Přehledový článek | Review article

Rezistence k antiagregační léčbě: klinická relevance funkčního vyšetření trombocytů

(Resistance to antiplatelet treatment: The clinical relevance of platelet function assays)

Jiří Plášek^{a,b}, Miroslav Homza^{a,b}, Jaromír Gumulec^c, Markéta Ryzí^c,
Radovan Stančík^a, David Šipula^a

^a Kardiovaskulární oddělení, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava, Česká republika^b Lékařská fakulta Ostravské univerzity, Ostrava, Česká republika^c Ústav klinické hematologie, Fakultní nemocnice Ostrava, Ostrava, Česká republika

INFORMACE O ČLÁNKU

Historie článku:

Došel do redakce: 6. 4. 2012

Přepřacován: 3. 8. 2012

Přijat: 8. 8. 2012

Dostupný online: 16. 8. 2012

Klíčová slova:

Aspirinová/clopidogrelová
rezistence

Funkční vyšetření trombocytů

Vysoká reziduální reaktivita

SOUHRN

Funkční vyšetření trombocytů zatím není rutinní vyšetřovací metodou v kardiologii. Vyšetření by mělo selektovat pacienty se zvýšenou reziduální reaktivitou trombocytů (high on-treatment platelet reactivity – HPR). Zvýšená reziduální reaktivita trombocytů je zřejmým, ačkoliv ne jediným, rizikovým faktorem aterosklerotického plátu) ovlivňujících vývoj aterosklerotické pláty. Protidestičková léčba je cílena především na snížení úrovně aktivace trombocytů. V neposlední řadě je třeba zohlednit unikátní farmakodynamiku a farmakokinetiku každé účinné látky a farmakogenetický profil recipienta. Cílem naší práce je shrnout dosavadní poznatky a podat ucelenou informaci o pozitivě, ale i rizicích hodnocení funkčního vyšetření trombocytů v kardiologii.

© 2012, ČKS. Published by Elsevier Urban and Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

Úvod

V dnešní době tvoří v kardiovaskulární medicíně kyselina acetylsalicylová (ASA) a thienopyridiny základ antiagregační léčby u pacientů po intervenčních výkonech. Kyselina acetylsalicylová je schopna zabránit zhruba 20–25 % ischemických vaskulárních příhod (infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, progresse ischemické choroby dolních končetin) dle rozsáhlé multicentrické studie Antithrombotic Trialists' Collaboration [1]. Clopidogrel redukuje relativní riziko ischemické vaskulární komplikace o 8,7 % ve srovnání s ASA [2]. Kromě předpokládané progresse základních vaskulárních chorob se začalo uvažovat o rezistenci k antiagregační léčbě, respektive selhání léčby. Zatím neexistuje exaktní definice aspirinové/clopidogrelové rezistence, a proto se pod tímto pojmem skrývá hned

několik odlišných fenoménů. Aspirinová/clopidogrelová rezistence *per se* představuje neschopnost blokády cyklooxygenázy-1, respektive receptoru adenosindifosfátu (ADP) při dobré biologické dostupnosti léčiva. Tyto konečné účinky léčby se ale velmi obtížně testují, a tak se musíme spokojit s nepřímými znaky selhání/nedostatečné blokády. Jako klinická rezistence je myšlena neschopnost antiagregačního přípravku zabránit ischemické vaskulární příhodě. Biochemická rezistence představuje abnormality ve funkčních testech trombocytů, které jsou ale závislé na typu použitého testu, množství ostatních agonistů agregace a mnoha dalších faktorech. Nejvýstižnější definice rezistence k antiagregační léčbě je definice Hankeyho [3]: „nedostatečná odpověď na standardní dávku kyseliny acetylsalicylové u spolupracujícího pacienta prokázaná spolehlivým, konzistentním a nezávislým testem funkce

Adresa: MUDr. Jiří Plášek, Ph.D., Kardiovaskulární oddělení, Fakultní nemocnice Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 00 Ostrava, e-mail: jiri_plasek@centrum.cz

DOI: 10.1016/j.crvasa.2012.08.003

trombocytů, signifikantně korelujícím s ischemickými epizodami". V některých ohledech přehlíženým jevem je možná nedostatečná compliance pacientů, která je navíc nelehce/draze ověřitelná a může vést k „pseudorezistenci". V poslední době se ustaluje pojem zvýšená reziduální reaktivita trombocytů při léčbě antiagregancii, tzv. high on-treatment platelet reactivity (HPR).

Úloha trombocytů v arteriální trombóze

Arteriální trombóza je složitý děj, jehož aktivace je spuštěna rupturou intimy cévy většinou v důsledku vystupňovaného aterosklerotického procesu. Následkem exprese subendoteliálních struktur jako von Willebrandova faktoru a kolagenu dojde k navázání destiček pomocí glykoproteinů Ib/VI/IX, respektive Ia/IIa, a jejich aktivaci [4]. Aktivace trombocytu znamená tři zásadní pochody: a) konformační změnu glykoproteinu IIb/IIIa zvyšující jeho vazebnou schopnost; b) vyloučení agonistů aktivace trombocytů jako ADP či tromboxanu A_2 (TxA_2) do oběhu, kde se pak váží na trombocyty; c) změnu tvaru trombocytu. Tromboxan A_2 je klíčovým prvkem tvorby primární hemostatické zátky a akcelerace aktivace trombocytů. Je schopen zvýšit expresi receptorů pro fibrinogen, má vazokonstrikční účinky a formou pozitivní zpětné vazby zvyšuje tvorbu svého prekursoru kyseliny arachidonové [5]. Aktivované trombocyty jsou díky své intra- a intercelulární signalizaci nepostradatelné v procesu primární hemostázy a následně tvorby koagula. Ze stejného důvodu jsou také cílem léčebných zásahů, které v dnešní kardiovaskulární medicíně tvoří základ managementu jak akutních stavů, tak primární i sekundární prevence.

Kyselina acetylsalicylová a ti ostatní

Kyselina acetylsalicylová je jedním z nejstarších synteticky připravovaných léků, ale jak ukázala recentní publikovaná studie týkající se snížení rizika kolorektálního karcinomu, stále může být středobodem převratných objevů [6]. Příomou a ireverzibilní inhibicí cílenou na cyklooxygenázu-1 (COX-1) ASA zamezuje produkci nestabilního produktu prostaglandinu H_2 , který by jinak účinkem tromboxan-syntázy dal vznik konečnému metabolitu TxA_2 . Resyntéza COX-1 je díky minimálnímu proteosyntetickému aparátu a absenci jádra trombocytu zanedbatelná, efekt tedy trvá po dobu životnosti trombocytu, což je 7–10 dnů. Denně se za klidových podmínek obměňuje přibližně 10 % celkového poolu trombocytů, při stresových reakcích, jakými jsou např. operační zátěž a systémová zánětlivá aktivita, může být obrat zvýšen [7]. V primární prevenci je ASA schopna zabránit 20–25 % nežádoucích ischemických kardiovaskulárních příhod, v sekundární prevenci je dle optimistických předpokladů číslo vyšší, cca 40 % [8]. Kyselina acetylsalicylová ale nemá vliv na mortalitu a existuje diverzita účinku vzhledem k pohlaví, snižuje totiž incidenci infarktů u mužů a cévních mozkových příhod u žen [1]. Není to málo, bereme-li v potaz, že blokuje cestu jen jednoho agonisty aktivace trombocytů. Navíc neovlivňuje silné agonisty jako trombin. Ve většině případů stačí k 95% blokádě COX-1 nízké dávky ASA, tj. 75–100 mg/denně

[9]; efekt je kumulativní. Zatímco COX-1 je produkována konstitutivně, produkce COX-2 je zvýšena až dvacetkrát u zánětlivých onemocnění, kterým je do jisté míry i ateroskleróza [10]. Jaderné buňky jako makrofágy a monocyty tak mohou přispívat ke COX-1 non-dependentní produkci TxA_2 , a tím „zastiňovat" účinek ASA. Populační variabilita v odpovědi na ASA je geneticky determinována z 1–13 %, její příčinou je většinou COX-1 nezávislá chronicky zvýšená aktivita/agregabilita trombocytů [11]. Clopidogrel patří do skupiny thienopyridinů, jejichž primárním cílem je nekompetitivní ireverzibilní blokáda receptoru pro ADP, tzv. $P2Y_{12}$. Signalizace cestou receptoru $P2Y_{12}$ je podstatná k plné aktivaci integrinu IIb/IIIa, který je důležitým prvkem ireverzibilní agregace trombocytů [4]. V textu se z thienopyridinů budeme zabývat pouze clopidogrelem pro superioritu ve srovnání s ticlopidinem a nedostatek dat o funkčním vyšetření trombocytů při léčbě prasugrelem. Ve srovnání s ticlopidinem je clopidogrel cca šestkrát silnější blokátor $P2Y_{12}$, má rychlejší nástup účinku a nižší incidenci závažných nežádoucích účinků, jako jsou neutropenie a trombotická trombocytopenická purpura [12]. Nevýhodou obou léků je, že jde o prodrug. Biologická dostupnost je proto závislá nejen na absorpci z gastrointestinálního traktu, která tvoří cca 50 %, ale také na metabolismu cytochromem P450. Až 85 % vstřebané látky se mění na zcela neúčinný metabolit, nicméně i 15 % účinné látky R-130964 kovalentně navázané na receptor $P2Y_{12}$ má dostatečný antiagregační efekt k ireverzibilní ADP-dependentní inhibici aktivace trombocytů [4]. Ve studii CAPRIE byla prokázána redukce relativního rizika ischemického infarktu, infarktu myokardu a kardiovaskulárního úmrtí o 8,7 procentního bodu při léčbě clopidogrelem 75 mg ve srovnání s kyselinou acetylsalicylovou 375 mg [13]. Těžšíště léčebného účinku thienopyridinů, obzvláště clopidogrelu, ale spočívá v prevenci ischemických příhod po provedení perkutánní koronární intervence se zavedením stentu, což nejlépe demonstrovala studie CLASSICS [14].

Poslední lékovou skupinou, která bude diskutována vzhledem k možné rezistenci/selhání léčby, jsou blokátory glykoproteinu IIb/IIIa. Existují tři skupiny těchto léků; monoklonální protilátky proti IIb/IIIa, peptidy a peptidomimetika. K adekvátnímu útlumu aktivace trombocytů je třeba udržovat 80% obsazení receptoru [14]. Ačkoliv první výsledky hodnocení účinku těchto léků byly zklamáním, jelikož nedocházelo k dostatečné redukci v krátkodobé mortalitě pacientů po koronárních intervencích, z dlouhodobého hlediska krátkodobé podání antagonistů IIb/IIIa v průběhu perkutánní koronární revaskularizace snížilo kardiovaskulární mortalitu [15].

Aspirinová rezistence

Koncept selhání léčby kyselinou acetylsalicylovou vznikl z představy, že antiagregační léčba by měla zabránit nejlépe všem ischemickým vaskulárním epizodám. Z podstaty vývoje aterosklerotického plátu je to prakticky nemožné. Kyselina acetylsalicylová, jak výše popsáno, působí na COX-1 a snižuje tvorbu trombogenního a vazokonstrikčního TxA_2 . Blokáda jedné cesty aktivace trombocytů ale kompletně nezamezí tvorbě primární hemostatické zátky, jsou-li obnaženy subendoteliální struktury při ruptuře aterosklerotického plátu. Na druhé straně by ani nebylo žádoucí, aby byla primární hemostáza úplně nefunkční,

tento stav by totiž měl za následek zvýšený počet krvácivých komplikací. Ponecháme teď stranou, že pacienti s Glanzmannovou trombocytopatií prakticky nemají infarkty či cévní mozkové příhody. Kyselina acetylsalicylová ve standardním dávkování zamezí zhruba 20 % ischemických příhod v primární prevenci [1]. Otázkou tedy je, jaký podíl z těch zbývajících 80 % je tvořen pacienty, kteří mohou být k léčbě kyselinou acetylsalicylovou rezistentní. Pravou biochemickou rezistencí by měla být neefektivní blokáda COX-1 při dostatečné biologické dostupnosti. Bylo prokázáno, že běžné dávkování 75–325 mg ASA je dostačující k 95% inhibici aktivity COX-1 [9]. Nedostatečná dávka by tedy neměla hrát větší roli. Někteří pacienti jsou ale schopni tvorby TxA_2 nezávislé na trombocytární produkci. Příčina může tkvět v aktivaci monocytomakrofágového systému nebo endoteliálních buněk a jejich inducibilní COX-2, na kterou ASA nemá vliv [16]. U kuřáků je zvýšená aktivita COX-2 jednou z příčin vysokého kardiovaskulárního rizika [17], možná právě v důsledku selhání léčby kyselinou acetylsalicylovou.

Na druhé straně je známý jev tzv. smokers paradox, kdy kouření tabáku zvyšuje inhibici destiček navozenou clopidogrelem. Zvýšený obrát trombocytů v důsledku stresové reakce organismu (operační zátěž, chronické zánětlivé procesy) zvýší populaci „neinhibovaných“ COX-1, což také přispívá k „selhání léčby“, protože biologický poločas ASA je pouhých 20 minut [18]. Data z Framinghamské studie prokazují, že za jednou třetinou variability odpovědi na ASA stojí genetické faktory [19]. Podkladem modifikované odpovědi na ASA může být jednonukleotidový polymorfismus genů pro COX-1, COX-2, případně různých trombocytárních glykoproteinových receptorů [20].

V případě narušené absorpce či zvýšeného metabolismu ASA může dojít ke snížení biologické dostupnosti léčiva a nedostatečnému účinku léčby. Důvody snížené biologické dostupnosti mohou být ale daleko prozaičtější, a to nedostatečná compliance, na kterou je třeba myslet obzvláště u geriatrických pacientů. V populaci pacientů po akutním infarktu myokardu neužívalo kyselinu acetylsalicylovou alarmujících 40 % testovaných [21]. V neposlední řadě je třeba vzít v potaz kompetici na úrovni receptoru COX-1 při konkomitantním užívání ASA s nesteroidními antiflogistiky. Pro ibuprofen a naproxen existují data potvrzující snížení účinnosti ASA pomocí měření tromboxanu B_2 v moči a parametrů funkčních testů trombocytů [22,23].

Máme tedy indicie, že z mnoha různých důvodů může dojít k selhání léčby kyselinou acetylsalicylovou. Velkou otázkou ale je, jakým způsobem standardně a validně tuto „rezistenci“ otestovat. Prevalence laboratorní rezistence k ASA se pohybuje od 5 do 40 % a nejvíce závisí na použitém testu [24]. Jako slibný test se ukázal močový 11-dehydrothromboxan B_2 (TxB_2), který byl odebírán u kanadských účastníků studie HOPE [25]. Vyhodnocoval se vztah rizika kardiovaskulární ischemické příhody v závislosti na hodnotě TxB_2 v moči. Z výsledků plyne, že rezistence k ASA je spíše hodnota kontinuální než kategorická. Lze ji dávat do souvislosti s nízkými močovými hodnotami TxB_2 , ale jednak vztah není absolutní pro možnou interferenci s renální insuficiencí a jednak chybí zřejmá hraniční hodnota. Přesto se TxB_2 používá společně se světelnou agregometrií jako zlatý standard, se kterým jsou srovnávány ostatní funkční testy trombocytů.

Clopidogrelová rezistence

V prevenci aterotrombózy se clopidogrel ukázal jako účinný v mnoha studiích a jde o v praxi plně zavedený lék. Přesto dle dostupných dat existuje variabilita v odpovědi na clopidogrel, která je stejně jako u ASA nejspíše multifaktoriální. Prevalence neadekvátní odpovědi na clopidogrel se pohybuje v rozmezí 5–40 % [26]. V případě clopidogrelu hraje ale genetická determinace selhání léčby daleko větší úlohu než u ASA. Clopidogrel je totiž prodrug a dvoukroková metabolizace na aktivní látku je závislá na polymorfismu genu jaterního cytochromu P450. U nositelů varianty CYP2C19*2 bylo prokázáno až šestkrát vyšší riziko aterotrombotického uzavěru stentu a výskyt v populaci se odhaduje na 30 % [27]. Pozitivní predikční hodnota polymorfismu CYP2C19 se ztrátou funkce pro nežádoucí kardiovaskulární příhody (trombóza stentu atd.) je však nízká, cca 12–20 % [28]. Ve studii ELEVATE-TIMI 56 bylo prokázáno, že ztrojnásobení dávky clopidogrelu na 225 mg vedlo u heterozygotů CYP2C19*2 ke srovnatelné úrovni blokády jako u pacientů bez této mutace. Homozygoti pro CYP2C19*2 nedosáhli dostatečné blokády trombocytů ani po 300 mg clopidogrelu [29]. V poněkud kontroverzní metaanalýze na 42 016 pacientech nebylo potvrzeno větší riziko kardiovaskulárních příhod u nositelů CYP2C19*2, do studie ale nebyli zahrnuti pouze homozygoti [30]. Bylo by ale nemístným zjednodušením tvrdit, že genetické polymorfismy jsou jediným důvodem zvýšené reziduální aktivity trombocytů a následného selhání/rezistence k léčbě. Jako u kteréhokoliv jiného léku může u některých pacientů dojít k horší absorpci clopidogrelu. Případně může dojít k lékové interakci na cytochromu P450 CYP3A4 ve smyslu indukce některými léky. U nejčastěji uváděných statinů a blokátorů protonové pumpy však v klinických studiích nebyl prokázán vyšší výskyt kardiovaskulárních ischemických příhod [31–33]. Ačkoliv v jedné studii byl prokázán po podání omeprazolu pokles inhibičního efektu clopidogrelu na P2Y_{12} pomocí VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), očekávaný vyšší výskyt kardiovaskulárních cílových ukazatelů nebyl pozorován [34]. Naproti tomu existují skupiny pacientů s akutními koronárními syndromy, kteří mají zvýšenou počáteční reaktivitu trombocytů („náchyllost k agregaci“), což je spojeno s nepříznivými kardiovaskulárními příhodami (periprocedurální infarkt myokardu, trombóza stentu) [35]. Jde převážně o pacienty s diabetes mellitus, obezitou či vyjádřeným metabolickým syndromem.

Rezistence k blokátorům IIa/IIb/IIIa?

Právem by měl být otazník u všech zmíněných rezistencí, jelikož termín nesplňuje patofyziologické podklady rezistence, a navíc evokuje spíše kategoriální než kontinuální charakter jevu; smysl však postrádá nejvíce u inhibitorů IIb/IIIa. Zde bychom totiž měli mluvit o úrovni blokády/reziduální reaktivitě trombocytů v závislosti na dávce, eventuálně délce infuze v případě parenterálního přípravku. Výsledky prvních studií s těmito přípravky byly spíše zklamáním z neočekávané špatných výsledků. Ve světle pozdějších poznatků o parciálním agonismu na cílovém receptoru, mírné prozánětlivé aktivaci a užším terapeutickém okně se zdůvodnily prvotní neúspěchy [4]. V pozdějších studiích, které zohlednily užší terapeutické

okno léčiva, byla prokázána bezpečnost podávání a užitek u vysoce rizikových pacientů v rámci PCI, obzvláště s trombózou nativních tepen či stentů [36]. Zatím neexistuje dostatek dat k označení „selhání léčby“ či rezistence k léčbě blokátory glykoproteinu IIb/IIIa. Byl ale prokázán větší antiagregační efekt po vysoké dávce tirofibanu ve srovnání se standardní dávkou abciximabu [37]. Selektivní tzv. downstream podání inhibitorů GP IIb/IIIa po saturační dávce 600 mg clopidogrelu se ukázalo jako účinná strategie v minimalizaci kardiovaskulárních rizik u troponin-pozitivních akutních koronárních syndromů [38]. Navíc blokátory GP IIb/IIIa prokázaly vysokou efektivitu v redukci periprocedurálních a dlouhodobých ischemických příhod u pacientů s HPR [39,40]. Příčiny interindividuální variability v odpovědi na GP IIb/IIIa zatím nelze určit tak snadno jako v případě ASA/clopidogrelu pro nedostatek studií zabývajících se touto problematikou. Navíc je v klinických podmínkách složité testovat účinek blokátory Gp IIb/IIIa při současném podávání ostatních protidestičkových léků.

Funkční vyšetření trombocytů

Hlavním cílem funkčního vyšetření trombocytů je zjistit úroveň odpovědi na antiagregační léčbu u pacientů léčených pro různé formy ischemické choroby srdeční, ale i cévní mozkové příhody. V primární prevenci by měla význam selekce rizikových pacientů s hrozící první epizodou aterotrombózy, v sekundární prevenci pak zmenšení rizika uzávěru stentu případnou úpravou léčby dle výsledků reziduální reaktivity trombocytů. Funkční vyšetření lze arbitrárně rozdělit na laboratorní a tzv. POCT (point-of-care test), jejichž spektrum se v poslední době velmi rychle rozšiřuje (tabulka 1).

Zlatým standardem ve vyšetřování funkce trombocytů je klasická optická agregometrie (**light transmittance aggregometry – LTA**), částečně i proto, že šlo o historicky první metodu. Jde o plně laboratorní metodu, náročnou jak instrumentálně, tak časově. Princip metody spočívá v měření světelné transmitance vzorku plazmy bohaté na trombocyty. Transmitance se zvyšuje vlivem postupné agregace trombocytů, která byla způsobena přidáním agonisty – induktoru agregace. Agregometr zaznamenává změny signálu jako agregační křivku, která má možný rozsah od 0 % (odpovídá plazmě bohaté na trombocyty) do 100 % (maximální agregace, odpovídá plazmě chudé na trombocyty). Průběh agregace trombocytů se zaznamenává po deset minut, hodnotí se maximální a pozdní agregace. Agregometrie vyšetřuje integrovanou odpověď destiček na ADP cestou receptorů P2Y₁ a P2Y₁₂. Optická agregometrie je etablovanou metodou k hodnocení vysoké reziduální aktivity trombocytů. Zvýšená trombocytární reaktivita je hodnocena jako 46% maximální 5 μmol/l ADP-indukované agregace. Výsledky zvýšené reaktivity trombocytů relativně dobře korelují s procentem ischemických příhod ve skupině pacientů selektované pomocí LTA [41]. Dle podaného agonisty je možno otestovat reaktivitu na ASA, clopidogrel i antagonisty GP IIb/IIIa. Senzitivita a specifita selekce rizikového pacienta pomocí LTA se pohybuje kolem 60 % pro obě položky. Významná je negativní prediktivní hodnota dosahující 94 % [38].

K náročnějším laboratorním metodám vyšetření funkce trombocytů patří také flowcytometrické vyšetření **fosfoproteinu stimulovaného vasodilací (VASP)**. Jde o intracelulární protein, jehož fosforylovaný podíl vypovídá o úrovni inhibice destiček cestou receptoru P2Y₁₂. Testuje

Tabulka 1 – Srovnání pro a proti metod funkčního vyšetření trombocytů

Typ metody	Výhody	Nevýhody
Optická agregometrie	Zlatý standard Dobrá korelace s klinickými příhodami	Laboratorní náročnost Částečná závislost na hodnotiteli
VASP	Malý objem vzorku z plné krve Možnost stanovení GP IIb/IIIa a mnoho jiných (CD40L, selektin)	Nutnost zkušeného personálu
PFA-100	POCT, semiautomatická metoda Jednoduchá	Závislost na hodnotě von Willebrandova faktoru Horší reproducibilita
VerifyNOW	POCT, semiautomatická metoda jednoduchá, rychlá	Závislost na hematokritu
Plateletworks	POCT Rychlé vyhodnocení Plná krev	Nedostatek dat o provázanosti s klinickými epizodami
Impact-R	POCT Plná krev bez další přípravy vzorku	Nedostatek dat o provázanosti s klinickými epizodami, nízká dostupnost
Multielektrodová agregometrie	Rychlé hodnocení Plná krev	Nutnost přípravy reagentů + manuální pipetování
Impedanční agregometrie	Plná krev, relativně dobře koreluje s trombotickými příhodami	Časově náročná příprava vzorku
Tromboelastografie (platelet mapping)	Poskytuje komplexní informaci o viskoelastických vlastnostech krve	Nedostatek studií

POCT – point-of-care test; VASP – fosfoprotein stimulovaný vasodilací (vasodilator-stimulated phosphoprotein).

tedy především reziduální aktivitu destiček po podání clopidogrelu. Index reaktivity destiček (platelet reactivity index – PRI) > 50 % vyjadřuje u VASP zvýšenou trombocytární reaktivitu [42]. Studie případů a kontrol prokázaly u 60 % pacientů se subakutní in-stent trombózou nedostatečnou inhibici receptoru P2Y₁₂ zjištěnou pomocí VASP [42,43]. Obě metody, jak LTA, tak VASP, prokázaly relativně dobrou korelaci ischemických/trombotických epizod se zvýšenou reziduální trombocytární reaktivitou (HPR), jejich významné omezení představuje náročnost zpracování a vyhodnocení vzorku. Výhodou LTA a VASP je naopak významná negativní prediktivní hodnota. Právě z důvodu laboratorní náročnosti starších metod a potřeby rychlé znalosti výsledků se v poslední době objevilo na trhu mnoho přístrojů, které testují funkce trombocytů jednak z plné krve a jednak přímo na klinických pracovištích, tj. POCT. Vzhledem k narůstajícímu počtu těchto metod je nutné znát princip vyšetření a faktory ovlivňující testy, abychom výsledky mohli správně interpretovat.

Platelet function analyser (PFA-100) testuje jako jeden z mála komplexně proces primární hemostázy, která je kriticky závislá na funkci trombocytů. Vyšetření se provádí z plné citrátové krve, která je nasávána za vysoké smykové rychlosti (5 000–6 000 s⁻¹) přes kapiláru potaženou induktory agregace trombocytů (liší se u jednotlivých modulů). Jako výsledek stanovení se udává tzv. closure time – uzavírací čas (CT), což je doba do uzavření membrány trombem. V případě responderů na ASA by měl přesahovat 180 sekund [44], pro clopidogrel 106 sekund [45]. V rámci vyšetření se uplatňuje úroveň aktivity trombocytů, ale také smykové napětí, které je intenzivnější při vyšších hodnotách von Willebrandova faktoru; hlavní výhodou testu se tak stává někdy jeho hlavní nevýhodou. V našem souboru 25 pacientů vyšetřených pomocí PFA-100 byli 2 pacienti s in-stent trombózou, kteří vykazovali zvýšenou reziduální reaktivitu trombocytů při léčbě ASA, jeden dokonce duální reziduální zvýšenou reaktivitu (léčený ASA + clopidogrelem). V obou případech byla navýšena dávka léků, která následně vedla alespoň k laboratornímu „responderství“, klinicky jsou oba pacienti po šesti měsících bez reinfarktu/rekronarografie. Ve velkém souboru se ale nepodařilo prokázat schopnost PFA-100, resp. PFA-200 selektovat na základě neprodloužení uzavíracího času pacienty s vyšším rizikem nepříznivých kardiovaskulárních příhod [41]. Optimální laboratorní odpověď tedy nemusí být nutně známkou dobrého klinického výsledku. Většina odborníků se shoduje, že se PFA-100 příliš nehodí k monitoraci úrovně inhibice trombocytů pro mnoho faktorů ovlivňujících vyšetření (počet trombocytů, hematokrit, hodnota fibrinogenu a von Willebrandova faktoru).

Mnohočetná impedanční agregometrie (multiple electrode aggregometry – MEA, Multiplate). Alternativou k LTA je impedanční agregometrie, která umožňuje vyšetřovat agregaci z plné krve. Mezi dvěma platinovými destičkami, které jsou umístěny v kyvetě se vzorkem, prochází elektrický proud. Ten způsobí pokrytí elektrod trombocyty. Po přidání agonisty trombocyty, leukocyty i erytrocyty adherují na elektrody s trombocyty, a tím snižují probíhající elektrický proud. Změna signálu je zaznamenávána jako agregační křivka, z níž se pak hodnotí parametr AUC (plocha pod křivkou). AUC kvantitativně odráží aktivitu trombocytů. K vyšetřování účinnosti léčby

kyselinou acetylsalicylovou se používá ASPItest (induktor agregace – kyselina arachidonová), při sledování léčby antagonisty trombocytárních receptorů ADP lze použít ADP test (induktor agregace – ADP), případně ADPtest HS (induktory agregace – ADP, prostaglandin E1 – PGE1). Nejde ale plně o metodu POCT, jelikož je nutné v průběhu vyšetření pipetovat. Mnohočetná impedanční agregometrie je schopna identifikovat pacienty s reziduální trombocytární reaktivitou s rizikem následné trombózy stentu až se 100% senzitivitou a 86% specificitou [46]. Optimální hraniční hodnota při vyšetření MEA > 416 AU/min selektuje pacienty s rizikem 30denní trombózy stentu s 84% specificitou a 70% senzitivitou [47]. Navíc byla prokázána dobrá korelace mezi výsledky MEA a zlatým standardem (LTA) [48], a dokonce vyšší selektivita pro trombózu stentu při vyšetření MEA než VASP [46].

VerifyNOW představuje plně metodu POCT založenou na turbidimetrickém stanovení agregace indukované agonistou (epinefrin, ADP). Vzorek plné citrátové krve je spojen s diagnostikem, které obsahuje mikropartikelé potažené lidským fibrinogenem. Aktivací agregace dojde ke vzniku shluků a zvýšení transparence vzorku. Pomocí poměru množství agregovaných destiček před agregací indukovanou agonistou a po ní byl vytvořen jak pro ASA, tak clopidogrel systém indexovaných jednotek. V případě ASA se vysoká reziduální reaktivita předpokládá při ARU > 550 [49], u thienopyridinů je předpoklad vysoké reziduální reaktivity při PRU > 236 [41]. V dosud největší práci byla pomocí VerifyNOW prokázána 63% specificita a 60% senzitivita pro predikci aterotrombotické příhody, negativní prediktivní hodnota byla 94 % [41].

Nejméně zkoumanou metodou je systém **Plateletworks**, jehož základním principem je měření počtu trombocytů před podáním agonisty agregace a po jeho podání; přímý počet je následně převeden na procenta. Specificita k predikci aterotrombotické příhody činila 58 %, senzitivita 63 %, negativní prediktivní hodnota 94 % [41]. Jako nejslibnější metody k měření reziduální „on-treatment“ reaktivity trombocytů se zdají být v seřazeném pořadí Multiplate, VerifyNOW.

Individualizace léčby pomocí funkčních vyšetření trombocytů

Logickým důsledkem zjištění zvýšené reziduální reaktivity trombocytů pomocí funkčních vyšetření by měla být úprava léčby. Obzvláště jde-li o metodu, která prokázala schopnost predikce aterotrombotických příhod, nebo shodně-li se více metod na přítomnosti HPR. Na našem pracovišti probíhá nyní studie založená na funkčním vyšetření trombocytů pomocí LTA, PFA-100/200, VerifyNOW a Multiplate (REACT-MI, viz ClinicalTrials.gov, číslo: NCT01381185). V případě shody dvou metod funkčního vyšetření na HPR je léčba upravena navýšením ASA, clopidogrelu či obojího; tímto postupem je zajištěn výběr jen nejrizikovějších pacientů. Zatím největší dosud provedená studie GRAVITAS, která zkoumala upravování dávky clopidogrelu (75 mg vs. 150 mg) na šest měsíců u pacientů s HPR zjištěnou pomocí VerifyNOW, neprokázala výhody tohoto postupu [50]. Ve studii byl ale velmi nízký výskyt primárního morbi-mortalitního cílového ukazatele, což může být vysvětlením neutrálního výsledku. Zajímavým počinem je studie ASCET, jejímž cílem bylo prokázat su-

Tabulka 2 – Studie zabývající se úpravou léčby na základě funkčního vyšetření trombocytů

Studie	Cíl	Vhodní pacienti	Počet pacientů	Léčebná strategie	Metoda vyšetření trombocytů	Primární cílový ukazatel
GRAVITAS	Úprava léčby na základě funkčního vyšetření agregace	Elektivní PCI, AKS, DES	n = 2 214	Dávka 75 vs. 150 mg clopidogrelu po 6 měsících	VerifyNOW	6měsíční KV úmrtí, nefatální infarkt či trombóza stentu
DANTE	Úprava léčby na základě funkčního vyšetření agregace	NAP/NSTEMI/PCI	n = 442*	Dávka 75 vs. 150 mg clopidogrelu po 6 měsících	VerifyNOW	6- a 12měsíční KV úmrtí, nefatální infarkt, revaskularizace (CABG/PCI)
ASCET	Záměna ASA za clopidogrel při rezistenci k ASA	ICHs	n = 1 001	160 mg ASA vs. 75 mg clopidogrel	PFA-100	Dvouletá NAP/IM, CMP či úmrtí
TOPAS-1	Zamezení in-stent trombózy pomocí řízené inhibice trombocytů	Předchozí PCI + stent	n = 450*	600 mg clopidogrelu vstupně, poté 6 měsíců 75 mg	VerifyNOW VASP	6měsíční in-stent trombóza
TRIGGER PCI	Alternativní léčba prasugrelem u neadekvátní odpovědi na clopidogrel	Elektivní PCI	n = 432	60/10 mg prasugrelu vs. 600/75 mg clopidogrelu	VerifyNOW	KV úmrtí, nefatální IM
ARCTIC	Úprava dávek ASA a clopidogrelu při neadekvátní odpovědi na léčbu	PCI + DES	n = 2 500*	Navýšení ASA + clopidogrel dle reaktivity + (ne)pokračování s clopidogrelem po 12 měsících	VerifyNOW	12měsíční kompozitní cílový ukazatel: úmrtí, IM, CMP, trombóza stentu, urgentní revaskularizace
3T/2R	Přidání tirofibanu ke standardní léčbě ASA + clopidogrel	Elektivní PCI	n = 263	Tirofiban bolus 25 µg/kg/3 min, poté 0,1525 µg/kg/14–24 h	VerifyNOW	Periprocedurální elevace KSE, 30denní úmrtí, IM, urgentní revaskularizace

AKS – akutní koronární syndrom; ASA – kyselina acetylsalicylová; CABG – aortokoronární bypass; CMP – cévní mozková příhoda; DES – stent vylučující léčivo (drug-eluting stent); KSE – kardioselektivní enzymy; KV – kardiovaskulární; NAP – nestabilní angina pectoris; PCI – perkutánní koronární intervence; NSTEMI – infarkt myokardu bez elevací úseku ST.

* předpokládaný počet zařazených pacientů

perioritu záměny clopidogrelu za ASA u pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční a zvýšenou reziduální trombocytární reaktivitou zjištěnou pomocí PFA-100 při monoterapii ASA. Předběžné výsledky neprokázaly méně kardiovaskulárních příhod u pacientů randomizovaných k monoterapii clopidogrelem, na definitivní analýzu si ještě budeme muset počkat.

Studie TRIGGER-PCI byla předběžně ukončena pro předpokládaný nedostatečný výskyt primárního cílového ukazatele vyplývající z interim analýzy (viz tabulku 2). Tato studie testovala efektivitu, bezpečnost a úroveň protidestičkové blokády prasugrelu ve srovnání s clopidogrelem u pacientů s HPR. Nebyla prokázána klinická použitelnost tohoto postupu, převážně pro nedostatečný výskyt primárního cílového ukazatele, nicméně prasugrel prokázal vyšší úroveň protidestičkové blokády [51]. Co nám výsledky dosavadních studií říkají? Závěry vesměs vyznívají skepticky, v neprospěch terapie řízené výsledky funkčních vyšetření trombocytů. Je třeba si ale uvědomit, že ve většině studií hodnotíme pouze reziduální riziko u jinak velmi dobře léčených pacientů, a výskyt kardiovaskulárních příhod tak bude nízký. Směr dalšího vývoje ukážou nadcházející studie (viz tabulku 2) a jejich metaanalýzy. Je-li dostupná některá z metod funkčního vyšetření agregace trombocytů na pracovišti, je zatím, s ohledem na obec-

nou neshodu a absenci oficiálních doporučení, ke zvážení vyšetření nejrizikovějších pacientů; tj. pacientů s in-stent trombózou, pacientů se stenty uvolňujícími léčivo (drug-eluting stent – DES, obzvláště stenty první generace) a diabetiků s četnými ischemickými komplikacemi. Oficiální doporučení American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) pro PCI hodnotí vhodnost funkčního vyšetření trombocytů jako třídu IIb, u pacientů s vysokým rizikem nepříznivého klinického výsledku [52]. Doporučení Evropské kardiologické společnosti považují funkční vyšetření trombocytů za vhodné, pouze změnilo-li to postup u daného pacienta [53].

Zjistíme-li u těchto pacientů HPR pro ASA samotnou či ASA/clopidogrel, máme zatím poněkud omezené možnosti. Jednou z možností je navýšení dávky a kontrolní vyšetření v případě ASA po několika hodinách, v případě clopidogrelu až po ustálení dávky za 3–5 dnů. Další možností je v ČR již registrovaný a na trh brzy vstupující prasugrel (Effient). V klíčové studii TRITON-TIMI 38 se prokázal jako efektivnější ve snížení ischemických příhod než clopidogrel, ale neměl vliv na kardiovaskulární či celkovou úmrtnost, a navíc zvýšil riziko fatálního krvácení [54]. Menší studie RESPOND prokázala alespoň laboratorní účinnost změny clopidogrelu za ticagrelor u pacientů s HPR [55], což naznačuje do budoucna slibné řešení.

Zatím neexistuje dostatek dat ke změně clopidogrelu za prasugrel či ticagrelor pouze na základě HPR. Výhodou ticagreloru oproti konkurenci (clopidogrel, prasugrel) je, že nejde o prodrug. Ze studie PLATO nicméně plyne signifikantní snížení ischemických vaskulárních příhod při srovnání ticagreloru s clopidogrelem s mírným zvýšením krvácivých komplikací [58]. Další možností řízení protidestičkové léčby je genetické testování. Dle studie dr. Megy ELEVATE TIMI 56 je racionální substituce clopidogrelu prasugrelem či ticagrelem jen v případě homozygotní mutace CYP2C19*2 [29]. Ve většině studií bylo funkční vyšetření trombocytů provedeno časně před PCI. Ačkoliv je známo, že periprocedurální vyšetření trombocytů má jednoznačně nižší výpovědní hodnotu než vyšetření ve větším odstupu od PCI [59].

Funkční vyšetření trombocytů je nyní předmětem intenzivního výzkumu, dostupná data však nejsou dostatečně přesvědčivá k zavedení metod do rutinní kardiologické praxe. K úpravě léčby u pacientů by tedy nemělo vést samotné vyšetření a zjištění HPR, ale především klinické epizody a rizikovost pacientů, jak bylo uvedeno výše.

Závěr

Funkční vyšetření trombocytů je co do kvality laboratorních metod etablované, spojení s klinickými příhodami či úprava léčby na základě HPR jsou ale naproti tomu v plenkách.

Je třeba si uvědomit několik základních věcí:

1. Pojmy aspirinová/clopidogrelová rezistence jsou sice úderné, ale do svých slovníků bychom měli zavést pojem vysoká reziduální reaktivita trombocytů, který lépe odpovídá spojitému spektru odpovědi na antiagregans.
2. Máme k dispozici širokou paletu metod, ale je nutné vědět, co přesně testují, abychom odfiltrovali různé interference při stanovení a výsledky správně interpretovali.
3. Metody funkčního vyšetření nám demonstrují „laboratorní“ vysokou reziduální reaktivitu, nás ale musí zajímat hlavně korelace s klinickými aterotrombotickými příhodami.
4. Funkční vyšetření trombocytů se zaměřuje na primární hemostázu, je ale třeba brát v úvahu i ostatní spolutvorné aterotrombózy jako klasické rizikové faktory (diabetes mellitus, renální insuficience, kouření atd. [60]) a procedurální rizika PCI (délka/průměr stentu, bifurkační stent, počet a charakter stenóz atd.).

Z našich požadavků na funkční vyšetření trombocytů vyplývá, že potřebujeme metodu, která bude:

1. mít jasně prokázaný vztah abnormality testu (nejlépe hraniční hodnotu) k riziku ischemické kardiovaskulární příhody/komplikace;
2. standardizována mezi laboratořemi;
3. aplikovatelná v řízené protidestičkové léčbě;
4. cenově dostupná („cost/benefit“);
5. lehce proveditelná (POCT);
6. reprodučibilní.

V některých ohledech zatím spíše jde o „sci-fi“, ale již nyní jsou na trhu metody, které mnohé požadavky splňují. Dle dostupných dat je žhavým kandidátem VerifyNOW a po doplnění více studií i Multiplate.

Vyšetření trombocytů v kardiologii zatím není rutinní. V hodnocení je třeba opatrnosti a znalosti limitací jednotlivých metod. Věříme, že po zhodnocení dat z intervenčních studií zabývajících se změnami léčby na základě funkčního vyšetření trombocytů se tyto metody stanou klinicky relevantním pomocníkem v rozhodování o úpravě léčby u pacientů se zvýšenou reziduální reaktivitou trombocytů.

Literatura

- [1] Antithrombotic Trialists' Collaboration, Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients, *BMJ* 324 (7329) (2002) 71–86.
- [2] E.L. de Oliveira, L.B. Deepak, Clinical evaluation of clopidogrel across the whole spectrum of indications: primary and secondary prevention of coronary artery disease, *European Heart Journal* 8 (2006) G10–G14.
- [3] G.J. Hankey, J.W. Eikelboom, Aspirin resistance, *BMJ* 328 (2004) 477–479.
- [4] A. McNicol, S.J. Israels, Platelets and anti-platelet therapy, *Journal of Pharmacological Sciences* 93 (2003) 381–396.
- [5] G.A. FitzGerald, Mechanisms of platelet activation: thromboxane A₂ as an amplifying signal for other agonists, *American Journal of Cardiology* 68 (7) (1991) 11B–15B.
- [6] P.M. Rothwell, M. Wilson, C.E. Elwin, et al., Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials, *Lancet* 376 (9754) (2010) 1741–1750.
- [7] F. Catella-Lawson, M.P. Reilly, S.C. Kapoor, et al., Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *New England Journal of Medicine* 345 (25) (2001) 1809–1817.
- [8] C. Patrono, B. Collier, G.A. FitzGerald, et al., Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy, *Chest* 126 (2004) 234S–264S.
- [9] C. Patrono, B. Collier, J.E. Dalen, et al., Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* 119 (2001) 39S–63S.
- [10] R. Ross, Atherosclerosis – an inflammatory disease, *New England Journal of Medicine* 340 (2) (1999) 115–126.
- [11] N. Faraday, L.R. Yanek, R. Mathias, et al., Heritability of platelet responsiveness to aspirin in activation pathways directly and indirectly related to cyclooxygenase-1, *Circulation* 115 (19) (2007) 2490–2496.
- [12] P.C. Kam, C.M. Nethery, The thienopyridine derivatives (platelet adenosine diphosphate receptor antagonists), pharmacology and clinical developments, *Anaesthesia* 58 (2003) 28–35.
- [13] P.C. Cannon, Effectiveness of clopidogrel versus aspirin in preventing acute myocardial infarction in patients with symptomatic atherothrombosis (CAPRIE trial), *American Journal of Cardiology* 90 (7) (2002) 760–762.
- [14] S.R. Steinhubl, K. Kottke-Marchant, D.J. Moliterno, et al., Attainment and maintenance of platelet inhibition through standard dosing of abciximab in diabetic and nondiabetic patients undergoing percutaneous coronary intervention, *Circulation* 100 (19) (1999) 1977–1982.
- [15] E.J. Topol, A.M. Lincoff, D.J. Kereiakes, et al., Multi-year follow-up of abciximab therapy in three randomized, placebo-controlled trials of percutaneous coronary revascularization, *American Journal of Medicine* 113 (1) (2002) 1–6.
- [16] J. Maclouf, G. Folco, C. Patrono, Eicosanoids and isoeicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease, *Thrombosis and Haemostasis* 79 (4) (1998) 691–705.

- [17] S.S. Barbieri, B.B. Weksler, Tobacco smoke cooperates with interleukin-1 β to alter beta-catenin trafficking in vascular endothelium resulting in increased permeability and induction of cyclooxygenase-2 expression in vitro and in vivo, *FASEB Journal* 21 (8) (2007) 1831–1843.
- [18] N. Zimmermann, A. Wenk, U. Kim, et al., Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery, *Circulation* 108 (5) (2003) 542–547.
- [19] C.J. O'Donnell, M.G. Larson, D. Feng, et al., Framingham Heart Study. Genetic and environmental contributions to platelet aggregation: the Framingham heart study, *Circulation* 103 (25) (2001) 3051–3056.
- [20] J.A. Cambria-Kiely, P.J. Gandhi, Aspirin resistance and genetic polymorphisms, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 14 (1) (2002) 51–58.
- [21] K.A. Schwartz, D.E. Schwartz, K. Ghosheh, et al., Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction, *American Journal of Cardiology* 95 (8) (2005) 973–975.
- [22] F. Catella-Lawson, M.P. Reilly, S.C. Kapoor, et al., Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin, *New England Journal of Medicine* 345 (25) (2001) 1809–1817.
- [23] M.L. Capone, M.G. Sciuilli, S. Tacconelli, et al., Pharmacodynamic interaction of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects, *Journal of the American College of Cardiology* 45 (8) (2005) 1295–1301.
- [24] G.J. Hankey, J.W. Eikelboom, Aspirin resistance, *Lancet* 367 (2006) 607–617.
- [25] J.W. Eikelboom, J. Hirsh, J.I. Weitz, et al., Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events, *Circulation* 105 (14) (2002) 1650–1655.
- [26] T.A. Nguyen, J.G. Diodati, C. Pharand, Resistance to clopidogrel: a review of the evidence, *Journal of the American College of Cardiology* 45 (8) (2005) 1157–1164.
- [27] T. Simon, C. Verstraeyt, M. Mary-Krause, et al., French registry of acute ST-elevation and non-ST-elevation myocardial infarction (FAST-MI) investigators. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events, *New England Journal of Medicine* 360 (4) (2009) 363–375.
- [28] A.R. Shuldiner, K.P. Bilen, A. Gandhi, et al., Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy, *Journal of the American Medical Association* 302 (2009) 849–857.
- [29] J.L. Mega, W. Hochholzer, A.L. Benin Frelinger 3rd, et al., Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease, *Journal of the American Medical Association* 306 (2011) 2221–2228.
- [30] M.V. Holmes, P. Perel, T. Shah, et al., CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events. A systematic review and meta-analysis, *Journal of the American Medical Association* 306 (2011) 2704–2714.
- [31] D.L. Bhatt, B.L. Cryer, C.F. Contant, et al., COGENT Investigators. Clopidogrel with or without omeprazole in coronary artery disease, *New England Journal of Medicine* 363 (20) (2010) 1909–1917.
- [32] V.L. Serebruany, M.G. Midei, A.I. Malinin, et al., Absence of interaction between atorvastatin or other statins and clopidogrel: results from the interaction study, *Archives of Internal Medicine* 164 (18) (2004) 2051–2057.
- [33] S. Riondino, N. Petrini, L. Donato, et al., Effects of rosuvastatin on platelet inhibition by clopidogrel in cardiovascular patients, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 28 (2) (2009) 151–155.
- [34] M. Gilard, B. Arnaud, J.C. Cornily, et al., Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole Clopidogrel Aspirin) study, *Journal of the American College of Cardiology* 51 (3) (2008) 256–260.
- [35] J.P. Collet, J.W. Werkum, Individualised antiplatelet therapy – is there a role for platelet function testing in routine clinical practice? *European Cardiology* 6 (1) (2010) 41–49.
- [36] M.J. Quinn, E.F. Plow, E.J. Topol, Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: recognition of a two-edged sword?, *Circulation* 106 (3) (2002) 379–385.
- [37] J.W. van Werkum, W.B. Gerritsen, J.C. Kelder, et al., Inhibition of platelet function by abciximab or high-dose tirofiban in patients with STEMI undergoing primary PCI: a randomised trial, *Netherlands Heart Journal* 15 (11) (2007) 375–381.
- [38] A. Kastrati, J. Mehilli, F.J. Neumann, et al., Abciximab in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention after clopidogrel pretreatment: the ISAR-REACT 2 randomized trial, *Journal of the American Medical Association* 295 (2006) 1531–1538.
- [39] G. Campo, L. Fileti, N. de Cesare, et al., 3T/2R Investigators, Long-term clinical outcome based on aspirin and clopidogrel responsiveness status after elective percutaneous coronary intervention: a 3T/2R (tailoring treatment with tirofiban in patients showing resistance to aspirin and/or resistance to clopidogrel) trial substudy, *Journal of the American College of Cardiology* 56 (2010) 1447–1455.
- [40] T. Cuisset, C. Frere, J. Quilici, et al., Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors improve outcome after coronary stenting in clopidogrel nonresponders: a prospective, randomized study. *Journal of the American College of Cardiology Interventions* 1 (2008) 649–653.
- [41] N.J. Breet, J.W. van Werkum, H.J. Bouman, et al., Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation, *Journal of the American Medical Association* 303 (8) (2010) 754–762.
- [42] P.A. Gurbel, K.P. Bliden, W. Samara, et al., Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study, *Journal of the American College of Cardiology* 46 (2005) 1827–1832.
- [43] P. Barragan, J.L. Bouvier, P.O. Roquebert, et al., Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation, *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 59 (2003) 295–302.
- [44] S. Kundu, E. Heilman, R. Sio, et al., Description of an in vitro platelet function analyzer-PFA-100, *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* 21 (suppl 2) (1995) 106–112.
- [45] J. Koessler, A.L. Kobsar, M.S. Rajkovic, et al., The new INNOVANCE® PFA P2Y cartridge is sensitive to the detection of the P2Y₁₂ receptor inhibition, *Platelets* 22 (1) (2011) 19–25.
- [46] J.M. Siller-Matula, G. Christ, I.M. Lang, et al., Multiple electrode aggregometry predicts stent thrombosis better than the vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8 (2) (2010) 351–359.
- [47] D. Sibbing, S. Braun, T. Morath, et al., Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis, *Journal of the American College of Cardiology* 53 (10) (2009) 849–856.
- [48] D. Sibbing, S. Braun, S. Jawansky, et al., Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment, *Thrombosis and Haemostasis* 99 (1) (2008) 121–126.
- [49] K.P. Dichara Bliden, U.S. Tantry, S.K. Chaganti, et al., Platelet function measured by VerifyNow identifies generalized high platelet reactivity in aspirin treated patients, *Platelets* 18 (6) (2007) 414–423.
- [50] M.J. Price, P.B. Berger, P.S. Teirstein, et al., Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention. The GRAVITAS randomized trial, *Journal of the American Medical Association* 305 (2011) 1097–1105.
- [51] D. Trenk, G.W. Stone, M. Gawaz, et al., A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) Study, *Journal of the American College of Cardiology* (2012) Epub ahead of print.

- [52] R.S. Wright, J.L. Anderson, C.D. Adams, et al., 2011 ACCF/AHA focused update of the guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, *Circulation* 123 (2011) 2022–2060.
- [53] C.W. Hamm, J.P. Bassand, S. Agewall, et al., ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: the Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC), *European Heart Journal* 32 (2011) 2999–3054.
- [54] S.D. Wiviott, E. Braunwald, C.H. McCabe, et al., TRITON-TIMI 38 Investigators, Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes, *New England Journal of Medicine* 357 (20) (2007) 2001–2015.
- [55] P.A. Gurbel, et al. Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation* 121 (10) (2010) 1188–1199.
- [56] J.P. Collet, G. Cayla, T. Cuisset, et al., Randomized comparison of platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy vs standard of care: rationale and design of the assessment with a double randomization of (1) a fixed dose vs a monitoring-guided dose of Aspirin and Clopidogrel after DES implantation, and (2) treatment interruption vs continuation, 1 year after stenting (ARCTIC) study, *American Heart Journal* 161 (1) (2011) 5–12.
- [57] D.J. Angiolillo, Applying platelet function testing in clinical practice: what are the unmet needs?, *Journal of the American Medical Association* 306 (11) (2011) 1260–1261.
- [58] L. Wallentin, R.C. Becker, A. Budaj, et al., PLATO Investigators, A. Freij, M. Thorsén, Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes, *New England Journal of Medicine* 361 (11) (2009) 1045–1057.
- [59] D.J. Angiolillo, Unraveling myths of platelet function and genetic testing the road to making tailored antiplatelet therapy a reality, *Journal of the American College of Cardiology* 57 (25) (2011) 2484–2486.
- [60] G. Montalescot, J.S. Hulot, J.P. Collet, Stent thrombosis: who's guilty?, *European Heart Journal* 30 (22) (2009) 2685–2688.
- Z anglického originálu přeložil autor.*