Měření aktivity trombocytů a účinnosti antiagregační léčby

Pavel Osmančík, Petra Paulů, Petr Toušek, František Bednář, Zuzana Mořovská, Petr Widimský

III. interní-kardiologická klinika, Kardiocentrum, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika

Osmančík P, Paulů P, Toušek P, et al. **Měření aktivity trombocytů a účinnosti antiagregační léčby.** *Cor Vasa* 2010;52(Suppl 1):15–20.

Cílem této práce je přinést přehled současných možností měření aktivity trombocytů a účinnosti antiagregační léčby. Ve druhé části článku jsou uvedeny příklady z vlastní zkušenosti autorů. Pozornost je soustředěna zejména na měření účinku antagonistů ADP.

Klíčová slova: Krevní destičky – Kyselina acetylsalicylová – Clopidogrel – Rezistence.

Osmančík P, Paulů P, Toušek P, et al. **Measuring of platelet activity and efficacy of antiplatelet therapy.** *Cor Vasa* 2010;52(Suppl 1): 15–20.

The aim of this paper is an overview of current options for measuring platelet activity and efficacy of antiplatelet therapy. The second part of the paper offers examples based on the authors' own experience. Particular attention is given to measurement of the effect of ADP antagonists.

Key words: Platelets – Aspirin – Clopidogrel – Resistance

Adresa: MUDr. Pavel Osmančík, Ph.D., FESC, III. interní-kardiologická klinika, Kardiocentrum, FNKV a 3. LF UK, Ruská 87, 100 00 Praha 10, Česká republika, e-mail: pavel.osmancik@gmail.com

Úvod

Antiagregační léčba tvoří jeden z pilířů akutní a invazivní kardiologie. Bez rozvoje protideštičkové léčby v posledních dvaceti letech by nebyl možný ani stávající rozmach intervenční kardiologie. Dle velké metaanalýzy klinických studií u pacientů s ischemickou chorobou srdeční (ICHs) je léčba kyselinou acetylsalicylovou (ASA) ve srovnání s placebem spojena s redukcí iktu, infarktu myokardu (IM) či kardiovaskulárního úmrtí asi o 25 %.¹ Clopidogrel je ve srovnání s ASA ještě účinnější, v přímém srovnání ASA a clopidogrelu ve studii CAPRIE byla léčba clopidogrelem spojena s redukcí kombinace cévní mozkové příhody (CMP), IM či úmrtí z kardiovaskulární příčiny o 8,7 %.²

Z podstaty biologie jako takové se nedá předpokládat, že jeden lék bude fungovat u všech pacientů stejně účinně. Myšlenka monitorace antiagregační léčby je logická, podobně jako když u pacientů užívajících antikoagulační léčbu měříme INR a hypertonikům titrujeme dávku anti-hypertenziv dle hodnot krevního tlaku, je oprávněná snaha o nastavení antiagregační léčby pacientovi na míru. K měření antiagregační léčby byla v poslední době vyvinuta celá řada přístrojů. Cílem této práce je vytvořit přehled současných možností měření aktivity trombocytů a účinnosti antiagregační léčby, ve druhé části článku s uvedením příkladů

z vlastní zkušenosti autorů. Pozornost bude soustředěna zejména na měření účinku ADP antagonistů, vzhledem k většímu klinickému významu ve srovnání s měřením účinku kyseliny acetylsalicylové.

Přehled metod měření aktivity trombocytů a účinnosti antiagregační léčby

Light transmission aggregometry

Tato metoda, vynalezená Gustavem Bornem v roce 1962, byla původně určena k měření defektních destiček.³ Přístroj na měření agregace je v podstatě spektrofotometr. Podstatou je zachycení rozdílu opacity mezi plazmou bohatou na destičky (0% agregace – opacitní) a plazmou chudou na destičky (100% agregace – čirá). Jak destičky agregují, plazma se „čistí“, čímž umožňuje větší průchod světla. K vyšší senzitivitě měření je vhodné užít destičky promyté, aby byly odstraněny plazmatické proteiny, koagulační faktory apod. Výsledek se zobrazí jako takzvaná křivka agregace, na které hodnotíme maximální amplitudu, změny tvaru a maxima v určitém bodě. Agregaci můžeme indukovat jak faktory endogenními (adrenalinem, kolagenem, adenosindifosfátem – ADP), tak exogenními (kationovým propylgalátem).⁴ K měření pomocí light transmission

aggregometry (LTA) je nutno užít velký vzorek plazmy, je to vyšetření časově náročné, vyžaduje velkou erudovanost provádějícího pracovníka a přípravu vzorků (neprovádí se z plné krve). Lze je použít k měření účinnosti kyseliny acetylsalicylové i thienopyridinů. Určitou modifikací LTA představuje impedanční agregometrie, která je ovšem taktéž časově náročná a vyžaduje erudici laborantů.

VerifyNow

VerifyNow (dříve Ultegra-Rapid Platelet Function Analyzer, výrobce Accumetrics, USA) měří absorpci světelného paprsku vzorkem poté, co se aktivované destičky shlukují s fibrinogenem na mikropartikulích, a tím se mění optická hustota vzorku (tedy podobně jako při LTA). K měření jsou potřebné mikropartikelky pokryté fibrinogenem a agonisté agregace, kteří se liší podle antiagregancia, jehož aktivitu měříme. VerifyNow je možno použít k měření účinku kyseliny acetylsalicylové, antagonistů ADP a antagonistů glykoproteinu IIb/IIIa.

Při měření účinku thienopyridinů se jako agonista používá ADP. Navíc je nutné přidat i prostaglandin E₂, který zablokuje aktivaci P₂Y₁ receptorů ADP, čímž se zvyšuje specifita výsledku na antagonisty receptoru P₂Y₁₂. Výsledek je označován v jednotkách PRU (platelet reactivity unit). K polovině vzorku je přidán TRAP (thrombin receptor activating protein), který zablokuje aktivitu thienopyridinů, a tudíž se tento výsledek může brát jako základní hodnota (BASE, tj. jakoby před nasazením terapie thienopyridiny). VerifyNow poté vypočítá dvě hodnoty – samotné PRU a tzv. PRU%, což je $\text{PRU}/\text{BASE} \times 100$. Při měření účinku kyseliny acetylsalicylové se jako agonista používá kyselina arachidonová, výsledná hodnota je udávána v tzv. ARU (aspirin reaction unit). Rezistence na kyselinu acetylsalicylovou se předpokládá při $\text{ARU} > 550$. Při měření antagonistů glykoproteinu IIb/IIIa se používá TRAP, velikost inhibice po podání inhibitorů se vyjadřuje jako procento inhibice ve srovnání se základním stavem. Měření pomocí VerifyNow je velmi jednoduché, stačí k němu velmi malý vzorek krve, bez potřeby pipetování (point-of-care assay), vyšetření se provádí z plné krve a výsledek je k dispozici v desítkách minut.

Platelet Function Analyzer-100 (PFA-100)

PFA-100 (výrobce Siemens Healthcare Diagnostics, USA) je rychlé bed-side vyšetření, sloužící zejména k vyšetření rezistence na kyselinu acetylsalicylovou. Vzorek krve se při tomto vyšetření dává do pohybu kapilárou pomocí vakua. Destičky jsou aktivovány střížnou silou a při průchodu malým lumenem o průměru 150 μm pokrytým membránou s kolagenem a agonisty agregace dochází k postupné adhezi destiček na membránu. Agregáty destiček postupně zcela uzavřou lumen kapiláry, jako výsledek měření se udává tzv. closure time (čas do zastavení toku krve kapilárou). K PFA-100 se dodávají dva typy cartridge, a sice s kolagenem a adrenalinem a kolagenem a ADP. Výhodou tohoto vyšetření je jeho poloautomatická, vyšetření se provádí z malého vzorku plné krve bez nutnosti přípravy vzorku,

i když se krev musí do přístroje pipetovat. Nevýhodou je velká závislost výsledku na hematokritu a koncentraci von Willebrandova faktoru. Největší nevýhodou je ovšem patrně jen malá senzitivita ke clopidogrelu.

Plateletwork

Plateletwork (výrobce Helena Laboratories, USA) je svou podstatou jednoduchá metoda, kdy se počet trombocytů porovná ve vzorku s agonisty a bez nich. Vyšetření se provádí z plné krve, je jednoduché a rychlé, je tedy možné měřit rezistenci na kyselinu acetylsalicylovou i thienopyridiny, není však dosud klinicky příliš vyzkoušené.

Thromboelastography Platelet Mapping System

Tromboelastografie (Thromboelastography Platelet Mapping System, výrobce Haemoscope, USA) je stará metoda, nyní zažívající mírnou renesanci (možná i díky rezistenci na protideštičkové léky). Výhoda tromboelastografie (TEG) spočívá v tom, že poměrně specificky měří podíl trombocytů na vzniku krevní sraženiny. Vyšetření se provádí z plné krve, ale je poměrně časově náročné s nutností pipetování.

Koncentrace tromboxanu B₂ v séru
a 11-dehydro-tromboxanu B₂ v moči

Tromboxan B₂ je metabolitem tromboxanu A₂. Koncentrace těchto molekul se stanovují pomocí metody ELISA. Nevýhodou je, že jde o nepřímé měření a že existuje mimodeštičkový zdroj tromboxanu A₂. Při měření koncentrace 11-dehydro-tromboxanu B₂ je koncentraci nutno vztáhnout k aktuální hodnotě kreatininu.

Průtoková cytometrie

Pomocí průtokové cytometrie můžeme měřit denzitu konkrétního proteinu (receptoru) na membráně buňky. Suspenze buněk je nejprve konjugována s monoklonální protilátkou proti měřenému antigenu. Molekuly monoklonální protilátky jsou potaženy fluorochromem, tj. látkou, která při osvětlení laserovým paprskem část světla absorbuje a část vydá pod jinou vlnovou délkou. Po inkubaci prochází suspenze buněk přes komoru, kde je každá buňka ozářena paprskem laseru. Dle množství emitovaného záření o vlnové délce fluorochromu určíme množství navázaných monoklonálních protilátek s fluorochromem, což koreluje s denzitou antigenů na povrchu buněk. Výsledek se zpravidla vyjadřuje jako průměrná fluorescenční intenzita.

Pomocí průtokové cytometrie můžeme měřit denzitu receptorů (markerů aktivity) přímo na membráně destiček. Nejčastěji se používá měření membránového destičkového P-selektinu, aktivovaného glykoproteinu IIb/IIIa a leukocytárně-destičkových agregátů. Tato vyšetření se nepoužívají ke zjištění účinku protideštičkové léčby, ale ke stanovení aktivity destiček u vybraných stavů a onemocnění. Aktivita trombocytů koreluje např. s hodnotou glykemie či triglyceridů a je větší taktéž u pacientů s pokročilejší ICHS.⁵ Naše pracoviště má bohaté zkušenosti s použitím této metody ve výzkumu aktivity trombocytů u pacientů během kardiologických operací s mimotělním oběhem a bez něj

a při výzkumu pacientů s uzavřenými aortokoronárními bypassy.^{6,7} Vyšetření průtokovou cytometrií je poměrně velmi přesné, ale náročné na čas a erudici laboratorních pracovníků, nutný je samozřejmě poměrně drahý přístroj, průtokový cytometr (výrobce Beckman Coulter, USA; Becton, Dickinson and Company, USA aj.). Nepoužívá se proto k rutinnímu měření v klinické praxi.

Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP) Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (výrobce Bio-Cytex, Francie) je vyšetření prováděné pomocí průtokové cytometrie. VASP je intracelulární protein, který je ve svém inaktivním stavu nefosforylovaný. Jeho fosforylace je aktivována PGE1 a inaktivována adenosinem přes receptory P2Y12. Při cytometrii se používají protilátky specifické pro fosforylovanou formu VASP. Míra fosforylace koreluje s mírou aktivity thienopyridinů, tj. inaktivací receptorů P2Y12. Vyšetření se provádí z plné krve, ale jak je uvedeno výše, je náročné na erudici laboratoře a vybavení průtokovým cytometrem. Výhodou je možnost stanovení VASP až dva dny po náběru krevního vzorku. Výsledek je udáván jako tzv. PRI (platelet reactivity index).

Význam měření antiagregační léčby v klinické praxi – literární data

Prospektivně byl sledován klinický význam nedostatečné laboratorní odpovědi na clopidogrel v několika prospektivních observačních studiích. Jako metody ke stanovení účinku clopidogrelu byly použity zejména LTA, TEG, VASP a VerifyNow. Matetzky a spol. sledovali 60 pacientů se STEMI léčených PCI s implantací stentu, účinek clopidogrelu byl stanoven pomocí LTA. Pacienti rezistentní na clopidogrel (měřeno optickou agregometrií po stimulaci ADP) měli signifikantně horší prognózu ve srovnání s pacienty s dobrou odpovědí na clopidogrel s častějším výskytem IM, CMP nebo manifestací ischemické choroby dolních končetin (ICHDK) v období šesti měsíců po IM.⁸ K podobným závěrům došli taktéž Cuisset a spol. u souboru 106 pacientů, kde pacienti s vyšší maximální agregací měřenou LTA měli horší kardiovaskulární prognózu.⁹ Angiolillo a spol. sledovali výskyt závažných kardiovaskulárních příhod (major adverse cardiovascular event – MACE) u 173 pacientů s DM a ICHS na duální antiagregační léčbě po dobu dvou let.¹⁰ Účinek clopidogrelu byl stanoven pomocí LTA po stimulaci ADP. Nedostatečný účinek clopidogrelu byl spojen s horší prognózou a signifikantně častějšími MACE. Negativní prediktivní hodnota (tedy nepřítomnost MACE při dostatečném účinku clopidogrelu) při hraniční hodnotě LTA jako 62% maximální agregace byla 86 %. Serebruany a spol. publikovali patrně největší soubor pacientů léčených clopidogrelem, u kterých byl účinek léčby hodnocen pomocí LTA.¹¹ V souboru 544 pacientů jevíly hodnoty agregometrie zcela normální gaussovskou distribuci. Jako rezistentní byli v této práci definováni pacienti s horší odpovědí po léčbě, než byly průměr + dvě směrodatné odchylky celého souboru; takovýchto pacientů bylo 4,8 % z celého souboru.

Bohužel, tato laboratorní data velkého souboru pacientů nekorelovala s jejich klinickým osudem.

Bliden a spol. použili ke stanovení účinku clopidogrelu tromboelastografii. Vyšší reaktivita trombocytů po podání clopidogrelu stanovená TEG byla spojena s častějším výskytem MACE v souboru 100 pacientů po PCI.¹²

Pomocí VerifyNow byl účinek clopidogrelu stanoven recentně v pracích s velkým souborem pacientů.^{13,14} Price a spol. sledovali osud 380 pacientů po PCI s implantací DES.¹³ Účinek clopidogrelu byl stanoven pomocí VerifyNow a měřen 12 hodin po podání clopidogrelu. Hraniční hodnota pro non-responderství byla vypočtena pomocí „receiver operating characteristics“ (ROC), tj. metody, která velmi dobře umožňuje stanovení optimální senzitivity, specifity a prediktivních hodnot jakéhokoli potenciálně prognostického testu. Optimální hraniční hodnota byla stanovena jako PRU 235. Pacienti s PRU > 235 významně častěji zemřeli či prodělali trombózu stentu během šestiměsíčního sledování. Při hodnotě PRU 235 byla senzitivita 78 %, specifita 68 %, negativní prediktivní hodnota 99 % a pozitivní prediktivní hodnota 5,8 %. Podobně Marcucci a spol. měřili účinek clopidogrelu celkem u 683 pacientů s akutním koronárním syndromem a korelovali výsledky testování s jejich klinickou prognózou.¹⁴ Všichni pacienti byli léčeni PCI s implantací kovového stentu (bare-metal stent – BMS) či lékového stentu (drug-eluting stent – DES), měření VerifyNow bylo provedeno 24 h po podání nasycovací dávky clopidogrelu, sledování byli 12 měsíců od PCI. Pomocí analýzy ROC byla stanovena optimální hodnota PRU > 240 s negativní prediktivní hodnotou 96 % a pozitivní prediktivní hodnotou 12 %.

VASP byl použit v predikci trombózy stentu v práci Blindt a spol.¹⁵ V této práci bylo vyšetřeno celkem 99 pacientů s vysokým rizikem trombózy stentu, hodnota VASP korelovala s rizikem vývoje trombózy stentu, jako hraniční hodnoty trombózy stentu byla dle ROC stanovena hodnota PRI < 48 %. V podobně uspořádané práci Bonella a spol. u souboru 144 pacientů byla pomocí analýzy ROC stanovena hraniční hodnota jako 50% PRI, účinek léku byl hodnocen 24 h po podání nasycovací dávky 600 mg.¹⁶ Stejná skupina autorů následně randomizovala rezistentní pacienty (tedy pacienty s PRU > 50 %) do dvou skupin; v první skupině byla ponechána standardní nasycovací dávka přes její nedostatečný laboratorní účinek, ve druhé byla pacientům nasycovací dávka navýšována až do dosažení dostatečného účinku léku (což bylo dosaženo podáváním někdy až tří dalších nasycovacích dávek, tedy celkem 2 400 mg tohoto léku!). Dosažení PRI pod 50 % se povedlo navýšením dávky ve druhé skupině u 86 % pacientů a bylo spojeno s nižší frekvencí MACE během prvního měsíce od PCI.¹⁷

Všechny uvedené studie se shodují v tom, že „laboratorní rezistence“ (tedy nedostatečná odpověď na clopidogrel) má taktéž klinický význam, horší „laboratorní“ odpověď je spojena s horším klinickým osudem pacientů, vyšší frekvencí úmrtí, IM, CMP či výskytem manifestní ICHDK. Jako optimální stanovení hraniční hodnoty pro responderství se jeví použití statistiky ROC s vypočtením optimální hodnoty

senzitivity, specificity, pozitivní a negativní prediktivní hodnoty. Všechny práce udávají téměř nezávisle na metodě použité ke stanovení účinku clopidogrelu velmi vysokou negativní prediktivní hodnotu (kolem 90 %) a velmi nízkou pozitivní prediktivní hodnotu (kolem 10 %). To je ovšem logické, když si uvědomíme malou frekvenci výskytu trombózy stentu, úmrtí či dalších sledovaných příhod ve studiích. Dle citovaných prací se hraniční hodnota při měření VerifyNow pohybuje kolem 240 PRU, při měření VASP kolem 50 % a při měření LTA kolem 60 % maximální agregace.

Slabinou výše citovaných prací je jejich nejednotná metodika, stimulace různým množstvím ADP (v pracích s LTA) a rozdílná doba, kdy se měřil účinek clopidogrelu po jeho podání (např. ve dvou velkých pracích s VerifyNow to bylo 12 a 24 hodin po podání léku). Maximum účinku clopidogrelu je přitom pomalejší a dosahuje 28 hodin po jeho podání.¹⁸ Trombocyty jsou u pacientů s akutním koronárním syndromem aktivovány a výsledky agregačních testů jsou v této akutní fázi horší, množství non-responderů tak může být v akutní fázi nadhodnoceno. Gurbel a spol. měřili agregaci destiček před PCI (a podáním 300 mg clopidogrelu) a následně 2 h, 24 h, 48 h a 5 a 31 dnů po jeho podání. Výsledky agregace klesaly od podání léku po PCI do druhého dne, při definici rezistence jako pokles agregace o méně než 10 % ve srovnání s hodnotou před podáním léku by bylo rezistentních 2 h po podání léku 63 % pacientů, 24 h po podání 31 % a po měsíci 15 % pacientů.

Kromě prospektivních observačních studií má velký význam výše zmíněná randomizovaná intervenční studie Bonella a spol., v níž bylo zvýšení dávky clopidogrelu dle hodnoty PRU u rezistentních pacientů spojeno s jejich lepším klinickým osudem. Poprvé se tak k nám dostala nejen observační data, ale také příslib toho, že úpravou (navýšením) léčby dle výsledků této studie jsme schopni nedobry osud rezistentních pacientů alespoň částečně zvrátit.

Význam měření antiagregační léčby v klinické praxi – vlastní data

Srovnání účinku clopidogrelu u hemodynamicky stabilních pacientů s nekomplikovaným akutním IM a u pacientů s akutním IM a výraznou hemodynamickou nestabilitou

Cíl práce, úvod

Cílem práce¹⁹ bylo porovnat účinnost clopidogrelu u skupiny hemodynamicky stabilních pacientů s nekomplikovaným průběhem STEMI (Killip I) a u skupiny výrazně hemodynamicky nestabilních pacientů se STEMI, tj. buď v plicním edému s nutností umělé plicní ventilace či v kardiogenním šoku (Killip III či IV). U těchto pacientů je velká pravděpodobnost nižšího účinku tohoto léku z několika důvodů. Clopidogrel existuje dosud jen v perorální formě. U pacientů na umělé plicní ventilaci je známa horší absorpce léků z gastrointestinálního traktu pro analgosedaci opiáty, hypoperfuzi gastrointestinálního traktu při centralizaci oběhu z důvodu vyplavení endogenních a k tomu exogenně

dodávaných katecholaminů apod. Dále musí být clopidogrel jako prodrug metabolizován na aktivní formu v játrech, při jejich hypoperfuzi u šokových pacientů se předpokládá nedostatečný účinek tohoto léku.

Metodika

Do studie bylo zařazeno celkem 40 pacientů se STEMI. První skupinu tvořilo 20 konsekutivních pacientů se STEMI, kteří byli hemodynamicky výrazně nestabilní, všichni byli na umělé plicní ventilaci a všem bylo nutno podávat katecholaminy. Druhou, kontrolní skupinu tvořilo také 20 pacientů hemodynamicky stabilních, kteří byli vybráni tak, aby se svými základními charakteristikami co nejvíce podobali nestabilním pacientům. Clopidogrel byl podán v úvodní nasycovací dávce 600 mg každému pacientovi a následně 75 mg/den, jeho účinnost byla hodnocena průtokovou cytometrií pomocí stanovení VASP. Krevní odběry byly provedeny před podáním clopidogrelu, 4 h po jeho podání, 24 h po podání a následně 2–4 dny po podání.

Výsledky

Obě skupiny pacientů byly srovnatelné svými základními klinickými charakteristikami, jako jsou věk, pohlaví, přítomnost diabetu apod. Z biochemických ukazatelů měli nestabilní pacienti vyšší hodnoty leukocytů, laktátu, CRP a kreatininu, což odpovídá jejich závažnějšímu klinickému stavu. Z dalších výsledků měli nestabilní pacienti po celou dobu sledování vyšší INR, hodnoty transamináz byly ovšem srovnatelné. Pokles VASP byl signifikantně významnější u stabilních pacientů v celém jeho průběhu ve srovnání s nestabilními. Ve stabilní skupině poklesla hodnota VASP již o 20 % za první 4 h a zůstala signifikantně nižší až do posledního odběru. U nestabilních pacientů hodnota VASP poklesla za první 4 h jen o 8 % a pokles ve srovnání se vstupní hodnotou nedosáhl statistické významnosti po celou dobu sledování.

Závěr

Účinek clopidogrelu u hemodynamicky nestabilních pacientů je výrazně snížen, ať již poruchou absorpce léku, či jeho biotransformace. S nižší účinností perorálního clopidogrelu je třeba počítat při léčbě těchto kriticky nemocných.

Faktory asociované s horší účinností clopidogrelu stanovenou pomocí VerifyNow nebo s vyšší aktivitou destiček stanovenou pomocí koncentrace CD40L u pacientů po PCI – pilotní data

Cíl práce

Cílem práce je stanovit prediktivní hodnotu testování účinku clopidogrelu v kombinaci s výsledkem testování aktivity destiček a genetickým testováním polymorfismů některých genů zodpovědných za vyšší aktivitu destiček na dostatečně velkém souboru pacientů. Dalším cílem je zjistit možnost dosažení dostatečné laboratorní odpovědi

na clopidogrel úpravou (navýšením) dávky clopidogrelu u rezistentních pacientů.

Metodika

V rámci tohoto projektu podpořeného grantem IGA bylo během roku 2009 zařazeno celkem 259 pacientů. Šlo o neselektovanou populaci pacientů, kterým byla provedena koronarografie a následně PCI. Z tohoto důvodu byli tito pacienti indikováni k duální antiagregační léčbě a kromě kyseliny acetylsalicylové jim bylo podáno 600 mg clopidogrelu před či během PCI a následně 75 mg clopidogrelu/den. Podmínkou zařazení do studie byla kromě podepsání informovaného souhlasu a provedení PCI taktéž přítomnost pacienta 24 hodin po PCI na klinice. Kromě standardních odběrů byl těmto pacientům proveden odběr citrátové krve pro stanovení účinnosti clopidogrelu pomocí přístroje VerifyNow, odběr séra za účelem stanovení koncentrace CD40L a IL-10 a odběr srážlivé krve na genetické testování. Všichni zařazení pacienti jsou na klinice sledováni s kontrolou za půl roku a jeden rok po PCI, pacientům, u nichž clopidogrel nebyl účinný, byla nabídnuta možnost zvýšení dávky clopidogrelu až na maximum tří tablet denně za účelem dosažení dostatečného laboratorního účinku.

Výsledky

Ve studii je sledováno 259 pacientů. Průměrný věk souboru je $70,4 \pm 15,1$, ve studii je 183 mužů (70,7 %) a 76 žen (29,3 %). Průměrná hodnota PRU je $207,5 \pm 91,3$, hodnota BASE $258,5 \pm 71,6$ a hodnota % inhibice $29,2 \pm 43,9$. Pokud jako hranici nedostatečného účinku clopidogrelu přijmeme $\text{PRU} > 240$, pak počet non-responderů je 98 (37 %).¹⁴ Pokud by byla použita hodnota průměr + standardní odchylka, která je taktéž v metodice některých prací použita, hranici non-responderství by bylo PRU 298, a non-responderů by tak bylo 45 (17 %). Průměrná hodnota CD40L souboru je $1,62 \pm 2,6$ pg/ml a IL-10 $4,2 \pm 5,1$ pg/ml.

Nebyly nalezeny rozdíly v PRU mezi diabetiky a ne-diabetiky (210 ± 93 vs. 205 ± 90 , $p = 0,6$), hodnota CD40L byla však u diabetiků podstatně vyšší ($3,1 \pm 4,1$ pg/ml vs. $0,96 \pm 0,97$ pg/ml; $p < 0,001$). Hodnota PRU nekorelovala signifikantně s věkem, pohlavím ani výškou pacienta, korelace s hmotností pacienta byla na hranici statistické významnosti ($p = 0,06$).

Kompletní 30denní sledování bylo dokončeno u prvních 103 pacientů. V této skupině 103 pacientů byly pozorovány tři trombózy stentu během prvních 30 dnů po PCI. Průměrná hodnota PRU u pacientů s trombózou stentu byla 298 ± 65 , u zbylých pacientů 192 ± 93 ($p < 0,05$). Hraniční hodnota pro non-respondery byla vypočtena jako průměr + jedna směrodatná odchylka z celého souboru, což činilo PRU 290. Testování clopidogrelu pomocí VerifyNow mělo, co se týče predikce trombózy stentu, vynikající negativní prediktivní hodnotu (98 %) a velmi dobrou senzitivitu (66 %), ale pouze limitovanou pozitivní prediktivní hodnotu (10 %) a specifitu (7 %). Tyto hodnoty odpovídají hodnotám, které byly publikovány v jiných pracích. Tento soubor 103 pacientů je ovšem nutno vzít jen jako pilotní, k dosažení dostatečné

statistické síly je v plánu a nyní probíhá doplnění souboru na celkový počet 500 pacientů s dokončením jejich sledování a doplněním hodnot CD40L a výsledků genetického testování do mnohorozměrové analýzy.

Diskuse

Aspirinová či clopidogrelová rezistence, tedy nedostatečná odpověď na tyto léky, je popisována dle různých autorů u 4,8–25 % pacientů.²⁰ Horší laboratorní účinek clopidogrelu je popisován u pacientů starších, diabetiků a pacientů s vyšší tělesnou hmotností.²¹ Taktéž pacienti s nestabilní anginou pectoris mají horší laboratorní účinek clopidogrelu ve srovnání s pacienty se stabilní anginou,²² výrazná hemodynamická nestabilita pacientů v naší práci byla jednoznačně spojena s nedostatečným účinkem clopidogrelu.¹⁹ V mnoha případech je příčina clopidogrelové rezistence geneticky determinována, např. polymorfismem na úrovni genu pro izoformu 2C19 cytochromu P450.^{23,24} Problematika příčin aspirinové či clopidogrelové rezistence je komplexnější a přesahuje možnosti tohoto článku.

V současné době probíhá řada studií zaměřených na rezistentní pacienty. Z největších je to studie ADAPT-DES (The Assessment of Dual AntiPlatelet Therapy with Drug Eluting Stents), která je velkou prospektivní observační studií a klade si za cíl přesně vyhodnotit výsledky VerifyNow s ohledem na riziko trombózy stentu na populaci více než 10 000 pacientů.²⁵ Studie GRAVITAS (Gauging Responsiveness with a Verify Now P2Y12 Assay-Impact on Thrombosis and Safety) má za úkol testovat, zda úprava antiagregační léčby (navýšením dávky či záměnou za prasugrel) povede ke snížení MACE po implantaci DES.²⁶ Jedna menší práce probíhá i na našem pracovišti. Dalším příslibem je objevení se nových ADP antagonistů (prasugrel, ticagrelor) s menším výskytem laboratorní rezistence. Prasugrel je podobně jako clopidogrel sice prodrug, ale jeho přeměna do aktivní formy není tak problematická jako u clopidogrelu. Procento pacientů s nedostatečnou laboratorní odpovědí na tento protidestičkový lék je ve srovnání s clopidogrelem menší a u řady pacientů rezistentních na clopidogrel může být dosaženo dostatečného antiagregačního účinku záměnou tohoto léku za prasugrel.²⁷

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* 2002;324:71–86.
2. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996;348:1329–1339.
3. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927–929.
4. Motovská Z, Šujanová Z, Wimmerová S, et al. Comparison of cationic propyl gallate and adenosine diphosphate for the measurement of aspirin effectivity with optical aggregometry. *Transl Res* 2007;150:246–252.
5. Osmančík PP, Bednář F, Mocíková H. Glycemia, triglycerides and disease severity are best associated with higher platelet activity in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis* 2007;24: 105–107.

6. Bednář F, Osmančík P, Vaněk T, et al. Platelet activity and aspirin efficacy after off-pump compared with on-pump coronary artery bypass surgery: results from the prospective randomized trial PRAGUE 11-Coronary Artery Bypass and REactivity of Thrombocytes (CABARET). *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136:1054–1060.
7. Osmančík PP, Bednář F, Mocíková H, et al. The comparison of platelet activity between patients with patent vs. occluded coronary artery bypass grafts. *Thromb Res* 2007;120:523–529.
8. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:3171–3175.
9. Cuisset T, Frere C, Quilici J, et al. High post-treatment platelet reactivity identified low-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost* 2006;4:542–549.
10. Angiolillo DJ, Bernardo E, Sabate M, et al. Impact of platelet reactivity on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1541–1547.
11. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, et al. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:246–251.
12. Bliden KP, DiChiara J, Tantry US, et al. Increased risk in patients with high platelet aggregation receiving chronic clopidogrel therapy undergoing percutaneous coronary intervention: is the current antiplatelet therapy adequate? *J Am Coll Cardiol* 2007;49:657–666.
13. Price MJ, Endemann S, Gollapudi RR, et al. Prognostic significance of post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation. *Eur Heart J* 2008;29:992–1000.
14. Marcucci R, Gori AM, Panizza R, et al. Cardiovascular death and nonfatal myocardial infarction in acute coronary syndrome patients receiving coronary stenting are predicted by residual platelet reactivity to ADP detected by a point-of-care assay: a 12-month follow-up. *Circulation* 2009;119:237–242.
15. Blindt R, Stellbrink K, de Taeye A, et al. The significance of vasodilator-stimulated phosphoprotein for risk stratification of stent thrombosis. *Thromb Haemost* 2007;98:1329–1334.
16. Bonello L, Paganelli F, Arpin-Bornet M, et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation analysis prior to percutaneous coronary intervention for exclusion of postprocedural major adverse cardiovascular events. *J Thromb Haemost* 2007;5:1630–1636.
17. Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, et al. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1404–1411.
18. Mořovská Z, Widimský P, Petr R, et al. Optimal pretreatment timing for high load dosing (600 mg) of clopidogrel before planned percutaneous coronary intervention for maximal antiplatelet effectiveness. *Int J Cardiol* 2009 Feb 14. [Epub ahead of print]
19. Osmančík P, Jirmář R, Hulíková K, et al. A comparison of the VASP index between patients with hemodynamically complicated and uncomplicated acute myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv* 2010;75: 158–166.
20. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006;27:647–654.
21. Cuisset T, Frere C, Quilici J, et al. Relationship between aspirin and clopidogrel responses in acute coronary syndrome and clinical predictors of non response. *Thromb Res* 2009;123:597–603.
22. Soffer D, Moussa I, Harjai KJ, et al. Impact of angina class on inhibition of platelet aggregation following clopidogrel loading in patients undergoing coronary intervention: do we need more aggressive dosing regimens in unstable angina? *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;59:21–25.
23. Simon T, Versteuyt C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009;360: 363–375.
24. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 2009;360:354–362.
25. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00638794>.
26. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00645918>.
27. Baker WL, White CM. Role of prasugrel, a novel P2Y₁₂ receptor antagonist, in the management of acute coronary syndromes. *Am J Cardiovasc Drugs* 2009;9:213–229.