

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Zdravotnická bioanalýtika



**Antiagregační léčba a možnosti jejího monitorování
u ischemické choroby srdeční**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2007

Markéta Kašparová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu doc. RNDr. Miroslavu Peckovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a lidský přístup v průběhu zpracování této diplomové práce. Paní Mgr. Iloně Fátorové bych ráda poděkovala za veškerou pomoc, kterou mi poskytla, a také za ochotu, se kterou řešila všechny mé dotazy. Dále bych ráda vyjádřila svůj dík všem z laboratoře speciálních metod hematologie II. Interní kliniky za milou a trpělivou pomoc při zvládnutí technik používaných ve studiích.

Velký dík si zaslouží také má rodina a přátelé, kteří mě neúnavně povzbuzovali a podporovali, a kteří neváhali poskytnout mi své zkušenosti v situacích, ve kterých jsem si sama nevěděla rady.

Obsah

Poděkování	2
Obsah.....	3
Abstrakt	5
Summary	6
1 Úvod a cíl práce.....	7
2 Teoretická část	8
2.1 Ischemická choroba srdeční.....	8
2.1.1 Rozdělení ICHS	8
2.1.2 Příčiny vzniku.....	9
2.1.3 Následky a projevy ischemie myokardu.....	9
2.1.4 Vývoj aterosklerotického poškození koronárních tepen.....	9
2.1.5 Farmakoterapie.....	11
2.2 Funkce trombocytů v hemostáze	14
2.3 Aktivace krevní destičky	14
2.4 Adheze	16
2.5 Agregace.....	17
2.6 Antiagregační látky.....	19
2.6.1 Zvýšení stability membrány trombocytu.....	20
2.6.2 Inhibice adheze.....	21
2.6.3 Blokáda agregace krevních destiček	21
2.6.4 Blokáda aktivačních cest a cyklů	24
3 Experimentální část	32
3.1 Materiál a metody.....	32
3.1.1 Odběr krve	32

3.1.2	Příprava plazmy pro agregační studie	32
3.1.3	Agregace trombocytů kationickým propylgalátem.....	32
3.1.4	Měření na přístroji PFA-100.....	35
3.1.5	Stanovení hladiny tromboxanu B ₂ v moči	37
3.2	Výsledky.....	38
3.2.1	Agregace s kationickým propylgalátem.....	38
3.2.2	Měření na přístroji PFA 100	43
3.2.3	Tromboxan B ₂ v moči.....	46
3.2.4	Citlivost pacientů s ICHS na antiagregační terapii	48
4	Grafická část.....	51
5	Diskuze.....	61
6	Závěr	66
7	Seznam použitých zkratk	69
8	Seznam literatury.....	71

Abstrakt

V naší studii jsme porovnávali možné metody monitorování antiagregační terapie, faktoru, který může výrazně ovlivnit riziko tromboembolické příhody. Provedli jsme agregační studie s kationickým propylgalátem (CPG), modifikované agregační studie vyšetřující vliv terapie na primární hemostázu (přístroj PFA-100) a studie zjišťující hladinu TXB₂ v moči.

V agregační studii jsme ověřili dostatečnou citlivost reagentie CPG v koncentraci 30 μmol/l, nezjistili jsme vliv stresových faktorů spojených s hospitalizací pacienta na měřené parametry agregace, ale potvrdili jsme signifikantní pokles hodnot slope (%/min) po podání ASA. U vyšetření Closure Time (CT) na přístroji PFA-100 jsme nepotvrdili vliv hospitalizace a s ní spojených stresových faktorů na měřený parametr. Nalezli jsme statisticky významné prodloužení CT na membráně Col/Epi vlivem antiagregační léčby. Hladiny TXB₂ v moči u pacientů s antiagregační terapií byly významně nižší než koncentrace u zdravých dárců.

Použité metody reagují změnou měřených parametrů na podání ASA, ze souboru 51 pacientů s dlouhodobou antiagregační léčbou jsme na základě porovnání s hodnotami kontrolních souborů vyčlenili pacienty, kteří na léčbu nereagovali (rezistence na ASA). Agregační metodou jsme detekovali 1 nonrespondenta (2 %), na přístroji PFA-100 2 nonrespondenty (4 %) a u TXB₂ v moči 5 nonrespondentů (10 %).

Summary

The effect of antiaggregation therapy is an important factor that can influence the risk of thromboembolic events. The methods of monitoring antiaggregation therapy we compared in our study. The aggregation with cationic propylgallate (CPG) as the activating substance, analyzer PFA-100, which investigates the function of primary haemostasis and measuring of TXB₂ in the urine were used to monitor the effect of the therapy. The sufficient concentration of CPG (30 µmol/l) in the aggregation study were confirmed. The influence of hospitalization and associated stress on the parameters of aggregation was not significant. However the decrease of parameter of aggregation (slope, %/min) after administration of a low dose of acetylsalicylic acid (ASA) was significant. The influence of stress linked to hospitalization on the detected closure time (CT), was not observed using PFA 100. Nevertheless antiaggregation therapy significantly prolonged CT measured on the collagen/epinephrine coated membrane. The concentration of the thromboxane B₂ in the urine of patients treated with antiaggregation therapy was also significantly lower in the contrary to healthy donators.

The methods reacted after administration of low doses ASA by modifying of measured parameters. Fifty one patients treated with long term antiaggregation therapy were separated into the groups of responsive and resistant ones. Segregation was carried out on the basis of the comparison with control groups parameters. One resistant patient (2 %) was detected by aggregation method, 2 nonrespondent patients (4 %) by use of the PFA-100 analyzer and 5 resistant patients (10 %) in terms of a measuring TXB₂ in the urine.

1 Úvod a cíl práce

V současné populaci je ischemická choroba srdeční (ICHS) jednou z velmi častých příčin úmrtí. Incidence této civilizační choroby je 5 - 10 případů/rok na 1000 obyvatel a úmrtnost je 2-3 úmrtí/rok na 1000 obyvatel. Úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění tvoří asi 50-55 % z celkové úmrtnosti a ICHS se na ní podílí asi polovinou případů. V průmyslově rozvinutých zemích je ICHS nejčastější příčinou mortality dospělé populace. Důslednou primární a sekundární prevencí se v posledních 25 letech podařilo v zemích Severní Ameriky, Austrálie a západní Evropy snížit úmrtnost na ICHS přibližně o 30 % (ŠPINAR A KOL., 2003).

Primární prevence spočívá ve vyhledávání osob s vyšším počtem rizikových faktorů, v komplexním ovlivnění těchto faktorů se zaměřením na snížení rozvoje aterosklerózy (MAREK A KOL., 2005). Jedním z důležitých faktorů, které mohou výrazně omezit riziko tromboembolické příhody je účinná dostupná léčba a případné monitorování jejího účinku.

Cílem této studie bylo zmapovat jednotlivé metody sloužící ke sledování účinnosti antiagregační léčby. Byly zvoleny vhodné kontrolní soubory, podle kterých byly vymezeny normální hodnoty. V těchto kontrolních souborech byla stanovena účinnost léčebné dávky a následně byly tyto soubory porovnány se soubory nemocných neléčených antiagregační terapií. Cílem studie bylo také vyloučit případné vlivy stresových faktorů na parametry popisující funkci trombocytů.

V práci byly využity nejnovější poznatky a metody z oblasti studia krevních destiček. Použili jsme jak agregační studie s kationickým propylgalátem, tak modifikace agregačních studií s přístrojem PFA 100 (Dade, Behring), který je schopen sledovat přímo tvorbu primární destičkové zátky. Ke zhodnocení účinku kyseliny acetylsalicylové, v současné době nejvíce používaného antiagregancia, jsme použili agregační techniky a měření množství uvolňovaného TXA₂ z aktivovaných trombocytů. V závěru práce jsme pacienty rozdělili na dvě skupiny – skupinu reagující a nereagující na léčbu ASA a diskutovali jsme problematiku ASA rezistence.

2 Teoretická část

2.1 Ischemická choroba srdeční

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je onemocnění, které vzniká na podkladě akutního nebo chronického omezení, případně zastavení přítoku krve vlivem změn na věnčitých tepnách (koronární složka) do určité oblasti srdečního svalu, kde vzniká ischemie až nekróza (myokardiální složka). K poškození svalu dochází z důvodu nepoměru mezi dodávkou a potřebou kyslíku v myokardu (ŠPINAR A KOL., 2003).

2.1.1 Rozdělení ICHS

Změny, které vznikají na myokardu v důsledku ischemizace, tvoří podklad několika charakteristických klinických projevů, podle kterých můžeme ICHS rozdělit na formy akutní a chronické. Mezi formy akutní se řadí nestabilní angina pectoris, akutní infarkt myokardu a náhlá srdeční smrt. Druhou formou je chronická ICHS, do této skupiny se řadí asymptomatická ICHS, stabilní angina pectoris, stav po infarktu myokardu, dysrytmická forma ICHS a chronické srdeční selhání (ŠPINAR A KOL., 2003).

Podle morfologických změn na svalovině myokardu způsobených ischemií můžeme rozlišit tři druhy ICHS. Infarkt myokardu je typický a morfologicky nejvýraznější projev. Po úplné zástavě krevního proudu v kapilárách se vyvine koagulační nekróza, která postupuje přes specifický parenchym, svalovou tkáň a vmezežené vazivo s cévami. Dalším morfologickým projevem je myomalacie, stav kdy není ischemie myokardu úplná. Nekróze podlehne pouze k nedostatku kyslíku citlivější složka stěny srdeční, tj. vlastní svalovina. Zachované intersticiální vazivo a cévy mohou být místem, kde dojde k reparaci svaloviny. Pokud se v myokardu objeví disperzní drobná mnohočetná ischemická ložiska různého stáří (myofibrosis disseminata), odpovídá tato morfologická změna klinickému syndromu označovanému jako angina pectoris (BEDNÁŘ A KOL., 1982).

2.1.2 Příčiny vzniku

Nejčastější příčinou vzniku ICHS je aterosklerotické postižení koronárních tepen, vzácně se jedná o postižení při kolagenózách, infekčních onemocněních, embolii nebo anomálních odstupech věnčitých tepen – tzv. fixní stenóza. Poststenotický tlak krve je znatelně nižší než střední diastolický tlak v aortě. Aby bylo toto zvýšení periferního odporu nějakým způsobem kompenzováno, musí být i v klidu použita koronární rezerva. Pokud není průsvit koronárních tepen zúžen o více než 75 %, nedochází ke klinické manifestaci tepenného poškození.

Další příčinou ischemie je spasmus koronárních tepen (tzv. vazospastická neboli Prinzmetalova angina). Vzniklá kontrakce, která je několikanásobně silnější než u zdravé koronární cévy, způsobuje omezení průsvitu cévy. Takto náhle a extrémně zvýšený odpor se stává příčinou ischemie. Spasmus mohou vyvolat katecholaminy, které byly do oběhu uvolněny z nervových zakončení. Katecholaminy působí vazokonstrikci přes α_1 receptory, které se nachází převážně v epikardiálních cévách (SILBERNAGL A LANG, 2001).

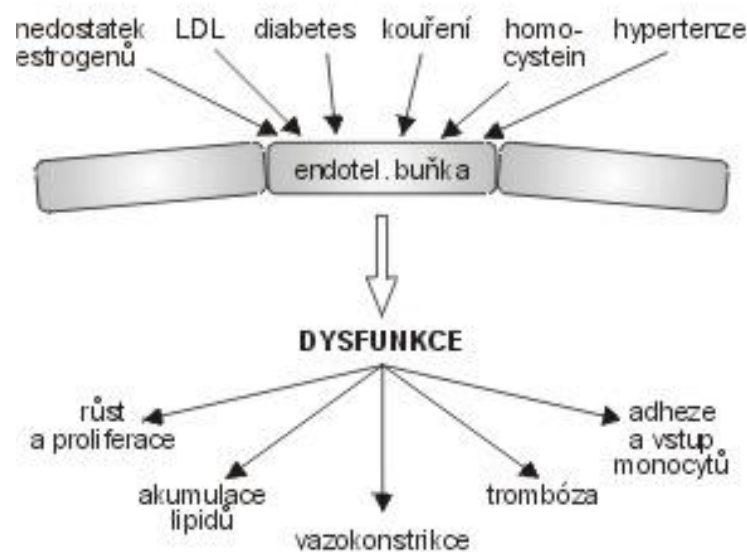
2.1.3 Následky a projevy ischemie myokardu

Za aerobních podmínek získává srdeční buňka energii ve formě ATP z β -oxidace (50-70 %) a glykolýzy (30 %). Při zvýšené svalové námaze také z laktátu. Pokud dojde v myokardu k ischemii a je přerušena dodávka O_2 , tvoří se ATP v anaerobních podmínkách. V tomto případě nevzniká jenom ATP, ale také kyselina mléčná, která disociuje na H^+ a laktát. Při „ischemické anoxii“ s laktátovým obratem dochází k minimální tvorbě ATP a ke kumulaci H^+ iontů. Pokud ischemie trvá déle, dochází vlivem tkáňové acidózy k zastavení glykolýzy. Následkem je ireverzibilní postižení buněk a uvolnění intracelulárních enzymů do krve (SILBERNAGL A LANG, 2001).

2.1.4 Vývoj aterosklerotického postižení koronárních tepen

Ateroskleróza je dlouhodobě probíhající onemocnění cévní stěny, jejíž struktura je alterována tvorbou atheromů. Onemocnění se po řadě let či desetiletí asymptomatického průběhu manifestuje svými komplikacemi: ICHS,

ischemickou cévní mozkovou příhodou nebo ischemickou chorobou dolních končetin, méně často pak komplikacemi v jiných lokalizacích (obliterace karotid, abdominální angina a další). Jedná se o chronické onemocnění cévní intimy, provázené akumulací cholesterolu, fibrózní tkáně, některých dalších komponent krve a změnami v medii cévní stěny. Po nespecifickém poškození cévního endotelu některými z rizikových faktorů (zvýšená koncentrace LDL cholesterolu, zvýšená hladina homocysteinu apod.) dochází ke stavu, který se nazývá „endoteliální dysfunkce“. Jde většinou o lokalizované postižení endotelu, kdy není porušena jeho integrita, ale jsou alterovány jeho funkce a endoteliální buňky mají zvýšený obrat a zvýšenou propustnost pro některé molekuly. Vzniká nerovnováha mezi vazokonstrikčními a vazodilatačními mechanismy, mezi prokoagulačními, protrombotickými, antikoagulačními a antitrombotickými mechanismy. Výsledkem je převaha vazokonstričních a protrombotických pochodů a aktivace zánětlivých a proliferačních dějů.



obr. 1: Příčiny a důsledky endoteliální dysfunkce (ŠPINAR A KOL., 2003)

Dochází mimo jiné ke zvýšené adhezi a agregaci trombocytů se zvýšeným uvolňováním růstových a proliferačních faktorů (především PDGF, který stimuluje proliferaci buněk hladné svaloviny). Chemotaktické faktory přitahují monocyty, které se transformují v makrofágy. Lipoproteiny snáze pronikají poškozeným endotelem do subendoteliálních prostor a masivně infiltrují cévní stěnu, kde jsou oxidovány. Oxidované lipoproteiny dále aktivují makrofágy a proces aterosklerózy progreduje. Rozvoje aterogeneze se účastní

prakticky všechny elementy cévního endotelu: buňky hladké svaloviny, monocyty (makrofágy), trombocyty a T-lymfocyty. Na konci těchto pochodů je pak fibro-ateromová léze, nebo ruptura či fisurace plátu s nasedající trombózou a obliterací postižené arterie. (ŠPINAR A KOL., 2003)

V další fázi dochází k progresi aterogenních změn. Pokračuje kumulace LDL v intimě cévy, rozvíjí se zánětlivá reakce. Hladké svalové buňky v medii cévy jsou aktivovány a prostupují do intimy, dochází k produkci extracelulární matrix, která vytváří stále ještě reverzibilní fibromuskulární plát.

Vzniklý ateromový plát obsahuje nekrotické jádro, které je vyplněno pěnovými buňkami, krystalky cholesterolu a solemi vápníku. Jádro je překryto fibromuskulární čepičkou. Tato čepička je místem, kde dochází nejčastěji k ruptuře plátu, a kde vzniká ideální povrch pro agregaci trombocytů.

2.1.5 Farmakoterapie

Farmakologický zásah při včasné sekundární prevenci ischemické choroby srdeční zahrnuje antitrombotickou a antianginózní terapii.

2.1.5.1 *Antianginózní terapie*

Antianginózní terapie snižuje intenzitu a frekvenci anginózních záchvatů. Léčba spočívá v odstranění nepoměru mezi dodávkou a potřebou kyslíku. Toho lze dosáhnout buď zvýšenou dodávkou kyslíku nebo snížením požadavků myokardu na kyslík.

Beta-blokátory bez vnitřní sympatomimetické aktivity snižují spotřebu kyslíku v myokardu negativně inotropním a chronotropním účinkem. Nitráty se působením volných sulfhydrylových skupin glutathionu mění na nitrosothiol, z něhož se v endoteliálních buňkách uvolňuje oxid dusnatý, který vyvolá snížení periferní rezistence cév. Blokátory kalciového kanálu zamezí vstupu Ca^{2+} do buňky pomalými kanály a vyvolají tak relaxaci hladké svaloviny v cévní stěně, snížení kontraktility myokardu a snížení elektrické dráždivosti a vodivosti převodního systému (HYNIE, 2001).

2.1.5.2 Antitrombotika

Antitrombotika tlumí aktivitu hemostatických mechanismů, které jsou v případě ICHS nežádoucí a život ohrožující. K inhibici primární hemostázy se používají protidestičkové léky (antiagregancia) a ke tlumení sekundární hemostázy antikoagulancia. Spontánní fibrinolýzu fibrinového trombu, spočívající v aktivaci plazminogenu na plazmin, je možné terapeuticky potencovat podáním tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) nebo lze přímo podat přirozená fibrinolytika, či jejich analoga (HYNIE, 2001).

2.1.5.2.1 Mechanismus účinku antitrombotik

Trombus, který se vytváří na poškozeném endotelu cév, je nejčastější příčinou ischemických příhod. K tvorbě trombu dochází na trombogenním povrchu cév (poškozený endotel). Do tohoto patofyziologického děje lze zasáhnout následujícími skupinami léčiv:

- endotel protektivními léky
- protidestičkovými léky
- antikoagulancii
- fibrinolytiky

2.1.5.2.1.1 Endotel protektivní léky

Jedná se o látky s protektivním vlivem na endotel, které působí různými mechanismy. Brání zvýšené adhezi trombocytů na cévní stěnu, aktivují lokální tvorbu endogenního t-PA a oxidu dusnatého (NO), tlumí tvorbu cytokinů a růstových faktorů podporujících neoangiogenezi, která se podílí na rozvoji aterosklerózy, a zvyšují přirozenou antitrombotickou schopnost endotelu. Do této skupiny léčiv lze zařadit hypolipidemika, nitráty nebo inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu a antagonisty antitrombinu (ŠPINAR A KOL., 2003).

2.1.5.2.1.2 Antikoagulancia

Účelem antikoagulační léčby je zamezit tvorbě trombinu z protrombinu a následně přeměně fibrinogenu na fibrin. Léčba současně zamezuje působení trombinu na některé další koagulační faktory (V, VIII a XIII). Faktor XIII

je důležitým činitelem hemostázy, protože aktivovaný F XIII stabilizuje trombus tvorbou nerozpustného fibrinu. Inhibice koagulačního procesu lze dosáhnout několika způsoby:

1. blokádou zahájení koagulační kaskády (TF, faktory fáze kontaktu)
2. blokádou aktivace protrombinu
3. blokádou účinku trombinu

Rozlišujeme přímé a nepřímé inhibitory trombinu. Mezi nepřímé inhibitory trombinu patří antitrombin, jehož účinek je zesílen heparinem. K přímým inhibitorům trombinu řadíme např. hirudin a jemu podobná analoga, která se váží přímo na aktivní místo trombinu a omezují tak jeho účinek v hemostáze. Nízkomolekulární heparin potencuje účinek AT k vyvázání faktoru Xa. Kumarinové preparáty inhibují funkci vitamin K epoxidázy. Vitamin K je nezbytný pro karboxylaci glutamové části prekurzorů koagulačních faktorů. Tato inhibice vede k tvorbě koagulačně neaktivních faktorů tzv. PIVKA (protein induced by vitamin K antagonist) faktorů (KATZUNG, 1994).

2.1.5.2.1.3 Fibrinolytika (trombolytika)

Fibrinolytika aktivují přeměnu plazminogenu na plazmin přímo v centrální části trombu a umožňují tak jeho postupnou degradaci. Altepláza a urokináza štěpí peptidické vazby molekuly plazminogenu přímo. Anistreptáza a streptokináza působí nepřímo, váží se na molekulu plazminogenu a vytváří komplex streptokináza-plazminogen, který je konvertován na komplex streptokináza-plazmin, který přeměňuje reziduální plazminogen na plazmin (ŠPINAR A KOL., 2003).

2.1.5.2.1.4 Protidestičkové léky (antiagregancia)

V současnosti dostupné protidestičkové léky interferují s různými kroky aktivačních procesů, včetně adheze, uvolňovací reakce nebo agregace a snižují riziko arteriální trombózy, ale mohou zvyšovat riziko krvácení při jejich předávkování. Indikace protidestičkové léčby vyplývá především z přítomnosti rizikových faktorů tepenné okluze. Antiagregační látky se efektivně využívají při primární a sekundární prevenci kardiovaskulárních chorob (BOSEN A KOL., 1984; HENNEKENS A KOL., 1997).

2.2 Funkce trombocytů v hemostáze

Trombocyty spolu s cévní složkou hrají hlavní roli v tvorbě primární hemostatické zátky. Tento proces se uplatňuje hlavně v místě ruptury aterosklerotického plátu. Při narušení endotelové výstelky dochází k obnažení kolagenních vláken v subendoteliální části. Krevní destička adhezuje k odhaleným kolagenním vláknům pomocí povrchových glykoproteinových receptorů (GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/V/IX). Vazba je zprostředkována bivalentními proteiny: vWF a fibronectinem. Adhezí na porušený endotel cévy dochází k aktivaci trombocytů, ke změně jejich tvaru, centralizaci granulí a sekreci proagregačních a chemických působků (serotonin, PDGF, PF4, β TG). Z granulí se uvolní další proagregační působky (ADP, TXA_2). Dochází k agregaci okolních a adherovaných destiček přes glykoproteinové receptory IIb/IIIa. V okolí poškozeného místa vzniká tzv. bílý trombus (PECKA, 2004).

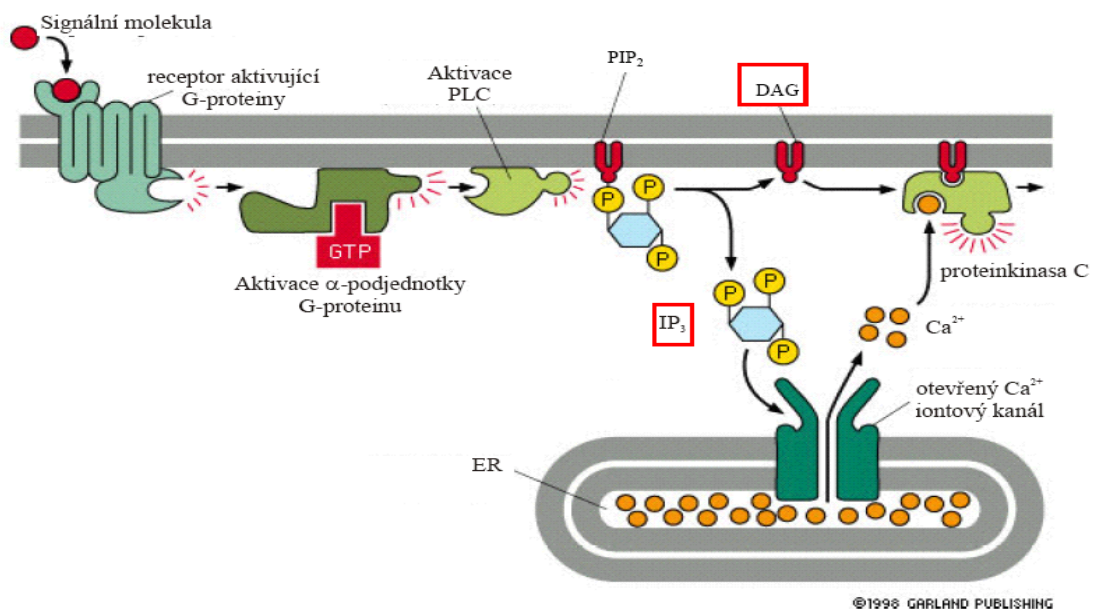
2.3 Aktivace krevní destičky

Krevní destičky podléhají řadě interakcí s rozpustnými složkami krevní plazmy nebo s narušeným povrchem endotelu. Výsledkem těchto interakcí může být jejich aktivace, při které se mění tvar destičky, metabolismus i látková přeměna. (KROLL A SCHAFER, 1995; KROLL A SCHAFER, 1989). Aktivace trombocytů je proces závislý na aktivačních a inhibičních signálech, které působí na povrchu trombocytů. Tyto signály (ligandy) jsou poznávány a předávány do nitrobuněčného prostoru specifickými membránovými receptory.

Obsazení specifického receptoru na povrchu membrány vede ke změně konformace transduceru (G regulačního proteinu), tato změna vede k navázání GTP. Alfa podjednotka s navázaným GTP se oddělí od zbývajících podjednotek a vazbou na efektorový enzym změní jeho aktivitu. Takto aktivovaný enzym generuje molekulu „druhého posla“. Podjednotka α má vlastní GTPázovou aktivitu, když defosforyluje ATP na ADP oddělí se od efektorového enzymu a připojí se zpět k β a γ podjednotce. Aktivita efektoru bez navázané α podjednotky se vrací do původního stavu (HYNIE, 2001).

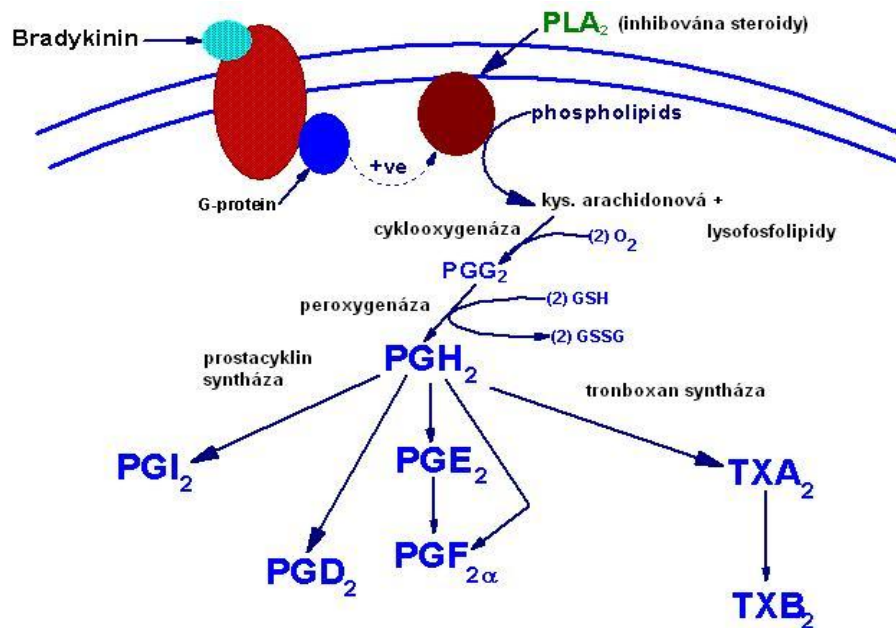
Efaktorovým enzymem je fosfolipáza C (PLC), která stimuluje hydrolýzu minoritních inositolových lipidů v buněčných membránách.

Z fosfatidylinositol-bi-fosfátu (PIP₂) vzniká inositoltrifosfát (IP₃) a diacylglycerol (DAG), tzv. druzí poslové. Primární funkcí IP₃ je uvolnění endogenního Ca²⁺ z endoplazmatického retikula. Ca²⁺ obsazuje své endogenní receptory (kalmodulin). Komplex s kalmodulinem aktivuje Ca²⁺/kalmodulin dependentní proteinkinázu. DAG aktivuje s dalšími kofaktory (fosfatidylserin, Ca²⁺) proteinkinázu C (PKC), která ovlivňuje další enzymy. PKC má široké spektrum zásahů v cytoplasmě, kde fosforyluje serinové a threoninové zbytky řady bílkovin.



obr. 2: Fosfoinositidová signální dráha

Dále může DAG degradovat na kyselinu arachidonovou. Stejným směrem může být DAG metabolizován lipázou (PLC). Kyselina arachidonová vzniká i další metabolickou cestou - působením aktivované protein lipázy A₂. V cyklu kyseliny arachidonové se tvoří produkty, které mají významný proagregační (TXA₂) a protiagregační efekt (PGI₂) viz obr. 3.



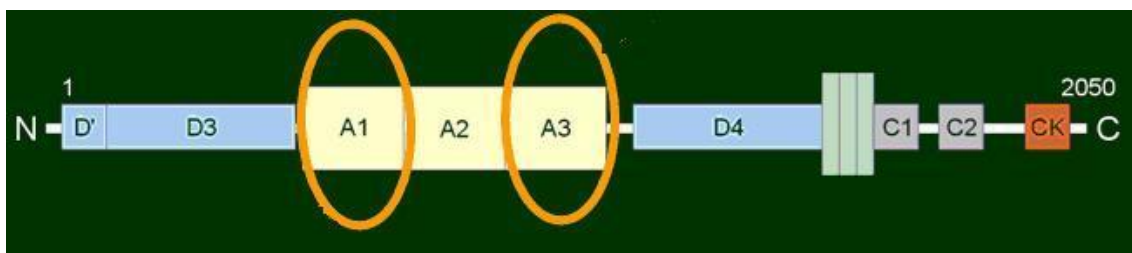
Obr. 3: Syntéza prostaglandinů – cyklus kys. arachidonové

2.4 Adheze

Adheze destiček je proces, při kterém dochází k přilnutí destiček na jiné než destičkové povrchy (ROTH, 1991). Adheze krevních destiček na subendotelové struktury poškozené cévy je komplexní proces, který vyžaduje přítomnost několika adhezních proteinů. Vedle trombocytů se na adhezi podílejí endotelové buňky, plazmatické adhezní proteiny a hemodynamické změny (smykové rychlosti, množství a viskozita krve, velikost a tvar cév). Uplatňují se rovněž některé látky především von Willebrandův faktor (vWF), dále fibronektin, fibrinogen.

VWF má vazebná místa pro GP Ib, GP IIb/IIIa a pro kolageny typu I, III a VI. Tato vazebná místa jsou důležitá pro navázání vWF na obnažené subendoteliální struktury (kolagenová vlákna) a následně připojení krevních destiček vyvázáním vWF na GP Ib v komplexu GP Ib/V/IX. Krevní destičky však mohou adherovat ke kolagením vláknům také přímo pomocí receptorového komplexu GP Ia/IIa (NIEUWENHUIS A KOL., 1985).

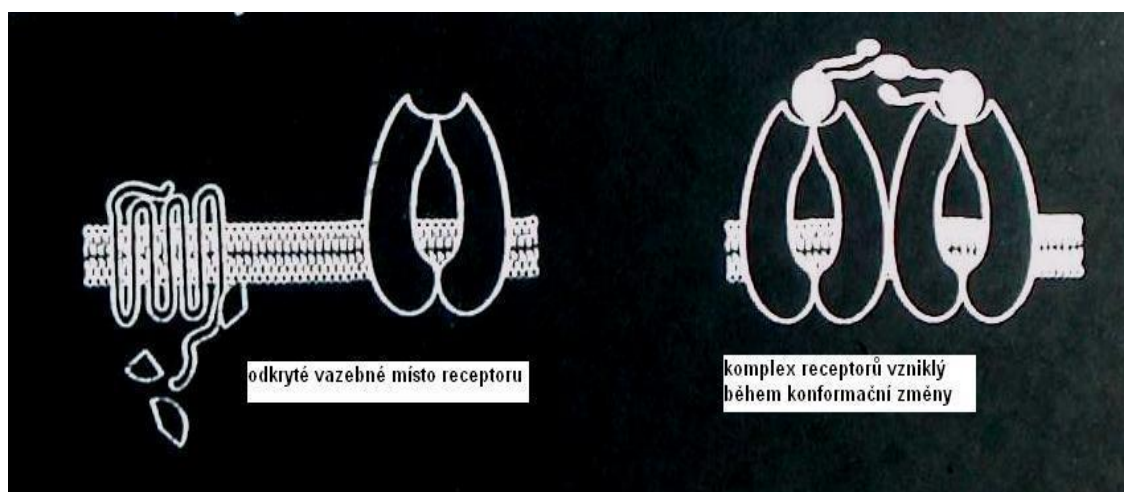
Adheze komplexu GP Ib/V/IX je zprostředkována vazbou GP Ib na A1 doménu vWF, který je přes doménu A3 vázán ke kolagenním strukturám.



Obr. 4: Von Willebrandův faktor

2.5 Agregace

Agregace je vzájemné shlukování krevních destiček. Dochází k němu vlivem změny konformace glykoproteinového komplexu GP IIb/IIIa po obsazení receptorových míst na membráně krevní destičky agonisty. Navázáním na své specifické receptory na membráně krevní destičky vyvolají agonisté konformační změnu a umožní propojení destiček přes proteinové můstky tvořené fibrinogenem nebo vWF. Navázáním aktivátoru na membránový receptor se na membráně krevní destičky odkryjí vazebná místa integrinového receptoru Gp IIb/IIIa. Glykoproteiny jsou v neaktivované destičce uspořádány volně, po stimulaci se glykoproteiny aktivují a dojde ke konformační změně (NURDEN, 1988).

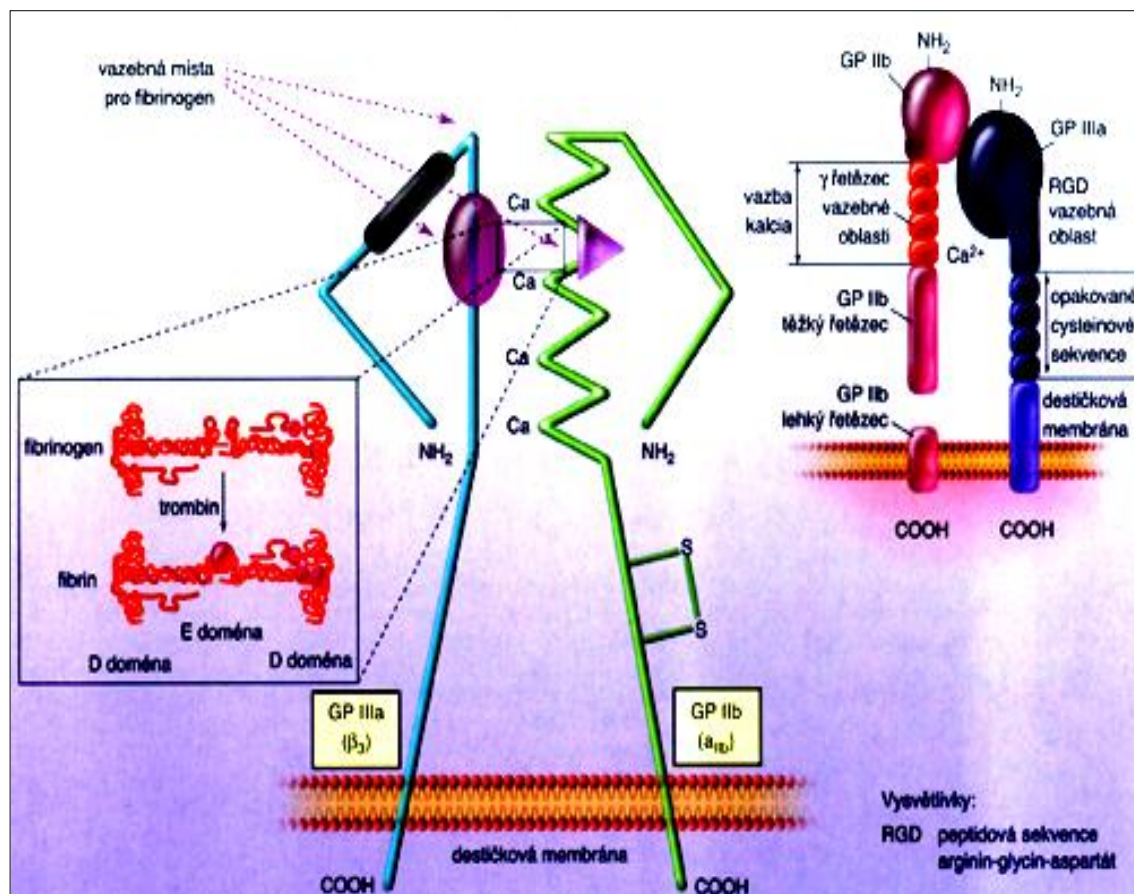


Obr. 5: Konformační změna komplexu GP IIb/III

Po ovlivnění receptorů na membráně krevní destičky dochází ke zvýšení povrchové denzity GpIIb/IIIa (glykoproteiny jsou uvolňovány z α -granulí a z denzních granulí). Na aktivovaný glykoproteinový komplex se váží domény fibrinogenu obsahující sekvence *Arg-Gly-Asp* (tzv. RGD sekvence) a dodekapeptid karboxylové části γ -řetězce molekuly fibrinogenu.

Kromě fibrinogenu je RGD sekvence přítomna i na dalších ligandech, jako vWF, vitronectin, trombospondin a fibronectin. Tyto ligandy mohou být rovněž navázány na receptor GpIIb/IIIa (MAYO A KOL., 1996).

Destičky se spojují přes molekulu fibrinogenu vazebnými můstky (GpIIb/IIIa - fibrinogen - GpIIb/IIIa). Pro vazbu jsou zejména důležité koncové karboxylové skupiny gama řetězců v D - oblasti fibrinogenu.



Obr. 6: Struktura GP IIb/IIIa

2.6 Antiagregační látky

Přijdou-li krevní destičky během cirkulace do styku s obnaženým kolagenem v subendoteliální vrstvě cévní stěny v důsledku ruptury aterosklerotického plátu, dochází v tomto místě k jejich adhezi. Záleží na rovnováze proagregačních a antiagregačních mechanismů, zda tento děj přestoupí do tvorby destičkového trombu (VOJÁČEK A KOL., 2002).

Antiagregační léčba je zaměřena na omezení shlukovací schopnosti krevních destiček (BADIMON A BADIMON, 1996). Aktivace krevních destiček nabízí vzhledem k počtu zúčastněným faktorů několik úrovní, na kterých je možno farmakologicky zasáhnout. Léčbu je možné kombinovat.

Trombocyty je možné inhibovat ve fázi aktivace, adheze nebo agregace, popřípadě můžeme potencovat jejich stabilitu. Využívá se:

■ **Stabilizace krevních destiček**

- zvýšení destičkového cAMP a cGMP

■ **Blokáda adheze krevních destiček na subendoteliální matrix**

- Inhibitory receptoru GP Ib/IIa
- antagonisté vWF

■ **Blokáda agregace krevních destiček – blokátory GP IIb/IIIa**

1) Přímé inhibitory receptorů GP IIb/IIIa

- na bázi monoklonálních protilátek
- Inhibitory s malou molekulou
 - syntetické peptidové inhibitory GP IIb/IIIa
 - nepeptidové inhibitory GP IIb/IIIa (fibany)

2) Blokátory geneze trombinu

- LMWH (nízkomolekulární hepariny)

■ **Blokáda aktivačních cest a cyklů**

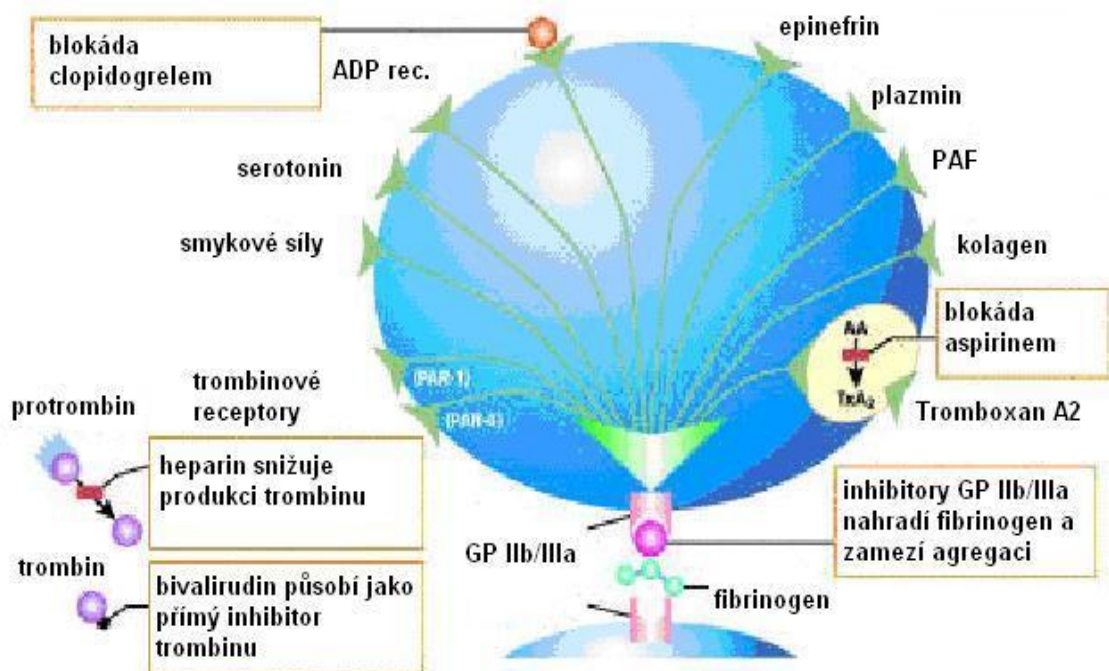
1) Inhibitory cyklu kyseliny arachidonové

- Inhibice COX - 1

- Současná inhibice tromboxansyntetázy a blokace receptorů pro TXA_2

2) Inhibitory receptorů induktorů agregace krevních destiček

- Selektivní inhibitory (inhibují 1 receptor)
 - Blokátory receptoru pro ADP
 - Blokátory receptoru pro trombin
- Komplexní inhibitory (inhibují více receptorů najednou)



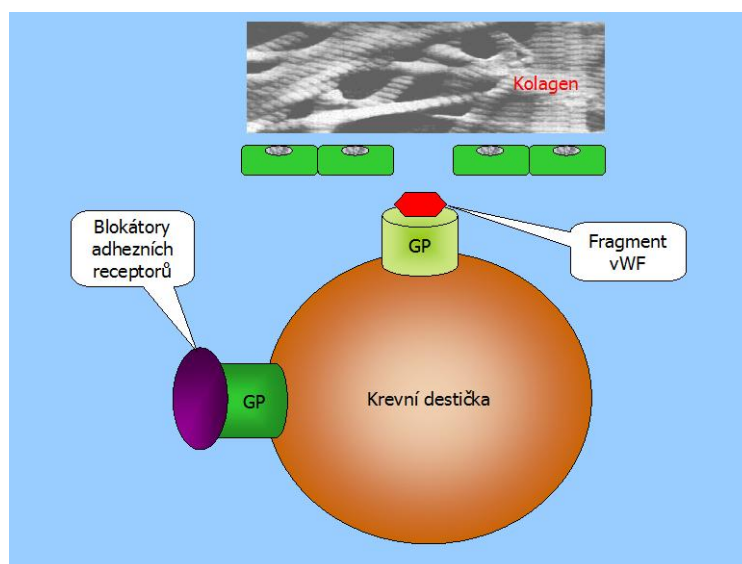
Obr. 7: Možnosti aktivace a blokády aktivace trombocytů

2.6.1 Zvýšení stability membrány trombocytu

Zvýšení stability membrány krevních destiček se docílí nejčastěji zvýšením koncentrace destičkového cAMP, což je zprostředkováno inhibicí fosfodiesterázy, která přeměňuje funkční cAMP na neaktivní AMP. Další možností je blokace zpětného příjmu adenosinu, který přes A_2 receptory stimuluje destičkovou adenylátcyklázu. Nejpoužívanějším přípravkem je dipyridamol, který v porovnání s kyselinou acetylsalicylovou (ASA) výrazněji inhibuje adhezi krevních destiček, jeho účinek na agregaci je naopak nižší (KLIMKOVÁ, 2002).

2.6.2 Inhibice adheze

Ve fázi adheze lze inhibovat vazbu na obnažená kolagenní vlákna buď na úrovni destičkových receptorů nebo blokádou vWF, který tuto vazbu zprostředkuje. Používají se zkušebně blokátory adhezních glykoproteinových receptorů GP Ib/IIa, mezi které patří kyselina aurinkarboxylová, heterogenní směs polykarboxylových polymerů, nebo proteiny izolované z jedu zmije *Bothrops jararaca*. Jako antagonisté vW faktoru se využívají jeho nefunkční fragmenty, které obsazují vazebná místa pro vWF. Blokáda v těchto místech snižuje vazebnou schopnost krevních destiček vázat se na obnažená kolagenní vlákna, zabraňuje se jejich adhezi, aktivaci a pozdější agregaci.

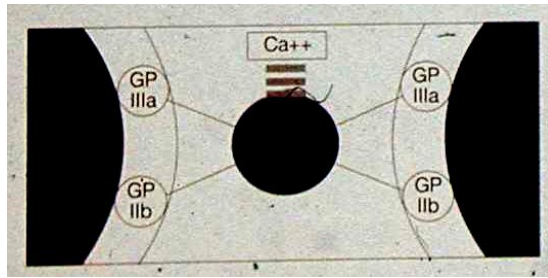


Obr. 8: Inhibice adheze

2.6.3 Blokáda agregace krevních destiček

2.6.3.1 *Blokátory receptorů GP IIb/IIIa*

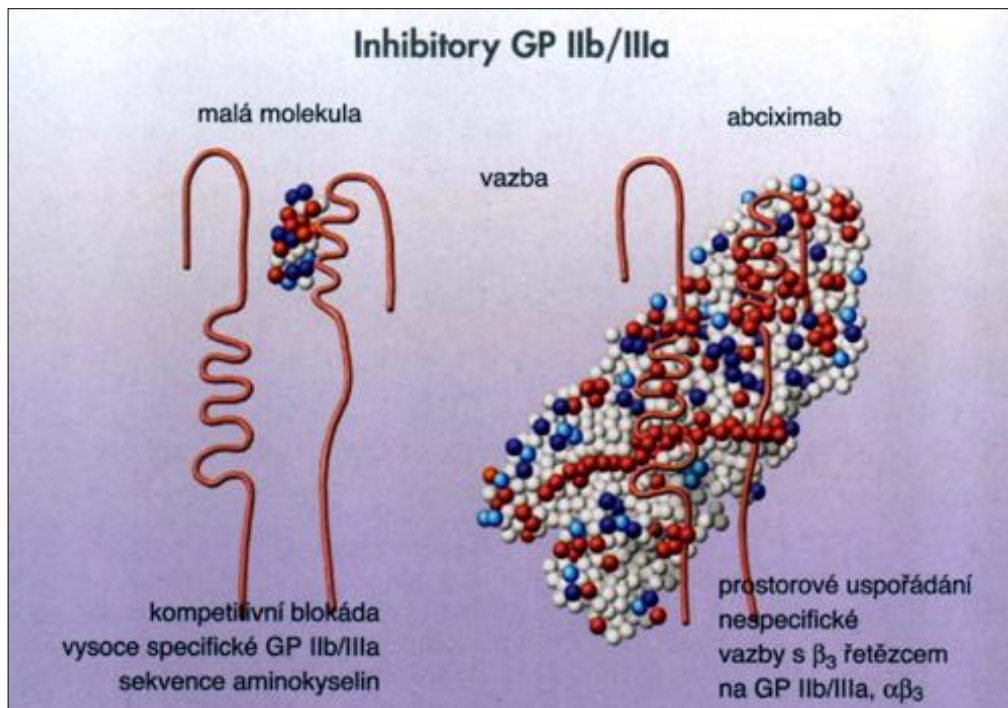
Inhibitory glykoproteinových receptorů typu IIb/IIIa zasahují v místě konečného a společného bodu všech cest vedoucích k aktivaci krevních destiček a v důsledku toho blokují agregaci destiček, která je vyvolána všemi agonisty. Inhibitory blokují připojení fibrinogenu k receptoru IIb/IIIa na krevních destičkách tím, že obsadí receptorové místo na konformačně změněné molekule GP IIb/IIIa. Inhibitory glykoproteinových receptorů IIb/IIIa jsou v současné době neúčinnějšími protideštičkovými léky (PECKA, 2004).



Obr. 9: Blokátory GP IIb/IIIa

2.6.3.1.1 Inhibitory s malou molekulou

Tyto látky napodobují RGD sekvenci aminokyselin fibrinogenu a váží se specificky na receptor krevních destiček IIb/IIIa.



Obr. 10: Inhibitory GP IIb/IIIa (PECKA, 2004)

- Peptidové inhibitory

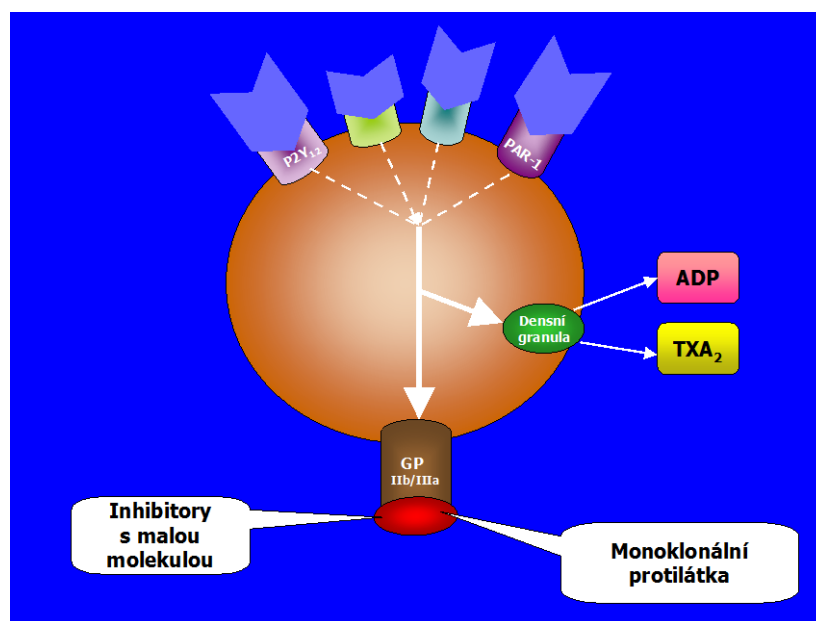
Eptifibatid je cyklický heptapeptid odvozený z hadího jedu pygmejového chřestýše. Má nahrazen Lys za Arg. Jedná se tedy o sekvenci KGD, která napodobuje RGD sekvenci a váže se s vysokou afinitou na GP IIb/IIIa.

- Nepeptidové inhibitory

Mezi nepeptidové inhibitory se řadí tirofiban a lamifiban, tyrosinové deriváty s vysokou afinitou k GPIIb/IIIa.

2.6.3.1.2 *Inhibice na bázi monoklonální protilátky*

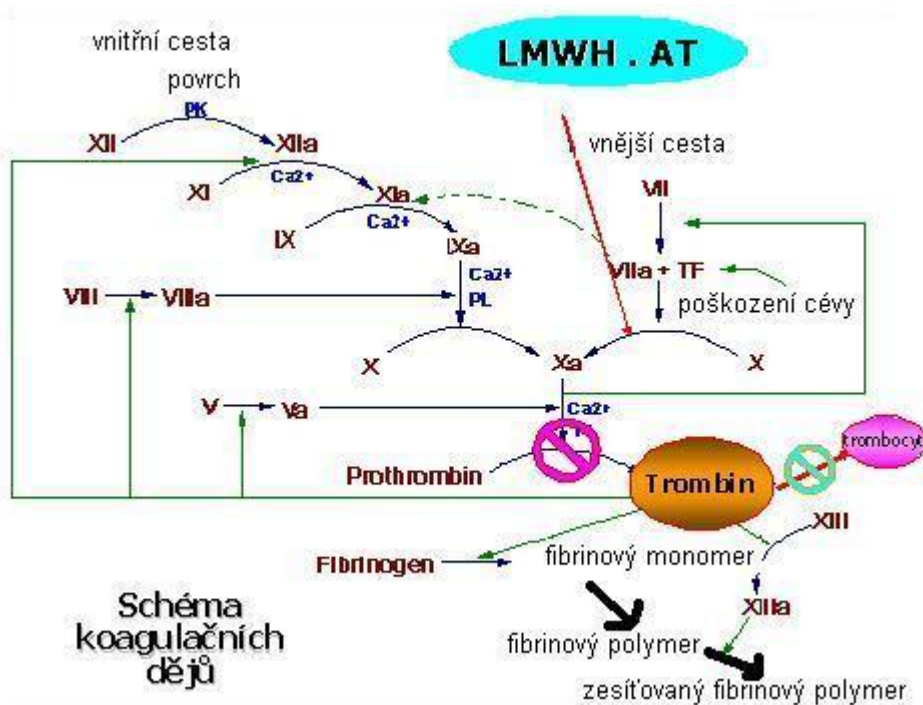
Abciximac je chimerická myš nebo lidská monoklonální protilátka, která nespecificky blokuje sterickou zábranou destičkový receptor GP IIb/III. Blokuje i vitronectinový receptor ($\alpha v\beta 3$) endotelií, buněk hladkého svalu a destiček a váže se i na $\alpha u\beta 2$ (Mac-1) receptor monocytů, neutrofilů a NK buněk, čímž brání adhezi k subendoteliálním strukturám (PECKA, 2004).



Obr. 11: *Inhibitory GP IIb/IIIa*

2.6.3.2 *Blokátory trombinu*

Nízkomolekulární hepariny (LMWH) v přítomnosti antitrombinu potencují jeho účinek na aktivovaný faktor Xa a tím snižují produkci aktivátoru krevních destiček – trombinu. Aktivace destiček ostatními mechanizmy zůstává zachována (VOJÁČEK, 2003).



Obr. 12: Místo působení LMWH

2.6.4 Blokáda aktivačních cest a cyklů

Aktivace trombocytů začíná aktivací receptoru na membráně. Pokud selektivními nebo komplexními inhibitory zablokujeme cesty aktivace jednotlivých agonistů, trombocyty nebudou aktivovány a nedojde ani k tvorbě destičkového trombu. Dále je možné pomocí inhibičních látek blokovat vnitřní metabolické cykly, při kterých se tvoří proagregační látky (např. cyklus kyseliny arachidonové) (PECKA, 2004).

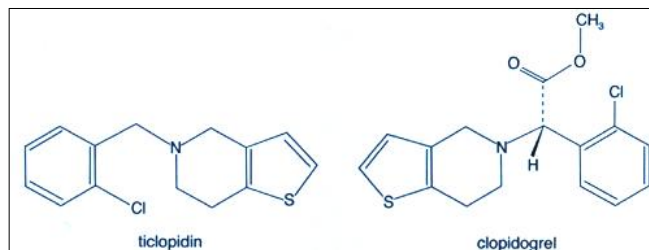
2.6.4.1 **Blokace membránových receptorů krevních destiček**

2.6.4.1.1 Selektivní inhibitory

Selektivní inhibitory inhibují jeden určitý receptor.

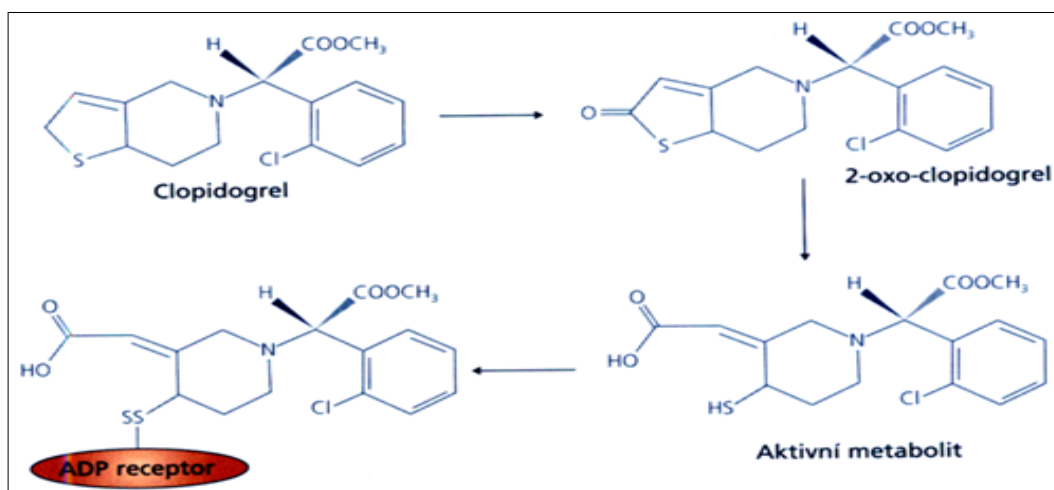
2.6.4.1.1.1 *Blokátory receptoru pro ADP*

ADP je vylučovaný z denzních granul destiček a z aktivovaného cévního subendotelu. *Ticlopidin* a *clopidogrel* jsou thienopyrimidinové deriváty, které selektivně a ireversibilně blokují destičkové ADP receptory P2Y₁₂ tím brání ADP dependentní aktivaci komplexu GP IIb/IIIa.



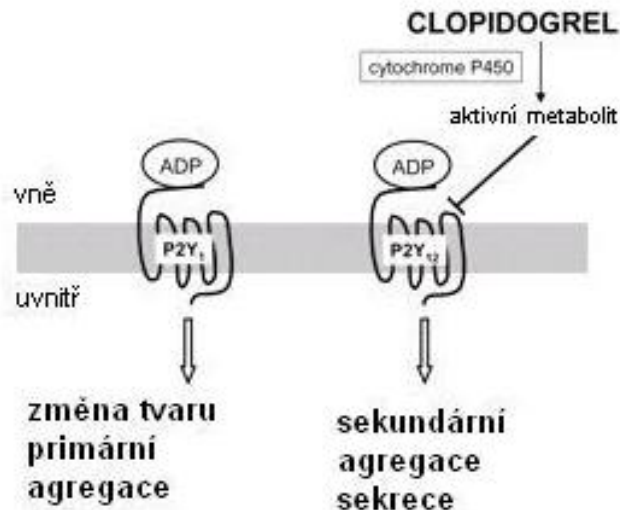
Obr. 13: Selektivní blokátory ADP receptorů (CATTANEO, 2004).

Deriváty nejsou aktivní přímo – protideštičkovou aktivitu získávají až po biotransformaci v játrech oxidací cytochromovým komplexem P-450. Vzniklý metabolit se váže na receptory P2Y₁₂, které jsou spojeny s cestou inhibice adenylcyklázy a s cestou aktivace fosfatidylinositoltrifosfátkinázy. Jiné cesty aktivace přes ADP receptory (P2Y₁ či P2Y₁₃) zůstávají neovlivněny.



Obr. 14: Biotransformace clopidogrelu v játrech na aktivní metabolit

Destičky nemocných, kteří užívají tyto léky nejsou schopné agregovat po stimulaci ADP, ale zachovávají si schopnost změny tvaru po přidání ADP. Blokáda receptorů P2Y₁ není schopna inhibovat všechny ADP receptory aktivace destiček. Je snaha najít inhibitory receptorů P2Y_{AD}.



Obr. 15: Působení clopidogrelu na ADP receptory (CATTANEO, 2004).

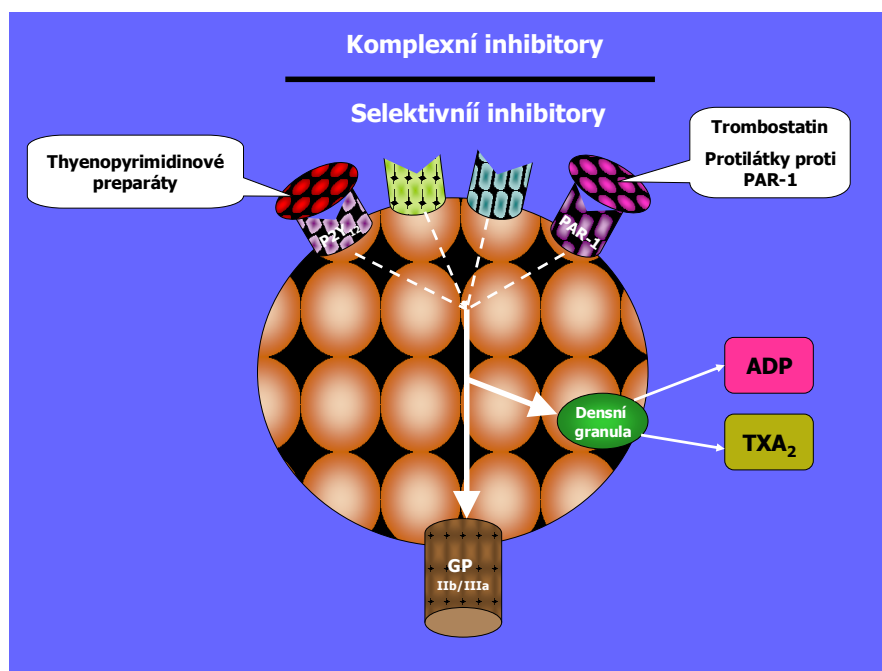
2.6.4.1.1.2 Blokátory receptoru pro trombin

Účinek blokátorů trombinových destičkových receptorů PAR-1 je založen na principu protilátek proti vlastnímu receptoru. *Trombostatin* je degradační oligopeptidový produkt bradykininu o 5 aminokyselinách, který se váže přímo na aktivní místo receptoru.

2.6.4.1.1.3 Komplexní inhibitory

Komplexní inhibitory jsou léčiva s komplexním působením, která ovlivňují více receptorů najednou.

Anagrelid inhibuje aktivaci po řadě podnětů např. ADP, trombin, kyselina arachidonová a kolagen. Po dlouhodobém podávání se může objevit trombocytopenie.



Obr. 16: Blokátory membránových receptorů

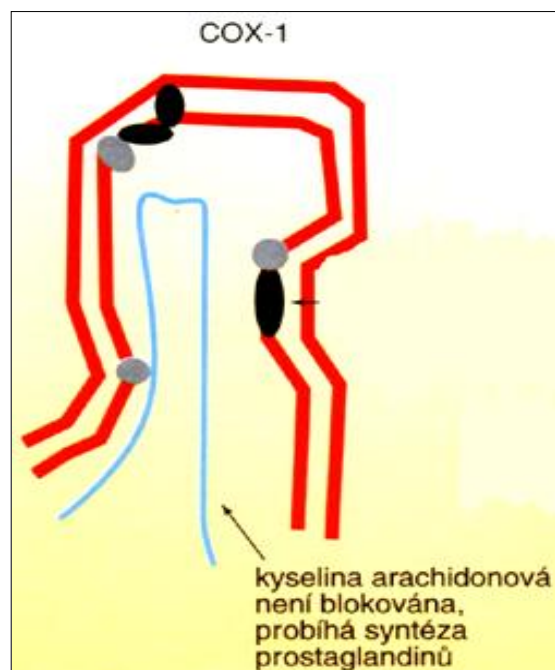
2.6.4.2 Inhibice enzymů cyklu kys. arachidonové

2.6.4.2.1 Inhibice COX-1 kyselinou acetylsalicylovou

Jako analgetikum a antipyretikum byl již 400 let před Kristem Hippokratem používán odvar z vrbové kůry, která obsahuje salicin - název odvozen od latinského názvu vrby – Salix (DALEN, 1991). První vědeckou zprávu o antipyretickém účinku odvaru z vrbové kůry přednesl v roce 1763 reverend Edward Stone na schůzi Royal Society. Účinná látka salicin byla poprvé izolována o několik let později na mnichovské universitě profesorem Johanem A. Bucherem (BUCHANEC A KOL., 2003). Italský chemik Raffael Piria vyluhoval z extraktu vrbové kůry kyselinu salicylovou (MCKEE A KOL., 2002). V roce 1897 syntetizoval Felix Hoffmann derivát kyseliny salicylové s menšími nežádoucími účinky, kyselinu acetylsalicylovou (SAMAMA A ELALAMY, 2000). V roce 1950 bylo poprvé prokázáno prodloužení krvácivosti po podání aspirinu. Důkazy o vlivu acetylsalicylové kyseliny na krevní destičky publikoval v roce 1967 Morris, antitrombotický efekt byl prokázán v roce 1970. Až mnohem později po tomto zjištění začala být ASA používána jako antiagregační látka při terapii ICHS (BUCHANEC A KOL., 2003).

Antiagregační účinek ASA je dán interferencí s biosyntézou cyklických prostanoidů v cyklu kyseliny arachidonové (AWTRY A LOSCALZO, 2000). V krevní destičce se prostaglandiny mohou tvořit v procesech, při kterých se kyselina arachidonová uvolňuje z membránových fosfolipidů deacylací zprostředkovanou fosfolipázami, nejčastěji PLA₂ nebo PKC a následně je účinkem cyklooxygenázy přeměněna na prostaglandiny. Uvolňování kyseliny arachidonové z buněčné membrány je stimulováno vazopresinem, bradykininem a noradrenalinem. Inhibováno je např. kortikosteroidy. ASA je poměrně rychle deacetylována játry – plazmatický poločas je asi 20 minut.

V roce 1991 byly zjištěny 2 izofomy cyklooxygenázy: COX-1 a COX-2 (SAMAMA A ELALAMY, 2000). COX-1 se nachází v krevních destičkách, kdežto COX-2 převážně v monocytech a makrofázích, ve kterých se tvoří „de novo“. Obě izofomy cyklooxygenázy jsou membránově vázané enzymy, které tvoří úzký a dlouhý hydrofobní kanál, do kterého vstupuje kyselina arachidonová uvolněná z poškozené membrány. Enzymy katalyzují přeměnu této kyseliny na prostaglandiny. COX-1 vzniká expresí genu o velikosti 22 kB na chromozomu 2 nebo 9, kdežto COX-2 je kódován genem o velikosti 8,3 kB lokalizovaným na chromozómu 1.

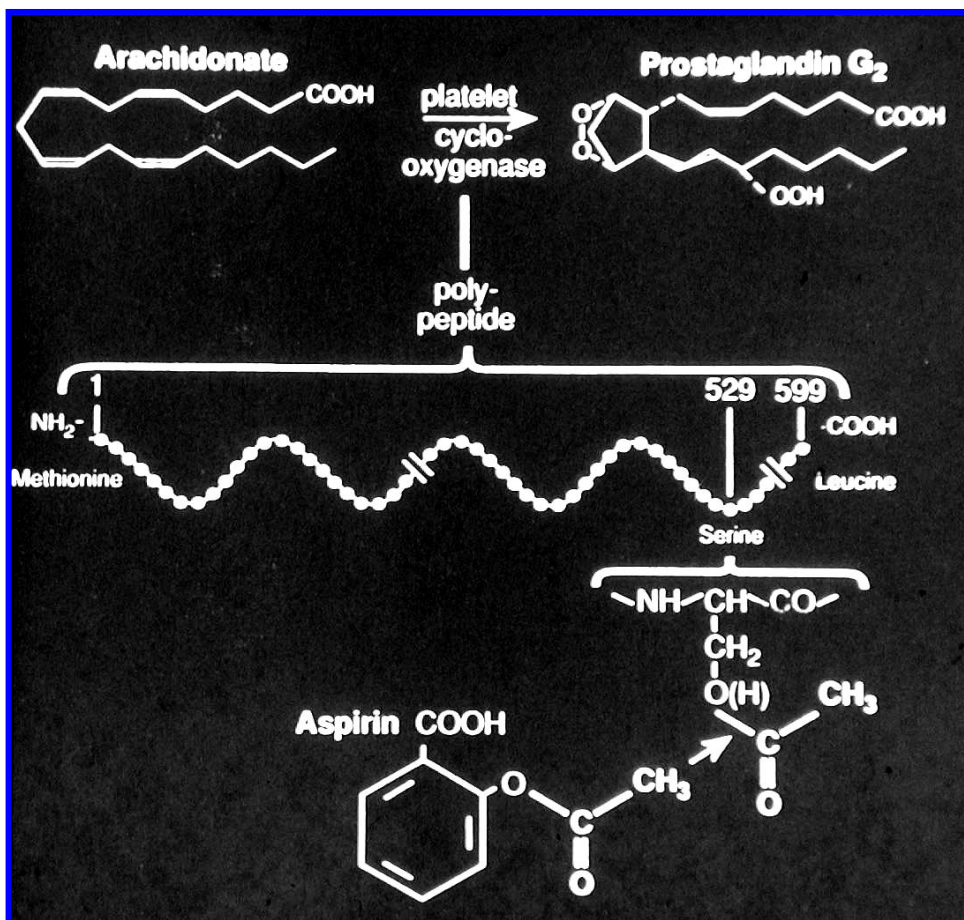


Obr. 17: Působení COX-1

Bílkovinné řetězce mají stejnou molekulovou hmotnost (72 kDa) a vykazují 63 % homologii v sekvenci aminokyselin (VANE A SPOL., 1998). ASA je 50 – 100 krát účinnějším inhibitorem destičkové COX–1, než monocytární COX–2. Přestože plazmatický poločas ASA je poměrně krátký, stačí za tuto dobu inhibovat prakticky všechny destičky. Navíc se předpokládá, že ASA inaktivuje COX i v relativně zralých megakaryocytech, ve kterých jsou již přítomny zárodky krevních destiček (AWTRY A LOSCALZO, 2000). Inhibice je nevratná a vzhledem k tomu, že destičky nedokáží COX syntetizovat, přetrvává po celou dobu biologického života trombocytu (10 – 12 dní). V současné době se používá terapeutické dávky ASA v rozmezí 50 – 100 mg za den. Tato léčba by měla zajistit účinnou blokaci syntézy TXA₂ v destičkách, bez současné blokady endotelové produkce PGI₂.

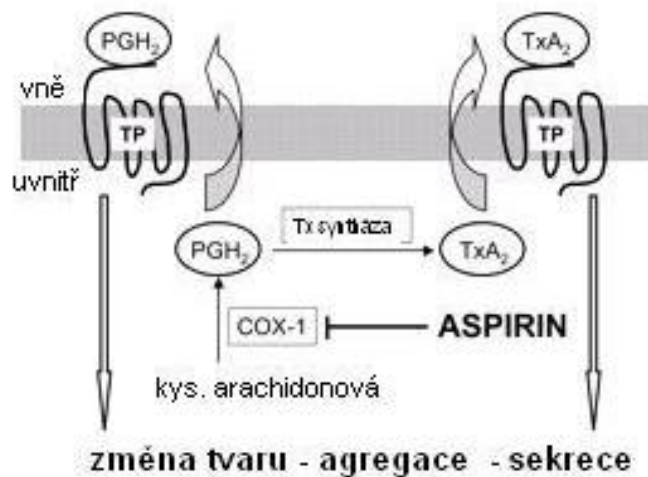
Účinek ASA na krevní destičky a endotelové buňky

ASA ireverzibilně acetyluje cyklooxygenázu v cyklu kyseliny arachidonové. Molekulární mechanismus této inhibice spočívá v blokádě COX kanálu v důsledku acetylace hydroxylové skupiny serinového rezidua v místě Ser⁵²⁹. Tím je zabráněno přístupu substrátu ke katalytickému místu enzymu (PATRONO, 2001; SAMAMA A ELALAMY, 2000). Současně je acetylována i COX–1 v endotelových buňkách. Zamezuje se tak následné konverzi arachidonové kyseliny na výrazné vasodilatátory, zejména na prostacyklin PGI₂.



Obr. 18: Acetylace serinového rezidua COX – 1

ASA snižuje mortalitu a možnost reinfarktu pokud je podávána jako krátkodobá léčba po akutním infarktu myokardu, při podávání pacientům s nestabilní anginou pectoris nebo pokud je podávána jako dlouhodobá sekundární prevence pacientům s kardiovaskulárním onemocněním. V těchto indikacích se ASA používá jako lék volby. Užívání jiných antiagregancií je z ekonomických důvodů omezeno. ASA má také relativně nízké nežádoucí účinky (Tramer,2000). Existuje fenomén, který se nazývá „rezistence na ASA“. O tomto jevu lze hovořit buď z klinického pohledu – jako o selhání protektivního účinku ASA před trombotickou komplikací nebo lze rezistenci definovat laboratorně - jako neschopnost způsobit in vitro prokazatelnou inhibici destičkových funkcí (HILMEROVÁ A FILIPOVSKÝ, 2004).



Obr. 19: Působení aspirinu (CATTANEO, 2004)

2.6.4.2.2 Současná inhibice tromboxansyntázy a blokace receptorů pro TXA₂

K této inhibici se využívá imidazolových přípravků (např. vapiprost nebo ridogrel). Jedná se o kombinované blokátory receptorů TXA₂ a tromboxansyntázy.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Odběr krve

Odběr krve byl prováděn za standardních podmínek (nalačno, z nezatažené paže). Místo vpichu bylo předem dezinfikováno. V uzavřeném odběrovém systému (VACUETTE® – Greiner) se do odběrových nádobek s antikoagulačním roztokem citrátu sodného odebere příslušné množství žilní krve. Obsah zkumavky se opatrně promíchá a nesrážlivá krev se použije k dalšímu zpracování. Krev byla zpracována do 1 hodiny po odběru.

Odběrová nádobka:

Jako odběrová nádobka byly používány zkumavky VACUETTE® Coagulation Tubes, které obsahují 0,4 ml 0,109 mol/l (3,2%) roztoku citrátu sodného. Roztok citrátu je při odběru v odběrové zkumavce smíchán v poměru 1:9 s krví. Používané koagulační zkumavky mají světle modré víčko.

3.1.2 Příprava plazmy pro agregační studie

Krev odebraná do nádobky s citrátem sodným se stáčí v nechlazené centrifuze 10 minut při 110 - 150 g. Získaná plazma bohatá na destičky (platelets rich plasma PRP) se odsaje, zbylý obsah zkumavky se podrobí následné centrifugaci po dobu 15 minut při 2500 g. Potom se odsaje plazma chudá na destičky (platelets poor plasma PPP). V obou plazmách se stanoví počet krevních destiček, pokud množství destiček v PRP přesáhne hodnotu $250 \cdot 10^9/l$, upraví se na tuto hodnotu přidáním PPP. Stabilita plazmy po separaci je 2 hodiny při laboratorní teplotě.

3.1.3 Agregace trombocytů kationickým propylgalátem

Agregace patří mezi základní funkční vyšetření primární hemostázy, která prověřují schopnost trombocytů agregovat buď samovolně nebo po stimulaci induktory (např. ADP, adrenalin, AA, kolagen, ristocetin). Agregace i tvorba destičkových agregátů, může být měřena na základě změny optické hustoty vzorku v plazmě bohaté na destičky nebo změnou impedance

u elektrod ponořených do plné nesrážlivé krve (JOHNS, 2004). Metodu agregace měřenou na základě změn optické hustoty vzorku poprvé popsal Born (BORN, 1963).

Ke stanovení parametrů agregace krevních destiček po stimulaci kationickým propylgalátem (CPG) byl použit optický agregometr APAC 4 (Helena Laboratories). Optická hustota plazmy chudé na destičky (PPP) se nastaví jako 100 % optická hustota, zatímco optická hustota plazmy bohaté na destičky (PRP) se nastaví na 0 %. Přístroj turbidimetricky registruje změnu optické hustoty v PRP po přidání induktoru, který vyvolá tvorbu destičkových agregátů, které zvýší světelnou transmissi. Výsledkem měření je příslušná agregační křivka PRP (závislost světelné transmise na čase), u které se hodnotí výška maximální amplitudy (% optické hustoty v porovnání s rozdílem optických hustot PPP a PRP). Sklon agregační křivky – slope - vyjadřuje rychlost náběhu agregace v %/min a T 50 odpovídá času potřebnému k dosažení 50% maximální amplitudy.

Přístroj:

APAC 4 (Automated platelet aggregation and coagulation tracer) je agregometr, který má 4 kanály pro souběžné měření; měřicí pozice pro kyvety jsou inkubovány na 37 °C. Aby se předešlo rozdílům v transmissi u odlišných PRP je přístroj nastaven na standardní počet trombocytů v PRP $250 \cdot 10^9/l$. Při takovémto nastavení transmise PPP odpovídá hodnotě po kompletní agregaci a transmise PRP odpovídá 0% transmissi.

Reagencie

Jako induktor agregace je používán kationický propylgalát sodný (Biovendor) v koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$.

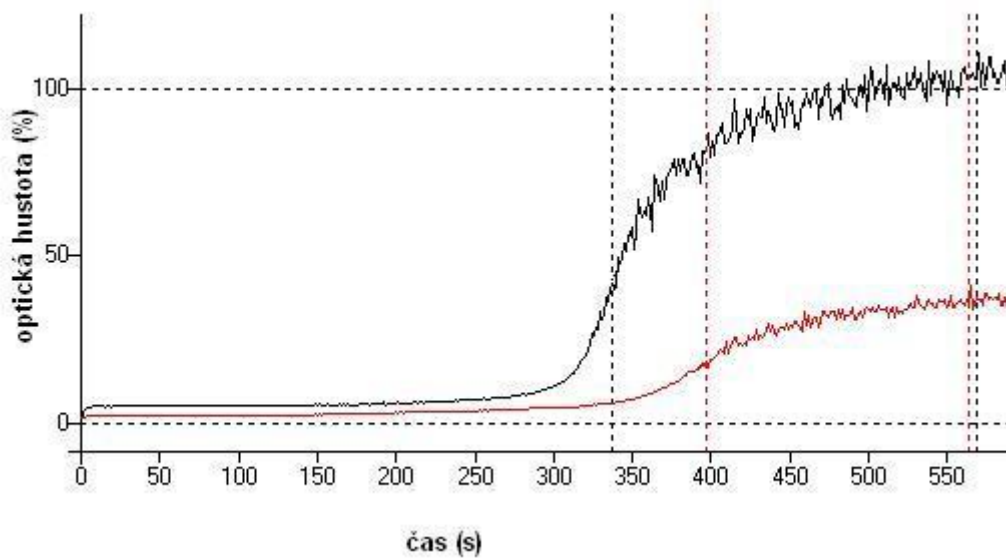
Materiál:

citrátová PPP (počet trombocytů $< 20 \cdot 10^9/l$)

citrátová PRP (počet trombocytů přibližně $250 \cdot 10^9/l$)

Postup:

- odběr krve do zkumavek s obsahem 0,4 ml 0,109 mol/l citrátu sodného, výsledný poměr krve a citrátu je 9:1
- centrifugace vzorků (příprava PPP a PRP)
- pipetuje se nejprve 225 μ l PPP do jedné a 225 μ l PRP do druhé kyvety agregometru
- nastaví se optická hustota PPP (odpovídá 100 % agregační křivky) a světelná transmise PRP (odpovídá 0 % agregační křivky)
- pipetujeme 25 μ l induktoru k PRP
- registrujeme změnu průchodnosti světla po dobu 10 minut a přístroj zaznamená agregační křivku (viz obr. 23).



Obr. 20: Agregační křivky (černá - neléčený pacient, červená - léčený pacient)

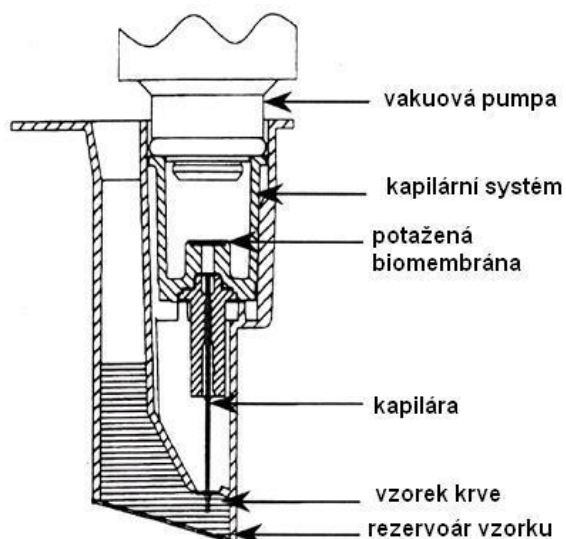
3.1.4 Měření na přístroji PFA-100

Přístroj PFA-100 (Platelet Function Analyzer) umožňuje rychlé zhodnocení funkce trombocytů v malém množství nesrážlivé krve. Vzorek citrátové krve je podtlakem nasát do kapiláry a protlačen přes centrální otvor v biologicky aktivní membráně, která je potažena kolagenem a epinefrinem nebo kolagenem a ADP. Kontakt trombocytů, které prochází otvorem v membráně s navázanými aktivátory, vyvolá jejich aktivaci a následně jejich adhezi a agregaci. Je měřen čas, za který je otvor v membráně uzavřen destičkovou zátkou tzv. „closure time“ (PRISCO, 2003).

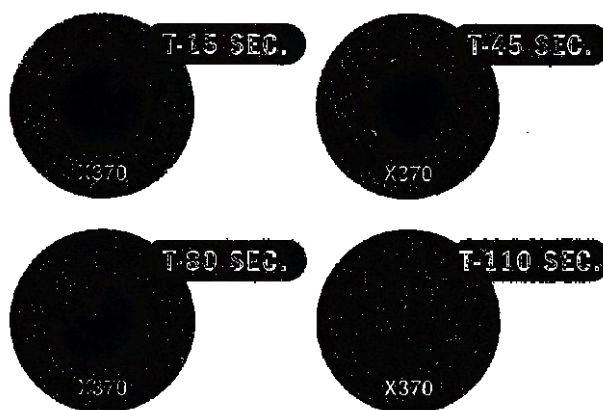
Normální „closure time“ pro kolagen/epinefrin je méně než 162 s a pro kolagen/ADP je méně než 103 s (GOPAL, 2006). Porovnáním obou časů je možné odhalit funkční poruchy trombocytů popřípadě vliv medikace. K prodloužení „closure time“ vždy pouze pro kolagen/epinefrin nebo pro kolagen/ADP, ne však dohromady pro oba druhy aktivních povrchů, dochází většinou v důsledek medikace. Tento test je používán ke screeningovým vyšetřením, nahrazuje dobu krvácení při monitorování protideštičkové terapie (GOPAL, 2006).

Přístroj

PFA-100 umožňuje rychlé stanovení funkce trombocytů z malého množství plné nesrážlivé krve. Karusel pro 2 měřicí moduly se po napipetování analyzovaného vzorku otočí a dopraví modul do přístroje. Měřicí modul (cartridge) na jedno použití se skládá ze zásobníku na vzorek, kapiláry a biologicky aktivní membrány s otvorem uprostřed. Uvnitř přístroje probíhá identifikace vloženého modulu, inkubace a nasátí vzorku a vlastní měření. Inkubační kanál je vyhříván na 37,9°C. Vzorek je vháněn k testovací membráně pomocí podtlaku. Jednotlivé moduly obsahují již potřebné množství aktivační reagentie. COL/ADP test cartridge (50 µg ADP, 2 µg COL) a COL/EPI test cartridge obsahuje 10 µg EPI a 2 µg COL.



Obr. 21: Princip PFA 100



Obr. 22: Uzavření otvoru v biologické membráně

Postup:

Do měřicí kyvety (cartridge) se napipetuje 800 μ l citrátové krve a modul se vloží do přístroje. Kapilárou je krev za působení podtlaku vháněna k biologicky aktivní membráně. Trombocyty se na membráně zachytí, aktivují se, mění tvar, adherují a agregují. Vytvořený agregát z krevních destiček uzavře otvor v biologické membráně. Přístroj zaznamená closure time.

3.1.5 Stanovení hladiny tromboxanu B₂ v moči

Na účinek ASA při blokaci cyklooxygenázy-1 v cyklu kyseliny arachidonové jsme usuzovali z množství generovaného tromboxanu A₂. ASA výrazně snižuje hladinu uvolněného TXA₂. Stablním metabolitem TXA₂ je 11-dehydro-tromboxan B₂ (11-dh-Tx B₂), jehož hladinu jsme v moči sledovali ELISA metodou. Senzitivita testu je dostatečná i k detekci nízké hladiny TxB₂ u pacientů, kteří na léčbu ASA odpovídají (GESKE A KOL., 2005; EIKELBOOM A KOL., 2002).

Analýza je založena na kompetici mezi 11-dehydroTXB₂ a 11-dehydroTXB₂ značeným acetylcholinesterázou (AChE) o omezený počet vazebných míst v jednotlivých jamkách obsazených specifickou králičí protilátkou proti 11-dehydroTXB₂. Počet vazebných míst a koncentrace 11-dehydroTXB₂-AChE je vždy konstantní, mění se pouze koncentrace 11-dehydro TXB₂ ve vyšetřovaném vzorku. Po přidání substrátu k AchE dojde k enzymatické reakci, při které vzniká barevný produkt. Měří se intenzita zabarvení, která je přímo úměrná množství navázaného 11-dehydroTXB₂-AChE a nepřímo úměrná koncentraci 11-dehydroTXB₂ ve vyšetřovaném vzorku (PERNEBY A KOL., 1999).

Příprava vzorku:

Čerstvý vzorek ranní moči byl po odběru dopraven do laboratoře, zpracován nebo zamražen při – 80° C a poté vyšetřen v sérii. Před samotným vyšetřením byl vzorek zředěn 1:3 koncentrovaným puftrem. Dále se postupuje dle návodu použitého ELISA kitu.

Reagencie:

Potřebné reagencie jsou součástí setu: 11-dehydro Thromboxane B2 EIA Kit (výrobce: Cayman Chemical, distributor: BioVendor).

3.2 Výsledky

3.2.1 Agregace s kationickým propylgalátem

3.2.1.1 *Normální hodnoty parametrů agregace po CPG (30 $\mu\text{mol/l}$) u kontrolní skupiny – zdraví jedinci*

Ke zjištění normálních parametrů agregace krevních destiček (slope a maximální amplituda) jsme použili soubor zdravých dárců. Do skupiny byli zařazeni zdraví jedinci z řad zaměstnanců FN Hradec Králové, kteří neužívali v posledních deseti dnech protideštičkové léky. 24 hodin před odběrem bylo respondentům doporučeno nepít alkoholické nápoje a nekouřit. Jedinci zařazení do kontrolní skupiny byli interně vyšetřeni a byla jim odebrána krev standardním způsobem, tak jak je uvedeno v kapitole 3.1.1.

Zjistili jsme že průměrná hodnota slope u tohoto souboru byla $84,0 \pm 20,0$ %/min. Hodnoty slope se pohybovaly v rozmezí 64,0 – 104,0 %/min. Podobně byly zjištěny průměrné hodnoty maximální amplitudy $77,6 \pm 12,8$ % (rozmezí 64,8 – 90,4 %), viz tabulka 1.

počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	CPG agregace (30 μl)		
				slope (%/min)	max. amplituda
20	10 / 10	22– 54 (32)	x	84,0	77,6
			s.d.	20,0	12,8
			rozmezí	64,0 – 104,0	64,8 - 90,4

Tab. 1 – Normální hodnoty CPG agregace v kontrolní skupině zdravých jedinců

3.2.1.2 Optimální koncentrace CPG používané k monitorování antiagregační léčby ASA

Ve studii jsme ověřili, zda koncentrace CPG doporučená výrobcem a uváděná v dostupné literatuře (SCHWARTZ, 1998) dostatečně citlivě zachycuje změny jednotlivých sledovaných agregačních parametrů. U souboru 29 pacientů (ve věku 53 – 83 let, medián 70 let) z II. interní kliniky FN a LF Hradec Králové s kardiovaskulárním onemocněním, kteří dlouhodobě užívali nízké dávky ASA (100 mg), jsme stanovili agregaci trombocytů po indukci CPG v koncentracích 30 $\mu\text{mol/l}$, 45 $\mu\text{mol/l}$ a 50 $\mu\text{mol/l}$. Sledovali jsme změny v parametrech slope (%/min) a maximální agregační amplitudě (%) (viz tabulka 2).

		koncentrace CPG $\mu\text{mol/l}$		
		30	45	50
slope	x	51,8	48,2	48,4
	s.d.	25,3	17,8	13,6
	rozmezí	26,4 - 77,1	30,4 - 66,0	34,8 - 61,9
max. amplituda	x	83,7	78,9	81,6
	s.d.	20,9	20,2	14,7
	rozmezí	62,8 - 104,5	58,7 - 99,1	66,9 - 96,3

Tab. 2 - Ověření optimální koncentrace CPG – soubor pacientů s kardiovaskulárním onemocněním

Ke statistickému vyhodnocení jsme použili párový t-test. Statisticky významné rozdíly při použití různých koncentrací CPG nebyly zjištěny ani u jednoho ze sledovaných parametrů. Porovnání naměřených hodnot slope a maximální agregačních amplitudy je zobrazeno v grafu 1 resp. grafu 2. Byla prokázána dostatečná citlivost reagentie CPG v pracovní koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$.

3.2.1.3 Parametry agregace u skupiny zdravých jedinců po podání ASA

U této skupiny vyšetřovaných osob jsme ověřili vliv antiagregační léčby ASA na krevní destičky stimulované kationickým propylgalátem. Vybraná skupina o počtu 8 zdravých osob byla interně vyšetřena, byla vyloučena případná terapie antiagregačními léky a léky ovlivňujícími funkci krevních destiček. Respondentům této skupiny byla podána ASA v těchto intervalech: 0. den - 100 mg, 1. den - 200 mg, 2. den 400 mg, současně bylo provedeno agregační vyšetření s kationickým propylgalátem (30 μ mol/l) před podáním ASA (0. den) a pak vždy 24 hodin po podání léku (1. den, 2. den a 3. den).

Hodnoty parametrů agregace (slope a max. amplituda) se v závislosti na vyšší dávce ASA měnily (viz tabulka 3).

	medián			
	1. měření 0 mg ASA	2. měření 100 mg ASA	3. měření 200 mg ASA	4. měření 400 mg ASA
slope (%/min)	100,35	84,3	62,65	54,5
ma (%)	96,35	92,5	94,3	93,6

Tab. 3 – Parametry agregace před a po podání ASA - skupina zdravých respondentů

Rychlost agregace (slope) klesá se zvyšující se účinnou dávkou ASA, výška agregační křivky (maximální amplituda) se prakticky nemění (viz graf 3).

Zjištěné parametry agregace (slope a maximální amplitudy) jsme porovnali pomocí krabicových grafů (viz grafy 4, 5) a statisticky vyhodnotili párovým t-testem pro jednotlivé léčebné dávky. Rozdíly mezi jednotlivými léčebnými dávkami vyjádřené hodnotou slope (%/min) byly signifikantní mezi hodnotami před léčbou a po podání léčebné dávky 100 mg ($p < 0,05$), dále mezi léčebnými dávkami 100 a 200 mg ($p < 0,001$). Mezi léčebnými dávkami 200 a 400 mg jsme nezjistili statistickou významnost.

3.2.1.4 Parametry agregace u skupiny hospitalizovaných pacientů bez antiagregační léčby

V této studii jsme ověřili, zda případná hospitalizace nebo další stresové či vnější faktory spojené s pobytem v nemocnici nemohou mít vliv na výsledek vyšetření. Kontrolní soubor zdravých dárců jsme porovnali se skupinou nemocných, kteří měli diagnózu, u které jsme nepředpokládali vliv na parametry krevních destiček. Do této skupiny byli zařazeni pacienti II. interní kliniky FN a LF UK Hradec Králové, kteří v posledních deseti dnech před vyšetřením nebrali žádné protideštičkové léky. 24 hodin před odběrem bylo pacientům doporučeno nekouřit. Pacienti byli interně vyšetřeni. Odběr byl proveden standardním způsobem, tak jak je uvedeno v kapitole 3.1.1.

Porovnávali jsme pouze parametry slope po stimulaci krevních destiček kationickým propylgalátem (30 $\mu\text{mol/l}$), protože v předchozí studii i v dalších studiích se tento parametr pro hodnocení účinnosti léčby ukázal jako nejvhodnější.

počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	CPG agregace slope (%/min)	
			x	
32	15 / 17	18 – 83 (48)	x	82,2
			s.d.	13,9
			rozmezí	68,3 – 96,1

Tab. 4 – Skupina pacientů bez antiagregační léčby

Zjištěná průměrná hodnota slope tohoto souboru byla $82,2 \pm 13,9$ %/min a rozmezí hodnot bylo 68,3 – 96,1 %/min.

Porovnání kontrolního souboru a souboru neléčených pacientů je zobrazeno v grafu 6. Nezjistili jsme statisticky významné rozdíly mezi oběma soubory. Potvrdili jsme, že při hospitalizaci pacientů, kteří nebyli léčeni antiagregační léčbou, nedochází k ovlivnění parametru slope po stimulaci CPG.

3.2.1.5 Parametry agregace u skupiny pacientů s antiagregační léčbou

V této studii jsme ověřovali vliv dlouhodobé stabilizované antiagregační léčby na parametry krevních destiček. U souboru 51 pacientů II. interní kliniky FN a LF UK Hradec Králové s kardiovaskulárním onemocněním, kterým byla profylakticky podávána antiagregační léčba (ASA 100 mg/den), jsme vyšetřili agregační parametry (slope a maximální amplituda) po stimulaci kationickým propylgalátem (30 μ mol/l). Zjištěná průměrná hodnota slope tohoto souboru byla $23,0 \pm 22,1$ %/min a rozmezí hodnot bylo 0,9 - 45,1%/min. Průměrná hodnota maximální amplitudy byla $39,8 \pm 30,7$ % a rozmezí hodnot bylo 9,1 - 70,5 % (viz tabulka 5).

počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	CPG agregace		
				slope (%/min)	max. amplituda
51	31 / 20	37 - 86 (71)	x	23,0	39,8
			s.d.	22,1	30,7
			rozmezí	0,9 - 45,1	9,1 - 70,5

Tab. 5 – Skupina pacientů s antiagregační léčbou (100 mg ASA/den)

Parametr slope tohoto souboru byl porovnán s hodnotami kontrolního souboru zdravých lidí a pacientů bez antiagregační léčby (viz graf 7). Zjištěné hodnoty maximální amplitudy souboru pacientů s antiagregační léčbou byly porovnány s hodnotami kontrolního souboru (viz graf 8). Zjistili jsme statistickou významnost mezi kontrolním souborem a souborem pacientů s antiagregační léčbou při porovnávání parametru slope ($p < 0,001$) i při porovnávání parametru maximální amplitudy ($p < 0,001$) a dále mezi soubory pacientů léčených antiagregační léčbou a léčených jinými než antiagregačními léky pro parametr slope ($p < 0,001$). Ověřili jsme, že hodnoty slope i maximální amplitudy jsou vlivem antiagregační léčby sníženy.

3.2.2 Měření na přístroji PFA 100

3.2.2.1 *Vyšetření kontrolní skupiny zdravých osob*

Na přístroji PFA-100 jsme sledovali tzv. closure time (CT). Ke zjištění normálních hodnot tohoto parametru jsme použili soubor zdravých lidí z řad zaměstnanců FN Hradec Králové, kteří v posledních deseti dnech neužívali protidestičkové léky a byli standardně vyšetřeni.

Tvorba primární destičkové zátky probíhala na dvou různých membránách potažených kolagenem a ADP nebo kolagenem a epinefrinem. Průměrný closure time na membráně s kolagenem a ADP byl $77,6 \pm 13,8$ s, rozmezí 63,8 - 91,3 s. Průměrný CT systému kolagen/epinefrin byl $110,9 \pm 20,3$ s (rozmezí 90,6 - 131,2 s), viz. tabulka 6.

počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	PFA-100 CT (s)		
				kolagen/epinefrin	kolagen/ADP
20	10 / 10	22– 54 (32)	x	110,9	77,6
			s.d.	20,3	13,8
			rozmezí	90,6 – 131,2	63,8 – 91,3

Tab. 6 – Hodnoty CT (PFA-100) - kontrolní skupina

3.2.2.2 *Vyšetření u hospitalizovaných pacientů bez antiagregační léčby*

V této studii jsme, podobně jako u studie s kationickým propylgalátem, ověřili zda léčba a další eventuální stresové faktory spojené s hospitalizací pacienta mohou mít vliv na parametry měřené přístrojem PFA-100. Zjišťovali jsme hodnoty CT pro systém kolagen/epinefrin. Použili jsme stejnou skupinu pacientů II. interní kliniky FN a LF Hradec Králové, za stejných podmínek uvedených v kapitole 3.2.1.4

Z naměřených hodnot jsme na základě průměru (128,4 s) a výběrové směrodatné odchylky (25,3 s) odvodili rozmezí hodnot CT (kolagen/epinefrin) 103,1 – 153,7 s (viz tabulka 7).

počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	PFA100 Col/Epi (s)	
			x	
32	15 / 17	18 – 83 (48)	x	128,4
			s.d.	25,3
			rozmezí	103,1 – 153,7

Tab. 7 – Hodnoty CT (PFA-100) - soubor pacientů bez antiagregační léčby

Zjištěné průměry u pacientů bez antiagregační léčby jsme porovnali s průměry kontrolní skupiny zdravých osob (viz graf 9). Při porovnání CT (kolagen/epinefrin) mezi kontrolní skupinou a skupinou pacientů bez antiagregační léčby jsme nenalezli statisticky významný rozdíl.

3.2.2.3 Vyšetření u skupiny pacientů s antiagregační léčbou

Na souboru pacientů II. interní kliniky FN a LF UK Hradec Králové, kteří dlouhodobě užívali ASA v dávce 100 mg/den, jsme ověřili vliv ASA na primární hemostázu pomocí closure time na přístroji PFA-100. Pacienti byli interně vyšetřeni a byla jim odebrána krev standardním způsobem (viz kapitola 3.1.1.).

Průměrný CT na membráně s kolagenem a ADP u pacientů, kteří dlouhodobě berou malé dávky ASA, byl $67,5 \pm 22,8$ s, rozmezí 45,5 – 90,2 s. Průměrný CT systému kolagen/epinefrin byl $196,7 \pm 85,1$ s, rozmezí 115,4 – 279,1 s, (viz tabulka 8).

počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	PFA-100 CT (s)		
				kolagen/ADP	kolagen/epinefrin
51	31 / 20	37 - 86 (71)	x	67,5	196,7
			s.d.	22,8	85,1
			rozmezí	45,5 – 90,2	115,4 – 279,1

Tab. 8 – Hodnoty CT (PFA-100) - soubor pacientů léčených 100 mg ASA

Zjištěné průměry u pacientů léčených ASA jsme porovnali s hodnotami zjištěnými pro kontrolní soubor zdravých osob bez léčby (viz grafy 10, 11). Statisticky významné rozdíly jsme zjistili pro systém kolagen/epinefrin ($p < 0,001$) (viz graf 12). Rozdíl CT na membráně kolagen/ADP u pacientů léčených 100 mg ASA/den při porovnání s CT kontrolní skupiny nebyl statisticky významný (viz graf 13).

3.2.3 Tromboxan B₂ v moči

3.2.3.1 *Hodnoty TXB₂ v moči u kontrolní skupiny*

Tromboxan B₂ je stabilním metabolitem tromboxanu A₂, který vzniká v metabolické cestě přeměny kys. arachidonové na jednotlivé endoperoxidy v aktivované krevní destičce. V případě antiagregační léčby ASA dochází k blokaci COX-1 a k omezení produkce nebo k úplnému zastavení tvorby endoperoxidů v této cestě. Hladina TXB₂ nás tedy nepřímo informuje o účinnosti antiagregační léčby acetylsalicylovou kyselinou.

Ke zjištění normálních hodnot koncentrace TXB₂ v moči jsme použili soubor zdravých lidí. Vyšetření bylo provedeno z ranní moče. Do skupiny byli zařazeni zdraví jedinci z řad zaměstnanců FN Hradec Králové, kteří neužívali v posledních deseti dnech protideštičkové léky. Zjistili jsme, že průměrná hodnota TXB₂ v moči u tohoto souboru byla 3,72 ± 1,34 ng/ml a hodnoty se pohybovaly v rozmezí: 2,37 - 5,06 ng/ml (viz tabulka 9).

počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	TXB ₂ v moči (ng/ml)	
			x	
16	7 / 9	22 – 54 (32,5)	x	3,72
			s.d.	1,34
			rozmezí	2,37 - 5,06

Tab. 9 – TXB₂ v moči - kontrolní soubor

3.2.3.2 TXB₂ v moči u pacientů dlouhodobě léčených nízkými dávkami ASA (100 mg)

U skupiny 51 nemocných s kardiovaskulárním onemocněním, u kterých byla profylakticky dlouhodobě podávána stabilní nízkodávková léčba ASA (100 mg), jsme stanovili ve vzorcích ranní moči hladiny TXB₂, abychom zjistili účinnost antiagregační léčby.

Z průměru (1,08 ng/ml) a výběrové směrodatné odchylky (0,81 ng/ml) jsme odvodili u této skupiny rozmezí pro koncentrace TXB₂ v moči: 0,26 – 1,89 ng/ml (viz tabulka 10).

počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	TXB ₂ (ng/ml)	
			x	
51	31 / 20	36 - 85 (69)	x	1,08
			s.d.	0,81
			rozmezí	0,26 – 1,89

Tab. 10 – Pacienti dlouhodobě léčení 100 mg ASA

Zjištěné hodnoty koncentrace TXB₂ v moči u pacientů dlouhodobě léčených ASA jsme porovnali s hodnotami koncentrací tromboxanu u skupiny zdravých lidí. Pacienti, kterým byly dlouhodobě podávány nízké dávky ASA (100 mg/den) měli nižší koncentraci TXB₂ v moči (viz graf 14). Tento rozdíl byl statisticky významný ($p < 0,001$) viz graf 15.

3.2.4 Citlivost pacientů s ICHS na antiagregační terapii

V databázi hematologické laboratoře Fakultní nemocnice Hradec Králové je evidováno přibližně 500 pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, kterým je profylakticky podávána ASA převážně v dávce 100 mg/ den. Z této skupiny jsme do naší studie vybrali 51 pacientů (31 mužů a 20 žen), u kterých byla reakce na ASA sledována delší dobu. Nejčastější diagnózou byla chronická ICHS (31 %), dále fibrilace a flutter síní (16%), esenciální hypertenze (12%) a akutní infarkt myokardu (6 %). Ostatní diagnózy byly v rozmezí 1 – 2 % (viz graf 16). Věk pacientů se pohyboval v rozmezí 36 – 85 let (medián věku byl 70 let). Označení diagnostických skupin respektuje v současné době platnou kategorizaci vydanou věstníkem MZ ČR.

U vybrané skupiny 51 pacientů léčených nízkými dávkami ASA (100 mg/den) jsme provedli agregační studie s kationickým propylgalátem, vyšetřili účinek primární hemostázy na přístroji PFA-100 a stanovili hladinu TXB₂ v moči. Zjištěné hodnoty jsme v daném vyšetřovacím schématu porovnali s hodnotami kontrolního souboru a soubor 51 pacientů jsme rozdělili na dvě skupiny: na skupinu pacientů, kteří reagují na léčbu ASA a na skupinu pacientů, kteří na tuto léčbu nereagují. Jednotlivé studie jsou zpracovány v částech 3.2.4.1 až 3.2.4.3.

3.2.4.1 Agregace stimulovaná CPG

Hodnoty slope souboru 51 pacientů jsme porovnali s hodnotami kontrolního souboru (viz 3.2.1.1). Do skupiny reagujících jsme zařadili všechny pacienty, jejichž hodnoty byly nižší než 64,0 %/min (viz tabulka 11).

Porovnání průměrných hodnot takto rozděleného souboru pacientů je graficky znázorněno v grafu 17. V souboru 51 pacientů byli jen 2 pacienti, kteří na léčbu nereagovali, proto soubor nebyl statisticky hodnocen.

Maximální amplituda nebyla u tohoto souboru hodnocena, protože již v minulých studiích jsme si ověřili, že tento parametr je méně citlivý k hodnocení léčených pacientů než parametr slope.

	počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	CPG agregace - slope (%/min)	
				x	
kontrola	20	10 / 10	22 – 54 (32)	x	84,0
				s.d.	20,0
				rozmezí	64,0 – 104,0
reagující	49	31 / 18	37 – 86 (70)	x	20,3
				s.d.	17,8
				rozmezí	2,5 – 38,1
nereagující	2	0 / 2	71 – 81 (70)	x	89,0
				s.d.	6,9
				rozmezí	82,1 – 95,9

Tab. 11 – Citlivost na ASA – agregace stimulovaná CPG (slope)

3.2.4.2 Closure time na přístroji PFA-100

Hodnoty CT souboru 51 pacientů jsme porovnali s hodnotami kontrolního souboru (viz 3.2.2.1). Do skupiny reagujících jsme zařadili všechny pacienty, jejichž hodnoty byly vyšší než 90,6 s (viz tabulka 12).

	počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	CT – kolagen/epinefrin (s)	
				x	
kontrola	20	10 / 10	22 – 54 (32)	x	110,9
				s.d.	20,3
				rozmezí	90,6 – 131,2
reagující	50	31 / 19	37 – 86 (70)	x	197,3
				s.d.	81,9
				rozmezí	115,4 – 279,1
nereagující	1	0 / 1	71	x	90,0
				s.d.	0
				rozmezí	90,0

Tab. 12 – Citlivost na ASA – closure time (CT) na přístroji PFA-100

Porovnání průměrných hodnot pro kolagen/epinefrin u takto rozděleného souboru pacientů je graficky znázorněno v grafu 18. Zjistili jsme, že v souboru 51 pacientů byl jen 1 pacient, který na léčbu nereagoval, podobně jako v minulé části nebyl soubor statisticky hodnocen. Soubor kalagen/ADP nelze pro tuto studii použít, protože nedochází k významným rozdílům mezi kontrolním souborem a léčenými pacienty.

3.2.4.3 TXB_2 v moči

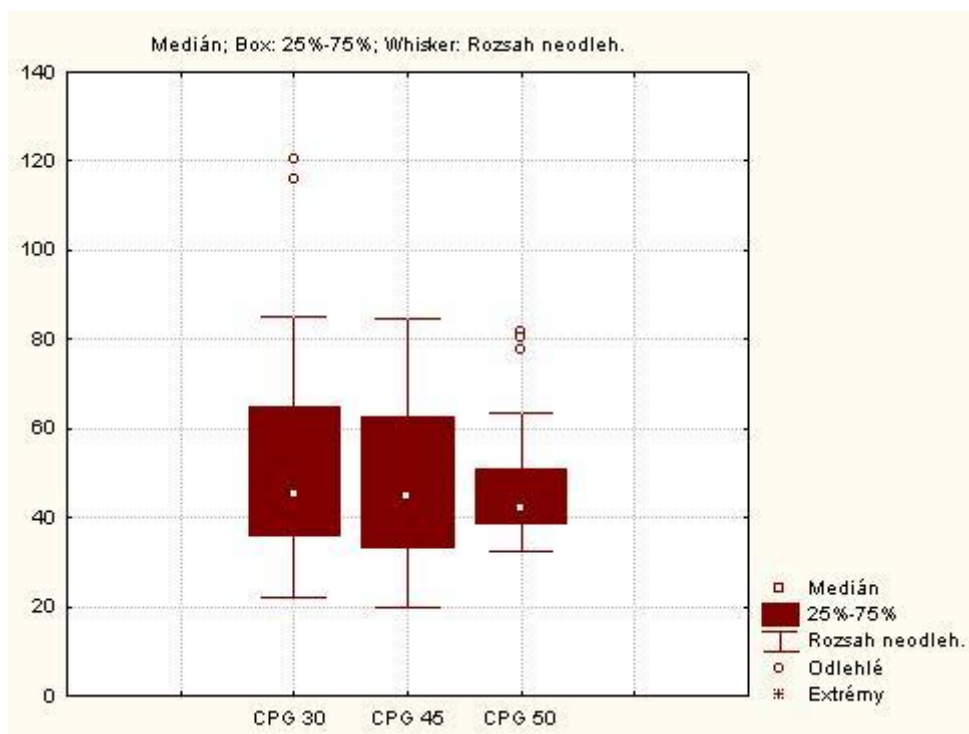
Hodnoty koncentrace TXB_2 v moči souboru 51 pacientů jsme porovnali s hodnotami kontrolního souboru (viz 3.2.3.1). Do skupiny reagujících jsme zařadili všechny pacienty, jejichž hodnoty byly nižší než 2, 37 ng/ml (viz tabulka 13).

	počet vyšetřených	pohlaví (M / Ž)	věk (medián)	TXB_2 (ng/ml)	
				x	s.d.
kontrola	16	7 / 9	22 – 54 (32,5)	x	3,72
				s.d.	1,34
				rozmezí	2,37 - 5,06
reagující	46	27 / 19	37 - 86 (70,5)	x	0,87
				s.d.	0,50
				rozmezí	0,37 - 1,37
nereagující	5	4 / 1	56 – 83 (60)	x	3,01
				s.d.	0,52
				rozmezí	2,49 - 3,53

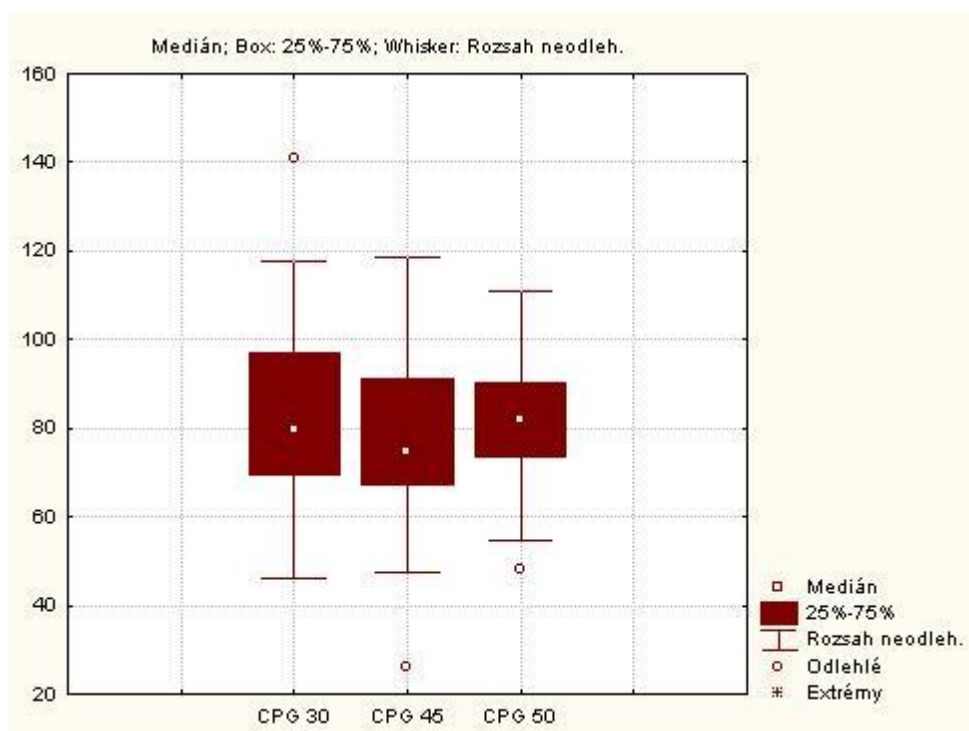
Tab. 13 – Citlivost na ASA – TXB_2 v moči (ng/ml)

Porovnání průměrných hodnot takto rozděleného souboru pacientů je graficky znázorněno v grafu 19. V souboru 51 pacientů bylo pouze 5 pacientů, kteří na léčbu nereagovali, proto soubor nebyl statisticky hodnocen.

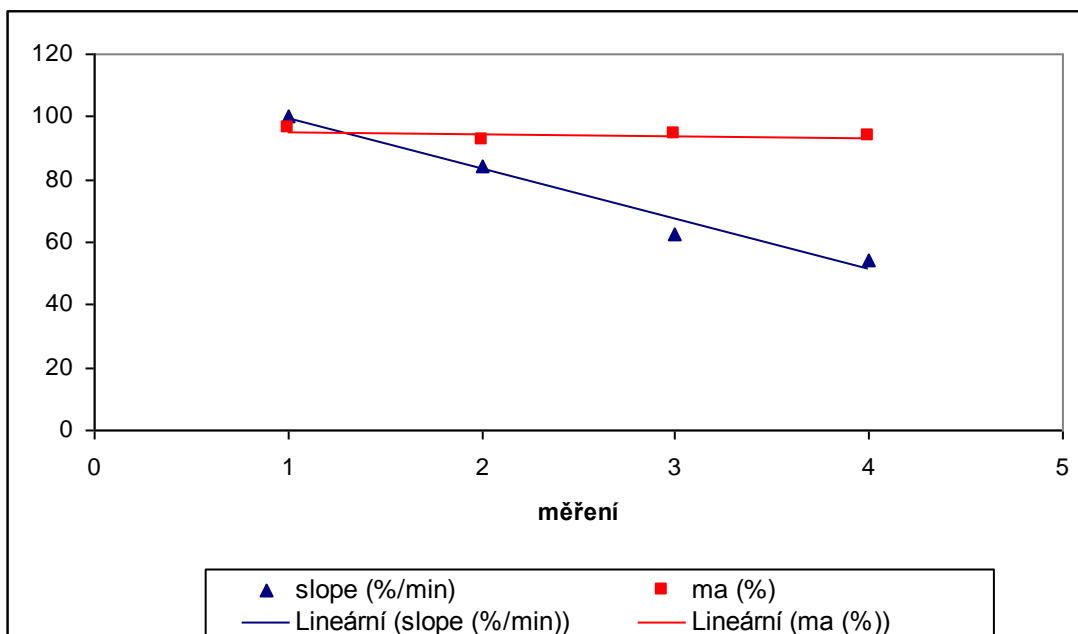
4 Grafická část



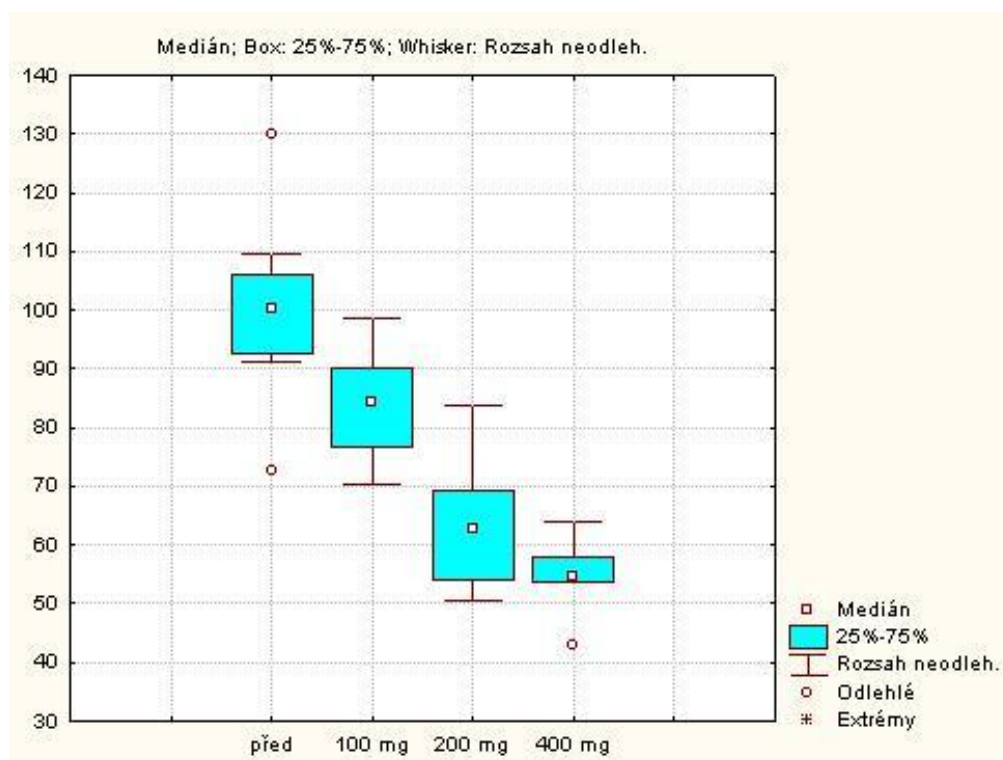
Graf 1 – Porovnání slope po indukci CPG o koncentracích 30, 45 a 50 µmol/l



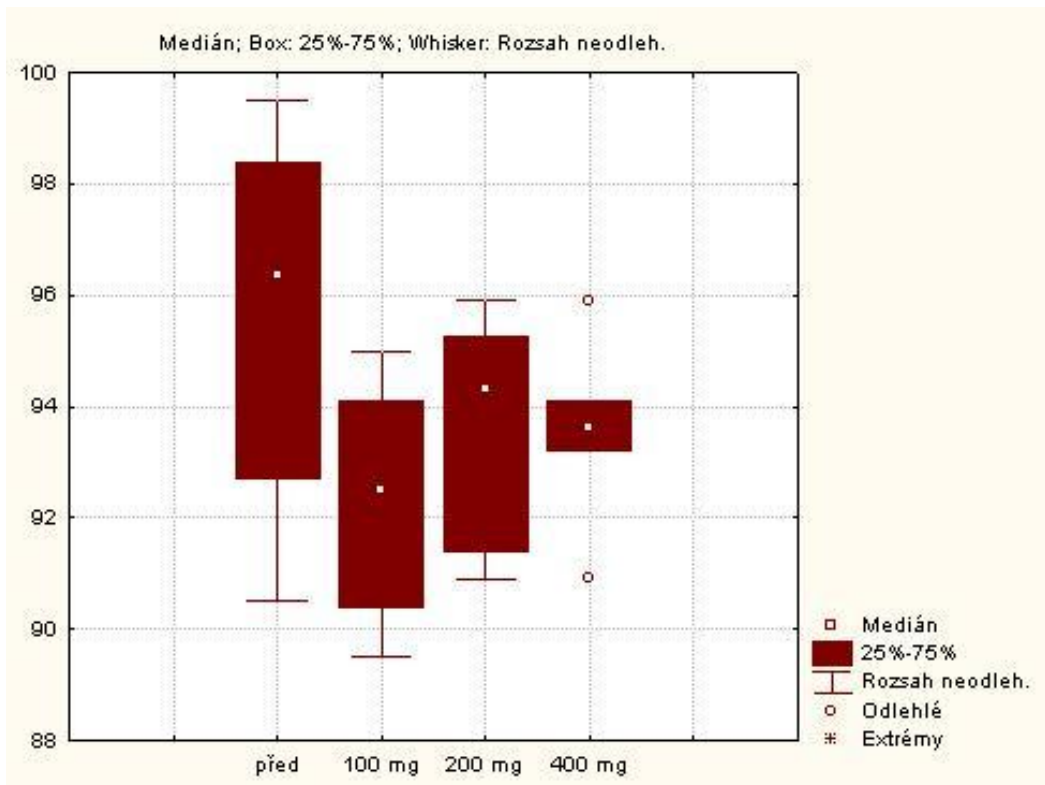
Graf 2 – Porovnání maximální amplitudy agregace po indukci CPG o koncentracích 30, 45 a 50 µmol/l



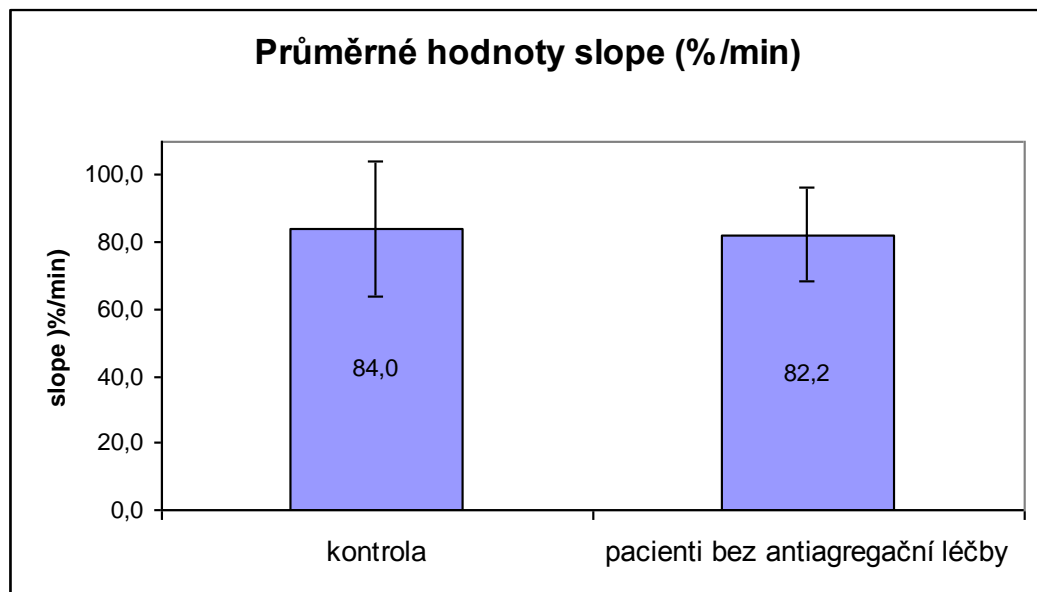
Graf 3 – Trendy mediánů jednotlivých parametrů agregace u jednotlivých měření (1., 2., 3. a 4. měření)



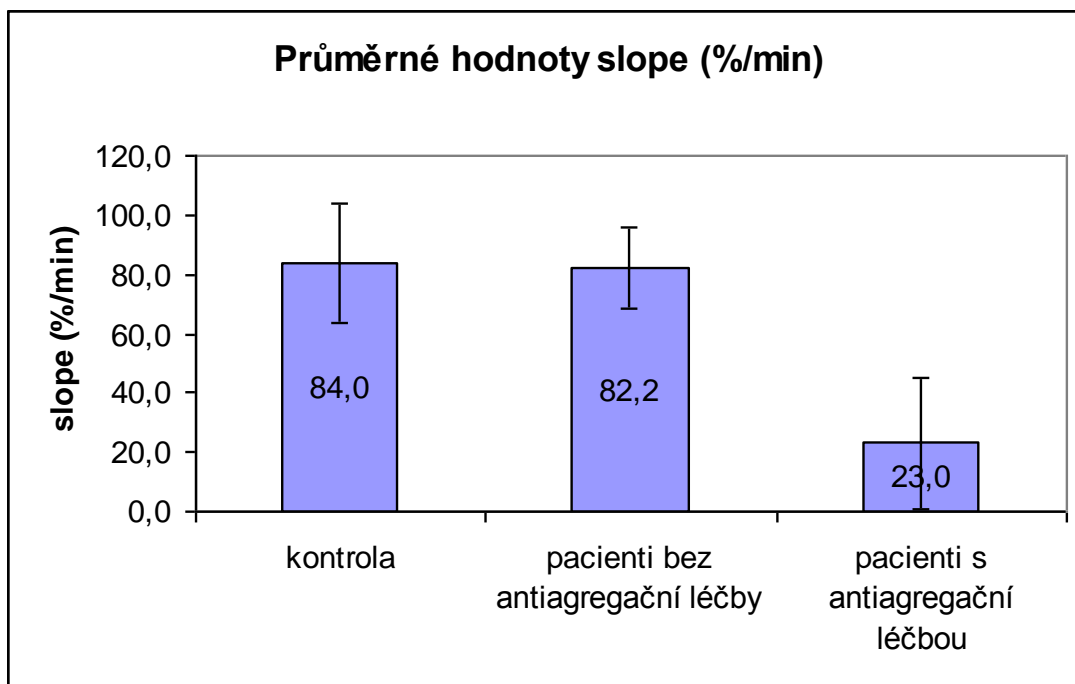
Graf 4 – Změny hodnot slope po podání ASA u kontrolní skupiny zdravých osob



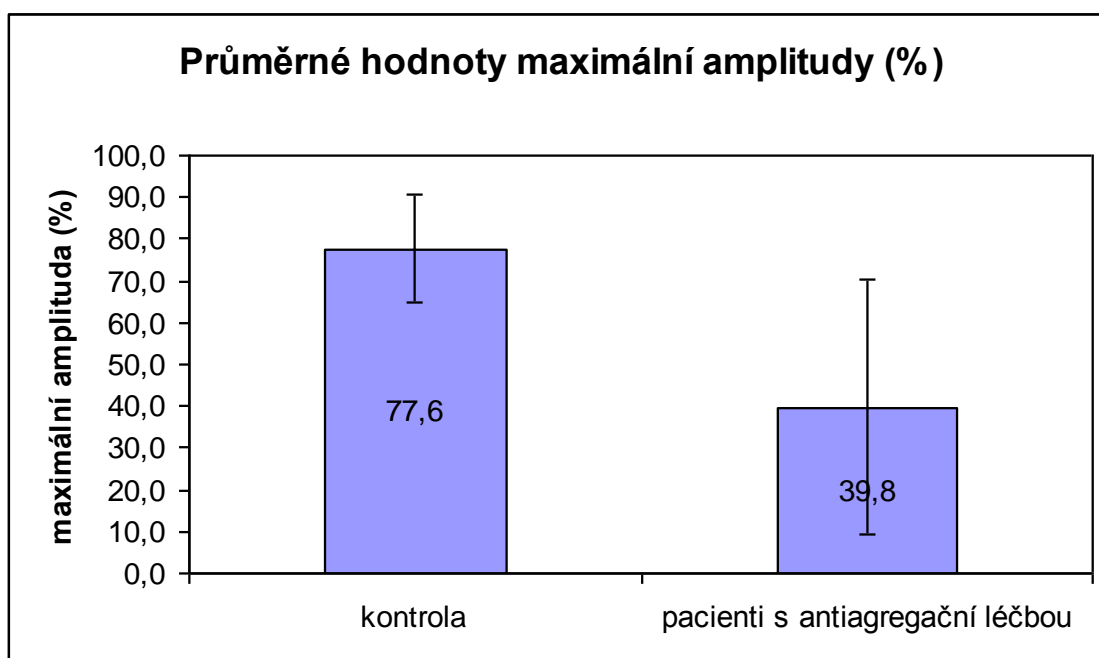
Graf 5 – Změny hodnot maximální amplitudy po podání ASA u kontrolní skupiny zdravých osob



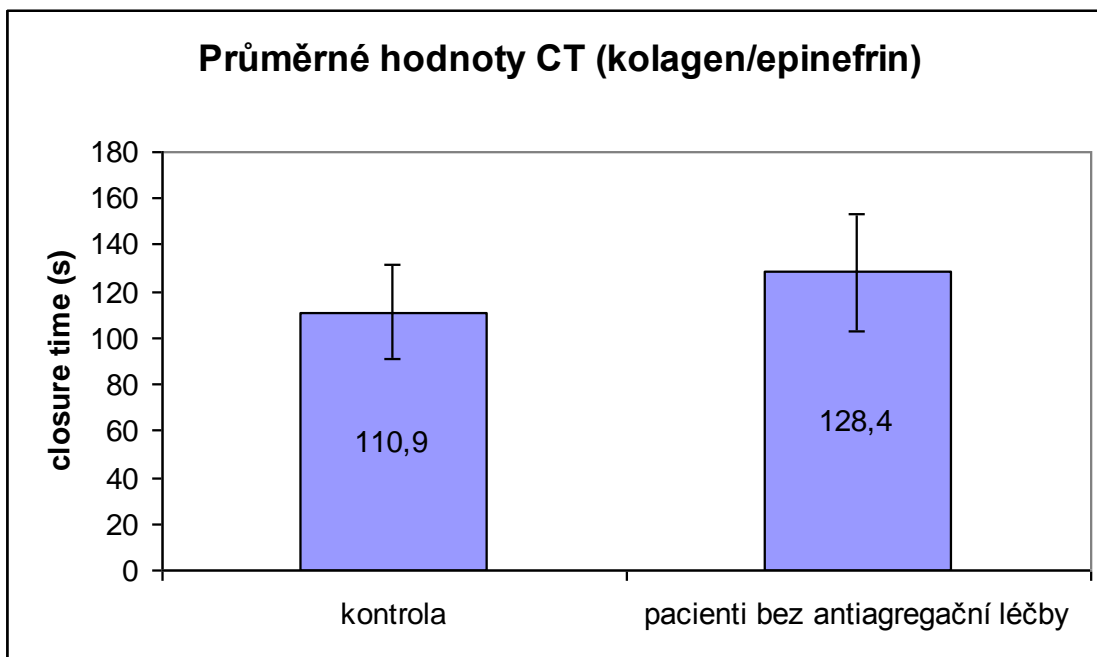
Graf 6 – Průměrné hodnoty slope (%/min) – kontrolní skupina a pacienti bez léčby



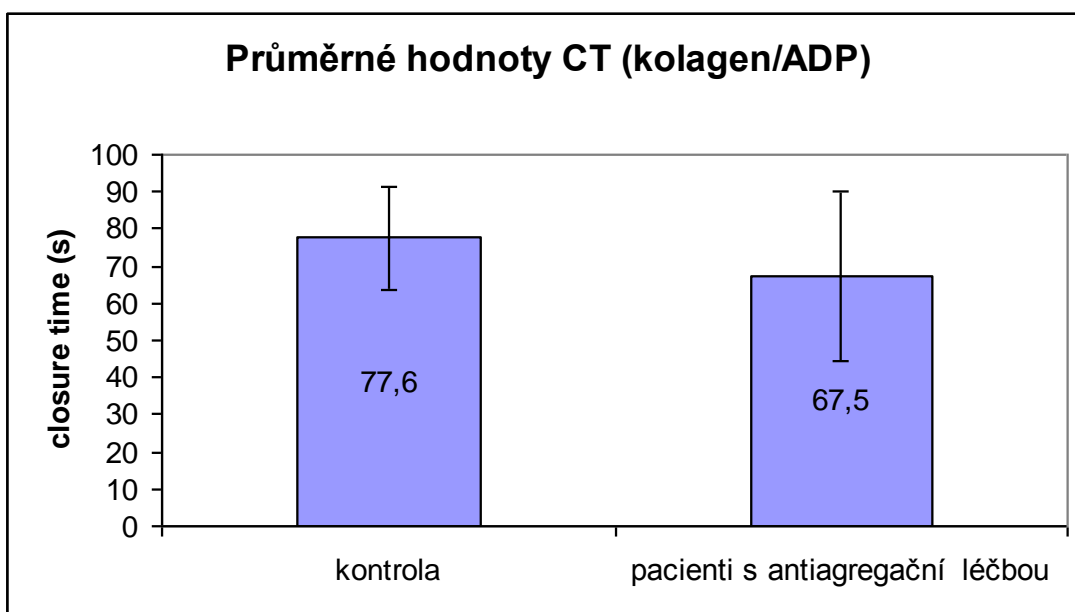
Graf 7 – Průměrné hodnoty slope (%/min) – kontrolní skupina, pacienti bez antiagregační léčby a pacienti s antiagregační léčbou



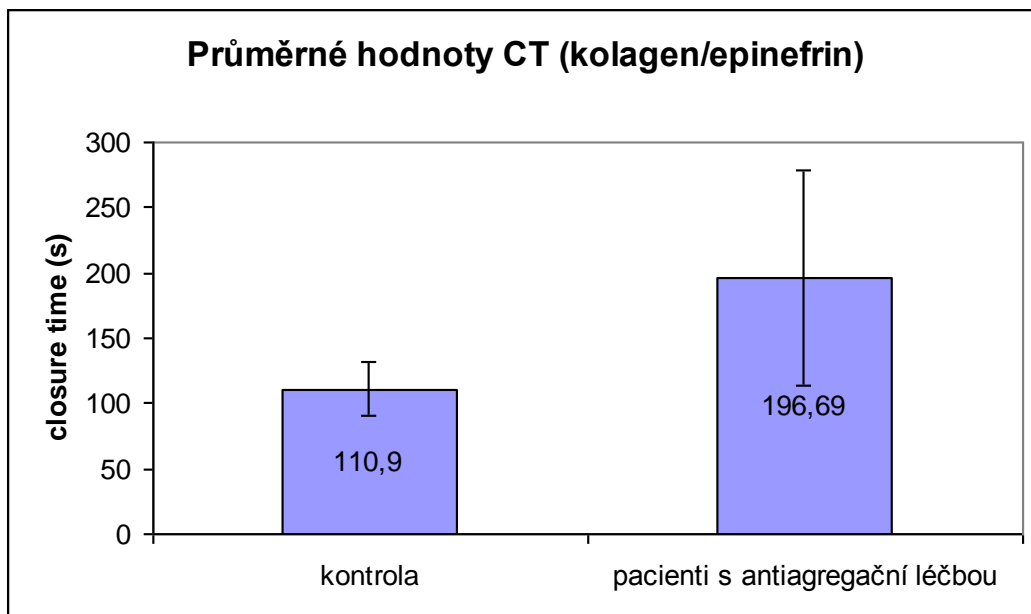
Graf 8 – Průměrné hodnoty maximální amplitudy (%) – kontrolní skupina a pacienti s antiagregační léčbou



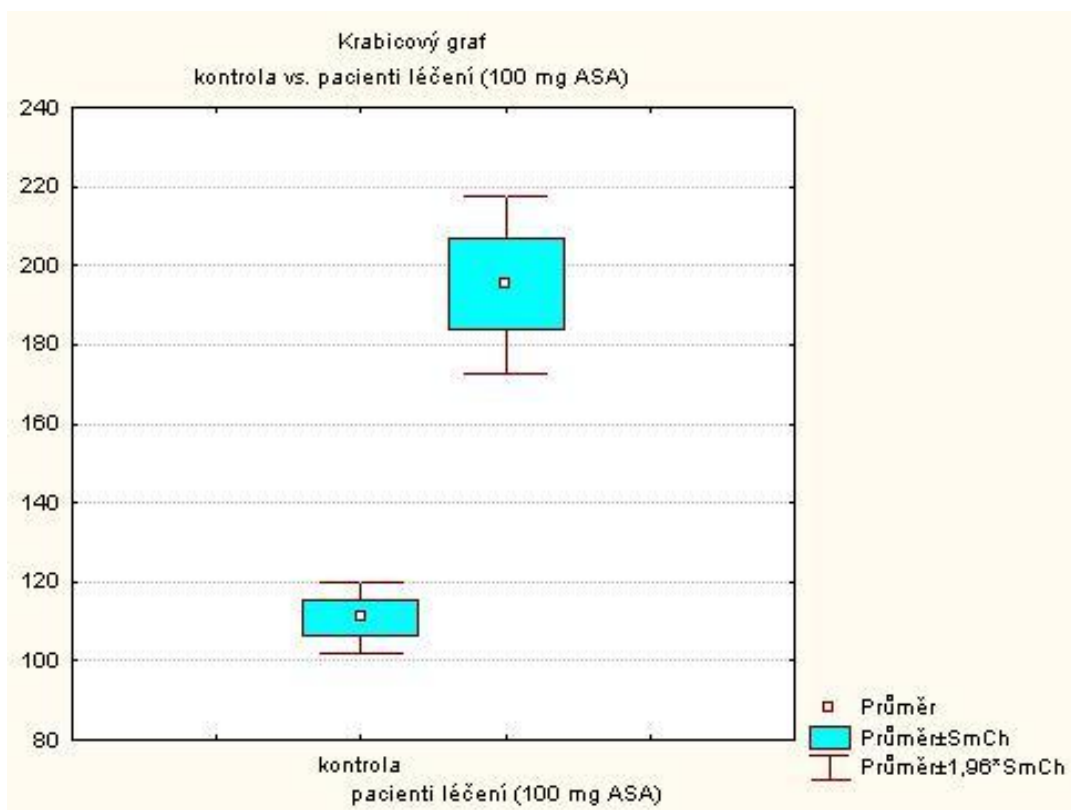
Graf 9 – Porovnání průměrných hodnot CT kolagen/epinefrin (s) - kontrolní skupina a soubor pacientů bez antiagregační léčby



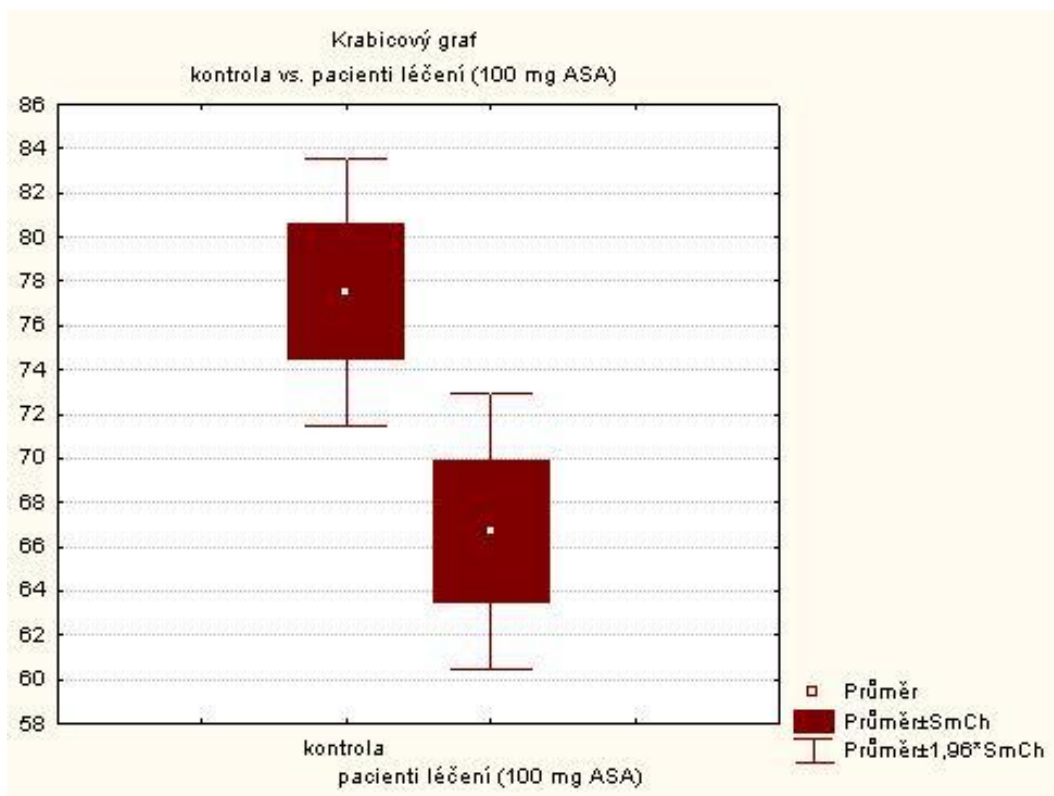
Graf 10 – Porovnání průměrných hodnot CT kolagen/ADP (s) - kontrolní skupina a soubor pacientů s antiagregační léčbou



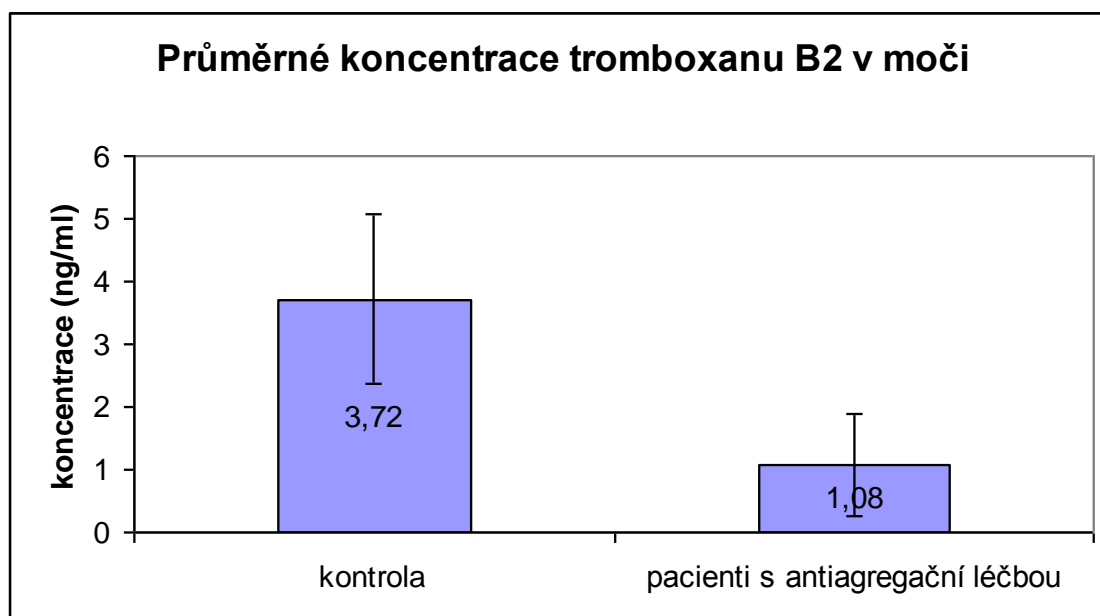
Graf 11 – Porovnání průměrných hodnot CT kolagen/epinefrin (s) - kontrolní skupina a soubor pacientů s antiagregační léčbou



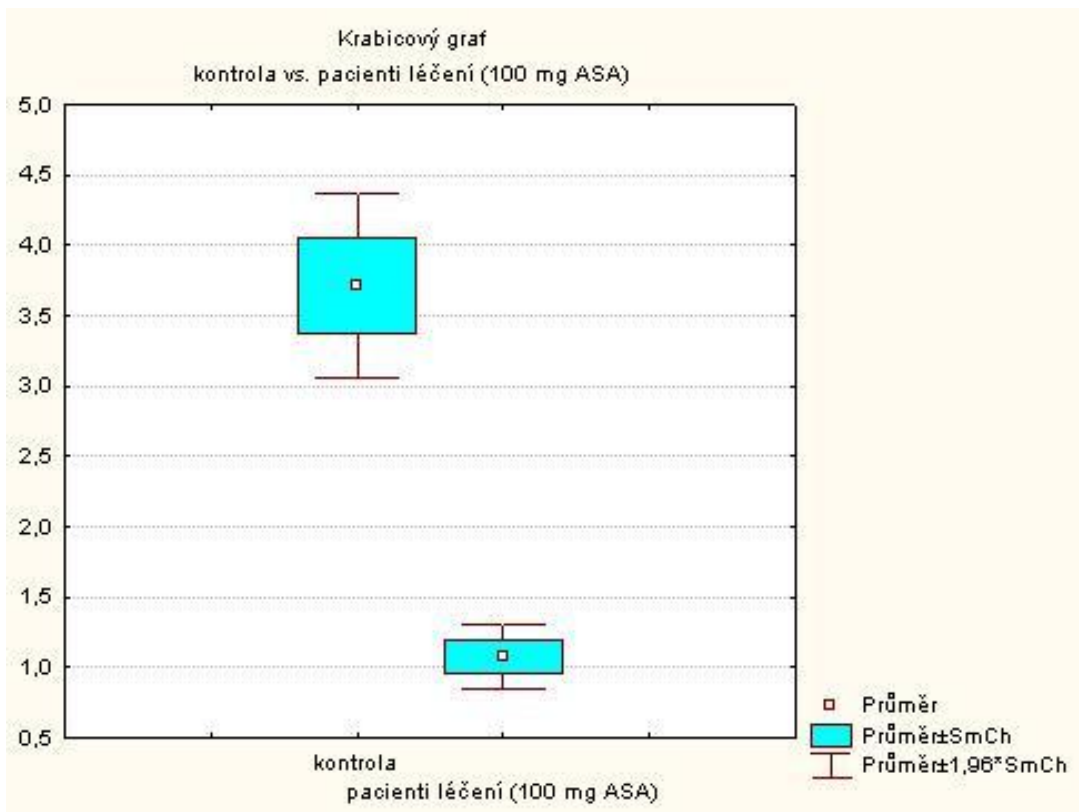
Graf 12 – Porovnání CT kolagen/epinefrin (s) - kontrolní skupina a soubor pacientů s antiagregační léčbou



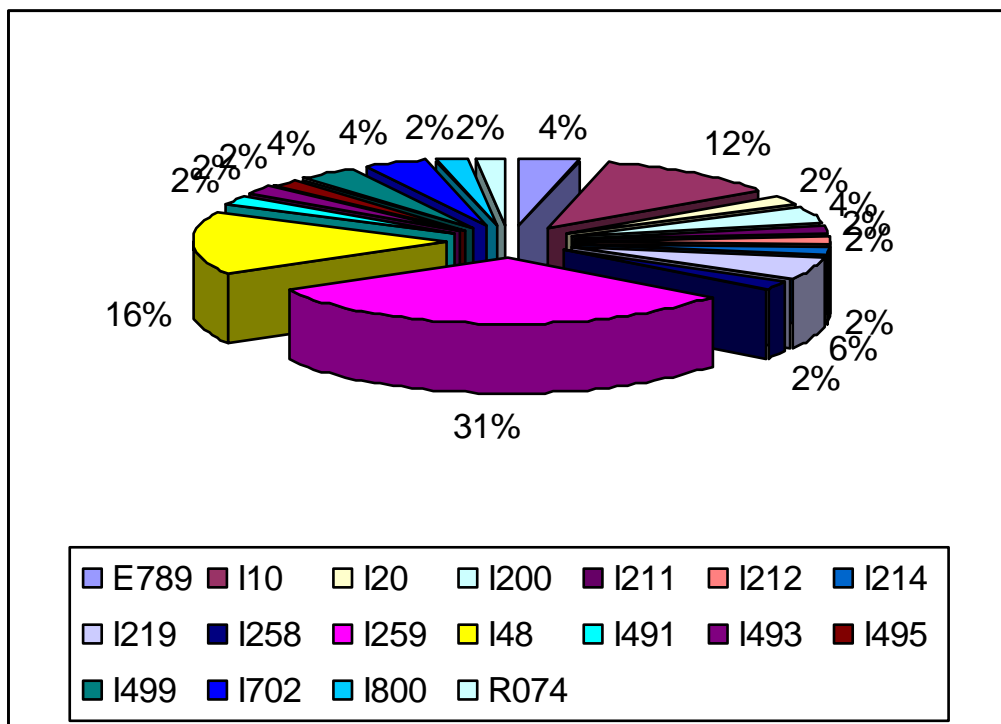
Graf 13 – Porovnání CT kolagen/ADP (s) - kontrolní skupina a soubor pacientů s antiagregační léčbou



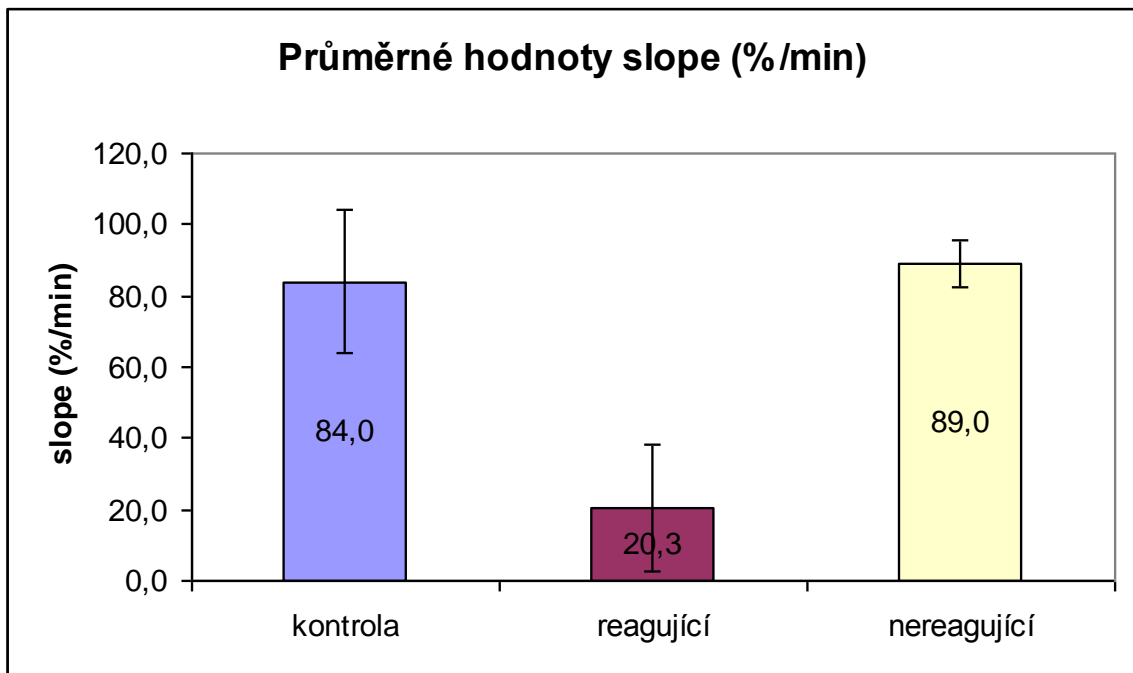
Graf 14 - Porovnání koncentrací TXB₂ v moči - kontrolní skupina a soubor pacientů s antiagregační léčbou



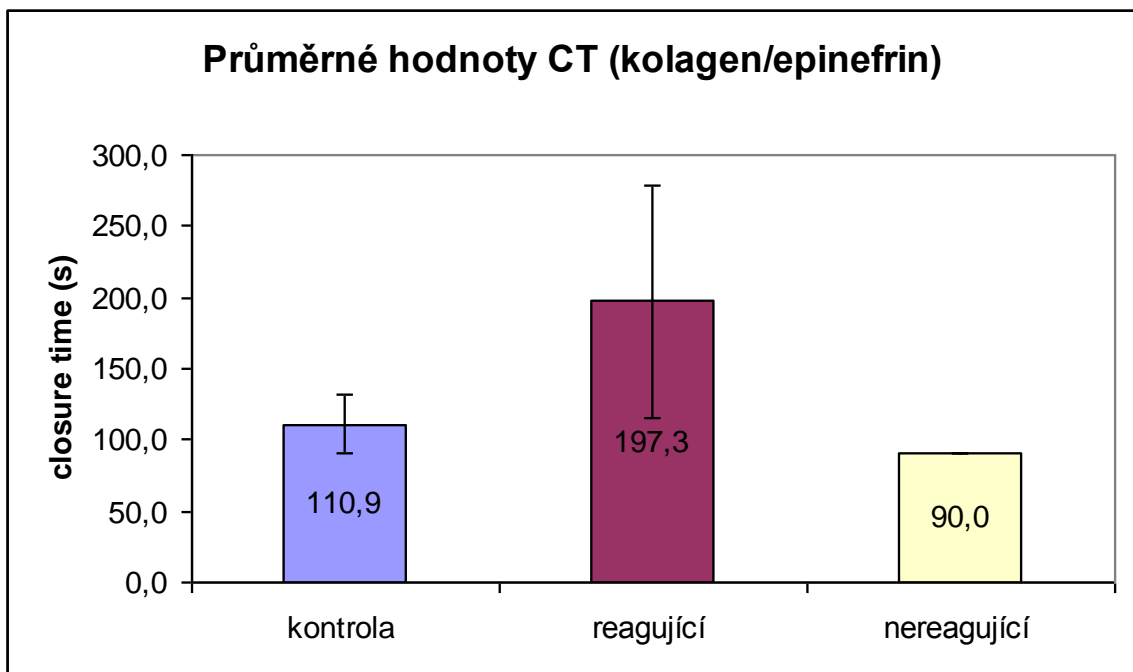
Graf 15 – Porovnání koncentrace TXB_2 v moči - kontrolní skupina a soubor pacientů s antiagregační léčbou



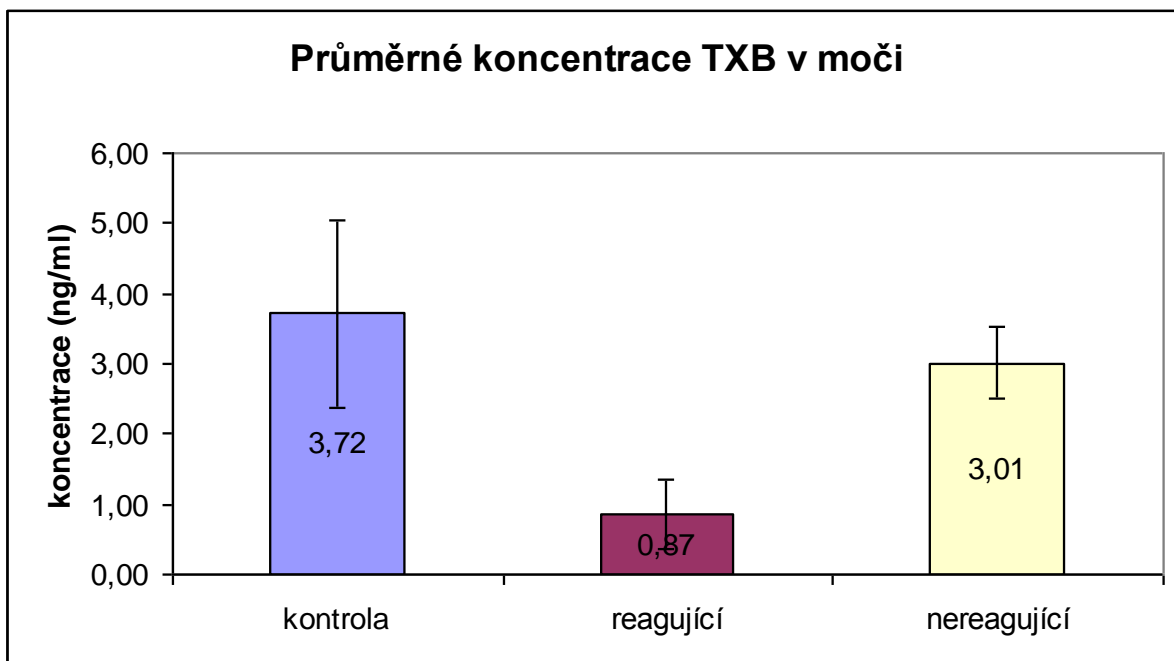
Graf 16 – Rozdělení pacientů podle základní diagnózy



Graf 17 – Porovnání průměrných hodnot slope (%/min) – kontrolní skupina, reagující pacienti a nereagující pacienti



Graf 18 - Porovnání průměrných hodnot CT kolagen/epinefrin (s)– kontrolní skupina, reagující pacienti a nereagující pacienti



Graf 19 - Porovnání průměrných hodnot koncentrace TXB₂ v moči– kontrolní skupina, reagující pacienti a nereagující pacienti

5 Diskuze

ICHS je jedním z velmi častých příčin úmrtí. Důslednou primární a sekundární prevencí se v posledních 25 letech podařilo v zemích Severní Ameriky, Austrálie a západní Evropy snížit úmrtnost na ICHS přibližně o 30 %. Od roku 1990 je v České republice pozorován jednoznačný trend ve snižování kardiovaskulární mortality. Primární prevence spočívá ve vyhledávání osob s vyšším počtem rizikových faktorů, v komplexním ovlivnění těchto faktorů se zaměřením na snížení rozvoje aterosklerózy (MAREK A KOL., 2005). Jedním z důležitých faktorů, které mohou výrazně omezit riziko tromboembolické příhody je účinná dostupná léčba a případné monitorování jejího účinku.

V současnosti dostupné protidestičkové léky interferují s různými kroky aktivačních procesů, včetně adheze, uvolňovací reakce nebo agregace a snižují riziko arteriální trombózy, ale mohou zvýšit riziko krvácení při jejich předávkování. Antiagregační látky se efektivně využívají při primární a sekundární prevenci kardiovaskulárních chorob (BOSEN A KOL., 1984; HENNEKENS A KOL., 1997).

V předkládané práci jsme se zaměřili na možnosti a dostupnost monitorování antiagregační terapie nejpoužívanějším antiagregačním prostředkem kyselinou acetylsalicylovou. Monitorování této léčby nebylo do nedávné doby dobře proveditelné. Sledování pomocí kolagenové křivky, případně křivky získané za použití ADP neposkytuje srovnatelné a interpretovatelné výsledky (De Gaetano G, 2003). Proto jsme zmapovali v současné době dostupné techniky sloužící ke sledování účinnosti antiagregační léčby. Zvolili jsme kontrolní soubory, které vymezily normální hodnoty. Na těchto kontrolních souborech jsme ověřili účinnost léčebné dávky a porovnali tyto soubory se soubory hospitalizovaných neléčených antiagregační terapií a vyloučili tak případné vlivy stresových faktorů, které by mohly ovlivnit výsledky vyšetření. K práci byly využity nejnovější poznatky z této oblasti.

Ke zjištění normálních parametrů agregace krevních destiček (slope a maximální amplituda) po stimulaci katonickým propylgalátem (CPG) jsme použili soubor zdravých lidí (část 3.2.1.1.). Podobně jsme zjistili normální

hodnoty i pro parametr měřený přístrojem PFA 100 (část 3.2.2.1.) a pro uvolňování metabolitu TXB₂ do moči (část 3.2.3.1). Prostaglandiny jsou ve většině tkání velmi brzo po svém vzniku inaktivovány enzymem 15-hydroxyprostaglandindehydrogenázou (MURRAY A KOL., 2002). Proto jsou pro měření produkce TXA₂ využívány jeho stabilní metabolity, TXB₂ v séru nebo v plazmě a 11-dehydro-TXB₂ v moči (EIKELBOOM A KOL, 2002).

V další části studie (část 3.2.1.2.) jsme ověřili, zda koncentrace CPG doporučená výrobcem a uváděná v dostupné literatuře (SCHWARTZ, 1998) dostatečně citlivě zachycuje změny jednotlivých sledovaných agregačních parametrů. Použili jsme soubor pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, kteří dlouhodobě užívali nízké dávky ASA (100 mg/denně), a stanovili jsme u nich agregaci trombocytů po indukci CPG v koncentracích 30 μmol/l, 45 μmol/l a 50 μmol/l. Sledovali jsme změny u parametru slope (%/min) a maximální agregační amplitudy (%). Nalezli jsme mezi jednotlivými koncentracemi jen minimální rozdíly. Proto jsme v dalších studiích používali ke stimulaci agregace výhradně koncentraci CPG 30 μmol/l.

Skupině zdravých osob (část 3.2.1.3) jsme aplikovali ASA v těchto intervalech: 0. den - 100 mg, 1. den - 200 mg, 2. den 400 mg, současně jsme provedli agregační vyšetření s CPG před podáním ASA (0. den), a pak vždy 24 hodin po podání léku (1. den, 2. den a 3. den). Hodnoty parametrů agregace (slope, max. amplituda) se v závislosti na vyšší dávce ASA měnily (grafy 4 a 5). Ověřili jsme si, že v průběhu 1 – 3 dnů se dosáhne terapeutické dávky.

Z literatury je známo, že krevní destičky jsou velmi citlivé na jakékoliv stresové situace nebo změny (SZCZEKLIK, 2005). Takovou stresovou skutečností může být i pobyt v nemocnici spojený s řadou dalších stresových faktorů. K ověření této skutečnosti jsme kontrolní soubor porovnali se skupinou hospitalizovaných, kteří měli diagnózu, u které jsme předpokládali, že nebude mít vliv na měřené parametry krevních destiček. Nezjistili jsme podstatné rozdíly mezi oběma soubory jak u agregace stimulované CPG (část 3.2.1.4), tak i při měření Closure Time na přístroji PFA-100 (část 3.2.2.2). U agregace stimulované CPG jsme porovnávali pouze parametry slope, protože v předchozí studii i v dalších studiích se tento parametr pro hodnocení účinnosti léčby ukázal jako nejvhodnější.

Ke zjištění terapeutických hodnot pro jednotlivá vyšetření (agregace po stimulaci CPG, měření na PFA-100 a TXB₂ v moči) jsme použili soubor pacientů dlouhodobě léčených 100 mg ASA. Hodnoty sledovaných parametrů se podle předpokladu statisticky významně liší od hodnot kontrolního souboru a souboru hospitalizovaných neléčených antiagregační terapií. Při stimulaci agregace s CPG dochází k výraznému poklesu jak hodnoty slope (graf 7), tak i maximální amplitudy. Při měření na přístroji PFA 100 došlo k prodloužení Closure time u systému kolagen/epinefrin, zatímco u systému kolagen/ADP pouze k jeho mírnému zkrácení (rozdíl není statisticky významný). Tyto poznatky jsou ve shodě s literárními údaji (KUNDU A KOL., 1996), protože destička v případě ADP využívá membránové receptory, které nejsou závislé na cyklu kyseliny arachidonové a aktivují krevní destičku přímo. TXB₂ je stabilním metabolitem tromboxanu A₂, který vzniká v metabolické cestě přeměny kys. arachidonové na jednotlivé endoperoxidy v aktivované krevní destičce. V případě antiagregační léčby kyselinou acetylsalicylovou dochází k blokaci COX-1 a k omezení produkce nebo k úplnému zastavení tvorby endoperoxidů v této cestě (VANE A KOL., 1998). Hladina TXB₂ nás tedy nepřímo informuje o účinnosti antiagregační léčby acetylsalicylovou kyselinou. U léčených pacientů v porovnání s kontrolním souborem docházelo ke statisticky významnému snížení koncentrace TXB₂ v moči, což je v souladu s literárními odkazy (HANKEY A EIKELBOOM, 2006).

Z literatury je známo, že existuje část populace, která neodpovídá na antiagregační účinek kys. acetylsalicylové. Aspirinová rezistence zatím není přesně definovaný fenomén. Nejběžněji se hovoří o tzv. klinicky vyjádřené rezistenci. Takto se označují situace, kdy prevence acetylsalicylovou kyselinou selhala – nezabránila dalším kardiovaskulárním trombotickým komplikacím přes to, že ASA byla řádně užívána (MALÝ, 2004). V literatuře se uvádí, že 5 – 45 % léčených nedosáhne adekvátního antiagregačního efektu (GUM A KOL, 2003). O laboratorní rezistenci se hovoří v případech, když ASA není schopna ovlivnit laboratorní testy, které vypovídají o funkci trombocytů. Tento jev popsal již Quick v roce 1966 u nemocných s von Willebrandovou chorobou, kdy po podání ASA nedošlo k prodloužení krvácivosti (MALÝ, 2005). Otázkou zůstává zda „laboratorní rezistence“ má souvislost s klinickým stavem, pokud ano, jestli jsme

podle výsledků laboratorních testů schopni predikovat klinické následky plynoucí z neúčinnosti léčby.

Weber a spol. (WEBER, 1999) navrhli klasifikaci laboratorní aspirinové rezistence, která rozlišuje farmakokinetickou, farmakodynamickou a pseudorezistenci. Farmakokinetická rezistence odráží stav, kdy aspirin in vitro inhibuje agregaci vyvolanou kolagenem i produkci tromboxanu, ale in vivo tento efekt nevyvolává. Příkladem je kompetice ASA s jinými nesteroidními antiflogistiky. Ibuprofen brání svojí přítomností ASA při acetylaci serinu⁵³⁰. Farmakokinetická rezistence je stav, kdy ASA nevyvolává inhibici in vivo ani in vitro. Možnou příčinou tohoto typu rezistence jsou genetické polymorfismy enzymu nebo větší množství COX-2 v trombocytech na úkor COX-1 (SZCZEKLIK, 2005; HANKEY A EIKELBOOM, 2006; ROZALSK A KOL.I, 2005; CAMBELL A KOL., 2004; HOBIKOGLU A KOL., 2005). Snížená biologická dostupnost ASA může být další příčinou rezistence, protože nedochází k dostatečné inhibici cyklooxygenázové dráhy (MARTIN A KOL., 2005, BLINC, 2005; KULICZKOWSKI, 2004).

Dalším faktorem, který způsobuje aspirinovou rezistenci, může být akcentace shlukování destiček zevními faktory jako např. kouření, zvýšení hladiny noradrenalinu během nadměrné fyzické zátěže nebo extrémního stresu, zvýšený oxidační stres nebo hypercholesterolemie.

Za nejspolehlivější metody průkazu rezistence na ASA se považují: agregační metody - agregace stimulovaná kationickým propylgalátem, dále poloautomatické měření aktivity destiček (PFA 100, Ultegra RPFA), které je jednoduché, rychlé, ale nespecifické s nejasnou senzitivitou a nejasnou korelací s klinikou. Stanovení metabolitů TX v moči má snad dobrou korelaci s klinikou, ale má nejasnou specifitu a senzitivitu, a nejasnou reprodukovatelnost.

Ke sledování aspirinové rezistence jsme použili soubor pacientů s diagnózou ICHS, kteří byli dlouhodobě léčeni 100 mg ASA/den. Zjištěné hodnoty měřených parametrů jsme porovnali s hodnotami kontrolního souboru. K vyjádření rezistence na léčbu jsme použili hodnoty, které se u léčených pacientů pohybovaly mimo hodnoty zjištěné u zdravých dárců (kontrolní soubor). V případě agregačního vyšetření jsme detekovali 1 nonrespondera (2 %), u PFA 100 2 nonrespondery (4 %) a u TXB₂ v moči 5 nonresponderů (10 %). Tyto údaje jsou srovnatelné s údaji uvedenými v literárních pramenech, ve kterých počty nonresponderů kolísají v rozmezí od 5 do 45 % v závislosti na metodice měření (ANDERSEN A KOL., 2002; GUM A KOL., 2003).

6 Závěr

1. V práci byly použity agregační studie s kationickým propylgalátem, studie s přístrojem PFA 100, který je schopen sledovat přímo tvorbu primární destičkové zátky, a studie, které sledovaly uvolňování TXA₂ z krevních destiček na základě stanovení stabilního metabolitu 11-dh-TXB₂ v moči.
2. Vypracovali jsme metodu s kationickým propylgalátem (CPG) modifikací metody podle Borna a Crosse a touto metodou jsme vyšetřili některé parametry agregace krevních destiček (BORN A CROSS, 1963).
 - a. Zjistili jsme normální rozmezí pro kontrolní soubor. Průměrná hodnota slope u tohoto souboru byla $84,0 \pm 20,0$ %/min. Hodnoty slope se pohybovaly v rozmezí 64,0 – 104,0 %/min. Podobně byly zjištěny průměrné hodnoty maximální amplitudy $77,6 \pm 12,8$ % (rozmezí 64,8 - 0,4 %).
 - b. Ve studii jsme na souboru pacientů dlouhodobě léčených nízkými dávkami ASA ověřili, že koncentrace CPG doporučená pro agregační studie výrobcem a uváděná v dostupné literatuře (SCHWARTZ, 1998), dostatečně citlivě zachycuje změny jednotlivých sledovaných agregačních parametrů. Byla prokázána dostatečná citlivost reagentie CPG v pracovní koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$.
 - c. U skupiny zdravých dárců jsme potvrdili závislost změn agregačních parametrů (slope a maximální amplituda) na výši dávky ASA. Hodnoty slope v závislosti na zvyšované dávce jednoznačně klesaly. Parametr slope vykazoval zvýšenou citlivost k antiagregační léčbě pomocí ASA, zatímco maximální amplituda se jevila jako ukazatel méně citlivý.
 - d. Nejistili jsme statisticky významné rozdíly u parametrů kontrolní skupiny zdravých dárců a u skupiny hospitalizovaných, u kterých nebyl předpokládán vliv základního onemocnění na destičkové funkce, a kteří nebyli léčeni antiagregační terapií.
 - e. Nalezli jsme statisticky významné rozdíly hodnot mezi skupinou zdravých dárců a skupinou nemocných s kardiovaskulárními komplikacemi, kteří byli dlouhodobě léčeni nízkými dávkami ASA ($p_{\text{slope}} < 0,001$;

$p_{ma} < 0,001$). Statistickou významnost v porovnání se souborem pacientů dlouhodobě léčených ASA vykazuje i skupina hospitalizovaných, u kterých nebyl předpokládán vliv základního onemocnění na destičkové funkce a kteří nebyli léčeni antiagregační terapií ($p_{slope} < 0,001$).

3. Další metodou bylo vyšetření primární hemostázy měřením CT na přístroji PFA-100. Tvorba primární destičkové zátky probíhala na dvou různých membránách potažených kolagenem a ADP nebo kolagenem a epinefrinem.
 - a. Průměrný CT u souboru zdravých dárců na membráně s kolagenem a ADP byl $77,6 \pm 13,8$ s, rozmezí 63,8 - 91,3 s. Průměrný CT systému kolagen/epinefrin byl $110,9 \pm 20,3$ s (rozmezí 90,6 - 131,2 s).
 - b. Podobně jako u agregační studie s CPG jsme porovnali soubor zdravých dárců a skupinu hospitalizovaných, kteří byli léčeni jinými léky než antiagregancii. Mezi kontrolní skupinou a skupinou hospitalizovaných bez antiagregační léčby jsme nenalezli statisticky významný rozdíl.
 - c. Při porovnání skupiny zdravých dárců se skupinou nemocných, kteří byli dlouhodobě léčeni nízkými dávkami ASA, jsme v systému kolagen/ADP nenalezli statisticky významný rozdíl, kdežto v systému kolagen/epinefrin byl rozdíl statisticky významný ($p < 0,001$).
4. Účinnost antiagregační terapie ASA byla nepřímo sledována pomocí hladiny TXB_2 .
 - a. Zjistili jsme průměrnou koncentraci TXB_2 v moči u souboru zdravých dárců $3,72 \pm 1,34$ ng/ml. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí: 2,37 - 5,06 ng/ml.
 - b. Zjištěné hodnoty koncentrace TXB_2 v moči u pacientů dlouhodobě léčených ASA jsme porovnali se zjištěnými hodnotami skupiny zdravých dárců. Pacienti, kterým byly dlouhodobě podávány nízké dávky ASA (100 mg/den) měli nižší koncentraci TXB_2 v moči. Rozdíl byl statisticky významný ($p < 0,001$).
5. U vybrané skupiny 51 pacientů léčených nízkými dávkami ASA (100 mg/den) jsme provedli agregační studie s CPG, vyšetřili jsme primární hemostázu na přístroji PFA-100 a stanovili jsme hladinu TXB_2 v moči. Zjištěné hodnoty jsme

v daném vyšetřovacím schématu porovnali s hodnotami kontrolního souboru a soubor 51 pacientů jsme rozdělili na dvě skupiny: na skupinu pacientů, kteří reagují na léčbu ASA a na skupinu pacientů, kteří na tuto léčbu nereagují (pacienti rezistentní na léčbu ASA).

a. V agregační studii jsme našli 2 pacienty, kteří na léčbu nereagovali, při měření na přístroji PFA 100 jsme zjistili 1 nemocného bez reakce na léčbu a u skupiny, u které jsme vyšetřovali hladinu TXB₂ v moči, jsme našli 5 jedinců, kteří na léčbu nereagovali. Vzhledem k nízkému počtu zjištěných pacientů, kteří na léčbu nereagovali nebyli soubory statisticky hodnoceny.

7 Seznam použitých zkratek

AA	arachidonic acid (kyselina arachidonová)
ACE	angiotensin converting enzyme (angiotenzin konvertující enzym)
ADP, ATP	adenosin (di, tri) phosphat (adenozinfosfát)
AChE	acetylcholin esteráza
ASA	acetylsalicylic acid (kyselina acetylsalicylová)
AT	antitrombin
cAMP, cGMP	cyklický (adenosin, guanin) monophosphat (cyklický monofosfát)
CMP	cytosinmonophosphat (cytosinový monofosfát)
COL	Colagen (kolagen)
COX	cyklooxygenáza
CPG	cationic propylgalate (kationický propylgalát)
CT	closure time (čas ukončení testu)
DAG	diacylglycerol
EPI	epinefrin (adrenalin)
F	koagulační faktor
GP	glykoprotein
GTP	guanosintriphosphat (guanozintrifosfát)
HPETE	hydroperoxyeicosatetraenoic acide (hydroperoxyeikosatetraenoová kyselina)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IP ₃	inositol triphosphat (inositoltrifosfát)
LDL	low density lipoproteins (nízkomolekulární lipoproteiny)

LMWH	low molecular weight heparin (nízkomolekulární heparin)
NK	natural killers (přirození zabíječi)
PAF	platelet activating factor (destičkový aktivační faktor)
PDGF	platelet-derived growth factor (destičkový růstový faktor)
PF4	platelet factor 4 (destičkový faktor 4)
PFA-100	Platelet Function Analyzer (analyzátor destičkových funkcí)
PG G, H, E, F, D	prostaglandin G, H, E, F, D
PGI	prostacyclin (prostacyklin)
PIP2	phosphatidylinositol-bi-phosphat (fosfatidylinositol-di-fosfát)
PKC	proteinkináza C
PLC, PLA ₂	phospholipase C, A ₂ (fosfolipáza)
PPP	platelet poor plasma (plazma chudá na destičky)
PRP	platelet rich plasma (plazma bohatá na destičky)
RGD	peptidová sekvence arginin-glycin-aspartát
TF	tkáňový faktor
t-PA	tissue-plazminogen activator (tkáňový aktivátor plazminogenu)
TXA ₂	tromboxan A ₂
vWF	von Willebrandův faktor
βTG	β-tromboglobulin

8 Seznam literatury

- ANDERSEN, K., HURLEN, M., ARBESEM, H., SELJEFLOT, I. **Aspirin non-responsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease.** *Tromb. Res.*, 2002, roč. 108, s. 37-42.
- AWTRY, E. H., LOSCALZO, J. **Aspirin.** *Circulation*, 2000, roč. 101, s. 1206-1218.
- BADIMON, L., A BADIMON, J. J. **Interaction of platelet activation and coagulation.** In FUSTER, V., TOPOL, E., eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott – Raven Publisher, 1996, s. 639-656.
- BEDNÁŘ, B. a kol. **Patologie.** Praha: Avicenum, 1982, s. 258-262.
- BLINC, A. **Aspirin resistance – clinically meaningful or a laboratory artefact?** *E-Journal*, 2005, roč.3, č. 25.
- BORN, G. V. A CROSS, M. J. **The aggregation of blood platelets.** *J.Physiol.*, 1963, č. 168, s. 178-195.
- BOSEN, G., BOSS, A. H., ØDUM, N., OLSEN, J. **Prolongation of bleeding time and Inhibition of platelet aggregation by low-dose acetylsalicylic acid in patient with cerebrovascular disease.** *Stroke*, 1984, roč. 15, č. 2, s. 240-243.
- BUCHANEC, J. a kol. **Salicylany (Aspirin, Acylpyrin) na prelome tisícročí.** *Klin. Farmakol. Farm.*, 2003, roč. 17, s. 96-101.
- CAMPBELL, C. L., TOPOL, E. J., STEINHUBL, S. R. **The clinical implications of detecting aspirin resistance.** *Business Briefing: Us Cardiology*, 2004, s. 39-42.
- CATTANEO, M. **Aspirin and Clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, roč. 24, s. 1980.
- DALEN, J. E. **An apple a day or an aspirin a day.** *Arch. Intern. Med.*, 1991, roč. 151, s. 1066-1069.

- DE GAETANO G, CERLETTI C. **Aspirin resistance: a revival of platelet aggregation tests?** *J. Tromb. Haemost.*, 2003; č.1, s. 2048-50.
- EIKELBOOM, J. W., HIRSH, J., WEITZ, J. I., a kol. **Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events.** *Circulation*, 2002, roč. 105, s. 1650-1655.
- GESKE, F. J., HURLEY, B., WHITTIER, A. a kol. **A new and rapid immunoassay for the detection of 11-dehydro-thromboxane B2.** *Blood*, 2005, roč. 106, abstrakt 2641.
- GOPAL, P., HOLLENSSEAD, S. C. **Laboratory testing for platelet function at University hospital.** *Laboratory Advisor University of Louisville School of Medicine*, 2006, roč. 19, s.1-5.
- GUM, P. A., KOTTKE – MARCHANT, K., WELSH, P. A., WHITE, J., TOPOL, E. J. **A prospective, blinded determination of the natural history of Aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease.** *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2003, roč. 41, č. 6, s. 961-965.
- HANKEY, G. J., EIKELBOOM, J. W. **Aspirin resistance.** *Lancet*, 2006, č. 264, s. 660 – 617 (22. 2. 2006)
http://www.accessmylibrary.com/coms2/summary_0286-13730039_ITM
- HENNEKENS, C. H., DYKEN, M. L., FUSTER, V. **Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association.** *Circulation*, 1997, roč. 96, s. 2751-2753.
- HILMEROVÁ, J. A FILIPOVSKÝ, J. **Klinický význam aspirinové rezistence.** *Vnitř. Lék.*, 2004, roč. 50, č. 6, s. 462-469.
- HOBIKOGLU, G. F., NORGAZ, T., AKSU, H. a kol. **High frequency of Aspirin resistance in patient with acute coronary syndrome.** *Tohoku J. Exp. Med.*, 2005, č. 207, s. 59-64 .
- HYNIE, S. **Farmakologie v kostce.** Praha: Triton, 2001, s. 68-75, 220.

- JOHNS, C. S. **Platelet function testing.** *Clin. Haemost. Rev.*, 2004, roč. 18, č. 4, s. 1-7.
- KATZUNG, B. B. **Základní a klinická farmakologie.** Praha, H and H, 1994, s. 482-495
- KLIMKOVÁ, I. **Látky používané v terapii onemocnění krve.** 2002.
- KROLL, M. H. A SCHAFFER, A. I. **The analysis of ligand-receptor interactions in platelet activation.** In M. JOSEPH (ed). *Immunopharmac. of platelets.* London: Academic Press, 1995, s. 31-65.
- KROLL, M.H. A SCHAFFER, A.I. **Biochemical mechanism of platelet activation.** *Blood*, 1989, roč. 74, č. 4, s. 1181-1195.
- KULICZKOWSKI, V. **Aspirin resistance in ischaemic heart disease.** *Polish Heart J.*, 2005, roč. 62, č. 1.
- KUNDU, S. K., HEILMANN, E. J. A KOL. **Characterisation of an in vitro platelet function analyzer (PFA-100), clinical application.** *Tromb. Haemost.*, 1996, roč. 2, s. 241-249.
- MALÝ, J. **Rezistence na kyselinu acetylsalicylovou.** *Interv. akut. Kardiol.*, 2005, roč. 4, č. 4, s. 192-193.
- MALÝ, J. **Vyšetření destičkových funkcí se vztahem k rezistenci na kyselinu acetylsalicylovou.** *Vnitř. Lék.*, 2004, roč. 50, č. 8, s. 591-599.
- MAREK, J. a kol. **Farmakoterapie vnitřních nemocí.** Praha: Grada, 2005, s. 25-33, 291-293.
- MARTIN, C. P., TALBERT, R. L. **Aspirin resistance: an evaluation of current evidence and measurement methods.** *Pharmacotherapy*, 2005, roč. 25, č. 7, s. 942-953.
- MAYO, K. H., FAN, F., BEAVERS, M. P., a kol. **RGD induces conformational transitions in purified platelet integrin GP IIb-IIIa-SDS system yielding multiple binding states for fibrinogen gamma Chin C-terminal peptide.** *FEBS Lett.*, 1996, roč. 378, s. 79-82.
- MCKEE, S. A., SANE, D. C., DELLARGYRIS, E. N. **Aspirin resistance in cardiovascular diseases: A review of prevalence, mechanisms**

- and clinical significance.** *Thromb. Haemost.*, 2002, roč. 88, s. 711-715.
- MURRAY, R. K. a kol. **Harperova Biochemie.** Praha: H+H, 2002, s. 247-249.
 - NIEUWENHUIS, H. K., AKKERMAN, J. W., HOUDIJK, W. P., SIXMA, J. J. **Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoproteins Ia.** *Nature*, 1985, roč. 318, s. 470–472.
 - NURDEN, A. T., GEORGIE, J. N., Platelet membrane glycoproteins: Their structure, function and modification in diseases. In **Biochemistry of platelets.** (PHILLIPS, D. R., SHUMAN, M. A) Orlando: Academic Press, 1986, s. 159-224
 - PATRONO, C. **Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs.** *J. Thromb. Haemost.*, 2003, č. 1, s. 1710-1713.
 - PECKA, M. **Laboratorní hematologie v přehledu, Fyziologie a patofyziologie hemostázy.** Český Těšín: Finidr, 2004, s. 225-230.
 - PECKA, M. **Laboratorní hematologie.** Český Těšín: Finidr, 2006, s. 103-131.
 - PERNEBY, C., GRANSTROM, E., BECK, O., a kol. **Optimization of an enzyme immunoassay for 11-dehydro-thromboxane B₂ in urine: comparison with GC-MS.** *Thromb. Res.*, 1999, roč. 96, s. 427- 436.
 - PRISCO, D., PANICCIA, R. **Point of care testing of haemostasis in cardiac surgery.** *Thromb J.*, 2003, č. 1, s. 1-4.
 - REILLY I. A. G., FITZGERALD, G. A. **Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo.** *Blood*, 1987, roč. 69, č. 1, s. 180-186.
 - ROTH, G. J. **Developing relationship: Arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib and leucine- rich glycoproteins.** *Blood*, 1991, roč. 77, s. 5.
 - ROZALSKI, M., BONCLER, M., LUZAK, B., WATALA, C. **Genetic factors underlying differential blood platelet sensitivity to inhibitors.** *Pharmacological reports*, 2005, roč. 57, s. 1-13.

- SAMAMA, M. M. A ELALAMY, I. **Aspirin et hemostase.** *Rev. Méd. Interne*, 2000, roč. 21, č. 1, s. 27-34.
- SCHWARTZ, K. A., SCHWARTZ, D. E., DAVIS, J. A. **Detection and monitoring of aspirin inhibition of platelet function using the cationic propyl gallate platelet aggregation assay.** *Abstract Book American Society of Hematology Meeting*, 1998, s. 17-19.
- SILBERNAGL, S., LANG, F. **Atlas patofyziologie člověka.** Praha: Grada, 2001, s. 216-218.
- SZCZEKLIK, A., A KOL. **Aspirin resistance.** *J. Thromb. Haemost.*, 2005, roč. 3, s. 1655-1662.
- ŠPINAR, J., VÍTOVEC, J. A KOL. **Ischemická choroba srdeční.** Praha: Grada, 2003, (2. 10. 2006)
https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1587.html
- TRAMER, R. M., **Aspirin, like all other drugs, is a poison.** *Br. Med. J.*, 2000, č. 321, s. 1170, 1183.
- VANE, J. R., BAKHLE, Y. S., BOTTING, R. M. **Cyklooxygenases 1 and 2.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998, roč. 38, s. 97-120.
- VOJÁČEK, J. **Inhibitory destičkových glykoproteinových receptorů typu IIb/IIIa.** *Remedia*, 2003, roč. 13, č. 2, s. 84-92.
- VOJÁČEK, J., MALÝ, M., HRABOŠ, V. a kol. **Hladina tkáňového faktoru, inhibitoru tkáňového faktoru a solubilního P-selektinu u nemocných s akutním koronárním syndromem.** *Cor Vasa*, 2002, roč. 44, s. 148-151.
- WEBER, A-A., ZIMMERMANN, K.C., MAYER-KIRCHRATH, J., SCHRÖR, K. **Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance.** *Lancet*, 1999, roč. 353, s. 900.