

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Lékařská fakulta

Hemato-onkologická klinika



**Monitorování účinku antiagregační terapie**

## DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor: **Mgr. Jana Úlehlová**  
Studijní program: Lékařská biologie P5152  
Forma studia: Kombinovaná  
Školící pracoviště: Hemato-onkologická klinika, FN Olomouc  
Vedoucí práce: **Doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.**  
Termín odevzdání práce: červen 2018

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 8.6. 2018

.....

Chtěla bych touto cestou poděkovat svému školiteli Doc. Mgr. Luďku Slavíkovi, Ph.D. za dlouholeté metodické vedení ve výzkumné práci a za kolegiální pomoc při řešení odborných úkolů i osobní příklad, kterým jsem mohla být ovlivněna.

Děkuji přednostovi kliniky profesorovi MUDr. Tomáši Papajíkovi, CSc. za umožnění výzkumné práce na klinice.

Poděkování patří také profesorovi MUDr. Karlu Indrákovi, DrSc. A Doc. MUDr. Věře Krčové za velmi cenné rady a pomoc při zpracování klinických údajů o vyšetřovaných pacientech.

Také bych ráda poděkovala laborantkám koagulační laboratoře, za pomoc při zpracování laboratorních vyšetření a Mgr. Janě Kučerové, která mi pomohla s problematikou molekulárně biologických vyšetření.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Janě Zapletalové, Dr. za pomoc při statistickém zpracování výsledků práce.

Děkuji svému manželovi za velkou podporu, trpělivost a pochopení, kterého se mi dostávalo během celého postgraduálního studia.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Mgr. Jana Úlehlová
Název práce	Monitorování účinku antiagregační terapie
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Koagulační laboratoř: Hemato-onkologické kliniky FN a LF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Doc. Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

### Abstrakt

Tématem disertační práce je návrh postupu monitorování účinku antiagregační terapie pomocí funkčních agregačních testů a molekulárně biologického stanovení polymorfismů receptorů krevních destiček.

Teoretická část disertační práce je zaměřena na popis fyziologie hemostázy, kde shrnuje základy hematopoézy zejména megakaryocytární linie a následně přibližuje procesy související s krevní destičkou jako je např. adheze, aktivace, degranulace a hlavně agregace. Následně je popsán mechanismus ovlivnění hemostázy antitrombotickou léčbou, která je dělena na antikoagulační, trombolytickou a zejména antiagregační. Zvláštní důraz je kladen na monitorování antiagregační terapie, ať už z laboratorního nebo klinického pohledu. Klinické dopady selhání antiagregační terapie jsou popsány na vysoce rizikové skupině mladých pacientů s akutním infarktem myokardu (AIM), kde lze předpokládat významný vliv genetických predisponujících faktorů.

Experimentální část disertační práce se věnuje monitorování protideštičkové léčby pomocí dvou funkčních agregačních testů (optické transmisní agregometrie a impedanční agregometrie). Jako cílová riziková skupina byl hodnocen soubor 124 pacientů s diagnózou AIM. U pacientů rezistentních na anopyrin byla následně provedena in vitro inkubace s kyselinou acetylosalicylovou, pro zjištění příčin selhání protideštičkové léčby. V neposlední řadě byla zjišťována frekvence výskytu polymorfismů destičkových receptorů COX-1 (rs10306114), P2Y12 C34T (rs6785930), P2Y12 T744C (rs2046934) GP1bA (rs2243093) a také GP6 (rs1613662) možné genetické příčiny neúčinnosti antiagregační léčby (aspirinová či thienopyridinová rezistence). K vyšetření polymorfismů destičkových receptorů byla využita metoda real-time PCR s následnou analýzou křivek tání.

**Klíčová slova** protideštičková léčba, aspirinová rezistence, thienopyridinová rezistence, optická transmisní agregometrie, impedanční agregometrie, polymorfismy destičkových receptorů

Počet stran	-
Počet příloh	0
Jazyk	Český

**Bibliographical identification:**

Autor's first name and Surname	Mgr. Jana Úlehlová
Title	Monitoring of antiplatelet therapy
Type of thesis	-
Department	Coagulation laboratory: Departement of Hemato-Oncology, University Hospital, Olomouc
Supervisor	Doc. Mgr. Luděk Slavík, PhD.
The year of presentation	2018

**Abstract**

This thesis deals with monitoring the effects of antiplatelet therapy using two functional aggregation tests that are correlated with molecular biological determination of platelet polymorphisms.

The theoretical part of the thesis is first focused on the description of the physiology of hemostasis, which summarizes the basics of hematopoiesis in particular megakaryocytic line and then approaches the processes associated with platelet such as adhesion, activation and degranulation mainly aggregations. Antithrombotic therapy is here divided into anticoagulant, thrombolytic and antiplatelet particular. Special emphasis is placed on monitoring antiaggregation therapy, both in terms of possible technologies used or followed in terms of risk group of patients with acute myocardial infarction (AMI), a disease that is described as one of the major causes of morbidity and mortality in developed countries.

The experimental part of the thesis deals with monitoring antiplatelet therapy with two functional aggregation test (optical transmission aggregometry and impedance aggregometry). The target risk group was taken up file 124 patients with a diagnosis of AMI. In patients resistant to aspirin was subsequently performed in vitro incubation with acetylsalicylic acid, to determine the causes of failure of antiplatelet therapy. Finally, the measured frequency of platelet gene polymorphisms COX-1 (rs10306114), P2Y<sub>12</sub> C34T (rs6785930), P2Y<sub>12</sub> T744C (rs2046934) GP1bA (rs2243093) and GP6 (rs1613662) as a genetic cause of inefficiency antiplatelet therapy (aspirin or thienopyridin resistance) . To investigate polymorphisms of platelet receptors, the method of real-time PCR followed by melting curve analysis.

Keywords	Antiplatelet therapy, aspirin resistance, thienopyridin resistance, optical transmission agregometry, impedance agregometry, platelet gene polymorphisms
Number of pages	-
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

OBSAH.....	- 6 -
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	- 9 -
SEZNAM TABULEK .....	- 11 -
CÍLE PRÁCE .....	- 13 -
TEORETICKÁ ČÁST .....	- 14 -
1. FYZIOLOGIE HEMOSTÁZY .....	- 14 -
1.1 Cévní stěna .....	- 14 -
1.2 Krevní destička.....	- 15 -
1.2.1 Poruchy krevních destiček.....	- 17 -
1.2.2 Primární hemostáza .....	- 18 -
1.2.3 Agregace.....	- 20 -
1.3 Plazmatický koagulační systém.....	- 21 -
1.3.1 TFPI .....	- 23 -
1.3.2 Systém proteinu C.....	- 24 -
1.3.3 AT .....	- 24 -
1.3.4 HC II.....	- 24 -
1.4 Fibrinolytický systém .....	- 25 -
2. ANTITROMBOTICKÁ LÉČBA.....	- 25 -
2.1 Antikoagulační léčba .....	- 26 -
2.1.1 Antagonisté vitamínu K.....	- 26 -
2.1.2 Hepariny.....	- 27 -
2.1.3 Nová antikoagulancia .....	- 28 -
2.2 Trombolytická léčba.....	- 28 -
2.2.1 Streptokinasa .....	- 29 -
2.2.2 Urokinasa .....	- 29 -
2.2.3 Tkáňový aktivátor plazminogenu .....	- 29 -
2.3 Antiagregační léčba.....	- 29 -
2.3.1 Kyselina acetylsalicylová (ASA).....	- 30 -
2.3.1.1 Aspirinová rezistence .....	- 32 -
2.3.2 Thienopyridiny .....	- 34 -
2.3.3 Blokátory receptorů GP IIb/IIIa.....	- 39 -
2.3.3.1 Abciximab.....	- 39 -
2.3.3.2 Syntetické inhibitory - tzv. „malé molekuly“ .....	- 40 -

3. MONITOROVÁNÍ ANTIAGREGAČNÍ TERAPIE .....	- 41 -
3.1 Optická transmisní agregometrie .....	- 41 -
3.2 Impedanční agregometrie .....	- 42 -
3.3 Další možnosti monitorace antiagregační léčby .....	- 44 -
3.3.1 Monitorování pomocí přístroje Verify Now .....	- 44 -
3.3.2 Monitorování přístrojem PFA 100 .....	- 44 -
3.3.3 Stanovení metabolitů cyklu kyseliny arachidonové .....	- 45 -
3.3.4 VASP .....	- 45 -
4. DESTIČKOVÉ POLYMORFISMY .....	- 46 -
4.1 Detekce polymorfismů destičkových receptorů .....	- 47 -
4.1.1 Polymorfismy a aspirinová rezistence .....	- 48 -
4.1.2 Polymorfismy a thienopyridonová rezistence .....	- 49 -
5. ANTIAGREGAČNÍ LÉČBA V SEKUNDÁRNÍ PREVENCI INFARKTU MYOKARDU A PŘÍČINY JEJÍHO SELHÁNÍ .....	- 50 -
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	- 51 -
6. MATERIÁL A PŘÍSTOJOVÁ TECHNIKA .....	- 51 -
6.1 Přístrojové vybavení .....	- 52 -
6.2 Biologický materiál .....	- 52 -
6.3 Reagencie – pracovní roztoky .....	- 52 -
6.4 Preanalytická kritéria – odběr, transport a zpracování biologického materiálu před vyšetřením .....	- 53 -
6.5 Sledovaný soubor pacientů .....	- 54 -
6.6 Optická transmisní agregometrie .....	- 54 -
6.7 Impedanční agregometrie .....	- 55 -
6.8 In vitro testování citlivosti krevních destiček pacientů na ASA .....	- 56 -
6.9 Genotypizace .....	- 57 -
6.9.1 Izolace DNA z leukocytů periferní krve .....	- 57 -
6.9.2 Stanovení koncentrace DNA .....	- 57 -
6.9.3 Real-time PCR - optimalizace .....	- 57 -
6.9.3.1 COX-1 A842G, rs10306114 .....	- 59 -
6.9.3.2 P2Y12 C34T, rs6785930 .....	- 62 -
6.9.3.3 P2Y12 T744C, rs2046934 .....	- 63 -
6.9.3.4 GP1bA -5T>C, rs2243093 .....	- 65 -
VÝSLEDKY .....	- 68 -
7.1 Stanovení aspirinové a thienopyridinové rezistence funkčními metodami .....	- 68 -
7.2 In vitro testování odezvy pacientů na ASA .....	- 70 -
7.3 Výsledky genotypizace destičkových polymorfismů .....	- 71 -

7.4	Statistické zpracování analyzovaných dat .....	- 75 -
7.4.1	Vztah výskytu polymorfismů u aspirinové rezistence .....	- 75 -
7.4.2	Vztah výskytu polymorfismů u thienopyridinové rezistence.....	- 76 -
	DISKUSE.....	- 79 -
	ZÁVĚR .....	- 86 -
	LITERATURA .....	- 88 -
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 99 -
	PUBLIKACE .....	- 101 -



# SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Nátěry kostní dřeně - ukázky megakaryocytů při zvětšení 200x	-16-
Obr. 2 Tvorba trombocytů z pluripotentní kmenové buňky BFU-Meg	-16-
Obr. 3 Rozdělení trombocytopenií podle patogeneze	-18-
Obr. 4 Hemostáza – endotel a proteiny.	-23-
Obr. 5 Místa aktivace antitrombotické terapie – koagulační kaskáda a destičky	-26-
Obr. 6 Metabolismus kyseliny arachodinové	-32-
Obr. 7 Vzorec kyseliny acetylsalicylové	-32-
Obr. 8 Strukturní vzorec Tiklopidin	-36-
Obr. 9 Strukturní vzorec Klopido-rel	-37-
Obr. 10 Schematické znázornění různých terapeutických možností inhibice destičkového receptoru P2Y <sub>12</sub> .	-37-
Obr. 11 Finální hodnocení MEA.	-41-
Obr. 12 Multiplate® analyzer	-42-
Obr. 13 Křivka tání DNA	-46-
Obr. 14 Schematické znázornění infarktu myokardu	-49-
Obr. 15 Sledovaný soubor pacientů s AIM	-52-
Obr. 16 Mechanismus aktivace krevní destičky běžně dostupnými induktory	-54-
Obr. 17 Graf křivky tání pro COX-1, rs10306114 bez použití metody spikování vzorku	-58-
Obr. 18 Graf křivek tání pro COX-1, rs10306114 s použitím metody spikování vzorků	-59-
Obr. 19 Graf křivek tání pro P2Y <sub>12</sub> C34T, rs6785930	-60-
Obr. 20 Graf křivek tání pro P2Y <sub>12</sub> T744C, rs2046934	-62-
Obr. 21 Graf křivek tání pro GP1bA, rs2243093	-63-
Obr. 22 Graf křivek tání pro GP6, rs1613662	-65-
Obr. 23 Grafické znázornění porovnání výsledků metodou LTA a MEA u aspirinové rezistence.	-66-
Obr. 24 Grafické znázornění porovnání výsledků metodou LTA a MEA u thienopyridinové rezistence.	-67-
Obr. 25 In vitro testování 18 pacientů s akutním infarktem myokardu a aspirinovou rezistencí prokázanou funkčními agregačními testy	-68-

- Obr. 26 Zastoupení jednotlivých polymorfismů ve sledovaném souboru 124 pacientů s AIM -69-
- Obr. 27 Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu COX1\_A1;-A842G (rs10306114) v závislosti na pohlaví. -70-
- Obr. 28 Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu P2RY12; C34T (rs6785930) v závislosti na pohlaví. -70-
- Obr. 29 Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu P2RY12; i-T744C (rs2046934) v závislosti na pohlaví. -70-
- Obr. 30 Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu GP1bA ; -5T>C (rs2243093) v závislosti na pohlaví. -71-
- Obr. 31 Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu GP6 ; T13254C (rs1613662) v závislosti na pohlaví. -71-

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Endogenní příčiny selhávání protidestičkové terapie ASA	-33-
Tab. 2 Exogenní příčiny selhávání protidestičkové terapie ASA	-34-
Tab. 3 Příčiny thienopyridinové rezistence	-38-
Tab. 4a Polymorfismy COX-1 genu, které mohou souviset s aspirinovou rezistencí	-46-
Tab. 4b Polymorfismy ADP receptorů, které mohou souviset s clopidogrelovou rezistencí	-49-
Tab. 5 Názvy a sekvence použitých primerů a sond	-56-
Tab. 6 Příprava mixu na reakci v objemu 10 µl - COX-1, rs10306114	-57-
Tab. 7 Nastavení LightCycler 480 instrument pro genotypizaci polymorfismu COX-1, rs10306114	-58-
Tab. 8 Příprava mixu na reakci v objemu 20 µl - P2Y12 C34T, rs6785930	-59-
Tab. 9 Nastavení LightCycler 480 instrument pro genotypizaci polymorfismu P2Y12 C34T, rs6785930	-60-
Tab. 10 Příprava mixu na reakci v objemu 20 µl - P2Y12 T744C, rs2046934	-61-
Tab. 11 Nastavení LightCycler 480 instrument pro genotypizaci polymorfismu P2Y12 T744C, rs2046934	-61-
Tab. 12 Příprava mixu na reakci v objemu 20 µl - GP1bA, rs2243093	-62-
Tab. 13 Nastavení LightCycler 480 instrument pro genotypizaci polymorfismu GP1bA, rs2243093	-63-
Tab. 14 Příprava mixu na reakci v objemu 20 µl - GP6, rs1613662	-64-
Tab. 15 Nastavení LightCycler 480 instrument pro genotypizaci polymorfismu GP6, rs1613662	-64-
Tab. 16 Účinnost antiagregační léčby po podání 100 mg ANP denně	-66-
Tab. 17 Účinnost antiagregační léčby po podání 75 mg klopidogrelu denně	-66-
Tab. 18 Závislost mezi mutačním stavem COX1_A1;-A842G (rs10306114) a funkčními testy.	-72-
Tab. 19 Závislost mezi mutačním stavem GP1bA ; -5T>C (rs2243093) a funkčními testy.	-73-
Tab. 20 Závislost mezi mutačním stavem GP6 ; T13254C (rs1613662) a funkčními testy.	-73-

Tab. 21 Závislost mezi mutačním stavem P2RY12; i-T744C (rs2046934) a funkčními testy.	-73-
Tab. 22 Závislost mezi mutačním stavem P2RY12; C34T (rs6785930) a funkčními testy.	-74-
Tab. 23 Závislost mezi mutačním stavem GP1bA ; -5T>C (rs2243093) a funkčními testy.	-74-
Tab. 24 Závislost mezi mutačním stavem GP6 ; T13254C (rs1613662) a funkčními testy.	-75-
Tab. 25 Prevalence aspirinové rezistence v různých klinických studiích	-78-
Tab. 26 Srovnání metodik pro monitorování protidestičkové terapie	-80-

## **CÍLE PRÁCE**

1. Literární rešerše problematiky monitorování účinku antiagregační terapie
2. Volba optimálních metod pro detekci účinné antiagregační terapie
3. Zhodnocení efektivity navrženého diagnostického postupu
4. Zjištění vlivů destičkových polymorfismů na selhání antiagregační terapie

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1. FYZIOLOGIE HEMOSTÁZY

Hemostáza je jedním ze základních fyziologických procesů. Jedná se o schopnost organismu zastavit krvácení. Jde o velmi komplexní proces, který je řízen optimální souhrou endoteliální bariéry cévní stěny, trombocytů, aktivačních a inhibičních faktorů koagulační kaskády a fibrinolytického systému. Hemostatické mechanismy se liší podle lokalizace tj. arteriální či venózní část cévního řečiště. V cévách je nutná pohotová interakce koagulačních faktorů s destičkami při tvorbě krevního uzávěru. Naopak v žilách je velmi důležitá účast inhibitorů plazmatických koagulačních faktorů, které brání růstu krevní sraženiny a jejímu šíření dále do cévního řečiště. (Pecka, 2004).

### 1.1 Cévní stěna

Cévy dělíme na arterie, vény a kapiláry. Součástí arterií jsou silné a pružné stěny, které tvoří tři vrstvy: vnitřní (endotel), střední (hladké svaly, kolagení vlákna a fibroblasty) a zevní (fibroelastické vazivo, cévy vyživující arterie). Vény neobsahují tolik svalových buněk jako arterie, což je důvodem tenčí stěny. Cévní stěna kapilár je redukována na minimum a slouží k výměně plynů, živin a zplodin metabolismu mezi krví a tkáněmi. Cévní stěna (s výjimkou kapilár) je třívrstvá: intima, media a adventicie.

Intima je tvořena jednou vrstvou endoteliálních buněk uložených pod bazální membránou, které se nacházejí na vnitřní straně cév. Pod bazální membránou leží subintima, která obsahuje žírné buňky (syntéza a skladování heparinu, histaminu a serotoninu). Media je tvořena elastickými vlákny (pružnost cév), kolagenem typu I a III, glykosaminoglykany (GAGs) a také strukturálními glykoproteiny. Poslední vrstvou cévní stěny je adventicie, která obsahuje fibroblasty, adipocyty a také žírné buňky (Matýšková et al., 1999).

K základním funkcím cévního systému patří nejen transport okysličené (odkysličené) krve k orgánům či tkáním, ale také plní velmi důležitou roli při hemostatických dějích. Úloha cév v hemostatickém systému je jednak mechanická (vazokonstrikce při poranění cévy), ale i zásobní, kdy je místem syntézy mnoha látek

podílejících se na hemostáze. V neposlední řadě je místem interakce jednotlivých složek všech systémů hemostázy.

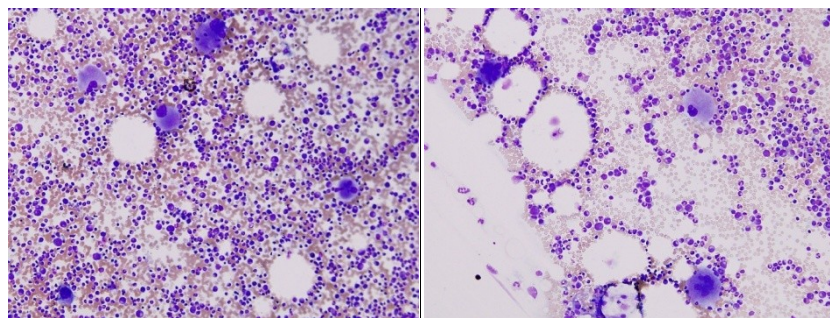
## 1.2 Krevní destička

Nedílnou součástí hemostázy jsou i krevní destičky. Krevní destičky se účastní tvorby primární cévní zátky při zástavě krvácení. Velmi významně se podílejí na obnovování vnitřních povrchů cévních stěn. Krevní destičky jsou malé bezjaderné diskoidní buněčné fragmenty vznikající z megakaryocytů při hematopoéze.

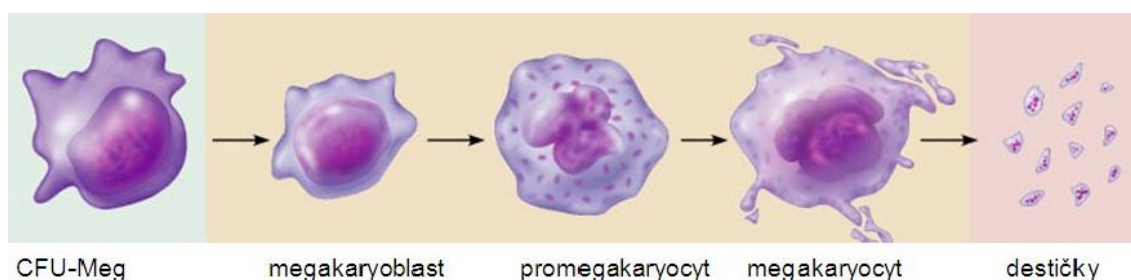
Hematopoéza (krvetvorba) je velmi složitý proces, během kterého se hematopoetická kmenová buňka diferencuje do mnoha buněčných typů. Mezi základní vlastnosti hematopoetické kmenové buňky patří schopnost sebeobnovy a pluripotence. Proliferace a diferenciací pluripotentní kmenové buňky vyžaduje kromě působení růstových faktorů (hormony a cytokiny) také jiné fyzikální interakce s podpůrnými stromálními buňkami a chemické interakce se sérovými faktory. Multipotentní kmenová buňka se nachází v kostní dřeni ve stálém počtu a zároveň dává vzniknout diferencovanějším kmenovým buňkám, tj. committed cells. Jednotlivé krvetvorné řady poté vycházejí z kmenových buněk pro dané linie. Krvetvorba je jediný vývojový proces, který probíhá po celý život člověka. Hematopoéza má u zdravého člověka velkou rezervu tzn. dle nutnosti lze mnohonásobně zvýšit produkci jednotlivých krevních elementů (Weissman et. al, 2001).

Hematopoetická liniová specifikace je dána kombinací působení vnitřních a vnějších faktorů. Mezi vnitřní faktory se řadí klíčové transkripční faktory, které se váží do místa promotorů či zesilovačů transkripce, čímž iniciují či zvyšují genovou expresi jednotlivých liniově specifických genových sad. (Orkin & Zon, 2002).

Trombocyty se tvoří ze zralých megakaryocytů. Megakaryocyty (Obr. 1) vznikají z pluripotentní kmenové buňky BFU-Meg procesem megakaryopoézy (Obr. 2). Působením řady růstových faktorů se pluripotentní kmenová buňka stává unipotentní (CFU-Meg) pro megakaryocytární vývojovou řadu. První morfologicky odlišitelnou buňkou je megakaryoblast, který prochází opakovanou atypickou mitózou tj. endomitózou při níž dochází k mnohonásobnému zmnožení genomu v jádře (2N, 4N, 8N, 16N...). Vývojová řada tedy začíná promegakaryoblastem, megakaryoblastem přes promegakaryocyt, až po samotný megakaryocyt (nezralý a zralý). Megakaryocyt se dále už nedělí, pouze vyzrává, což trvá 5-10 dní. (Pecka, 2002).



Obr. 1 Nátěry kostní dřeně - ukázky megakaryocytů při zvětšení 200x.



Obr. 2 Tvorba trombocytů z pluripotentní kmenové buňky BFU-Meg ( upraveno podle: Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings; [http://faculty.mdc.edu/cvizoso/BSC%202086%20L%20%202\\_files/frame.htm#slide0054.htm](http://faculty.mdc.edu/cvizoso/BSC%202086%20L%20%202_files/frame.htm#slide0054.htm))

Trombopoéza je proces tvorby krevních destiček ze zralého megakaryocytu trvající okolo 5 hodin. Tvorba nových krevních destiček je stimulována hormonem trombopoetinem (TPO) produkovaným v játrech, který je aktivován při poklesu počtu krevních destiček. TPO se váže na specifické receptory tzv. c-MPL (receptor pro trombopoetin), které se nacházejí na kmenových buňkách, megakaryocytech i destičkách. Tato vazba částečně vysvětluje protichůdný vztah mezi počtem krevních destiček a koncentrací TPO v krvi. TPO vykazuje v přibližně 20% homologii s erythropoetinem. Diferenciace megakaryopoézy se vedle TPO účastní i další doplňující regulační proteiny jako je IL (interleukin) -3, IL-6, IL-11 a G-CSF (růstový faktor stimulující kolonie granulocytů). Existuje přibližný odhad, že jeden megakaryocyt je schopen produkovat 1000-5000 destiček. Mladší destičky bývají větší a obsahují více granul se serotoninem a také více vazebných míst pro léčiva na membráně, zatímco starší destičky jsou menší a mají méně serotoninu. Destičky přežívají v periferní krvi po dobu 7-10 dní, poté jsou degradovány ve slezině, dále v játrech a kostní dřeni (Faber et al., 2012).

Normální počet trombocytů u dospělých je v rozmezí  $130-400 \times 10^9/l$ . Vedle celkového počtu trombocytů mohou být hodnoceny i další parametry jako je střední



objem krevní destičky (MPV) s fyziologickými hodnotami 7,8-11,0 fl; dále šíře distribuce destiček (PDW) s fyziologickými mezemi 12-18 fl; či destičkový hematokrit (Pct) s fyziologickým rozmezím 0,12-0,35% (Penka et al., 2001).

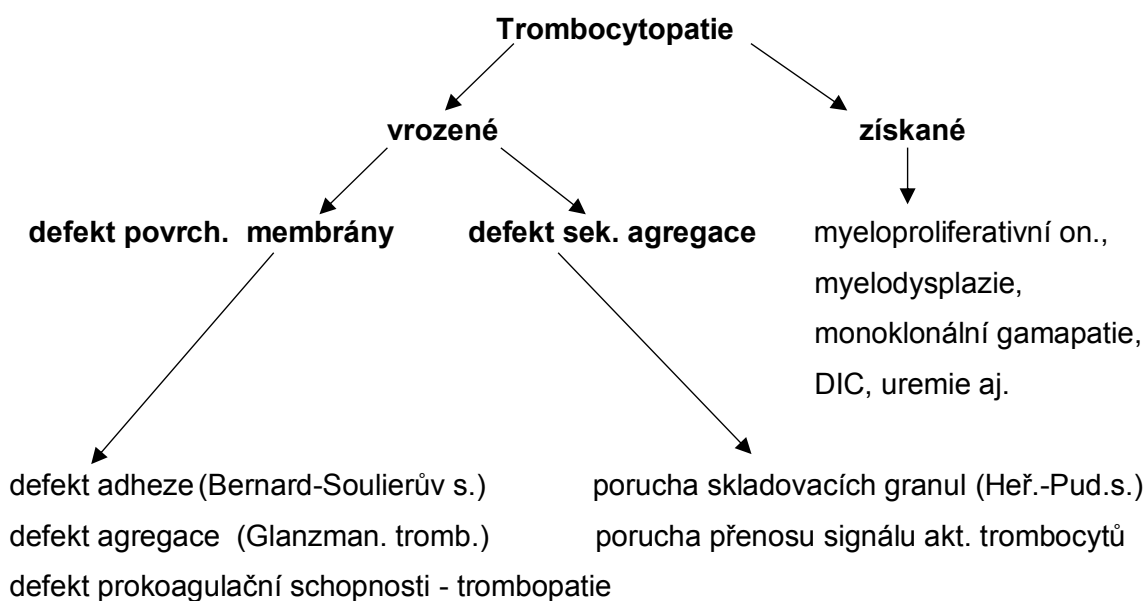
Krevní destičky se dělí z funkčního hlediska na čtyři oblasti tj. periferní zóna, sol-gel zóna, organelová zóna a membránová zóna. **Periferní zónu** tvoří glykokalyx a dvojvrstva fosfolipidů - nazývaná jako destičkový faktor 3 (PF3). Na povrchu krevních destiček se vyskytuje sfingomyelin a fosfatidylcholin. Fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin a dále fosfatidylinositol jsou součástí vnitřní strany membrány. Fosfatidylcholin a fosfatidylinositol jsou zdroje kyseliny arachidonové. Transfer  $Ca^{2+}$  v membráně je umožněn díky fosforylaci fosfatidylinositolu. Jednou ze základních funkcí periferní zóny je adheze na porušený endotel i na ostatní trombocyty. **Zóna solubilního gelu** je tvořena mikrofilamenty, středními filamenty a mikrotubuly, které se nacházejí těsně pod membránou. Tato zóna zajišťuje tvarové změny destičky a sekreci granulí. V **zóně organel** se nacházejí mitochondrie, azurofilní  $\alpha$  granula, hutné  $\delta$  granula, peroxizomy, glykogen atd. Jedná se o zónu metabolických dějů. **Zóna membránových systémů** zahrnuje otevřený kanálkový systém a dále hustý tubulární systém (vznikl z endoplazmatického retikula). Otevřený systém komunikuje s buněčným povrchem a hraje roli při transportu obsahu granul na povrch trombocytu. V cévní stěně probíhá metabolismus kyseliny arachidonové, která je přítomna v krevní plazmě a ve fosfolipidech stěny buněk všech tkání. K této metabolizaci dochází díky enzymům cyklooxygenase a lipooxygenase.

### 1.2.1 Poruchy krevních destiček

Trombocytopenie neboli poruchy krevních destiček mohou být rozděleny na vrozené či získané. U trombocytopenií je počet destiček normální nebo lehce snížený, avšak bývá porušena ultrastruktura destiček eventuelně je změněna jejich funkce nebo metabolismus (Penka&Tesařová, 2011).

Jednou z forem vrozené trombocytopenie je také porucha adhezivní. Typickým příkladem této poruchy je Bernardův-Soulierův syndrom. Tento syndrom se dědí autozomálně recesivně a typickým nálezem jsou velké destičky a defektní komplex glykoproteinu Ib/IXb a glykoproteinu V čili CD42b/CD42a/CD42d. Dalším typem vrozené trombocytopenie je porucha agregability např. Glanzmannova-Naegeliho trombocytopenie – autozomálně recesivní onemocnění s defektem glykoproteinu IIb/IIIa neboli CD41/CD61. Heřmanského-Pudlákův syndrom je poruchou skladovacích granulí (dochází k chybění skladovacích granul obsahujících proagregační látky nebo je obsah těchto látek ve skladovacích granulích významně snížen) a další syndromy této

skupiny jsou Chédiakův-Higashiho syndrom nebo Wiskottův-Aldrichův syndrom a také syndrom šedých destiček (Salles et al., 2008).



Obr. 3 Rozdělení trombocytopatií podle patogeneze

Získané trombocytopatie jsou častějším nálezem než vrozené trombocytopatie. Získané trombocytopatie provázejí řadu onemocnění jako myeloproliferativní onemocnění, myelodysplastický syndrom, leukemie aj. Neopomenutelnou součástí získaných poruch trombocytů jsou trombocytopatie polékové, nejčastěji po protizánětlivých lécích (kys. acetylsalicylová, indometacin, ibuprofen).

### 1.2.2 Primární hemostáza

V procesu tvorby primární hemostatické zátky hrají klíčovou roli krevní destičky a cévní složka. Základní funkce spočívá v zástavě krvácení tzn. při poranění se po vazokonstrikci jako první vytvoří primární trombus, který je teprve druhotně zpevněn fibrinovým vláknem. Mezi základní složky hemostázy patří: cévní stěna, složka tkáňová a krevní destičky. (Levy-Toledano et al., 1997). Primární hemostáza je tvořena sledem následujících dějů: adheze, aktivace, degranulace (sekrece), agregace a také destičkami zprostředkovanou koagulací. Primární hemostáza je zakončena přemístěním fosfolipidů z vnitřní membránové dvojvrstvy do míst vnějších membránových struktur. Uvolnění fosfolipidů aktivuje další proces hemostázy, čímž je polymerace rozpustného fibrinu na nerozpustný fibrin (Pecka, 2004).

### 1.2.2.1 Adheze

Adheze krevních destiček je proces, při kterém nasedají trombocyty na jiné než destičkové povrchy. Obnažení subendoteliálních struktur, zvláště kolagenu spouští signál pro vazbu bivalentních proteinů tj. von Willebrandova faktoru (vWF) respektive fibronektinu. Dochází tedy k vazbě povrchových glykoproteinů destiček GP Ia/IIa/IIb, GP Ib/IX/V, jejichž prostřednictvím dochází k adhezi destiček k poškozenému epitelu. Adheze může být stimulována řadou vnějších faktorů a mezi nejvýznamnější jednoznačně patří účinek ADP (pocházející z okolní tkáně).

K laboratornímu sledování adheze krevních destiček se používají buď nefyziologické povrchy (skleněné kuličky či vlákna), nebo fyziologické povrchy (kolagenová vlákna či kolagenové povrchy). Může být detekována přímá adheze destiček a nebo retence tzn. monitorování adheze současně s agregací trombocytů.

### 1.2.2.2 Aktivace

Při aktivaci povrchových struktur destičky probíhá řada biochemických procesů. Hlavní roli hraje aktivace receptorů pro ADP, tromboxan  $A_2$ , trombin, serotonin i adrenalin. Při aktivaci krevních destiček dochází k metabolizaci kyseliny arachidonové. Tvoří se proagregační metabolit tromboxan  $A_2$  ( $TXA_2$ ), který se následně přemění na neaktivní metabolit tromboxan  $B_2$ . Aktivace mění také tvar trombocytu tzn. z diskovitého tvaru na amorfní respektive na améboidní (s pseudopodii, povrch se zvětšuje). Při tomto ději se uvolňují proagregační a chemotaktické působky tzn. nastává sekreční fáze.

### 1.2.2.3 Degranulace

Uvolnění působků (sekrece) z trombocytu se děje za spolupůsobení několika faktorů:  $TXA_2$ ,  $Ca^{2+}$ , proteinkinasa C (PLC), myosinkinasa – lehký řetězec (MLCK). Nejprve dochází k sekreci alfa granulí a při silnějším podnětu i denzních granulí.

Z alfa granulí krevních destiček je uvolňován destičkový faktor 4 (PF4), který se skládá ze 4 stejných jednotek o MW 7,8 kDa. Celková MW PF4 homotetrameru je 29 kDa. PF4 váže heparin ve stechiometrickém poměru a tvoří antiheparinovou aktivitu. Uvolněný PF4 bývá skladován v hepatocytech a také v endotelu. Z hepatocytů se

uvolňuje působením heparinu. Zvýšená hladina PF4 poukazuje na vyšší aktivitu trombocytů.

Beta tromboglobulin ( $\beta$ -TG) je destičkový protein, který je skladován v alfa granulích destiček a slabě váže heparin. Při porovnání afinity PF4 a  $\beta$ -TG je tato vazba asi 5 krát nižší. Jedná se o také o homotetramer s MW 35,8 kDa.  $\beta$ -TG hraje roli při zánětlivé odpovědi a podporuje růst buněk. Zvýšená hladina  $\beta$ -TG bývá popisována u akutního infarktu myokardu, embólií, trombóz, diseminované intravaskulární koagulace, po chirurgických výkonech atd.

Tromboxan  $B_2$  (TXB<sub>2</sub>) vzniká z tromboxanu  $A_2$ , který vzniká při metabolismu kyseliny arachidonové. TXB<sub>2</sub> lze stanovovat buď v bezdestičkové plazmě nebo v moči. Dle hodnoty TXB<sub>2</sub> v bezdestičkové plazmě či moči lze monitorovat účinnost antiagregační léčby po podání kyseliny acetylsalicylové.

Stanovení TXB<sub>2</sub> je založeno na kompetici 11-dehydro- TXB<sub>2</sub> a 11-dehydro-TXB<sub>2</sub> označeným acetylcholinesterasou (AChE). Počet vazebných míst a také koncentrace 11-dehydro- TXB<sub>2</sub>-AChE je konstantní. Jednotlivá stanovení se liší koncentrací 11-dehydro- TXB<sub>2</sub> ve vyšetřovaném vzorku. V reakci monitorujeme barevný produkt, kdy intenzita zbarvení je přímo úměrná množství navázaného 11-dehydro- TXB<sub>2</sub>-AChE a nepřímo úměrná koncentraci 11-dehydro- TXB<sub>2</sub>.

### 1.2.3 Agregace

Aktivace destiček vyvolá strukturní změny s obnažením vazebných míst receptorů typu glykoproteinů GP IIb/IIIa (početně nejhojnější GPs). Aktivace GP IIb/IIIa receptorů umožní vzájemné propojení vždy dvou destiček prostřednictvím bivalentních proteinů: molekuly fibrinogenu, vWF, vitronektinu atd. Působením TXA<sub>2</sub> a serotoninu dojde také k obnažení a uvolnění fosfolipidů (PL) na povrchu trombocytu. PL za účasti  $Ca^{2+}$  významně potencují polymerizaci rozpustného fibrinogenu na nerozpustnou fibrinovou síť tj. katalyzují aktivaci koagulační kaskády.

Agregace je tedy vzájemné shlukování krevních destiček, které může následovat po adhezi. Agregaci trombocytů je možné stimulovat působením řady induktorů jako je ADP, TXA<sub>2</sub>, kolagen, adrenalin, trombin, kyselina arachidonová aj.

V laboratorních podmínkách můžeme agregaci monitorovat v plazmě bohaté na trombocyty (PRP) nebo v plné krvi. Pokud sledujeme agregaci trombocytů bez přidání stimulujících látek jedná se o tzv. spontánní agregaci. Jestliže agregaci trombocytů indukujeme přidáním určitých látek jako je například ADP, kolagen, arachidonová kyselina a další, pak se hovoří o tzv. stimulované agregaci.

Testování destičkových funkcí je tedy prováděno při podezření na krvácivé stavy, při hodnocení odpovědi na nasazenou protideštičkovou terapii, ale také v transfuzním lékařství (u dárců krve, při výrobě destičkových koncentrátů či po aplikaci transfuzních přípravků) (Kehrel & Brodde, 2013).

### 1.3 Plazmatický koagulační systém

Plazmatický koagulační systém představuje procesy, které vedou ke vzniku nerozpustného fibrinu (stabilního fibrinového koagula). Působením trombinu (FIIa) dochází ke štěpení fibrinogenu. Nejprve se odštěpí fibrinopeptid A a posléze i fibrinopeptid B. Po odštěpení obou fibrinopeptidů vznikne fibrin monomer, který je díky své pozměněné struktuře náchylný k polymeraci. Působením FXIIIa (aktivovaný fibrin stabilizující faktor, který je jako řada dalších faktorů aktivovaný trombinem) se monomery fibrinu propojují kovalentními vazbami za vzniku nerozpustného fibrinu (Muzbeck et al., 1999). Na retrakci krevní sraženiny se podílejí opět krevní destičky.

Koagulační faktory jsou označovány římskými číslicemi v pořadí, v němž byly objeveny. Aktivované formy se označují písmenem „a“. Většina koagulačních faktorů je syntetizována v játrech a řada z nich potřebuje ke své syntéze vitamin K. S výjimkou tkáňového faktoru (TF) jsou všechny koagulační faktory přítomné v plazmě jako zymogeny a pro svoji aktivitu vyžadují proteolytické štěpení, při němž vzniká koagulačně aktivní enzym. Jediný z faktorů, který v plazmě koluje v nepatrném množství v aktivované podobě, je FVIIa. Ale i FVII je v plazmě přítomen převážně v neaktivní podobě.

Faktory II, VII, IX, X, XI, XII a prekalkrein vykazují po rozštěpení enzymatickou aktivitu a řadí se mezi serinové proteázy. Jiné faktory se po rozštěpení účastní tvorby koagulačně aktivních komplexů (vnitřní tenáza, protrombináza) a chovají se jako kofaktory (FVIII, FV a vysokomolekulární kininogen-HMWK). Glykoprotein fibrinogen je substrátem pro trombin.

Primární systém aktivace (dříve zvaný vnější systém) se spouští po vazbě volně kolujícího F VIIa s TF. Vytvořený komplex aktivuje za účasti destičkových fosfolipidů a  $Ca^{2+}$  – za vzniku tetramerního komplexu zvaného vnější tenáza  $[FVIIa \cdot TF \cdot PI \cdot Ca^{2+}]$  – FX na FXa. FXa vstupuje společně se svým kofaktorem, FVa, destičkovými fosfolipidy a  $Ca^{2+}$  do komplexu protrombinázy (protrombináza =  $[FXa \cdot FVa \cdot PI \cdot Ca^{2+}]$ ). Protrombináza konvertuje přeměnu malého množství protrombinu na trombin. Takto vzniklý trombin není schopen rozštěpit dostatečné množství fibrinogenu, ale je schopen zpětně aktivovat koagulační FXI, FIX, kofaktory FVIII, FV a trombocyty. Tato

fáze koagulace se nazývá **iniciace**. Souběžně se vznikem komplexu vnější tenázy a protrombinázy se aktivuje inhibitor tkáňového faktoru (TFPI). Působení komplexu vnější tenázy je vázáno pouze na povrch buněk exprimujících tkáňový faktor, proto je tato cesta aktivace po navázání TFPI na TF zablokována. Koagulace pak probíhá pouze přídatnou, akcesorní (dříve zvanou vnitřní) cestou koagulace ve fázi **amplifikace** a **propagace**. Přídatný systém aktivace koagulace (dříve zvaný vnitřní systém) se spouští zpětnými mechanismy. Malým množstvím trombinu, vzniklým cestou vnější tenázy a protrombinázy, se aktivuje FXI, FIX a kofaktory – FVIII a FV. Celý proces koagulace je touto cestou významně urychlen, amplifikován. FIXa se svým kofaktorem F VIIIa vytvářejí společně s destičkovými fosfolipidy a Ca<sup>2+</sup> tetramerní komplex [FIXa . F VIIIa. PI . Ca<sup>2+</sup>], tzv. vnitřní tenázu. Vnitřní tenáza generuje již dostatečné množství FXa. FXa společně se svým kofaktorem FVa konvertuje v komplexu protrombinázy [FXa . FVa . PI . Ca<sup>2+</sup>] již dostatečné množství protrombinu na trombin. Vzniklý trombin aktivuje přeměnu glykoproteinu fibrinogenu na fibrinové, spontánně polymerující fibrinové monomery. Vzniklé polymery fibrinu jsou stabilizovány trombinem aktivovaným FXIIIa (fibrin stabilizujícím faktorem) a vzniká nerozpustné fibrinové koagulum. Dřívější představa o tom, že se vnitřní cesta koagulace (dnes zvaná akcesorní či přídatná) spouští ve fázi kontaktu aktivací FXII s následnou aktivací FXI, který tvoří komplex s neenzymatickým kofaktorem vysokomolekulárním kininogenem – HMWK, byla v současné době opuštěna. Ukazuje se, že se touto cestou spouští proces koagulace především na arteficiálních površích ve studiích in vitro. Úloha FXII (i FXI) není v dnešní době ještě zcela jednoznačně objasněna. Je však známo, že v komplexu [FXI.HMWK] se nemůže FXI aktivovat na FXIa. FXI může být aktivován FXIIa, trombinem a autoaktivací, což není u ostatních faktorů koagulace s výjimkou FVIIa obvyklé.

Oba systémy hemokoagulace působí v organismu společně a komplexně. Pro iniciaci koagulace je nezbytný systém vnější tenázy. Systém vnitřní tenázy je nezbytný pro amplifikaci procesu. Celý proces probíhá na povrchu krevních buněk. Iniciace na povrchu monocytů, amplifikace a propagace na povrchu krevních destiček. Průběh koagulačních reakcí není přísně kaskádovitý, dochází k celé řadě zpětných vazeb.



vnější tenázy (tzn. blokuje aktivitu tkáňového faktoru). TFPI se může vázat na LDL cholesterol a podílet se na vzniku aterosklerotických plátů.

### 1.3.2 Systém proteinu C

FIIa se váže na transmembránový glykoprotein trombomodulin (TM). Ve vytvořeném komplexu [TM . FIIa] se trombin stává koagulačně neaktivní, ale aktivuje protein C na aktivovaný protein C (APC). Aktivovaným proteinem C se inhibují kofaktory VIII<sub>a</sub> a Va<sub>i</sub>, čímž se inhibuje systém vnitřní tenázy a protrombinázy, a tím i generace trombinu. Účinnost proteinu C je potencována jeho kofaktorem (proteinem S). PC se váže na endoteliální receptor proteinu C, čímž se stává několikanásobně citlivějším na komplex [TM . FIIa]. Aktivovaný protein C má nejen koagulačně inhibiční, ale i profibrinolytickou aktivitu. Zvyšuje uvolňování tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) z vazby na inhibitor aktivátoru plazminogenu (PAI-1), přičemž vytváří s PAI-1 komplex [APC . PAI-1].

### 1.3.3 AT

Antitrombin inhibuje nejen trombin, ale i další serinové proteázy, které vyvazuje v poměru 1:1. Vzniklé komplexy jsou odbourávány v buňkách monocytomakrofágového systému. Rychlost vzniku komplexů [AT.FIIa nebo jiná serinová proteáza] je výrazně potencována heparinem (Lechner & Kyrle, 1995). Inhibice trombinu se odehrává řádově v sekundách, inhibice ostatních serinových proteas však v minutách. Vazba heparinu s AT je reverzibilní. Z dostupných heparinů se na AT váží jen ty, které mají sekvenci pentasacharidu. Inaktivace trombinu vyžaduje současnou vazbu trombinu i antitrombinu na jednu molekulu heparinu. Tato vazba zvyšuje účinnost AT až tisícinásobně. Pro inaktivaci trombinu musí být heparin tvořen minimálně 18 monosacharidovými jednotkami. Kratší molekuly FIIa neinhibují, zachovávají si však antiXa aktivitu. Je-li přítomen volný trombin, vzniká komplex [FIIa . AT], označovaný jako TAT. Tento komplex postrádá jak koagulační aktivitu trombinu, tak inhibiční aktivitu antitrombinu. Svědčí však o hyperkoagulačním stavu systému.

### 1.3.4 HC II

Do skupiny přirozených inhibitorů koagulačního systému patří i heparinový kofaktor II (HCII), jehož aktivita je namířena výhradně proti trombinu a který má zřejmě jen lokální význam.



Obecně platí, že nedostatek přirozených inhibitorů koagulačního systému je rizikovým faktorem tromboembolické nemoci.

## 1.4 Fibrinolytický systém

Fibrinolytický systém je zodpovědný za lýzu stabilního fibrinového koagula. Za fyziologických podmínek udržuje celý systém hemostázy hemostatickou rovnováhu nedochází ani ke krvácení, ani k uzávěru cév. Pokud dojde ke vzniku fibrinového koagula, které významně omezuje krevní tok, je aktivován fibrinolytický systém (Davie et al., 1991). Při nedostatečné reakci fibrinolytického systému může dojít k nekontrolovatelnému uzávěru cévy, čímž vzniká závažná trombotická komplikace. Fibrinolytický systém je složen z proenzymů, enzymů a inhibitorů, čímž je velmi podobný systému koagulačnímu (Kasthuri et al., 2010).

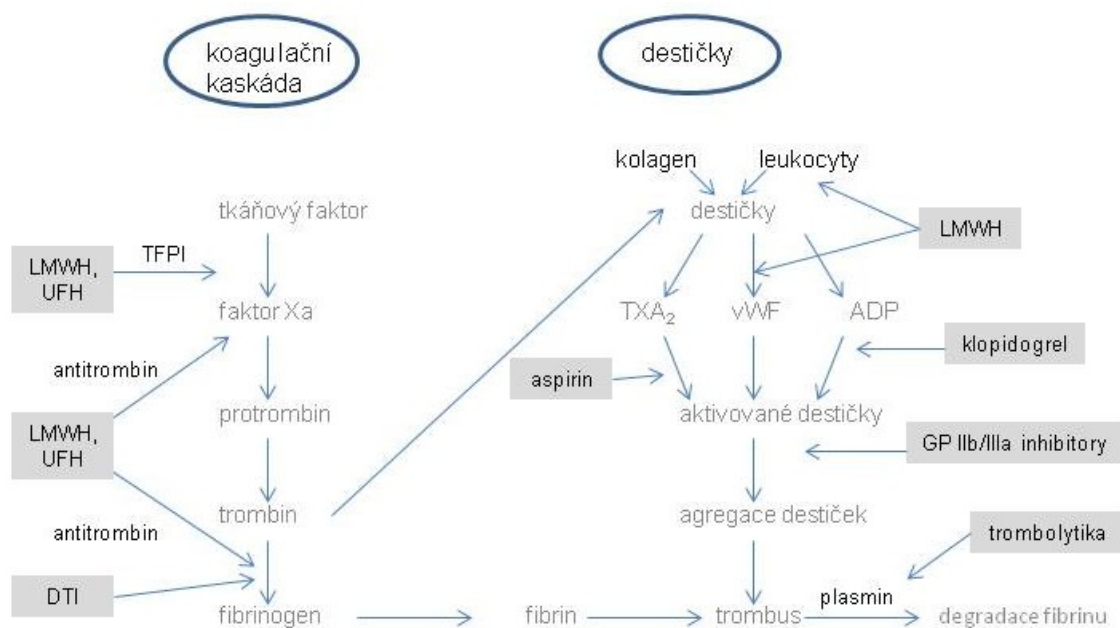
## 2. ANTITROMBOTICKÁ LÉČBA

Tromboembolické příhody (TEN) mají rozsáhlé spektrum klinických manifestací. Stále se rozšiřují indikace vyžadující antitrombotickou léčbu. Hemostatické mechanismy mohou být někdy nežádoucí ba dokonce život ohrožující a tudíž je třeba tuto aktivitu tlumit. Primární hemostázu inhibují zejména protidestičkové léky a sekundární hemostázu inhibují zejména antikoagulancia. Fibrinolýzu fibrinového trombu je možné potencovat podáváním t-PA či přirozenými fibrinolytiky včetně jejich analog (Buller al., 2005). Místa aktivace antitrombotické terapie jsou znázorněna na Obr. 5. Účinky této skupiny léčiv lze poté rozdělit na:

- Léky snižující hyperkoagulabilitu systému
- Léky zamezující následnému shlukování trombocytů
- Léky zabráňující zvětšení trombu či rozpouštějící fibrinovou část trombu

Antitrombotickou léčbu můžeme rozdělit na:

- Antikoagulační
- Trombolytickou
- Antiagregační



Obr. 5 Místa aktivace antitrombotické terapie – koagulační kaskáda a destičky (upraveno podle Selwyn, 2003), ADP – adenosindifosfát, DTI – přímý inhibitor trombinu, GP – glykoprotein, LMWH – nízkomolekulární heparin, TFPI – inhibitor tkáňového faktoru, UFH – nefrakciovaný heparin, vWF – von Willebrandův faktor

## 2.1 Antikoagulační léčba

Terapeutické možnosti dlouhodobé perorální léčby byly po řadu desetiletí omezeny na kumarinové deriváty, v našich podmínkách nejčastěji warfarin. V 80. letech minulého století byly do léčby TEN zavedeny nízkomolekulární hepariny (LMWHs). Zejména v posledních letech dochází k významnému pokroku v oblasti vývoje nových antitrombotik.

Mechanismus působení antikoagulační léčby je založen na inhibici generace trombinu a tudíž následnému zabránění přeměny fibrinogenu na fibrin. Při snížené tvorbě trombinu či vyvazování trombinu z koagulačního procesu se také velmi významně omezí riziko aktivace trombocytární složky hemostázy. Antikoagulační léčba má jako hlavní cíl co nejrychlejší dosažení účinné terapeutické hladiny léku, její udržení a také zabránění předávkování.

### 2.1.1 Antagonisté vitamínu K

Hlavním a u nás běžně používaným antikoagulačním léčivem z této skupiny je kumarinový derivát warfarin. Jde o syntetický derivát kumarinu s poločasem 2-3 dny.

Kumariny bývají také nazývány jako antivitaminy K. Účinek kumarinů spočívá v zabránění karboxylace gama glutamových N terminálních zbytků aminokyselin proenzymů faktorů protrombinového komplexu. V minulosti byly používány i kumarinové deriváty s delším poločasem účinku.

Vhodné nastavení pacienta na kumarinový preparát se detekuje pomocí protrombinového testu, vyjádřeného hodnotou mezinárodního normalizovaného poměru (INR). Vhodné terapeutické rozmezí adekvátně léčeného pacienta se nachází od 2,0 do 3,0 INR. Při nedodržení terapeutického rozmezí INR je ohrožena účinnost i bezpečnost podávání warfarinu.

Farmakokinetika warfarinu je ovlivněna také geneticky tj. polymorfismem genu cytochromu P450 – CYP2C9, který je zodpovědný za metabolické clearance warfarinu a genu VKORC1 (vitamín K epoxid reduktasa).

Léčba warfarinem může být vzácně komplikovaná žilní gangrénou nebo i nekrózou měkkých tkání u pacientů s nedostatkem proteinu C a S. Léčba warfarinem je ovlivňována řadou vnějších vlivů, zvláště příjmem vitamínu K ve stravě, přítomností jiných onemocnění. Další nevýhodou jsou četné lékové interakce. Při předávkování či krvácivých komplikacích se k neutralizaci využívají vitamín K, čerstvě zmražená plazma nebo deriváty protrombinového komplexu.

Ve světě se používají i další deriváty kumarinu jako je např. fenoprokumon (Marcoumar, poločas 5 dní), acenocumarol (Sintron, poločas 2-3 dny).

### **2.1.2 Hepariny**

Nefrakcionovaný heparin (UFH) a nízkomolekulární heparin (LMWH) patří mezi nepřímé inhibitory trombinu tzn. blokují trombin zprostředkovaně zvýšením účinku antitrombinu. Metabolismus heparinu je v lidském těle zprostředkován enzymem heparinasou v játrech. Antikoagulační odpověď LMWHs je předvídatelnější a účinnější než UFH, protože se neváží na plazmatické proteiny, trombocyty a další buňky. Účinek LMWHs není nutné běžně monitorovat. Sledování hladiny nízkomolekulární heparinů je však doporučováno u obézních či astenických pacientů, u těhotných či malých dětí a také u nemocných s renálním selháním pomocí stanovení anti-Xa aktivity.

K dalším a také běžně dostupným antikoagulantům je řazen nepřímý inhibitor FXa fondaparinux (Arixtra). Jedná se o syntetický analog pentasacharidu a jeho podání lze využívat například při léčbě heparinem indukované trombocytopenie.

### 2.1.3 Nová antikoagulancia

Nová antikoagulancia působí velmi cíleně na dané místo koagulační kaskády. Do této skupiny léčiv patří přímý inhibitor trombinu dabigatran etexilát (Pradaxa). Dabigatran inhibuje jak volný trombin, tak trombin vázaný na fibrin. Podání dabigatranu bylo schváleno v roce 2008 pro prevenci TEN u ortopedických výkonů, později v indikacích prevence cévní mozkové příhody a systémové embolie u dospělých pacientů s nevalvulární fibrilací síní s rizikovými faktory a pro léčbu hluboké žilní trombózy a plicní embolie a v prevenci rekurence těchto komplikací u dospělých pacientů.

Mezi nová antikoagulancia dále patří také rivaroxaban (Xarelto) (Goldstein et al., 2013; Mega et al., 2012) a apixaban (Eliquis) (Alexander et al., 2009). Rivaroxaban i apixaban jsou přímé inhibitory FXa, na který působí specificky.

Dabigatran ani rivaroxaban či apixaban není nutné v běžné klinické praxi monitorovat (Oldgren et al., 2011). Pokud však dojde ke krvácení či trombotické komplikaci po podání nových antikoagulancií je monitorování účinku vhodné. K orientačnímu stanovení dabigatranu se využívá běžně dostupný APTT či nově dostupný a přesný diluovaný trombinového času tzv. Hemoclotu. Pro přesné stanovení rivaroxabanu a apixabanu se využívá stanovení anti Xa aktivity kalibrované standardy daného léku.

Ve vývoji jsou i další nová antikoagulancia např. inhibitory faktoru IXa s kódovým označením SB249417 či RB006 (Povsic et al., 2011). Mezi další testovaná nová léčiva řadíme také inhibitor tkáňového faktoru TF/VIIa Tifacogin, avšak tyto studie byly pozastaveny (Aditya, 2012).

Pokud dojde k předávkování či krvácivým komplikacím je nutno léčbu novými antikoagulancii přerušit. Pro tyto klinické situace jsou doporučeny již přesné algoritmy zahrnující pátrání po zdroji krvácení, obecnou hemostatickou podporu a využití antidot (diarucizumab – již schválené antidotum a dále také andexanet, který zatím není dostupný).

## 2.2 Trombolytická léčba

Trombolytická léčba je založena na potenciaci přeměny plazminogenu na plazmin. Trombolytika vyvolávají přeměnu plazminogenu na plazmin a aktivují fibrinolytický proces. Trombolytika jsou dělena na přímá a nepřímá. Mezi typické zástupce nepřímých trombolytik patří streptokinasa. Do skupiny přímých trombolytik řadíme

tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA aktilyza). Trombolytická léčba má za cíl zejména zprůchodnění tepny nebo žíly, což významně snižuje mortalitu pacientů.

### **2.2.1 Streptokinasa**

Streptokinasa někdy také označovaná jako streptasa je protein, který je produkován některými typy  $\beta$ -hemolytického streptokoka. Účinnost streptokinasy je závislá na dostatečném množství plazminogenu. Rizikovým místem této léčby je nutnost nasycení bolusu protilátek vůči streptokinase (zůstaly v organismu po infekci  $\beta$ -hemolytického streptokoka), protože toto nasycení je u každého pacienta individuální. Maximální trombolytická aktivita bývá v závislosti na dávce obvykle dosažena do 30 minut po podání. Díky tvorbě protilátek proti streptokinase není možno provést opakovanou aplikaci u pacientů. Časně nežádoucí účinky dostavující se bezprostředně po podání patří febrilní reakce, bolesti hlavy, hypotenze nebo také alergické reakce. Krvácivé komplikace v podobě život ohrožujícího krvácení se vyskytují pouze u 0,3 – 2,0% nemocných.

### **2.2.2 Urokinasa**

Urokinasa je enzym vytvářený epiteliálními buňkami močového traktu a vyskytující se v moči zdravých lidí. Urokinasa aktivuje přeměnu plazminogenu na plazmin přímo. Urokinasa není antigenní, netvoří protilátky dokonce nemá popsány alergické reakce a proto může být podávána opakovaně (Pecka, 2004).

### **2.2.3 Tkáňový aktivátor plazminogenu**

Tkáňový aktivátor plazminogenu (t-PA) je přirozeně tvořen endoteliálními buňkami a patří mezi přímá trombolytika. Molekula t-PA obsahuje vazebné místo pro fibrin a katalytické místo pro přeměnu plazminogenu na plazmin. TPA se specificky váže na fibrin, hlavně ve vnitřních strukturách trombu. Velká výhoda t-PA je, že neindikuje antigenní odpověď, jelikož se jedná o humánní enzym (Fugate et al., 2010). V klinice se používá rekombinantní forma rt-PA (preparát Actilyse).

## **2.3 Antiagregační léčba**

Do primární hemostázy lze zasáhnout na úrovni adheze, aktivace, degranulace či vlastní agregace. V praxi se nejvíce osvědčila blokáda receptorů ADP

thienopyridinovými antagonisty ADP receptorů či blokáda metabolické cesty vedoucí k syntéze TXA<sub>2</sub> kyselinou acetylsalicylovou. Oba principy antiagregační léčby si nekonkurují, ale optimálně se doplňují, jak prokázala i řada klinických studií. Protidestičkové léky nemají antidotum a v případě výskytu závažných krvácivých komplikací je nutné podat trombocytární koncentráty.

Antiagregační léčba zůstává jedním ze základních sekundárně preventivních léčebných opatření při léčbě komplikací aterosklerózy a je navázána na všechny další léčebná opatření. Cílem dalšího výzkumu je učinit tuto léčbu ještě účinnější s menším výskytem vedlejších účinků.

Antiagregační léčba omezuje shlukování krevních destiček. Existuje řada míst a úrovní, ve kterých antiagregační léčba může farmakologicky zasáhnout (Pecka, 2004).

Hlavní vedlejší účinky antiagregační léčby jsou krvácivé komplikace, hlavně krvácení do zažívacího systému a mozkové krvácení. Hlavními faktory, které zvyšují výskyt těchto krvácení jsou věk, dávka léku, délka léčby a komorbidity – artrózy a bolestivé muskuloskeletální syndromy vedoucí k nekontrolovanému používání nesteroidních antirevmatik, výskyt vředové choroby gastroduodena v anamnéze, onemocnění ledvin s renální insuficiencí, kouření a nedostatečné zajištění stravy. U thienopyridinů je třeba ze závažných nežadoucích účinků pamatovat na trombocytopenie a neutropenie, nauzeu, zvracení, bolesti v břiše a průjmy (Špác, 2010).

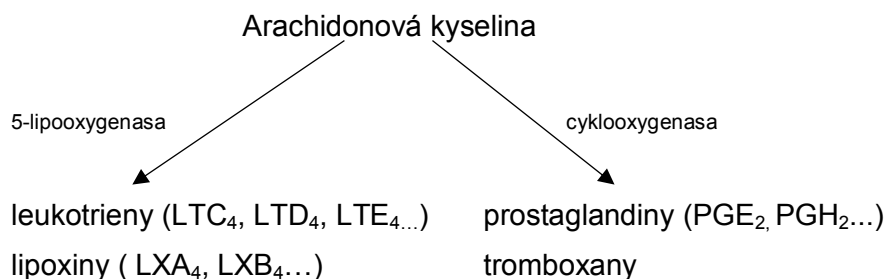
Agregaci můžeme regulovat za pomoci dvou protikladných faktorů tj. TXA<sub>2</sub> a PGI<sub>2</sub>. TXA<sub>2</sub> zvyšuje agregaci a podporuje vazokonstrikci, zatímco PGI<sub>2</sub> inhibuje agregaci krevních destiček a vyvolává vazodilataci. Z mechanismu účinku PGI<sub>2</sub> a TXA<sub>2</sub> je zřejmé, že mezi těmito látkami existuje funkční antagonismus při ovlivňování cévního průsvitu a agregace destiček. Obě látky vznikají při metabolismu kyseliny arachidonové.

### **2.3.1 Kyselina acetylsalicylová (ASA)**

Kyselina acetylsalicylová (ASA) patří již déle než sto let k široce užívaným lékům. ASA má antiflogistické a antipyretické účinky a také významně snižuje agregaci krevních destiček, čímž snižuje riziko kardiovaskulárních chorob, tedy recidiv infarktu myokardu, zhoršení anginy pectoris, brání retrombóze v arteriálním řečišti po chirurgických výkonech atd. Uplatnění ASA je velmi široké. Užívání ASA však může u některých pacientů poškozovat sliznici žaludku a dvanáctníku.

ASA je látka vyvolávající nevratnou inhibici cyklooxygenasy (COX) a následně potlačuje syntézu TXA<sub>2</sub>. Cyklooxygenasa je klíčový enzym, který produkuje cyklické

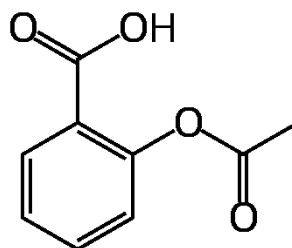
endoperoxidy  $PGG_2$  a  $PGH_2$  z arachidonové kyseliny. Nachází se v denzním tubulárním systému. Existují 2 izoformy cyklooxygenázy tj. COX-1 a COX-2. COX-1 se nachází zejména v krevních destičkách a COX-2 hlavně v monocytech a makrofázích. Obě izoformy jsou membránově vázané enzymy, které tvoří úzký a dlouhý hydrofóbní kanál, do něhož vstupuje kyselina arachidonová z poškozené membrány. Funkce enzymů je katalyzovat transformaci této kyseliny na prostaglandiny (Matýšková et al., 1999; Pecka, 2004). Kyselina arachidonová je tedy hlavní výchozí látkou při tvorbě různých druhů eikosanoidů. Kyselina arachidonová má dvě odlišné metabolické dráhy (Obr. 6). První metabolickou cestou je přeměna pomocí cyklooxygenasy při níž dochází k syntéze prostanoidů a dále druhou metabolickou drahou je přeměna pomocí lipoxygenasy, čímž vznikají leukotrieny a lipoxiny. Prostanoidy mohou být dále členěny na prostaglandiny, prostacyklin a tromboxany, což jsou deriváty kyseliny propanové.



Obr. 6 Metabolismus kyseliny arachidonové

Kyselina acetylsalicylová (Obr. 7) v krevních destičkách a také buňkách endotelu ireverzibilně inhibuje cyklooxygenasu (COX-1) tím, že ji acetyluje. ASA, která tedy vyvolá nevratnou inhibici cyklooxygenasy, potlačí i syntézu tromboxanu  $A_2$  a také dalších prostaglandinů. V buňkách endotelu je schopnost tvořit prostacyklin porušena přechodně, neboť cyklooxygenasa se opět rychle vytvoří. Zde však vidíme rozdíl u krevních destiček, které nejsou schopny enzymy znovu vytvářet, jelikož se jedná o bezjaderné buněčné fragmenty. Tvorba  $TXA_2$  je pozastavena na 7–10 dní, což odpovídá délce života krevní destičky.

Dávky ASA, které se používají v antiagregační léčbě (100 – 200 mg denně, pouze ve vyjmečných případech se jedná o vyšší denní dávkování), nemají většinou významný gastrotoxický účinek na žaludeční sliznici, nicméně u citlivých pacientů mohou i nižší dávky ASA vyvolávat projevy nesnášenlivosti, nauseu, zvracení aj. U velmi citlivých pacientů se objevují i slizniční změny (eroze, petechie či dokonce vředy), což může vyvolat závažné, život ohrožující komplikace v podobě masivního krvácení do zažívacího traktu (Lüllmann et al., 2009).



Obr. 7 Vzorec kyseliny acetylsalicylové

Je zapotřebí, aby ASA do destiček vstoupila nezměněna z důvodu potlačení tvorby nežádoucích eikosanoidů acetylací enzymu. Při perorálním podání aspirinu probíhá v játrech jeho deacetylace. Díky tomu jsou destičky saturovány vyšší koncentrací narozdíl od endotelu.

Mezi další nežádoucí účinky ASA patří alergická kožní vyrážka, poškození žaludeční sliznice (žaludeční vředy), zhoršení renálních funkcí a především může vyvolat krvácení. Rovněž děti a dospívající mládež trpící horečnatým onemocněním by neměli užívat ASA bez předchozí rady s lékařem. Pokud během léčby dojde k dlouhodobějšímu zvracení, může se jednat o tzv. Reyův syndrom, vzácné, avšak závažné choroby, o které je známa souvislost s ASA. Terapie pomocí ASA se využívá u nemocí jako jsou angina pectoris, sekundární profylaxe u infarktu myokardu nebo u cévní mozkové příhody (Lüllmann et al., 2009).

Dále existují na trhu léky, které mají kyselinu acetylsalicylovou kombinovanou např. s dipyridamolem u přípravku Aggrenox®. Jedná se o inhibitor fosfodiesterasy, který blokuje zejména uvolňování vWF a adhezivitu destiček. Zablokováním destičkové fosfodiesterasy nedochází k tvorbě cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Samotný dipyridamol není vhodný pro antitrombotickou léčbu nemocných s ICHS, u nichž může prohloubit ischemii. Je indikován k léčbě tranzitorní ischemické ataky (TIA) a druhotné prevenci ischemického iktu (Huang et al., 2013).

### 2.3.1.1 Aspirinová rezistence

Termín aspirinová rezistence je poměrně nepřesný. Používá se jak ve smyslu klinickém, tak laboratorním. Termín „rezistence“ obecně znamená, že lék je neschopen zasáhnout svůj farmakologický cíl. Dle této definice by se aspirinová rezistence vztahovala pouze na situace, kdy aspirin není schopen inhibice produkce TXA<sub>2</sub> závislé na COX-1 a následné redukci destičkových funkcí závislých na TXA<sub>2</sub> (Angiolillo, 2009; Hirmerová 2009).



Z klinického pohledu tedy může nastat situace, kdy užívání ASA nezabrání trombotické komplikaci. Jedná se o stav, při kterém selhává léčba ASA. Ve všech případech se nemusí striktně jednat o nedostatečnou odpověď, neboť k trombotické komplikaci může dojít i při rozsáhlé progresi aterosklerózy nebo také po zavedení stentu. ASA má v prevenci kardiovaskulárních příhod nezpochybnitelnou účinnost, ale není schopna zabránit trombotickým komplikacím u všech pacientů.

Laboratorně je aspirinová rezistence popisována jako nemožnost prokázat účinek aspirinu laboratorními testy. V diagnostice aspirinové rezistence se vyskytuje řada testovacích systémů s různou citlivostí a specifitou. Pokud je léčba ASA neúčinná, dochází stále ke tvorbě TXA<sub>2</sub>, jehož metabolit tj. TXB<sub>2</sub> lze detekovat v moči nebo v plazmě. Další běžně dostupné testy sledují nedostatečnou inhibici agregační schopnosti krevních destiček při užívání ASA. Použití metod se u jednotlivých studií liší, a proto bývá nízká vzájemná korelace. Optická a také impedanční agregometrie po stimulaci kyselinou arachidonovou se jeví jako nejvhodnější metody ke stanovení protideštičkového účinku po podání ASA (Zimmermann & Hohlfeld, 2008).

Příčiny aspirinové rezistence můžeme rozdělit na endogenní (Tab. 1) a exogenní (Tab. 2). Endogenní příčiny ASA rezistence jsou dále rozděleny na skupinu buněčných a dále také skupinu genetických příčin. Je nutné si uvědomit, že na stanovení agregace trombocytů mají vliv různé faktory. Jedná se zejména o nedostatečnou biologickou dostupnost (non compliance, nedostatečná dávka, nedostatečná absorpce, interference s jinými léky), zvýšenou funkci destiček (neúplná tvorba TXA<sub>2</sub>, zvýšený obrát destiček) genetické příčiny (polymorfismy receptorů: GP IIb/IIIa, kolagen, tromboxan; polymorfismy enzymů: COX-1, COX-2, TXA<sub>2</sub> syntasy), interakci trombocytů s jinými krevními buňkami. Existuje také velmi různorodá skupina faktorů, které mají vliv na agregaci trombocytů jako např. kouření, hypercholesterolemie, stres, zvýšená aktivita sympatiku aj. Agregaci trombocytů nelze většinou stanovit u vzorků s chylózní, ikterickou a také hemolytickou plazmou. Limitující je také počet trombocytů. Pro většinu metod stanovení agregace trombocytů je limitní hodnota 100x10<sup>9</sup>/l.

Tab. 1 Endogenní příčiny selhávání protideštičkové terapie ASA

<b>Endogenní příčiny ASA rezistence</b>	
Buněčné	Genetické
cesty neblokované ASA (indukce agregace erythrocyty, trombinem, kolagenem,	polymorfismus COX-1 (alteruje aktivní místo a brání acetylaci aspirinem), COX-2, TXA <sub>2</sub> syntetázy

adrenalinem, ADP, cytokiny)	
senzitivita destiček na kolagen a ADP	ADP polymorfismus GP Ia/Ia, Ib/V/IX, IIb/IIIa receptoru
overexprese COX-2 (rychlá regenerace trombo)	polymorfismus receptoru pro kolagen GP VI, vWf GP Ia
regenerovaná COX-1 (Mo, Ma, endotelie)	polymorfismus f XIII (Val34Leu), který vede k inhibici aktivace faktoru XIII při léčbě ASA
resolviny	
tvorba 8-iso-PGF	

Tab. 2 Exogenní příčiny selhávání protideštičkové terapie ASA

<b>Exogenní příčiny ASA rezistence</b>
malabsorpce
lékové interakce (NSAID)
kouření
fyzická zátěž, posturální reakce, stres
věk, pohlaví
zvýšený obrat krevních destiček
hyperlipidémie, hyperglykémie
netrombotická etiologie cévního uzávěru (arteriitida, embolizace)
hyperkoagulační stav u akutních koronárních syndromů
dose dependence

### 2.3.2 Thienopyridiny

Thienopyridiny jsou ireverzibilní blokátory ADP receptoru P2Y<sub>12</sub>. Další cesty aktivace přes ADP receptory jako je P2Y<sub>1</sub> nejsou ovlivněny. Konečným efektem blokady ADP receptoru je zabránění aktivace destičkového receptoru GP IIb/IIIa. Thienopyridiny první i druhé generace získávají svoji aktivitu až po biotransformaci v játrech tj. oxidací cytochromem P-450. Velmi odlišná je potom biotransformace thienopyridinů třetí generace, kde k aktivaci dochází ve střevní stěně. Schematické znázornění různých terapeutických možností inhibice destičkového receptoru P2Y<sub>12</sub> shrnuje také Obr. 10.

Jako první zástupce thienopyridinů byl do klinické praxe uveden **tiklopidin**. Byla prokázána jeho účinnost v prevenci trombózy koronárních stentů při kombinované léčbě s ASA. Dnes je jeho užívání považováno za obsolentní a zůstává užíván pouze jako záložní lék při nemožnosti užití modernějších preparátů z této skupiny antiagregancií. Mezi nejzávažnější vedlejší účinky tiklopidinu patří neutropenie, trombocytopenie, aplastické anémie a trombocytopenické purpury. Méně závažnými komplikacemi jsou alergické reakce a průjemy.

Dominantní postavení má v současnosti thienopyridin druhé generace, **klopidogrel**, vzhledem k obdobné klinické účinnosti jako tiklopidin, ovšem lepšímu bezpečnostnímu profilu (nižší výskyt krvácivých komplikací, dřevňových útlumů atd.). Thienopyridiny jsou proléčiva s nutností metabolické aktivace cestou cytochromu P450, což vede k delší době do nástupu účinku. Po podání klopidogrelu se dostaví účinek do 2–4 hodin, tuto nevýhodu lze částečně zmírnit podáním nasycovací (navýšené, bolusové) dávky.

V případě klopidogrelu je klíčovým izoenzymem pro metabolizaci oxidáza CYP 2C19, která má až u 30 % populace jednu defektní alelu, což má za důsledek nedostatečný efekt léku a tímto podmíněná nedostatečná klinická účinnost je hlavním nedostatkem léčby klopidogrelem. Rezistenci na léčbu klopidogrelem zvyšuje také současná léčba inhibitory protonové pumpy (např. omeprazolem), který je rovněž metabolizován CYP 2C19. Lepší účinnosti léku u pacientů s tímto defektem lze částečně dosáhnout již zmíněným navýšením úvodní dávky na 600 mg.

**Prasugrel** je thienopyridin 3. generace, jenž je aktivován ve střevní stěně a jeho metabolismus není tudíž ovlivněn polymorfizmem CYP. Má tedy méně lékových interakcí a je funkční i u pacientů rezistentních ke klopidogrelu tj. u pacientů neadekvátně odpovídajících na léčbu klopidogrelem (Alexopoulos et al., 2012). Je rovněž dostupný v perorální (p.o.) formě, má však výrazně kratší dobu do nástupu účinku (30 minut). Po orálním podání je prasugrel esterázami v krvi a ve střevě přeměněn na neaktivní thiolakton, který je dále oxidován cytochromem P 450 (izoenzymem 3A4 a 2B6) na aktivní metabolit R-138727. V porovnání s metabolickým osudem klopidogrelu tj. přeměna na intermediární thiolaktonový produkt probíhá pomaleji a během této přeměny je ztraceno cca 85% meziprojektu (přeměnou na inaktivní metabolity). Hladiny aktivních metabolitů jsou po prasugrelu vyšší než po klopidogrelu a vykazují také menší variabilitu. Pokud se uplatní i genetický polymorfizmus ve funkci izoenzymu 2C19 s důsledky nižší schopnosti přeměny klopidogrelu na aktivní metabolit, pak jsou rozdíly v účinnosti v neprospěch klopidogrelu ještě výraznější. Menší variabilita účinných krevních hladin aktivního

metabolitu po podání prasugrelu se jeví jako základ jeho spolehlivějšího terapeutického účinku.

Ve studii TRITON-TIMI 38 prokázal prasugrel lepší výsledky oproti klopidogrelu u pacientů s akutním koronárním syndromem. Nevýhodou tohoto léky je však vyšší výskyt krvácivých komplikací, z čehož vyplývá i omezení léčby prasugrelem u pacientů vyššího věku (nad 75 let), cévní mozková příhoda/transitorní ischemická ataka v anamnéze nebo také nízká hmotnost (pod 60 kg). Dá se ale říci, že stále převyšuje benefit nad riziky. Největší přínos oproti klopidogrelu byl prokázán u pacientů po implantaci stentu.

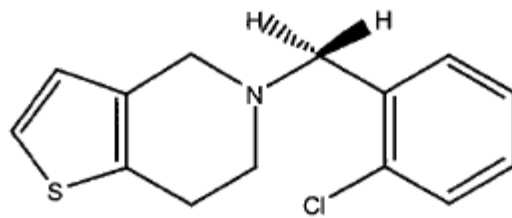
**Elinogrel** je nový thienopyridin, který má na rozdíl od předchozích reverzibilní vazbu kompetitivního charakteru na receptor P2Y<sub>12</sub>, velmi rychlý nástup a krátkou dobu trvání účinku. Lék je dostupný v perorální i intravenózní formě a v klinických studiích vykazuje příznivější bezpečnostní profil oproti starším thienopyridinům (Ueno et al., 2010).

Podání thienopyridinů v kombinaci s aspirinem při léčbě akutního koronárního syndromu a při koronárních intervencích je dnes považováno za tzv. zlatý standart.

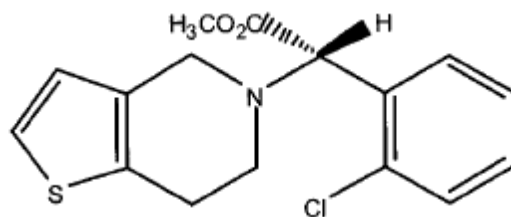
**Ticagrelor** je antagonist ADP receptorů non-thienopyridinového charakteru. Ticagrelor působí přímo na receptor P2Y<sub>12</sub>, je dostupný v perorální formě či ve formě infuze, nevyžaduje biotransformaci na aktivní metabolit (zásadní rozdíl od thienopyridinů, nezávislost na systému CYP) (Nordeen et al., 2013). Nástup účinku je v rozmezí 2–4 hodin u perorální formy avšak v případě infuze se účinek dostaví za 3–6 min, blokáda ADP receptorů je reverzibilní, z čehož vyplývá kratší efekt léku a také nutnost podávání ve dvou denních dávkách. Ve studii PLATO vykázal ve srovnání s klopidogrelem při podávání po dobu 12 měsíců pacientům po infarktu myokardu s elevacemi ST úseku redukcí rizika úmrtí a opakujících se atherotrombotických příhod bez zvýšení rizika závažného krvácení (Goel, 2013). Nejčastějším nežádoucím účinkem při léčbě ticagrelorem je vyšší výskyt asymptomatických atrio-ventrikulárních blokád a obdobně jako u všech reverzibilních blokátorů receptorů P2Y<sub>12</sub> (elinogrel, ticagrelor, cangrelor) dechová nedostatečnost. Můžeme tedy říci, že Ticagrelor je vhodnou alternativou thienopyridinů při duální antiagregační terapii u pacientů s akutním koronárním syndromem (Vandvik et al, 2012).

**Cangrelor** je rovněž non-thienopyridinový antagonist ADP receptoru P2Y<sub>12</sub> s přímým a také reverzibilním účinkem. Výhodou tohoto preparátu je velice rychlý nástup účinku tj. v řádu minut. Stejně jak již bylo zmíněno u předchozího léku je efekt rovněž velice krátkodobý v řádu desítek minut. Cangrelor se tedy musí aplikovat kontinuálně - intravenózně, z čehož vyplývá omezené užívání při léčbě akutního koronárního syndromu. Vzhledem k velmi rychlému odeznívajícímu účinku by mohl být

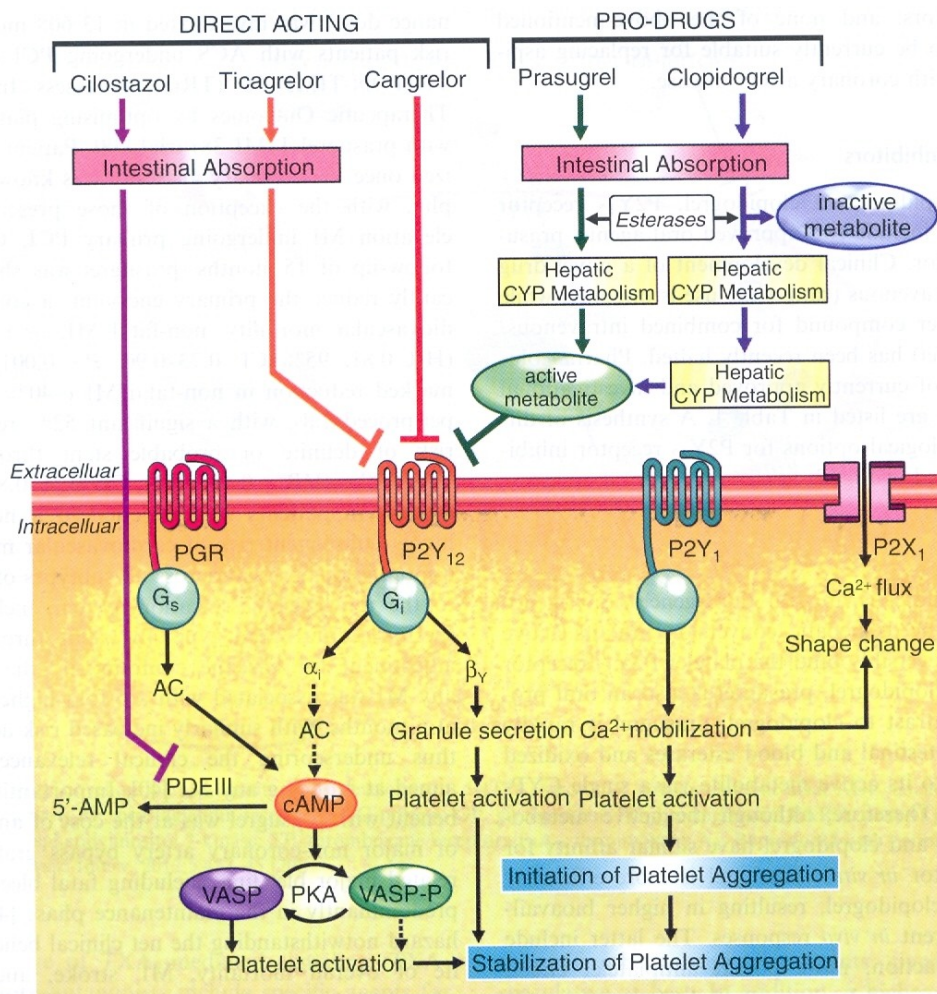
užíván jako překlenovací léčba zejména u pacientů s dalšími urgentními kardiologickými výkony (White et al, 2012).



Obr. 8 Strukturální vzorec Tiklopidin



Obr. 9 Strukturální vzorec Klopidoogrel



Obr. 10 Schematické znázornění různých terapeutických možností inhibice destičkového receptoru P2Y<sub>12</sub>. Plné černé šipky ukazují cestu aktivace destiček. Naproti tomu tečkované černé šipky označují místa inhibice. ADP – adenosin difosfát, ATP – adenosin trifosfát, cAMP – cyklický adenosin monofosfát, PDE-III – fosfodiesterasa III, PGE1 – prostaglandin E1, PAK – protein kinasa, VASP-P – fosforylace vazodilatací stimulovaného monofosfátu (upraveno dle Angiolillo DJ et al., 2011).

### 2.3.2.1 Thienopyridinová rezistence

Faktory ovlivňující selhání terapie klopidogrelem můžeme rozdělit do tří skupin (genetické, buněčné, klinické – viz. tabulka 3). Z genetických příčin jsou to zejména polymorfizmy cytochromu P 450 (CYP 2C19, CYP 3A4, 3A5), polymorfizmy receptoru pro ADP. Mezi faktory klinické patří hlavně nespoupráce nemocného v terapii, inadékvátní dávkování, lékové interakce (mezi klopidogrelem a farmaky metabolizovanými přes cytochrom P450), přidružené choroby (diabetes mellitus,

obezita), stresové situace, či zvýšený obrat trombocytů (Kreutz et al., 2013). Byla popsána i korelace mezi sníženou odpovědí na ASA a současně sníženou odpovědí na klopidogrel.

Tab. 3 Příčiny thienopyridinové rezistence

<b>Příčiny thienopyridinové rezistence</b>
lékové interakce s CYP3A4
BMI, diabetes, inzulinoresistence, stres
interindividuální a intraindividuální variabilita v aktivitě CYP 45
akcelerovaný obrat krevních destiček
genové polymorfismy CYP 450
genové polymorfismy destičkových receptorů
Noncompliance, poddávkování

### **2.3.3 Blokátory receptorů GP IIb/IIIa**

V klinické praxi se užívají pouze parenterální preparáty, jejichž užití je omezeno na terapii akutního koronárního syndromu a koronární intervence. Doposud testované perorální molekuly vykazovaly výrazně zvýšené riziko krvácivých komplikací a díky nízké afinitě ke GP IIb/IIIa receptoru rovněž vznik protrombotického stavu po jejich vysazení. Důsledkem bylo zvýšení mortality ve studiích s těmito preparáty.

#### **2.3.3.1 Abciximab**

Abciximab je Fab část monoklonální protilátky proti GP IIb/IIIa receptoru, proto je jeho vazba na receptor trvalá. Abciximab byl testován v mnoha studiích u pacientů s akutním koronárním. Abciximab se podává v infúzi a má poměrně dlouhý poločas tj.

8 až 16 hodin, a proto také po ukončení infúze se vrátí agregace destiček k 50 % původních hodnot až po 24 – 48 hodinách (Berny-Lang et al., 2013). Při intravenózním podání abciximabu se již v průběhu 30 minut váže 65 % abciximabu za přítomnosti  $Ca^{2+}$  na destičky (cirkulující i ve slezině). V dnešní době se jedná o neúčinnější protideštičkový přípravek. Abciximab je schopen blokovat i tvorbu mikroagregátů, tím že inhibuje další destičkový receptor pro vitronektin a dále receptor MAC-1 (CD11b/18) na aktivovaných leukocytech a monocytech. Inhibuje navíc i trombin, čímž má také antikoagulační účinek. Výhoda aplikace abciximabu byla prokázána u pacientů, u kterých byla provedena implantace koronárního stentu. Významně zvýšené riziko krvácivých komplikací bylo nalezeno u pacientů současně léčených heparinem ve vyšších dávkách (100 IU/kg). Přínosné bylo přidání abciximabu ke standardní duální antiagregaci u pacientů podstupujících elektivní perkutánní koronární intervenci pouze v případě výrazně zvýšeného rizika periprocedurálních komplikací (nestabilní plát, venózní štěp), u ostatních naopak zvýšené riziko krvácivých komplikací převyšovalo výhodu trojitě antitrombotické léčby (Queiroz et al., 2004). Nevýhodou tohoto přípravku je vyšší cena.

#### **2.3.3.2 Syntetické inhibitory - tzv. „malé molekuly“**

Dalšími dostupnými preparáty z této skupiny jsou eptifibatid a tirofiban (Berny-Lang et al., 2013). Eptifibatid byl izolován nejdříve z hadího jedu barbourinu chřestýše *Sistrurus barbowii* a v dnešní době je již vyráběn synteticky. Obě látky působí přes kompetitivní vazbu na receptor GP IIb/IIIa, takže po přerušení jejich aplikace dochází k obnově funkce trombocytů po přibližně 4 hodinách od aplikace. U těchto preparátů jsou k dispozici data o příznivém účinku zejména v kombinaci s klopidogrelem 600 mg u akutního koronárního syndromu před primární perkutánní koronární intervencí, avšak pouze pokud čas od zahájení léčby do provedení intervence přesahuje 2,5 hodiny. U pacientů s renální insuficiencí je nutno redukovat dávky obou preparátů. Podání antagonistů GP IIb/IIIa při konzervativní léčbě akutního koronárního syndromu není doporučováno.

Perorální syntetické inhibitory GP IIb/IIIa zatím v prevenci a léčbě arteriálních trombů selhaly. Některé z nich místo antiagregačního účinku naopak destičky aktivovaly. Do této kategorie řadíme následující přípravky orbofiban, xemilofiban, sibrafiban, lefradafiban, klerval, lotrafiban atd.



### 3. MONITOROVÁNÍ ANTIAGREGAČNÍ TERAPIE

V posledních letech probíhá vývoj nových laboratorních metod, které jsou využívány k monitoraci selhávání antiagregační čili protidestičkové terapie. Nejčastěji užívanou metodou pro vyšetření funkce krevních destiček je vyšetření jejich agregace. Pro monitorování účinku antiagregační terapie lze využít řadu dnes běžně užívaných laboratorních metod. Nejčastěji sledovaným antiagregačním lékem je již dříve zmiňovaná kyselina acetylsalicylová, která je bez pochyby nejstarším a nejužívanějším tradičním, finančně nenáročným lékem v primární i sekundární prevenci aterotrombotických cévních příhod. V dnešní době slouží stále jako tzv. „zlatý standard“ vyšetření agregace trombocytů v plazmě bohaté na trombocyty (PRP) pomocí optické transmisní agregometrie (Woo et al., 2010).

Membrána krevní destičky může obsahovat více receptorů pro jeden induktor. Typickým příkladem je ADP receptor, který má na membráně krevních destiček hned dva receptory tj. P2Y<sub>1</sub> a P2Y<sub>12</sub>. Pokud je agregační reakce indukována nízkou dávkou ADP, pak dochází k primární agregační vlně a obsazen je pouze receptor P2Y<sub>1</sub> a uvolní se Ca<sup>2+</sup>. Až při vyšších koncentracích ADP induktoru dojde k obsazení receptoru P2Y<sub>12</sub>, čímž dojde k sekundární agregační odpovědi a také se exprimuje a aktivuje velký počet glykoproteinových komplexů a tudíž dochází k sekreci obsahu granul a spouští se metabolismus kyseliny arachidonové.

#### 3.1 Optická transmisní agregometrie

V dnešní době slouží jako tzv. „zlatý standard“ vyšetření agregace krevních destiček v citrátové plazmě bohaté na krevní destičky (PRP) a chudé na krevní destičky (PPP) pomocí optické transmisní agregometrie (LTA) (Cattaneo, 2007). Analyzuje se změna průchodnosti světla, k níž dochází při vytváření agregátů krevních destiček. K monitorování protidestičkové terapie se využívá agregačního stanovení indukovaného, kdy se přidávají stimulační látky, kterou mohou vyvolat agregaci. Z agregační křivky bývá nejčastěji vyhodnocena maximální amplituda, která se vyjadřuje v procentech rozdílné propustnosti světla tzn. PRP - PPP. Dalšími možnými parametry k vyhodnocení může být rychlost nástupu agregační křivky či doba nutná k dosažení poloviny maximální amplitudy. Zástupce analyzátorů s LTA agregometrickým stanovením je AFACT 4004, který umožňuje až 4 souběžné reakce v jednom běhu. Limitujícím faktorem pro optickou transmisní agregometrii je počet destiček pod

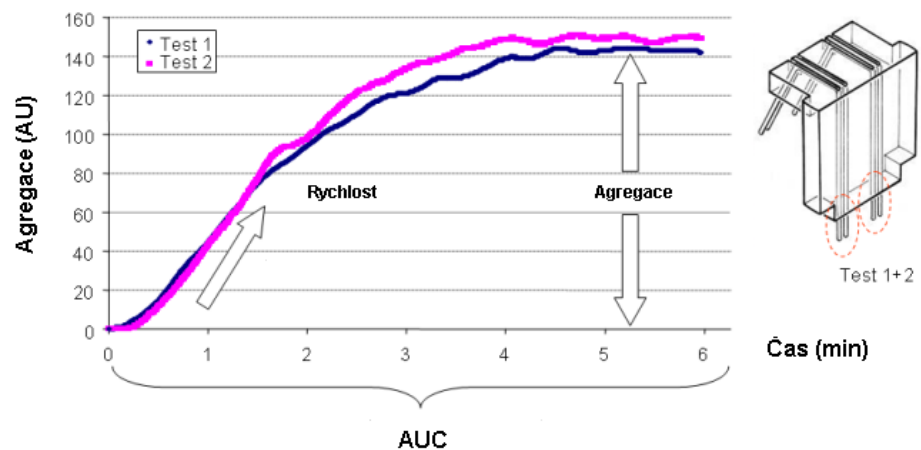
100x10<sup>9</sup>/l. Problematické a spíše neměřitelné se dají nazvat také vzorky s chylózní či hemolytickou plazmou.

Při podezření na aspirinovou rezistenci se jako specifický induktor využívá kyselina arachidonová. Literárně je jako další možný induktor popisován např. i kationický propylgalát (CPG), avšak není specifický (Zimmermann & Hohlfeld, 2008). Při podezření na thienopyridinovou rezistenci se jako specifický induktor využívá ADP a PGE<sub>1</sub>.

### 3.2 Impedanční agregometrie

Jednou z nových možností jak zjistit reziduální agregaci krevních destiček je použití vícekanálové impedanční agregometrie (MEA), která je prováděna z plně nesrážlivé krve (Mueller et al., 2007; Seyfert et al., 2007). Výhodou tohoto stanovení je jednoduchá příprava vzorku k analýze také díky odstranění centrifugačního kroku. Jedná se o měření elektrické impedance mezi dvěma elektrodami v nesrážlivé (nejlépe hirudinové) plné krvi. Speciálně vyrobená kyveta dále obsahuje magnetické míchadlo a dva páry elektrod potažených stříbrem. Registruje se změna impedance, která vzniká vlivem narůstání agregátů krevních destiček na dvou nezávislých elektrodách. Výsledkem je křivka, která zobrazuje závislost agregace destiček vyjádřenou v agregačních jednotkách (AU), na čase (min) (Weber et al., 2012). Jak je patmo na Obr. 11, tak z jednoho měřicího kanálu se získávají dvě agregační křivky, každá z jedné dvojice elektrod. Na trhu je dostupná široká škála induktorů jako je ADP, arachidonová kyselina, kolagen, peptid aktivující trombinový receptor (TRAP), prostaglandin E<sub>1</sub> aj. Z průměrných hodnot obou křivek patří mezi standardně hodnocené parametry:

- Plocha pod křivkou
- Maximální amplituda agregace
- Maximální sklon agregace



Obr. 11 Finální hodnocení MEA. Křivky vyjadřují závislost agregace krevních destiček (AU) na čase (min). Mezi základní zobrazené parametry patří: plocha pod křivkou (AUC), maximální sklon agregace (slope) a maximální amplituda agregace (upraveno dle <http://www.multiplate.net/en/parameter.php>).

Pro správnou analýzu je důležité dodržet preanalytickou fázi a v laboratoři zpracovat biologický materiál nejlépe do dvou hodin od samotného odběru a uchovávat jej při laboratorní teplotě (Lippi et al., 2012).

Analyzátor má možnost provést až pět analýz v jednom běhu. (Hanke et al., 2010).



Obr. 12 Multiplate® analyzer (upraveno dle <http://multiplate.net/en/leftinstrument.php>)

## 3.3 Další možnosti monitorace antiagregační léčby

Mezi další běžně dostupné technologie patří měření pomocí přístroje Verify Now, PFA 100, měření metabolitů kyseliny arachidonové (v séru nebo také v moči) či použití průtokové cytometrie např. pro stanovení thienopyridinové rezistence. V tomto případě lze užívat flow-cytometrii s vasodilatátor stimulačním fosfoprotein fosforylačním testem (VASP) (Blais et al., 2009).

### 3.3.1 Monitorování pomocí přístroje Verify Now

Měření pomocí přístroje Verify Now je založeno na principu optické agregometrie. Analýza probíhá ze zkumavky s nesrážlivou (hirudinovou či citrátovou) krví, propíchnutím aspirační jehlou. Součástí této analýzy je aktivace specifickými induktory (dle typu antiagregační léčby pacienta), jež aktivují destičky. Agregace je podpořena latexovými kuličkami, které jsou na svém povrchu pokryty fibrinogenem. Výhodou tohoto systému je rychlost analýzy a nenáročná obsluha přístroje (Paulu et al., 2013).

Přístroj umožňuje sledovat účinnost antiagregační léčby po podání ASA tzv. Aspirin test, který výsledek testu vyjadřuje v jednotkách ARU (Aspirin Reaction Units, jako induktor je použita kyselina arachidonová) a dále také po podání thienopyridinů, kde je výsledek vyjádřen v jednotkách PRU (P2Y<sub>12</sub>Reaction Units, jako induktor je použito ADP/PGE<sub>1</sub>). K monitorování léčby antagonisty GP IIb/IIIa se jako vhodný test používá iso-TRAP test. Výsledek stanovení se vyjadřuje v PAU jednotkách (Platelet Aggregation Units), které vyjadřují rychlost náběhu a intenzitu agregační odpovědi.

Tento test není vhodné používat u pacientů s vrozenými abnormalitami krevních destiček a také u pacientů se sníženou funkcí krevních destiček. Krev je nutno vyšetřit 0,5 – 4 hod od odběru krve.

### 3.3.2 Monitorování přístrojem PFA 100

Přístroj PFA 100 se skládá z měřicího přístroje a příslušných měřících modulů. PFA 100 monitoruje adhezi a agregaci trombocytů a pro tuto analýzu používá malé množství citrátové plné krve. Měřicí cartridge je na jedno použití a obsahuje zásobník na vzorek, kapiláru a biologicky aktivní membránu s otvorem uprostřed. Membrána je dodávána buď ve složení kolagen/ADP nebo kolagen/epinefrin (Karger et al., 2007). Při analýze prochází krev přes membránu, čímž je aktivována adheze a agregace a

následně je uzavřen otvor v membráně tj. čas uzavření (closure time - CT) (Golanski et al., 2013).

Pro monitorování antiagregační terapie ASA je vhodné použít modul kolagen/epinefrin a pro monitoring thienopyridinové rezistence modul ADP/kolagen, kde je membrána navíc pokryta ionty vápníku a prostaglandinem E1.

Limitující pro tento typ analýzy je počet destiček tj. pod  $100 \times 10^9/l$  a hodnota hematokritu pod 28%. Komplikace se mohou vyskytovat také u vzorků chylózních, ikterických či hemolytických. Také přítomnost vzduchových bublin nebo mikrotrombů může výrazně ovlivnit výsledky stanovení. Thienopyridinové deriváty není vhodné monitorovat při léčbě streptokinasou a dále teofylin interferuje v testech, pokud je v krvi v koncentraci vyšší než 5 mg/l.

### **3.3.3 Stanovení metabolitů cyklu kyseliny arachidonové**

Další možnou metodikou, která slouží pouze pro stanovení aspirinové rezistence, je detekce 11-dehydrotromboxanu  $B_2$  (v séru nebo moči) (Gremmel et al., 2013) – test je ale v porovnání s výše zmíněnými agregačními metodikami časově náročnější a může být ovlivněn výskytem tohoto metabolitu z mimodestičkových zdrojů. Tromboxan  $B_2$  ( $TXB_2$ ) je produktem neenzymatické přeměny  $TXA_2$ , který je za fyziologických podmínek vysoce nestabilní.

### **3.3.4 VASP**

Vyšetření fosforylace VASP (vasodilatator-stimulated phosphoprotein) proteinu vázaného v trombocytech na vlákna aktinu. Tato metodika však vyžaduje nákladnou aparaturu průtokové cytometrie. Principiálně se jedná o stanovení fosforylovaného VASP (VASP-P) s fluoresceinem značenou monoklonální protilátkou vůči VASP-P v oblasti Ser 239 (VASP-16C2). Tato fosforylace nastává po kaskádě nitrotrombocytárních kroků vyvolaných stykem destičky s vazodilatátorem – prostaglandinem E1 (prostacyklinem). Koncentrace VASP-P poté v destičce klesá po inhibici adenyl cyklasy a snížení cAMP vyvolané ADP. Vyšetření je stanovováno ve vzorcích krve pacienta léčeného clopidogrelem, k němuž je v prvním kroku přidán prostacyklin a ve druhém kroku ADP. Pokud byl při léčbě clopidogrelem blokován destičkový receptor pro ADP  $P2Y_{12}$ , k poklesu koncentrace zvýšeného VASP-P po přidání ADP nedochází a výsledné značení monoklonální protilátkou proti VASP-P je v těchto destičkách pozitivní (Bagoli et al., 2013).

Je již prokázáno, že výsledky stanovení účinnosti clopidogrelu pomocí VASP-P testu korelovaly s výší ischemických změn vyvolaných nedostatečnou účinností protidestičkové léčby u nemocných po provedené perkutánní koronární intervenci (Bonello et al., 2008). V takovém případě je vhodné podat místo clopidogrelu nový inhibitor ADP receptoru prasugrel, který má vyšší účinnost (Wiviott et al., 2007). Na stanovení slopidogrelové rezistence pomocí VASP může mít vliv dysfunkce endotelu se snížením syntézy NO, prostacyklinu, nebo hypercholesterolémie či hyperglykémie (Ang et al., 2008).

## 4. POLYMORFISMY RECEPTORŮ KREVNÍCH DESTIČEK

Monitorování účinnosti protidestičkové léčby se jeví klíčovým faktorem ve vyšetřování sekundární prevence IM, zejména u mladých pacientů v době příchodu nových léčebných možností. Vysoké procento selhání této terapie při léčbě kyselinou acetylsalicylovou resp. při léčbě thienopyridiny, ukazuje na závažnost tohoto problému. Zjišťování příčin selhání léčby je jedním z klíčových faktorů pro racionalizaci a personalizaci protidestičkové terapie, ale také pro další stratifikaci postupu zejména s ohledem na prevenci recidiv aterotrombotických příhod. V poslední době byla identifikována celá řada endogenních a exogenních příčin selhání protidestičkové terapie. Podíl jednotlivých endogenních a exogenních faktorů ovlivňujících selhání terapie se liší s ohledem na použitý protidestičkový lék, jeho metabolizaci a s ohledem na genetické predispozice pacienta.

S rizikem aterotrombogeneze jsou v dnešní době spojovány i polymorfismy genů receptorů povrchových glykoproteinů krevních destiček nebo jejich enzymů. Jedná se o polymorfismy receptoru pro fibrinogen – integrin GP III (HPA-1), receptoru pro ADP P2Y<sub>12</sub> (haplotyp H1/H2 a také 34C > T), receptoru pro trombin PAR-1 (IVS - 14A > T), enzymu cyklooxygenázy 1 (-842A > G), receptor pro kolagen GP Ia/IIa (807C > T) a také genu GP VI (13254T > C), jenž nesouvisí pouze s vyšším výskytem koronárních příhod, ale také s žilní trombózou (Kvasnička et al., 2008; Lepántalo et al. 2006). Klinický význam jednotlivých polymorfismů genů destičkových receptorů zatím je studován. U ADP receptoru P2Y<sub>12</sub> jsou známy čtyři polymorfismy (i-139C > T, i-744T > C, i-ins801A a 52G > T), které jsou ve vazebné nerovnováze a tvoří dva haplotypy, které jsou označovány jako H1 a H2. Alela H2 bývá označována jako možná

příčina vyššího rizika aterosklerozy. Zajímavý je výsledek studie GENDER, kdy u nemocných nesoucích běžnou alelu H1 po perkutánní koronární angioplastice a zavedení stentu byl zjištěn nižší výskyt restenóz. Polymorfismus enzymu cyklooxygenasy 1 zřejmě ovlivňuje odpověď destiček na léčbu kyselinou acetylsalicylovou.

## 4.1 Detekce polymorfismů destičkových receptorů

Správně vedená protideštičková léčba je jednou z hlavních možností, jak předejít vzniku nebo recidivě akutního koronárního syndromu. Protideštičková léčba má však svá úskalí. Jednou z možností neúčinnosti či selhání antiagregační léčby je genetický předpoklad tzn. polymorfismy destičkových receptorů. Pro jejich detekci je možno použít real-time PCR (RT PCR, PCR v reálném čase), která je moderní molekulárně genetická technika umožňující rychlou, efektivní a spolehlivou detekci včetně kvantifikace specifického úseku DNA popřípadě RNA. Real-time PCR existuje v různém uspořádání.

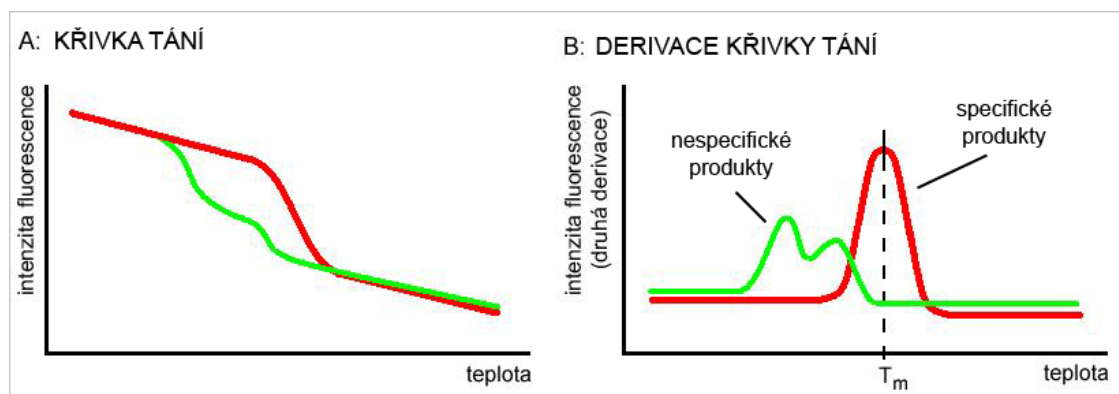
Alelové odlišení příslušných aminokyselin se stanovuje analýzou křivek tání po ukončení cyklů PCR reakce (Kroupis et al., 2009). Analýza křivek tání se používá k rozpoznání jednotlivých DNA produktů a genotypizaci. Na teplotu tání ( $T_m$ ) má vliv sekvence, délka vlákna a také obsah GC bazí. Při nevhodném párování bazí mezi dvěma vlákny DNA dochází ke snížení  $T_m$ . Tohoto jevu se využívá zejména při genotypizační analýze. U komplementárně navázaných prób je vidět vyšší  $T_m$  na rozdíl od prób nekomplementárních. Příčinou bývají jednobodové mutace. Teplota tání může být definována jako bod, kdy polovina molekul DNA taje nebo polovina prób disociuje z molekuly DNA. (přepřelováno podle návodu k přístroji LightCycler®480 - Operator's manual, Software verze 1.2, [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)).

Pro stanovení destičkového polymorfismu receptoru COX-1 (-842A > G) lze použít RT PCR v podobě HRM (vysokorozlišovací analýza křivek tání). HRM je metodika, která slouží k vyhodnocení povahy produktů RT PCR.

Pro zjištění destičkových polymorfismů P2Y<sub>12</sub> - C34T, P2Y<sub>12</sub> - T744C a GP1bA se využívá specifických sond a primerů a vyhodnocení je provedeno melting-curve genotyping.

Pro stanovení destičkového polymorfismu GP VI se ukazuje jako nejvhodnější asymetrické uspořádání s využitím hybridizačních sond a primerů. Výchozí

koncentrace jednoho primeru je dvojnásobně vyšší než koncentrace druhého primeru. DNA je syntetizována do doby než se jeden z primerů zcela vyčerpá. K vyhodnocení se používá stejně jako u předchozích destičkových polymorfismů melting-curve genotyping.



Obr. 13 Křivka tání DNA

Při vytváření heteroduplexů mají křivky tání odlišný tvar a po derivaci křivky tání lze produkty snadněji odlišit. (přepřacováno podle: <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>)

#### 4.1.1 Polymorfismy a aspirinová rezistence

Geneticky podmíněné příčiny selhání protideštičkové léčby aspirinem se rozděluje na změny v cytochromu P-450, kde probíhá utilizace ASA, a dále genetické změny destičkových receptorů. Utilizace ASA v cytochromu P-450 je již podrobně prozkoumána, proto je vlastní práce dále zaměřena na genetické změny destičkových receptorů, kde situace není zcela objasněna. Mezi geneticky podmíněné změny destičkových receptorů, které mohou způsobit rezistenci na ASA, patří polymorfismus destičkového receptoru COX-1 (Maree et al., 2005), GP IbA (Angiolillo et al., 2005) a GP VI (Lepantalo et al., 2006).

Již řada studií se snažila najít souvislost mezi aspirinovou rezistencí a polymorfismy v genu pro COX-1 (Goodman et al., 2007). Celkově je známo více než 30 studií, díky nimž bylo identifikováno 50 polymorfismů v 11 genech. Jednotlivé typy polymorfismu pro COX-1 jsou zobrazeny v Tab. 4 (Goodman et al., 2008). Řada těchto polymorfismů nebyla následně klinicky sledována a testována, což nás vedlo k výběru polymorfismu pro cyklooxygenasu -842A > G.

Tab. 4a Polymorfismy COX-1 genu, které mohou souviset s aspirinovou rezistencí



<b>Polymorfismus</b>	C22T	C50T/A842G	G128A	C644A	C714A	C10427A	G1446A
<b>Počet studií</b>	6	8	2	4	4	2	2

#### 4.1.2 Polymorfismy a thienopyridonová rezistence

Klopidogrel je proléčivo s nízkou konverzí na aktivní metabolit, většina klopidogrelu je degradována esterasami a jen 10–15 % je oxidázami CYP (cytochrom P) biotransformováno na účinný metabolit. Při jakémkoli snížení aktivity řetězce izoenzymů (CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4 aj.) podíl látky degradované esterasami stoupá a výsledná koncentrace aktivní látky klesá pod terapeutickou hladinu. V běžné praxi je právě tohle snížení aktivity časté, třetinu nemocných tvoří geneticky pomalí metabolizátoři na úrovni CYP2C19. Další možností je blokáda přeměny vedoucí k lékové interakci s inhibitory zúčastněných izoenzymů. Mezi nejdůležitější typ inhibice CYP2C19 patří léčba omeprazolem (inhibitory protonové pumpy), který je často používán k prevenci krvácení do trávicího traktu u pacientů léčených protideštičkovými léky (Simon et al., 2009; Siller-Matula et al., 2009). Prasugrel je také proléčivem s nutností přeměny, avšak nepodléhá inaktivaci esterasami a polymorfismus izoenzymů CYP či jejich inhibice pouze zpomalí biotransformaci, ale nedojde k degradaci na neúčinné metabolity. V játrech je prasugrel metabolizován řadou izoenzymů, jako je CYP3A, CYP2B6 a v menší míře i CYP2C9 a CYP2C19, na aktivní metabolit (R-138727).

Již řada studií se snažila najít souvislost mezi thienopyridinovou rezistencí a polymorfismy v destičkovém receptoru P2Y<sub>12</sub>. Mezi geneticky podmíněné změny destičkových receptorů, které mohou způsobit rezistenci na thienopyridiny, patří polymorfismus destičkového receptoru P2Y<sub>12</sub> - C34T, P2Y<sub>12</sub> - T744C (Kvasnička et al., 2008) a GP IbA (Angiolillo et al., 2005) a GP VI (Lepantalo et al., 2006). Jak již bylo zmíněno výše – vznik aktivních metabolitů klopidogrelu je ovlivněn celou řadou jednotlivých nukleotidových polymorfismů (SNP).

Tab. 4b Polymorfismy ADP receptorů, které mohou souviset s klopidogrelou rezistencí (Geisler et al., 2013)

<b>Polymorfismus</b>	G190C	C893T	A1622G	C145T	T742C	T1209C	C234T	G52T
<b>Frekvence výskytu minoritní alely</b>	0,15	0,02	0,15	0,17	0,17	0,33	0,17	0,02

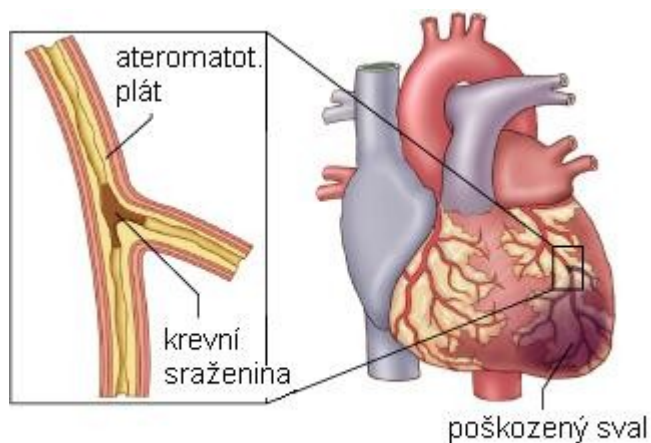
## **5. ANTIAGREGAČNÍ LÉČBA V SEKUNDÁRNÍ PREVENCI INFARKTU MYOKARDU A PŘÍČINY JEJÍHO SELHÁNÍ**

Akutní infarkt myokardu (AIM) jako hlavní projev akutního koronárního syndromu je ve vyspělých zemích včetně České republiky stále jednou z hlavních příčin morbidity a mortality. AIM je nejzávažnější formou ischemické choroby srdeční (ICHS). Většina onemocnění srdečně cévního systému, s výjimkou vrozených vad, se vyskytuje spíše v dospělém věku. Infarkt myokardu je akutní ložisková ischemická nekróza srdečního svalu vznikající na základě náhlého uzavření či progresivního extrémního zúžení věnčité/věnčitých tepny/tepen zásobující příslušnou oblast. Ve více než 95% je příčinou koronární ateroskleróza s rupturou intimy a trombózou v místě plátu. V současné době stále vzrůstá počet informací o příčinách a patogenetických mechanismech velmi časně manifestace ICHS ve formě akutního infarktu myokardu v mladém věku - u mužů ve věku 18-45 let a u žen 18-55 let. AIM u mladých nemocných má incidenci 8-9 krát nižší než u starších osob a reprezentuje pouze 2-6 % všech nemocných s AIM. Tato skupina mladších nemocných je v řadě aspektů odlišná od nemocných, kteří prodělali svůj první AIM až ve věku nad 60 let. Z doposud publikovaných studií je známo, že nemocniční mortalita mladších nemocných s AIM se pohybuje mezi 2,9 - 5 % versus nemocniční mortalita starších nemocných s AIM, která se pohybuje okolo 20 %.

Česká republika má velmi dobře propracovaný systém kardiovaskulární péče. V rámci celé republiky je rozprostřeno celkem 21 kardiovaskulárních center, která zajišťují péči o nemocné s AIM. Při diagnostice AIM je nutné pacienty dostat co nejdříve do katetrizační laboratoře, kde je poskytnuta moderní léčba – zprůchodnění uzavřené věnčité tepny tzv. přímou angioplastikou. Tato terapie je vysoce účinná, avšak musí být poskytnuta včas tj. do 12 hod. Schematické znázornění infarktu myokardu shrnuje Obr. 14.

Klíčovou součástí sekundární prevence infarktu myokardu je duální protidestičková léčba kyselinou acetylosalicylovou (ASA) a thienopyridinovými deriváty. Tato léčba však může selhávat u 5 – 30 % pacientů z důvodu rezistence na

protidestičkové léky (Cuisset et al., 2009). Nejprve byl tento fenomén popsán při podávání kyseliny acetylsalicylové a následně u thienopyridinů. Příčiny rezistencí jsou multifaktoriální a jejich laboratorní stanovení využívá více možných detekčních způsobů.



Obr. 14 Schematické znázornění infarktu myokardu (upraveno dle <http://www.mdguidelines.com/myocardial-infarction-acute>)

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6. MATERIÁL A PŘÍSTOJOVÁ TECHNIKA

## 6.1 Přístrojové vybavení

- Agregometr APACT 4004 (LABiTec, Ahrensburg, Německo).
- Agregometr Multiplate<sup>®</sup> analyzer (Dynabyte, Mnichov, Německo)
- LightCycler 480 instrument<sup>™</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
- Destičky LightCycler<sup>®</sup> 480 Multiwell Plate (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
- Centrifuga MEGAFUGE 1.0 R (Heraeus)
- Centrifuga BIOFUGE 22R (Heraeus)
- Stolní centrifuga 5424 (Eppendorf)
- Stolní mikrocentrifugy Spectrafuge Mini (Labnet International, Inc.)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies)
- Automatické pipety 0,1–1 µl, 10 µl; 20-100 µl; 200 µl; 100-1000 µl (Eppendorf AG, Hamburk, Německo)
- Zkumavky VACUETTE (Greiner Bio-One, Rakousko)
- Laboratorní plasty a sklo
- Ledničky (4–8 °C) a mrazicí boxy (pod -20 °C, pod -80 °C)
- Vortex REAX Control (Heidolph)
- Biologický termostat BT 120 (LAB systém)

## 6.2 Biologický materiál

- DNA izolovaná z periferní krve pacientů
- nesrážlivá krev s přídavkem citrátu sodného (0,109 mol/l tj. 3,2 %)
- nesrážlivá krev s přídavkem hirudinu (15 IU/ml)

## 6.3 Reagencie – pracovní roztoky

- Gentra puregene blood kit (Qiagen, Minneapolis, USA)
  - RBC lysis solution
  - Cell lysis solution
  - Protein precipitation solution
  - DNA hydration solution
- LightCycler 480 Genotyping Master<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
- Roztok MgCl<sub>2</sub>, 25 mM

- Tris pufr 10 mM, pH 8
- Arachidonová kyselina (Dynabyte, Mnichov, Německo)
- ADP (Helena Laboratories, Texas, USA)
- Prostaglandin (Dynabyte, Mnichov, Německo)
- Acetylsalicylová kyselina (Acylpyrin 100: Herbacos-bofarma s.r.o., Pardubice, ČR)
- Fyziologický roztok NaCl 0,9%
- 70% ethanol
- 100% isopropanol
- Methanol
- LightCycler 480 Genotyping Master<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
  - MasterMix – FastStartTaqDNAPolymerase, reakční pufr, dNTPmix (s UTP náhradou za dTTP) a HighResolutionMelting
  - roztok MgCl<sub>2</sub>, 25 mM
  - tris pufr 10 mM, pH 8
  - Primery a sondy jsou uvedeny v Tab. 5
- DNA diluent

## **6.4 Preanalytická kritéria – odběr, transport a zpracování biologického materiálu před vyšetřením**

Dodržení preanalytické fáze je velmi důležité pro správnou interpretaci získaných výsledků. Hodnoty výsledků mohou být ovlivněny vlastním odběrem, transportem materiálu do laboratoře, přípravou a zpracováním biologického materiálu před vyšetřením. Na preanalytickou fázi má také vliv přístup personálu (dodržování metodických postupů, správné pracovní návyky, kalibrace přístrojů aj.). Jednotlivé části preanalytického procesu mají následně vliv na variabilitu výsledků.

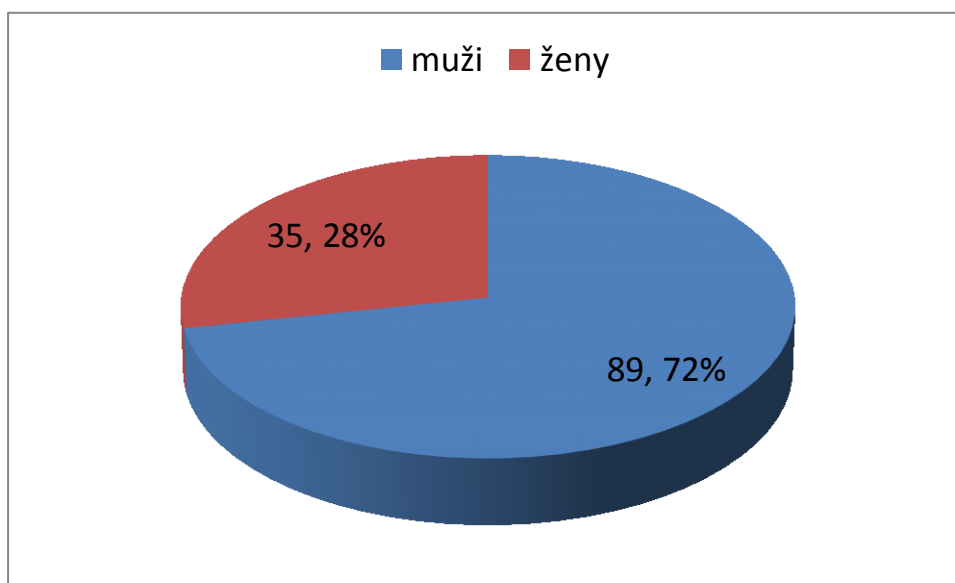
K odběru krevních vzorků byly použity odběrové zkumavky a také jehly VACUETTE<sup>®</sup> (Greiner Bio-One, Rakousko). Odběrové zkumavky VACUETTE<sup>®</sup> pro vyšetření optické transmisní agregometrie a dále také pro izolaci DNA obsahovaly pufrovaný roztok citrátu sodného, jehož koncentrace byla 0,109 mol/l (3,2 %), který vyvazuje vápenaté ionty a chrání labilní prokoagulační faktory. Pro stanovení impedanční agregometrie byly použity zkumavky stejné firmy se stejnou technikou

náběru a jako antikoagulant byl použit hirudin (15 IU/ml), který je přímým inhibitorem trombinu a nevyvazuje vápenaté ionty.

Každý odebraný vzorek byl ihned šetrně promíchán a co nejrychleji transportován do laboratoře. Všechny vzorky byly zpracovány do 2 hodin po odběru.

## 6.5 Sledovaný soubor pacientů

Byl vyšetřen soubor 124 rizikových pacientů (89 mužů a 35 žen) s akutním infarktem myokardu (AIM) viz. Obr. 15. Všichni pacienti byli vyšetřeni po minimálně sedmi dnech od stanovení diagnózy AIM a tudíž také od nasazení duální protidestičkové léčby 100 mg ASA a 75 mg clopidogrelu denně. Monitorování protidestičkové léčby bylo provedeno pomocí optické transmisní agregometrie na analyzátoru AFACT 4004 v citrátové plazmě bohaté na trombocyty a souběžně také pomocí impedanční agregometrie na analyzátoru Multiplate v plné hirudinové krvi. Průměrný věk skupiny nemocných byl 51 let a medián byl 48 let. Věkové rozmezí námi sledovaných pacientů se pohybovalo od 19 do 83 let.



Obr. 15 Sledovaný soubor pacientů s AIM. Z grafu je patrná převaha mužů (72 %) nad ženami (28 %).

## 6.6 Optická transmisní agregometrie

Stanovení bylo provedeno měřením agregace krevních destiček, v plazmě bohaté na krevní destičky (PRP) (Linnemann et al., 2008), pomocí turbidimetrické metody na analyzátoru AFACT 4004 (LABiTec, Ahrensburg, Německo). Stanovení bylo zahájeno centrifugací při 150 g po dobu 10 minut a při pokojové teplotě, čímž byla

získána plazma bohatá na destičky (PRP) resp. centrifugace při 2000 g po dobu 10 minut opět při pokojové teplotě pro získání plazmy chudé na destičky (PPP) (Cattaneo, 2007). Výsledný počet destiček pro optickou transmisní analýzu byl upraven na  $250 \times 10^{12}/l$  (rozmezí 221-282  $\times 10^{12}/l$ ).

Jako specifický induktor pro stanovení aspirinové rezistence (Cuisset et al, 2009) byla použita kyselina arachidonová (Helena Biosciences, UK) v koncentraci 1  $\mu\text{mol}/l$ . Pro stanovení nedostatečného účinku terapie bylo použito u optické transmisní agregometrie indukované arachidonovou kyselinou cut-off 25 % (Slavik et al. 2011; Ulehlova et al. 2011).

Pro detekci thienopyridinové rezistence (Gurbel & Tandry, 2007) byla stimulace agregace indukována ADP s prostaglandinem E1 v koncentraci 10  $\mu\text{mol}/l$ . Finální koncentrace  $\text{PGE}_1$  byla 9,4  $\text{nmol}/l$ . Pro stanovení nedostatečného účinku terapie bylo použito u optické transmisní agregometrie indukované ADP s  $\text{PGE}_1$  cut-off 45 % (Slavik et al. 2011; Ulehlova et al. 2011).

Pacienti, kteří mají nižší hodnoty agregace než stanovené cut-off, odpovídají adekvátně na protideštičkovou léčbu. Zatímco u pacientů, jejichž hodnota agregace je vyšší než stanovené cut-off, lze předpokládat laboratorní neúčinnost podávání protideštičkové léčby.

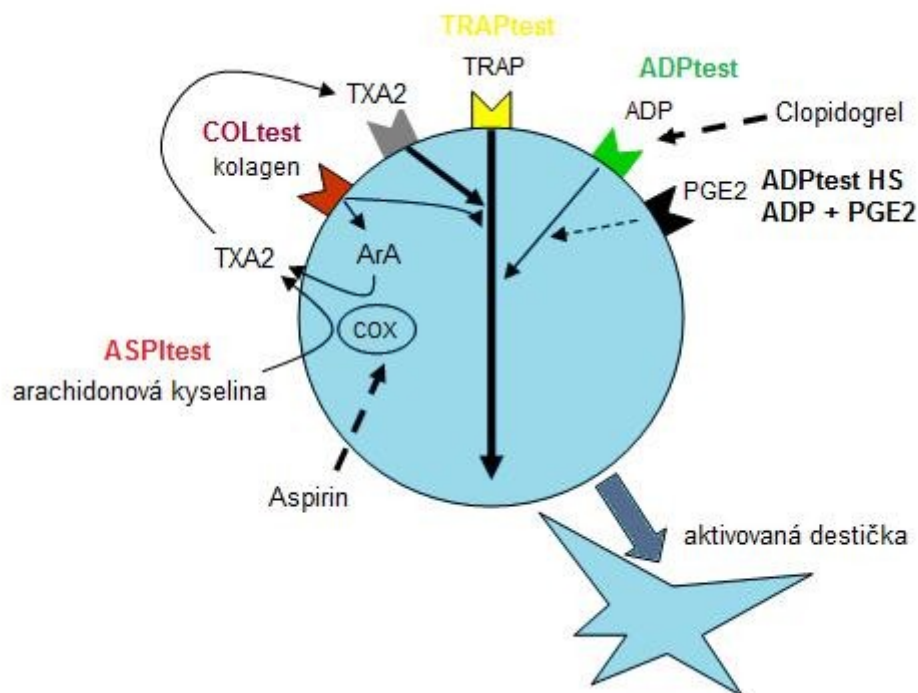
## 6.7 Impedanční agregometrie

Agregace krevních destiček touto metodou byla měřena v plné nesrážlivé hirudinové krvi pomocí impedanční metody na analyzátoru Multiplate (Dynabyte, Mnichov, Německo). Spolehlivost testu je dána dvojicí nezávislých senzorů složených ze dvou párů elektrod potažených stříbrem, čímž jsou získány dva výstupy (křivky) (Breugelmans et al., 2008; Penz et al., 2010). Jednotlivé křivky ukazují závislost agregace trombocytů, která je vyjádřena v agregačních jednotkách (AU) za čas (min). Mechanismus aktivace krevní destičky pomocí běžně dostupných induktorů je shmut na Obr. 16. Tato impedanční agregometrie umožňuje sledovat následující parametry:

- plocha pod křivkou AUC (AU/min)
- maximální amplituda agregace (AU)
- maximální sklon agregace (AU/min)

Reakce byla zahájena naředěním hirudinové plné krve fyziologických roztokem (0,9% NaCl) v poměru 1:2. Tato směs byla temperována za míchání v měřící kyvetě po dobu 3 min na konstantní teplotu 37°C (Mueller et al. 2007; Seyfert et al. 2007). Agregační reakce, tzv. ASPItest, byla zahájena přidáním kyseliny arachidonové, pro stanovení aspirinové rezistence, ve finální koncentraci 15 mM jako induktoru. Pro

detekci thienopyridinové rezistence bylo použito specifické kombinace induktoru ADP s PGE<sub>1</sub> v koncentraci 10 µmol/l tzv. ADPtest HS. Finální koncentrace PGE<sub>1</sub> byla 9,4 nmol/l (Calatzis et al., 2004). Residuální agregace krevních destiček byla monitorována v podobě zvyšující se impedance a vyjádřena v agregačních jednotkách za čas tj. AUC/min s cut-off u ASPI testu v rozmezí 200 AUC/min resp. u ADPHS testu 298 AUC/min (Slavik et al. 2011; Ulehlova et al. 2011).



Obr. 16 Mechanismus aktivace krevní destičky běžně dostupnými induktory (přepracováno podle: <http://www.multiplate.net/en/testresult.php>)

## 6.8 In vitro testování citlivosti krevních destiček pacientů na ASA

Pro in vitro testování odezvy pacientů na ASA jsou vybráni pacienti, kteří mají laboratorně prokázanou aspirinovou rezistenci pomocí agregačních funkčních testů. Vzorky plné citrátové krve těchto pacientů jsou dále inkubovány s kyselinou acetylsalicylovou, která je naředěna fyziologickým roztokem. Koncentrační řada přichystaných roztoků ASA je pipetována v dávkách, které odpovídají denní dávce 0 – 500 mg ASA. U každého pozitivního pacienta je znázorněna celá škála koncentrací ASA tj. 0; 6,25; 12,5; 50; 100; 250 a také 500 mg viz. Obr. 25. Délka inkubace plné citrátové krve pacienta a roztoku ASA je po vortexování 5 minut. Následně je provedena impedanční agregometrie s přidáním kyseliny arachidonové jako induktoru.



Díky této metodě může být vyloučena porucha destičkového receptoru, čímž lze zjistit compliance pacienta (zda pacient lék užívá a také s jakou pravidelností) eventuálně odhalit defekt způsobený špatným vstřebáváním.

## **6.9 Genotypizace**

### **6.9.1 Izolace DNA z leukocytů periferní krve**

DNA byla izolována z leukocytů periferní krve (pufrovaný citrát sodný byl použit v odběrové zkumavce jako protisrážlivé činidlo) pomocí Gentra puregene blood kit (Qiagen, Minneapolis, USA) dle standardizovaného postupu daného výrobcem.

Nejprve byly lyzovány erythrocyty pomocí RBC lysis solution (300 µl plné citrátové krve + 900 µl RBC lyzačního roztoku). Následovala inkubace 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl vzorek centrifugován při laboratorní teplotě po dobu 3 minut a při 10000 rpm. Po centrifugaci byl opatrně odebrán supernatant a byla provedena lýze buněk (+300 µl Cell lyzačního roztoku + promíchání + 1 min na ledu). Ke směsi bylo přidáno 100 µl Protein precipitačního roztoku, které bylo následováno vortexováním a centrifugací za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Vzniklý supernatant byl napipetován do čisté ependorfy s přidavkem 300 µl isopropanolu. Poté byl vzorek promíchán a centrifugován (10000 rpm/laboratorní teplota/3 min). Supernatant byl rychle odstraněn a následoval konečný proplach pomocí 300 µl 70% etanolu a také centrifugace (10000 rpm/laboratorní teplota/3 min). Supernatant byl opět rychle odstraněn a vzorek DNA byl vysušen při laboratorní teplotě. Po vysušení vzorku byla DNA rozpuštěna v 50 µl DNA hydration solution.

### **6.9.2 Stanovení koncentrace DNA**

Stanovení koncentrace DNA bylo provedeno na přístroji Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Pro naši analýzu byl použit modul určený pro nukleové kyseliny (DNA/RNA modul). Samotná analýza pracuje s 2 µl DNA vzorku pacientů. Naměřené hodnoty byly použity pro výpočet ředění DNA na konečnou koncentraci 6 ng/µl popřípadě 25 ng/µl.

### **6.9.3 Real-time PCR - optimalizace**

Vzorky DNA byly naředěny na požadovanou koncentraci tj. 6 ng/µl pro stanovení COX1\_A1 a pro další polymorfismy destičkových receptorů uvedených

v Tab. 5 byla požadována koncentrace 25 ng/μl. Genotypizace všech výše zmíněných destičkových polymorfismů byla stanovena pomocí analyzátoru LightCycler 480 instrument™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) s využitím specifických primerů a sond LightCycler 480 Genotyping Master® (TIB MOLBIOL GmbH, Německo).

Stanovení bylo provedeno pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase s analýzou křivek tání fluorescenčních sond, která je založena na poklesu fluorescence při uvolnění fluorescenční sondy z PCR produktu. Výhodou této metody je možnost detekce přímo v PCR zkumavce tzn. ihned po amplifikaci, bez nutnosti otevírat reakční zkumavku, což snižuje potřebu manipulace se vzorkem a také riziko kontaminace. Samotná analýza trvá pouze několik minut a je časově úsporná. Fluorescenční signál je snímán ze všech jamek zároveň, což přispívá k uniformitě dat v rámci celé destičky. Díky unikátnímu teplotnímu bloku se tato analýza vyznačuje perfektní teplotní homogenitou a reprodukovatelností jednotlivých analýz.

Princip metody spočívá v amplifikaci úseku pacientovy DNA obsahující hledaný polymorfismus. Tato amplifikace je sledována v reálném čase. Reakční směs pro PCR obsahuje mimo obvyklých komponentů i 2 fluorescenční sondy. Jedna ze sond leží přímo v místě polymorfismu, druhá v blízkosti konce první sondy. Sondy jsou na koncích přiléhajících k sobě značeny odlišnými fluorescenčními barvami. Při excitaci jednoho fluoroforu dochází k rezonančnímu přenosu energie na druhý fluorofor, jehož záření detekujeme. Po amplifikaci je teplota snížena na úroveň, při níž nasedají obě sondy a produkují fluorescenční signál. Při postupném zahřívání dojde k uvolnění sondy specifické pro polymorfismus a k poklesu fluorescence. V případě, že DNA obsahuje variantu odlišnou od sekvence sondy, není tato sonda plně komplementární a dojde k jejímu uvolnění při nižší teplotě, než při úplné komplementaritě. Toto je možné měřit jako rozdílné vrcholy fluorescence na teplotní ose. V případě, že má pacient obě alely s jinou než standardní variantou, dojde k poklesu fluorescence například pouze při nižší teplotě. V případě obou wild type alel, dojde k poklesu až při teplotě vyšší. Heterozygot bude mít dva vrcholy při rozdílných teplotách. Sekvence použitých primerů a sond jsou uvedeny v Tab 5.

Dá se říci obecně, že nežádoucím jevem analýz destičkových polymorfismů je opakované rozmrazování sond a primerů. Pro optimalizaci těchto metodik byl zvolen postup, při kterém proběhla alikvotace sond i primerů uvedených v Tab. 5.

Tab. 5 Názvy a sekvence použitých primerů a sond

Název genu	SNP	Identifik. SNP	Oligonukleotidy

P2RY <sub>12</sub>	i-T744C	rs2046934	5'ATTTATCTAAATATCTTTTACACgAA 5'AAATAAAATATAggtTATTACCACA 5'AAAAGATTACAAACgTCATTTCAA--FL 5'LC640-TTCCCAAgATgTAgATgCCATATAgCA--PH
P2RY <sub>12</sub>	C34T	rs6785930	5'AAgTTACACACAgAgATAACAgC 5'gAAgATCAgAAATgACTgTgTTC 5'CgCAgAggTgAgATTgTCg--FL 5'LC640-CggCTTgCATTCTTgTTggTTACCTAgAg--PH
COX1_A1	-A842G	rs10306114	5'CCTTCCgATAACTgAgAACCT 5'TTTCTAgCCCTCAgTATTCTCAT 5'CAATgAgggAATgCACACAAATCTCCTgg--FL 5'LC640-gCAgTgCCCAGCATgTAg--PH
GP1bA	-5T>C	rs2243093	5'gCAgggggATCCACTCAA 5'ggTTgTgTCTTTcggCAgg 5'CCACAggCCCTCATgCCTC--FL 5'CCTCCTCTTgCTgCTCCTgCTgCC--PH
GP6	T13254C	rs1613662	5'CAAATCTgTgAAAgAACCAACT 5'gATTTCCCAggAACCTCTgT 5'gCACCAgAATggACCCTgCAgAACCT--FL 5'LC640-CCTgCTACCgAggAAggTgg--PH

### 6.9.3.1 COX-1 A842G, rs10306114

Analýza DNA byla provedena pomocí HRM, která používá klasické PCR reagentie a fluorescenční interkalační barvivo (ResoLight), jež se navazuje přímo na dvouvláknovou DNA. Pacienti s normálním genotypem a homozygoti se příliš neliší v množství uvolněného interkalačního barviva a lze je odlišit podle jejich teploty tání. Avšak vyšší obsah barviva mají heterozygoti, kteří tvoří heteroduplexy. Díky tomu heterozygoti dávají odlišnou křivku tání a jsou lépe rozlišeni než homozygoti (Pecka, 2010). Výsledná data měření byla vyhodnocena s použitím LightCycler 480 Gene Scanning Software.

První stanovení neprokázala dostatečnou schopnost odlišení homozygotního typu mutace a pacientů s normálním genotypem, proto bylo potřeba využít metodu rozšířenou o tzv. spikování vzorků. Princip spočívá v přidání určitého množství wild type DNA do všech vzorků. Díky tomu dojde k prokazatelnému odlišení homozygotů od wild type genotypu. Pro vyšší robustnost spikování byla do všech vzorků přidávána wild type DNA v poměru 1:1. Měření probíhalo vždy dvoukolově. V prvním kole bez přidání wild type DNA, kdy bylo možné jasně identifikovat heterozygoty (Obr. 17). V

druhém kole bylo provedeno spikování s přidavkem wild type DNA v poměru 1:1. Tím došlo k prokazatelnému odlišení homozygotů (Obr. 18).

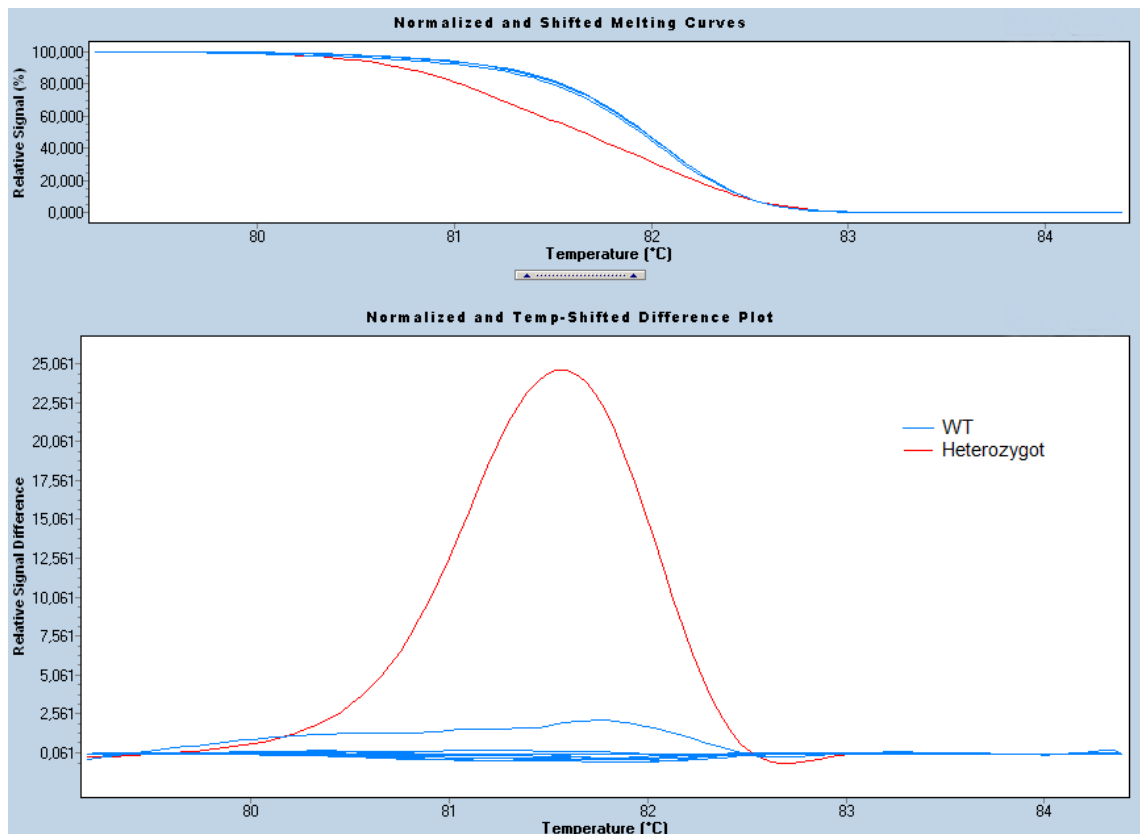
Primery byly připraveny naředěním na koncentraci 2  $\mu\text{M}$  každý. Z takto předpřipravených primerů byl nachytán pracovní roztok, kde bylo napipetováno 4  $\mu\text{l}$  primeru F, dále 4  $\mu\text{l}$  primeru R a také 92  $\mu\text{l}$  Minimal buffer (10 mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA). Rozpis pro přípravu mixu je zaznamenán v Tab. 6 a nastavení konkrétní analýzy je popsán v Tab. 7.

Tab. 6 Příprava mixu na reakci v objemu 10  $\mu\text{l}$  - COX-1, rs10306114

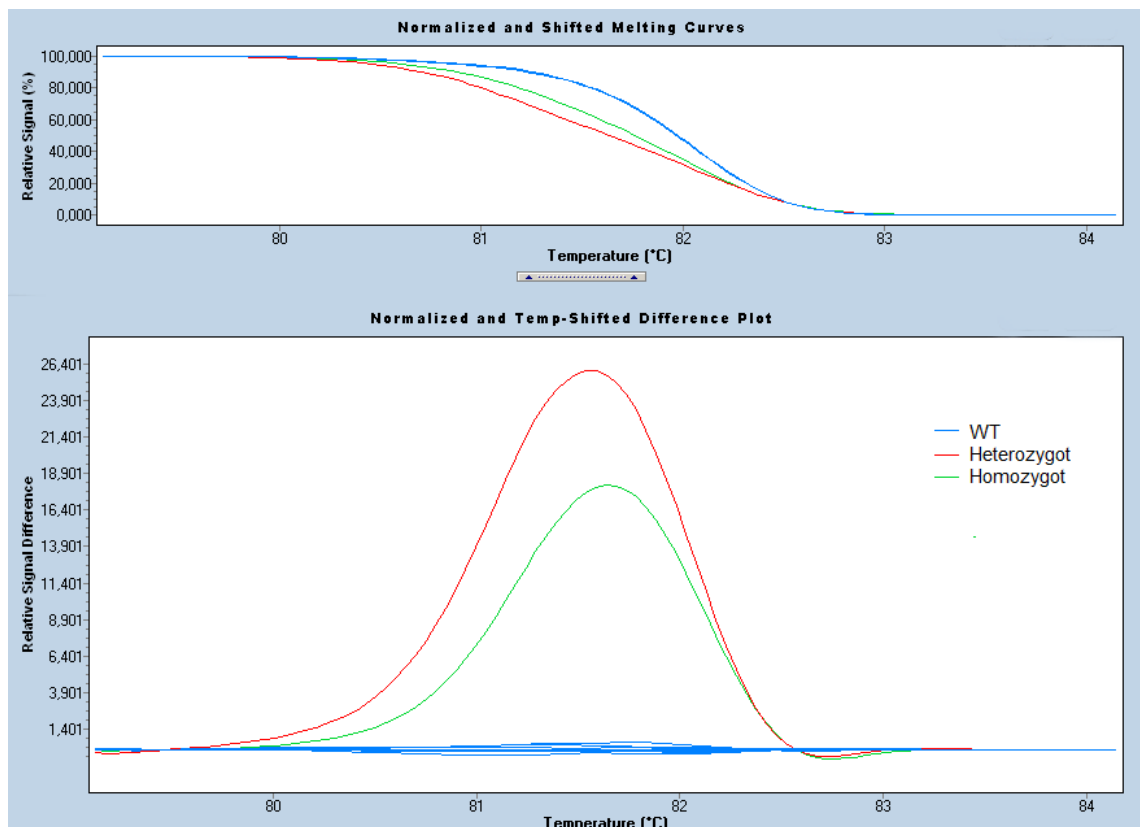
<b>Položka reakční směsi</b>	<b>Množství roztoku na 1 reakci (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
PCR voda	1,6
MgCl <sub>2</sub>	1,4
Primery (F+R)	1
HRM Master MIX	5
Celkem reakční směsi	9
DNA pacineta	1 (event. při spikování 0,5+0,5)

Tab. 7 Nastavení LightCycler 480 instrument pro genotypizaci polymorfismu COX-1, rs10306114

<b>Název programu</b>	<b>Cyklus</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas</b>	<b>Rychlost (°C/s)</b>
Počáteční denaturace	1	95	10 min	4,40
PCR amplifikace	45	95	10 s	4,40
	45	60	10 s	2,20
	45	72	15 s	4,40
HRM	1	95	1 min	4,40
	1	40	1 min	2,20
	1	70	1 s	4,40
	1	95		0,02
Chlazení	1	40	10 s	2,20



Obr. 17 Graf křivky tání pro COX-1, rs10306114 bez použití metody spikování vzorku. Jasně lze identifikovat pacienty s heterozygotní mutací COX-1.



Obr. 18 Graf křivek tání pro COX-1, rs10306114 s použitím metody spikování vzorků. Z obrázku je patrné, že lze snadno odlišit i pacienty s homozygotní mutací COX-1.

### 6.9.3.2 P2Y<sub>12</sub> C34T, rs6785930

U ADP receptoru P2Y<sub>12</sub> je známo více polymorfismů, které jsou ve vazebné nerovnováze a tvoří dva holotypy, které jsou označovány jako H1 a H2. Zejména alela H2 bývá označována jako možná příčina vyššího rizika aterosklerozy.

Primery byly připraveny naředěním na koncentraci 5 μM každý. Z takto předpřipravených primerů byl nachytán pracovní roztok, kde bylo napipetováno 5 μl primeru F, dále 5 μl primeru R a také 90 μl Minimal buffer (10 mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA).

Pro stavení výše zmíněného destičkového polymorfismu byly připraveny také pracovní roztoky pro sondy, které byly naředěny na koncentraci 4 μM každá. Napipetováno bylo vždy 4 μl sondy do 16 μl Minimal buffer (10 mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA). Rozpis pro přípravu mixu je zaznamenán v Tab. 8 a nastavení konkrétní analýzy je popsán v Tab. 9. Výstup z analýzy křivek tání je následně shrnut na Obr. 19.

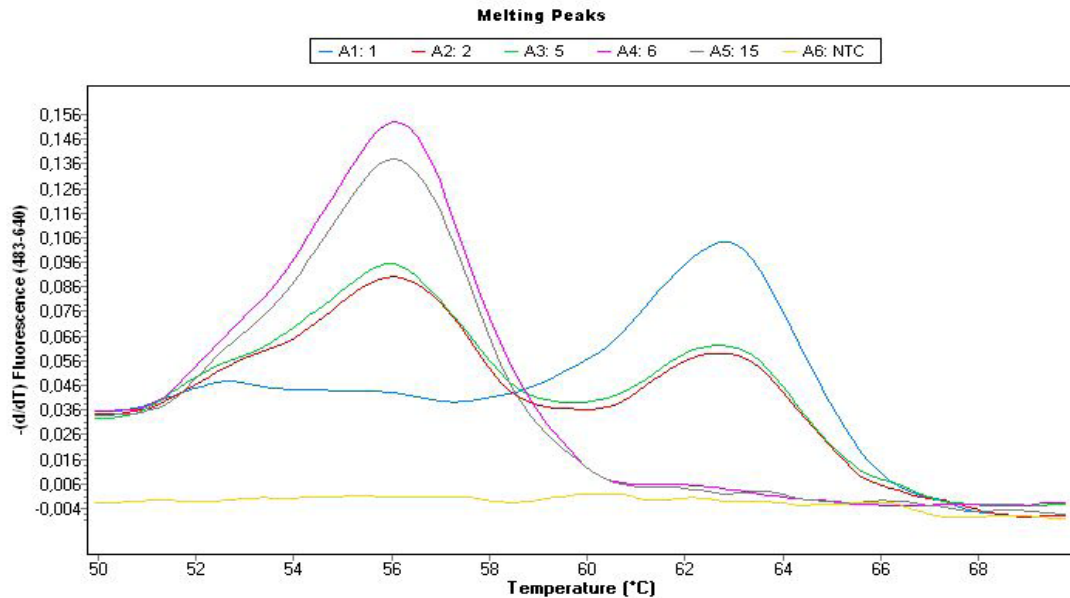
Tab. 8 Příprava mixu na reakci v objemu 20 μl - P2Y<sub>12</sub> C34T, rs6785930

Položka reakční směsi	Množství roztoku na 1 reakci (μl)
PCR voda	10
Sondy (LC460+FL)	1+1
Primery (F+R)	2
GT Master MIX	4
Celkem reakční směsi	18
DNA pacienta	2

Tab. 9 Nastavení LightCycler 480 instrument pro genotypizaci polymorfismu P2Y<sub>12</sub> C34T, rs6785930

Název programu	Cyklus	Teplota (°C)	Čas	Rychlost (°C/s)
Počáteční denaturace	1	95	10 min	4,40
	40	95	10 s	4,40
	40	60	10 s	2,20
PCR amplifikace	40	72	15 s	4,40
	1	95	1 min	4,40
Melting				

	1	48	1 min	1,50
	1	70		0,11
Chlazení	1	40	10 s	1,50



Obr. 19 Graf křivek tání pro P2Y<sub>12</sub> C34T, rs6785930 – k vyhodnocení byla použita metoda genotyping s následujícími teplotami tání jednotlivých mutantních stavů: wt ~ 56 °C; homo ~ 63 °C; hetero – oba peaky

### 6.9.3.3 P2Y<sub>12</sub> T744C, rs2046934

Gen pro P2Y<sub>12</sub> a jeho polymorfismus T744C nacházející se v intronu bývá spojován s ischemickou chorobou srdeční včetně akutního infarktu myokardu (Zee et al., 2008).

Primery byly připraveny naředěním na koncentraci 5 μM každý. Z takto předpřipravených primerů byly nachytány dva pracovní roztoky. Do prvního pracovního roztoku bylo napipetováno 5 μl primeru F a dále 45 μl Minimal buffer (10 mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA). Druhý roztok byl připraven smícháním 5 μl primeru R opět s 45 μl Minimal buffer (10 mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA).

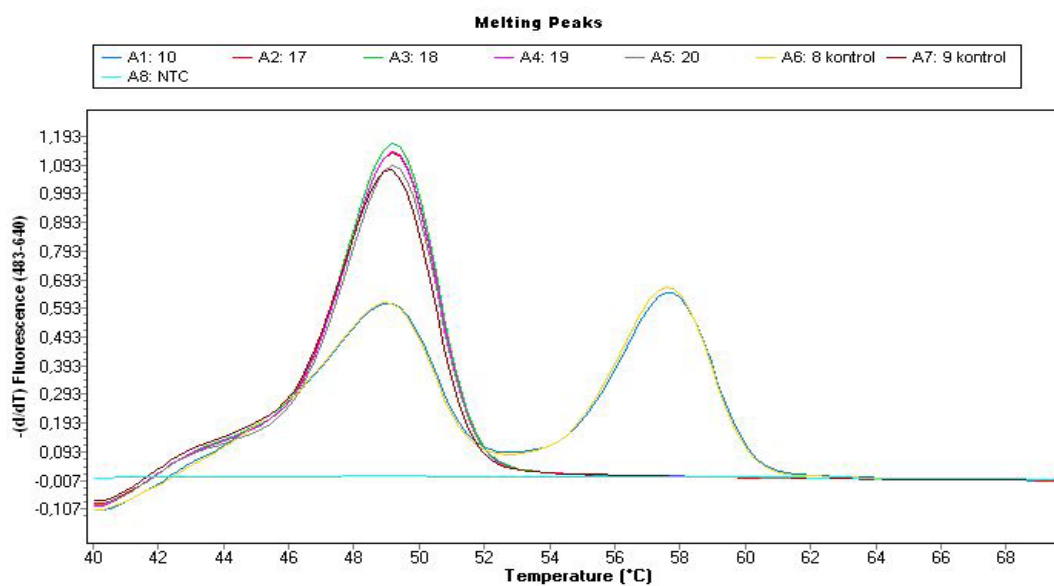
Pro stavení výše zmíněného destičkového polymorfismu byly připraveny také pracovní roztoky pro sondy, které byly naředěny na koncentraci 4 μM každá. Napipetováno bylo vždy 4 μl sondy do 16 μl Minimal buffer (10 mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA). Rozpis pro přípravu mixu je zaznamenán v Tab. 10 a nastavení konkrétní analýzy je popsán v Tab. 11. Výstup z analýzy křivek tání je následně shrnut na Obr. 20.

Tab. 10 Příprava mixu na reakci v objemu 20  $\mu$ l - P2Y12 T744C, rs2046934

Položka reakční směsi	Množství roztoku na 1 reakci ( $\mu$ l)
PCR voda	10
Sondy (LC460+FL)	1+1
Primery (F+R)	1+1
GT Master MIX	4
Celkem reakční směsi	18
DNA pacienta	2

Tab. 11 Nastavení LightCycler 480 instrument pro genotypizaci polymorfismu P2Y12 T744C, rs2046934

Název programu	Cyklus	Teplota ( $^{\circ}$ C)	Čas	Rychlost ( $^{\circ}$ C/s)
Počáteční denaturace	1	95	10 min	4,40
	40	95	10 s	4,40
PCR amplifikace	40	54	10 s	2,20
	40	72	15 s	4,40
Melting	1	95	1 min	4,40
	1	40	2 min	1,50
	1	70		0,11
Chlazení	1	40	10 s	1,50





Obr. 20 Graf křivek tání pro P2Y12 T744C, rs2046934 - k vyhodnocení byla použita metoda genotyping s následujícími teplotami tání jednotlivých mutantních stavů: wt ~ 49,5 °C; homo ~ 58 °C; hetero – oba peaky

#### 6.9.3.4 GP1bA -5T>C, rs2243093

Gen pro GP1bA a jeho polymorfismus T13254C v regionu 5'UTR bývá spojován s ischemickou chorobou srdeční včetně akutního infarktu myokardu (Antoniades et al., 2006).

Primery byly připraveny naředěním na koncentraci 5 µM každý. Z takto předpřipravených primerů byl nacytán pracovní roztok, kde bylo napipetováno 5 µl primeru F, dále 5 µl primeru R a také 90 µl Minimal buffer (10 mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA).

Pro stavení výše zmíněného destičkového polymorfismu byly připraveny také pracovní roztoky pro sondy, které byly naředěny na koncentraci 4 µM každá. Napipetováno bylo vždy 4 µl sondy do 16 µl Minimal buffer (10 mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA). Rozpis pro přípravu mixu je zaznamenán v Tab. 12 a nastavení konkrétní analýzy je popsán v Tab. 13. Výstup z analýzy křivek tání je následně shrnut na Obr. 21.

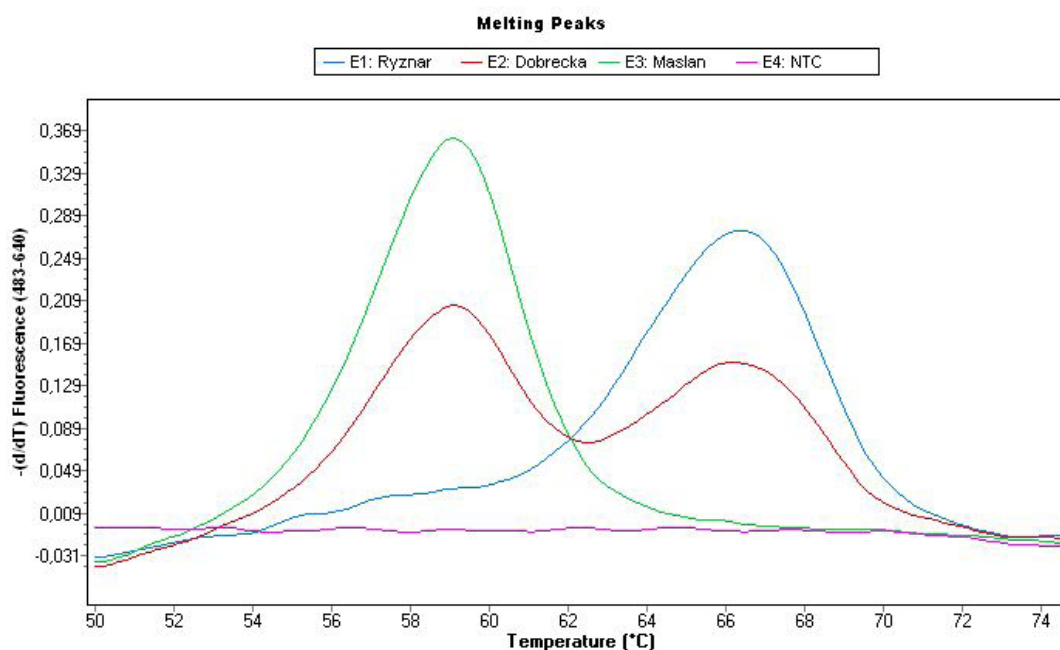
Tab. 12 Příprava mixu na reakci v objemu 20 µl - GP1bA, rs2243093

<b>Položka reakční směsi</b>	<b>Množství roztoku na 1 reakci (µl)</b>
PCR voda	10
Sondy (LC460+FL)	1+1
Primery (F+R)	2
GT Master MIX	4
Celkem reakční směsi	18
DNA pacienta	2

Tab. 13 Nastavení LightCycler 480 instrument pro genotypizaci polymorfismu GP1bA, rs2243093

<b>Název programu</b>	<b>Cyklus</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas</b>	<b>Rychlost (°C/s)</b>
Počáteční denaturace	1	95	10 min	4,40

	40	95	10 s	4,40
PCR amplifikace	40	60	10 s	2,20
	40	72	15 s	4,40
	<hr/>			
Melting	1	95	1 min	4,40
	1	50	1 min	2,20
	1	75		0,11
<hr/>				
Chlazení	1	40	10 s	1,50
<hr/>				



Obr. 21 Graf křivek tání pro GP1bA, rs2243093 - k vyhodnocení byla použita metoda genotyping s následujícími teplotami tání jednotlivých mutantních stavů: wt ~ 59°C; homo ~ 66°C; hetero – oba peaky

#### 6.9.3.5 GP6 T13254C, rs1613662

Gen pro GPVI je složen z osmi exonů. V pátém exonu se nachází SNP T13254C a důsledkem je záměna serinu za prolin. Právě alela C je v řadě klinických studií spojována s infarktem myokardu (Ollikainen et al., 2004).

Primery byly připraveny naředěním na koncentraci 5  $\mu$ M u primeru F a na 10  $\mu$ M u primeru R. Z takto předpřipravených primerů byl nachytán pracovní roztok, kde bylo napipetováno 5  $\mu$ l primeru F, dále 10  $\mu$ l primeru R a také 85  $\mu$ l Minimal buffer (10 mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA). Pro lepší účinnost genotypizace byla tedy zvolena real-time PCR v asymetrickém uspořádání.

Pro stavení výše zmíněného destičkového polymorfismu byly připraveny také pracovní roztoky pro sondy, které byly naředěny na koncentraci 4  $\mu$ M každá.

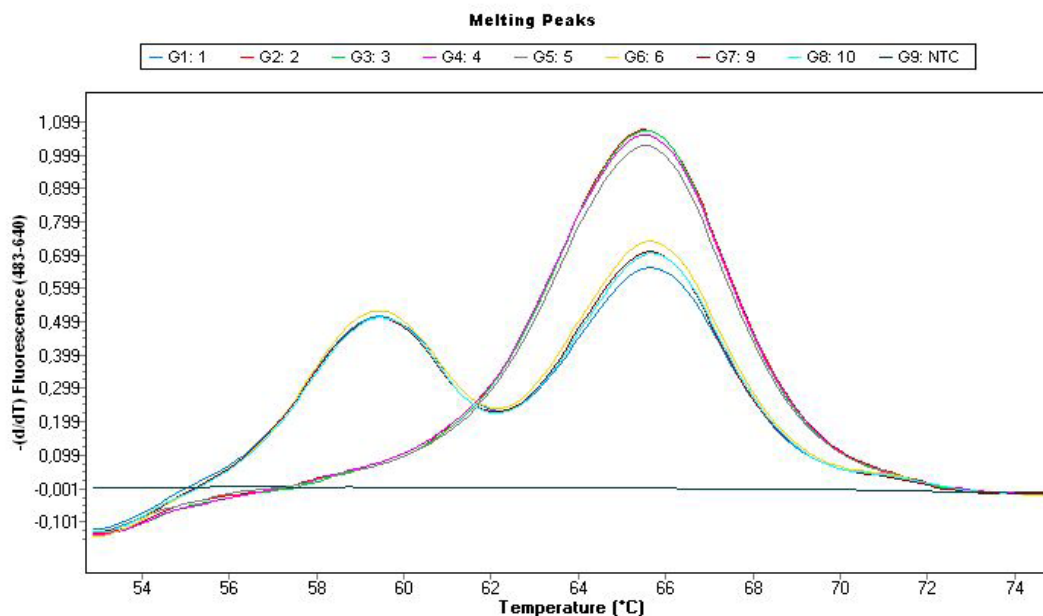
Napipetováno bylo vždy 4  $\mu$ l sondy do 16  $\mu$ l Minimal buffer (10 mM Tris pH=8, 0,01mM EDTA). Rozpis pro přípravu mixu je zaznamenán v Tab. 14 a nastavení konkrétní analýzy je popsán v Tab. 15. Výstup z analýzy křivek tání je následně shrnut na Obr. 22.

Tab. 14 Příprava mixu na reakci v objemu 20  $\mu$ l - GP6, rs1613662

<b>Položka reakční směsi</b>	<b>Množství roztoku na 1 reakci (<math>\mu</math>l)</b>
PCR voda	10
Sondy (LC460+FL)	1+1
Primery (F+R)	2
GT Master MIX	4
Celkem reakční směsi	18
DNA pacienta	2

Tab. 15 Nastavení LightCycler 480 instrument pro genotypizaci polymorfismu GP6, rs1613662

<b>Název programu</b>	<b>Cyklus</b>	<b>Teplota (°C)</b>	<b>Čas</b>	<b>Rychlost (°C/s)</b>
Počáteční denaturace	1	95	10 min	4,40
PCR amplifikace	40	95	10 s	4,40
	40	60	10 s	2,20
	40	72	15 s	4,40
Melting	1	95	2 min	4,40
	1	53	1 min	1,50
	1	75		0,11
Chlazení	1	40	10 s	1,50



Obr. 22 Graf křivek tání pro GP6, rs1613662 - k vyhodnocení byla použita metoda genotyping s následujícími teplotami tání jednotlivých mutantních stavů: wt ~ 65,5 °C; homo ~ 58,5 °C; hetero – oba peaky.

## VÝSLEDKY

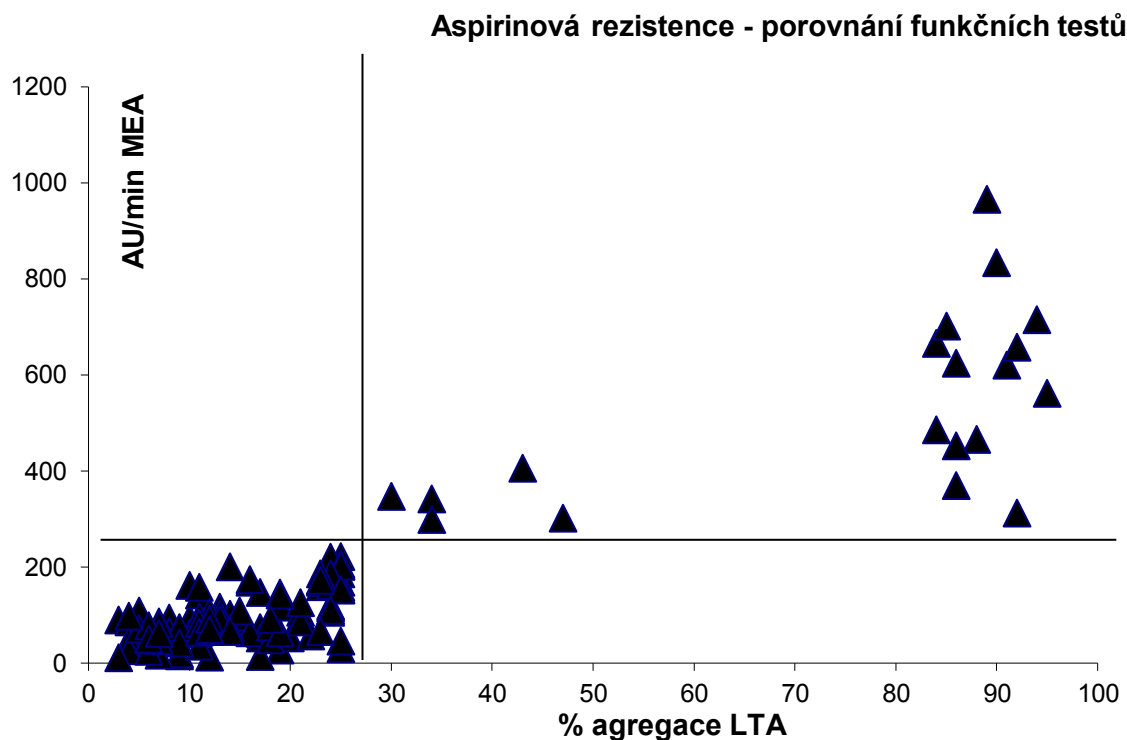
### 7.1 Stanovení aspirinové a thienopyridinové rezistence funkčními metodami

Hodnocený soubor zahrnuje 124 pacientů s akutním infarktem myokardu. Funkční test na měření agregační schopnosti destiček, tak mohl sloužit k identifikaci pacientů, kteří na léčbu při laboratorním hodnocení nereagují dostatečně. Léčba je účinná u 85,49 % pacientů po podání 100 mg ANP (Tab. 16; Obr. 23) a také u 74,2 % pacientů po podání 75 mg klopidogrelu (Tab. 17; Obr. 24). U 14,51 % pacientů lze předpokládat aspirinovou rezistenci a dále také u 25,8 % lze usuzovat na thienopyridinovou rezistenci.

Výsledkem měření funkčních testů jsou agregační křivky trombocytů vyjádřené v agregačních jednotkách v závislosti na čase AU\*min u impedanční agregometrie eventuelně v % u optické transmisní agregometrie tzn. maximální amplituda agregační křivky.

Tab. 16 Účinnost antiagregační léčby po podání 100 mg ANP denně

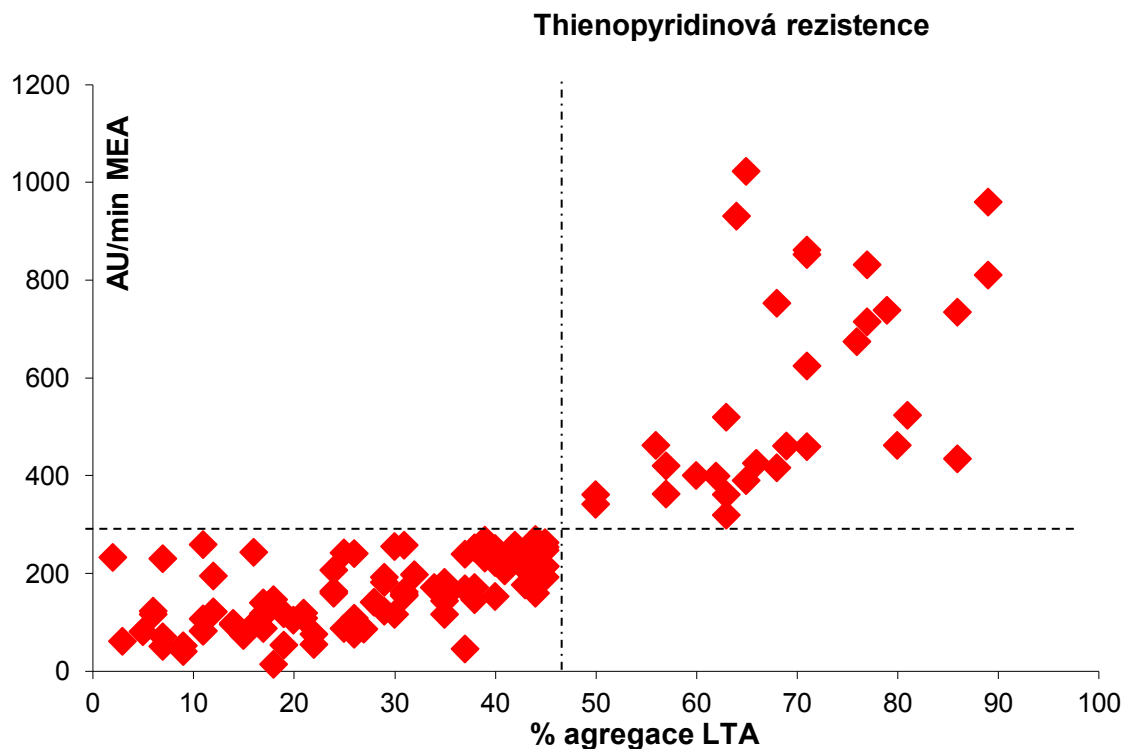
Účinnost aspirinové léčby	Počet pacientů	% účinnost
+	106	85,49
-	18	14,51



Obr. 23 Grafické znázornění porovnání výsledků metodou LTA a MEA u aspirinové rezistence. Soubor monitorovaných pacientů na duální antiagregační léčbě tvořilo 89 mužů a 35 žen, kteří měli diagnózu akutního infarktu myokardu.

Tab. 17 Účinnost antiagregační léčby po podání 75 mg klopidogrelu denně

Účinnost thienopyridinové léčby	Počet pacientů	% účinnost
+	92	74,2
-	32	25,8

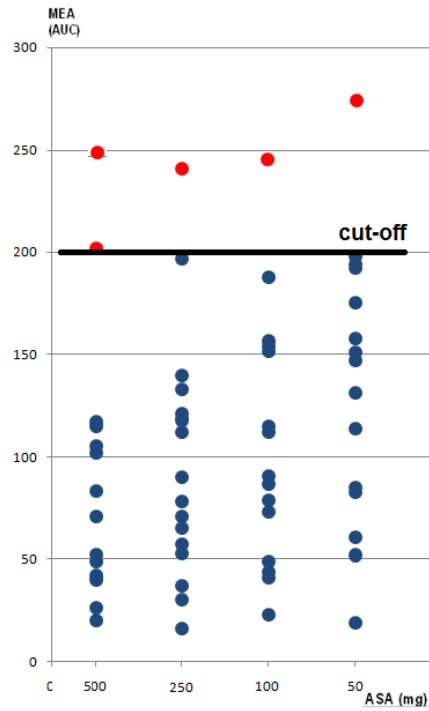


Obr. 24 Grafické znázornění porovnání výsledků metodou LTA a MEA u thienopyridinové rezistence. Soubor monitorovaných pacientů na duální antiagregační léčbě tvořilo 124 mužů a žen, kteří měli diagnózu akutního infarktu myokardu.

## 7.2 In vitro testování odezvy pacientů na ASA

Pro in vitro testování odezvy pacientů na ASA byli vybráni pacienti, kteří měli laboratorně prokázanou aspirinovou rezistenci. Jednalo se o 18 pacientů z celkového souboru 124 pacientů s akutním infarktem myokardu.

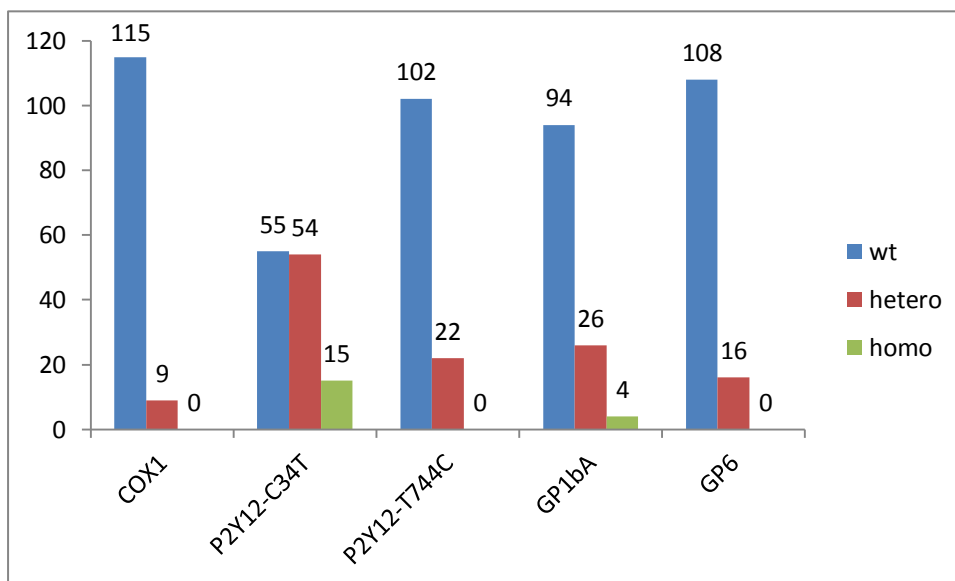
U dvou pacientů je vidět posun aktivace destiček až u velmi vysokých denních dávek ASA tj. 500 mg, což již však není adekvátní přípustná protideštičková terapie (Obr. 25). Příčinou takto zjištěné aspirinové rezistence mohou být endogenní faktory a je proto nutné a vhodné změnit typ léčby.



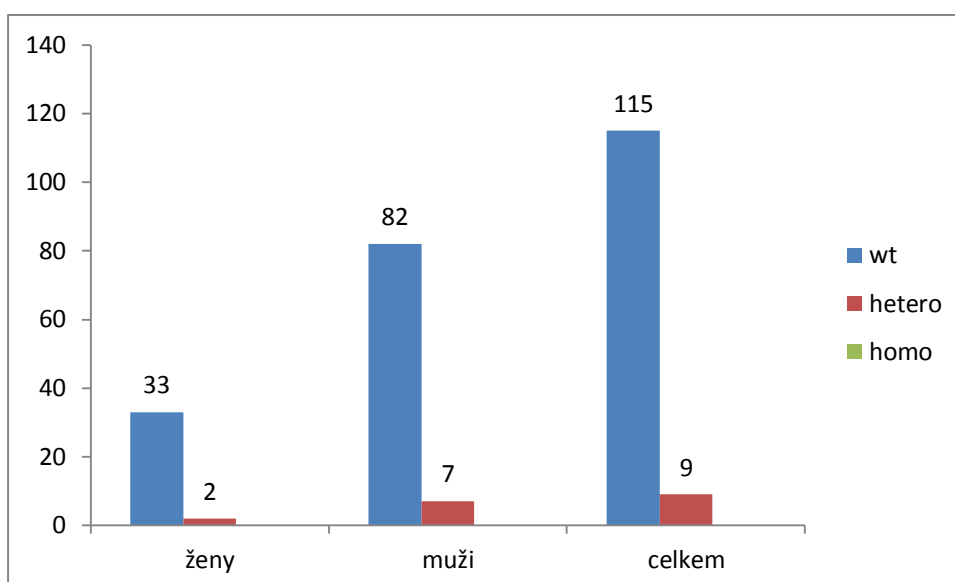
Obr. 25 In vitro testování 18 pacientů s akutním infarktem myokardu a aspirinovou rezistencí prokázanou funkčními agregačními testy.

## 7.3 Výsledky genotypizace destičkových polymorfismů

Polymorfismy destičkových receptorů byly detekovány u vzorků DNA izolovaných z leukocytů periferní krve pacientů s akutním infarktem myokardu. Celkově bylo vyizolováno všech 124 DNA pacientů s AIM. Optimální stanovení všech genotypů destičkových polymorfismů závisí na čistotě a také koncentraci měřené DNA. DNA koncentrace byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop ND-1000 a naředěna na požadovanou koncentraci 25 ng/μl (většina stanovení destičkových polymorfismů – viz. jednotlivé postupy měření) eventuálně na koncentraci 6 ng/μl (COX1). Zastoupení všech pěti testovaných destičkových polymorfismů je graficky znázorněno na Obr. 26. Dále na Obr. 27 – 31 jsou graficky znázorněny testované destičkové polymorfismy ve vztahu k pohlaví sledovaných pacientů s AIM.

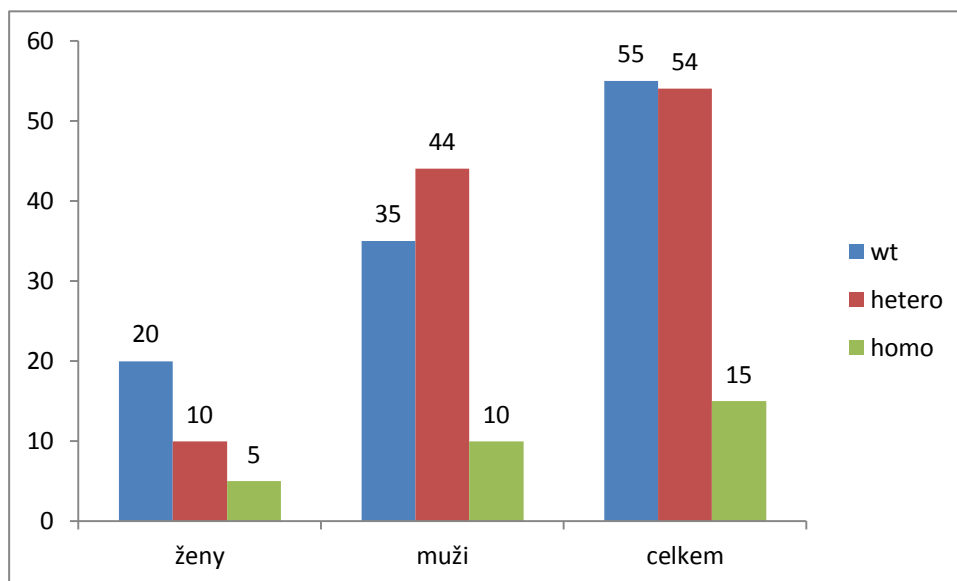


Obr. 26 Zastoupení jednotlivých testovaných polymorfismů ve sledovaném souboru 124 pacientů s AIM.

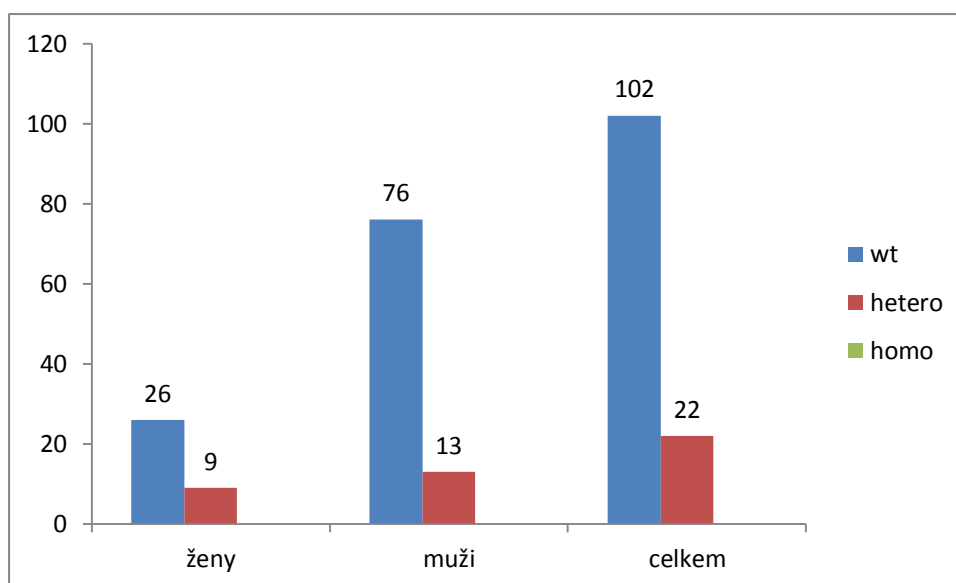


Obr. 27 Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu COX1\_A1;-A842G (rs10306114) v závislosti na pohlaví. Výskyt výše specifikovaného destičkového polymorfismu u mužského pohlaví činí 7,87 % oproti výskytu u ženského pohlaví 5,71 %.

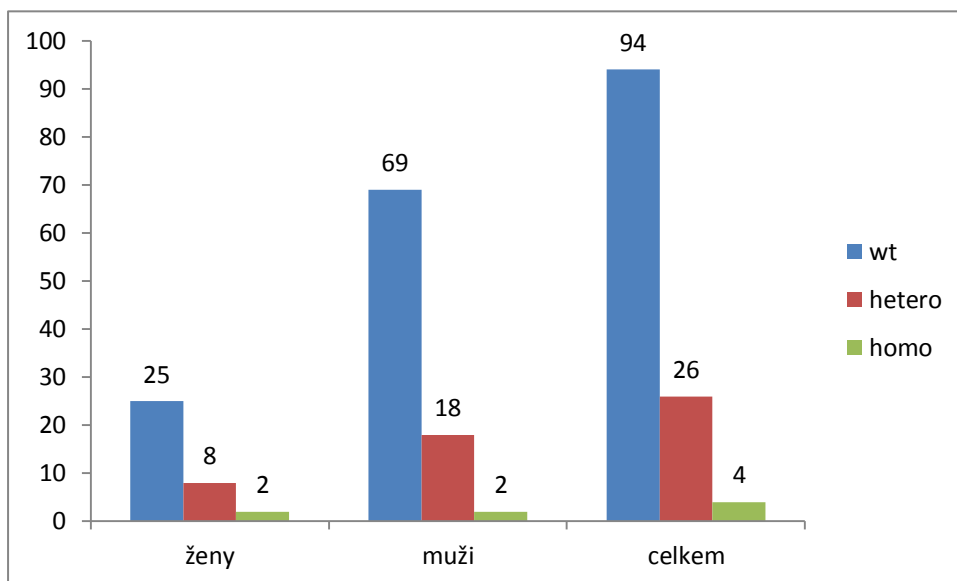




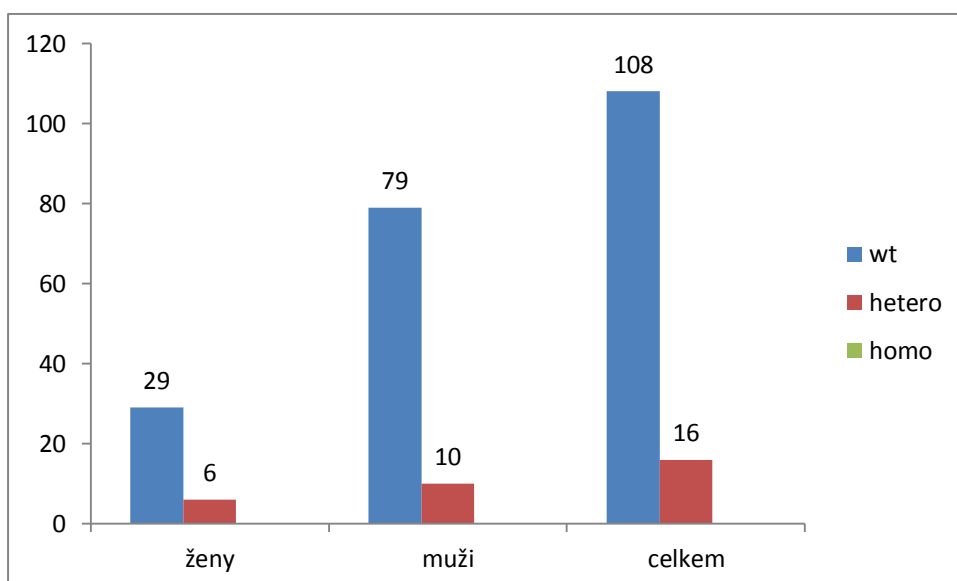
Obr. 28 Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu P2RY12; C34T (rs6785930) v závislosti na pohlaví. Výskyt výše specifikovaného destičkového polymorfismu u mužského pohlaví činí 49,44 % heterozygotů a 11,24 % homozygotů oproti výskytu u ženského pohlaví 28,57 % heterozygotů a 14,29 % homozygotů.



Obr. 29 Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu P2RY12; i-T744C (rs2046934) v závislosti na pohlaví. Výskyt výše specifikovaného destičkového polymorfismu u mužského pohlaví činí 14,61 % oproti výskytu u ženského pohlaví 25,71 %.



Obr. 30 Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu GP1bA ; -5T>C (rs2243093) v závislosti na pohlaví. Výskyt výše specifikovaného destičkového polymorfismu u mužského pohlaví činí 20,22 % heterozygotů a 2,25 % homozygotů oproti výskytu u ženského pohlaví 22,86 % heterozygotů a 5,71 % homozygotů.



Obr. 31 Zastoupení jednotlivých genotypů polymorfismu GP6 ; T13254C (rs1613662) v závislosti na pohlaví. Výskyt výše specifikovaného destičkového polymorfismu u mužského pohlaví činí 11,24 % oproti výskytu u ženského pohlaví 17,14 %.

## 7.4 Statistické zpracování analyzovaných dat

Statistická analýza byla provedena za využití software SPSS verze 15 (SPSS Inc., Chicago, USA). Závislost mezi laboratorní odpovědí na antiagregační léčbu a mutačními stavy destičkových receptorů byla zhodnocena prostřednictvím Fisherova exaktního testu. Fisherův přímý exaktní test se používá v situacích, kdy ve čtyřpolní tabulce jsou v některých buňkách tak nízké četnosti, které neumožňují použít  $\chi^2$ -testu. Fisherův exaktní test je řazen mezi neparametrické testy pracující s daty na nominální škále, v nejjednodušší vyjádření ve dvou třídách: pozitivní/negativní, úspěch/neúspěch atd. Příslušné dvě třídy lze vytvořit také dichotomizací původně spojité proměnné, např. převedením původně spojitého laboratorního testu na test poskytující pouze 2 možnosti vyjádření (ano/ne; 0/1) pomocí cut-off hodnoty dané laboratorní metodikou. (Havránek 1993; Pavlík et al., 2005).

V experimentu jsou porovnávány vždy dva soubory: výsledky genotypizačního stanovení daného destičkového polymorfismu s funkčním agregačním testem. Soubor vyšetřených pacientů s akutním infarktem myokardu o četnosti N=124 nebyl testován na shodu, ale na vzájemný vztah mezi mutačním stavem a pozitivním nálezem agregačního testu tj. aspirinovou či thienopyridinovou rezistencí prokázanou funkčními agregačními testy. Výsledky byly uspořádány do přehledných kontingenčních tabulek. Test byl hodnocen na hladině signifikance 0,05.

### 7.4.1 Vztah výskytu polymorfismů u aspirinové rezistence

Tab. 18 Závislost mezi mutačním stavem COX1\_A1;-A842G (rs10306114) a funkčními testy.

<b>LTA+MEA</b>	<b>homozygot</b>	<b>heterozygot</b>	<b>wild type</b>	<b>celkem</b>
NEG počet	0	4	102	106
%	00,0%	3,77%	96,23%	100%
POZ počet	0	5	13	18
%	00,0%	27,78%	72,22%	100%
Celkem počet	0	9	115	124
%	0,00%	7,26%	92,74%	100%

Fisherův exaktní test prokázal signifikantní statistickou závislost mezi funkčními agregačními testy tj. LTA a MEA a mutačním stavem COX1\_A1;-A842G (rs10306114) ( $p=0,003$ ).

Tab. 19 Závislost mezi mutačním stavem GP1bA ; -5T>C (rs2243093) a funkčními testy.

<b>LTA+MEA</b>		<b>homozygot</b>	<b>heterozygot</b>	<b>wild type</b>	<b>celkem</b>
NEG	počet	4	21	81	106
	%	3,77%	19,81%	76,42%	100%
POZ	počet	0	5	13	18
	%	00,0%	27,78%	72,22%	100%
Celkem	počet	4	26	94	124
	%	3,23%	20,97%	75,80%	100%

Fisherův exaktní test neprokázal signifikantní statistickou závislost mezi funkčními agregačními testy tj. LTA a MEA a mutačním stavem GP1bA ; -5T>C (rs2243093) ( $p=0,755$ ).

Tab. 20 Závislost mezi mutačním stavem GP6 ; T13254C (rs1613662) a funkčními testy.

<b>LTA+MEA</b>		<b>homozygot</b>	<b>heterozygot</b>	<b>wild type</b>	<b>celkem</b>
NEG	počet	0	12	94	106
	%	00,0%	11,32%	88,68%	100%
POZ	počet	0	4	14	18
	%	00,0%	22,20%	77,80%	100%
Celkem	počet	0	16	108	124
	%	0,00%	12,90%	87,10%	100%

Fisherův exaktní test neprokázal signifikantní statistickou závislost mezi funkčními agregačními testy tj. LTA a MEA a mutačním stavem GP6 ; T13254C (rs1613662) ( $p=0,249$ ).

## 7.4.2 Vztah výskytu polymorfismů u thienopyridinové rezistence

Tab. 21 Závislost mezi mutačním stavem P2RY12; i-T744C (rs2046934) a funkčními testy.

<b>LTA+MEA</b>		<b>homozygot</b>	<b>heterozygot</b>	<b>wild type</b>	<b>Celkem</b>
NEG	počet	0	15	77	92
	%	00,0%	16,30%	83,70%	100%
POZ	počet	0	7	25	32
	%	00,0%	27,78%	72,22%	100%
Celkem	počet	0	22	102	124
	%	0,00%	17,74%	82,26%	100%

Fisherův exaktní test neprokázal signifikantní statistickou závislost mezi funkčními agregačními testy tj. LTA a MEA a mutačním stavem P2RY12; i-T744C (rs2046934) ( $p=0,424$ ).

Tab. 22 Závislost mezi mutačním stavem P2RY12; C34T (rs6785930) a funkčními testy.

<b>LTA+MEA</b>		<b>homozygot</b>	<b>heterozygot</b>	<b>wild type</b>	<b>Celkem</b>
NEG	počet	10	38	44	92
	%	10,87%	41,30%	47,83%	100%
POZ	počet	5	16	11	32
	%	15,63%	50,00%	34,37%	100%
Celkem počet		15	54	55	124
	%	12,10%	43,55%	44,35%	100%

Fisherův exaktní test prokázal signifikantní statistickou závislost mezi funkčními agregačními testy tj. LTA a MEA a mutačním stavem P2RY12; C34T (rs6785930) ( $p=0,129$  versus  $p=0,061$ ).

Tab. 23 Závislost mezi mutačním stavem GP1bA ; -5T>C (rs2243093) a funkčními testy.

<b>LTA+MEA</b>		<b>homozygot</b>	<b>heterozygot</b>	<b>wild type</b>	<b>Celkem</b>
NEG	počet	2	20	70	92
	%	2,18%	21,74%	76,10%	100%
POZ	počet	2	6	24	32
	%	6,30%	18,70%	75,00%	100%
Celkem počet		4	26	94	124
	%	3,23%	20,97%	75,80%	100%

Fisherův exaktní test neprokázal signifikantní statistickou závislost mezi funkčními agregačními testy tj. LTA a MEA a mutačním stavem GP1bA ; -5T>C (rs2243093) ( $p=0,488$  versus  $p=0,812$ ).

Tab. 24 Závislost mezi mutačním stavem GP6 ; T13254C (rs1613662) a funkčními testy.

<b>LTA+MEA</b>		<b>homozygot</b>	<b>heterozygot</b>	<b>wild type</b>	<b>celkem</b>
NEG	počet	0	12	94	106
	%	00,0%	11,32%	88,68%	100%
POZ	počet	0	4	14	18
	%	00,0%	22,20%	77,80%	100%
Celkem	počet	0	16	108	124
	%	0,00%	12,90%	87,10%	100%

Fisherův exaktní test neprokázal signifikantní statistickou závislost mezi funkčními agregačními testy tj. LTA a MEA a mutačním stavem GP6 ; T13254C (rs1613662) ( $p=1,000$ ).

## DISKUSE

Existuje řada patofyziologických stavů a nemocí, které jsou spojeny s poškozením nebo také patologicky sníženou či zvýšenou funkcí krevních destiček. Trombocyty jsou přímo zapojeny do patogeneze kardiovaskulárních onemocnění včetně akutního infarktu myokardu. Destičky přispívají k iniciaci a progresi aterosklerotické léze, kdy adherují na místa s aktivovanými endotelovými buňkami, iniciují tvorbu agregátů destiček s monocyty a dále lokálně uvolňují mediátory zánětu a mitogeneze. Jedna z příčin recidivy kardiovaskulárních onemocnění spočívá i v přetrvávající zvýšené agregabilitě destiček. Nazývá se též jako vysoká reaktivita destiček při protideštičkové léčbě či častěji rezistence na protideštičkovou léčbu, kdy ani duální antiagregační léčba nevede u některých jedinců k odpovídající léčebné odpovědi, tj. inhibici agregace destiček, a přetrvává tak zvýšené riziko (v některých případech i fatální) recidivy atherotrombotické příhody. Fenomén reziduální agregability destiček je znám již řadu let. (Abaci et al., 2013; Cuisset et al., 2009).

V současné době patří duální protideštičková léčba ANP a klopidogrelem do základního pilíře sekundární prevence akutního infarktu myokardu. V době rozvoje nových léčebných možností se monitorování účinnosti protideštičkové léčby jeví jako vhodná možnost v hodnocení účinnosti sekundární prevence infarktu myokardu, zejména u mladých pacientů

Z klinického pohledu představuje pojem aspirinové či thienopyridinové rezistence selhání této protideštičkové léčby, tzn. užívání ANP eventuelně klopidogrelu nezabránilo další trombotické příhodě. Z laboratorního pohledu představuje pojem aspirinové či thienopyridinové rezistence nemožnost prokázat inhibici destičkových funkcí in vitro při užívání protideštičkových léků tj. v našem sledovaném souboru pacientů 100 mg ANP a 75 mg klopidogrelu denně. Existuje řada publikací sledujících tuto problematiku a variabilita účinku podávané protideštičkové terapie se liší dle použitých laboratorních metodik, avšak také dle velikosti a různorodosti testovaného souboru nemocných. (Shenkman et al., 2008; Silva et al., 2012; Eikelboom et al., 2002).

Selhání protideštičkové léčby může vést až k fatálním následkům, které zvyšují morbiditu a mortalitu. Z tohoto důvodu jsou velmi důležité laboratorní testy disponující dostatečnou spolehlivostí, specifitou, senzitivitou a reprodukovatelností (Ferraris et al., 2011). Prokázání aspirinové či thienopyridinové neodpovídavosti pacienta má závažné důsledky, jak pro pacienta samotného, tak i pro lékaře. V takové situaci může být protideštičková léčba navýšena eventuelně změněna. Typickým příkladem je pacient

nereagující na 100 mg ANP denně, ale s adekvátní odpovědí na 200 mg ANP denně. Existují samozřejmě situace, které nemusejí umožnit lékaři provést elegantní navýšení protidestičkové léčby, ať už z důvodu gastrointestinálních komplikací či tvorby petechií aj. Další volbou je užití jiného typu protidestičkového léku, jako je například při prokázané aspirinové rezistenci (nereagující na zvýšené dávkování ANP), přechod na thienopyridinový preparát např. klopidogrel. V dnešní době máme i možnost tak zvané triple terapie – používána v indikovaných případech např. fibrilace síní, kdy k duální protidestičkové terapii je přidán antikoagulační lék, ať už starší generace (warfarin, lawarin) či některý z novějších antitrombotik jako je dabigatran či rivaroxaban (Mega & Carreras, 2012). Úskalím těchto nových léků je především cena, komplikace spojené s krvácením a nesmí být opomenuta také omezená indikace a nedostupnost antidota.

Ve sledovaném souboru 124 pacientů s akutním infarktem myokardu byla zjištěna nedostatečná účinnost protidestičkové léčby, při využití dvou funkčních testů tj. optické transmisní agregometrie a impedanční agregometrie, po podání 100 mg ANP u 14,51 % pacientů (Obr. 23, Tab. 16) a dále po podání 75 mg klopidogrelu u 25,8 % pacientů (Obr. 24, Tab. 17). Stanovení cut-off hodnoty je velmi komplikované, jelikož nelze přesně definovat stav, který má být posuzován. Je důležité definovat pojem rezistence na protidestičkovou léčbu. Jedná se o stav, kdy je nedostatečná hladina léku pro potlačení agregační schopnosti destiček nebo stav, kdy potlačíme samotnou agregační schopnost destiček? A pokud ano, tak na jaké hodnoty? Odpovědi na tyto otázky nejsou jednoznačné a zcela zásadním způsobem ovlivňují výsledky klinických studií. Jestliže by byly klinické studie prováděny totožným laboratorním stanovením rezistence na protidestičkovou léčbu, pak by byly i hodnoty cut-off podstatně srovnatelnější.

Pro definování cut-off námi použité metodiky bylo použito klasického srovnávacího souboru zdravých dárců, což je poměrně náročné ale při vyšetření agregačních schopností destiček nezbytné. Tyto meze byly určeny pro optickou agregometrii tak impedanční agregometrii z plné krve. Teprve poté byl hodnocen soubor pacientů léčených kyselinou acetylsalicylovou eventuelně klopidogrelem.

Příčiny rezistencí na protidestičkovou léčbu jsou multifaktoriální a pro jejich detekci je využívána řada laboratorních stanovení. V dnešní době je stále jako tzv. zlatý standard využívána metoda optické transmisní agregometrie (LTA) (Cattaneo et al., 2007). Úskalí detekce rezistence na protidestičkovou léčbu může být např. v nedostatečné standardizaci metodik při volbě induktoru a následném stanovení optimální koncentrace induktoru (Mehta & Mohandas, 2010). Jako vhodně zvolený induktor pro monitorání ASA se jeví kyselina arachidonová, avšak některé starší publikace uvádějí také kationický propylglylát.



V práci „The assesment of aspirin resistance by using light transmission and multiple electrode aggregometry“ bylo na skupině 101 pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční léčených 100 mg ASA provedeno porovnání LTA a MEA. Nejprve bylo stanoveno cut-off pro LTA na 45 % residuálně aktivovaných trombocytů a 2000 AUC jednotek pro MEA. Byla také prokázána srovnatelnou citlivost metod a stanoven výskyt rezistence na léčbu ANP na 22,22 resp. 22,21 % (LTA resp. MEA). Zvýšený výskyt rezistence byl dán vyšetřením klinicky selektivního souboru pacientů s příznaky selhání léčby. V souboru byla navýšena compliance pacientů, kteří si uvědomili, že jsou kontrolováni a také byla navýšena dávky ASA u pacientů rezistentních na 100 mg dávku.

Dále byla hodnocena rezistence u klopidogrelu. Výsledky shrnuje publikace „Detection of clopidogrel resistance by MEA and LTA“. V této práci byla na skupině 84 pacientů s kardiovaskulárním onemocněním léčených klopidogrelem korelována LTA a MEA.. Literatura dosud poskytovala zejména pro LTA velmi rozporuplná data. U stanovení LTA bylo přidáno blokátoru receptoru P2Y1 a dále následovalosrovnáníobou metodiky s MEA. Signifikantní korelace laboratorního stanovení rezistence na léčbu na základě residuální aktivity trombocytů s klinickým dopadem selhání léčby, kterým je manifestace ACS u pacienta, poskytují jen metody využívající PGE1.

Pro sledování adekvátní agregační odpovědi se na trhu v posledních letech objevuje také řada analyzátorů, které je možno používat přímo u lůžka pacienta tzv. point of care technologie (POCT). Typickým zástupcem této kategorie je Verify Now, jehož výsledky velmi dobře korelují s výsledky LTA (Gremmel et al., 2013; Homoncik et al., 2000).

Výskyt rezistence k protidestičkové terapii je v literatuře udáván ve velmi širokém rozmezí 3-40 % (Krasopoulos et al., 2008). Odlišnosti v použitých metodikách u klinických studií a následně široký rozptyl % aspirinové rezistence shrnuje také Tab. 25 prevalence aspirinové rezistence.

Tab. 25 Prevalence aspirinové rezistence v různých klinických studiích

<b>Studie (rok)</b>	<b>Velikost souboru</b>	<b>Charakteristika pacientů</b>	<b>Metoda detekce</b>	<b>% aspirinové rezistence</b>
Grundmann et al., 2003	53	Ischemický stroke	PFA-100	35
Eikelboom et al., 2002	976	Kardiovaskulární onemocnění	11-dTxB2	3,5
Andersen et al., 2002	129	Infarkt myokardu	PFA-100	35

Grotemeyer et al., 1993	180	Ischemický stroke	Index destičkové reaktivity	40
Mueller et al., 1997	100	Periferní arteriální nemoc	LTA	8
Gum et al., 2003	326	Kardiovaskulární onemocnění	LTA	5,5

Mezi běžně dostupná vyšetření korelující s aspirinovou rezistencí patří také stanovení 11-dehydrotromboxanu B<sub>2</sub> v moči nebo séru (Gremmel et al., 2013; Frelinger et al., 2006).

Kvantitativní sledování primární hemostázy může být také prováděno v citrátové plné krvi pomocí přístroje PFA 100. Mezi výhody této analýzy patří simulace in vivo podmínek avšak nevýhodou tohoto stanovení je vyšší finanční náročnost. Při detekci aspirinové rezistence je zapotřebí použít membránu potaženou epinefrinem a kolagenem a u stanovení thienopyridinové rezistence zase membránu potaženou ADP a kolagenem eventuelně navíc pokrytou Ca<sup>2+</sup> a také prostaglandinem E1. Stanovení agregace trombocytů v plné krvi využívá také přístroj Verify Now, jehož použití v našich podmínkách je spíše jako analyzátoru u lůžka tzv. POCT (Hezard et al., 2002).

Tab.26 Srovnání metodik pro monitorování protideštičkové terapie

<b>Metoda</b>	<b>specifická</b>	<b>senzitivita</b>	<b>použitelnost</b>
<b>LTA</b>	nízká*/ vysoká*	nízká	jednoduché, rychlé, zlatý standard, *variabilita výsledků dle použité reagentie (ADP versus ADP+PGE <sub>1</sub> )
<b>MEA</b>	vysoká	vysoká	jednoduché, rychlé, plná krev, standardizace výrobcem, vyšší cena než LTA
<b>11-dehydro-tromboxan B2</b>	nízká	vysoká	korelace s klinikou, mimodeštičkové zdroje tromboxanu, závislost na renálních funkcích, časově náročné, v séru a v moči
<b>PFA-100</b>	nízká*/ vysoká*	vysoká	jednoduché, rychlé, plná krev, nejasná korelace s klinikou, *variabilita výsledků dle použité cartridge (ADP versus ADP+PGE <sub>1</sub> )
<b>Verify Now</b>	vysoká	vysoká	jednoduché, rychlé, citlivé, vyšší cena než MEA

<b>VASP-P</b>	vysoká	vysoká	finančně i časově náročné, omezené použití
---------------	--------	--------	--

Analýza vícenásobné impedanční agregometrie pomocí přístroje Multiplate je také blízká podmínkám in vivo. Výhodou této metody je standardizace provedená výrobcem, avšak je vždy nutné provést stanovení vlastního referenčního rozmezí pro jednotlivé testy. Pro vlastní stanovení účinnosti protidestičkové terapie byly zvoleny dva zástupci ze skupiny funkčních testů s vysokou specificitou a senzitivitou viz. Tab. 26 a to právě impedanční agregometrie s analyzátozem Multiplate a dále již výše zmíněný zlatý standard tj. optická transmisní agregometrie.

Neúčinnost podávané protidestičkové léčby je známa již řadu let a v poslední době častokrát diskutována jako významná klinická komplikace např. u recidivy infarktu myokardu. Z této příčiny řadíme monitorování protidestičkové terapie a její vyhodnocení k rozhodujícím faktorům prevence aterotrombotických příhod jako je například infarkt myokardu či cévní mozková příhoda. Příčiny selhání protidestičkové terapie mohou být původu exogenního a také endogenního (Michelson 2008; Michelson et al., 2005). Mezi exogenní příčiny řadíme non-compliance pacienta (pacient neužívá předepsaný lék ve správném dávkování či vůbec, důvodem může být nesnášenlivost léku – iritace žaludeční sliznice), omezená absorpce protidestičkového léku, nedostatečná dávka protidestičkového léku, současné užívání nesteroidních léků, které brání vazbě ASA na vazné místo COX–1, ale také kouření, zvýšená tvorba adrenalinu vlivem stresu, věk i pohlaví, hyperlipidémie, hyperglykémie, zvýšený obrat krevních destiček netrombotická etiologie cévního uzávěru (arteriitida, embolizace) a dále například hyperkoagulační stav u akutních koronárních syndromů.

Pro in vitro testování pacientů na odezvu ASA byl vybrán funkční agregační test MEA s vysokou senzitivitou a specificitou. Důvodem této volby bylo přiblížení se co nejvíce podmínkám in vivo, což nám umožňuje právě MEA, která využívá pro měření plnou nesrážlivou krev. Při tomto in vitro testování posloužil jako základní údaj běžná denní dávka ASA tj. 100 mg a dále také předpoklad 100 % utilizace tohoto léku. Z takto získaných dat je patrné, že pro většinu pacientů z testovaného souboru 18 pacientů s AIM, lze k inhibici krevních destiček použít i poloviční denní dávku tj. již 50 mg ASA (Obr. 25). Tyto naše poznatky korelují i s literárními údaji již publikovanými tzn. denní dávka 30 či 40 eventuelně 50 mg ASA je dostačující k adekvátní odpovědi na tento protidestičkový lék (Hegelson et al., 1993). Jak je již patrné z Obr. 25 většina pacientů reaguje adekvátně i na nízké dávkování ASA, tudíž příčiny potenciální aspirinové rezistence jsou u těchto pacientů původu exogenního tzn. porucha vstřebávání ASA, zvýšený obrat krevních destiček eventuelně non.compliance pacienta či přidružená

medikace aj. Z grafu také vidíme dva pacienty, kteří nereagují adekvátně na in vitro zvyšující se koncentraci ASA, což poukazuje na poruchu receptoru COX-1. V těchto dvou případech je nutné přejít na jiný typ protidestičkového či antitrombotického léku s cílem zabránit recidivě tromboembolické příhody či dalšímu akutnímu infarktu myokardu.

Rozložení jednotlivých exogenních a endogenních příčin selhávání protidestičkové terapie se liší dle použitého léku, jeho metabolizaci a samozřejmě dle genetické predispozice pacienta. Pokud se zaměříme na metabolizaci jednotlivých protidestičkových léků je situace velmi rozdílná lék od léku. Kyselina acetylsalicylová je poměrně dobře metabolizována a utilizace této účinné protidestičkové látky je takřka 100 %. Velmi odlišná situace je u thienopyridinových léků. Zejména klopido-rel, thienopyridin druhé generace, prochází komplikovaným procesem metabolizace a na aktivní metabolit je přeměněno pouze 15 % léčiva. Situace u thienopyridinů se vyvíjí lepším směrem u novějších léčiv třetí generace, kde je hladina aktivních metabolitů výrazně vyšší. Manifestace AIM může být způsobena dle řady odborných publikací genetickými polymorfismy destičkových receptorů. (Kvasnička et al., 2008; Motovska et al., 2010; Ashavaid et al., 2011). Pro genotypizaci polymorfismů destičkových receptorů byla zavedena a optimalizována metoda real-time PCR používající přístroj LightCycler 480 instrument™. Ke zjištění výskytu jednotlivých polymorfismů destičkových receptorů byly využity primery a sondy (TIB MOLBIOL GmbH, Německo). Produkty PCR reakce byly detekovány pomocí analýzy křivek tání. Genotypizačním testem bylo vyšetřeno 124 DNA vzorků pacientů s AIM. Zastoupení jednotlivých testovaných polymorfismů destičkových receptorů a také jejich genotypů jsou zaznamenány v Obr. 26. I přestože přítomnost polymorfismů destičkových receptorů v genetické výbavě naší populace nepatří mezi hlavní rizikové faktory AIM, tak záchyt aspirinové či thienopyridinové rezistence, která vychází 14,51 % aspirinová rezistence a dále 25,8 % thienopyridinová rezistence, je jeví jako velmi významné riziko rozvoje tohoto onemocnění. Cílem disertační práce bylo zjistit vliv genetických polymorfismů destičkových receptorů a stanovit manifestaci rizika vzniku AIM. Byla také provedena korelace mezi pozitivními výsledky funkčních testů a výskytem mutačních stavů jednotlivých destičkových polymorfismů. Podařilo se prokázat signifikantní závislost mezi přítomností mutačního stavu destičkového receptoru COX-1(842A > G), který zvyšuje také riziko krvácení a aspirinovou rezistencí (prokázanou funkčním testem)  $p=0,003$  (Tab. 18). Výskyt polymorfismu COX-1 výše zmíněného jsme prokázali u 7,26 % v souboru 124 pacientů s AIM, což vychází přibližně o 5 % méně ve srovnání se skupinou 1450 zdravých dárců krve ve studii Kvasnička et al., 2009. Vliv pohlaví nebyl prokázán u všech destičkových polymorfismů. Ze získaných dat je patrné, že frekvence

mutovaných stavů destičkových polymorfismů jsou v populaci vysoké a nemusí být jedinou příčinou rezistence na protideštičkovou léčbu a následné recidivy trombotických stavů jako je například AIM. Metodické postupy sloužící k detekci polymorfismů destičkových receptorů jsou technologicky nenáročné a samotná analýza (díky předchozí optimalizaci) není dlouhá. Výhodou těchto metodik je stanovení jednotlivých genotypů s pravděpodobností jistou tj. 100%.

Značnou výhodou je použití in vitro testování s ASA, díky němuž lze rozlišit pacienty, u nichž léčba selhává z exogenních příčin. Pro zajištění účinné sekundární prevence postačuje navýšit množství denní dávky ASA. Neadekvátní odpověď na protideštičkovou léčbu z důvodu přítomnosti polymorfismu destičkového receptoru nepatří mezi časté možnosti. Snaha překonat reziduální agregabilitu destiček po léčbě preferuje jednak intenzifikace dávky dostupných antiagregancií a dále také využívá nových látek s příznivějšími farmakologickými vlastnostmi, než má například clopidogrel. Prasugrel představuje thienopyridin druhé generace s daleko příznivějšími farmakokinetickými i farmakodynamickými vlastnostmi. Jeho biotransformace je méně závislá na CYP než u clopidogrelu a aktivní metabolit se objevuje v krevním oběhu velmi rychle (již po 15 min.). Má nízkou interindividuální variabilitu v účinku, tj. P2Y<sub>12</sub> (ADP) dependentní agregaci destiček a zanedbatelnou prevalenci pacientů vykazujících rezistenci.

Funkční testy pro monitorování protideštičkové terapie nám pomáhají odhalit neúčinnost podávané výše uvedené duální terapie. Na základě našich výsledků in vitro inkubace s ASA lze lépe zajistit účinnou prevenci u pacientů s protideštičkovou terapií ASA a tuto léčbu individualizovat.

## ZÁVĚR

Cílem disertační práce bylo zhodnotit možnosti laboratorního monitorování protidestičkové terapie a dále u specifické rizikové skupiny pacientů s akutním infarktem myokardu určit rezistenci na duální protidestičkovou terapii (aspirinová a thienopyridinová rezistence). Dalším cílem této disertační práce bylo posoudit vliv destičkových polymorfismů na laboratorní selhání duální protidestičkové terapie.

V problematice sledování protidestičkové léčby se nám podařilo pomoci odhalit rozdíly v monitoraci léčby, kdy jsme na základě podrobného zhodnocení provádění jednotlivých testů dokázali porovnat nejpoužívanější vyšetření se shodnými výsledky jak u vyšetření aspirinové rezistence tak zejména thienopyridinové rezistence (komplikovanější situace jelikož je inhibován jen jeden z ADP receptorů). Z palety dostupných vyšetřovacích metod jsme potvrdili jako nejvhodnější LTA či MEA. Pro sledování rizikových pacientů s AIM jsme tedy nejprve využili výše zmíněných funkčních agregačních testů (doplňených o in vitro testování ASA).

Prokázali jsme srovnatelnou citlivost metod a stanovili výskyt rezistence na léčbu kys. acetylsalicylovou na 22,22 resp. 22,21 % (LTA resp. MEA). Na skupině 84 pacientů s kardiovaskulárním onemocněním léčených clopidogrelem stanovili výskyt rezistence na léčbu thienopyridiny na 11,9 resp. 10,7 % (MEA resp. LTA).

Správná účinnost použité protidestičkové terapie byla stanovena po podání 100 mg ANP denně jako cut-off LTA do 25 % včetně a dále pro MEA do 200 AUC. Při posouzení thienopyridinové rezistence tj. po podání 75 mg klopidogrelu denně, je stanoveno cut-off do 45 % u LTA a také do 298 AUC u MEA. Oba funkční testy spolu korelují a ze zjištěných dat je vidět účinnou léčbu po podání ANP (ve výše uvedeném dávkování) u 85,49 % pacientů s akutním infarktem myokardu. Aspirinová rezistence byla funkčními agregačními testy potvrzena u 14,51 % pacientů s AIM. Při pohledu na druhý protidestičkový lék tj. klopidogrel, byla nalezena menší část pacientů 74,2 % adekvátně odpovídajících na tuto léčbu. Thienopyridinová rezistence byla prokázána shodně LTA i MEA a činí 25,8 %.

Při identifikaci možných genetických příčin rezistence na protidestičkovou léčbu v práci se nám podařilo prokázat statisticky významnou korelaci mutačního stavu COX-1 receptoru (-842A>G; rs10306114) s přítomností rezistence na ASA, ale nepodařilo se prokázat staticky významnou souvislost mezi mutacemi P2Y12 (i-744T>C; rs2046934) a P2Y12 (34C>T; rs6785930) a funkčním průkazem thienopyridinové rezistence.

Rezistence na protidestičkovou terapii může mít řadu endogenních, ale také exogenních příčin. Provést in vitro simulaci thienopyridinové rezistence je velmi komplikované zejména díky způsobu metabolizace klopidogrelu. Jednou z možností jak tyto příčiny odhalit v případě aspirinové rezistence je využití in vitro inkubace vzorku rizikového pacienta s kyselinou acetylsalicylovou a následnou detekci pomocí MEA. Tento postup umožňuje přesně odlišit pacienty, kteří nedokáží odpovědět na denní dávky ASA až 500 mg. V případě takto potvrzených neodpovídajících pacientů je nutno zvážit další postup léčby tzn. ASA z léčby vyjmout a v případě stále trvajících rizika např. dalšího akutního infarktu myokardu, nasadit jiný protidestičkový lék (prasugrel, ticagrelor) nebo také antikoagulační léčbu indikovanou kardiologem v podobě warfarinu či dle možností indikace i nový antitrombotický lék (dabigatran, rivaroxaban, apixaban).

Při posouzení vztahu aspirinové rezistence a endogenních faktorů jsme se zaměřili na vztah polymorfismů destičkových receptorů COX-1, GP1bA a také GPVI. Při posouzení vztahu thienopyridinové rezistence a endogenních faktorů jsme se zaměřili na polymorfismy destičkových receptorů P2Y<sub>12</sub> (C34T; T744C), GP1bA a také GPVI.

Získaná data potvrzují, že výskyt polymorfismů destičkových faktorů není primární rizikový faktor. Hlavním rizikovým faktorem pro pacienty s akutním infarktem myokardu zůstává rezistence na protidestičkovou terapii. Byla prokázána signifikantní závislost mezi přítomností mutačního stavu COX-1 destičkového receptoru a rezistencí na protidestičkovou léčbu po podání ASA ( $p = 0,003$ ). In vitro inkubace s ASA vede k senzitivnější diagnostice aspirinové rezistence eventuelně k úpravě dávkování ASA terapie. Nepodařilo se prokázat staticky významnou souvislost mezi mutacemi P2Y<sub>12</sub> (i-744T>C; rs2046934) a P2Y<sub>12</sub> (34C>T; rs6785930) a funkčním průkazem thienopyridinové rezistence.

Tato disertační práce poukazuje na nové možnosti laboratorní diagnostiky při prevenci akutního infarktu myokardu, ale také dalších diagnóz využívajících v léčbě protidestičkovou terapii (neurologie, angiologie). Může být očekáváno, že v budoucnu by například postupy založené na in vitro testování, mohly rozšířit současné diagnostické postupy. Tento postup monitorování protidestičkové terapie u pacientů s AIM se ukazuje jako velmi účinný a je možné jej využívat i v rutinní laboratorní diagnostice.

## LITERATURA

Abaci O, Kilickesmez KO (2013) Aspirin resistance: Where are we now? *Anadolu Kardiol Derg.* **13**(4), 370-3.

Aditya S (2012) Oral and parenteral anticoagulants: new kids on the block. *J Postgrad Med.* **58**(4), 275-85.

Alexander JH, Becker RC, Bhatt DL (2009) Apixaban, an oral, direct, selective factor Xa inhibitor, in combination with antiplatelet therapy after acute coronary syndrome: results of the APPRAISE trial. *Circulation* **119**, 2877–2885.

Alexopoulos D, Xanthopoulou I, Gkizas V, Kassimis G, Theodoropoulos KC, Makris G, Koutsogiannis N, Damelou A, Tsigkas G, Davlouros P, Hahalis G (2012) Randomized assessment of ticagrelor versus prasugrel antiplatelet effects in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Interv.* **5**(6), 797-804.

Ang L, Palakodeti V, Khalid A, et al. (2008) Elevated plasma fibrinogen and diabetes mellitus are associated with lower inhibition of platelet reactivity with clopidogrel, *J Am Coll Cardiol*, **52**, 1052–1059.

Angiolillo DJ (2009) Variability in responsiveness to oral antiplatelet therapy, *Am J Cardiol.* **103** (3 Suppl), 27A-34A.

Angiolillo DJ, Ueno M (2011) Optimizing platelet inhibition in clopidogrel poor metabolizers: terapeutik options and practical considerations. *JACC Cardiovasc Interv.* **4**, 411-4.

Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. (2005) Variability in platelet aggregation following sustained aspirin and clopidogrel treatment in patients with coronary heart disease and influence of the 807 C/T polymorphism of the glykoprotein Ia gene, *J Am Coll Cardiol.* **96**, 1095.



Antoniades C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Stefanadi E, Marinou K, Stefanadis C (2006) Genetic polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and the risk for premature myocardial infarction: effects on the release of sCD40L during the acute phase of premature myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **47**, 1959-1966.

Ashavaid TF, Todur SP, Kondkar AA, Nair KG, Shalia KK, Dalal JJ, Rajani R, Ponde CK (2011) Platelet polymorphisms: frequency distribution and association with coronary artery disease in an Indian population. *Platelets* **22**(2), 85-91.

Bagoly Z, Sarkady F, Magyar T, Kappelmayer J, Pongrácz E, Csiba L, Muszbek L (2013) Comparison of a New P2Y<sub>12</sub> Receptor Specific Platelet Aggregation Test with Other Laboratory Methods in Stroke Patients on Clopidogrel Monotherapy, *PLoS One* **8** (7), 1-11.

Berny-Lang MA, Jakubowski JA, Sugidachi A, Barnard MR, Michelson AD, Frelinger AL (2013) P2Y<sub>12</sub> Receptor Blockade Augments Glycoprotein IIb-IIIa Antagonist Inhibition of Platelet Activation, Aggregation, and Procoagulant Activity. *J Am Heart Assoc.* **2**(3), 1-10.

Blais N, Pharad Ch, Lordkipanidze M, et al. (2009) Response to aspirin in healthy individuals. Cross-comparison of light transmission aggregometry, VerifyNow system, platelet count drop, thromboelastography (TEG) and urinary 11-dehydrothromboxane B<sub>2</sub>, *Thromb Haemost* **102**, 404-411.

Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, et al. (2008) 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.* **51**, 1404–1411.

Breugelmans J, Vertessen F, Mertens G, Gadisseur A, Der Planken MV (2008) Multiplate whole blood impedance aggregometry: a recent experience. *Thromb. Haemost.* **100**, 725–726.

Büller HR, Agnelli G, Hull RD, Hyers TM, Prins MH, Raskob GE (2005) Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* **127**(1), 416.

Calatzis A, Wittwer M, Krueger B (2004) A new approach to platelet function analysis in whole blood – the multiplate analyzer. *Platelets* **15**, 479–517.

Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, et al. (2007) Platelet aggregation studies: autologous platelet poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet rich plasma to normalize platelet count, *Haematologica* **92**: 694–697.

Cuisset T, Frere C, Quilici J, et al. (2009) Aspirin noncompliance is the major cause of „aspirin resistance“ in patients undergoing coronary stenting. *Am Heart J.* **157** (5): 889-893.

Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W (1991) The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* **30**(43), 10363-70.

Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S (2002) Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* **105**, 1650–1655.

Faber E a kolektiv (2012) Základy hematologické diagnostiky, pp 42-43, Univerzita Palackého v Olomouci.

Ferraris VA, Ferraris SP, Saha SP (2011) Antiplatelet drugs: mechanisms and risks of bleeding following cardiac operations. *Int J Angiol* **20**(1), 1-18.

Frelinger AL, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, Barnard MR, Michelson AD (2006) Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation* **113**, 2888–2896.

Fugate JE, Giraldo EA, Rabinstein AA (2010) Thrombolysis for cerebral ischemia. *Front Neurol.* **29**; 1:139.

Geisler T, Schaeffeler E, Gawaz M, Schwab M (2013) Genetic variation of platelet function and pharmacology: An update of current knowledge. *Thromb. Haemost.* **110**, 876–887.

Goel D (2013) Ticagrelor: The first approved reversible oral antiplatelet agent. *Int J Appl Basic Med Res.* **3**(1), 19-21.

Golanski J, Syska K, Watala C (2013) Revival of PFA-100--how far is it useful for the monitoring of ADP receptor antagonists? *Thromb Haemost.* **109**(3), 564-5.

Goldstein P, Elalamy I, Huber K, Danchin N, Wiel E (2013) Rivaroxaban and other non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in the emergency treatment of thromboembolism. *Int J Emerg Med.* **6**(1), 1-9.

Goodman T, Sharma P, Ferro A (2007) The genetics of aspirin resistance. *Int. J. Clin. Pract.* **61**, 826–834.

Goodman T, Ferro A, Sharma P (2008) Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol* **66**, 222–232.

Gremmel T, Perkmann T, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW, Steiner S (2013) Differential Impact of Inflammation on Six Laboratory Assays Measuring Residual Arachidonic Acid-Inducible Platelet Reactivity During Dual Antiplatelet Therapy. *J Atheroscler Thromb.* **20**, 1-16.

Gurbel PA, Tandry US (2007) Clopidogrel resistance ? *Thrombosis Research* **120**, 311–321.

Havránek T (1993) Statistika pro biologické a lékařské vědy.- Academia, Praha

Helgason CM, Hoff JA, Kondos GT, Brace LD (1993) Platelet aggregation in patients with atrial fibrillation taking aspirin or warfarin. *Stroke* **24**,1458–1461.

Hezard N, Metz D, Nazeyrollas P, Droulle C, Potron G, Nguyen P (2002) PFA-100 and flow cytometry: can they challenge aggregometry to assess antiplatelet agents, other than GPIIb/IIIa blockers, in coronary angioplasty? *Thromb. Res.* **108**, 43–47.

Hirmerová J (2009) Aspirinová rezistence – současné názory a doporučení pro praxi, *Interní Med.* **11**(9), 384-388.

Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W (2000) Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb. Haemost.* **83**, 316–321.

Huang Y, Li M, Li JY, Li M, Xia YP, Mao L, Hu B (2013) The Efficacy and Adverse Reaction of Bleeding of Clopidogrel plus Aspirin as Compared to Aspirin Alone after Stroke or TIA: A Systematic Review. *PLoS One* **8**(6), 1-6.

Karger R, Donner-Banzhoff N, Müller HH, Kretschmer V, Hunink M (2007) Diagnostic performance of the platelet function analyzer (PFA-100) for the detection of disorders of primary haemostasis in patients with a bleeding history-a systematic review and meta-analysis. *Platelets* **18**(4), 249-60.

Hanke AA, Roberg K, Monaca E, Sellmann T, Weber CF, Rahe-Meyer N, Görlinger K (2010) Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate). *Eur J Med Res.* **15**(5), 214-9.

Kasthuri RS, Glover SL, Boles J, Mackman N (2010) Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor as key regulators of global hemostasis: measurement of their levels in coagulation assays. *Semin Thromb Hemost.* **36**(7), 764-71.

Kehrel BE, Brodde MF (2013) State of the art in platelet function testing. *Transfus Med Hemother.* **40**(2), 73-86.

Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR (2008) Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* Jan 26; **336** (7637), 195-8.

Kreutz RP, Nystrom P, Kreutz Y, Miao J, Kovacs R, Desta Z, Flockhart DA, Jin Y (2013) Inhibition of platelet aggregation by prostaglandin E1 (PGE1) in diabetic patients during therapy with clopidogrel and aspirin. *Platelets* **24**(2), 145-50.

Kroupis C, Theodorou M, Kounavi M, Oliveira SC, Iliopoulou E, Mavri-Vavayanni M, Melissari EN, Degiannis D (2009) Development of a real-time PCR detection method for a FCGR2A polymorphism in the LightCycler and application in the heparin-induced thrombocytopenia syndrome, *Clin Biochem* **42**, 1685-93.

Kvasnička J, Hajkova J, Bobčikova P, Křížova P, Duškova D, Poletinova Š, Kieferova V (2008) Polymorfizmy krevních destiček a možnosti monitorace účinku protideštičkové léčby. *Interv Akut Kardiol* **7**(6): 215–218.

Lechner K, Kyrle PA (1995) Antithrombin III concentrates--are they clinically useful? *Thromb Haemost.* **73**(3), 340-8.

Lepäntalo A, Mikkelsen J, Reséndiz JC, Viiri L, Backman JT, Kankuri E, Karhunen PJ, Lassila R (2006) Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost.* **95**(2): 253-9.

Levy-Toledano S, Gallet C, Nadal F, Bryckaert M, Maclouf J, Rosa JP (1997) Phosphorylation and dephosphorylation mechanisms in platelet function: a tightly regulated balance. *Thromb Haemost.* **78**(1), 226-33.

Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, et al. (2008) Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary, *J Thromb Haemost* **6**: 677–683.

Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ (2012) Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost.* **38**(6), 565-75.

Lüllmann H, Mohr K, Wehling M (2009) Toxikologie a farmakologie, pp. 170–352, Grada Publishing, Praha.

Malý M (2003), Antiagregační léčba blokátory adenosindifosfátového receptoru, *Remedia* **13**, 110–116.

Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, et al. (2005) Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin, *J Tromb Haemost* **3**, 2340-2345.

Matýšková M, Zavřelová J, Hrachovinová I (1999) Hematologie pro zdravotní laboranty, 2. díl Krevní srážení, pp 7-80, 186-199, IDVPZ Brno, Brno.

Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD (2012) Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* **366**, 9–19.

Mega J, Carreras ET (2012) Antithrombotic therapy: triple therapy or triple threat? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. pp. 547-552.

Mehta J, Mohandas B (2010) Aspirin resistance? Fact or fiction? A point of view. *World J Cardiol* **26**, 280–288.

Michelson AD (2008) P2Y12 antagonism: promises and challenges. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(3), 33-38.

Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW, Gurbel P, Kottke-Marchant K, Kunicki TJ, Pulcinelli FM, Cerletti C, Rao AK (2005) Aspirin resistance: position paper of the Working group on aspirin resistance. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1309–1311.

Motovska Z, Kvasnicka J, Widimsky P, Petr R, Hajkova J, Bobcikova P, Osmancik P, Odvodyova D, Katina S (2010) Platelet glycoprotein GP VI 13254C allele is an independent risk factor of premature myocardial infarction. *Thromb Res* **125**(2), 61-64.

Mueller T, Dieplinger B, Poelz W, et al. (2007) Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate analyzer - comparison with two flow cytometric methods, *Thromb Res* **121**, 249–258.

Muzbeck L, Yee VC, Hevessy Z (1999) Blood coagulation factor XIII: Structure and function. *Thromb Res* **94**, 271–305.

Nordeen JD, Patel AV, Darracott RM, Johns GS, Taussky P, Tawk RG, Miller DA, Freeman WD, Hanel RA (2013) Clopidogrel Resistance by P2Y12 Platelet Function Testing in Patients Undergoing Neuroendovascular Procedures: Incidence of Ischemic and Hemorrhagic Complications. *J Vasc Interv Neurol.* **6**(1), 26-34.

Oldgren J, Budaj A, Granger CB (2011) Dabigatran vs placebo in patients with acute coronary syndromes on dual antiplatelet therapy: a randomized, double-blind, phase II trial. *Eur Heart J* **32**, 2781–2789.

Ollikainen E, Mikkelsen J, Perola M, Penttila A, Karhunen PK (2004) Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary

thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* **176**, 95-99.

Orkin SH, Zon LI (2002) Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol.* **3(4)**, 323-328.

Paulu P, Osmancik P, Tousek P, Minarik M, Benesova L, Motovska Z, Bednar F, Kocka V, Widimsky P (2013) Lack of association between clopidogrel responsiveness tested using point-of-care assay and prognosis of patients with coronary artery disease, *J Thromb Thrombolysis* **36**,1-6.

Pecka M (2002) Laboratorní hematologie v přehledu - Buňka a krvetvorba, pp 152-154, FINIDR, Český Těšín.

Pecka M (2004) Laboratorní hematologie v přehledu - fyziologie a patofyziologie hemostázy, pp 208-230, FINIDR, Český Těšín.

Pecka M (2010) Preanalytická fáze. Praktická hematologie, (Pecka M., ed.), pp. 43-55, 315-318, Finidr, Český Těšín.

Penka M, Buliková A, Matýšková A, Zavřelová J (2001), Hematologie I, Neonkologická hematologie, pp 99-175, Grada Publishing, spol s.r.o., Tiskárky Havlíčkův Brod, a.s.

Penka M, Tesařová E a kolektiv (2011) Hematologie a transfuzní lékařství I, Hematologie, pp 27-29, 222-239, Grada, Praha.

Penz SM, Bernlochner I, Tóth O, Lorenz R, Calatzis A, Siess W (2010) Selective and rapid monitoring of dual platelet inhibition by aspirin and P2Y12 antagonists by using multiple electrode aggregometry. *Thromb J* **8(9)**, 1-8.

Povsic TJ, Wargin WA, Alexander JH, Krasnow J, Krolick M, Cohen MG, Mehran R, Buller CE, Bode C, Zelenkofske SL, Rusconi CP, Becker RC; RADAR Investigators, (2011) Pegnivacogin results in near complete FIX inhibition in acute coronary syndrome patients: RADAR pharmacokinetic and pharmacodynamic substudy. *Eur Heart J.* **32(19)**, 2412-9.

Queiroz Fernandes Araujo JO, Veloso HH, Braga De Paiva JM, et al. (2004) Efficacy and safety of abciximab on acute myocardial infarction treated with percutaneous coronary interventions: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Am Heart J*, **148**, 937–943.

Pavlík J, a kol. (2005) Aplikovaná statistika, pp 111-115, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, VŠCHT Praha.

Salles II, Feys HB, Iserbyt BF, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H (2008) Inherited traits affecting platelet function. *Blood Rev.* **22**(3): 155-72.

Selwyn AP (2003) Prothrombotic and antithrombotic pathways in acute coronary syndromes, *Am J Cardiol* 91, 3H-11H.

Shenkman B, Matetsky S, Feper P, Hod H, Einav Y, Lubetsky A, Varon D, Avion N (2008) Variable responsiveness to clopidogrel and aspirin among patients with acute coronary syndrome as assessed by platelet functions tests. *Thromb. Res.* **122**, 336–345.

Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N, Steg PG, Ferrieres J, Danchin N, Becquemont L (2009) Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med.* **360**, 363-75.

Siller-Matula JM, Spiel AO, Lang IM, Kreiner G, Christ G, Jilma B (2009) Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am Heart J.* **157**,148.e1-5.

Silva FB, Almeida Junior GL, Neno A, Kezen J, Spelta M, Godomiczer A, Villela R, Hellmuth B, Xavier SS, Lins RH (2012) Resistance to clopidogrel: prevalence and associate variables. *Arq Bras Cardiol.* **99**(6), 1135-41.

Slavík L, Úlehlová J, Krcová V, Hlusi A, Indraková J, Hutýra M, Galuszka J, Indrak K (2011) Detection of clopidogrel resistance by MEA and LTA. *Transfuze a hematologie dnes*, **17**: 92-96.



Seyfert UT, Haubelt H, Vogt A, et al. (2007) Variables influencing Multiplate(TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals, *Platelets* **18**, 199–206.

Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J (2005), *Metody molekulární biologie*, pp 73-106, Brno, Masarykova univerzita.

Špác J (2010) Současná antiagregační terapie v praxi, *Via Pract* **7**, pp. 5-13.

Ueno M, Rao SV, Angiolillo DJ (2010) Elinogrel: pharmacological principles, preclinical and early phase clinical testing. *Future Cardiol.* **6**(4): 445–453.

Ulehlova J, Slavik L, Krcova V, Hutyra M, Galuszka J, Indrak K (2011) The assessment of aspirin resistance by using light transmission and multiple electrode aggregometry, *Int J Lab Hematol.* **33** (3):305-9. doi: 10.1111/j.1751-553X.2010.01286.x. Epub 2011 Jan 11.

Vandvik PO, Lincoff AM, Gore JM, Gutterman DD, Sonnenberg FA, Alonso-Coello P, Akl EA, Lansberg MG, Guyatt GH, Spencer FA (2012) Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest.* **141**(Suppl 2): 637S-68S.

Weber CF, Görlinger K, Meininger D, Herrmann E, Bingold T, Moritz A, Cohn LH, Zacharowski K (2012) Point-of-care testing: a prospective, randomized clinical trial of efficacy in coagulopathic cardiac surgery patients. *Anesthesiology* **117**(3), 531-47.

Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. (2007) Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndrome. *NEJM* **357**, 2001–2015.

White HD, Chew DP, Dauerman HL, Mahaffey KW, Gibson CM, Stone GW, Gruberg L, Harrington RA, Bhatt DL (2012) Reduced immediate ischemic events with cangrelor in PCI: a pooled analysis of the CHAMPION trials using the universal definition of myocardial infarction. *Am Heart J.* **163**(2): 182–190.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **17**, 387-403.

Woo KS, Kim BR, Kim JE, Goh RY, Yu LH, Kim MH, Han JY (2010) Determination of the prevalence of aspirin and clopidogrel resistances in patients with coronary artery disease by using various platelet-function tests. *Korean J Lab Med.* **30**(5), 460-8.

Zee RY, Michaud SE, Diehl KA, Chasman DI, Emmerich J, Gaussem P, Aiach M, Ridker PM (2008) Purinergic receptor P2Y<sub>1</sub>, G-protein coupled, 12 gene variants and risk of incident ischemic stroke, myocardial infarction, and venous thromboembolism. *Atherosclerosis* **197**(2), 694-699.

Zimmermann N, Hohlfeld T (2008) Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb Haemost.* **100**(3): 379-390.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACT	aktivovaný srážecí čas
ADP	adenosindifosfát
AChE	acetylcholinesterasa
AIM	akutní infarkt myokardu
APC	aktivovaný protein C
aPTT	aktivovaný parciální tromboplastinový čas
ARU	aspirin reaction units
ASA	kyselina acetylsalicylová
AT	antitrombin
ATP	adenosintrifosfát
AU	agregační jednotka
AUC	plocha pod křivkou
BFU	pluripotentní kmenová buňka
Ca <sup>2+</sup>	vápenaté ionty
CFU	unipotentní kmenová buňka
COX	cyklooxygenasa
CSF	colony stimulating factors
CT	closure time
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTI	přímý inhibitor trombinu
GAGs	glykosaminoglykany
GP	glykoprotein
HC II	heparinový kofaktor II
HMWK	vysokomolekulární kininogen

ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
LMWH	nízkomolekulární heparin
LTA	optická agregometrie
MEA	vícenásobná elektrodová agregometrie
MLCK	myosinkinasa
MPV	střední objem krevní destičky
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PAR	receptor pro trombin
PDGF	růstový faktor z destiček
PC	protein C
Pct	destičkový hematokrit
PDW	šíře distribuce destiček
PF 3	destičkový faktor 3
PF 4	destičkový faktor 4
PGE <sub>1</sub>	prostaglandin E <sub>1</sub>
PGI <sub>2</sub>	prostaglandin I <sub>2</sub>
PI	fosfolipidy
PLC	proteinkinasa C
PPP	plazma chudá na destičky
PRP	plazma bohatá na destičky
PRU	P2Y <sub>12</sub> Reaction Units
RNA	ribonukleová kyselina
RT PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SNP	jednonukleotidová záměna
TEN	tromboembolická příhoda, nemoc
TF	tkáňový faktor
TFPI	inhibitor tkáňového faktoru
TG	tromboglobulin
TM	trombomodulin
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TPO	trombopoetin
TXA <sub>2</sub>	tromboxan A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	tromboxan B <sub>2</sub>
UFH	nefrakcionovaný heparin
VASP	vasodilatátorem stimulová fosfoprotein
VKORC1	vitamín K epoxid reduktasa

## PUBLIKACE

### Původní vědecké publikace přímo související s tématem disertační práce uveřejněné v recenzovaných či impaktovaných časopisech

1. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Hutyra M., Galuszka J., Indrak K. The assessment of aspirin resistance by using light transmission and multiple electrode aggregometry. *Int J Lab Hematol.* 2011 Jun;**33**(3):305-9. doi: 10.1111/j.1751-553X.2010.01286.x. Epub 2011 Jan 11., **IF 1,176**
2. Slavík L., Úlehlová J., Krčová V., Hluší A., Indráková J., Hutyra M., Galuszka J., Indrak K. Detection of clopidogrel resistance by MEA and LTA. *Transfuzie a hematologie dnes* 2011;**2**:92-96.
3. Úlehlová J., Slavík L., Kučerová J., Krčová V., Václavík J., Indrak K. Genetické polymorfismy destičkových receptorů u mladých pacientů s akutním infarktem myokardu (AIM) a rezistencí k protideštičkové léčbě. *Transfuzie a hematologie dnes* 2012;**1**:14-18.
4. Ulehlova J., Slavik L., Kucerova J., Krcova V., Vaclavik J., Indrak K. Genetic Polymorphisms of Platelet Receptors in Patients with Acute Myocardial Infarction and Resistance to Antiplatelet Therapy. *Genetic testing and molecular biomarkers* 2014; **18** (9): 599-604., **IF 1,464**

### Původní a přehledné vědecké publikace nepřímou související s tématem disertační práce uveřejněné v recenzovaných či impaktovaných časopisech

5. Slavik L., Novak M., Ulehlova J., Prochazka M., Prochazkova J., Lattova V., Polak P., Pilka R. Possibility of Coagulation System Activation Determination with Tissue Factor in Pregnancy Complications. *Clin. Lab.* 2016 **62** (10) :1851-1856. **IF 0,84**
6. Janek D., Slavik L., Ulehlova J., Krcova V., Hlusi A., Prochazkova J. Validation of a new panel of automated chemiluminescence assays for anticardiolipin antibodies in the screening for antiphospholipid syndrome. *Clin Lab.* 2016 Jul 1;**62**(7):1309-1315. **IF 0,936**
7. Slavik L., Svobodova G., Ulehlova J., Krcova V., Hlusi A., Prochazkova J., Hutyra M. Polymorphism of the Fcy Receptor II as a Possible Predisposing

- Factor for Heparin-Induced Thrombocytopenia. Clin. Lab 2015; **61**(8):1027-1032. **IF 0,936**
8. Prochazka M., Procházková J., Lubušský M., Pilka R., Úlehlová J., Michalec I., Polák P., Kacerovský M., Slavík L.: Markers of Endothelial Activation in Preeclampsia. Clin. lab. 2015, **61**(1-2):39-46. **IF 0,936**
  9. Šaňák D., Hutýra M., Král M., Veverka T., Bártková A., Kunčarova A., Dorňák T., Franc D., Kaňovský P., Fedorco M., Galuzska J., Vindiš D., Skála T., Táborský M., Čecháková E., Tüdös Z., Černá M., Köcher M., Úlehlová J., Slavík L., Zapletalová J., Langová K., Herzig R., Školoudík D.: Heart arrhythmias in young patients with cryptogenic ischemic stroke. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2015 Jun;**159**(2):283-7. IF 0,924
  10. Prochazkova J., Slavik L., Ulehlova J., Prochazka M. The role of tissue factor in normal pregnancy and in the development of preeclampsia. A review. Biomedical papers 2014; **159**(2), DOI:10.5507/bp.2014.061 review IF 1,200
  11. Slavik L., Ulehlova J., Krcova V., Hlusi A., Indrakova J., Hutýra M., Galuszka J., Indrak K.: Detection of Clopidogrel Resistance Using ADP Induced Aggregometry with Specific Inhibitor PGE1. Clin. Lab. 2014(**60**):1475-1480. IF 1,129
  12. Slavik L., Svobodova G., Ulehlova J., Krcova V., Hlusi A., Prochazkova J., Kaletova M., Hrcakova Y., Indrak K. The Advantages and Limitations of Impedance Aggregometry in Detection of Heparin-Induced Thrombocytopenia. Clin. Lab. 2014 **08**:1319-1324., DOI:10.7754 IF 1,129
  13. Lattová V., Procházková J., Procházková J., Ulehlová J., Slavík L., Lubušský M., Brychtová P. Preeclampsia and thrombin generation test. Ceska Gynekologie 2013; **78** (5) :466-72.
  14. Procházková J., Procházková M., Slavík L., Úlehlová J., Dhaifalah I., Lubušský M., Šimětka O. Dysfunkce endotelu u těhotných s chronickou formou hypertenze. Česká Gynekologie 2013, **78** (3), 230-236.
  15. Filipčíková R., Březinová J., Oborná I., Blažková Z., Krčová V., Slavík L., Úlehlová J., Hluší A., Bezdičková M. Výskyt vybraných geneticky podmíněných trombofilních markerů u pacientek podstupujících léčbu neplodnosti. Česká Gynekologie 2013, **78** (1), 73-77.
  16. Slavík L., Svobodová G., Úlehlová J., Krčová V., Hluší A., Procházková J. Současné možnosti laboratorní diagnostiky heparinem indukované trombocytopenie. *Transfúze a hematologie dnes* 2013;**2**:76-80.
  17. Krčová V., Hluší A., Palová M., Slavík L., Úlehlová J. Nová antikoagulancia – možnosti monitorování antikoagulačního účinku (dabigatran). *Interní Medicína pro Praxi* **14** (8-9), 318-321.
  18. Král M., Školoudík D., Šaňák D., Veverka T., Bártková A., Dorňák T., Hutýra M., Vindiš D., Úlehlová J., Slavík L., Šváblová M., Kubičková V., Herzig R., Kaňovský P. Assessment of relationship between acute ischemic stroke and heart disease- protocol of a prospective observational trial. 2012 *Biomedical Papers* **156**, 284-289. **IF 1,200**

19. Slavík L., Procházková J., Procházka M., Šimetka O., Hluší A., Úlehlová J. The pathophysiology of endothelial function in pregnancy and the usefulness of endothelial markers. 2011 *Biomedical Papers* **155**, 219-224. IF 0,99
20. Lattová V., Procházka M., Úlehlová J. Trombin generační test u fyziologické a rizikové gravidity. *Česká Gynekologie* 2011, **76** (5), 367-370.
21. Hluší A., Slavík L., Úlehlová J., Krčová V., Zapletalová J., Indrák K. Globální hodnocení funkce hemostázy – Část II. Vlastní zkušenosti s použitím trombin generačního testu u pacientů s trombofilií. *Transfúze a hematologie dnes* 2010;**3**:121-125.
22. Slavík L., Úlehlová J., Hluší A., Procházková J., Procházka M., Krčová V., Indrák K. Mikropartikule. *Vnitřní lékařství* 2010; **56**(SUPPL. 1), S112-S116.
23. Hluší A., Slavík L., Úlehlová J., Krčová V., Indrák K. Globální hodnocení funkce hemostázy – Část I. Trombin generačního test. *Transfúze a hematologie dnes* 2010;**2**:65-70.
24. Procházková J., Dhaifallah I., Měchurová A., Pilka R., Šimetka O., Slavík L., Úlehlová J., Lubušský M., Procházka M. Monitorování hladin markerů aktivity endotelu během fyziologické gravidity. *Česká Gynekologie* 2010, **75** (2), 92-100.
25. Rehák M., Krčová V., Slavík L., Fric E., Langová K., Úlehlová J., Řehák J. The role of thrombophilia in patients with retinal vein occlusion and no systemic risk factors. *Canadian journal of Ophthalmology* 2010, **45** (2), 171-175. **IF 1,294**
26. Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Procházka M., Úlehlová J., Indrák K. Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics. 2009 *Biomedical Papers* **153**, 19-26.

### **Publikovaná abstrakta – 1.autor**

1. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Bártková A., Král M., Vlachová I. Detection of aspirin resistance in secondary prevention of ischemic stroke. 20<sup>th</sup> International Congress on Thrombosis. 25.-28.6.2008 Atény, Řecko. poster, abstrakta
2. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Procházková J., Hluší A., Klusová N., Novotný D., Vlachová I. Metody stanovení rezistence na protidestičkovou léčbu. Pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy a Slezska. 14.-15.11.2008 Hotel Tennis Club Prostějov. přednáška
3. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Bártková A., Král M., Vlachová I., Novotný D. Srovnání detekce aspirinové rezistence optickou agregometrií a ELISA testem. 2. Národní kongres ČSTH ČLS JEP 2008. 20.-21.11.2008 Clarion Congress Hotel Praha. přednáška, abstrakta
4. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Procházková J., Hluší A., Čech L., Ditmar D. Laboratorní monitorování dabigatranu během ortopedických výkonů. XVI.

Česko-Slovenská konference o trombóze a hemostáze s mezinárodní účastí  
21.-23.5.2009 Hradec Králové. přednáška, abstrakta

5. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Procházková J., Hluší A., Čech L. Laboratory monitoring of dabigatran during orthopedic surgery. Poster, XXII<sup>th</sup> Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 11.-16.7.2009 Boston. poster, abstrakta
6. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Procházková J., Hluší A. Klinický význam vyšetření rezistence na současnou antiagregační terapii. IV. Bratislavské hematologické a transfuziologické dni s mezinárodní účastí 15.-17.10.2009 Bratislava. přednáška, abstrakta
7. Úlehlová J., Slavík L. Monitorace přímých a nepřímých inhibitorů trombinu. Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy 20.-21.11.2009 Prostějov. přednáška
8. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Procházková J., Hluší A. Zvýšená hladina koagulačních faktorů jako riziko trombofilie. XVII. Slovensko-Česká konference o hemostáze a trombóze s mezinárodní účastí, hotel Victoria, Martin 20.-22.5.2010. přednáška, abstrakta
9. Úlehlová J., Kačalová P., Chalupníková P., Ježáková J., Sečkařová M., Sýkorová M. Slavík L., Aktuální diagnostika von Willebrandovy nemoci. 13.Konference zdravotních laborantů. 25.6.2010 Olomouc. přednáška, abstrakta
10. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Procházková J., Hluší A. Are high levels of coagulation factors IX and XI risk factor of thrombophilia? 21<sup>st</sup> International Congress on Thrombosis. 6.-9.7.2010 Miláno, Itálie. poster, abstrakta
11. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Galuska J., Václavík J., Hutýra M. Monitorace protidestičkové léčby. Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy 12.-13.11.2010 Prostějov. přednáška
12. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Galuska J., Václavík J. Vyšetření účinnosti antiagregační léčby u mladých pacientů s IM. X. a XI. Česko-Slovenská konference laboratorní hematologie s mezinárodní účastí. 2. a 3.12.2010 Hradec Králové. přednáška, abstrakta
13. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Galuska J., Václavík J. Genetické polymorfismy destičkových receptorů a jejich vliv na rezistenci k protidestičkové léčbě u mladých pacientů s AIM. XVIII. Česko-Slovenská konference o trombóze a hemostáze s mezinárodní účastí. 19. a 21.5.2011 Hradec Králové. přednáška, abstrakta
14. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Galuszka J., Václavík J. Platelet gene polymorphisms related to acute myocardial infarction in young patients. Poster,



XXIII<sup>th</sup> Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis  
23.-28.7.2011 Kyoto. poster, abstrakta

15. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Hluší A. Možnosti vyšetření přímých inhibitorů trombinu. Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť střední a severní Moravy 4.-5.11.2011, Prostějov. přednáška
16. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Václavík J., Galuszka J., Kucerova J. Relationship between platelet gene polymorphisms and platelet aggregation in patients with acute myocardial infarction. Poster, 56. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hamostaseforschung e.V. 1.-4.2.2012. St. Gallen, Switzerland. poster, abstrakta
17. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Palová M., Indrák K. Možnosti vyšetření přímých inhibitorů trombinu. XIX. Slovensko-Česká konference o hemostáze a trombóze s mezinárodní účastí. 24.-26.5.2012 Martin. přednáška, abstrakta
18. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Palová M. Rozlišení endogenních a exogenních příčin ASA rezistence in vitro. XXVI. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. 24.-26.6.2012 Olomouc. poster, abstrakta
19. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Palová M. In vitro monitorování inhibice agregace trombocytů ASA. XVI. Česko-Slovenský hematologický a transfuziologický sjezd. XIII. Česko-slovenská konference laboratorní hematologie. 5.-8.9.2012 Brno. přednáška, abstrakta
20. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Palová M. Možnosti laboratorní kontroly nových antitrombotik – update 2012. Tradiční pracovní setkání spolupracujících hematologických a onkologických pracovišť Moravy a Slezska 9.-10.11.2012, Prostějov. přednáška
21. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Václavík J., Kucerova J. Determination mutation status of platelet polymorphisms in patients with acute myocardial infarction. Poster, 57. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hamostaseforschung e.V. 20.-23.2.2013. St. Mnichov, Německo. poster, abstrakta
22. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Palová M. Možnosti laboratorní kontroly nových antitrombotik. XXVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. 12.-14.5.2013 Olomouc. poster, abstrakta
23. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Hluší A., Procházková J., Palová M. In vitro detekce inhibice agregace trombocytů acetylsalicylovou kyselinou. XXVII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí. 12.-14.5.2013 Olomouc. poster, abstrakta

24. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Václavík J., Kučeorová J. Determination of the status of platelet polymorphisms in patients with acute myocardial infarction. 17<sup>th</sup> International of the Danubian League against thrombosis and haemorrhagic disorders. XX. Česko-Slovenská konference o trombóze a hemostáze s mezinárodní účastí. 22.- 25.5.2013 Hradec Králové. přednáška, abstrakta
  
25. Ulehlova J., Slavik L., Krcova V., Vaclavik J., Kucerova J. Methods for detection of ASA resistance in vitro. Poster, XXIV<sup>th</sup> Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 29.6.-4.7.2013 Amsterdam. poster, abstrakta
  
26. Úlehlová J., Slavík L., Krčová V., Václavík J., Indrák K. In vitro monitoring of response to ASA. XIV. Slovensko-české dni laboratórnej hematologie a transfuziológie 15.-16.10.2013, Bratislava. přednáška, abstrakta