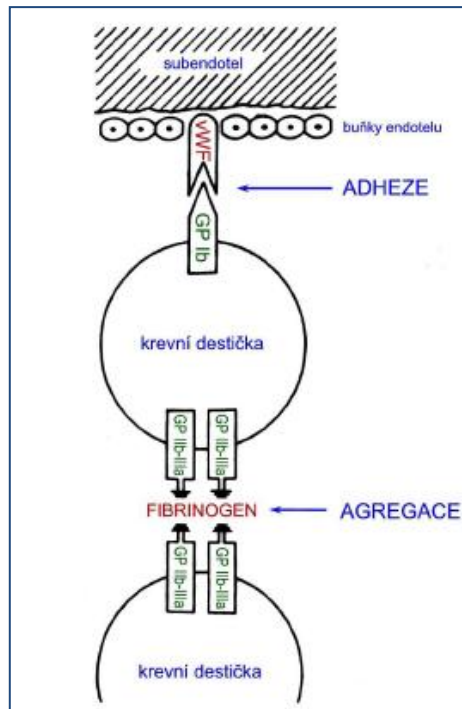
Trombocyty jsou přímými účastníky primární hemostasy, která zahrnuje interakci destiček s poraněnou cévní stěnou a vede k vytvoření primární krevní zátky. Kromě toho zasahují i do hemostasy sekundární, kdy díky svému fosfolipidovému povrchu umožňují řádný průběh koagulačních procesů a uvolňují látky pro obnovu endotelu a normální funkci cévní stěny.<sup>3,5</sup>

Destičky cirkulující v krevním oběhu jsou velmi labilní a reagují na změny prostředí. Nejběžněji rozeznanou reaktivní odpovědí je adheze, změna tvaru a agregace trombocytu. Adheze je přilnutí krevních destiček na jakýkoliv povrch s výjimkou dalšího trombocytu. Podílejí se na ní plasmatické proteiny, struktury subendotelu a termodynamické změny, jako je množství a viskozita krve a velikost a tvar cév. Adheze je přímo lineárně závislá na počtu trombocytů. Agregace je vzájemné spojení krevních destiček s cílem vytvoření sraženiny – trombu.<sup>5</sup>

Ve fázi adheze trombocyty adherují na obnaženou subendotelovou tkáň pomocí von Willebrandova faktoru, který se váže na destičkový adhesivní receptor GP Ib/IX a zároveň na kolagen poraněné cévy.<sup>10</sup> Paralelně s tímto procesem probíhá i aktivace krevních destiček, která je zprostředkována vazbou aktivátorů ADP, epinefrinu, trombinu a kolagenu na receptory, které jsou pro ně specifické. Vazba agonistů vede k přenosu signálů s následnou aktivací fosfolipasy C a mobilizací  $Ca^{2+}$  z tubulárního systému. Vysoká koncentrace  $Ca^{2+}$  způsobí aktivaci fosfolipasy  $A_2$  s uvolněním kyseliny arachidonové, inhibicí tvorby antiagregačně působícího cAMP a aktivaci proteokinasy, které způsobí změnu oválného tvaru destiček na kulovitý a vytvoření výběžků – pseudopodií.<sup>3, 6</sup> Deformací destiček dochází ke zvětšení plochy, na které dochází k interakci faktorů koagulační kaskády.

Dále dochází ke změnám membránové struktury. Při tzv. fenoménu „flip-flop“ dojde k přetočení fosfolipidové dvojvrstvy cytoplasmatické membrány trombocytu v horizontální rovině a na vnější povrch membrány se dostanou záporně nabitě fosfolipidy,<sup>11</sup> které následně výrazně urychlují interakce koagulačních faktorů.<sup>12</sup> Při tzv. uvolňovací reakci se z destičkových granulí uvolňují ADP a tromboxan  $A_2$  ( $TXA_2$ ), které navázáním na destičkové receptory zesilují aktivaci trombocytů.<sup>3</sup>





Obr. 3 Schéma adheze a aktivace trombocytů<sup>13</sup>

K agregaci destiček dochází vlivem změny konformace glykoproteinové struktury GP IIb/IIIa po obsazení receptorových míst na membráně trombocytu agonisty.<sup>13</sup> Konformační změna umožní vyvázání molekuly fibrinogenu nebo von Willebrandova faktoru (vWF) mezi dvěma receptory GP IIb/IIIa na dvou různých destičkách.<sup>6</sup> První agregační vlna vede ke vzniku nepevného agregátu, který se může znovu rozpadnout. Dochází jen k částečnému spojování trombocytů menším počtem glykoproteinových struktur. Při silnějším aktivačním impulsu k sobě destičky přilnou těsněji a dochází k tzv. sekundární agregaci, která je ireversibilní.<sup>6,5</sup>

Posledním krokem primární hemostasy je smrštění (retrakce) vytvořené krevní zátky, které slouží k podpoře uzavření rány. Dojde k přilnutí pseudopodií destiček k fibrinovým vláknům a retrakce kontraktálních bílkovin destiček vyvolá smrštění sraženiny – koagula. K tomuto procesu přispívá vazba fibrinogenu destiček na destičkový aktin prostřednictvím receptorů GP IIb/IIIa.<sup>5</sup>

Pro zastavení krvácení z větších cév je potřeba aktivovat hemokoagulační systém. Jedná se o řadu reakcí, na kterých se účastní plasmatické proteiny, působící jako enzymy a kofaktory krevního srážení. K aktivaci koagulace dochází na buněčném povrchu. Při poranění dochází k iniciaci buňkami, které nesou na svém povrchu tkáňový faktor, který se dostane do kontaktu s krví. Další reakce probíhají na membránách aktivovaných trombocytů, které se shromáždí v místě poškození. V posledním stupni dochází k tvorbě

trombinu, který přeměňuje rozpustnou bílkovinu fibrinogen na nerozpustný polymer fibrin, který je hlavní složkou koagula. <sup>3</sup>

## **1.5 Induktory agregace trombocytů**

Agregace většinou následuje po adhesi, ale může být vyvolána i přímo, působením řady induktorů, např. ADP, TXA<sub>2</sub>, kolagenu, adrenalinu, trombinu nebo kyseliny arachidonové, které se v laboratoři využívají pro stanovení funkce krevních destiček. <sup>6</sup>

### **1.5.1 Vyvolání agregace adenosindifosfátem**

Primární agregace je vyvolána ADP uvolněným z poškozených tkání (vnější ADP) a má reversibilní průběh. Krevní destičky jsou spojovány přes aktivované glykoproteinové oblasti, které se při nedostatečném impulsu ADP znovu oddělí a navrátí do původního stavu, a dojde k desagregaci trombocytů. Teprve při dostatečně velké koncentraci vnějšího ADP dojde k sekreci obsahu densních granulí, které obsahují zásobní ADP, a ke spuštění mechanismu tvorby TXA<sub>2</sub>. Tento proces má již ireversibilní průběh. <sup>6</sup>

Aktivace buněk pomocí ADP je zprostředkována pomocí membránových glykoproteinových receptorů P2Y<sub>1</sub> a P2Y<sub>12</sub>, které projevují svou aktivitu prostřednictvím tzv. párových G-proteinů. Aktivovaný receptor P2Y<sub>1</sub> podporuje mobilizaci Ca<sup>2+</sup> uvnitř buňky a přispívá ke změně tvaru destiček. P2Y<sub>12</sub> po aktivaci vede k inhibici enzymu adenylcyklasy s následným poklesem hladiny cAMP, k aktivaci fosfolipasy A<sub>2</sub>, která je součástí cyklu přeměny kyseliny arachidonové na TXA<sub>2</sub>, a aktivaci receptorů GP IIb/IIIa. <sup>3,6</sup>

### **1.5.2 Vyvolání agregace tromboxanem A<sub>2</sub>**

Tromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) vzniká v trombocytech převážně při přeměně kyseliny arachidonové působením enzymu cyklooxygenasy. Váže se na tromboxan-prostaglandinové receptory, aktivuje fosfolipasu C prostřednictvím párových G-proteinů vede k aktivaci, sekreci a agregaci krevních destiček. <sup>3,14</sup>

### 1.5.3 Faktor aktivující destičky

Faktor aktivující destičky (PAF) je produkován řadou buněk včetně krevních destiček. Je to účinný aktivátor nejen trombocytů, ale také monocytů a neutrofilů. PAF aktivuje destičky nezávisle na ADP a TXA<sub>2</sub> a kromě aktivačních účinků také zvyšuje cévní propustnost a vyvolává vasokonstrikci.<sup>15</sup>

### 1.5.4 Vyvolání agregace adrenalinem

Adrenalin (epinefrin) sám o sobě vyvolá agregaci pouze tehdy, pokud je v dávkách výrazně překračujících jeho fyziologickou koncentraci. Působí přes  $\alpha_2$ -adrenergní receptor prostřednictvím G-proteinu. Jeho navázáním na membránový receptor destičky dochází k odkrytí vazebného místa receptoru GP IIb/IIIa pro vazbu s fibrinogenem. Jeho dalším účinkem je inhibice adenylcyklasy. Adrenalin slouží především k zesílení účinku jiných destičkových aktivátorů.<sup>6, 16</sup>

### 1.5.5 Vyvolání agregace kolagenem

Kolagen je hlavní složkou cévní stěny a hraje důležitou roli při vyvolání aktivace krevních destiček, jejich agregaci a při nastartování reparačních pochodů.<sup>17</sup> Destičky aktivuje pouze ve své polymerní formě za současné přítomnosti ADP. V prvním kroku dojde k adhezi destiček ke kolagenovým vláknům, k tomu částečně přispívá i interakce pozitivního náboje kolagenu s negativně nabitým povrchem destiček.<sup>18</sup> Po obsazení příslušných receptorů dojde k vyvolání agregačního signálu. Jako nejúčinnější aktivátor agregace se ukazuje kolagen typu III.<sup>6</sup>

### 1.5.6 Vyvolání agregace trombinem

Trombin vzniká na povrchu krevních destiček účinkem protrombinasy na protrombin. Destičky aktivuje prostřednictvím proteasou aktivovaného receptoru PAR-1. Patří mezi nejsilnější aktivátory trombocytů, je schopný vyvolat změnu tvaru, uvolňovací reakci i agregaci.<sup>6, 19</sup>

Trombin nelze používat jako agregační induktor v podmínkách in-vitro, protože jeho působením na plasmu bohatou na destičky dochází ke vzniku fibrinové zátky. Pro tyto podmínky byl zaveden induktor TRAP-6, což je peptid aktivující trombinový receptor.

### **1.5.7 Vyvolání agregace ristocetinem**

Ristocetin není přirozeným induktorem agregace. Je to antibiotikum, které se používá při stanovení funkce krevních destiček. Způsobuje aglutinaci a následnou agregaci tím, že zprostředkovává interakci mezi vWF a GP Ib/IX na povrchu trombocytů. V nepřítomnosti vWF je citlivost na ristocetin snížena, toho se využívá při diagnostice von Willebrandovy choroby.<sup>20, 21</sup>

### **1.5.8 Vyvolání agregace pomocí kationického propylgalátu**

Kationická forma propylgalátu (CPG) se používá k vyvolání agregační odpovědi speciálně při sledování účinnosti protideštičkové léčby kyselinou acetylsalicylovou. Kationický propylgalát je alkyl ester kyseliny gallové mající kladný náboj. Stimuluje uvolňovací reakci z destičkových granulí, modifikuje složení membrány trombocytů a má antioxidační účinky.<sup>22</sup>

## **1.6 Protideštičková léčba**

Pokud přijdou trombocyty během cirkulace v krevním řečišti do styku s obnaženým kolagenem v subendoteliální vrstvě cévní stěny v důsledku aterosklerotického poškození, dochází v tomto místě k jejich adhesi. V případě porušení rovnováhy mezi proagregačními a antiagregačními mechanismy dojde k vytvoření destičkového trombu.<sup>23</sup>

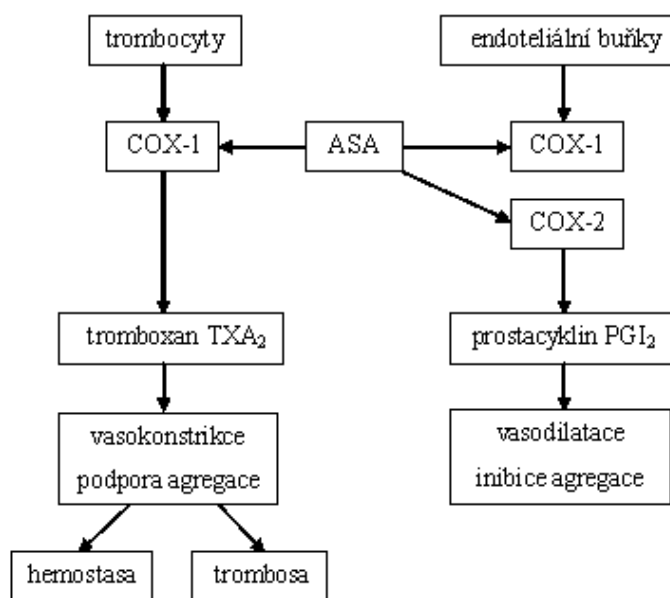
Antiagregační léčba je zaměřena na omezení shlukovací schopnosti trombocytů.<sup>24</sup> Protideštičkové léky interferují při různých krocích aktivačních procesů, včetně adheze, uvolňovací reakce a agregace a snižují riziko arteriální trombózy. Při nadměrném užití však mohou zvýšit riziko krvácení.<sup>4</sup>

Existuje mnoho látek, které zasahují do procesu adheze, aktivace či agregace trombocytů, důkazy o klinické účinnosti pro antiagregační léčbu jsou však v dnešní době pouze pro blokaci tromboxanové cesty inhibicí cyklooxygenasy pomocí kyseliny acetylsalicylové, blokaci ADP receptorů thienopyridinovými deriváty a pro dipyridamol působící prostřednictvím zvýšení cAMP.<sup>25</sup>

### 1.6.1 Ovlivnění tromboxanové cesty působením kyseliny acetylsalicylové

V tomto případě se nejvíc využívá ireversibilní nebo reversibilní inhibice cyklooxygenasy (COX), experimentálně je možná i inhibice tvorby kyseliny arachidonové, inhibice tromboxansynthetasy a blokace tromboxanových receptorů.<sup>25</sup>

Kyselina arachidonová (AA) se deacylací zprostředkovanou fosfolipasami uvolňuje z membránových fosfolipidů. V cyklu kyseliny arachidonové působí cyklooxygenasa 1, která je součástí metabolismu prostaglandinů, kde umožňuje vznik cyklických endoperoxidů, především TXA<sub>2</sub> a prostacyklinu (PGI<sub>2</sub>), což jsou látky významně ovlivňující proces primární hemostase.<sup>4, 25, 26</sup> Cyklooxygenasa 1 je blokována kyselinou acetylsalicylovou (ASA). Inhibice COX-1 pomocí ASA je ireversibilní, protože krevní destička nemá jádro, a nemá tudíž ani genetickou výbavu potřebnou k znovuvytvoření potřebných enzymů pro syntézu prostaglandinů.<sup>27</sup>



Obr. 4 Mechanismus inhibice endoperoxidů kyselinou acetylsalicylovou (ASA)<sup>25</sup>

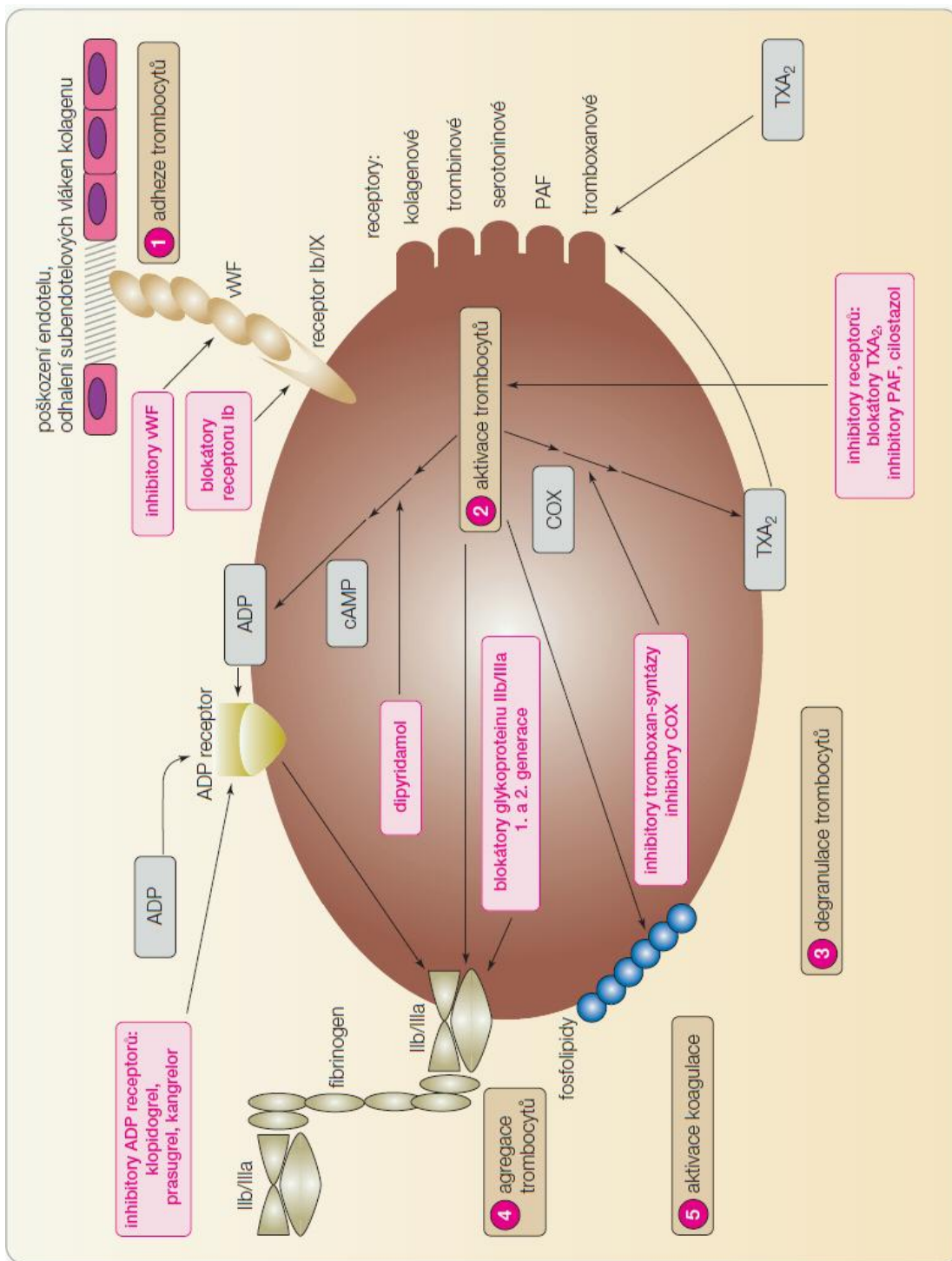
Inhibiční vliv ASA na COX-1 je závislý na dávce této látky. Dávka nižší než 75 mg nemá prokázaný účinek a dávky vyšší než 150 mg nevedou ke snížení kardiovaskulárních rizik, naopak se zvyšuje výskyt vedlejších účinků. Udává se, že funkce destiček se plně obnoví za 6–7 dní po poslední dávce. Hlavním místem účinku ASA na trombocyty je portální oběh, antiagregační účinek tedy na rozdíl od účinku protizánětlivého a analgetického není závislý na sérové hladině. Pro ireversibilní inhibici celé populace destiček tedy stačí kontakt ASA s trombocyty v portálním systému v krátké době před její degradací v játrech.<sup>4, 25</sup>

Nejdéle používaným lékem, který obsahuje ASA jako účinnou látku pro inhibici agregace trombocytů, je Aspirin. V dnešní době je dostupná řada dalších produktů s obchodními názvy např. Anopyrin, Preventax nebo Godasal.

### **1.6.2 Inhibice membránových receptorů pro ADP působením clopidogrelu**

Thienopyridinové deriváty (tiklopidin, clopidogrel a prasugrel) blokují vazbu ADP na destičkové receptory. Aktivní metabolity z těchto derivátů vznikají v těle účinkem cytochromu P450 3A4 a váží se selektivně a ireversibilně na receptor P2Y<sub>12</sub><sup>28</sup>, čímž brání ADP-dependentní aktivaci receptorů GP IIb/IIIa a vazbě trombocytů s fibrinogenem.<sup>25,29</sup>

V našich podmínkách se k inhibici používají léky s účinnou látkou clopidogrel nebo tiklopidin s obchodními názvy např. Plavix, Trombex nebo Tragren. Protože tyto látky po perorálním podání vyžadují přeměnu na aktivní látku, je jejich nástup účinku relativně pomalý.



Obr. 5 Schematické znázornění primární hemostasy a farmakologických možností jejího ovlivnění<sup>29</sup>

## **1.7 Cíl bakalářské práce**

Cílem předkládané bakalářské práce bylo sledování funkce krevních destiček u zdravých jedinců a jedinců užívajících protideštičkovou léčbu pomocí dvou metod, optické a impedanční agregometrie.

Dalším cílem bylo získání dat ke stanovení normálních rozmezí hodnot pro jednotlivé induktory používané v optické a impedanční agregometrii pomocí měření zdravých jedinců. Po získání určitého množství výsledků a stanovení normálního rozmezí hodnot pak dále porovnání obou metod agregace s přihlédnutím na vyjádření účinnosti protideštičkové léčby a na základě toho vybrání metody, která bude pro monitorování léčby vhodnější.



## **2. Experimentální část**

### **2.1 Definice souboru**

#### **2.1.1 Kontrolní soubor**

Do kontrolního souboru bylo zařazeno 25 mužů a 25 žen, s průměrným věkem 37 let. Jednalo se o zdravé jedince, kterým byl vzorek krve pro stanovení funkce krevních destiček odebrán za standardních podmínek v Centrální hematologické laboratoři Všeobecné fakultní nemocnice (CHL VFN) Praha. Kritériem pro vyloučení ze souboru dárců byla léčená hypertenze, mutace F V Leiden a pozitivní markery akutní fáze, tj. zvýšený počet leukocytů, zvýšený fibrinogen a zvýšená hodnota CRP.

#### **2.1.2 Pacienti s protideštičkovou léčbou**

Do skupiny pacientů bylo vybráno 25 mužů a 25 žen, s průměrným věkem 63 let. Tito pacienti, trpící kardiovaskulární chorobou, užívali dlouhodobou duální protideštičkovou léčbu, tzn., že užívali zároveň clopidogrel (75 mg denně) i ASA (100 mg denně).

### **2.2 Použitý materiál**

#### **2.2.1 Diagnostika**

ADP – LTA (Bio/Data Corporation, Horsham, USA)

ADP – Multiplate (Verum Diagnostica GmbH, Munich, Germany)

Citrát sodný (Lachema, Brno, ČR)

Epinefrin (Helena Biosciences, Gateshead, UK).

Fyziologický roztok (Ardepharma, Ševětín, ČR)

Hirudin (Calbiochem, Kalifornie, USA)

Kationický propylgalát (Analytical Control Systems, USA)

Kolagen (Helena Biosciences, Gateshead, UK)

Kyselina arachidonová (Verum Diagnostica GmbH, Munich, Germany)

Kyselina acetylsalicylová (Verum Diagnostica GmbH, Munich, Germany)

Prostaglandin E<sub>1</sub> (Verum Diagnostica GmbH, Munich, Germany)

Ristocetin (Bio/Data Corporation, Horsham, USA)

TRAP 6 (Verum Diagnostica GmbH, Munich, Germany)

### 2.2.2 Biologický materiál

Plná krev odebraná do hirudinu (CHL VFN Praha)

Plná krev odebraná do citrátu (CHL VFN Praha)

## 2.3 Přístroje

### 2.3.1 „Platelet Aggregation Profiler“ (PAP4)

PAP4 (Bio/Data Corporation, USA) je čtyřkanálový analyzátor, který se používá pro stanovení funkce krevních destiček pomocí optické agregometrie (LTA – Light Transmission Aggregometry).

### 2.3.2 „Multiplate“ (MEA – Multiplate Electrode Aggregometry)

„Multiplate“ (Dynabyte, Munich, Germany) je analyzátor pracující na impedančním principu. Skládá se z pěti paralelních kanálů s detekčními kabely, elektronicky řízené pipety, monitoru a softwaru na bázi Windows XP. Slouží ke kompletnímu vyšetření funkce krevních destiček. Může se použít také k monitorování protideštičkové léčby.

### 2.3.3 Další přístroje

Centrifuga 5804 R (Eppendorf)	příprava PRP a PPP
Centrifuga Mini Spin (Eppendorf)	příprava plasmy bez destiček
Coulter LH 755 (Beckman Coulter, USA)	stanovení počtu krevních destiček v PRP

## 2.4 Metody

### 2.4.1 Odběr vzorků krve

Vzorky byly získány od informovaných zdravých dárců a pacientů užívajících kombinovanou protideštičkovou léčbu. Odběr krve byl ve většině případů proveden za standardních podmínek přímo v laboratoři (hematologická laboratoř VFN), aby bylo zamezeno chybám v preanalytické fázi při zpracování. V případě odběru krve provedeném na jiném pracovišti byl zajištěn šetrný transport krve do laboratoře do 30 minut.

Krev byla odebírána do odběrových zkumavek do citrátu sodného (odběrový systém Vacutainer, Becton-Dickinson, UK), nebo do hirudinu (odběrový systém Vacuette, Greiner, Rakousko) v závislosti na dalším měření.

#### **2.4.2 Příprava krve pro měření agregace destiček na „Multiplate“**

Pro stanovení funkce destiček pomocí impedanční agregometrie byla krev ze žíly odebrána do 15 IU/ml hirudinu. Hirudin působí jako přímý inhibitor trombinu, nedochází tedy k vyvazování  $\text{Ca}^{2+}$ . Krev s hirudinem byla stabilizována při pokojové teplotě až do doby měření.

#### **2.4.3 Příprava plasmy bohaté na destičky**

Pro analýzu optickou agregometrií byla krev ze žíly odebrána do zkumavek s citrátem v poměru 1:10 (1 díl citrátu sodného o koncentraci 0,129 mol/l a 9 dílů krve). Odebraná plná krev byla centrifugována (10 min, 900 RPM, 25°C). Horní vrstva plasmy obsahující krevní destičky (PRP) byla pipetou přenesena do nové zkumavky a řádně promíchána. Na analyzátoru Coulter LH 755 byl stanoven počet krevních destiček a v případě potřeby upraven. K úpravě na požadovaný počet destiček pro stanovení optickou agregometrií byla PRP ředěná PPP.

#### **2.4.4 Příprava plasmy chudé na destičky**

Na přípravu plasmy chudé na destičky byla použita krev odebraná do citrátu, která byla centrifugována (10 min, 3000 RPM, 25°C). Pro přípravu plasmy bez destiček byla PPP znovu centrifugována (5 min, 13000 RPM, 25°C).

#### **2.4.5 Měření agregace destiček na „Multiplate“**

Vyšetření bylo prováděno z plné krve ve speciálních kyvetách majících dva páry senzorů, na kterých se destičky po indukci adherují a agregují. Dva páry senzorů zajišťovaly automatickou kontrolu kvality. Pro jednu analýzu bylo potřeba 300  $\mu\text{l}$  krve. Během nasedání destiček na senzory docházelo ke zvýšení elektrického odporu (impedance). Elektrické napětí bylo převedeno na agregační jednotky AU, které byly

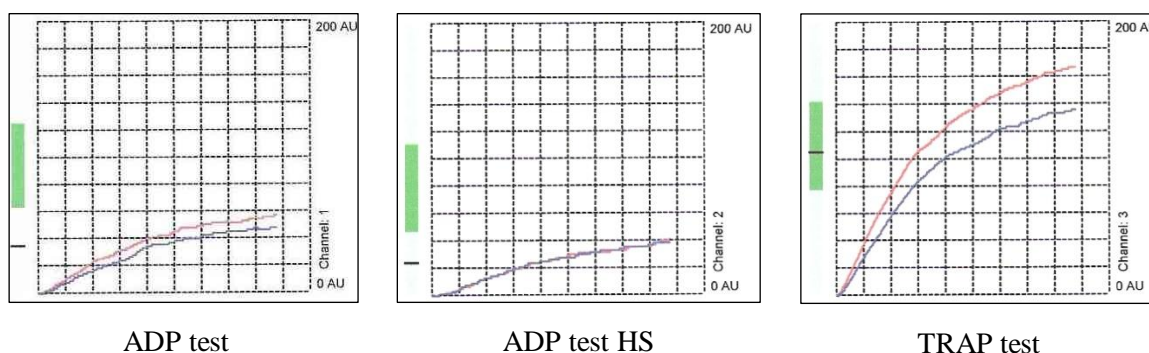
vynášeny do grafu v závislosti na čase. Hlavním měřeným parametrem byla plocha pod agregační křivkou (AUC) vyjádřená v agregačních jednotkách za minutu (AU\*min).

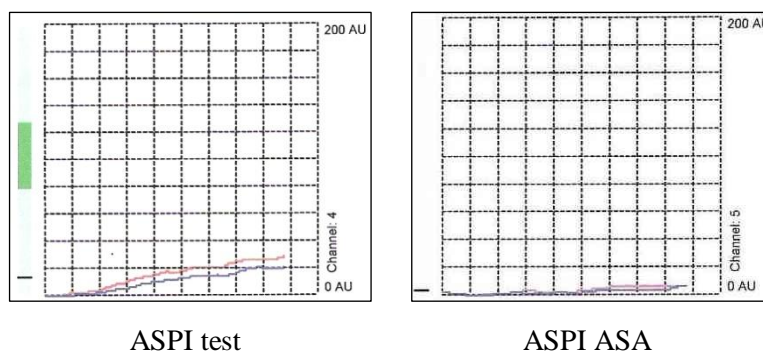
Při samotném měření byly do jednotlivých kanálů analyzátoru umístěny kyvety s elektrodami a byly k nim připojeny detekční kabely. Na počítači byly zadány identifikační údaje měřeného jedince a vybrány jednotlivé testy na proměření. U kontrolní skupiny i skupiny pacientů byla sledována míra agregace po indukci ADP (ADP test a ADP test HS), peptidem aktivujícím trombinový receptor 6 (TRAP test) a kyselinou arachidonovou (ASPI test a ASPI ASA). ADP test byl použit pro sledování účinnosti inhibitoru receptoru pro ADP - P2Y<sub>12</sub>. TRAP test sloužil pro kontrolu funkce destiček, při správné funkci by neměl být ovlivněn protideštičkovou léčbou. ASPI test byl využit ke sledování účinnosti ASA jakožto inhibitoru cyklooxygenasy a ASPI ASA sloužil jako kontrolní test rezistence na ASA.

Do každé kyvety bylo elektronicky řízenou pipetou přeneseno 300  $\mu$ l krve a 300  $\mu$ l fyziologického roztoku (0,9% roztok NaCl). Následně bylo do kyvet přidáno 20  $\mu$ l jednotlivých induktorů v pořadí ADP (o koncentraci 6,5  $\mu$ mol/l), ADP s prostaglandinem, TRAP 6 (o koncentraci 32  $\mu$ mol/l), AA (o koncentraci 0,5 mmol/l) a AA s ASA, a bylo spuštěno měření.

Z jednoho měřicího kanálu byly získány dva výstupy – dvě agregační křivky. Na křivce byla znázorněna závislost agregace destiček, vyjádřená v agregačních jednotkách (AU), na čase (min). Z průměrných hodnot obou křivek byla vypočítána hodnota AUC – plocha pod křivkou (AU\*min).

Na obrázku 6 jsou znázorněné agregační křivky pacienta s účinnou duální protideštičkovou léčbou (ASA 100 mg, clopidogrel 75 mg).





Obr. 6 Agregáčnı křivky pacienta s účinnou duání protidestičkovou léčbou měřené na „Multiplate“

#### 2.4.6 Provedení testů funkce krevních destiček optickou agregometrií

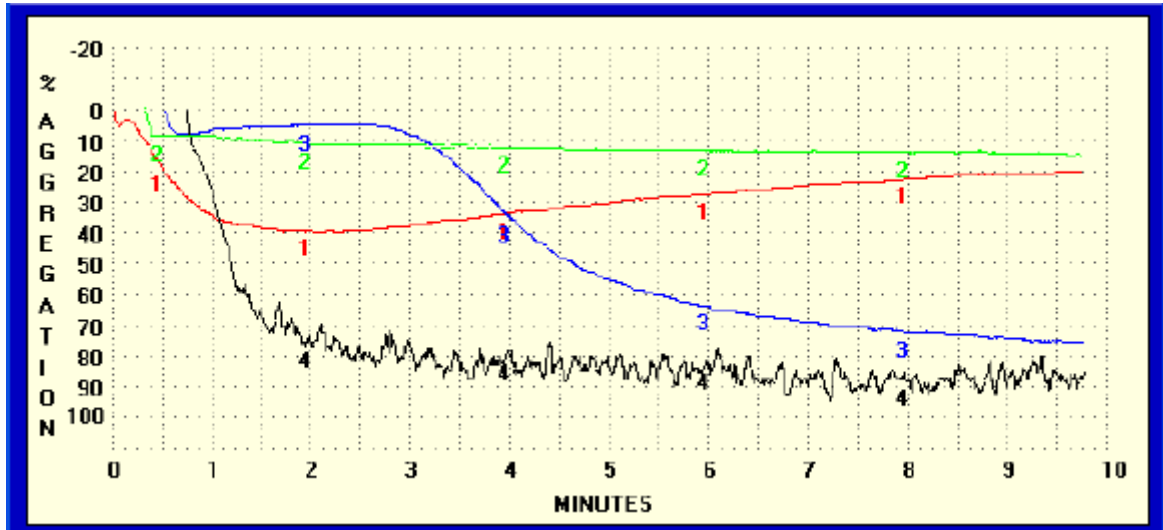
Měření probíhalo za stálého míchání ve skleněných silikonovaných mikrokyvetách inkubovaných při 37°C. V experimentech byla měřena změna propustnosti světla (transmise) po přidání induktoru. Pro měření byla potřeba 225 µl plasmy bohaté na destičky (PRP) a 25 µl induktoru. Počet destiček v PRP byl upraven pomocí plasmy chudé na destičky (PPP) na počet 200–300·10<sup>9</sup>/l. Jako kontrola sloužila plasma bez destiček. Výstupem byly agregáčnı křivky znázorňující závislost míry agregace na čase. U většiny induktorů byla sledována finální agregace v %, resp. rozdíl mezi „baseline“ nastavenou pomocí PPP (0 %) a maximální agregací (100 %).

Při vlastním měření byla do šesti mikrokyvet umístěna míchadla. Do kyvet bylo následně pipetou přeneseno 225 µl PRP, která byla při přípravě naředěna PPP na optimální počet destiček. Do sedmé mikrokyvety bylo pipetou přeneseno 250 µl plasmy bez destiček, tento vzorek byl použit jako blank, pro nastavení „baseline“. Mikrokyvety byly umístěny do přístroje, kde byly temperovány na teplotu 37°C. Na počítači byly zadány identifikační údaje testovaného jedince a nastaveny jednotlivé parametry pro měření. Do mikrokyvet bylo k PRP přidáváno 25 µl jednotlivých induktorů v pořadí ADP (o koncentraci 20 µg/ml), epinefrin (o koncentraci 100 µmol/l), kolagen (o koncentraci 19 µg/ml) a ristocetin (o koncentraci 1,5 mg/ml), v druhé fázi pak kyselina arachidonová (o koncentraci 500 µg/ml) a kationický propylgalát (o koncentraci 300 µmol/l), a ihned po přidání induktoru bylo spuštěno měření. Přibližně po 8 minutách bylo měření ukončeno. Primární křivky byly vyhodnoceny softwarem přístroje a uloženy do databáze vzorků v přístroji.

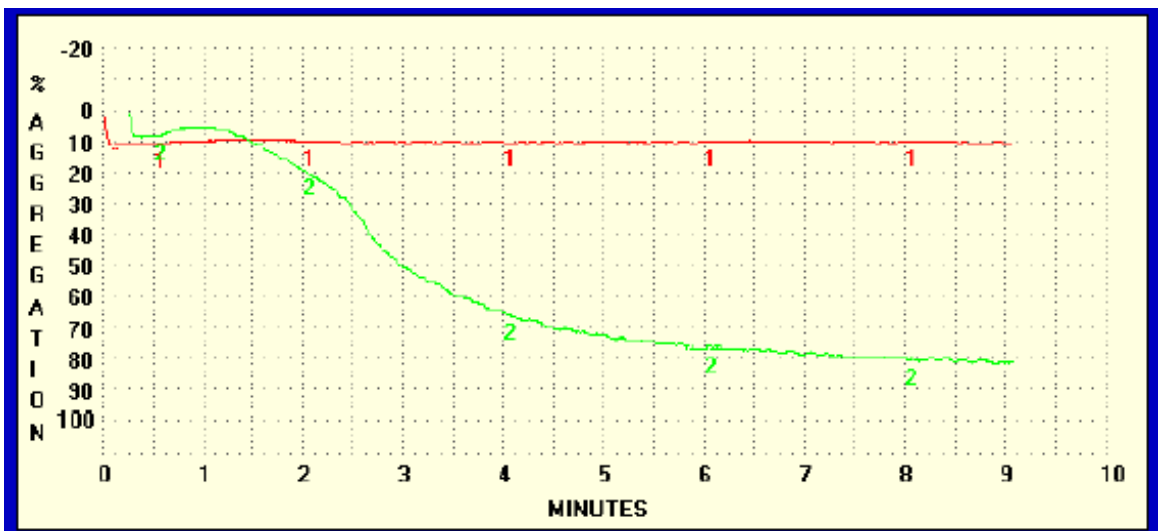
Na výstupních grafech byla u většiny induktorů – ADP, epinefrinu (EPI), kolagenu (COL), ristocetinu (RIS) a kyseliny arachidonové (AA) hodnocena míra finální agregace v %, u ADP také míra desagregace v %. U kationického propylgalátu (CPG) byla

hodnocena strmost křivky – slope, udávaná v %/min, a čas při poloviční agregaci – T 50, udávaný v s.

Na obrázku 7 a 8 jsou znázorněné agregační křivky pacienta s účinnou duální protidestičkovou léčbou (ASA 100 mg, clopidogrel 75 mg).



Obr. 7 Agregační křivky po indukci ADP-1, EPI-2, COL-3 a RIS-4



Obr. 8 Agregační křivky po indukci AA-1 a CPG-2

### 3. Výsledky

Zjištěná data pro vliv jednotlivých induktorů na agregaci krevních destiček, tj. % agregace, % disagrace, strmost křivky (slope) a poloviční čas agregace (T 50), byla zpracována v systému Microsoft Office Excel 2007 a statistické výpočty provedeny v programu Statistica 10.

#### 3.1 Stanovení normálního rozmezí hodnot měření agregace krevních destiček po jednotlivých induktorech u kontrolní skupiny

##### 3.1.1 Normální rozmezí hodnot pro měření agregace krevních destiček optickou agregometrií

U pacientů i zdravých jedinců byla vyhodnocována finální agregace měřená po indukci ADP, epinefrinem (EPI), ristocetinem (RIS), kyselinou arachidonovou (AA) a poloviční čas agregace a strmost křivky po indukci kationickým propylgalátem (CPG). Referenční rozmezí bylo stanoveno pomocí kontrolní skupiny, jejíž hodnoty jsou uvedené v tabulce 1, následovně:

ADP = 61–93 %

AA = 59–91%

EPI = 60–90 %

CPG T 50 = 44–100 s

RIS = 70–96 %

CPG slope = 66–120 %/min

##### 3.1.2 Normální rozmezí hodnot pro měření agregace krevních destiček impedanční agregometrií

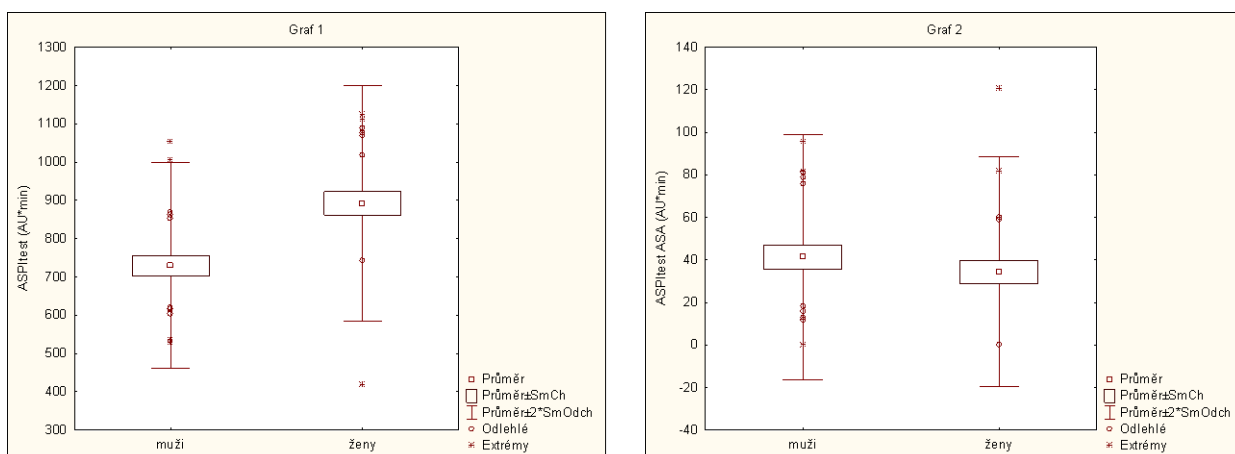
U obou skupin byl vyhodnocován ADP test (míra agregace po indukci ADP), TRAP test (míra agregace po indukci peptidem aktivujícím trombinový receptor), ASPI test (míra agregace po indukci kyselinou arachidonovou) a ASPI ASA (míra agregace po indukci kyselinou arachidonovou s přidáním kyseliny acetylsalicylovou). Referenční rozmezí bylo stanoveno pomocí kontrolní skupiny, jejíž hodnoty jsou uvedené v tabulce 1 – pro muže a ženy, v tabulce 2 – pro muže a v tabulce 3 – pro ženy, následovně:

ADP test (muži) = 320–878 AU\*min  
 TRAP test (muži) = 667–1159 AU\*min  
 ASPI test (muži) = 466–992 AU\*min  
 ASPI ASA (muži i ženy) = 0–93 AU\*min

ADP test (ženy) = 501–1017 AU\*min  
 TRAP test (ženy) = 771–1319 AU\*min  
 ASPI test (ženy) = 591–1193 AU\*min

### 3.1.3 Statistické porovnání hodnot měření agregace destiček po jednotlivých induktorech mezi pohlavími

Pro statistické porovnání mezi pohlavími byl použit T-test pro nezávislé skupiny. Zjistili jsme signifikantní rozdíl ( $p < 0,001$ ) u testů na „Multiplate“ kromě kontrolního testu ASPI ASA. Na LTA nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi pohlavími. Na grafu 1 a 2 jsou znázorněná porovnání výsledků ASPI testu a ASPI ASA testu u kontrolního souboru pro muže a ženy.



Graf 1 a 2 Porovnání hodnot ASPI testu a ASPI ASA u kontrolního souboru mužů a žen

### 3.1.4 Korelace hodnot měření agregace krevních destiček po jednotlivých induktorech v kontrolním souboru

Normalita byla hodnocená pravděpodobnostním grafem a SW testem (Shapiro-Wilkův test). Na základě normality byly vybrány příslušné korelace.

Pro zjištění vzájemných korelačních vztahů v kontrolním souboru byl použit Pearsonův korelační koeficient s následujícími výsledky: parametry v rámci jednotlivých metod spolu vzájemně korelují ( $p < 0,05$ ) s výjimkou parametru CPG, kde jsou používány jiné jednotky, než u ostatních parametrů na LTA.



## 3.2 Definice zbytkové aktivity destiček a účinnosti duální léčby

### 3.2.1 Účinnost léčby měřená optickou agregometrií

Při hodnocení účinnosti protideštičkové léčby se kladl důraz především na induktry, po kterých byla agregace výrazně ovlivněna. Míra ovlivnění agregace destiček léčbou v porovnání s mírou agregace u kontrolního souboru je pro clopidogrel znázorněná v grafech 4, 5 a 6, pro kyselinu acetylsalicylovou (ASA) v grafech 7–11. V případě ASA to byl epinefrin, kyselina arachidonová a kationický propylgalát, v případě clopidogrelu ADP.

### 3.2.2 Účinnost léčby měřená impedanční agregometrií

Účinnost léčby ASA, resp. clopidogrelu (tj. míra inhibice agregace destiček po indukci AA, resp. ADP) byla vyhodnocována v %. Základem pro výpočet byla měřená plocha pod křivkou ASPI testu, resp. ADP testu (AU\*min).

Pro výpočet míry inhibice agregace po indukci AA u ASPI testu a ADP u ADP testu (% inh.) podle rovnice 2, vyjadřované pomocí zjištěných hodnot TRAP testu, se vycházelo z faktu, že mezi průměrnými hodnotami TRAP testu pro kontrolní soubor a soubor pacientů není statisticky významný rozdíl (Kolmogorův-Smirnovův test,  $p > 0,01$ ). Pro dopočet teoretické hodnoty ASPI a ADP testu u pacientů, viz rovnice 1, bylo využito zjištění, že ASPI a ADP test s TRAP testem v kontrolním souboru korelují.

$$ASPI\ test\ (pac.)\ teor. = \frac{TRAP\ test\ (pac.) \cdot ASPI\ test\ (kon.)}{TRAP\ test\ (kon.)} \quad (1)$$

$$účinnost\ (\%) = \left( 1 - \frac{ASPI\ test\ (pac)\ měř.}{ASPI\ test\ (pac.)\ teor.} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

*pac.* – pacient, *kon.* – kontrolní soubor, *teor.* – teoretická hodnota, *měř.* – naměřená hodnota  
účinnost v % – míra inhibice

### 3.3 Deskriptivní statistika zjištěných hodnot agregace krevních destiček po přidání jednotlivých induktorů

#### 3.3.1 Hodnoty agregace trombocytů zjištěné u kontrolního souboru

Je doporučováno, aby si každá laboratoř stanovila vlastní normální rozmezí hodnot pro sledované parametry, proto byl vybrán kontrolní soubor zdravých jedinců. V tabulce 1 jsou uvedené zjištěné hodnoty agregace pro celý soubor zdravých jedinců, tj. muže i ženy. V tabulce 2 jsou pak uvedené hodnoty agregace pouze pro muže, v tabulce 3 pouze pro ženy.

Tab. 1 Hodnoty agregace destiček u zdravých dárců pro optickou (LTA) i impedanční (MEA) agregometrii

		LTA							MEA			
n = 50	Věk	ADP	% des. ADP	EPI	RIS	AA	CPG slope	CPG T 50	ADPtest	TRAPtest	ASPItest	ASPI ASA
minimum	21	62	0	59	65	61	66	48	382	716	419	0
maximum	68	94	2	90	97	93	120	108	997	1296	1126	121
medián	33	76	0	76	83	75	92	71	670	971	812	31
průměr	37	77	0	75	83	75	93	72	679	979	811	38
sm. odch.	13	8	0	7	6	8	14	14	156	146	163	28
2SD	25	16	1	15	13	16	27	28	313	292	326	55
P±2SD	37±25	77±16	0±1	75±15	83±13	75±16	93±27	72±28	679±313	979±292	811±326	38±55

Tab. 2 Hodnoty agregace destiček u zdravých dárců pro optickou (LTA) i impedanční (MEA) agregometrii – skupina mužů

muži		LTA							MEA			
n = 25	Věk	ADP	% des. ADP	EPI	RIS	AA	CPG slope	CPG T 50	ADPtest	TRAPtest	ASPItest	ASPI ASA
minimum	21	62	0	59	72	61	66	54	382	716	531	0
maximum	62	94	2	90	92	90	116	108	997	1156	1053	96
medián	33	77	0	76	84	75	92	69	558	931	690	40
průměr	35	79	0	76	84	75	92	74	599	913	729	41
sm. odch.	11	9	1	8	6	8	13	13	140	123	131	28
2SD	22	17	1	15	11	17	25	27	279	246	263	57
P±2SD	35±22	79±17	0±1	76±15	84±11	75±17	92±25	74±27	599±279	913±246	729±263	41±57

Tab. 3 Hodnoty agregace destiček u zdravých dárců pro optickou (LTA) i impedanční (MEA) agregometrii – skupina žen

ženy		LTA							MEA			
n = 25	Věk	ADP	% des. ADP	EPI	RIS	AA	CPG slope	CPG T 50	ADPtest	TRAPtest	ASPItest	ASPI ASA
minimum	21	64	0	61	65	63	74	48	433	832	419	0
maximum	68	92	1	85	97	93	120	99	989	1296	1126	121
medián	33	75	0	74	80	75	94	71	757	1024	880	31
průměr	39	76	0	74	82	76	95	70	759	1045	892	34
sm. odch.	14	7	0	7	7	8	14	14	129	137	150	26
2SD	28	14	0	14	14	15	29	29	258	274	301	53
P±2SD	39±28	76±14	0	74±14	82±14	76±15	95±29	70±29	759±258	1045±274	892±301	34±53

### 3.3.2 Hodnoty agregace trombocytů zjištěné u souboru pacientů

Důvodem měření dat souboru pacientů byla nutnost ověřit účinnost podávané duální léčby. V tabulce 4 jsou uvedené zjištěné hodnoty agregace pro celý soubor jedinců, tj. muže i ženy. V tabulce 5 jsou uvedené hodnoty agregace pouze pro muže, v tabulce 6 pouze pro ženy.

Tab. 4 Hodnoty agregace destiček u pacientů pro optickou (LTA) i impedanční (MEA) agregometrii

		LTA							MEA					
n = 50	Věk	ADP	% des. ADP	EPI	RIS	AA	CPG slope	CPG T 50	ADPtest	ADPtest % inh.	TRAPtest	ASPItest	ASPItest % inh.	ASPI ASA
minimum	37	33	0	9	64	0	12	75	17	0	405	41	0	0
maximum	86	89	84	76	100	74	92	480	951	68	1210	1050	94	175
medián	62	57	44	30	87	9	34	157	390	27	887	125	83	23
průměr	63	56	41	33	86	12	38	185	426	32	869	176	75	31
sm. odch.	14	12	26	16	8	16	16	97	208	25	207	177	24	35

Tab. 5 Hodnoty agregace destiček u pacientů pro optickou (LTA) i impedanční (MEA) agregometrii – soubor mužů

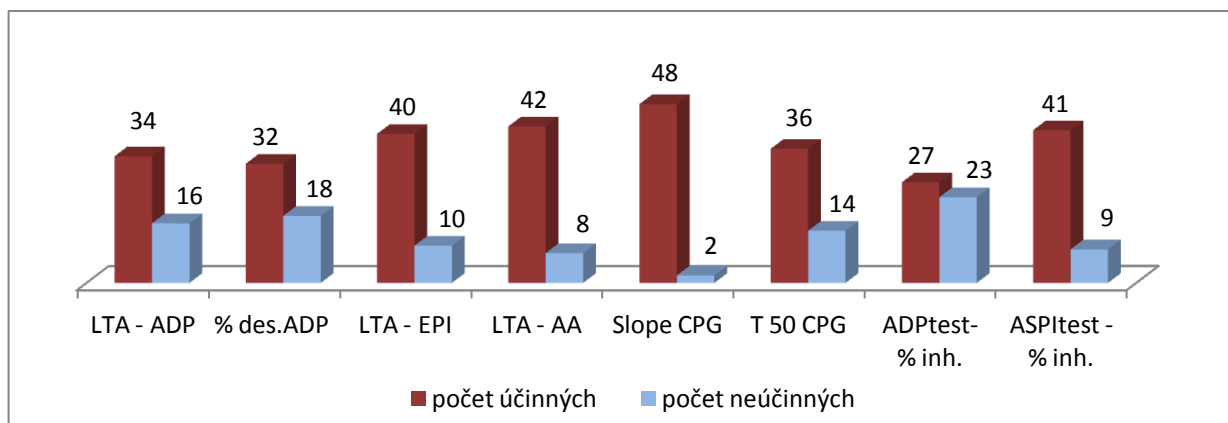
muži		LTA							Multiplate					
n = 25	Věk	ADP	% des. ADP	EPI	RIS	AA	CPG slope	CPG T 50	ADPtest	ADPtest % inh.	TRAPtest	ASPItest	ASPItest % inh.	ASPI ASA
minimum	37	33	0	9	64	0	12	75	107	0	405	41	0	0
maximum	86	89	84	76	100	74	92	480	951	68	1210	1050	94	175
medián	62	57	44	30	87	9	34	157	390	27	887	125	83	23
průměr	63	56	41	33	86	12	38	185	426	32	869	176	75	31
sm. odch.	14	12	26	16	8	16	16	97	208	25	207	177	24	35

Tab. 6 Hodnoty agregace destiček u pacientů pro optickou (LTA) i impedanční (MEA) agregometrii – soubor žen

ženy		LTA							Multiplate					
n = 25	Věk	ADP	% des. ADP	EPI	RIS	AA	CPG slope	CPGT 50	ADPtest	ADPtest % inh.	TRAPtest	ASPItest	ASPItest % inh.	ASPI ASA
minimum	37	24	6	16	64	0	20	71	176	0	323	19	0	0
maximum	79	69	96	71	99	55	64	316	730	74	1381	594	97	117
medián	64	50	52	30	86	10	40	109	381	50	960	146	82	18
průměr	60	50	53	32	85	15	40	140	375	45	923	183	75	29
sm. odch.	14	11	23	14	8	14	14	70	159	21	222	143	25	32

### 3.4 Vyjádření účinnosti léčby

Pro hodnocení účinnosti léčby jsme použili data uvedená v tabulce 4. Počty jedinců, u kterých byla léčba účinná, jsme znázornili v grafu 3, procentuální vyjádření účinné léčby je uvedeno v tabulce 7.



Graf 3 Číselné vyjádření účinnosti léčby pomocí vybraných parametrů

Tab. 7 Procentuální vyjádření účinnosti léčby

	LTA - ADP	% des. ADP	LTA - EPI	LTA - AA	Slope CPG	T 50 CPG	ADP test - % inh.	ASPI test - % inh.
účinnost %	68	64	80	84	96	72	54	82

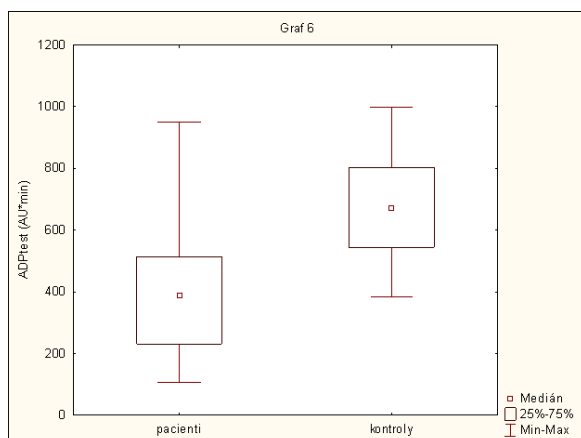
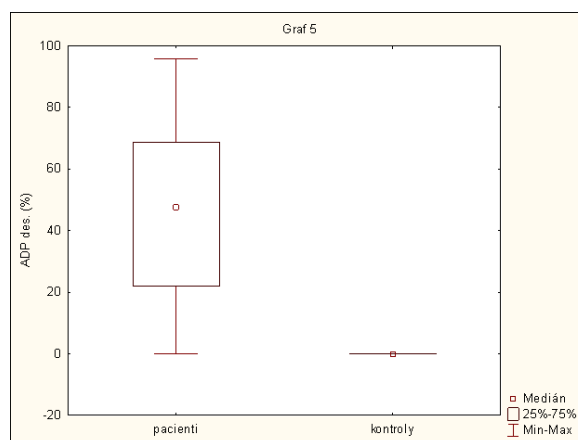
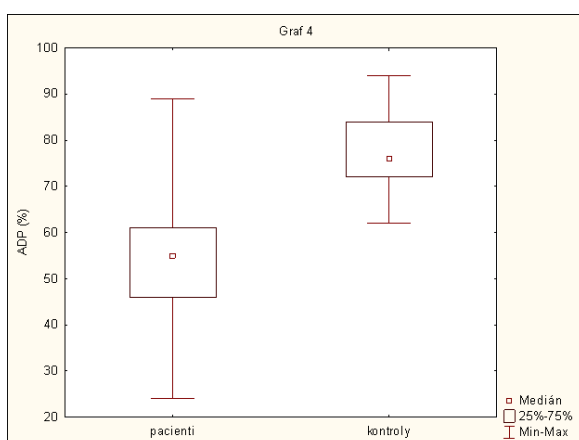
### 3.5 Statistické porovnání pacientů a kontrol

Pro statistické porovnání zjištěných hodnot agregace krevních destiček po přidání jednotlivých induktorů u pacientů a kontrol mezi pacienty a kontrolami jsme použili Kolmogorův-Smirnovův test. U všech parametrů jsme zjistili signifikantní rozdíl ( $p < 0,001$ ).

Na základě porovnání normálních hodnot agregace destiček a hodnot agregace po podání protideštičkové léčby bylo možné vybrat ty induktory, které po podání protideštičkové léčby ukazují změny v agregaci desetiček.

### 3.5.1 Parametry stanovené pro sledování účinnosti clopidogrelu

Po podání clopidogrelu byla zjištěna snížená agregace po indukci ADP, proto byly pro vyhodnocování účinnosti léčby použity právě parametry agregačních křivek, které tento fakt znázorňovaly. Na grafech 4, 5 a 6 je možno pozorovat rozdíl mezi mírou agregace u zdravých jedinců a pacientů užívajících protideštičkovou léčbu.

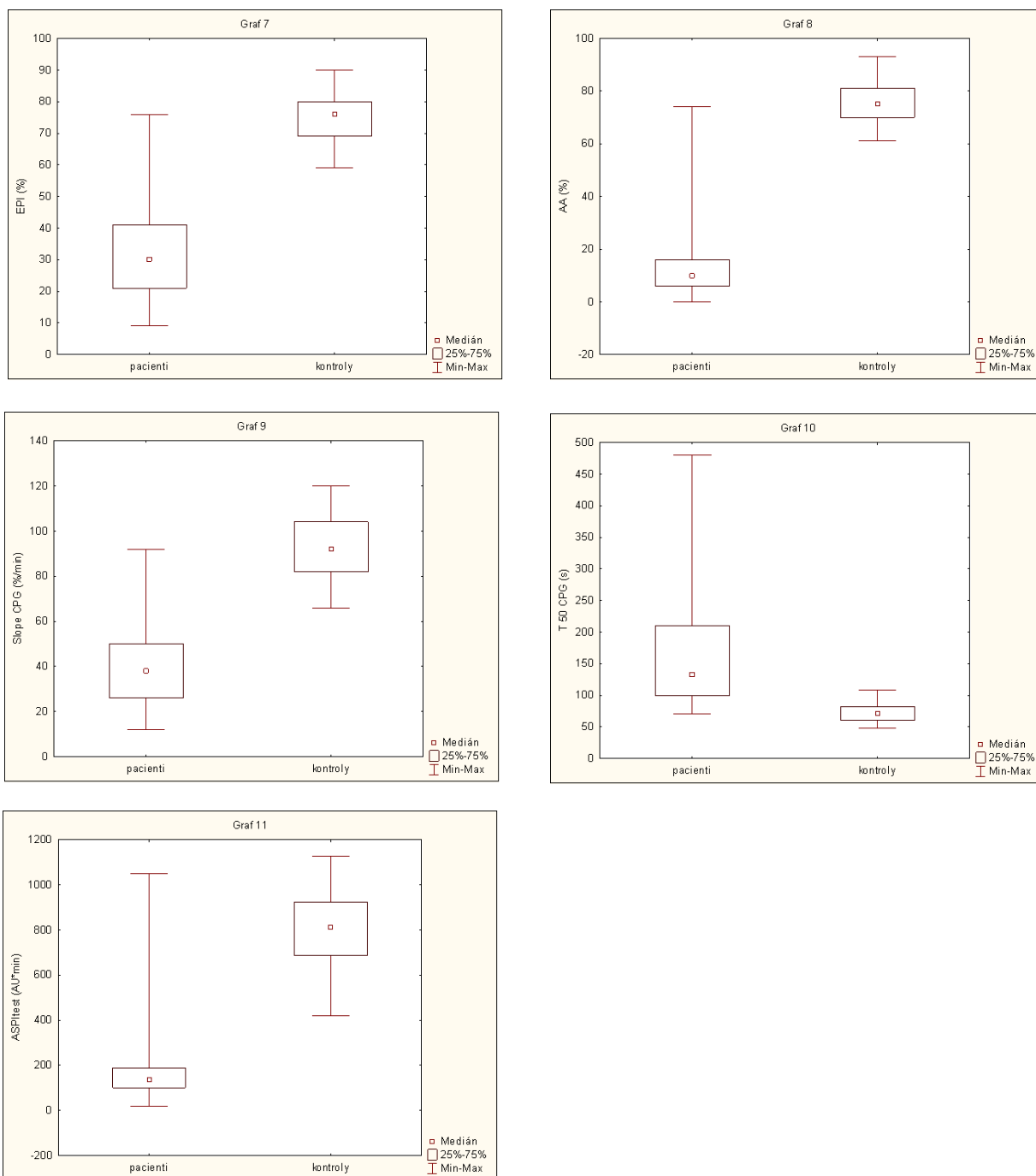


*Graf 4–6 Graficky znázorněné porovnání míry agregace krevních destiček u pacientů a kontrolního souboru, v grafu 4 je znázorněné porovnání agregace po indukci ADP, v grafu 5 desagregace po indukci ADP, v grafu 6 porovnané hodnoty ADP testu*

### 3.5.2 Parametry stanovené pro sledování účinnosti kyseliny acetylsalicylové

Po podání kyseliny acetylsalicylové (ASA) byla zjištěna snížená agregace po indukci epinefrinem (EPI), kyselinou arachidonovou (AA) a zvýšený poloviční čas agregace a odlišná strmost křivky po indukci kationickým propylgalátem (CPG).

Na grafech 7–11 je možno pozorovat rozdíl mezi mírou agregace, desagregace, T 50 a slope u zdravých jedinců a pacientů užívajících protidestičkovou léčbu.



Graf 7–11 Graficky znázorněné porovnání míry agregace krevních destiček u pacientů a kontrolního souboru, v grafu 7 je porovnání agregace po indukci EPI, v grafu 8 po indukci AA, v grafu 9 slope CPG, v grafu 10 porovnání T 50 CPG a v grafu 11 jsou porovnané hodnoty ASPI testu

## 4. Diskuse

V teoretické části práce jsme popsali základní funkce krevních destiček a monitorování jedné z těchto funkcí, agregace destiček. Uvedli jsme induktory, které vyvolávají agregaci destiček a které jsme potom dále využívali v experimentální části práce.

V první části porovnávání jsme hodnotili míru agregace destiček po přidání jednotlivých induktorů u skupiny zdravých dárců v počtu padesáti jedinců a pomocí získaných dat jsme stanovili laboratorní normální rozmezí hodnot měření funkce krevních destiček pro jednotlivé induktory. Výsledky jsme hodnotili komplexně, v souboru, kde byli zahrnuti muži i ženy, a následně jsme vyhodnocení provedli i pro soubor mužů a žen zvlášť. Měření funkce destiček vybraných zdravých jedinců jsme prováděli v období od června 2011 do dubna 2012.

Ve druhé části měření jsme hodnotili míru agregace destiček po přidání jednotlivých induktorů u skupiny pacientů užívajících duální protideštičkovou léčbu. Na analyzátorech jsme proměřovali agregaci po několika vybraných induktorech, při vyhodnocování jsme dále používali jen ty induktory, které agregaci výrazně ovlivňovaly.

U hodnot funkce destiček kontrolní skupiny měřené optickou agregometrií nebyly zjištěny významné rozdíly mezi pohlavím, proto také uvádíme normální rozmezí hodnot agregace pro muže a ženy dohromady. U impedanční agregometrie byly u jednotlivých induktorů výsledky pro muže a ženy odlišné. Proto na základě této práce vznikne doporučení vyhodnocovat výsledky impedanční agregometrie pro ženy a muže odděleně a i naše stanovené rozmezí hodnot je pro muže a ženy rozlišeno.

Při měření optickou agregometrií jsme si ověřili, že agregace destiček po přidání induktorů je v případě ASA výrazně ovlivněna po indukci epinefrinem, kyselinou arachidonovou a kationickým propylgalátem, v případě clopidogrelu po indukci ADP. V porovnání s hodnotami stanovenými v rámci měření souborů zdravých jedinců u pacientů léčených ASA obvykle docházelo k mírnému snížení hodnot finální agregace po přidání ADP a k mírné desagregaci, k výraznému snížení až chybění agregace po indukci kyselinou arachidonovou (AA = 0–20 %) a epinefrinem (EPI = 0–44 %) a k posunutí hodnot mimo stanovené normální rozmezí pro kationický propylgalát (CPG slope < 66 %/min a CPG T50 > 100 s). U pacientů léčených clopidogrelem docházelo k výraznému snížení hodnot finální agregace po indukci ADP (ADP = 0–59 %) a k výrazné desagregaci (% des. po indukci ADP  $\geq$  35 %). U souboru pacientů jsme

vztahovali zjištěné hodnoty agregace a jejího ev. snížení k hodnotám určeným v rámci kontrolního souboru. Rozmezí pro účinnou léčbu u některých parametrů bylo dříve stanovené v naší laboratoři z rozsáhlého souboru pacientů s protideštičkovou léčbou (AA, EPI, % des. po ADP) a v případě finální agregace po ADP z literatury.<sup>30</sup>

Při měření míry agregace impedanční agregometrií po přidání jednotlivých induktorů je průměrná účinnost ASA při denní dávce 100 mg 65–99 %. Toto rozmezí bylo dříve stanovené v naší laboratoři pomocí rozsáhlého souboru pacientů užívajících ASA (nepublikované výsledky). Průměrná účinnost (tj. míra inhibice agregace destiček po indukci ADP) při denní dávce 75 mg clopidogrelu je 40–60 %.<sup>31</sup>

Z porovnání jednotlivých metod vyplývá, že optická agregometrie je vhodnější pro sledování účinnosti léčby ASA, protože je zřejmá odezva po indukci třemi agonisty, které je třeba pro jejich mírně odlišnou citlivost hodnotit komplexně.

Impedanční agregometrie je vhodná pro stanovení účinnosti jak po léčbě ASA, tak po clopidogrelu, protože ukazuje významnou změnu hodnot agregace po přidání jednotlivých induktorů. Pomocí testu ASPI ASA lze navíc určit případnou aspirinovou resistenci.

Je také důležité přihlédnout k výhodám a nevýhodám provedení jednotlivých metod. Příprava krve na měření optickou agregometrií je časově náročná, projevuje se vliv chylasní, ikterické a hemolytické plasmy, vzhledem k tomu, že se jedná o optickou metodu, na druhou stranu je velkou výhodou úprava počtu destiček pro měření na standardní počet 200–300·10<sup>9</sup>/l. Tím optická agregometrie (LTA) zůstává „zlatým standardem“ pro stanovení funkce destiček. Dále je na LTA možné přímé vyjádření v procentech agregace, není potom nutné složité vyhodnocování.

Měření pomocí impedanční agregometrie je rychlé, protože se používá plná krev, odpadá tak časově náročná příprava plasmy bohaté na destičky, navíc je potřeba menšího objemu krve, a zároveň probíhá analýza souběžně na dvou senzorech a umožňuje tak automatickou kontrolu kvality měření. Jednou z nevýhod je atypické protisrážlivé činidlo (hirudin), které nemusí být vždy dostupné. Velkou roli zde hraje počet destiček, který na rozdíl od optické agregometrie nemůžeme upravit. Vyhodnocení výsledků je při tomto měření poměrně složité, výstupní hodnoty je potřeba přepočítávat pomocí kontrolních testů.



## 5. Závěr

V bakalářské práci jsme zjistili, že pro sledování účinnosti duální protidestičkové léčby je vhodná optická i impedanční agregometrie využívaná pro měření míry agregace krevních destiček. Nevýhodou optické agregometrie je její časová náročnost, výhodou je snadnější interpretace výsledků a standardizovaný počet destiček pro analýzu. Nevýhodou impedanční agregometrie je vliv počtu krevních destiček a náročnější interpretace výsledků, bylo by tedy potřebné stanovit jednoznačné meze pro účinnost léčby. Výhodou impedanční agregometrie je její rychlost a potřeba malého objemu krve.

Z porovnání jednotlivých metod vyplývá, že optická agregometrie je vhodnější pro sledování účinnosti léčby ASA, pro možnost posouzení agregace destiček po indukci třemi agonisty agregace.

Každá laboratoř monitorující protidestičkovou léčbu by si měla stanovit normální rozmezí hodnot pro používané metody a zároveň i meze pro účinnou i neúčinnou léčbu na dostatečně velkém kontrolním souboru. Bez tohoto rozmezí není možné účinnost léčby hodnotit.

Ideálním postupem je vyšetřit funkci destiček ještě před zahájením léčby a následně sledovat její účinnost, protože každý pacient reaguje na léčbu individuálně. V laboratorní praxi však většinou není možné tento postup dodržet.

Účinnost protidestičkové léčby je doporučováno sledovat vždy, aby se předešlo možným trombotickým, nebo naopak krvácivým příhodám. Ke způsobu monitorování je potřeba přistupovat individuálně a velmi důležitá je především interpretace zjištěných hodnot agregace. Zjištěná data je dobré vyhodnocovat v souladu s ostatními hemokoagulačními výsledky a závěr stanovit i s ohledem na anamnézu pacienta.

## 6. Literatura

- (1) Pecka, M. *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba*; Finidr: Český Těšín, 2002; p. 160.
- (2) Lexová, S. a kolektiv *Hematologie pro zdravotní laboranty 1. díl*; Brno, 2000; p. 183.
- (3) Sakalová, A.; Bátorová, A.; Mistrík, M.; Hrubíško, M.; a kolektiv *Klinická hematológia*; Osveta: Martin, 2010.
- (4) Pecka, M. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy*; Finidr: Český Těšín, 2004; p. 237.
- (5) Matýšková, M.; Zavřelová, J.; Hrachovinová, I. *Hematologie pro zdravotní laboranty 2. díl*; Brno, 1999; p. 203.
- (6) Pecka, M. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*; Finidr: Český Těšín, 2006; p. 304.
- (7) Patel, S. R.; Hartwig, J. H.; Italiano, J. E. *The Journal of Clinical Investigation* 2005, 115, 3348-3354.
- (8) Shapiro, A. *Haemophilia* 2000, 6, 120-127.
- (9) Kroll, M. H.; Schafer, A. I. In *Immunopharmacology of Platelets*; Academic Press: London, 1995; pp. 31-65.
- (10) Jurk, K.; Kehrel, B. E. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2005, 31, 381-92.
- (11) Schroit, A. J.; Zwaal, R. F. A. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991, 1071, 313-329.
- (12) Lapetina, E. G.; Siegel, F. L. *The Journal of Biological Chemistry* 1983, 285, 7241-7244.
- (13) Kubisz, P.; Hrubíšková, K.; Pařízek, M.; Holan, J. *Trombocyty a trombocytomie*; Martin, 1987; p. 296.
- (14) Lullmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie*; Grada, 2004; p. 725.

- (15) Štvrtinová, V.; Ferencík, M.; Hulín, I.; Jahnová, E. *Bratislavské lekárske listy* 1998, 99, 5-19.
- (16) Larson, P. O. *The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology* 1988, 623-632.
- (17) Clementson, K. J. *Haemostasis* 1999, 29, 16-26.
- (18) Fauvel, F.; Legrand, Y. J.; Caen, J. P. *Thrombosis research* 1978, 12, 273-285.
- (19) Berndt, M. C.; Phillips, D. R. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1981, 370, 87-95.
- (20) Kurata, M.; Horii, I. *The Journal of toxicological sciences* 2004, 29, 13-32.
- (21) Hrabcová, R. Agregace trombocytů - test primární hemostase <http://www.pr-lab.cz/downloads/noviny/noviny-09-2008.pdf>. (staženo 10. 10. 2011)
- (22) Stejskal, D.; Prosková, J.; Petrzalová, A.; Bartek, J.; Oral, I.; Lacnák, B.; Horalík, D.; Sekaninová, S. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky* 2001, 145, 69-74.
- (23) Vojáček, J.; Mates, M.; Hraboš, V. *Intervenční a akutní kardiologie* 2003, 69-72.
- (24) Badimon, L.; Badimon, J. J. In *Atherosclerosis and coronary artery disease*; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1996; pp. 639-656.
- (25) Špác, J.; Hlinomaz, O. *Kardiologické fórum* 2006, 4, 9-17.
- (26) Weiss, H. J.; Turitto, T. *Blood journal* 1979, 53, 244-250.
- (27) Malý, J. *Intervenční a akutní kardiologie* 2005, 4, 192-193.
- (28) Giusti, B.; Gori, A. M.; Marcucci, R.; Saracini, C.; Sestini, I.; Paniccia, R.; Valente, S.; Antonucci, D.; Abbate, R.; Gensini, G. F. *Pharmacogenetics and Genomics* 2007, 17, 1057-1064.
- (29) Bultas, J. *Remedia* 2007, 3, 224-231.

- (30) Gurbel, P. A.; Antonino, M. J.; Bliden, K. P. *Platelets* 2008, 19, 595-604.
- (31) SPC pro Plavix (SÚKL)  
[http://www.sukl.cz/uploads/Farmakoviligance/Bezpecnostni\\_informace/SmPC\\_Plavix\\_75.pdf](http://www.sukl.cz/uploads/Farmakoviligance/Bezpecnostni_informace/SmPC_Plavix_75.pdf). (staženo 5. 9. 2011)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno, příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka