

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA LAĐIĆ

**NEODZIVNOST NA PROTITROMBOCITNA ZDRAVILA
PRI KORONARNI BOLEZNI**

**RESISTANCE TO ANTIPLATELET THERAPY
IN CARDIOVASCULAR DISEASE**

MAGISTRSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ZNANSTVENI PODDIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINA
ZNANSTVENO PODROČJE KLINIČNA BIOKEMIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravila na Oddelku za laboratorijsko diagnostiko v Splošni bolnišnici Slovenj Gradec pod vodstvom mentorice prof. dr. Mojce Stegnar, prof. biol.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mojci Stegnar, prof. biol., ki me je uvedla v raziskovalno delo, mi nudila strokovno podporo in me usmerjala tekom izvajanja podiplomske naloge.

Velika zahvala gre tudi doc. dr. Mojci Božič Mijovski, univ. dipl. biol., spec. med. biokem., ki mi je nudila strokovne nasvete in podporo pri izvajanju podiplomske naloge.

Posebno se zahvaljujem Marinki Tehovnik, ing., ki mi je pomagala pri praktičnem delu podiplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem prostovoljcem, ki so se odzvali moji prošnji in darovali kri.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Mojce Stegnar, prof. biol.

Podpis:

Predsednica komisije: prof. dr. Janja Marc, spec. med. biokem.

Članica komisije: prof. dr. Irena Mlinarič-Raščan

Ljubljana, 2015

KAZALO VSEBINE

1. UVOD.....	1
1.1. EPIDEMIOLOGIJA KORONARNE BOLEZNI	1
1.2. ETIOPATOGENEZA KORONARNE BOLEZNI.....	1
1.3. TROMBOCITI IN NJIHOVA VLOGA V HEMOSTAZI	3
1.4. PREPREČEVANJE IN ZDRAVLJENJE KORONARNE BOLEZNI	5
1.4.1. Revaskularizacijski posegi	5
1.4.2. Zdravljenje z zdravili, ki ne delujejo proti trombocitom	5
1.4.3. Zaviralci agregacije trombocitov	6
1.4.4. Neodzivnost na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov.....	9
1.5. MERJENJE DELOVANJA TROMBOCITOV	12
1.5.1. Metode za merjenje delovanja trombocitov	12
1.5.2. Problemi pri določanju delovanja trombocitov z laboratorijskimi metodami....	14
2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	16
3. PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE	17
3.1. PREISKOVANCI	17
3.2. MATERIALI IN METODE.....	18
3.2.1. Odvzem krvi.....	18
3.2.2. Določitev števila trombocitov	19
3.2.3. Merjenje agregacije trombocitov z optično agregometrijo	19
3.2.4. Merjenje zapiralnega časa	22
3.2.5. Statistični izračuni	24
4. REZULTATI	26
4.1. DOLOČITEV REFERENČNIH VREDNOSTI ZA DELOVANJE TROMBOCITOV Z METODO OPTIČNE AGREGOMETRIJE IN ZAPIRALNEGA ČASA PRI KONTROLNI SKUPINI	26
4.2. AGREGACIJA TROMBOCITOV Z METODO OPTIČNE AGREGOMETRIJE PRI SKUPINAH BOLNIKOV Z ZAVIRALCI AGREGACIJE TROMBOCITOV	27
4.3. ZAPIRALNI ČASI PRI SKUPINAH BOLNIKOV Z ZAVIRALCI AGREGACIJE TROMBOCITOV	33
4.4. NEODZIVNOST NA ZAVIRALCE AGREGACIJE TROMBOCITOV	37
4.5. UJEMANJE METOD	40
5. RAZPRAVA.....	44
6. ZAKLJUČEK.....	57

7. LITERATURA..... 59

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema adhezije in agregacije trombocitov.....	4
Slika 2: Delovanje ASK, klopidogrela in prasugrela na agregacijo trombocitov	7
Slika 3: Primer agregacijske krivulje z agonistom ADP, 11 $\mu\text{mol/L}$ pri preiskovancu iz kontrolne skupine	22
Slika 4: Agregacija trombocitov izzvana z 11 mg/L kolagena.....	29
Slika 5: Agregacija trombocitov izzvana s 5,5 mg/L kolagena.....	30
Slika 6: Agregacija trombocitov izzvana z 11 $\mu\text{mol/L}$ ADP.....	31
Slika 7: Agregacija trombocitov izzvana s 5,5 $\mu\text{mol/L}$ ADP	32
Slika 8: Agregacija trombocitov izzvana z 1,6 mmol/L arahidonsko kislino	33
Slika 9: Zapiralni čas z merilno celico KOL/EPI.....	35
Slika 10: Zapiralni čas z merilno celico KOL/ADP	36
Slika 11: Zapiralni čas z merilno celico P2Y	37

KAZALO TABEL

Tabela 1: Referenčne vrednosti agregacije trombocitov z metodo optične agregometrije in zapiralnega časa pri kontrolni skupini	27
Tabela 2: Analiza agregacije trombocitov z metodo optične agregometrije	28
Tabela 3: Vrednosti zapiralnih časov	34
Tabela 4: Število in odstotek neodzivnih bolnikov	39
Tabela 5: Ujemanje metod optične agregometrije in zapiralnega časa v skupini ASK	41
Tabela 6: Ujemanje metod optične agregometrije in zapiralnega časa v skupini ASK in klopidogetrel	42
Tabela 7: Ujemanje metod optične agregometrije in zapiralnega časa v skupini ASK in prasugrel	43

POVZETEK

Uvod: Dvotirno zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov, klopidogrelom ali prasugrelom v kombinaciji z acetilsalicilno kislino (ASK), je pri preprečevanju večine koronarnih bolezni bolj učinkovito kot zdravljenje samo z ASK. Kljub tej vrsti zdravljenja ima določen delež bolnikov ponovne ishemične dogodke, kar je lahko posledica neodzivnosti na ASK, klopidogrel ali prasugrel.

Namen: Določiti referenčne vrednosti za delovanje trombocitov z metodo optične agregometrije in zapiralnega časa in ugotoviti delež bolnikov s koronarno boleznijo, ki so neodzivni na zdravljenje z ASK in dvotirno zdravljenje z ASK in klopidogrelom oziroma prasugrelom.

Hipoteze: Neodzivnost na ASK bomo določili pri največ 60 % bolnikov. Neodzivnost na dvotirno zdravljenje z ASK in klopidogrelom/prasugrelom pričakujemo pri manj kot 30 % bolnikih. Ujemanje metod optične agregometrije in merjenja zapiralnega časa pri opredeljevanju neodzivnosti na ASK, klopidogrel in prasugrel bo zmerno (koeficient kapa večji od 0,2).

Preiskovanci in metode: V raziskavo smo vključili 111 preiskovancev, ki smo jim izmerili število trombocitov, agregacijo trombocitov z metodo optične agregometrije z agonisti: kolagen (11 in 5,5 mg/L), ADP (11 in 5,5 μ mol/L) ter arahidonsko kislino (1,6 mmol/L), zapiralni čas z merilnimi celicami s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI), kolagenom in ADP (KOL/ADP) in P2Y.

Rezultati: Pri merjenju agregacije trombocitov z optično agregometrijo s kolagenom in ADP je bil odstotek neodzivnih bolnikov na ASK 23–97 %, pri dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogrelom 8–80 % ter ASK in prasugrelom 0–50 %, z arahidonsko kislino je bilo 0–6 % neodzivnih bolnikov. Merjeno z vsemi tremi merilnimi celicami je bilo med bolniki z ASK neodzivnih 34–86 %. Pri bolnikih, ki so jemali ASK in klopidogrel, je bilo neodzivnih 22–53 %, pri bolnikih z ASK in prasugrelom pa 10–30 %. Z izračunom koeficienta kapa smo ugotovili slabo ujemanje metod optične agregometrije in zapiralnega časa (koeficient kapa je znašal od –0,251 do 0,439), kar bi lahko bila posledica določanja različnih lastnosti trombocitov z različnima metodama.

Zaključek: Ugotovili smo, da je delež neodzivnih bolnikov odvisen od uporabljene metode in koncentracije agonista. Ne glede na izbrano metodo pa je bil delež neodzivnih bolnikov manjši pri tistih na dvotirnem zdravljenju v primerjavi z bolniki na enotirnem

zdravljenju in pri bolnikih na prasugrelu v primerjavi z bolniki na klopidogrelu. Ujemanje metod za merjenje agregacije trombocitov z metodo zapiralnega časa in optične agregometrije je bilo večinoma slabo (koeficient kapa manjši od 0,2).

ABSTRACT

Background: Dual antiplatelet therapy with clopidogrel or prasugrel and acetyl salicylic acid (ASK), is more effective than therapy with ASK alone in prevention of the majority of cardiovascular diseases. Despite the antiplatelet therapy, many patients continue to experience ischemic events, possibly as a consequence of unresponsiveness to ASK, clopidogrel or prasugrel.

Aim: To determine reference ranges for platelet function for the methods of optical aggregometry and closure time. To identify proportion of patients with cardiovascular disease, who are resistant to therapy with ASK and dual therapy with ASK and clopidogrel/prasugrel.

Hypothesis: The resistance to ASK therapy will be established in utmost of 60 % of patients. The resistance to dual therapy with ASK and clopidogrel/prasugrel is expected in less than 30 % of patients. Methods of optical aggregometry and closure time will be in moderate agreement in establishing ASK, clopidogrel and prasugrel resistance (kappa coefficient higher than 0,2).

Patients and methods: We included 111 subjects in whom we measured platelet count, platelet aggregation with optical aggregometry with the following agonists: collagen (11 and 5,5 $\mu\text{g/mL}$), ADP (11 and 5,5 $\mu\text{mol/L}$) and arachidonic acid (1,6 mmol/L) and closure time with test cartridges with collagen and epinephrine (KOL/EPI), collagen and ADP (KOL/ADP) and P2Y.

Results: By measuring platelet aggregation with optical aggregometry with collagen and ADP there were 23–97 % resistant patients on ASK, in dual therapy with ASK and clopidogrel 8–80 % and with ASK and prasugrel 0–50 %. With arachidonic acid there were 0–6 % resistant patients. Measuring closure times with all three test cartridges there were 34–86 % resistant patients on ASK. Among patients on ASK and clopidogrel there were 22–53 % resistant, among patients on ASK and prasugrel there were 10–30 % resistant patients. Calculating kappa coefficients we mostly determined poor agreement between the methods of optical aggregometry and closure time (kappa coefficient was from $-0,251$ to $0,439$), possibly as a consequence of assessing different platelet properties with different methods.

Conclusions: We found that the proportion of resistant patients depended on the laboratory method and agonist concentration utilized. Regardless of the method used there was a

smaller proportion of resistant patients on dual antiplatelet therapy compared to patients on monotherapy and smaller proportion of resistant patients on prasugrel compared to patients on clopidogrel. Agreement between the methods of closure time and optical aggregometry for measuring platelet aggregation was mostly poor (kappa coefficient less than 0,2).

KLJUČNE BESEDE:

agregacija trombocitov, zapiralni čas, neodzivnost na acetilsalicilno kislino, klopidogrel, prasugrel

KEYWORDS:

platelet aggregation, closure time, acetyl salicylic acid resistance, clopidogrel resistance, prasugrel resistance

SEZNAM UPORABLJENIH OKRAJŠAV

ACE – angiotenzin konvertaza

ADP – adenzin difosfat

AGR – agregacija trombocitov

ARAH – arahidonska kislina

ASK – acetilsalicilna kislina

ATP – adenzintrifosfat

COX-1 – ciklooksigenaza-1

CRP – reaktivni protein C

CY – citokrom

CYS – cistein

EGF – epidermalni rastni faktor

GF – rastni faktor

GP – glikoprotein

HDL – lipoprotein z visoko gostoto

KOL – kolagen

KOL/EPI – merilna celica s kolagenom in epinefrinom pri merjenju zapiralnega časa

KOL/ADP – merilna celica s kolagenom in ADP pri merjenju zapiralnega časa

LDL – lipoprotein z nizko gostoto

MAP-kinaza – z mitogenom aktivirana protein kinaza

PAI-1 – zaviralec aktivatorja plazminogena-1

PAF – faktor, ki aktivira trombocite

PDGF – trombocitni rastni faktor

PFA-100[®] – analizator trombocitnega delovanja

PF4 – trombocitni faktor 4 (PF4)

PG – prostaglandin

PGE1 – prostaglandin E1

POCT – testiranje ob bolniku

PPP – plazma, revna s trombociti

PRP – plazma, bogata s trombociti

P2Y – merilna celica za merjenje antagonistov receptorjev P2Y₁₂ pri merjenju zapiralnega časa

P2Y₁₂ – receptor na površini trombocitov

TGF-β – transformirajoči rastni faktor β

TS – tromboksan sintetaza

TxA₂ – tromboksan A₂

VASP – vasodilator-stimuliranega fosfoproteina

vWf – von Willebrandov faktor

ZČ – zapiralni čas

1. UVOD

O koronarnih boleznih govorimo, kadar je zaradi zožitve koronarnih arterij oskrba srca s krvjo nezadostna. Poglavitni povzročitelj koronarnih boleznih je ateroskleroza. Bolezen se prične že v otroštvu in dolgo časa ne povzroča nikakršnih težav. Običajno poteka v dveh fazah. Za kronično fazo je značilna počasna rast aterosklerotičnih leh. Pri akutni fazi pa pride do razpokanja žilne stene, nastanka krvnih strdkov na razpokah in delne ali popolne zapore koronarne arterije. Za koronarne boleznih je značilna ishemija srčne mišice, ki je posledica obolelih koronarnih arterij zaradi pretočnih težav. Patogenetsko dogajanje se odraža v značilni klinični sliki: V kronični fazi ateroskleroze je značilna stabilna angina pectoris, za akutne epizode pa simptomi akutnega koronarnega sindroma, vključujoč nestabilno angino pectoris, akutni miokardni infarkt ali nenadno srčno odpoved. Prognoza nezdravljenih koronarnih boleznih, predvsem akutnega koronarnega sindroma, je pogosto slaba, z nedavnimi novostmi v zdravljenju pa se je bistveno izboljšala.

1.1. EPIDEMIOLOGIJA KORONARNE BOLEZNI

Koronarna bolezen je najpogostejši vzrok obolevanja in umrljivosti v razvitih deželah sveta. Ponavadi oboleva populacija srednjih let, moški okrog 55. leta starosti, ženske pa približno 10 let kasneje. Delež starejših ljudi je vsako leto večji in pri teh se ugotavlja tudi porast dejavnikov tveganja za razvoj aterosklerotičnih boleznih, zato število bolnikov vsako leto narašča. Moški v mlajših in srednjih letih obolevajo za koronarno boleznijo vsaj dvakrat pogosteje v primerjavi z ženskami, v starosti pa je ta razlika manjša (1).

1.2. ETIOPATOGENEZA KORONARNE BOLEZNI

Koronarna ateroskleroza je sistemska, kompleksna in multifaktorialna bolezen. Pojavlja se že zelo zgodaj, že v prvih desetih letih starosti, njene značilne spremembe so aterosklerotične lehe. Lehe se večajo zelo počasi. Sočasno se kompenzatorno preoblikuje žilna stena, kar ima za posledico, da leha sorazmerno pozno ovira regionalni krvni obtok in zato se klinični simptomi pojavijo ponavadi šele v zrelem življenju. Poškodba žilnega

endotelija je eden izmed najzgodnejših aterosklerotičnih dogodkov, ki v prvi fazi prizadane notranjo plast arterijske stene – intimo.

Ateroskleroza je degenerativna bolezen, za katero je značilno kopičenje lipidov in nekrotičnega materiala v arterijski steni. V aterosklerotičnem procesu v določenih obdobjih prevladuje vnetje s proliferacijo gladkih mišičnih celic in vezivnega tkiva ter tvorba kolagena in proteoglikanov. Proces proliferacije spremlja kopičenje makrofagov in limfocitov T. Ateroskleroza je tako opredeljena kot vnetni odgovor na poškodbo žilne stene. Ugotovili so, da so celice, ki so zastopane pri vnetju, verjetno odgovorne za nastanek aterosklerotične lehe in za njen kasnejši razvoj. Do takšnega sklepanja so prišli na osnovi opazovanj, da se monociti pri prehodu v endotelij spremenijo v makrofage in kasneje v penaste celice, ki so podlaga za nastanek maščobnih leh. Iz makrofagov se izločajo biološko aktivne snovi, kot so kemotaktični in rastni dejavniki, levkotrieni, interleukini in peroksidni anion. Predpostavko o vpletenosti vnetja podpirajo tudi skupki vnetnih celic, pretežno limfocitov, v adventiciji bolezensko spremenjenih arterij. Na vpletenost imunskega mehanizma v aterogenezo kaže poleg celic, ki so nosilke imunskega celičnega odgovora, tudi kopičenje imunoglobulinov (predvsem IgG) v aterosklerotično spremenjeni žilni steni. Pri bolnikih z akutnim srčnim infarktom so ugotovili, da je koncentracija reaktivnega proteina C (CRP) zvišana, tako ima CRP pomembno napovedno vrednost za razvoj ali ponovni pojav ishemije srčne mišice. Povišane vrednosti CRP naj bi bile posledica večje vnetne aktivnosti v aterosklerotičnih lehah. Rezultati raziskav kažejo, da je zaščitni učinek acetilsalicilne kisline (ASK), kot protivnetne zdravilne učinkovine, pred srčnomišičnim infarktom tesno povezan z zniževanjem ravni CRP v plazmi. Preprečevanje kardiovaskularnih bolezni z ASK naj bi torej pretežno temeljilo na protivnetnem delovanju (1).

Zaradi poškodbe žilnega endotelija se poveča prepustnost notranjih plasti žilne stene in zato se v intimi kopiči LDL holesterol (lipoproteini nizke relativne gostote), kar izzove degenerativne in vnetne reakcije. LDL holesterol se pri prehodu skozi endotelij oksidira, kar onemogoči prehod LDL holesterola iz žilne stene nazaj v žilno svetlino. Oksidacija LDL holesterola predstavlja enega izmed glavnih procesov aterogeneze. Makrofagi se pri osebah s hiperholesterolemijo zaradi povišanega dotoka lipidov pretvorijo v penaste celice, ki se na določenih mestih kopičijo in so osnova za nastanek maščobnih leh. Z napredovanjem procesa ateroskleroze se iz maščobnih leh razvijejo aterosklerotične lehe,

ki pomenijo žarišče nastanka krvnih strdkov (trombov) in s tem tromboemboličnih zapletov (1).

1.3. TROMBOCITI IN NJIHOVA VLOGA V HEMOSTAZI

Hemostaza je kompleksen proces, pri katerem sodelujejo beljakovine v krvi (faktorji in zaviralci koagulacije in fibrinolize) in žilni steni (tkivni faktor, tkivni aktivator plazminogena), med trombociti v krvi in žilno steno (endotelijske celice, celice gladkega mišičja). Uravnavanje hemostaze poteka na površini trombocitov, endotelijskih celic in subendotelija. Trombociti so brezjedrni delci megakariocitov. Njihova življenjska doba v krvnem obtoku znaša 7 do 10 dni.

Adhezija trombocitov: Pri poškodbi žile je adhezija trombocitov prvi odgovor na poškodbo. Trombociti se nalepijo na žilno steno s pomočjo glikoproteinov GP Ib/IX, ki delujejo kot receptorji za vezavne beljakovine (vWf, fibrinogen, fibronektin, vitronektin) na poškodovani žilni steni. Pri adheziji trombocitov na subendotelij pride do aktivacije trombocitov. Na receptorje na površini trombocitov se vežejo agonisti, ki aktivirajo trombocite, to so ADP, adrenalin, kolagen, trombin, tromboksan A_2 (TxA_2) in posebni faktor, ki aktivira trombocite (PAF). Trombociti pri aktivaciji spremenijo svojo obliko iz diskoidne v kroglasto s panožicami, pride do prerazporeditve organelov v sredino trombocitov in sproščanja snovi iz zrn (sekrecije). Iz zrn α se sprostijo β -tromboglobulin, trombocitni faktor 4 (PF4), faktor V (FV), fibrinogen, vWF, trombospondin, fibronektin, vitronektin, zaviralec aktivatorja plazminogena-1 (PAI-1) in rastni faktorji (PDGF, EGF, TGF- β). Iz gostih zrn se sprostijo ADP, ATP, Ca^{2+} in serotonin. Lizosomi vsebujejo kisle hidrolaze.

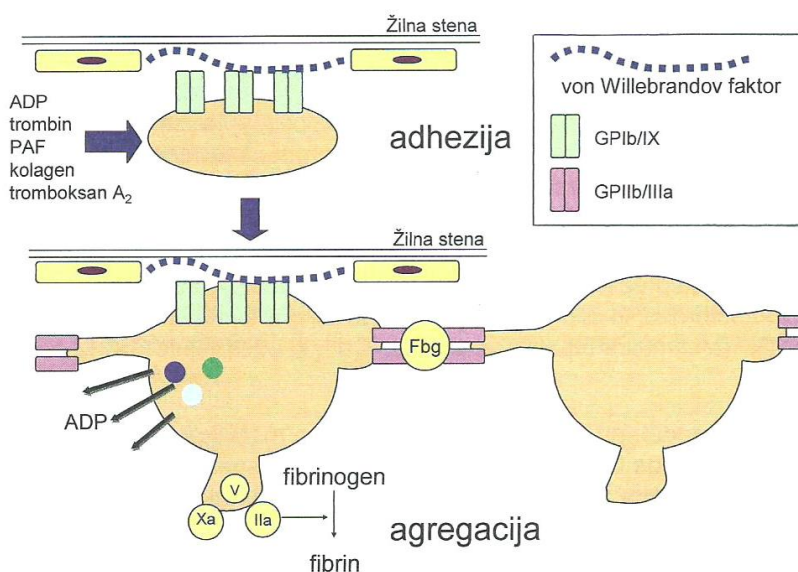
Ključni dogodek pri aktivaciji trombocitov je mobilizacija in povečanje znotrajceličnega Ca^{2+} . Znotrajtrombocitni Ca^{2+} pospeši delovanje protein kinaze C, aktivira fosfolipazo A_2 , pomemben je pri aktiviranju celičnega ogrodja in pri sekreciji.

Adhezija trombocitov na kolagen in vezava agonistov (npr. trombina) na receptor povzroči hidrolizo membranskih fosfolipidov in sintezo eikozanoidov, ki so oksigenirani derivati arahidonske kisline. Sinteza eikozanoidov se začne s sproščanjem arahidonske kisline iz membranskih fosfolipidov (fosfoinozitola in fosfatidilholina), kar katalizirata fosfolipaza C in fosfolipaza A_2 . Ciklooksigenaza (COX) pretvarja arahidonsko kislino v prostaglandin

G_2 (PGG_2) in H_2 (PGH_2), te pa tromboksan sintetaza (TS) pretvarja v TxA_2 . V povratni zvezi lahko TxA_2 aktivira fosfolipazo C (2).

Agregacija trombocitov: S sekrecijo iz trombocitov se sprostijo agonisti (ADP), ki povzročijo aktivacijo trombocitov v okolici. Trombociti se zlepijo med seboj (agregirajo). Najpomembnejši dogodek pri agregaciji je vezava adhezijskih beljakovin (fibrinogena in drugih, kot so vWF, fibronektin, vitronektin) na glikoproteinske receptorje GPIIb/IIIa. Fibrinogen lahko zaradi svoje posebne molekulske strukture (dvojne molekule) poveže dva trombocita med seboj (2).

Agregacija, sekrecija in retrakcija strdka so odvisne od prenosa signalov. Agonisti transdukcije signala so ADP, trombin, adrenalin, tromboksan A_2 , PAF, pa tudi kolagen in druge adhezijske beljakovine. Najmočnejša agonista sta trombin in TxA_2 . Pri prenašanju signala sodelujejo proteini G, fosfolipaza C, fosfolipaza A_2 in izoenzimi proteinkinaze C. Transdukcija signala povzroči centralizacijo zrc, nastajanje psevdopodijev in sodeluje pri preoblikovanju receptorjev GPIIb/IIIa za fibrinogen (slika 1). Strdki se nato retrahirajo in iztisnejo serum, s čimer se strdek čvrsti. Mehanizem krčenja strdka je analogen krčenju mišice (2).



Slika 1: Shema adhezije in agregacije trombocitov (2)

Na sliki so predstavljene poglavitne komponente, ki sodelujejo pri adheziji in agregaciji trombocitov.

Okrajšave: ADP – adenzindifosfat, Fbg – fibrinogen, GPIb/IX – glikoproteinski receptor Ib/IX, GPIIb/IIIa – glikoproteinski receptor Iib/IIIa, PAF – faktor, ki aktivira trombocite)

1.4. PREPREČEVANJE IN ZDRAVLJENJE KORONARNE BOLEZNI

Preprečevanje koronarne bolezni je usmerjeno v odpravljanje dejavnikov tveganja (kajenje, prehrana z veliko nasičenimi maščobami in holesterolom, telesna neaktivnost, zvišan krvni tlak, sladkorna bolezen, podedovana nagnjenost k zgodnji aterosklerozi, pogostost bolezni narašča s starostjo, stres). V zadnjih letih se je v nekaterih razvitih zahodnoevropskih državah umrljivost za koronarno srčno boleznijo znižala za 30 %, v manj razvitih pa še vedno narašča (1). V razvitih državah se je umrljivost verjetno znižala zaradi vsestranske in učinkovitejše primarne preventive (privzgoja načel zdravega načina življenja, zdravljenje povišanega krvnega tlaka in holesterola tudi z zdravili). Zdravljenje ateroskleroze pa je v glavnem namenjeno odpravljanju posledic napredovalega aterosklerotičnega procesa, je kompleksno in mora biti individualno. Vsebuje ukrepe, s katerimi se skuša bolniku omiliti njegove težave, zaustaviti napredovanje koronarne ateroskleroze in izboljšati življenjsko prognozo.

1.4.1. Revaskularizacijski posegi

Perkutana koronarna revaskularizacija je standardna, nekirurška metoda agresivnega zdravljenja obstruktivne koronarne ateroskleroze. Pri posegu se preko vodilnega koronarnega katetra in žice postavi balonski kateter na mesto obstruktivne lezije, aterosklerotična leha se raztrga in tako se poveča žilna svetlina. Zdravljen žilni segment povečini stabiliziramo z žilno opornico, stentom. Kirurška koronarna revaskularizacija je standardna metoda zdravljenja obstruktivne koronarne ateroskleroze. Kirurška metoda v nasprotju s perkutano premosti obstruktivne koronarne lezije, pri čemer uporabi venske ali arterijske presadke. Izbira načina koronarne revaskularizacije je odvisna od narave koronarne ateroskleroze, delovanja levega prekata in pridruženih bolezni. Pogosto pa je pri istem bolniku potrebno opraviti oba načina revaskularizacije (1).

1.4.2. Zdravljenje z zdravili, ki ne delujejo proti trombocitom

Z zdravili ne lajšamo ali preprečujemo le epizod miokardne ishemije, temveč skušamo zaustaviti tudi napredovanje ateroskleroze in preprečiti njene usodne zaplete (srčni infarkt,

smrt). Za zdravljenje se uporabljajo predvsem nitrati, blokatorji receptorjev beta in kalcijevi antagonisti. Pri zaviranju napredovanja ateroskleroze pa imajo dokazano učinkovitost statini in zaviralci angiotenzin konvertaze (ACE).

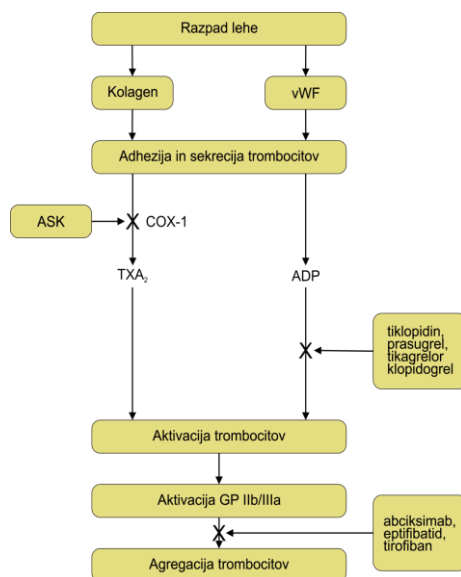
Nitrati (nitroglicerini, izosorbid-dinitrat in njihovi metaboliti) učinkujejo na sistemske in koronarne žile, tako da povzročijo vasodilatacijo in znižajo diastolično obremenitev srca. Z znižanjem diastoličnega tlaka in volumna srca zmanjšajo napetost prekatne stene, na arterijah povzročajo razširitev in s tem zmerno znižanje sistoličnega tlaka. Koronarni pretok se poveča. Blokatorji receptorjev beta kompetitivno zavirajo kateholaminsko spodbujanje adrenergičnih receptorjev beta in zmanjšajo potrebo po kisiku v srčni mišici. Kalcijevi antagonisti zavirajo vstop kalcija v celice miokarda in gladkih mišičnih žil: znižajo krvni tlak (nifedipin, amlodipin), upočasnijo srčno frekvenco (verapamil, diltiazem). Statini znižajo celokupni plazemski holesterol, delež LDL holesterola, nekoliko manj trigliceride in ugodno vplivajo na nivo HDL holesterola. Zaviralci ACE (angiotenzin-konvertaza) znižujejo krvni pritisk. Z zaviranjem angiotenzin pretvarjajočega encima preprečijo pretvorbo angiotenzina I v aktivno obliko angiotenzin II, uporabljajo se za zdravljenje vseh oblik koronarne bolezni (ramipril, kaptopril) (1).

1.4.3. Zaviralci agregacije trombocitov

Pri koronarnih srčnih boleznih se uporabljajo zdravila, ki zavirajo različne procese v trombocitih. Protitrombocitna zdravila so po ATC-klasifikaciji zaviralci agregacije trombocitov brez heparina (3). V nadaljnjem besedilu protitrombocitna zdravila poimenujemo zaviralci agregacije trombocitov.

Zaviralci agregacije trombocitov preprečujejo medsebojno zlepljanje trombocitov in njihovo prilepljanje na okvarjeno notranjo žilno površino. Obstajajo tri vrste zaviralcev agregacije trombocitov z dokazano klinično učinkovitostjo: 1. inhibitorji ciklooksigenaze-1, npr. ASK (aspirin[®], Bayer), 2. inhibitorji trombocitnega receptorja za ADP: komponente tienopiridinov, npr. prasugrel (effient[®], Eli Lilly), klopidogrel (plavix[®], Sanofi Pharma), tiklopidin, tikagrelor, in 3. antagonisti glikoproteinskega receptorja IIb/IIIa (npr. abciximab, tirofiban, eptifibatide). Antagonisti GPIIb/IIIa so postali pomemben razred zaviralcev agregacije trombocitov, ki se uporabljajo za preprečevanje tromboz pri bolnikih

po perkutani koronarni intervenciji ali z akutnim koronarnim sindromom (4). Na sliki 2 je prikazano delovanje ASK, klopidogrela in prasugrela na agregacijo trombocitov.



Slika 2: Delovanje ASK, klopidogrela in prasugrela na agregacijo trombocitov

Na sliki je prikaz delovanja ASK, klopidogrela in prasugrela na agregacijo trombocitov. ASK z ireverzibilno acetilacijo COX-1 inhibira sintezo TxA_2 . Klopidogrel in prasugrel ireverzibilno zavirata receptor ADP na trombocitih P2Y_{12} .

Podrobneje opisujemo zdravila, ki smo jih preučevali v tej raziskavi:

ASK: Antitrombotični učinek ASK je v inhibiciji agregacije trombocitov, ker zavira nastanek TxA_2 v trombocitih. Mehanizem inhibiranja tvorbe TxA_2 je povezan z ireverzibilno inhibicijo encima ciklooksigenaze-1 (COX-1), v katerem ASK acetilira aminokislino serin 530 (5, 6). Trombociti ne morejo tvoriti nove COX-1, zato ne proizvajajo TxA_2 . Samo novonastali trombociti lahko proizvajajo TxA_2 . Dnevno se zamenja približno 10 % trombocitov, hemostaza pa se lahko normalizira, ko nastane 20 % novih trombocitov (5). ASK je učinkovito zdravilo za zdravljenje in preprečevanje koronarnih bolezni. Predpisan odmerek ASK za preprečevanje agregacije trombocitov znaša 100 mg dnevno. Že en odmerek 160 mg ASK popolnoma inhibira sintezo TxA_2 (8). Klinične študije kažejo na učinkovitost ASK v primarnem in sekundarnem preprečevanju infarkta miokarda, kapi in kardiovaskularne smrti. Pri visokorizičnih bolnikih se opaža približno 25 % znižanje kardiovaskularnih dogodkov (7).

Klopidogrel: Tienopiridini, med katere sodi klopidogrel, delujejo na aktivacijo trombocitov preko receptorjev za ADP, tako da se ireverzibilno vežejo na enega od dveh ADP receptorjev, in sicer na receptor P2Y₁₂ (8). Klopidogrel učinkovito inhibira trombocitno agregacijo, inducirano z ADP, na metabolizem arahidonske kisline pa nima neposrednega vpliva. V jetrih se metabolizira po dveh poteh; prva je hidroliza v neaktiven derivat karboksilne kisline (85 % cirkulirajočih metabolitov), druga pa je medirana s citokromom P450 (CYP450), v največji meri z izoencimi CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, pri čemer se klopidogrel oksidira v 2-oksi-klopidogrel in metabolizira v aktivni tiol metabolit (9). Aktivni metabolit klopidogrela selektivno in ireverzibilno inhibira receptor P2Y₁₂ s tvorbo kovalentne disulfidne vezi med reaktivno tiolno skupino in dvema cisteinskima ostankoma (cys 17 in cys 270), ki sta prisotna v ekstracelični domeni receptorja P2Y₁₂. Tako je vezava ADP na receptor P2Y₁₂ permanentno inhibirana (10). Klopidogrel zniža tvorbo trombocitno-levkocitnih agregatov, nivo CRP, p-selektina ter hitrost nastanka trombina (11–15). Receptor P2Y₁₂ je vezan na G-protein (Gi), ki inhibira adenilil ciklazo in aktivira MAP-kinazo (z mitogenom aktivirana protein kinaza). S tem se na način pozitivne povratne zanke zagotavlja nadaljnja trombocitna aktivacija (16). Zaradi konverzije v aktivno obliko relativno pozno učinkuje, inhibicija agregacije trombocitov je odvisna od genetskih variant CYP450, predvsem CYP2C19. Ustrezno odmerjanje klopidogrela pri bolnikih z nefunkcionalnim genotipom CYP2C19 v kliničnih raziskavah še ni bilo ugotovljeno (17). V kliničnih raziskavah so ugotovili, da ima klopidogrel večji protitrombotični učinek kot ASK pri bolnikih z aterosklerozo in je v primerjavi z ASK nekoliko uspešnejši v preprečevanju kliničnih zapletov (18). Preučevali so interindividualno variabilnost odziva trombocitov na klopidogrel (19) in ugotovili, da 5–10 % bolnikov, kljub zdravljenju s klopidogrelom (8, 20–22), doživi akutno ali subakutno trombozo po koronarni vstavitvi stenta. Zdravljenje s klopidogrelom ima v primerjavi z zdravljenjem z ASK relativno tveganje za klinične zaplete (infarkt miokarda, smrt) nižje za 8,4 % (23).

Prasugrel: Prasugrel z zaviranjem vezave ADP na tiopiridinski receptor P2Y₁₂ na površini trombocitov prepreči njihovo agregacijo. Je antiagregacijsko zdravilo druge generacije, kjer so optimirali njegove farmakokinetične lastnosti, zato ima manj stranskih učinkov. Kot ostali tienopiridini je tudi prasugrel prozdravilo, ki je *in vitro* neaktivno in se v jetrih s pomočjo CYP450 pretvori v aktiven metabolit, največ z CYP3A4 in CYP2B6, manj z CYP2C9 in CYP2C19 (24). Na farmakokinetiko aktivnega metabolita prasugrela ali

inhibicijo agregacije trombocitov genetske variante CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A5 nimajo pomembnega vpliva (24). Preklinične študije kažejo, da je bolj učinkovit pri inhibiciji *ex vivo* trombocitne agregacije in tvorbi strdka *in vivo* kot klopidogetrel. Aktivna metabolita prasugrela in klopidogetrela imata podoben nivo trombocitne inhibicije *in vitro*, koncentracija aktivnega metabolita *in vivo* pa je različna (odmerek prasugrela je 60 mg na začetku, ki se nato nadaljuje z 10 mg dnevno, začetni odmerek klopidogetrela je 300 mg, nato 75 mg dnevno). Pri prasugrelu je inhibicija trombocitne agregacije hitrejša, večja in bolj konzistentna, vendar pa zmerno povečuje tveganje za krvavitve (25).

Dvotirno zdravljenje: Aktivacija trombocitov poteka po različnih mehanizmih, kar vodi posledično do tromboze. Strategija zdravljenja, usmerjena samo k enemu mehanizmu, ne bo preprečila vseh ostalih dogodkov, ki vodijo do tromboze (26). Dvotirno zdravljenje, klopidogetrel ali prasugrel v kombinaciji z ASK, je pri preprečevanju večine srčnožilnih bolezni bolj učinkovito kot zdravljenje samo z ASK. Raziskava CAPRIE (Clopidogrel vs. Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events, Klopidogetrel vs. Aspirin) pri bolnikih s tveganjem za ishemične dogodke je pokazala pomembne prednosti zdravljenja s klopidogetrelom pri bolnikih v primerjavi z zdravljenjem samo z ASK (18). Ker klopidogetrel in ASK inhibirata agregacijo trombocitov preko različnih mehanizmov, omogoča dvotirno zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov komplementarno in dodatno prednost v primerjavi z zdravljenjem z enim samim zdravilom. Dvotirno zdravljenje s klopidogetrelom in ASK se jemlje kot »zlato standard« za znižanje trombocitne aktivacije in agregacije pri bolnikih z akutnim koronarnim sindromom in bolnikih z vstavljenim stentom (27–29), vendar pa ima dvotirno zdravljenje za posledico večje tveganje za krvavitve (30). Pri visokorizičnih bolnikih s koronarno boleznijo so prednosti dvotirnega (ali celo trotirnega) zdravljenja z zaviralci agregacije trombocitov lahko večje od zelo visoke rizičnosti za omejeno časovno obdobje (31).

1.4.4. Neodzivnost na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov

O neodzivnosti na zdravilo govorimo takrat, ko zdravilo ne doseže svojega farmakološkega učinka bodisi zaradi zmanjšane biološke razpoložljivosti, inaktivacije zdravila ali negativnih interakcij z drugimi snovmi ali pa zaradi sprememb tarčne substance, na katero zdravilo učinkuje (32). Govorimo o dveh vrstah neodzivnosti na zdravljenje z zaviralci

agregacije trombocitov. Klinična neodzivnost je opisana kot nezmožnost zdravila, da prepreči ishemične kardiovaskularne dogodke. Pri laboratorijski neodzivnosti gre za to, da laboratorijske metode ne pokažejo vpliva zdravil. Postavlja se vprašanje, ali lahko laboratorijske metode, s katerimi določamo odziv trombocitov na zaviralce agregacije trombocitov, napovejo klinično neodzivnost in ali ima laboratorijska neodzivnost za posledico tudi klinično neodzivnost. Ni povsem jasno, kako je laboratorijska neodzivnost povezana s klinično neodzivnostjo.

Številne študije nakazujejo, da je določen del populacije neodziven na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov in ima večjo incidenco aterotrombotičnih zapletov, npr. infarkt miokarda, ishemična kap. Nezmožnost ASK ali tienopiridinov, da zmanjšajo agregacijo trombocitov, se smatra kot neodzivnost na ASK in tienopiridine (33). ASK preprečuje do 25 % vseh koronarnih zapletov (34). Vzrokov za ostalih 75 % zapletov je več, med njimi tudi neodzivnost na ASK. Dvotirno zdravljenje, ASK v kombinaciji s klopidoogrelom ali prasugrelom, je pri preprečevanju večine srčnožilnih bolezni bolj učinkovito kot zdravljenje samo z ASK. Kljub tej vrsti zdravljenja ima določen delež bolnikov srčnožilno bolezen (35), kar je lahko posledica neodzivnosti na tienopiridine.

Neodzivnost na ASK: Čeprav ASK zmanjšuje tveganje za ponovitev srčnožilnih dogodkov za približno 25 %, ima 10 do 20 % bolnikov kljub primernemu zdravljenju ponovno trombozo (7). Neodzivnost na ASK se nanaša na nezmožnost ASK, da inhibira od COX-1 odvisno tvorbo TxA₂ in posledično od TxA₂ odvisnega delovanja trombocitov.

Potencialni vzroki neodzivnosti na ASK so številni in raznovrstni: 1. znižana biološka razpoložljivost ASK; 2. interferenca z drugimi zdravili; 3. povečana tvorba trombocitov, na katere ASK ne vpliva in so sposobni tvorbe TxA₂; 4. tvorba TxA₂ z izoobliko COX-2, neobčutljivo na ASK v novonastalih trombocitih ali drugih celicah; 5. genetski polimorfizmi v trombocitnih receptorjih in encimih; 6. začasna neodzivnost inducirana zaradi intervencij koronarne revaskularizacije – operacije ali angioplastike; 7. drugi faktorji: kajenje; 8. pospešeno delovanje trombocitov v zvezi s hiperholesterolemijo, ki trombocitno membrano tako spremeni, da zmanjša dovzetnost proteinov za acetilacijo; 9. hiperkoagulabilna stanja po srčni kapi ali ob nestabilni angini pectoris; 10. povišan nivo noradrenalina – fizična vadba, psihični stres; 11. povečana občutljivost na ADP in kolagen; 12. povečano sproščanje trombocitov iz kostnega mozga zaradi stresa, oksidativni stres (36, 32).

Neodzivnost na ASK merimo z različnimi metodami, z agregometrijo in zapiralnim časom, direktna metoda pa je detekcija rezidualne aktivnosti ciklooksigenaze (COX-1). Raziskave kažejo, da ni konsekvencnosti v merjenju odzivnosti na ASK s POCT-metodami pri bolnikih, ki prejemajo različne odmerke ASK. Incidenca za neodzivnost na ASK je zelo odvisna od metode in je redka, kadar se določa z metodami, ki direktno indicirajo aktivnost COX-1 (37, 38). Merjenje koncentracije TxA₂ bi lahko natančno določilo potencialno prave na ASK neodzivne bolnike in delno razložilo neskladnosti med različnimi preiskavami delovanja trombocitov.

Neodzivnost na ASK je lahko povezana tudi s spremljajočo neodzivnostjo na klopidogetrel (39, 40). Taki bolniki kažejo visoko reaktivnost trombocitov na kolagen, dodatno k stimulaciji z ADP in arahidonsko kislino (39, 41). Študije kažejo na fenotip z visoko reaktivnostjo trombocitov, ki bi lahko bil povezan s povečanim tveganjem za ishemične dogodke.

Neodzivnost na tienopiridine se nanaša na nezmožnost inhibiranja trombocitnega receptorja P2Y₁₂ in posledično od receptorja P2Y₁₂ odvisnega delovanja trombocitov. Detekcija neodzivnosti na klopidogetrel v glavnem bazira na študijah z metodo optične agregometrije z ADP kot agonistom (21, 42, 43, 39, 44–59). Uporabljajo pa se tudi metode pretočne citometrije z merjenjem ekspresije receptorjev, odvisno od aktivacije po stimulaciji z ADP, POCT-metode, fosforilacija VASP (21, 42, 55, 60, 61).

Potencialni vzroki za neodzivnost na zdravljenje s klopidogetrelom so: 1. interindividualne razlike v metabolizmu prozdravila klopidogetrel v njegov aktivni metabolit (genetske variante CYP450); 2. interference z drugimi zdravili; 3. večja biološka variabilnost trombocitnega odgovora na ADP lahko povzroči večjo interindividualno variabilnost odgovora na ADP pri merjenju agregacije trombocitov med jemanjem klopidogetrela (21, 62) in 4. nezadostna biorazpoložljivost klopidogetrela, ki lahko izhaja iz individualnih razlik v intestinalni absorpciji zdravila (63). Precej študij je že obravnavalo neodzivnost na klopidogetrel, medtem ko neodzivnost na prasugrel še ni raziskana. Prasugrel je ireverzibilni inhibitor receptorja P2Y₁₂ in je prozdravilo tako kot klopidogetrel, ki potrebuje metabolno aktivacijo. Zdravljenje s prasugrelom ima za posledico povečano tveganje za krvavitve, ki so značilne pri vseh njegovih odmerkih (64). Farmakodinamski profil prasugrela je boljši kot pri klopidogetrelu in je povezan z nižjo incidenco neodzivnosti (65). ASK in tienopiridini povečujejo tveganje za krvavitve.

1.5. MERJENJE DELOVANJA TROMBOCITOV

1.5.1. Metode za merjenje delovanja trombocitov

Merjenje delovanja trombocitov se uporablja za določanje učinka zdravljenja z zaviralci agregacije trombocitov v klinične in raziskovalne namene. Razvoj novih, enostavnejših metod kaže posledično porast preiskav za določanje delovanja trombocitov izven specializiranih laboratorijev za hemostazo in raziskovalnih laboratorijev.

Delovanje trombocitov lahko merimo s številnimi *in vitro* metodami, pri katerih se določajo različni parametri trombocitne aktivacije, sekrecije, adhezije in agregacije. Metode za merjenje delovanja trombocitov so: čas krvavitve, optična agregometrija z merjenjem prepustnosti svetlobe, impedančna agregometrija, pretočna citometrija, merjenje TxB_2 v serumu in metabolitov TxB_2 v urinu (11-dehidro- TxB_2), analizator trombocitnega delovanja in merjenje agregacije trombocitov s pomočjo delcev, prekritih s fibrinogenom. Obstajajo tudi druge metode, npr. agregacija v polni krvi, tromboelastografija, merjenje adhezije in agregacije pri visokih strižnih silah in druge (66), ki se prav tako uporabljajo za določevanje inhibicije trombocitov z zaviralci agregacije trombocitov, vendar njihova uporaba ni razširjena in je zaradi pomanjkanja izkušenj omejena (67).

Vse preiskave, razen števila trombocitov, merijo delovanje trombocitov. Te preiskave vključujejo žive celice, pri katerih ugotavljamo ekspresijo receptorjev, adhezijo, agregacijo in sproščanje snovi iz zrnč. Čas krvavitve je globalna preiskava za ugotavljanje motenj primarne hemostaze. Je *in vivo* metoda (68), ki nam poda oceno števila in delovanja trombocitov ter delovanja žilne stene. Merimo čas, ki je potreben, da preneha krvavitev iz vbodne v ušesni mečici ali iz vreznine na podlakti. Optična agregometrija se uporablja za merjenje agregacije trombocitov v plazmi, bogati s trombociti. Klasični agregometri merijo prepustnost za svetlobo. Lumiagregometer meri, poleg agregacije trombocitov, tudi sproščanje ATP iz trombocitnih zrnč. Poznan je tip agregometra, ki hkrati meri citoplazemski ionizirani kalcij in agregacijo trombocitov. Impedančna agregometrija je konceptualno podobna optični agregometriji, za razliko uporablja polno kri; agregacija trombocitov po dodatku agonista se meri s spremembo v električni impedanci med dvema elektrodama (69). Pri metodi pretočne citometrije trombocite inkubiramo s protitelesi, ki so usmerjena proti GPIIb/IX in GPIIb/IIIa, na katere je vezan fluorokrom. Z imunometodo se

določajo vsi topni faktorji, ki se sproščajo iz trombocita. Serumski TxB_2 je stabilen metabolit TxA_2 in odraža celotno kapaciteto trombocitov, da sintetizirajo TxA_2 , ter je zato najbolj specifična preiskava za merjenje farmakoloških učinkov ASK (6). Metabolit TxB_2 11-dehidro- TxB_2 v urinu prav tako odraža obseg inhibicije tvorbe TxA_2 , medirane z ASK (70). Eden od trombocitnih analizatorjev uporablja kivete/elektrode za enkratno uporabo z različnimi agonisti za diagnosticiranje in spremljanje zdravljenja z zaviralci agregacije trombocitov (66). Trombocitni agregometer je enostaven, avtomatski analizator, ki zaradi odgovora na trombocitne agoniste meri aglutinacijo delcev, prevlečenih s fibrinogenom (71). Pri metodi trombelastografije (TEG) se meri prispevek trombocitne agregacije, inducirane z arahidonsko kislino in ADP, glede na celotno natezno trdnost trombocitno-fibrinskega strdka (42).

V pričujočem delu smo za oceno delovanja trombocitov in merjenje učinka zaviralcev agregacije trombocitov uporabili naslednji preiskavi, in sicer: optično agregometrijo z merjenjem prepustnosti svetlobe in merjenje zapiralnega časa z analizatorjem trombocitnega delovanja PFA-100[®].

Agregometrija z merjenjem prepustnosti svetlobe velja po Bornu za »zlati standard« za merjenje delovanja trombocitov (34) in za *in vitro* metodo, ki se pogosto uporablja (72). Pri analiziranju se določa porast prepustnosti svetlobe, potem ko stimulirajoča substanca (agonist) povzroči aktivacijo trombocitov. Agregacija poteka ob prisotnosti Ca^{2+} , ki ga je dovolj v citratni krvi ali plazmi. Meritev se vrši v plazmi, bogati s trombociti (PRP), in plazmi, revni z njimi (PPP). Plazmi se dodajo različni agonisti za aktivacijo trombocitov (kolagen, ADP, epinefrin, arahidonska kislina), ki povzročijo njihovo agregacijo. Agregacijo in aglutinacijo trombocitov merimo s turbidimetrijo, saj posamični trombociti bolj razpršijo svetlobo kot trombocitni agregati. Zato ima agregacija trombocitov za posledico zmanjšano absorpcijo svetlobe. Večina agregometrov meri svetlobno prepustnost in ne absorpcije. Analizator meri svetlobo, ki preseva skozi plazmo. Večja je agregacija trombocitov v plazmi (manj je delcev v plazmi), večja je prepustnost svetlobe. Spremembo svetlobne prepustnosti v časovni enoti po dodatku agonista zabeleži analizator kot agregacijsko krivuljo.

Merjenje zapiralnega časa je preiskava, pri kateri v merilni celici potekata adhezija in agregacija trombocitov iz vzorca polne krvi. Ta preiskava nadomešča merjenje časa krvavitve *in vitro*. Merilna celica je sestavljena iz zbiralnika za vzorec, kapilare in biološko aktivne membrane z odprtino premera 150 μm na sredini. Merilne celice se razlikujejo po

membranah oziroma po aktivatorju agregacije, s katerim je prevlečena membrana. Le-ta je pri merilni celici KOL/EPI prevlečena s kolagenom in epinefrinom, pri merilni celici KOL/ADP s kolagenom in ADP in pri merilni celici P2Y z ADP, prostaglandinom E1 in ioniziranim kalcijem. Merilna celica KOL/EPI je primerna za detekcijo motenj delovanja trombocitov, inducirano z intrinzičnimi motnjami trombocitov, von Willebrandovo boleznijo ali inhibirajočimi faktorji proti trombocitom. Merilna celica KOL/ADP se uporablja ob povišanem ZČ, določenim z merilno celico KOL/EPI, da se odkrije morebiten vpliv ASK. Merilna celica P2Y odkrije motnje delovanja trombocitov, povzročene z blokado trombocitnega P2Y₁₂ receptorja. Vzorec polne krvi v merilni celici potuje pod standardnimi pogoji (ob konstantnem tlaku) po tanki kapilari do membrane, ki je prevlečena s trombocitnimi agonisti. Zaradi stika krvi z agonisti (kolagenom, epinefrinom, ADP, prostaglandin E1 (PGE1)) pride do adhezije in agregacije trombocitov. Na odprtini se prične tvoriti trombocitni strdek, ki postopoma zapre odprtino. Ko se slednja popolnoma zapre, se tok krvi prekine, kar analizator zazna kot zapiralni čas v sekundah. Z merjenjem zapiralnega časa se zelo približamo fiziološkim okoliščinam v organizmu. Metoda simulira poškodovano žilo, kjer nastaja strdek pri pretoku krvi ob močnih strižnih silah, upoštevane so interakcije med trombociti in drugimi celicami v krvi, ker se pri merjenju uporablja polna kri. Slabost metode je v tem, da na meritev vplivajo število trombocitov, vrednost hematokrita in koncentracija vWf (73).

1.5.2. Težave pri določanju delovanja trombocitov z laboratorijskimi metodami

Osnovna težava merjenja delovanja trombocitov ali z zdravili povezane inhibicije je, da nobena posamezna metoda ne zajame celotne kompleksnosti biologije in delovanja trombocitov (26, 43). Slaba stran vseh metod za merjenje delovanja trombocitov je tudi ta, da niso standardizirane. Na *in vitro* metode imajo znaten vpliv predanalitski dejavniki: način odvzema krvi, antikoagulantna sredstva, shranjevanje vzorcev in temperatura vzorcev. Trombociti so zelo občutljivi na te dejavnike, zato je preiskave potrebno izvesti kmalu po odvzemu krvi, kar otežuje meritve pri teh metodah za oceno delovanja trombocitov. Ponovljivost in primerljivost metod je sorazmerno slaba. V nadaljnjem besedilu opisujemo dejavnike, ki pomembno vplivajo na rezultate merjenja agregacije trombocitov z optično agregometrijo in rezultate merjenja zapiralnega časa.

Čas do analize vzorca: Trombociti so zelo občutljivi na shranjevanje in hlajenje vzorca. Odgovor trombocitov je na te dejavnike zelo hiter. Priporočilo je, da optično agregometrijo izvedemo največ 2 do 3 ure po odvzemu krvi (74, 75).

Vrsta antikoagulanta: Za večino preiskav agregacije trombocitov in zapiralnega časa se uporablja plazma, ki je antikoagulirana z natrijevim citratom in ima malo trombocitov. Kot antikoagulant se uporablja 3-natrijev citrat v dihidratni obliki. Natrijev citrat se uporablja v koncentraciji 0,129 mol/L (3,8 %) ali 0,105 mol/L (3,2 %). Ker natrijev citrat ne vstopa v eritrocite in ostane v plazmi, spremembe v hematokritu ali v polnjenju epruvete vplivajo na končno koncentracijo kalcija in na ta način na rezultate preiskav agregacije trombocitov. Razmerje med krvjo in antikoagulantnim sredstvom je 9 : 1. Ekspresija p-selektina na površini trombocita se poveča v prisotnosti natrijevega citrata kot antikoagulanta napram drugim antikoagulantom (76). Vrednosti zapiralnega časa so prav tako odvisne od koncentracije natrijevega citrata.

Izbira agonista: Za določanje delovanja trombocitov z metodo agregometrije ima glavni pomen izbira in koncentracija agonista, pri zapiralnem času pa izbira merilne celice, ki vsebuje določene agoniste. Kadar določamo trombocitni odgovor na ASK, se je potrebno primarno osredotočiti na inhibicijo COX-1; tako je arahidonska kislina najprimernejši agonist. Če agonist stimulira več načinov aktivacije trombocitov, je lahko odgovor ASK zmanjšan v primerjavi z metodami, ki uporabljajo arahidonsko kislino. Pri klopidogetu je smiselno meriti odgovor, induciran z ADP. Ta reagira z najmanj dvema receptorjema na površini trombocita, P2Y₁₂ in P2Y₁, tako z določanjem delovanja trombocitov določamo kombiniran biološki vpliv ADP na oba receptorja. Določanje vpliva klopidogeta na P2Y₁₂ je najbolj točno določeno z merjenjem fosforilacije vasodilator-stimuliranega fosfoproteina (VASP) (77).

Vpliv števila trombocitov: Število trombocitov v PRP naj bi vplivalo na agregacijo trombocitov *in vitro*. Na začetku se je v raziskavah trombocitne agregacije priporočalo prilagajanje števila trombocitov pri optični agregometriji v PRP-plazmi z avtologno plazmo, revno s PPP. Nedavne študije pa so pokazale, da lahko prilagajanje števila trombocitov v PRP pred agregacijo povzroči neustrezno inhibicijo in tako vpliva na meritve končne trombocitne agregacije (33). Število trombocitov prav tako vpliva na zapiralni čas. Študije kažejo, da nizko število trombocitov (pod $50 \times 10^9/L$) pomembno podaljšuje zapiralni čas (78).

2. NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Glede na uporabo antiagregacijskih zdravilnih učinkovin za preprečevanje večine koronarnih bolezni je spremljanje uspešnosti zdravljenja nujno potrebno. Določen delež bolnikov ima kljub zdravljenju z zaviralci agregacije trombocitov ponovne ishemične dogodke, kar je lahko posledica neodzivnosti na ASK, klopidogrel ali prasugrel. Rezultati naše raziskave bi lahko predstavljali osnovo za večjo klinično raziskavo, v kateri bi ugotavljali povezavo med neodzivnostjo na ASK, klopidogrel in prasugrel, merjeno z metodo optične agregometrije in zapiralnim časom, ter kliničnimi dogodki.

Namen raziskave je bil:

1. določiti referenčne vrednosti za delovanje trombocitov z metodo optične agregometrije z različnimi koncentracijami kolagena, ADP in arahidonske kisline;
2. določiti referenčne vrednosti za delovanje trombocitov z metodo merjenja zapiralnega časa z uporabo merilnih celic s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI), kolagenom in ADP (KOL/ADP) in P2Y;
3. ugotoviti delež bolnikov s koronarno boleznijo, ki se zdravijo z zaviralci agregacije trombocitov (ASK ter kombinacijo ASK s klopidogrelom in prasugrelom) in so neodzivni na to zdravljenje;
4. ugotoviti, kako se ujemata metodi optične agregometrije in zapiralnega časa glede prepoznavanja oseb, ki so neodzivne na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov.

Z nalogo smo nameravali preveriti naslednje hipoteze:

1. Neodzivnost na ASK bomo ugotovili pri največ 60 % bolnikov, ki prejemajo ASK. Pri skupinah bolnikov z dvotirnim zdravljenjem (ASK in klopidogrel ter ASK in prasugrel) bo število neodzivnih bolnikov pomembno manjše. Neodzivnost na dvotirno zdravljenje z ASK in klopidogrelom ter ASK in prasugrelom bomo ugotovili pri manj kot 30 % bolnikih.
2. Ujemanje metod optične agregometrije in meritev zapiralnega časa pri opredeljevanju neodzivnosti na ASK, ASK/klopidogrel in ASK/prasugrel bo zmerno (koeficient kapa večji od 0,2).

3. PREISKOVANCI, MATERIALI IN METODE

Magistrsko nalogo smo izvajali v skladu z določili Kodeksa medicinske etike in deontologije in Konvencije o varovanju človekovih pravic in dostojanstva. Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko je dala soglasje za izvajanje raziskave dne 11. 12. 2007.

3.1. PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 111 oseb, ki smo jih glede bolezni ter načinov zdravljenja razvrstili v 4 skupine. Vse preiskovance smo v pisni obliki seznanili z namenom raziskave in njihovo vlogo v njej. Preiskovanci so na podlagi prostovoljne pisne privolitve prostovoljno sodelovali v raziskavi.

Kontrolna skupina

V to skupino smo vključili 30 navidezno zdravih prostovoljcev. Vključili smo 10 moških in 20 žensk, starih od 28 do 74 let.

Bolniki s stabilno koronarno boleznijo (skupina: ASK)

V to skupino smo vključili 35 bolnikov s stabilno koronarno boleznijo, ki so preboleli akutni srčni infarkt in so prejeli ASK (aspirin, 100 mg/dan). Pred vključitvijo v raziskavo je bilo trajanje zdravljenja neprekinjeno najmanj 14 dni. V raziskavo smo vključili 26 moških in 9 žensk, ki so bili stari od 36 do 81 let.

Bolniki po perkutanem koronarnem posegu (skupina: ASK + klopidogetrel)

V to skupino smo vključili 36 bolnikov po perkutanem koronarnem posegu, ki so obiskovali kardiološko ambulanto v Splošni bolnišnici Slovenj Gradec. Ti bolniki so prejeli dvotirno zdravljenje: ASK (aspirin, 100 mg dnevno) in klopidogetrel (plavix, 75 mg dnevno) za preprečevanje tromboze na mestu žilne opornice. Trajanje zdravljenja je bilo neprekinjeno najmanj 14 dni. Med bolniki je bilo 29 moških in 7 žensk, ki so bili stari od 34 do 87 let.

Bolniki po perkutanem koronarnem posegu (skupina: ASK + prasugrel)

V to skupino smo vključili 10 bolnikov po perkutanem koronarnem posegu, ki so obiskovali kardiološko ambulanto v Splošni bolnišnici Slovenj Gradec. Ti bolniki so prejeli dvotirno zdravljenje: acetilsalicilno kislino (aspirin, 100 mg dnevno) in prasugrel (effient, 10 mg dnevno) za preprečevanje stent tromboze. Trajanje zdravljenja je bilo neprekinjeno najmanj 14 dni. V raziskavo smo vključili 8 moških in 2 ženski, razpon starosti bolnikov je bil od 41 do 71 let.

3.2. MATERIALI IN METODE

3.2.1. Odvzem krvi

Preiskovancem smo odvzeli kri iz komolčne vene nadlakti med 8. in 12. uro zjutraj. Preiskovanci so bili tešči oziroma so pojedli lahek zajtrk najkasneje eno uro pred odvzemom. Pred njim so sede počivali 20 minut. Pri odvzemu krvi smo uporabili iglo 21G. Za agregacijo trombocitov smo odvzeli 10 mL krvi v vakuumsko epruveto z dodatkom antikoagulant (0,105 M natrijev citrat, vacutainer, Beckton Dickinson). Prve 3–4 mL krvi smo zaradi možne vsebnosti tkivnega tromboplastina zavrgli ali uporabili za druge analize (zapiralni čas). Razmerje med krvjo in antikoagulantnim sredstvom je bilo 9 : 1. Kri smo odvzeli z najmanjšim možnim zažemom nadlakti ali brez njega in to tik pred začetkom preizkusa.

4,5 mL krvi za merjenje zapiralnega časa smo odvzeli v vakuumske epruvete z dodatkom 0,105 M natrijevega citrata istega proizvajalca.

Za določitev števila trombocitov in hematokrita smo odvzeli kri v vakuumsko epruveto z antikoagulantnim sredstvom K₃-EDTA (vacutainer, Beckton Dickinson).

Do analize smo vzorce hranili pri sobni temperaturi. Vse preiskave smo opravili najkasneje v dveh urah po odvzemu krvi.

3.2.2. Določitev števila trombocitov

Analizo števila trombocitov v trombocitni plazmi PRP in plazmi brez trombocitov PPP smo izvedli na hematološkem analizatorju ADVIA 2120i proizvajalca Siemens (Marburg, Nemčija).

3.2.3. Merjenje agregacije trombocitov z optično agregometrijo

Priprava vzorcev

S krvjo je bilo potrebno ravnati previdno, počasi pipetirati, da nismo poškodovali membrane trombocitov in da nismo sprožili spontane agregacije. Vse epruvete in pipete, ki smo jih uporabljali, so bile plastične (polipropilenske) ali steklene silikonizirane, ker se lahko trombociti lepijo na stene steklenih epruvet. Kri smo hranili pri sobni temperaturi, ker se pri nizki lahko sproži spontana agregacija. Pred centrifugiranjem je kri stala 15 minut pri sobni temperaturi. Iz vsakega vzorca krvi smo pripravili PRP in PPP.

PRP smo pripravili tako, da smo kri centrifugirali pri 200 g 10 minut pri sobni temperaturi in brez zavore. Supernatant je bila PRP. Previdno smo odpipetirali približno 2 mL PRP (po 1 mL iz vsake epruvete) v plastično posodico. Na hematološkem števcu smo določili število trombocitov in ga zabeležili. Števila trombocitov v PRP nismo prilagajali z avtologno PPP. Močno hemoliziranih in lipemičnih vzorcev nismo analizirali.

PPP smo pripravili tako, da smo ostanek krvi pri pripravi PRP centrifugirali pri 1500 g 15 minut pri sobni temperaturi. Supernatant je bila PPP, ki smo jo s plastično kapalko previdno odpipetirali v plastično posodico. Na hematološkem števcu smo določili število trombocitov. Število trombocitov v PPP ni smelo presegati 20×10^9 trombocitov/L. Če je bilo trombocitov več, smo plazmo ponovno centrifugirali.

Reagenti

Za merjenje agregacije trombocitov smo uporabili naslednje reagente:

1. kolagen (DiaColgen, DiaMed, kataloška št. 308261, lot 30720.22.11): 110 mg/L govejega liofiliziranega kolagena. Končna delovna koncentracija je bila 11 mg/L. Kolagen smo raztopili z 1 mL destilirane vode in rahlo premešali. Reagent je bil obstojen v hladilniku 1 teden. Koncentracijo 5,5 mg/L smo pripravili z redčenjem

osnovnega reagenta z destilirano vodo v razmerju 1 : 1 (300 µL osnovnega reagenta in 300 µL destilirane vode).

2. adenzin difosfat (ADP, DiaAdin, DiaMed, kataloška št. 308161, lot 30710.11.12): vsebino stekleničke smo raztopili z 1 mL destilirane vode (110 µmol/L). Končna delovna koncentracija je bila 11 µmol/L. Raztopljen reagent ADP je bil 1 teden obstojen v hladilniku. Koncentracijo 5,5 µmol/L smo pripravili z redčenjem osnovnega reagenta z destilirano vodo v razmerju 1 : 1 (300 µL osnovnega reagenta in 300 µL destilirane vode).
3. arahidonska kislina (DiaChidon, DiaMed, kataloška št. 308461, lot 30740.15.11): 1,6 mmol/L liofilizirane arahidonske kisline (AK). Vsebino stekleničke smo raztopili z 1 mL destilirane vode. Raztopljen reagent je bil 1 teden obstojen v hladilniku. Delovna koncentracija je bila 1,6 mmol/L.
4. spiralna tekočina (Washing solution, Siemens, kataloška številka OWZC 39, lot 538762A): vsebuje klorovodikovo kislino in triton X-100. Vrednost pH ≤ 2.0. Raztopina je bila pripravljena za uporabo. Zaprta steklenička je bila uporabna do datuma, označenega na steklenički pri temperaturi 2–25 °C. Odrpna steklenička je bila stabilna 5 dni pri temperaturi 15–25 °C.

Dodani volumen agonista ni smel presežati 10 % celokupnega volumna. Po našem protokolu je analizator BCT odpipetiral 135 µL plazme in 15 µL agonista.

Princip merjenja

Agregacijo trombocitov smo sprožili z različnimi agonisti: kolagenom (končna koncentracija 11 mg/L in 5,5 mg/L), ADP (končna koncentracija 11 µmol/L in 5,5 µmol/L) ter arahidonsko kislino (končna koncentracija 1,6 mmol/L). Stopnjo agregacije smo določili z merjenjem prepustnosti svetlobe skozi vzorec plazme. Prepustnost svetlobe je teoretično največja v PPP, tako da smo za standardizacijo postopka uporabili PPP istega preiskovanca. Iz meritev v PRP in PPP smo izračunali odstotek prepustnosti svetlobe.

Neodzivnost na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov smo definirali kot agregacijo trombocitov z določenim agonistom, ki ni bila znižana, temveč je bila znotraj referenčnih vrednosti, ki smo jih določili pri kontrolni skupini.

Potek dela

Po centrifugiranju in pred analiziranjem je PRP stala pri sobni temperaturi 15 minut. Preiskave nismo kalibrirali. Za kontrolo kvalitete smo uporabili plazmo zdravega preiskovanca. Reagente smo vstavili na ustrezna mesta v analizator BCT: R0 Wash solution, C1 ADP 11 $\mu\text{mol/L}$, C2 ADP 5,5 $\mu\text{mol/L}$, C3 kolagen 11 mg/L , C4 kolagen 5,5 mg/L , C5 NaCl, C6 arahidonska kislina 1,6 mmol/L , C7 NaCl. Izbrali smo ustrezni reagentni profil.

Vsak preiskovanec je imel 2 vzorca: PRP in PPP. Vzorce smo naložili na ustrezna mesta v analizatorju. Za vzorec PPP smo izbrali preiskavo agregacija PPP, za vzorec PRP pa agregacija PRP. Analizo smo pričeli tako, da smo zaprli pokrov analizatorja. Meritev 1. vzorca je potekala 38 minut, če smo naložili več vzorcev hkrati, pa temu ustrezno več minut.

Analizator BCT je v merilni kiveti mešal PRP s hitrostjo 1000 obratov/minuto. Po priporočilu se signal odčitava 1 minuto pred dodatkom agonista (stabilen zapis, oscilacije). Analizator BCT tega ni omogočal, zato smo merili od dodatka agonista 10 minut. Meritev smo izvedli v roku 2 ur po odvzemu krvi.

Izračun rezultatov

Za izračun smo uporabili vrednosti optične gostote (OG) na začetku in koncu merjenja v PRP in optično gostoto PPP. Rezultat smo izračunali kot odstotek agregacije po enačbi:

$$\% \text{ agregacije} = \frac{\text{OG}_S - \text{OG}_K}{\text{OG}_S - \text{OG}_{\text{PPP}}} \times 100$$

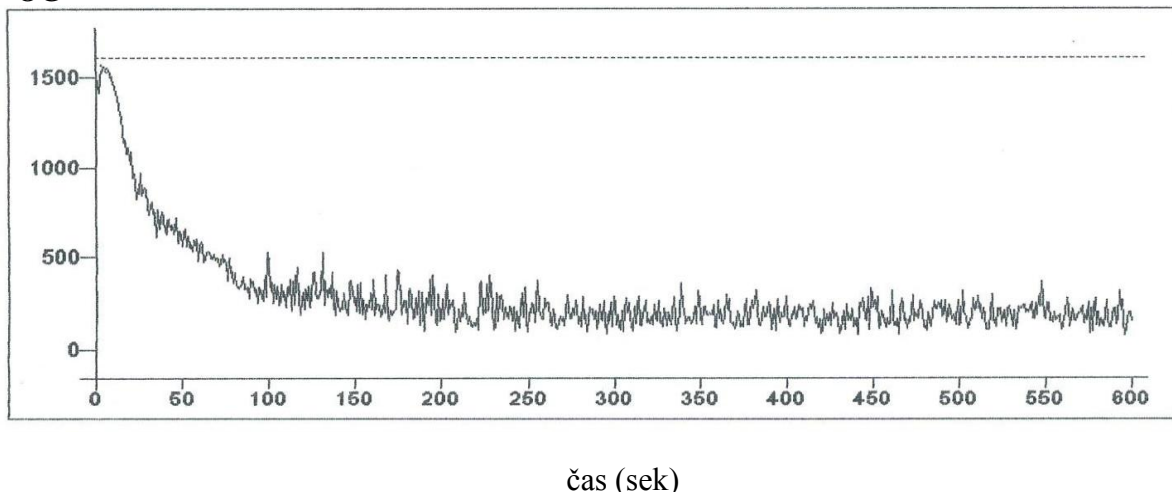
OG_S – optična gostota plazme takoj po dodatku agonista (S-start)

OG_K – optična gostota plazme po 10 minutah (K-končna)

OG_{PPP} – optična gostota plazme PPP

Po končani agregaciji smo pregledali agregacijsko krivuljo (slika 3).

OG



Slika 3: Primer agregacijske krivulje z agonistom ADP, 11 $\mu\text{mol/L}$ pri preiskovancu iz kontrolne skupine

3.2.4. Merjenje zapiralnega časa

Priprava vzorca

Vzorec za analizo zapiralnega časa je bila polna venska kri z antikoagulantom Na-citrat (3,2 % oz. 0,105 M). Vzorci so bili pri sobni temperaturi stabilni 4 ure. Po odvzemu smo kri dobro premešali z antikoagulantom, tako da smo jo z dlanjo 3- do 4-krat rahlo obrnili. Hemoliziranih vzorcev nismo analizirali.

Reagenti

Zapiralni čas smo izmerili v merilnih celicah: kolagen/epinefrin (KOL/EPI), kolagen/ADP (KOL/ADP) in P2Y na analizatorju trombocitnega delovanja PFA-100[®] proizvajalca Siemens (Marburg/Lahn, Nemčija).

Za merjenje zapiralnega časa smo potrebovali naslednje reagente:

1. merilna celica s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI, PFA-100[®] Collagen-Epinephrine Test Cartridges, Siemens, kataloška št. B4170-20, lot 5595509): ima membrano prevlečeno s kolagenom (2 μg Tip I kolagen konja) in epinefrinom (10 μg epinefrin bitartrat). Pred uporabo smo merilno celico segreti na sobno temperaturo, kar je trajalo približno 15 minut. Stabilnost merilnih celic v zaprti vrečki v hladilniku je bila do datuma, označenega na embalaži. Ko je bila vrečka

- odprta, so bile merilne celice stabilne 3 mesece na 2 do 8 °C. Pri sobni temperaturi so bile merilne celice stabilne 4 ure (v vrečki ali ne).
2. merilna celica s kolagenom in ADP (KOL/ADP, PFA-100 Collagen-ADP Test Cartidges, Siemens, kataloška št. B4170-21, lot 5596284): ima membrano prevlečeno s kolagenom (2 µg Tip I kolagen konja) in ADP (50 µg). Pred uporabo smo merilno celico ogreli na sobno temperaturo, kar je trajalo približno 15 minut. Stabilnost merilnih celic v zaprti vrečki v hladilniku je bila do datuma, označenega na embalaži. Ko je bila vrečka odprta, so bile merilne celice stabilne 3 mesece na 2 do 8 °C. Pri sobni temperaturi so bile merilne celice stabilne 4 ure (v vrečki ali ne).
 3. merilna celica P2Y (INNOVANCE PFA P2Y Test Cartidges, Siemens, kataloška št. B4170-22, lot 5464009): ima membrano prevlečeno z ADP (20 µg), prostaglandinom E1 (PGE1, 5 ng) in ioniziranim kalcijem (125 µg), v obliki 431 µg kalcijev diklorid dihidrat $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Pred uporabo smo merilno celico ogreli na sobno temperaturo, kar je trajalo približno 15 minut. Stabilnost merilnih celic v zaprti vrečki v hladilniku je bila do datuma, označenega na embalaži. Ko je bila vrečka odprta, so bile merilne celice stabilne 3 mesece. Po odstranitvi zaščitne folije so bile merilne celice pri sobni temperaturi stabilne 12 ur.
 4. spiralna tekočina (Trigger Solution, Siemens, kataloška št. B4170-50, lot 5299031): stabilna pri sobni temperaturi do datuma, označenega na embalaži. Po odprtju stekleničke je bila stabilna 60 dni. Tekočino je bilo potrebno zavreči, če je bila motna ali je vsebovala kakršnekoli delce. Spiralna tekočina se je pri merjenju dodala na začetku analize na membrano, da je raztopila ADP, kalcij in PGE1, s katerimi je bila membrana prevlečena.

Princip merjenja

Polna kri se iz zbiralnika v merilni celici aspirira skozi kapilaro in odprtino v membrani. V analizatorju se ob stalnem pritisku potiska skozi ozko kapilaro proti odprtini, ki je prevlečena s kolagenom. Hemodinamske razmere v kapilari oponašajo razmere v arterioli, odprtina pa oponaša poškodbo žile. Zaradi stika s trombocitnimi agonisti, s katerimi je prevlečena membrana, pride do adhezije in agregacije trombocitov. Na odprtini začne nastajati strdek, ki postopoma zapre odprtino. Ko se odprtina popolnoma zapre, se tok krvi prekine, analizator to zazna kot zapiralni čas v sekundah. Meritev se prekine, če strdek ne

nastane v 300 sekundah, če je pretok moten zaradi zračnih mehurčkov ali trombocitnih agregatov in zaradi premajhnega volumna polne krvi.

Neodzivnost na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov smo definirali kot zapiralni čas, merjen z določeno merilno celico, ki ni bil podaljšan, temveč znotraj referenčnih vrednosti, ki smo jih določili pri kontrolni skupini.

Potek dela

Merjenje zapiralnega časa smo izvedli na analizatorju delovanja trombocitov PFA-100®. Na njem smo pred pričetkom dela izvedli spiranje in samotestiranje (self test). Merilni celici smo odstranili zaščitno folijo. V njeno odprtino smo odpipetirali 800 µL polne citratne krvi, ki smo jo pred tem rahlo premešali. Kri smo pipetirali počasi po notranji steni odprtine, da smo preprečili nastanek zračnih mehurčkov. Merilno celico smo vstavili na položaj A za inkubacijo. Položaj B mora biti prazen. S pritiskom na tipko Run smo pričeli z meritvijo. Meritev je potekala do 300 sekund.

Preiskave nismo kalibrirali. Za kontrolo kakovosti smo analizirali kri zdravega preiskovanca.

Rezultati

Rezultate zapiralnega časa smo podajali v sekundah. Maksimalni zapiralni čas je 300 s. Vrednosti, večje od 300 s, pomenijo, da v tem času ni prišlo do zaprtja odprtine. Te vrednosti smo za statistično analizo arbitrarno določili kot 300 s.

3.2.5. Statistični izračuni

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili statistični program Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, ZDA). Normalnost porazdelitve spremenljivk smo testirali s Kolmogorov-Smirnovim testom. Vrednosti spremenljivk, ki so se razporejale normalno, smo prikazali z aritmetično sredino in standardnim odklonom, vrednosti spremenljivk, ki se niso razporejale normalno, pa z mediano in razponom med prvim in tretjim kvartilom.

Za preizkušanje razlik med skupinami smo za spremenljivke, ki so se razporejale normalno, uporabili analizo variance (ANOVA). Če je bila F-vrednost (razmerje med variancami) pomembno visoka ($p < 0,05$), smo razlike med posameznimi skupinami preskušali s Schefferjevim testom. Za spremenljivke, ki se niso razporejale normalno, pa smo uporabili Kruskal-Wallisov test. Pri preizkušanju razlik smo imeli vrednost $p < 0,05$ za statistično značilno.

Razlike v številu neodzivnih bolnikov smo testirali s Hi-kvadrat testom. Pri preizkušanju domnev smo imeli vrednost $p < 0,05$ za statistično značilno.

Ujemanje med metodami smo izračunali s koeficientom kapa. V primeru, ko je bil le-ta manjši od 0,2, smo menili, da gre za slabo ujemanje, pri koeficientu kapa 0,21–0,40 za zmerno, pri koeficientu kapa 0,41–0,60 za precejšnje, pri koeficientu kapa 0,61–0,80 za dobro in pri koeficientu kapa 0,81–1,00 za zelo dobro ujemanje (79).

4. REZULTATI

4.1. DOLOČITEV REFERENČNIH VREDNOSTI ZA DELOVANJE TROMBOCITOV Z METODO OPTIČNE AGREGOMETRIJE IN ZAPIRALNEGA ČASA PRI KONTROLNI SKUPINI

V prvi fazi smo določili referenčne vrednosti za delovanje trombocitov z metodo optične agregometrije in zapiralnega časa kot razpon med 5. in 95. percentilom pri kontrolni skupini. V tabeli 1 so prikazane aritmetične sredine s standardnimi odkloni in razpon med 5. in 95. percentilom. Te vrednosti smo uporabili, ko smo ugotavljali (ne)odzivnost bolnikov na zaviralce agregacije trombocitov.

Agregacijo trombocitov smo pri metodi optične agregometrije izzvali s kolagenom (KOL), adenzin difosfatom (ADP) in arahidonsko kislino (ARAH), zapiralne čase pa smo merili v merilni celici s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI), kolagenom in ADP (KOL/ADP) ter v celici za merjenje antagonistov receptorjev P2Y (P2Y).

Tabela 1: Referenčne vrednosti agregacije trombocitov z metodo optične agregometrije in zapiralnega časa pri kontrolni skupini

Prikazane so aritmetične sredine s standardnimi odkloni in razpon med 5. in 95. percentilom.

	N	X ± SD	Referenčna vrednost (5–95 %)
Trombociti (x 10 ⁹ /L)	30	343 ± 93	182–479
Agregacija (%)			
KOL (11 mg/L)	30	86 ± 5	76–93
KOL (5,5 mg/L)	26	77 ± 18	66–90
ADP (11 µmol/L)	30	77 ± 15	45–92
ADP (5,5 µmol/L)	28	62 ± 27	15–91
ARAH (1,6 mmol/L)	28	84 ± 6	76–92
Zapiralni čas (s)			
KOL/EPI	30	110 ± 23	88–151
KOL/ADP	30	84 ± 12	70–109
P2Y	30	66 ± 11	50–88

4.2. AGREGACIJA TROMBOCITOV Z METODO OPTIČNE AGREGOMETRIJE PRI SKUPINAH BOLNIKOV Z ZAVIRALCI AGREGACIJE TROMBOCITOV

Agregacijo trombocitov smo analizirali z metodo optične agregometrije pri kontrolni skupini in bolnikih na zdravljenju z zaviralci agregacije trombocitov (ASK, ASK in klopidogetromolom ter ASK in prasugrelom). Agregacijo trombocitov smo izzvali s kolagenom (KOL), adenzin difosfatom (ADP) in arahidonsko kislino (ARAH). Odstotek agregacije trombocitov smo izračunali iz vrednosti optične gostote (OG) na začetku in koncu merjenja v PRP in optično gostoto PPP. Število trombocitov smo določili na hematološkem analizatorju.

V tabeli 2 so prikazani starost preiskovancev, število trombocitov in vrednosti agregacije trombocitov pri kontrolni skupini ter pri bolnikih na zaviralcih agregacije trombocitov. Bolniki, ki so dobivali ASK in klopidogetromol, so bili pomembno starejši od navidezno zdravih v kontrolni skupini in od ostalih bolnikov (ANOVA: F = 10,62; p < 0,001). Število

trombocitov v krvi pa je bilo med skupinami primerljivo (ANOVA: $F = 2,67$; $p = 0,051$) in med njimi ni bilo statistično pomembnih razlik. Razlike med skupinami v agregaciji trombocitov z metodo optične agregometrije opisujemo pri posameznih slikah 4–8.

Tabela 2: Analiza agregacije trombocitov z metodo optične agregometrije

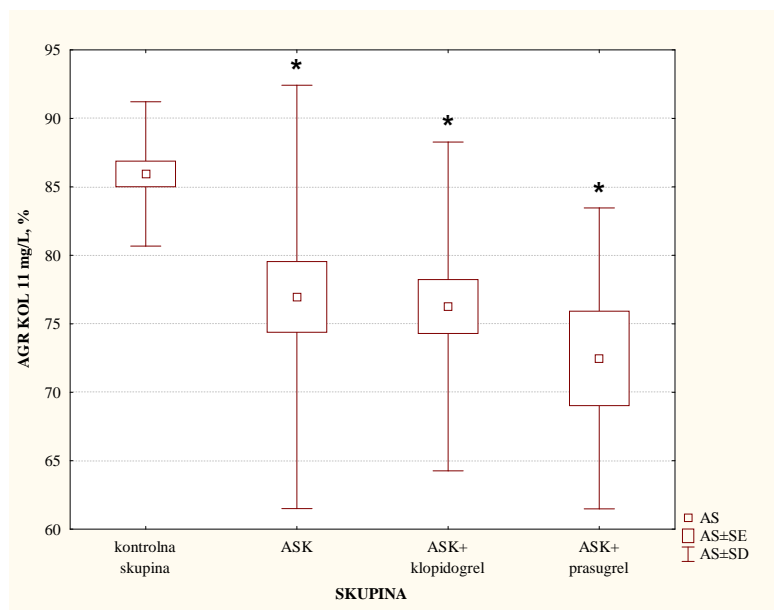
Starost, število trombocitov ter vrednosti agregacije trombocitov z metodo optične agregometrije (aritmetična sredina \pm standardni odklon) v kontrolni skupini in pri bolnikih z zaviralci agregacije trombocitov.

	Kontrolna skupina	ASK	ASK + klopidogrel	ASK + prasugrel
N	30	35	36	10
starost (leta)	54 \pm 13	63 \pm 12*	70 \pm 11**	56 \pm 11
Trombociti ($\times 10^9/L$)	343 \pm 93	341 \pm 100	330 \pm 72	365 \pm 51
Agregacija (%)				
KOL (11 mg/L)	86 \pm 5	77 \pm 15*	76 \pm 12*	72 \pm 11*
KOL (5,5 mg/L)	77 \pm 18	47 \pm 22*	40 \pm 20**	29 \pm 20**
ADP (11 μ mol/L)	77 \pm 15	61 \pm 14*	41 \pm 20**##	16 \pm 12**###++
ADP (5,5 μ mol/L)	62 \pm 27	47 \pm 16	30 \pm 18**#	12 \pm 10**##
ARAH (1,6 mmol/L)	84 \pm 6	11 \pm 17**	16 \pm 19**	10 \pm 14**

Scheffejev test: * $p < 0,05$ in ** $p < 0,001$ v primerjavi s kontrolno skupino; # $p < 0,05$ in ## $p < 0,001$ v primerjavi s skupino z ASK; ++ $p < 0,001$ v primerjavi s skupino z ASK in klopidogrelom.

Vrednosti agregacije trombocitov z metodo optične agregometrije pri kontrolni skupini ter pri bolnikih na zaviralcih agregacije trombocitov so prikazane v slikah 4–8.

Na sliki 4 so prikazane vrednosti agregacije trombocitov, izzvane z 11 mg/L kolagena, pri vseh štirih skupinah preiskovancev. Agregacijo trombocitov smo določili z metodo optične agregometrije. Odstotek agregacije trombocitov smo izračunali iz vrednosti optične gostote (OG) na začetku in koncu merjenja v PRP in optično gostoto PPP. Z ANOVA-o smo ugotovili, da so se skupine pomembno razlikovale med seboj ($F = 5,40$; $p = 0,002$). Pri vseh treh skupinah bolnikov je bila agregacija trombocitov, izzvana z 11 mg/L kolagena, pomembno nižja kot pri kontrolni skupini (vsi $p < 0,05$, oznaka *), med skupinami bolnikov pa ni bilo pomembnih razlik.

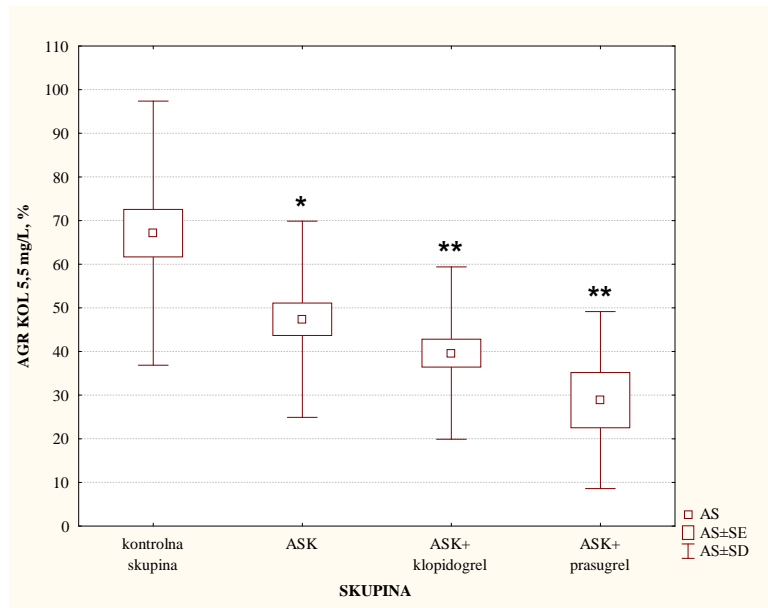


Slika 4: Agregacija trombocitov, izzvana z 11 mg/L kolagena

Na sliki je prikazana agregacija trombocitov (%), izzvana z 11 mg/L kolagena, pri kontrolni skupini in skupinah ASK, ASK + klopidogetrel, ASK + prasugrel. Prikazane so aritmetične sredine (majhen kvadrat), aritmetične sredine \pm standardne napake aritmetične sredine (velik kvadrat) in aritmetične sredine \pm standardni odkloni (črta).

Scheffejev test: * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolno skupino.

Na sliki 5 so prikazane vrednosti agregacije trombocitov, izzvane s 5,5 mg/L kolagena, pri vseh štirih skupinah preiskovancev. Agregacijo trombocitov smo določili z metodo optične agregometrije. Odstotek agregacije trombocitov smo izračunali iz vrednosti optične gostote (OG) na začetku in koncu merjenja v PRP in optično gostoto PPP. Z ANOVA-o smo ugotovili, da so se skupine pomembno razlikovale med seboj ($F = 10,00$; $p < 0,001$). Pri vseh treh skupinah bolnikov je bila agregacija trombocitov, izzvana s 5,5 mg/L kolagena, pomembno nižja kot pri kontrolni skupini ($p < 0,05$ pri skupini na ASK (oznaka *), $p < 0,001$ pri skupini na ASK in klopidogetrelom in skupini na ASK in prasugrelom (oznaka **)), med skupinami bolnikov pa ni bilo pomembnih razlik.



Slika 5: Agregacija trombocitov, izzvana s 5,5 mg/L kolagena

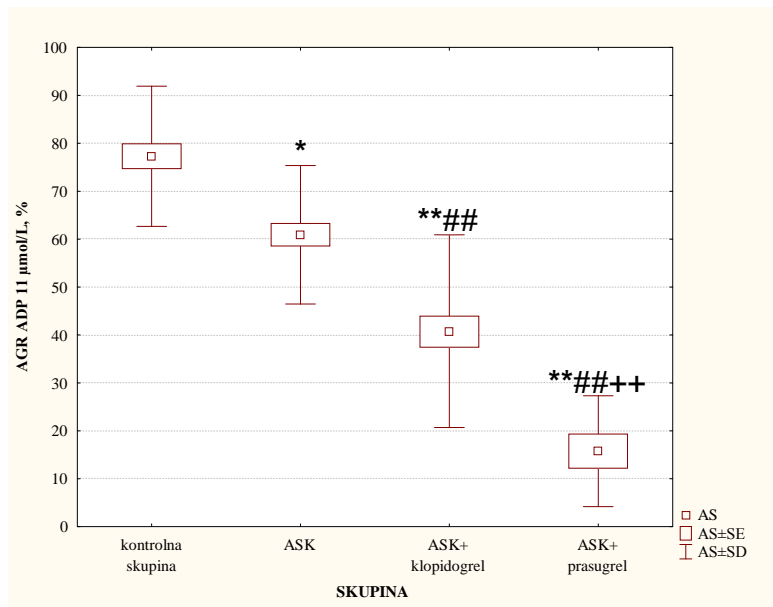
Na sliki je prikazana agregacija trombocitov (%), izzvana s 5,5 mg/L kolagena, pri kontrolni skupini in skupinah ASK, ASK + klopidogetrel, ASK + prasugrel. Prikazane so aritmetične sredine (majhen kvadrat), aritmetične sredine (AS) ± standardne napake aritmetične sredine (SE, velik kvadrat) in aritmetične sredine ± standardni odkloni (SD, črta).

Scheffejev test: * $p < 0,05$ pri skupini na ASK v primerjavi s kontrolno skupino,

** $p < 0,001$ pri skupini na ASK in klopidogetrelu ter skupini na ASK in prasugrelu v primerjavi s kontrolno skupino.

Na sliki 6 so prikazane vrednosti agregacije trombocitov, izzvane z 11 $\mu\text{mol/L}$ ADP, pri vseh štirih skupinah preiskovancev. Agregacijo trombocitov smo določili z metodo optične agregometrije. Odstotek agregacije trombocitov smo izračunali iz vrednosti optične gostote (OG) na začetku in koncu merjenja v PRP in optično gostoto PPP. Z ANOVA-o smo ugotovili, da so se skupine pomembno razlikovale med seboj ($F = 48,74$; $p < 0,001$). Pri vseh treh skupinah bolnikov je bila agregacija trombocitov, izzvana z 11 $\mu\text{mol/L}$ ADP, pomembno nižja kot pri kontrolni skupini. Skupina bolnikov na ASK je imela v primerjavi s kontrolno skupino $p < 0,05$ (oznaka *). Obe skupini bolnikov na dvotirnem zdravljenju pa sta imeli v primerjavi s kontrolno skupino $p < 0,001$ (oznaka **). Zelo nizko agregacijo trombocitov smo izmerili pri obeh skupinah bolnikov na dvotirnem zdravljenju. Bolniki z ASK in klopidogetrelom in bolniki z ASK in prasugrelom so imeli pomembno nižjo

agregacijo trombocitov v primerjavi z bolniki, ki so bili zdravljeni samo z ASK (oba $p < 0,001$, oznaka ##). Slednja skupina na dvotirnem zdravljenju se je pomembno razlikovala tudi od skupine z ASK in klopidogetrom ($p < 0,001$, oznaka ++).



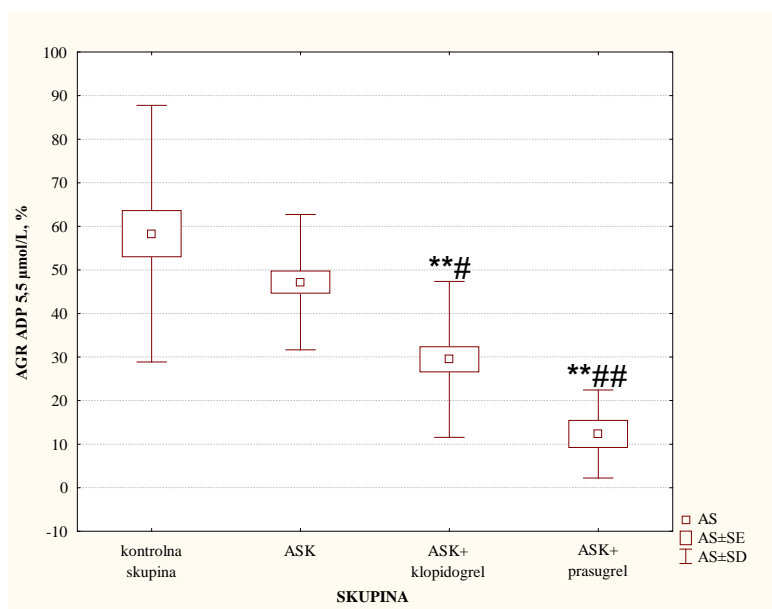
Slika 6: Agregacija trombocitov, izzvana z 11 µmol/L ADP

Na sliki je prikazana agregacija trombocitov (%), izzvana z 11 µmol/L ADP, pri kontrolni skupini in skupinah ASK, ASK + klopidogetrel, ASK + prasugrel. Prikazane so aritmetične sredine (AS, majhen kvadrat), aritmetične sredine ± standardne napake aritmetične sredine (SE, velik kvadrat) in aritmetične sredine ± standardni odkloni (SD, črta).

Scheffejev test: * $p < 0,05$ v primerjavi s kontrolno skupino. ** $p < 0,001$ v primerjavi s kontrolno skupino, ## $p < 0,001$ v primerjavi s skupino na ASK, ++ $p < 0,001$ v primerjavi s skupino na ASK in klopidogetrelu.

Podobne rezultate kot pri agregaciji trombocitov, izzvani z 11 µmol/L ADP, smo ugotovili pri agregaciji trombocitov, izzvani s 5,5 µmol/L ADP, čeprav razlike med skupinama niso bile tako izrazite (slika 7). Agregacijo trombocitov smo določili z metodo optične agregometrije. Odstotek agregacije trombocitov smo izračunali iz vrednosti optične gostote (OG) na začetku in koncu merjenja v PRP in optično gostoto PPP. Vse štiri skupine so se pomembno razlikovale med seboj (ANOVA, $F = 18,29$; $p < 0,001$), vendar pa med kontrolno skupino in bolniki z ASK ni bilo pomembne razlike. Bolniki na dvotirnem

zdravljenju so se pomembno razlikovali od kontrolne skupine ($p < 0,001$, oznaka **). Bolniki na dvotirnem zdravljenju pa so se razlikovali od bolnikov na ASK po pomembno nižji agregaciji trombocitov ($p < 0,05$ pri skupini na ASK in klopidogetu (oznaka #), $p < 0,001$ pri skupini na ASK in prasugretu (oznaka ##)).



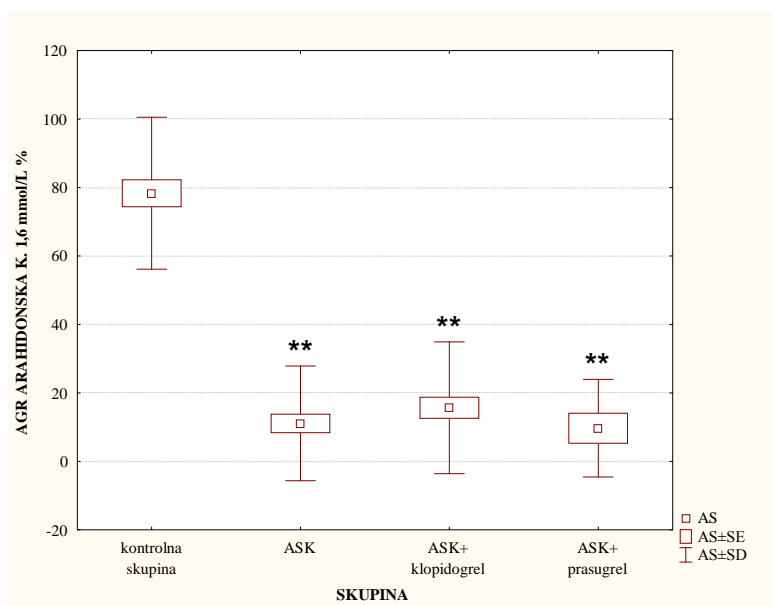
Slika 7: Agregacija trombocitov, izzvana s 5,5 µmol/L ADP

Na sliki je prikazana agregacija trombocitov (%), izzvana s 5,5 µmol/L ADP, pri kontrolni skupini in skupinah ASK, ASK + klopidoget, ASK + prasugret. Prikazane so aritmetične sredine (majhen kvadrat), aritmetične sredine ± standardne napake aritmetične sredine (velik kvadrat) in aritmetične sredine ± standardni odkloni (črta), standardni odkloni (SD, črta).

Scheffejev test: kontrolna skupina se pomembno razlikuje od skupine: ASK + klopidoget in skupine: ASK + prasugret, ** $p < 0,001$. Skupini: ASK + klopidoget in ASK + prasugret se pomembno razlikujeta od skupine ASK, # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$.

Na sliki 8 so prikazane vrednosti agregacije trombocitov, izzvane z 1,6 mmol/L arahidonske kisline, pri vseh štirih skupinah preiskovancev. Agregacijo trombocitov smo določili z metodo optične agregometrije. Odstotek agregacije trombocitov smo izračunali iz vrednosti optične gostote (OG) na začetku in koncu merjenja v PRP in optično gostoto PPP. Ugotovili smo pomembne razlike med skupinami (ANOVA, $F = 86,86$; $p < 0,001$). Pri vseh treh skupinah bolnikov je bila agregacija trombocitov, izzvana z 1,6 mmol/L

arahidonsko kislino, pomembno nižja kot pri kontrolni skupini (vsi $p < 0,001$, oznaka **), med skupinami bolnikov pa ni bilo pomembnih razlik.



Slika 8: Agregacija trombocitov, izzvana z 1,6 mmol/L arahidonsko kislino

Na sliki je prikazana agregacija trombocitov (%), izzvana z 1,6 mmol/L arahidonsko kislino, pri kontrolni skupini in skupinah ASK, ASK + klopidogetrel, ASK + prasugrel. Prikazane so aritmetične sredine (AS, majhen kvadrat), aritmetične sredine \pm standardne napake aritmetične sredine (SE, velik kvadrat) in aritmetične sredine \pm standardni odkloni (SD, črta).

Scheffejev test: kontrolna skupina se pomembno razlikuje od skupine ASK, skupine ASK + klopidogetrel in skupine ASK + prasugrel. ** $p < 0,001$ v primerjavi s kontrolno skupino.

4.3. ZAPIRALNI ČASI PRI SKUPINAH BOLNIKOV Z ZAVIRALCI AGREGACIJE TROMBOCITOV

Analizirali smo agregacijo trombocitov z metodo merjenja zapiralnega časa pri kontrolni skupini in bolnikih na zdravljenju z zaviralci agregacije trombocitov (ASK, ASK in klopidogetrelom ter ASK in prasugrelom). Zapiralne čase smo izmerili v merilni celici s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI), kolagenom in ADP (KOL/ADP) ter v celici za merjenje antagonistov receptorjev P2Y (P2Y). Rezultate zapiralnega časa smo podali v sekundah.

V tabeli 3 in na slikah 9–11 so prikazane vrednosti zapiralnega časa pri kontrolni skupini ter pri bolnikih na zdravljenju z zaviralci agregacije trombocitov.

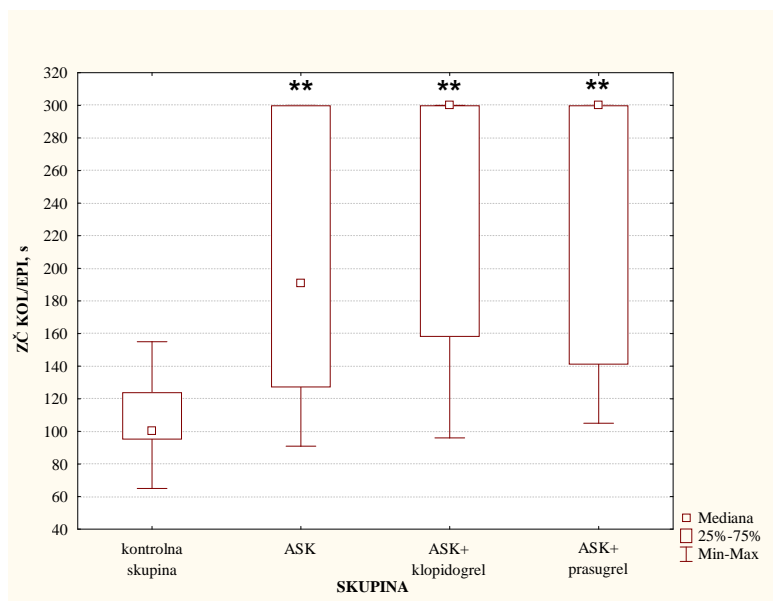
Tabela 3: Vrednosti zapiralnih časov

V tabeli so prikazane vrednosti zapiralnih časov (mediana in razpon med 1. in 3. kvartilom) pri kontrolni skupini in pri bolnikih z zaviralci agregacije trombocitov: skupine ASK, ASK + klopidogrel in ASK + prasugrel.

	Kontrolna skupina	ASK	ASK + klopidogrel	ASK + prasugrel
N	30	35	36	10
KOL/EPI	100 (95–124)	191** (127–300)	300** (158–300)	300** (141–300)
KOL/ADP	83 (73–90)	90 (80–111)	106** (91–136)	128** (112–300)
P2Y	65 (58–72)	67 (60–81)	97**# (71–300)	300*** (145–300)

Kruskal-Wallisov test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ v primerjavi s kontrolno skupino; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ v primerjavi s skupino z ASK.

Slika 9 prikazuje rezultate zapiralnih časov z merilno celico KOL/EPI pri kontrolni skupini in bolnikih. Agregacijo trombocitov smo določili z metodo merjenja zapiralnega časa. Zapiralne čase smo izmerili v merilni celici s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI). Rezultat zapiralnega časa smo podali v sekundah. Vse tri skupine bolnikov so imele pomembno daljše zapiralne čase kot kontrolna skupina (vse $p < 0,001$, oznaka **), med skupinami bolnikov pa ni bilo pomembnih razlik.

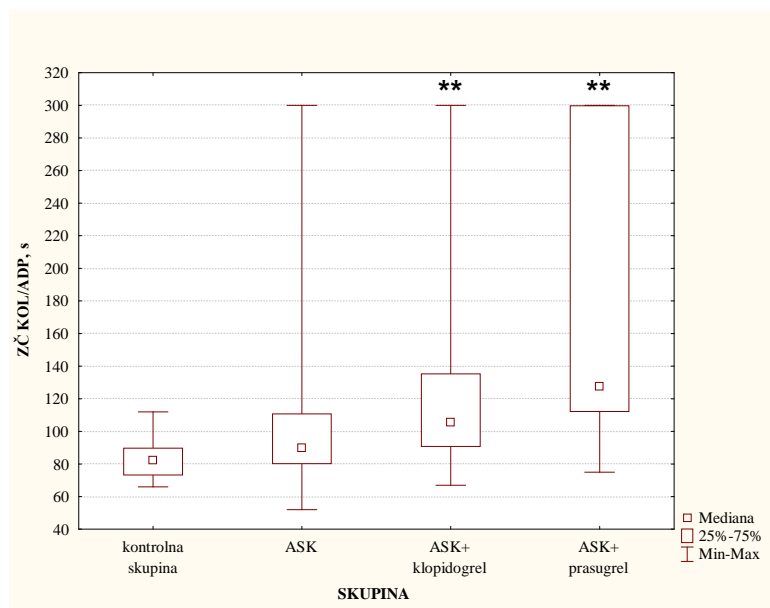


Slika 9: Zapiralni čas z merilno celico KOL/EPI

Slika prikazuje zapiralni čas (s) z merilno celico KOL/EPI pri kontrolni skupini in skupinah ASK, ASK + klopidogetrel, ASK + prasugrel. Prikazane so mediane vrednosti (majhen kvadrat), razpon med 1. in 3. kvartilom (velik kvadrat) ter razpon med najnižjo in najvišjo vrednostjo (črta).

Razlike med skupinami smo izračunali s pomočjo Kruskal-Wallisovega testa za neodvisne spremenljivke. Kontrolna skupina se pomembno razlikuje od skupine ASK, skupine ASK + klopidogetrel in skupine ASK + prasugrel. ** $p < 0,001$.

Zapiralni časi z merilno celico KOL/ADP so prikazani na sliki 10. Agregacijo trombocitov smo določili z metodo merjenja zapiralnega časa. Zapiralne čase smo izmerili v merilni celici s kolagenom in ADP (KOL/ADP). Rezultat zapiralnega časa smo podali v sekundah. Skupina bolnikov na zdravljenju z ASK se ni pomembno razlikovala od kontrolne skupine ($p = 0,15$), skupini bolnikov na dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogetrelom ter ASK in prasugrelom pa sta imeli pomembno daljše zapiralne čase (obe $p < 0,001$, oznaka **).



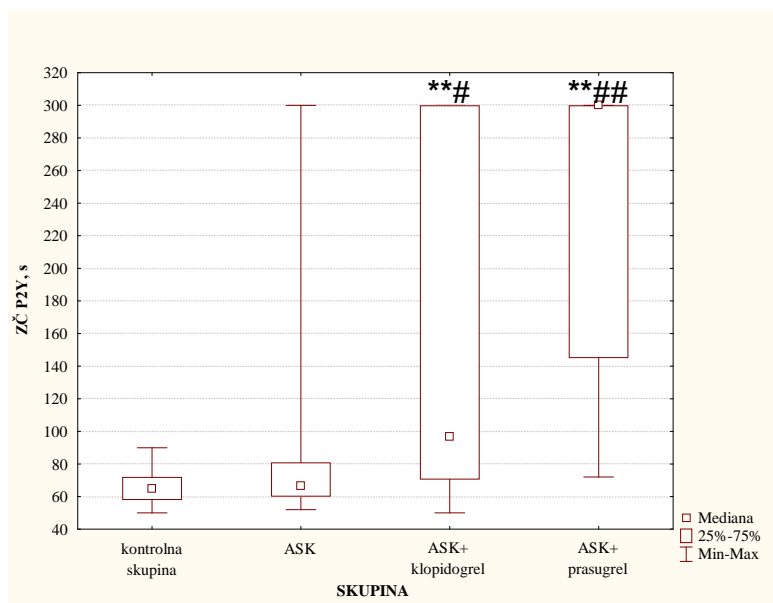
Slika 10: Zapiralni čas z merilno celico KOL/ADP

Slika prikazuje zapiralni čas (s) z merilno celico KOL/ADP pri kontrolni skupini in skupinah ASK, ASK + klopidogetrel, ASK + prasugrel. Prikazane so mediane sredine (majhen kvadrat), razpon med 1. in 3. kvartilom (velik kvadrat) ter razpon med najnižjo in najvišjo vrednostjo (črta).

Razlike med skupinami smo izračunali s pomočjo Kruskal-Wallisovega testa za neodvisne spremenljivke: kontrolna skupina se pomembno razlikuje od skupine ASK + klopidogetrel in skupine ASK + prasugrel (** p < 0,001).

Zapiralni časi z merilnimi celicami P2Y so prikazani na sliki 11. Agregacijo trombocitov smo določili z metodo merjenja zapiralnega časa. Zapiralne čase smo izmerili v merilni celici za merjenje antagonistov receptorjev P2Y (P2Y). Rezultat zapiralnega časa smo podali v sekundah.

Skupina bolnikov na ASK se ni pomembno razlikovala od kontrolne skupine (p = 1,00), skupini bolnikov na dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogetrelom ter ASK in prasugrelom pa sta imeli pomembno daljše zapiralne čase od kontrolne skupine (obe p < 0,001, oznaka **). Ti dve skupini bolnikov sta se tudi pomembno razlikovali od skupine bolnikov, ki je bila zdravljena samo z ASK (p < 0,05 za dvotirno zdravljenje z ASK in klopidogetrelom (oznaka #) ter p < 0,001 za dvotirno zdravljenje z ASK in prasugrelom (oznaka ##)).



Slika 11: Zapiralni čas z merilno celico P2Y

Na sliki je prikazan zapiralni čas (s) z merilno celico P2Y pri kontrolni skupini in skupinah ASK, ASK + klopidogetrel, ASK + prasugrel. Prikazane so mediane sredine (majhen kvadrat), razpon med 1. in 3. kvartilom (velik kvadrat) ter razpon med najnižjo in najvišjo vrednostjo (črta).

Razlike med skupinami smo izračunali s pomočjo Kruskal-Wallisovega testa za neodvisne spremenljivke: ** $p < 0,001$ v primerjavi s kontrolno skupino, # $p < 0,05$ v primerjavi s skupino ASK, ## $p < 0,001$ v primerjavi s skupino ASK.

4.4. NEODZIVNOST NA ZAVIRALCE AGREGACIJE TROMBOCITOV

Določili smo delež bolnikov s koronarno boleznijo, ki se zdravijo s zaviralci agregacije trombocitov (ASK ter kombinacijo ASK s klopidogetrelom in prasugrelom) in so neodzivni na to zdravljenje. Razlike v številu neodzivnih bolnikov smo testirali s Hi-kvadrat testom. Agregacijo trombocitov smo pri metodi optične agregometrije izzvali s kolagenom (KOL), adenozin difosfatom (ADP) in arahidonsko kislino (ARAH), zapiralne čase pa smo merili v merilni celici s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI), kolagenom in ADP (KOL/ADP) ter v celici za merjenje antagonistov receptorjev P2Y (P2Y).

Pri bolnikih, ki so prejeli zaviralce agregacije trombocitov, smo pričakovali, da se bo agregacija trombocitov, izzvana z različnimi agonisti, zmanjšala. Če je agregacija

trombocitov pri določenem bolniku ostala v mejah referenčnih vrednosti, smo to opredelili kot neodzivnost na zaviralce agregacije trombocitov. Analogno temu smo pri zapiralnih časih pričakovali, da se bodo le-ti pri bolnikih z zaviralci agregacije trombocitov podaljšali. Če so ti časi ostali pri določenem bolniku v mejah referenčnih vrednosti, smo menili, da je bolnik neodziven na zaviralce agregacije trombocitov. V tabeli 4 sta prikazana število in odstotek bolnikov, ki so bili neodzivni. Pri merjenju agregacije trombocitov s kolagenom in ADP je bil odstotek neodzivnih bolnikov na ASK sorazmerno visok (23–97 %). Neodzivnih bolnikov je bilo manj pri dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogrelom (8–80%) ter ASK in prasugrelom (0–50%). Skoraj vsi bolniki pa so bili odzivni na zaviralce agregacije trombocitov, merjeno z metodo optične agregometrije z arahidonsko kislino (0–6% neodzivnih bolnikov).

Podobne rezultate smo dobili z merjenjem zapiralnega časa. Merjeno z vsemi tremi merilnimi celicami je bilo med bolniki z ASK največ neodzivnih bolnikov (34–86%). Pri bolnikih, ki so jemali ASK in klopidogrel, je bilo neodzivnih 22–53%, pri bolnikih z ASK in prasugrelom pa samo 10–30% (tabela 4).

Tabela 4: Število in odstotek neodzivnih bolnikov

Število (N) in odstotek (%) neodzivnih bolnikov na zaviralce agregacije trombocitov: ASK, dvotirno zdravljenje ASK/klopidogrel ter ASK/prasugrel.

	ASK		ASK + klopidogrel		ASK + prasugrel	
	N = 35		N = 36		N = 10	
	N	%	N	%	N	%
Agregacija (%)						
KOL (11 mg/L)	25	71	23	64	5	50
KOL (5,5 mg/L)	8	23	3	8	0	0
ADP (11 µmol/L)	31	88	15	41	0	0
ADP (5,5 µmol/L)	34	97	29	80	3	30
ARAH (1,6 mmol/L)	0	0	2	6	0	0
Zapiralni čas (s)						
KOL/EPI	12	34	8	22	3	30
KOL/ADP	23	66	19	53	2	20
P2Y	30	86	17	47	1	10

V raziskavi smo pri bolnikih na dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogrelom določili z metodo optične agregometrije v povprečju neodzivnost pri 40 % bolnikov (6–80 %, odvisno od vrste in koncentracije agonista), z merjenjem zapiralnega časa smo določili v povprečju neodzivnost pri 41 % bolnikov (22–53 %, odvisno od vrste merilne celice). Pri bolnikih na dvotirnem zdravljenju z ASK in prasugrelom smo z metodo optične agregometrije določili povprečno neodzivnost pri 16 % bolnikov (0–50 %, odvisno od vrste in koncentracije agonista), z metodo merjenja zapiralnega časa smo opredelili v povprečju neodzivnost pri 20 % bolnikov (10–30 %, odvisno od vrste merilne celice) (tabela 4).

4.5. UJEMANJE METOD

Analizirali smo ujemanje metod optične agregometrije in zapiralnega časa glede prepoznavanja oseb, ki so neodzivne na zaviralce agregacije trombocitov. Ujemanje metod smo izračunali s pomočjo koeficienta kapa v posameznih skupinah. Izračunani koeficienti kapa so prikazani v tabelah 5–7.

Pri vseh treh skupinah bolnikov smo določili slabo do precejšnje ujemanje metod. V skupini bolnikov na zdravljenju z ASK smo določili zmerno ujemanje med metodama merjenja zapiralnega časa z merilno celico P2Y in agregacijo trombocitov z agonisti: kolagen 11 mg/L (koeficient kapa: 0,259), ADP 11 $\mu\text{mol/L}$ (koeficient kapa: 0,364) in ADP 5,5 $\mu\text{mol/L}$ (koeficient kapa: 0,300) (tabela 5). V skupini zdravljeni z ASK in klopidogetrom smo ugotovili zmerno ujemanje med metodo merjenja zapiralnega časa z merilno celico KOL/ADP in agregacijo trombocitov z agonistom ADP 11 $\mu\text{mol/L}$ (koeficient kapa: 0,339). Ujemanje metod merjenja zapiralnega časa z merilno celico P2Y in agregacijo trombocitov z agonistom ADP 11 $\mu\text{mol/L}$ je bilo precejšnje (koeficient kapa: 0,439), z agonistom ADP 5,5 $\mu\text{mol/L}$ (koeficient kapa: 0,220) pa zmerno (tabela 6). V skupini, zdravljeni z ASK in prasugrelom, smo ugotovili zmerno ujemanje med metodama merjenja zapiralnega časa z merilno celico KOL/ADP in agregacijo trombocitov s kolagenom 11 mg/L (koeficient kapa: 0,400) in z ADP 5,5 $\mu\text{mol/L}$ (koeficient kapa: 0,211). Precejšnje ujemanje smo določili med metodama merjenja zapiralnega časa z merilno celico P2Y in agregacijo trombocitov z ADP 5,5 $\mu\text{mol/L}$ (koeficient kapa: 0,412) (tabela 7).

V tabeli 5 je prikazano ujemanje metod (koeficienti kapa) v skupini, zdravljeni z ASK. Optično agregometrijo smo merili z različnimi agonisti (kolagen: KOL, adenozin difosfat: ADP, arahidonska kislina: ARAH), zapiralni čas pa v merilni celici s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI), kolagenom in ADP (KOL/ADP) ter v celici za merjenje antagonistov receptorjev P2Y (P2Y). Ujemanje metod smo izračunali s pomočjo koeficienta kapa. V skupini bolnikov na zdravljenju z ASK je bilo ujemanje med metodama slabo do zmerno. Koeficient kapa je znašal od $-0,058$ do 0,364. Zmerno ujemanje smo določili med metodama merjenja zapiralnega časa z merilno celico P2Y in

agregacijo trombocitov z agonisti: kolagen 11 mg/L (koeficient kapa: 0,259), ADP 11 μ mol/L (koeficient kapa: 0,364) in ADP 5,5 μ mol/L (koeficient kapa: 0,300).

Tabela 5: Ujemanje metod optične agregometrije in zapiralnega časa v skupini ASK. Prikazano je ujemanje metod (koeficient kapa) optične agregometrije (AGR) in zapiralnega časa (ZČ) v skupini, zdravljeni z ASK.

	AGR KOL (11 mg/L) (95 % IZ)	AGR KOL (5,5 mg/L) (95 % IZ)	AGR ADP (11 μ mol/L) (95 % IZ)	AGR ADP (5,5 μ mol/L) (95 % IZ)	AGR ARAH (1,6 mmol/L) (95 % IZ)
ZČ KOL/EPI (s)	0,046 (0–0,336)	0,035 (0–0,427)	0,126 (0–0,392)	0,030 (0–0,277)	0 (0–0,459)
ZČ KOL/ADP (s)	–0,045 (–0,422–0,332)	–0,029 (–0,325–0,266)	–0,017 (–0,429–0,396)	–0,055 (–0,539–0,429)	0 (0–0,255)
ZČ P2Y (s)	0,259 (0–0,676)	0,074 (0–0,295)	0,364 (0–0,880)	0,300 (0–0,946)	–0,058 (–0,218–0,101)

IZ – interval zaupanja.

Koeficient kapa, manjši od 0,2, smo vzeli za slabo, koeficient kapa 0,21–0,40 za zmerno, koeficient kapa 0,41–0,60 za precejšnje, koeficient kapa 0,61–0,80 za dobro in koeficient kapa 0,81–1,00 za zelo dobro ujemanje.

V tabeli 6 je prikazano ujemanje metod (koeficienti kapa) v skupini, zdravljeni z ASK in klopidogetrelom. Optično agregometrijo smo merili z različnimi agonisti (kolagen: KOL, adenozin difosfat: ADP, arahidonska kislina: ARAH), zapiralni čas pa v merilni celici s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI), kolagenom in ADP (KOL/ADP) ter v celici za merjenje antagonistov receptorjev P2Y (P2Y). Ujemanje metod smo izračunali s pomočjo koeficienta kapa. Izračunali smo slabo do precejšnje ujemanje med metodama zapiralnega časa in agregacijo trombocitov, koeficient kapa je znašal od –0,251 do 0,439. Zmerno ujemanje smo določili med metodo merjenja zapiralnega časa z merilno celico KOL/ADP

in agregacijo trombocitov z agonistom ADP 11 $\mu\text{mol/L}$ (koeficient kapa: 0,339). Ujemanje metod merjenja zapiralnega časa z merilno celico P2Y in agregacijo trombocitov z agonistom ADP 11 $\mu\text{mol/L}$ je bilo precejšnje (koeficient kapa: 0,439), z agonistom ADP 5,5 $\mu\text{mol/L}$ (koeficient kapa: 0,220) pa zmerno.

Tabela 6: Ujemanje metod optične agregometrije in zapiralnega časa v skupini ASK in klopidogetrel

V tabeli je prikazano ujemanje metod (koeficient kapa) optične agregometrije (AGR) in zapiralnega časa (ZČ) v skupini, zdravljeni z ASK in klopidogetrelom.

	AGR KOL (11 mg/L) (95 % IZ)	AGR KOL (5,5 mg/L) (95 % IZ)	AGR ADP (11 $\mu\text{mol/L}$) (95 % IZ)	AGR ADP (5,5 $\mu\text{mol/L}$) (95 % IZ)	AGR ARAH (1,6 mmol/L) (95 % IZ)
ZČ KOL/EPI (s)	0,060 (0–0,351)	0 (0–0,493)	0,118 (0–0,459)	0,083 (0–0,336)	0,100 (0–0,609)
ZČ KOL/ADP (s)	0,097 (0–0,427)	0,111 (0–0,436)	0,339 (0,034– 0,645)	0,195 (0–0,525)	0,044 (0–0,356)
ZČ P2Y (s)	–0,032 (–0,333– 0,270)	–0,251 (–0,660– 0,158)	0,439 (0,144– 0,735)	0,220 (0–0,521)	–0,055 (–0,420– 0,309)

IZ – interval zaupanja.

Koeficient kapa, manjši od 0,2, smo vzeli za slabo, koeficient kapa 0,21–0,40 za zmerno, koeficient kapa 0,41–0,60 za precejšnje, koeficient kapa 0,61–0,80 za dobro in koeficient kapa 0,81–1,00 za zelo dobro ujemanje.

V tabeli 7 je prikazano ujemanje metod (koeficienti kapa) v skupini, zdravljeni z ASK in prasugrelom. Optično agregometrijo smo merili z različnimi agonisti (kolagen: KOL, adenzin difosfat: ADP, arahidonska kislina: ARAH), zapiralni čas pa v merilni celici s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI), kolagenom in ADP (KOL/ADP) ter v celici za merjenje antagonistov receptorjev P2Y (P2Y). Ujemanje metod smo izračunali s pomočjo koeficienta kapa. Ugotovili smo slabo do precejšnje ujemanje med metodama zapiralnega časa in agregacijo trombocitov z vsemi tremi agonisti v različnih koncentracijah; koeficient

kapa je znašal med $-0,154$ do $0,412$. Zmerno ujemanje smo določili med metodama merjenja zapiralnega časa z merilno celico KOL/ADP in agregacijo trombocitov s kolagenom 11 mg/L (koeficient kapa: $0,400$) in z ADP $5,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$ (koeficient kapa: $0,211$). Precejšnje ujemanje smo ugotovili med metodama merjenja zapiralnega časa z merilno celico P2Y in agregacijo trombocitov z ADP $5,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$ (koeficient kapa: $0,412$).

Tabela 7: Ujemanje metod optične agregometrije in zapiralnega časa v skupini ASK in prasugrel

Ujemanje metod (koeficient kapa) optične agregometrije (AGR) in zapiralnega časa (ZČ) v skupini, zdravljeni z ASK in prasugrelom.

	AGR KOL (11 mg/L) (95 % IZ)	AGR KOL ($5,5 \text{ mg/L}$) (95 % IZ)	AGR ADP ($11 \text{ } \mu\text{mol/L}$) (95 % IZ)	AGR ADP ($5,5 \text{ } \mu\text{mol/L}$) (95 % IZ)	AGR ARAH ($1,6 \text{ mmol/L}$) (95 % IZ)
ZČ KOL/EPI (s)	0,200 (0–0,807)	$-0,154$ ($-1,246$ – $0,939$)	$-0,154$ ($-1,246$ – $0,939$)	0,048 (0–0,771)	0 (0–0,947)
ZČ KOL/ADP (s)	0,400 (0–0,968)	0 (0–1)	0 (0–1)	0,211 (0–0,958)	0 (0–1)
ZČ P2Y (s)	0,200 (0–0,807)	0 (0–1)	0 (0–1)	0,412 (0–1)	0 (0–1)

IZ – interval zaupanja

Koeficient kapa, manjši od $0,2$, smo vzeli za slabo, koeficient kapa $0,21$ – $0,40$ za zmerno, koeficient kapa $0,41$ – $0,60$ za precejšnje, koeficient kapa $0,61$ – $0,80$ za dobro in koeficient kapa $0,81$ – $1,00$ za zelo dobro ujemanje.

5. RAZPRAVA

S pričujočo raziskavo smo pri kontrolni skupini najprej določili referenčne vrednosti za metodi optične agregometrije in merjenja zapiralnega časa, da bi ugotovili, kako je delovanje trombocitov zavrto pri bolnikih s koronarno beloznijo, ki so prejeli zaviralce agregacije trombocitov. Namen naloge je bil ugotoviti, koliko bolnikov bo neodzivnih na ta zdravila in v kolikšni meri se metodi merjenja delovanja trombocitov ujemata pri ugotavljanju neodzivnosti na zaviralce agregacije trombocitov. Določili smo delež neodzivnih bolnikov s koronarno boleznijo na zdravljenje s zaviralci agregacije trombocitov (ASK ter kombinacija ASK s klopidogrelom in prasugrelom) (tabela 4). Razlike v številu neodzivnih bolnikov smo testirali s Hi-kvadrat testom. Agregacijo trombocitov smo pri metodi optične agregometrije izzvali s kolagenom (KOL), adenozin difosfatom (ADP) in arahidonsko kislino (ARAH), zapiralne čase pa smo merili v merilni celici s kolagenom in epinefrinom (KOL/EPI), kolagenom in ADP (KOL/ADP) ter v celici za merjenje antagonistov receptorjev P2Y (P2Y). Ugotovili smo, da je bil delež neodzivnih bolnikov odvisen od uporabljene metode in koncentracije agonista (tabela 4). Pri bolnikih, ki so prejeli ASK, je to zdravilo povzročilo znižanje agregacije z ADP in arahidonsko kislino, ne pa s kolagenom (tabela 2). Dvotirno zdravljenje z ASK in klopidogrelom oziroma prasugrelom je povzročilo znižanje agregacije z uporabo vseh treh agonistov (ADP, kolagen in arahidonska kislina) (tabela 2). Pri merjenju zapiralnega časa je ASK podaljšala zapiralni čas, izmerjen v merilni celici kolagen/epinefrin, ne pa v merilnih celicah kolagen/ADP in P2Y (tabela 3). Dvotirno zdravljenje z ASK in klopidogrelom oziroma prasugrelom pa je podaljšalo zapiralne čase v vseh treh merilnih celicah (tabela 3). Ujemanje med obema uporabljenima metodama je bilo slabo, v najboljšem primeru zmerno, in sicer odvisno od vrste zaviralcev agregacije trombocitov, ki so jih prejeli bolniki, in od metode merjenja delovanja trombocitov (tabele 5–7).

Metodologija agregometrije z merjenjem prepustnosti svetlobe se pogosto uporablja tako v kliničnih kot tudi raziskovalnih laboratorijih (80). Zahteva relativno veliko količino krvi, potrebna je takojšnja analiza vzorca, rezultat je zelo odvisen od priprave vzorca, od analitičnega postopka, metoda je dolgotrajna in draga (visok strošek za agregometer), ne upošteva vloge eritrocitov in vpliva strižnih sil, ki pa *in vivo* pomembno vplivata na

agregacijo trombocitov (81). Slabost metode agregacije trombocitov je v tem, da poteka v nefizioloških pogojih, ker meri samo delovanje trombocitov in ne njihove interakcije z drugimi krvnimi celicami. Poteka v mirujoči plazmi, kar ne ustreza razmeram v telesu, kjer se kri pretaka. Na rezultat agregacije trombocitov vplivajo tudi hitrost mešanja vzorca, optična geometrija in kalibracija agregometra. Rezultati med različnimi laboratoriji so slabo primerljivi zaradi uporabe različnih analizatorjev, priprave vzorcev, antikoagulantnih sredstev, vrste in koncentracije agonistov, ki sprožijo agregacijo (74). To so razlogi, da je standardizacija metode nujno potrebna. Ker metoda ni standardizirana, mora vsak laboratorij določiti svoje lastne referenčne vrednosti. Zato smo v prvi fazi naše raziskave ugotovili te vrednosti pri kontrolni skupini in razpon med 5. in 95. percentilom teh vrednosti vzeli kot referenčne vrednosti (tabela 1). Naše referenčne vrednosti, prikazane v tabeli 1, smo primerjali z objavljenimi. V podobni raziskavi so določili normalne vrednosti za agregacijo trombocitov s kolagenom 11mg/L 69 do 97 % (36), mi pa 76 do 93 % (tabela 1). Referenčne vrednosti za agregacijo trombocitov z ADP 11 $\mu\text{mol/L}$ so določili 69 do 93 % (36), v naši raziskavi pa smo določili nižje vrednosti, in sicer 45 do 92 % (tabela 1). Referenčne vrednosti za agregacijo trombocitov z arahidonsko kislino 1,6 mmol/L 79 do 99 % (36), z našo raziskavo pa nekoliko nižje, tj. 76 do 92 % (tabela 1).

V več raziskavah so primerjali različne izvedbe optične agregometrije. Testirali so vpliv stabilizacije PRP tako, da so merili agregacijo takoj po odvzemu krvi napram časovnemu zamiku 30–45 minut po odvzemu krvi (74). 30-minutna stabilizacija PRP ni imela pomembnega vpliva na maksimalno agregacijo, inducirano z ADP, arahidonsko kislino in kolagenom (82). Priporočilo je, da se merjenje agregacije trombocitov izvede znotraj 2–3 ur po odvzemu krvi (74, 75). Vprašanje je tudi, ali se število trombocitov v PRP prilagaja ali ne na $230\text{--}270 \times 10^9/\text{L}$, (26, 74), ker naj bi bila agregacija *in vitro* odvisna od števila trombocitov v PRP. Raziskava na zdravih preiskovancih je pokazala, da ni pomembnih razlik pri neprilagojenem številu trombocitov v PRP ($290\text{--}640 \times 10^9/\text{L}$ v primerjavi s prilagojenim, če so agregacijo inducirali z arahidonsko kislino, ADP in kolagenom (82). Ti rezultati se ujemajo tudi s predhodnimi študijami (74, 33, 83). Prilagoditev PRP glede na število trombocitov ne daje bistvenih prednosti, je časovno zamudna in nepotrebna (83). PRP z neprilagojenim številom trombocitov pomeni tudi manj manipulacije s trombociti in zato bolje odraža *in vivo* situacijo. V naši raziskavi števila trombocitov v PRP-plazmi nismo prilagajali.

V nasprotju z optično agregometrijo so meritve zapiralnega časa standardizirane, ker vsi uporabljamo enake merilne celice istega proizvajalca. Zapiralni čas je čas, v katerem trombociti iz vzorca, ki teče skozi ozko kapilarno merilne celice, zaprejo odprtino v membrani merilne celice, ki je prevlečena s trombocitnimi agonisti določene koncentracije. Referenčne vrednosti zapiralnega časa je določil proizvajalec merilnih celic. Proizvajalčeve referenčne vrednosti zapiralnega časa z merilno celico KOL/EPI znašajo 82 do 150 sekund, z merilno celico KOL/ADP 62 do 100 sekund in z merilno celico P2Y manj kot 106 sekund (84, 85). Kljub temu da je metoda standardizirana in uporabljamo enake merilne celice, nismo določili popolnoma enakih referenčnih vrednosti. V naši raziskavi smo določili referenčne vrednosti (razpon med 5. in 95. percentilom) zapiralnega časa z merilno celico KOL/EPI nekoliko višje v primerjavi s proizvajalčevimi (88 do 151 sekund) (tabela 1). Tudi referenčne vrednosti zapiralnega časa z merilno celico KOL/ADP smo določili malo višje v primerjavi s proizvajalčevimi (70 do 109 sekund) (tabela 1). Referenčne vrednosti zapiralnega časa z merilno celico P2Y pa smo določili nekoliko nižje v primerjavi s proizvajalčevimi (50 do 88 sekund) (tabela 1). Podobne rezultate kot naša raziskava je pokazala raziskava, v kateri so preučevali variabilnost preiskav delovanja trombocitov, kjer so določili normalne vrednosti za metodo zapiralnega časa z merilno celico KOL/EPI 71 do 163 sekund, kar je nekoliko širše območje v primerjavi z našo raziskavo (36). Z merilno celico KOL/ADP so določili normalne vrednosti 60 do 124 sekund, spodnjo mejo nižje, zgornjo mejo pa višje kot v naši raziskavi (36). V raziskavi, ki je preučevala uporabnost spremljanja antagonistov receptorja ADP, so določili normalne vrednosti za metodo zapiralnega časa z merilno celico P2Y 44 do 96 sekund, kar je nekoliko višje kot v naši raziskavi (86).

Kot smo pričakovali, je bila agregacija trombocitov, merjena z optično agregometrijo, pomembno nižja pri vseh treh skupinah bolnikov z zaviralci agregacije trombocitov ne glede na to, kateri agonist agregacije smo uporabili (tabela 2). Pomembno nižja od agregacije trombocitov pri bolnikih z ASK je bila agregacija trombocitov pri bolnikih na dvotirnem zdravljenju, če smo agregacijo izzvali z ADP (tabela 2). Klopido­grel in prasugrel sta antagonist – ireverzibilna inhibitorja trombocitnih receptorjev za ADP – zato je bil ta rezultat tudi pričakovan.

Podobno kot pri metodi optične agregometrije so bili zapiralni časi bolnikov na zaviralcih agregacije trombocitov pomembno daljši kot pri kontrolni skupini, a le če smo uporabili merilno celico KOL/EPI (tabela 3). Naši rezultati so pričakovani, saj merilni celici KOL/ADP in P2Y nista občutljivi na učinke ASK. Pri merjenju zapiralnih časov s slednjima merilnima celicama pa smo ugotovili pomembno daljše čase pri obeh skupinah bolnikov na dvotirnem zdravljenju (tabela 3). Naše meritve potrjujejo tudi podatki proizvajalca merilnih celic za zapiralni čas ter raziskava pri 70 zdravih prostovoljcih, kjer so dokazali, da se že pri enkratnem zaužitju ASK zapiralni čas, izmerjen z merilno celico KOL/EPI, statistično značilno podaljša, zapiralni čas, izmerjen z merilno celico KOL/ADP, pa se ne spremeni (72).

V raziskavi so preučevali znižanje trombocitne aktivacije pri bolnikih z arterijsko aterosklerozo na zdravljenju z zaviralci agregacije trombocitov (ASK, klopidogrel, dvotirno zdravljenje z ASK in klopidogrelom) z metodo merjenja zapiralnega časa (23). Zapiralni čas z merilno celico KOL/EPI je bil pri bolnikih na zdravljenju samo z ASK in dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogrelom podaljšan v primerjavi z zdravljenjem samo s klopidogrelom. Zapiralni čas z merilno celico KOL/ADP je bil podaljšan pri bolnikih na dvotirnem zdravljenju v primerjavi z bolniki, ki so bili na zdravljenju samo z ASK ($p = 0,0009$) ali klopidogrelom ($p = 0,0074$) (23). V raziskavi pri 35 bolnikih s stabilno koronarno boleznijo, ki so bili na dvotirnem zdravljenju s klopidogrelom in ASK, so ugotovili, da je merilna celica P2Y občutljiva na inhibicijo receptorja P2Y₁₂ (87).

Z našo raziskavo smo ugotavljali delež bolnikov s koronarno boleznijo, ki se zdravijo z zaviralci agregacije trombocitov in so bili neodzivni na zdravljenje (tabela 4). Za opredelitev neodzivnosti na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov smo uporabili lastne referenčne vrednosti (tabela 1). Pri bolnikih, ki so prejeli zaviralce agregacije trombocitov, smo pričakovali, da se bo agregacija trombocitov, izzvana z različnimi agonisti, zmanjšala. Kadar je bila agregacija trombocitov pri določenem bolniku v mejah referenčnih vrednosti (tabela 1), smo bolnika obravnavali kot neodzivnega na zaviralce agregacije trombocitov. Ker metoda optične agregometrije ni standardizirana in rezultati iz različnih laboratorijev niso primerljivi, bi bilo nesmiselno določiti univerzalno mejno vrednost trombocitne agregacije za opredelitev neodzivnosti na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov (8). Pri metodi optične agregometrije je glede na vrsto in koncentracijo agonista odziv agregacije le delno in variabilno moduliran preko TxA₂, ki se

sintetizira iz arahidonske kisline ali ADP, ki se sprosti iz trombocitnih granul. Pri uporabi dveh specifičnih trombocitnih agonistov, arahidonske kisline za spremljanje zdravljenja z ASK in ADP za spremljanje zdravljenja s tienopiridini, lahko rezultati s to metodo precenijo incidenco neodzivnosti na zaviralce agregacije trombocitov (8).

Analogno rezultatom optične agregometrije smo tudi pri zapiralnih časih pričakovali, da se bo čas pri bolnikih na zdravljenju z zaviralci agregacije trombocitov podaljšal. Kadar je bil zapiralni čas pri določenem bolniku v mejah referenčnih vrednosti, smo opredelili, da je bolnik neodziven na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov.

Neodzivnost na ASK

Pri merjenju agregacije trombocitov smo določili sorazmerno visok odstotek neodzivnih bolnikov (0–97 %) (tabela 4). Skoraj vsi bolniki pa so bili odzivni na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov, merjeno z agregacijo trombocitov z arahidonsko kislino (0–6 % neodzivnih bolnikov) (tabela 4). Ker je bilo pri tem agonistu zelo malo neodzivnih bolnikov, smo iz tega lahko sklepali, da je agregacija, izzvana z arahidonsko kislino, najbolj občutljiva na učinke ASK. V naši raziskavi smo določili z merjenjem zapiralnega časa z vsemi tremi merilnimi celicami med bolniki na ASK 34–86% neodzivnih bolnikov (tabela 4).

Z rezultati te raziskave smo potrdili našo hipotezo, da bomo pri bolnikih na zdravljenju z ASK ugotovili največ 60 % neodzivnih bolnikov. V povprečju smo določili 56 % neodzivnih bolnikov z metodo agregometrije (23–97 %, odvisno od vrste in koncentracije agonista), kar se sklada z našimi pričakovanji, in 62 % z metodo merjenja zapiralnega časa (34–86 %, odvisno od vrste merilne celice), kar nekoliko odstopa od naših pričakovanj (tabela 4).

Podobne rezultate kot naša raziskava je pokazala raziskava, v kateri so preučevali variabilnost preiskav delovanja trombocitov. Ugotovili so, da ASK pomembno zniža agregacijo trombocitov, izzvano z ADP in arahidonsko kislino, in pomembno podaljša zapiralni čas v KOL/EPI merilni celici, nima pa pomembnega vpliva na trombocitno agregacijo, inducirano s kolagenom, in zapiralni čas v merilni celici KOL/ADP (92). Agregacija trombocitov, inducirana z arahidonsko kislino, je najbolj občutljiva preiskava za merjenje vpliva ASK na trombocitno delovanje (92). Vpliv ASK na trombocitno agregacijo, inducirano z ADP, in zapiralni čas z merilno celico KOL/EPI je manj izrazit in

bolj variabilen. Pri določanju neodzivnosti na ASK v študiji med trombocitno agregometrijo in zapiralnim časom ni bilo skladnosti (88). Z raziskavo pri 108 bolnikih s koronarno boleznijo, ki so bili na zdravljenju z ASK, so preučevali inhibicijo agregacije z arahidonsko kislino in ugotovili neodzivnost pri polovici bolnikov (89). V podobni raziskavi so pri 113 bolnikih s koronarno boleznijo ugotovili 32 % neodzivnih bolnikov na zdravljenje z ASK (90). Ugotovili so tudi, da je verjetnost neodzivnosti višja pri bolnikih s koronarno boleznijo, povišanimi vrednostmi celokupnega holesterola glede na LDL holesterol, pri zdravljenju s statini in pri kadilcih (90).

Primerna koncentracija agonista je ena izmed pomembnih spremenljivk, ki vplivajo na rezultate trombocitne agregacije (74), predvsem v kontekstu neodzivnosti na ASK. Višja koncentracija agonista je tako močen sprožilec trombocitne agregacije, da zakrije učinek zaviralcev agregacije trombocitnih zdravil (8). Kolagen naj bi bil manj specifičen za določanje odgovora na ASK, ker z njim inducirana aktivacija trombocitov ni odvisna samo od sinteze TxA_2 , ampak tudi od trombocitne reaktivnosti na kolagen in trombocitne dovzetnosti na izločen ADP (8, 91).

Primerjava različnih laboratorijskih metod za opredelitev neodzivnosti na ASK (optična agregometrija z arahidonsko kislino, merjenje zapiralnega časa, merjenje agregacije trombocitov s pomočjo delcev, prekritih s fibrinogenom, določanje serumskega TxB_2 , določanje 11-dehidrotromboksana B_2) v objavljenih študijah ponavadi kaže zelo slabo ujemanje ali pa korelacije sploh ni (91–95), kar kaže na to, da so metode občutljive na različne parametre delovanja in zaviranja trombocitov. Incidenca neodzivnosti na ASK variira od 5,5 do 61 % v 11 študijah (96), kjer so uporabili nespecifične metode trombocitne aktivacije/agregacije za spremljanje učinka ASK. Nasprotno pa je znašala incidenca neodzivnosti na ASK od 1 do 1,7 % v raziskavah, kjer so določali koncentracijo TxB_2 (91, 93, 97), in manj kot 1 % v študijah, kjer so uporabili z arahidonsko kislino inducirano trombocitno agregacijo (98, 99). Za razliko pa študije, kjer so s specifičnimi metodami določali farmakološki učinek tienopiridinov, kažejo široko variabilnost odgovora na ta zdravila s pomembnim deležem bolnikov, ki so slabo odzivni (15–30 %) (19, 21).

Incidenca prave neodzivnosti na ASK je pri bolnikih je zelo nizka, verjetno manj kot 1 % (32, 100), če se uporabljajo specifične metode, kot sta agregometrija, stimulirana z arahidonsko kislino, ali merjenje TxB_2 v serumu. Po drugi strani pa nespecifične metode, npr. agregometrija, stimulirana s kolagenom in ADP, ter merjenje zapiralnega časa in

določanje metabolita tromboksana v urinu, kažejo veliko večjo frekvenco neodzivnosti na ASK, 20–30 % ali tudi do 65 % (32, 101).

Dokazano je, da so v rezultatih, pridobljenih z metodo agregometrije in z merjenjem zapiralnih časov, pomembne razlike in imajo velik vpliv na določanje neodzivnosti na ASK (88). Primerjava optične agregometrije z merjenjem agregacije trombocitov s pomočjo delcev, prekritih s fibrinogenom, in merjenjem zapiralnega časa je pokazala, da je skladnost preiskav slaba in le nekaj bolnikov je bilo neodzivnih z vsemi tremi metodami (92). V metaanalizi so ugotovili, da imajo bolniki z dokazano laboratorijsko neodzivnostjo na ASK posledično večje tveganje tudi za klinično neodzivnost na ASK, ker kažejo pomembno višje tveganje za ponovne kardiovaskularne dogodke v primerjavi z bolniki, ki so laboratorijsko občutljivi na ASK (101).

Neodzivnost na dvotirno zdravljenje

Z merjenjem agregacije trombocitov smo določili manj neodzivnih bolnikov kot pri bolnikih na ASK (tabela 4). Neodzivnih na dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogetrom je bilo 6–80 % bolnikov ter pri zdravljenju z ASK in prasugrelom 0–50 % bolnikov (tabela 4). Pri bolnikih na zdravljenju z ASK in klopidogetrom je bilo z merjenjem zapiralnega časa neodzivnih 22–53% bolnikov, pri bolnikih na zdravljenju z ASK in prasugrelom pa 10–30%, kar je manj kot pri zdravljenju z ASK (tabela 4).

Pri bolnikih na dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogetrom ali prasugrelom smo pričakovali neodzivnost pri manj kot 30 % bolnikov – to hipotezo smo z metodo optične agregometrije in metodo merjenja zapiralnega časa potrdili pri bolnikih na zdravljenju z ASK in prasugrelom.

Nasprotno ASK pa študije s specifičnimi metodami za merjenje farmakološkega vpliva tienopiridinov (metoda fosforilacije VASP) kažejo širšo variabilnost odzivnosti na ta zdravila, s pomembnim deležem bolnikov, ki so zelo slabo odzivni (15–30%) (32). Interindividualne razlike v metabolizmu tienopiridinov do njihovih aktivnih metabolitov je najverjetnejši mehanizem za interindividualno variabilnost v trombocitni inhibiciji (32). Delež neodzivnih bolnikov tudi variira glede na uporabo različnih metod za določanje delovanja trombocitov in definicij neodzivnosti. Pri raziskavah, kjer so uporabili metodo agregacije, inducirane z ADP, in mejno vrednost pri 10 % inhibiciji, so ugotovili 5–44% neodzivnih bolnikov (26). Pri tem je zelo pomembno odmerjanje zdravila in čas po odmerjanju. Ob neodzivnosti se priporoča povečevanje odmerka klopidogetra, kljub

pomanjkanju klinične dokumentacije (26, 102). Številne študije poročajo o veliki variabilnosti v odzivih na zdravljenje s klopidogetrom in deležu neodzivnosti 5 do 44% (21, 22, 39, 44–54). Razlike v prevalenci neodzivnosti med študijami so lahko posledica razlik v odmerjanju zdravila, času odmerjanja, razlik v definiciji (merjenje relativne spremembe v agregaciji napram absolutni spremembi, merjenje maksimalne napram končni agregaciji), laboratorijski metodi ali nezadostnega časa pred odvzemom krvi za zaznavanje maksimalnega efekta. Med potencialnimi vzroki za neodzivnost na zdravljenje s klopidogetrom so interindividualne razlike v metabolizmu prozdravila klopidogetrol v njegov aktivni metabolit. Inhibicija z ADP inducirano trombocitno agregacijo dobro korelira z metabolno aktivnostjo hepatičnega citokroma P450, ki aktivira prozdravilo v njegov aktivni metabolit (103). Variante citokroma P450 so povezane z znižano odzivnostjo trombocitov na klopidogetrol in so tako možen genetski razlog za variabilnost odziva na klopidogetrol (104, 105). Vzrok neodzivnosti so lahko tudi interference z drugimi zdravili, npr. benzodiazepin in selektivni serotonin inhibitorji interferirajo z biorazpoložljivostjo klopidogetrola (106). Ostaja pa še vprašanje interference atorvastatina in drugih statinov, ki se metabolizirajo s hepatičnim citokromom P450 in zato lahko interferirajo s tvorbo aktivnega metabolita tienopiridinov, kar pa je še kontroveržno (klopidogetrol in atorvastatin sta substrata izoenzima citokroma CYP3A4) (8, 107). Biološka variabilnost trombocitnega odgovora na ADP je lahko vzrok visoki interindividualni variabilnosti agregacije trombocitov, izzvane z ADP, pri bolnikih s klopidogetrom (21, 62). Nezadostna biološka razpoložljivost klopidogetrola lahko izhaja iz individualnih razlik v intestinalni absorpciji zdravila (63), ki se regulira s P-glikoproteinom, transportno beljakovino v črevesju. Pomembne razlike v indeksu telesne mase pri dobro in slabo odzivnih bolnikih kažejo na to, da standardni odmerek klopidogetrola (75 mg dnevno) ne zadošča pri bolnikih z večjo telesno težo (106). Aktivni metabolit klopidogetrola ireverzibilno inhibira P2Y₁₂ receptor s tvorbo kovalentne disulfidne vezi, kar je lahko dokaz postzdravljenja P2Y₁₂ pri neodzivnih bolnikih. Neodzivnost na prasugrel še ni raziskana v zadostni meri.

V raziskavah so preučevali tudi povezavo med reaktivnostjo trombocitov na ADP, ki je pokazatelj za neodzivnost na klopidogetrol, in ishemičnimi dogodki pri bolnikih s perkutano koronarno intervencijo. Delovanje trombocitov so določali s pomočjo optične agregometrije in ugotovili povezave med inhibicijo trombocitov z neodzivnostjo na

klopidogrel, postterapevtsko reaktivnostjo trombocitov, trombozo stenta in ponovnimi ishemičnimi dogodki (39, 48, 59).

V raziskavi so pri pomembnem številu bolnikov ugotovili neodzivnost hkrati na ASK in klopidogrel, neodzivnost na klopidogrel so ugotovili pri 47 % bolnikov, ki so bili neodzivni na ASK (108). Pri bolnikih s trombozo je bila določena neodzivnost na ASK in klopidogrel celo višja, nad 50 % (109).

Ujemanje metod

Z nalogo smo želeli ugotoviti ujemanje metod optične agregometrije in zapiralnega časa glede prepoznavanja oseb, ki so neodzivne na zaviralce agregacije trombocitov. Ujemanje metod smo izračunali s koeficientom kapa, in sicer med obema metodama z uporabo vseh agonistov in merilnih celic KOL/EPI, KOL/ADP in P2Y v posameznih skupinah bolnikov (tabela 5–7). Predvidevali smo, da bo ujemanje metod optične agregometrije in merjenja zapiralnega časa pri opredeljevanju neodzivnosti na zdravljenje z ASK ter z ASK/klopidogrelom in ASK/prasugrelom zmerno (koeficient kapa večji od 0,2). Ugotovili pa smo večinoma slabo ujemanje, kar je bilo nižje od pričakovanega.

V skupini bolnikov na zdravljenju z ASK je bilo ujemanje med metodama optične agregometrije in merjenja zapiralnega časa slabo do zmerno (tabela 5). Koeficienti kapa kažejo nikakršno oziroma slabo ujemanje obeh metod. Izjema je le merjenje agregacije trombocitov s kolagenom (11 mg/L) in ADP (11 $\mu\text{mol/L}$ in 5,5 $\mu\text{mol/L}$) ter zapiralnim časom z merilno celico P2Y, kjer je bilo ujemanje zmerno (koeficient kapa okrog 0,3) (tabela 5).

V skupini bolnikov na dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogrelom smo izračunali slabo do precejšnje ujemanje med metodama optične agregometrije in merjenja zapiralnega časa (tabela 6) Koeficienti kapa kažejo slabo ujemanje obeh metod. Izjemi sta merjenje agregacije trombocitov z ADP (11 $\mu\text{mol/L}$) ter zapiralnim časom z merilno celico KOL/ADP, kjer je bilo ujemanje zmerno (koeficient kapa: 0,339), in z merilno celico P2Y, kjer je bilo ujemanje precejšnje (koeficient kapa: 0,439). Ujemanje je bilo zmerno med metodo agregacije trombocitov z ADP (5,5 $\mu\text{mol/L}$) in zapiralnim časom z merilno celico P2Y (koeficient kapa 0,220) (tabela 6).

V skupini bolnikov na dvotirnem zdravljenju z ASK in prasugrelom smo ugotovili slabo do precejšnje ujemanje med metodama optične agregometrije in merjenja zapiralnega časa (tabela 7). Koeficienti kažejo slabo ujemanje obeh metod. Izjemi sta merjenje agregacije

trombocitov s kolagenom (11 mg/L) ter zapiralnim časom z merilno celico KOL/ADP, kjer je bilo ujemanje zmerno (koeficient kapa: 0,400), in merjenje agregacije trombocitov z ADP (5,5 $\mu\text{mol/L}$) ter zapiralnim časom z merilno celico P2Y, kjer je bilo ujemanje precejšnje (koeficient kapa: 0,412), ter zapiralnim časom z merilno celico KOL/ADP, kjer je bilo ujemanje zmerno (koeficient kapa: 0,211) (tabela 7).

Naši rezultati kažejo bistveno slabše ujemanje pri metodi merjenja zapiralnega časa, kot ga navaja proizvajalec merilnih celic KOL/EPI in KOL/ADP – 90 % (84). V raziskavi, kjer so primerjali metode za določanje delovanja trombocitov za preučevanje prevalece neodzivnosti na ASK pri bolnikih s stabilno koronarno boleznijo, so ugotovili slabo do zmerno ujemanje med metodami optične agregometrije z agonistoma arahidonska kislina (1,6 mmol/L) in ADP v različnih koncentracijah (5, 10 in 20 $\mu\text{mol/L}$) ter merjenja zapiralnega časa z merilno celico KOL/EPI (110). Zmerno ujemanje so določili med metodama optične agregometrije z agonistoma arahidonska kislina (1,6 mmol/L) in ADP (5 $\mu\text{mol/L}$), koeficient kapa 0,250 (114). V raziskavi so ugotovili, da med metodami ni bilo korelacije, korelacijski koeficient je znašal od $-0,120$ do $0,101$ (110).

Podobno kot naša raziskava je ujemanje metod optične agregometrije in merjenja zapiralnega časa obravnavala tudi raziskava, v kateri so preučevali variabilnost metod za merjenje delovanja trombocitov (88). Ugotovili so, da pri opredeljevanju neodzivnosti na ASK ni bilo ujemanja med optično agregometrijo z agonistoma arahidonsko kislino in ADP (koeficient kapa 0,0; 95 % IZ $-0,3$ do $0,3$) in merjenjem zapiralnega časa z merilno celico KOL/EPI (koeficient kapa 0,0; 95 % IZ $-0,4$ do $0,4$) (88). Ugotovili so, da obstaja med metodama optične agregometrije in merjenjem zapiralnega časa pomembna razlika, kar ima velik vpliv pri opredeljevanju neodzivnosti na ASK (88). Večina raziskav, ki so primerjale metodi optične agregometrije in merjenja zapiralnega časa, je določila slabo korelacijo med metodama, neodvisno od agonista, in z metodo merjenja zapiralnega časa ugotovila višji delež neodzivnosti na ASK (92, 95, 111). Pri koronarni bolezni so znane povišane vrednosti vWf, ki lahko vplivajo na meritve zapiralnega časa, kar ima za posledico lažno povišane vrednosti prevalece neodzivnosti na ASK pri bolnikih s koronarno boleznijo (112), v naši raziskavi vWf nismo določali, zato tega ne moremo trditi. Pri bolnikih s stabilno koronarno boleznijo, kjer so določali inhibicijo delovanja trombocitov s klopidogrelom, so prav tako ugotovili slabo korelacijo med metodama optične agregometrije z agonistom ADP (5 $\mu\text{mol/L}$ in 20 $\mu\text{mol/L}$) in merjenjem zapiralnega časa z merilno celico KOL/ADP (korelacijski koeficient manjši od 0,2) (113).

Potencialni vzrok za slabo ujemanje metod za merjenje učinka zaviralcev agregacije trombocitov z metodo optične agregometrije in merjenja zapiralnega časa bi lahko pripisali različnim principom merjenja delovanja trombocitov pri obeh metodah. Pri metodi optične agregometrije merimo delovanje trombocitov brez prisotnosti drugih krvnih celic, in sicer statično v kiveti spektrofotometra, pri metodi merjenja zapiralnega časa pa lahko trombociti reagirajo z drugimi krvnimi celicami. Strdek, ki nastane v membrani merilne celice, je sestavljen pretežno iz trombocitov, vWf in fibrinogena (114). Trombociti so poleg tega izpostavljeni strižnim silam, ki nastanejo ob pretoku krvi skozi kapilaro merilne celice.

Merjenje delovanja trombocitov in trombocitni odgovor na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov je zelo kompleksno in odvisno od številnih metodoloških dejavnikov. Korelacija laboratorijskih rezultatov s kliničnimi izidi je težavna, prav tako tudi uporaba rezultatov za usmerjanje izbire zdravljenja.

Nobena posamezna metoda ne more zaobseči vseh aspektov biologije trombocitov. Izbira antikoagulantov pri odvzemu krvi in agonista pri metodi vpliva na rezultate. Metode določanja in definicije za normalen/patološki odgovor na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov morajo biti pazljivo izbrane, da odražajo učinkovitost receptorjev in specifičnost reakcij. Raziskave, ki poskušajo korelirati merjenje trombocitnega delovanja ter vpliv zdravil na zmanjšanje delovanja trombocitov s klinično sliko, so osredotočene na signalne poti receptorjev ali trombocitne reakcije (aktivacija ali agregacija). Čeprav številne študije podpirajo povezavo med laboratorijsko in klinično neodzivnostjo, ni nobena definitivna. V objavljenih kliničnih raziskavah še niso raziskali, če zdravljenje, ki ga prilagajamo glede na laboratorijske rezultate neodzivnosti na ASK in klopidoogrel, vodi do izboljšanja kliničnega poteka bolezni. Delovna skupina Mednarodnega združenja za trombozo in hemostazo je priporočila, da naj bo klinično pomembna definicija neodzivnosti osnovana na podatkih v povezavi z laboratorijskimi metodami (115). Skupina je poudarila, da pravilen pristop k neodzivnosti na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov ni raziskan, v dosedanjih kliničnih raziskavah še niso ugotovili kliničnega pomena spreminjanja zdravljenja samo na osnovi neodzivnosti, določene z laboratorijskimi metodami. Pri kliničnih raziskavah neodzivnosti na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov sta pomembna dva vidika: 1. katera enostavna, cenovno ugodna in hitra metoda ali kombinacija metod za ugotavljanje delovanja trombocitov najbolj napove

uspešnost zdravljenja z zaviralci agregacije trombocitov pri posameznih bolnikih ter specifično indikacijo za zdravljenje in 2. uspešnost zdravljenja, če se zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov prilagodi glede na laboratorijske rezultate. V kliničnih raziskavah je potrebno pri bolnikih z znano neodzivnostjo ugotoviti potencialne prednosti prilagajanja odmerka zdravila ali suplementarnega zdravljenja z zaviralci agregacije trombocitov z različnimi farmakodinamskimi profili.

Kljub temu da še ni dokončnega dogovora, kako naj bodo obravnavani neodzivni bolniki na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov, pa v nekaterih kliničnih raziskavah poročajo o povezavi med laboratorijsko neodzivnostjo in ponovnimi ishemičnimi dogodki. Z metodo optične agregometrije so v raziskavi ugotovili povezavo med neodzivnostjo na ASK pri bolnikih s stabilno koronarno boleznijo in ponovnim infarktomiokarda ali srčno odpovedjo (111, 116). Ugotovili so 5,2 % neodzivnih bolnikov na ASK, 24 % neodzivnih in 10 % odzivnih bolnikov je imelo koronarni zaplet. V nekaj študijah poročajo o povezavi med neodzivnostjo na ASK, določeno z metodo merjenja zapiralnega časa, in povečanimi koronarnimi zapleti pri bolnikih na zdravljenju z ASK (117, 118). Osnovna težava v objavljenih raziskavah v zvezi z določanjem neodzivnosti na ASK je premalo opravljenih meritev delovanja trombocitov, ker je določanje neodzivnosti na ASK odvisno glede na čas in količino odmerjanja ASK (37, 119).

Večina objavljenih raziskav pri merjenju delovanja trombocitov ne upošteva interakcij med trombociti in fibrinom, kinetike nastanka trombina, merjenja čvrstosti strdka in drugih dejavnikov, ki lahko imajo pomembno vlogo pri napovedi ishemičnih dogodkov. Metode, ki merijo koagulacijo in interakcije trombocitov, predstavljajo boljši napovedni dejavnik kot izolirane meritve delovanja trombocitov (67).

Klinične raziskave potrjujejo, da je klinični pomen zaviralcev agregacije trombocitov zelo odvisen od razmerja med željenim antitrombotičnim učinkom in tveganjem za krvavitve. Dolgotrajno zdravljenje z nizkim odmerkom ASK namreč predstavlja pomembno tveganje za krvavitve, predvsem iz gastrointestinalnega trakta (120).

Precej obetavne so raziskave, ki preučujejo povezave med genetskimi polimorfizmi receptorjev na površini trombocitov in polimorfizmi signalnih proteinov s tveganjem za

aterotrombotične dogodke. Farmakogenomika trombocitov je pričela povezovati podatke o genetiki z interindividualnimi razlikami v odzivnosti na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov, z neodzivnostjo na zdravljenje z ASK se lahko poveže več genetskih polimorfizmov ali pojasni variabilnost odziva na zdravljenje s klopidogrelom in drugimi zaviralci agregacije trombocitov (121). Zaenkrat še ni enotnega pristopa k načinu zdravljenja in preprečevanja srčnožilnih bolezni.

6. ZAKLJUČEK

Pri bolnikih, ki prejemajo ASK, smo ugotovili znižanje hitrosti agregacije z agonistom ADP in arahidonsko kislino, ne pa pri kolagenu. Zdravljenje z ASK in klopidogetrelom/prasugrelom je povzročilo znižanje odstotka agregacije pri vseh treh agonistih. ASK je podaljšala zapiralni čas, izmerjen v merilni celici kolagen/epinefrin, ne pa v kolagen/ADP in P2Y₁₂ merilnih celicah. Zdravljenje z ASK in klopidogetrelom/prasugrelom je podaljšalo zapiralni čas pri vseh treh merilnih celicah. V raziskavi smo ugotovili slabo do precejšnje ujemanje metod optične agregometrije in meritev zapiralnega časa pri opredeljevanju neodzivnosti na ASK/klopidogetrel in ASK/prasugrel. Največje ujemanje (precejšnje) smo ugotovili v skupini bolnikov na dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogetrelom pri merjenju agregacije trombocitov z ADP (11 μmol/L) ter zapiralnim časom z merilno celico P2Y₁₂, (koeficient kapa: 0,439).

Z rezultati raziskave smo delno potrdili prvo hipotezo, da bomo ugotovili neodzivnost na ASK pri največ 60 % bolnikov. Slednje je veljalo za metodo agregometrije, ne pa za metodo merjenja zapiralnega časa. Pri bolnikih na dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogetrelom/prasugrelom smo pričakovali neodzivnost pri manj kot 30 % bolnikov. To hipotezo smo potrdili v skupini bolnikov na dvotirnem zdravljenju z ASK in prasugrelom, ne pa pri bolnikih na dvotirnem zdravljenju z ASK in klopidogetrelom. Hipoteze o dobrem ujemanju primerjanih metod nismo potrdili, saj smo ugotovili večinoma slabo ujemanje. Ugotovili smo, da je delež neodzivnih bolnikov odvisen od uporabljene metode in koncentracije agonista. Ne glede na izbrano metodo pa je bil delež neodzivnih bolnikov manjši pri tistih na dvotirnem zdravljenju v primerjavi z bolniki na enotirnem zdravljenju in pri bolnikih na prasugrelu v primerjavi z bolniki na klopidogetrelu. Sklepamo, da je dvotirno zdravljenje bolj učinkovito od enotirnega, prav tako zdravljenje z ASK/prasugrelom v primerjavi z ASK/klopidogetrelom.

Primerjava metod za spremljanje neodzivnosti na zdravljenje z zaviralci agregacije trombocitov odraža slabo ujemanje, kar kaže na to, da metodi na drugačen način merita učinke zdravljenja z zaviralci agregacije trombocitov in sta občutljivi na različne parametre trombocitnega delovanja. Rezultati naše raziskave bi lahko predstavljali osnovo za klinično raziskavo, v kateri bi ugotavljali povezavo med neodzivnostjo na ASK, klopidogetrel in

prasugrel, merjeno z metodo optične agregometrije in zapiralnim časom, in kliničnimi dogodki.

7. LITERATURA

1. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M: Interna medicina, 4. izdaja, Založba Littera Picta, Ljubljana, 2011: 241–278.
2. Stegnar M: Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami. Klinični oddelek za žilne bolezni, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, Ljubljana, 2005.
3. Tekavčič Glover T, Vučko Mole S, Krbavčič A, Obreza A: Anatomsko-terapevtsko-kemična (ATC) klasifikacija zdravil, 4. izdaja, Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, Ljubljana, 2012.
4. Billett HH: Antiplatelet agents and arterial thrombosis. *Cardiol Clin.* 2008; 26: 189–201.
5. Awtry EH, Loscalzo J: Aspirin. *Circulation* 2000; 101: 1206–18.
6. Fitzgerald GA: Parsing an enigma: The pharmacodynamics of aspirin resistance. *Lancet* 2003; 361: 542–4.
7. Antithrombotic Trialist Collaboration: Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71–86.
8. Cattaneo M: Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1980–1987.
9. Clarke TA, Waskell LA: The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 53–9.
10. Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP: Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 2003; 101: 3908–14.
11. Xiao Z, Theroux P: Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1982–8.
12. Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schror K, Weber AA: Platelet CD40 ligand (CD40L)-subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 2001; 12: 74–82.
13. Vivekananthan DP, Bhatt DL, Chew DP, Zidar FJ, Chan AW, Moliterno DJ, et al.: Effect of clopidogrel pretreatment on periprocedural rise in C-reactive protein after percutaneous coronary intervention. *AM J Cardiol* 2004; 94: 358–60.

14. Gurbel PA, Bliden KP, Guyer K, Aggarwal N, Tantry US: Delayed thrombin-induced platelet-fibrin clot generation by clopidogrel: A new dose-related effect demonstrated by thrombelastography in patients undergoing coronary artery stenting. *Thromb Res* 2006 Jun 26; doi:10.1016/j.thromres.2006.05.006.
15. Labarthe B, Theroux P, Angioi M, Ghitescu M: Matching the evaluation of the clinical efficacy of clopidogrel to platelet function tests relevant to the biological properties of the drug. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 638–45.
16. Offermanns S: Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99: 1293–304.
17. »FDA Drug Safety Communication: Reduced effectiveness of Plavix (clopidogrel) in patients who are poor metabolizers of the drug«
(<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm203888.html>). Food and Drug Administration (FDA). March 12, 2010.
18. CAPRIE steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996; 348: 1329–39.
19. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ: Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 246–51.
20. Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C: Resistance to Clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1157–64.
21. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM: Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003; 107: 2908–13.
22. Jaremo P, Lindahl TL, Fransson SG, Richter A: Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med*. 2002; 252: 233–238.
23. Grau AJ, Reiners S, Lichy C, Buggle F, Ruf A: Platelet function under aspirin, Clopidogrel, and both after ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 849–855.
24. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/022307s007lbl.pdf.
25. Garg A, Pandey A, Oza PA, Chaturvedi M: Newer antiplatelet and antithrombotic drugs on the horizon. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 2013; 3: 105–110.
26. Gurbel PA, Tantry US: Clopidogrel resistance? *Thromb Res*. 2007; 120: 311–321.

27. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK: Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001; 345: 494–502.
28. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, et al.: Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* Aug 18 2001; 358(9281): 527–33.
29. Steinhubl SR, Berger PB, Mann III JT, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, et al.: CREDO Investigators. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 2411–20.
30. Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, et al.: CHARISMA Investigators. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2006; 354: 1706–17.
31. Hjerdahl P: Should we monitor platelet function during antiplatelet therapy? *Heart* 2008; 94: 685-687. doi:10.1136/hrt.2007.135194.
32. Cattaneo M: Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost.* 2007; 5(Suppl 1): 23–7.
33. Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F: Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 2007; 92: 694–7.
34. Born GV: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927–9.
35. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ: Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *European Heart Journal* 2006; 27: 647–654.
36. Rakuša M, Stegnar M, Božič M: Biološka variabilnost in ponovljivost metod za merjenje delovanja trombocitov, Ljubljana, 2006.
37. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J: Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation.* 2007; 115: 3156–3164.

38. Pulcinelli FM, Riondino S, Celestini A: Persistent production of platelet thromboxane A₂ in patients chronically treated with aspirin. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 2784–2789.
39. Lev EI, Patel RT, Maresh KJ: Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the role of dual drug resistance. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 27–33.
40. Templin C, Schaefer A, Stumme B, Drexler H, von Depka M: Combined aspirin and clopidogrel resistance associated with recurrent coronary stent thrombosis. *Clin Res Cardiol* 2006; 95: 122–6.
41. Dichiara J, Bliden KP, Tantry US: Platelet aspirin responsiveness measured by VerifyNow: correlation with multiple methods and identification of a high platelet reactivity phenotype. *Platelets.* 2007; 18: 414–423.
42. Bliden KP, DiChiara J, Tantry US, Bassi AK, Chaganti SK, Gurbel PA: Increased risk in patients with high platelet aggregation receiving chronic clopidogrel therapy undergoing percutaneous coronary intervention: is the current antiplatelet therapy adequate? *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 657–666.
43. Michelson AD: Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation.* 2004; 110: e489–e493.
44. Müller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schonig A, Gawaz M: Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost.* 2003; 89: 783–787.
45. Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carroll RC: Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am J Cardiol.* 2004; 93: 456–458.
46. Lepantalo A, Virtanen KS, Heikkila J, Wartiovaara U, Lassila R: Limited early antiplatelet effect of 300 mg clopidogrel in patients with aspirin therapy undergoing percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J.* 2004; 25: 4768–4783.
47. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E: Identification of low responders to a 300-mg clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stenting. *Thromb Res.* 2005; 115: 101–108.
48. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V: Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004; 109: 3171–3175.

49. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E: Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes*. 2005; 54: 2430–2435.
50. Gurbel P, Bliden KP, Hayes KM, Yoho JA, Herzog WR, Tantry US: The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45: 1392–1396.
51. Dziewierz A, Dudek D, Heba G, Rakowski T, Mielecki W, Dubiel JS: Inter-individual variability in response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Kardiol Pol*. 2005; 62: 108–117.
52. Geisler T, Langer H, Wydymus M: Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur Heart J*. 2006; 27: 2420–2425.
53. Hochholzer W, Trenk D, Bestehorn HP: Impact of the degree of peri-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 1742–1750.
54. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A: Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49: 2312–2317.
55. Gurbel PA, Bliden KP, Guyer K: Platelet reactivity in patients and recurrent events post-stenting: results of the PREPARE POST-STENTING study. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46: 1820–1826.
56. Gurbel PA, Bliden KP, Zaman KA, Yoho JA, Hayes KM, Tantry US: Clopidogrel loading with eptifibatide to arrest the reactivity of platelets: results of the CLEAR PLATELETS study. *Circulation*. 2005; 111: 1153–1159.
57. Gurbel PA, Bliden KP, Tantry US: Effect of clopidogrel with and without eptifibatide on tumor necrosis factor-alpha and C-reactive protein release after elective stenting: results from the CLEAR PLATELETS 1b study. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 2186–2191.
58. Cuisset T, Frere C, Quilici J: High post-treatment platelet reactivity identified low-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost*. 2006; 4: 542–549.
59. Gurbel PA, Bliden KP, Samara W: Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST study. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46: 1827–1832.

60. Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO: Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2003; 59: 295–302.
61. Wong G, Price M, Valencia R, Lee S, Gollapudi R, Teirstein PS: Measurement of clopidogrel inhibition with a point-of-care assay identifies patients at risk for stent thrombosis after percutaneous coronary intervention. Presented at: Transcatheter Cardiovascular Therapeutics; October 22–27, 2006; Washington, DC.
62. Michelson AD, Linden MD, Furman MI, Li Y, Barnard MR, Fox ML, Lau WC, McLaughlin TJ, Frelinger AL: Evidence that pre-existent variability in platelet response to ADP accounts for “clopidogrel resistance” *J Thromb Haemost* 2007; 5: 75–81.
63. Taubert D, Von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, Kastrati A, Schomig A, Schomig E: Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 486–501.
64. Wiviott SD, Antman EM, Winters KJ, Weerakkody G, Murphy SA, Behounek BD, et al.: JUMBO-TIMI 26 Investigators. Randomized comparison of prasugrel (CS-747, LY640315), a novel thienopyridine P2Y₁₂ antagonist, with clopidogrel in percutaneous coronary intervention: results of the Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally (JUMBO)-TIMI 26 Trial. *Circulation* 2005; 28(111): 3366–73.
65. Jakubowski JA, Payne CD, Brandt JT, Weerakkody GJ, Farid NA, Small DS, et al.: The platelet inhibitory effects and pharmacokinetics of prasugrel after administration of loading and maintenance doses in healthy subjects. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47: 377–84.
66. Harrison P, Frelinger AL 3rd, Furman MI, Michelson AD: Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thromb Res.* 2007; 120: 323–36.
67. Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD: Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 1822–34.
68. Ivy AC, Nelson D, Bucher G: The standardization of certain factors in the subcutaneous »venostasis« bleeding time technique. *J Lab Clin Med* 1941; 26: 1812–8.
69. Cardinal DC, Flower RJ: The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods.* 1980; 3: 135–58.
70. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S: Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular deaths in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation.* 2002; 105: 1650–5.

71. Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, et al.: Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation*. 1999; 99: 620–5.
72. Wuillemin WA, Gasser KM, Zeerleder SS, Lammle B: Evaluation of a Platelet Function Analyser (PFA-100) in patients with bleeding tendency. *Swiss Med Wkly* 2002; 132: 443–8.
73. Harrison P, Robinson MS, Mackie IJ, Joseph J, McDonald SJ, Liesner R, et al.: Performance of the platelet function analyser PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10: 25–31.
74. Breddin HK: Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets* 2005; 16: 151–8.
75. Harrison P: Platelet function analysis. *Blood Rev* 2005; 19: 111–23.
76. Schneider DJ, Tracy PB, Mann KG, Sobel BE: Differential effects of anticoagulants on the activation of platelets *ex vivo*. *Circulation*. 1997; 96: 2877–2883.
77. Geiger J, Brich J, Honig-Liedl P: Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 2007–2011.
78. Butenas S, Branda RF, van't Veer C, Cawthern KM, Mann KG: Platelets and phospholipids in tissue factor-initiated thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 660–667.
79. Viera AJ, Garrett JM: Understanding interobserver agreement: The kappa statistic. *Fam Med* 2005; 37(5) 360–363.
80. Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD: Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2009; 7:1029.
81. Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Haas NF, Taite BB, Szalony JA, Page JD, et al: Assessment of platelet function assays. *Am Heart J* 1998; 135: S170–8.
82. Stegnar M, Knežević A, Božič Mijovski M: The effect of pre-analytical variables on light transmittance aggregometry in citrated platelet-rich plasma from healthy subject. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48 (10).
83. Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E: Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 677–83.

84. Siemens Healthcare Diagnostic: Dade[®]PFA Collage/EPI Test Cartridge and Dade[®]PFA Collagen/ADP Test Cartridge, To aid in the detection of platelet dysfunction in citrated human whole blood. Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH September 2010.
85. Siemens Healthcare Diagnostic: Innovance[®]PFA P2Y, For the detection of platelet P2Y₁₂-receptor blockade in patients undergoing therapy with a P2Y₁₂-receptor antagonist. Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH December 2009.
86. Golanski J, Syska K, Watala C: Revival of PFA-100-how far is it useful for the monitoring of ADP receptor antagonists? *Thromb Haemost* 2013; 109: 564–565.
87. Kinsella JA, Tobin WO, Cox D: Prevalence of *ex vivo* high on treatment platelet reactivity on antiplatelet therapy after transient ischemic attack or ischemic stroke on the PFA-100[®] and VerifyNow[®]. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2012.
88. Božič-Mijovski M, Rakuša M, Stegnar M: Variation in platelet function testing has a major influence on detection of aspirin resistance in healthy subjects. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2008; 36: 84–90.
89. Syrbe G, Redlich H, Weidlich B, Ludwig J, Kopitzsch S, Gockefitz A, Herzog T: Individual dosing of ASA prophylaxis by controlling platelet aggregation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2001; 7: 209–213.
90. Coma-Canella I, Velasco A, Castano S: Prevalence of aspirin resistance measured by PFA-100. *Int J Cardiol* 2005; 101: 71–6.
91. Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S, Mimuro J, Ozaki Y, Sakata Y: Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathways in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1271–1278.
92. Harrison P, Segal H, Blasbery K, Furtado C, Silver L, Rothwell PM: Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. *Stroke* 2005; 36: 1001–5.
93. Fontana P, Nolli S, Reber G, De Moerloose P: Biological effects of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 healthy volunteers. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 813–9.
94. Faraday N, Becker DM, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Segal JB, Moy TF, Bray PF, Becker LC: Relation between atherosclerosis risk factors and aspirin resistance in a primary prevention population. *Am J Cardiol* 2006; 98: 774–9.

95. Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Corral J, Acuna C, Guerrero JA, Vicente V: Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure? *Stroke* 2005; 36: 276–80.
96. Campbell CL, Steinhubl SR: Variability in response to aspirin: do we understand the clinical relevance?. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 665–9.
97. Frelinger AL III, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, Barnard MR, Michelson AD: Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation* 2006; 113: 2888–96.
98. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA: Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1705–9.
99. Williams MS, Kickler TS, Vaidya D, Ng'alla LS, Bush DE. Evaluation of platelet function in aspirin treated patients with CAD. *J Thromb Thrombolysis* 2006; 21: 241–7.
100. Patrono C, Rocca B: Drug insight: aspirin resistance- fact or fashion? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007; 4: 42–50.
101. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Huisman MV: Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007; 167: 1593–9.
102. O'Donoghue M, Wiviott SD: Clopidogrel response variability and future therapies: clopidogrel: does one size fit all? *Circulation.* 2006; 114: e600–6.
103. Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DGM, Guyer KE, Tait AR, Bates ER: Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation* 2004; 109: 166–71.
104. Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P: Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006; 108: 2244–7.
105. Suh JW, Koo BK, Zhang SY, Park KW, Cho JY, Jang IJ, Lee DS, Sohn DW, Lee MM, Kim HS: Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel. *CMAJ* 2006; 174: 1715–22.
106. Feher G, Koltai K, Alkonyi B, Papp E, Keszthelyi Z, Kesmarky G, Toth K: Clopidogrel resistance: role of body mass and concomitant medications. *Int J Cardiol* 2006 Dec 12.

107. Poulsen TS, Vinholt P, Mickley H, Koesholm L, Kristensen SR, Damkler P: Existence of a clinically relevant interaction between clopidogrel and HMG-CoA reductase inhibitors? Re-evaluating the evidence *Bas Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96: 103–10.
108. Geisler T., Gawaz M: Variable response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 2007; vol22, number 2: 196–202.
109. Wenaweser P, Dörffler-Melly J, Imboden K: Stent thrombosis is associated with an impaired response to antiplatelet therapy. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1748–1752.
110. Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG: A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *European Heart Journal* 2007; 28: 1702–1708.
111. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED: Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2001; 88: 230–235.
112. Chakroun T, Gerotziafas G, Robert F, Lecrubier C, Samama MM, Hatmi M, Elalamy I: *In vitro* aspirin resistance detected by PFA-100 closure time: pivotal role of plasma von Willebrand factor. *Br J Haematol* 2004; 124: 80–85.
113. Lordkipanidze M., Pharand C., Nguyen TA, Schampaert E., Palisaitis DA, Diodati JG., Comparison of four tests to assess inhibition of platelet function by clopidogrel in stable coronary artery disease patients. *European Heart Journal* 2008; 29: 2877–2885.
114. Poujol C, Nurden A, Paponneau A, Heilmann E, Nurden P: Ultrastructural analysis of the distribution of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregates formed in the PFA-100. *Platelets* 1998; 9: 381–9.
115. Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW: Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 1309–1311.
116. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ: A prospective, blinded determination of the natural history of ASK resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 961–5.
117. Marcucci R, Paniccia R, Antonucci E: Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol.* 2006; 98: 1156–1159.
118. Poulsen TS, Jorgensen B, Korsholm L: Prevalence of aspirin resistance in patients with an evolving acute myocardial infarction. *Thromb Res.* 2007; 119: 555–562.

119. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA: Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke*. 1994; 25: 2331–2336.
120. Campbell CL, Smyth S, Montalescot G, et al.: Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *J Am Med Assoc* 2007; 297: 2018–2024.
121. Zuern CS, Schwab M, Gawaz M, Geisler T: Platelet pharmacogenomics. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1147–58 [Epub 2010 Feb 1].