

Katedra Kardiologii, I Klinika Kardiologii Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

oraz

Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Małgorzata Duszyńska

Maria Jamrozek-Jedlińska

**OCENA OPORNOŚCI NA SKOJARZONE LECZENIE
PRZECIWPŁYTKOWE U CHORYCH Z TROPONINODODATNIM
OSTRYM ZESPOŁEM WIEŃCOWYM LECZONYCH INWAZYJNIE**



Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Mieczysław Komarnicki

Prof. UM dr hab. med. Tatiana Mularek-Kubzdela

Poznań, 2013

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP **s. 8-34**

1.1. PODSTAWY PATOFIZJOLOGICZNE

1.2. CHARAKTERYSTYKA LEKÓW PRZECIWPLÝTKOWYCH

1.3. METODY OCENY FUNKCJI PŁYTEK

1.3.1. Metody oceny funkcji płytek podczas leczenia ASA

1.3.1.1. *Niezautomatyzowane*

1.3.1.2. *Zautomatyzowane (typu point-of-care)*

1.3.2. Metody oceny funkcji płytek podczas leczenia tienopirydynami

1.3.2.1. *Niezautomatyzowane*

1.3.2.2. *Zautomatyzowane*

1.3.3. Metody oceny funkcji płytek podczas leczenia antagonistami receptora płytkowego GP lib/IIIa

1.3.3.1. *Niezautomatyzowane*

1.3.3.2. *Zautomatyzowane (typu point-of-care)*

2. CELE PRACY **s. 35**

3. MATERIAŁ **s.36-42**

3.1. KRYTERIA WŁĄCZENIA CHORYCH DO BADANIA

3.2. KRYTERIA WYŁĄCZENIA CHORYCH Z BADANIA

3.3. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH PODGRUP

3.4. KORONAROGRAFIA

3.5. LECZENIE

3.6. OBSERWACJA PO 3 LATACH

4. METODYKA

s. 43-57

4.1. BADANIA PODSTAWOWE WSTĘPNE I PO 3 LATACH

4.2. BADANIA OCENIAJĄCE CZYNNOŚĆ PŁYTEK

4.2.1. OCENA WEWNĄTRZPŁYTKOWEGO STĘŻENIA MALONYLODIALDEHYDU
(MDA)

4.2.2. OCENA CZYNNOŚCI PŁYTEK W BADANIU PFA-100

4.2.3. OCENA CZYNNOŚCI PŁYTEK W AGREGOMETRZE OPTYCZNYM.

4.3. KRYTERIA OPORNOŚCI

4.4. OCENA POLIMORFIZMU GENU C807T GLIKOPROTEINY Ia

4.5. OZNACZENIE STĘŻENIA HOMOCYSTEINY

4.6. OBSERWACJA ODLEGŁA BADANIEJ GRUPY

4.7. ANALIZA STATYSTYCZNA

4.8. KRYTYKA METODY OCENY CZYNNOŚCI PŁYTEK W BADANIU PFA-100

5. WYNIKI

s. 58-97

5.1. BADANIA WSTĘPNE

5.2. OCENA OPORNOŚCI NA LECZENIE PRZECIWPŁYTKOWE

5.2.1. Wyniki oceny czynności płytek wykonanej aparatem PFA-100

5.2.2. Wyniki oceny czynności płytek wykonane agregometrem optycznym

5.2.3. Wyniki badań oporności – chorzy oporni i wrażliwi na leki przeciwplatekcyjne

5.2.4. Charakterystyka podgrup - chorzy oporni a wrażliwi na leki przeciwplatekcyjne

5.2.5. Ocena wpływu stężenia homocysteiny na występowanie oporności na leki przeciwplatekcyjne.

5.2.6. Ocena polimorfizmu C807T genu GP Ia

5.2.7. Ocena oporności na leki przeciwplatekcyjne w zależności od występowania polimorfizmu C807T genu GP Ia.

5.2.8. Ocena wysokości stężenia troponiny I oraz frakcji wyrzucania w zależności od występowania oporności na leki przeciwplatekcyjne

5.2.9. Ocena wartości stężenia troponiny I, frakcji wyrzucania oraz stężenia homocysteiny w zależności od rodzaju polimorfizmu C807T dla genu GPIa w porównywanych grupach chorych

5.3. BADANIA KONTROLNE PO 3 LATACH

5.3.1. Określenie częstości nawrotów incydentów wieńcowych w trakcie trzyletniej obserwacji badanej grupy pacjentów w skojarzeniu z ocenianą opornością na leki przeciwplatekcyjne.

5.3.2. Ocena danych klinicznych, wyników wybranych parametrów biochemicznych uzyskanych w badaniu kontrolnym.

5.3.3. Wynik oceny czynności płytek wykonane aparatem PFA-100

Zmienność odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne w zależności od polimorfizmu C807T genu GP Ia.

5.3.4. Ocena wybranych parametrów wskaźników echokardiograficznych
uzyskanych w badaniu kontrolnym po 3 latach

5.4. OBSERWACJA ODLEGŁA PO 6 LATACH-ANKIETA TELEFONICZNA

6. <u>OMÓWIENIE</u>	s. 98-125
7. <u>WNIOSKI</u>	s. 126
8. <u>STRESZCZENIE</u>	s. 127-132
9. <u>SUMMARY</u>	s. 133-136
10. <u>PIŚMIENICTWO</u>	s. 137-152
11. <u>SPIS TABEL</u>	s. 153-155
12. <u>SPIS RYCIN</u>	s. 156-157
13. <u>PODZIAŁ PRACY DOKTORANTÓW</u>	s. 158

SPIS SKRÓTÓW

ACS – ostry zespół wieńcowy

ADP – dwufosforan adenozyiny

AHA – Amerykańskie Stowarzyszenie Serca

ARU – jednostki odpowiedzi na ASA

ASA – kwas acetylosalicylowy, aspiryna

AT II – angiotensyna II

BMI – indeks masy ciała

CABG – zabieg pomostowania aortalno-wieńcowego

cAMP – cykliczny monofosforan adenozyiny

ChNS – choroba niedokrwienna serca

COX-1 i COX-2 – cyklooksygenazy 1 i 2

C807, T807, G873, A873 – allele genu glikoproteiny Ia

CT – czas zamknięcia apertury w aparacie PFA-100

DES – stent uwalniający lek

EF – frakcja wyrzucania lewej komory

EKG – elektrokardiogram

FS – frakcja skracania lewej komory

GO – gałąź okalająca lewej tętnicy wieńcowej

GPZ – gałąź przednia zstępująca lewej tętnicy wieńcowej

GP Ia – glikoproteina Ia

GP IIa – glikoproteina II a

GP IIb/IIIa – glikoproteina IIb/IIIa

IVSd – grubość przegrody międzykomorowej w rozkurczu

IVSs – grubość przegrody międzykomorowej w skurczu

IRA – tętnica odpowiedzialna za zawał

LA_d – wymiar lewego przedsionka w rozkurczu

LK – lewa komora

LVEDD – wymiar końcowo-rozkurczowy lewej komory

LVESD – wymiar końcowo-skurczowy lewej komory

MDA – malonylodialdehyd

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

NSTEMI – zawał serca bez uniesienia odcinka ST

OZW – ostry zespół wieńcowy

PIA₁ – receptor płytkowy dla GP IIb/IIIa

PCI – przezskórny zabieg rewaskularyzacyjny .

PCR – polimerazowa reakcja łańcuchowa

PFA-100 – aparat do oceny czynności płytek krwi (*Platelet Function Analyzer – 100*)

PGG₂ i **PGH₂** – prostaglandyny **G₂** i **H₂**

PGI₂ – prostacyklina

PLT – płytki krwi

PPP – osocze ubogopłytkowe

PRP – osocze bogatopłytkowe

aPTT – czas częściowej tromboplastyny po aktywacji

PTW – prawa tętnica wieńcowa

PWd – grubość tylnej ściany lewej komory w rozkurczu

PWs – grubość tylnej ściany lewej komory w skurczu

P₂Y₁ i **P₂Y₁₂** – receptory płytkowe purynowe

STEMI – zawał serca z uniesieniem odcinka ST

TxA₂ i **TxB₂** – tromboksany A2 i B2

UA – niestabilna choroba wieńcowa

vWF – czynnik von Willebranda

1. WSTĘP

Choroby układu sercowo-naczyniowego pod postacią miażdżycy tętnic są jedną z głównych przyczyn śmiertelności w krajach rozwiniętych. Proces miażdżycowy najczęściej obejmuje tętnice wieńcowe, naczynia domózgowe oraz tętnice kończyn dolnych i odpowiada za powstawanie ostrych incydentów wieńcowych, udarów mózgu czy też objawów niedokrwienia kończyn. Badania epidemiologiczne wskazują, że choroby te są wynikiem złożonych interakcji pomiędzy czynnikami genetycznymi, długotrwałymi wpływami środowiska i współistnieniem zaburzeń o udowodnionym wpływie na przyspieszenie rozwoju miażdżycy takimi jak cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia czy hiperhomocysteinemia. W świetle dotychczasowych badań za główny mechanizm powstawania ostrych incydentów naczyniowych (niedokrwiennych) uważa się pęknięcie blaszki miażdżycowej w miejscu jej uszkodzenia z wytworzeniem zakrzepu zamykającego naczynie i ustaniem przepływu krwi w dystalnej części naczynia, co prowadzi do ostrego niedokrwienia części unaczynianego narządu.

1.1. PODSTAWY PATOFIZJOLOGICZNE

Jedną z kluczowych ról w procesie powstawania zakrzepu na pękniętej blaszce miażdżycowej odgrywają płytki krwi. Podczas ostrego incydentu naczyniowego płytki są aktywowane przez szereg działających poprzez swoiste receptory czynników, w tym tromboksan A_2 (TxA₂), difosforan adenozyiny (ADP), kolagen oraz trombinę [1].

Trwające od szeregu lat obserwacje i badania kliniczne dotyczące ostrych zespołów wieńcowych (OZW) pozwoliły na ustalenie, że jednym z najsilniej wpływających na redukcję śmiertelności jest zastosowanie w jak najwcześniejszej fazie choroby kwasu acetylosalicylowego (ASA). Kwas acetylosalicylowy jest inhibitorem aktywacji i agregacji płytek krwi poprzez hamowanie syntezy prostanoidów (m.in. tromboksanu A_2), co w rezultacie prowadzi do działania przeciwzakrzepowego, a także do ograniczenia zależnego od TxA_2 skurczu naczynia i uwalniania czynników wzrostu i cytokin z ziarnistości płytek krwi. W ostatnich latach pojawiły się nowe grupy leków przeciwplatekowych działających zarówno poprzez wpływ na metabolizm kwasu arachidonowego, jak i o innych mechanizmach działania np. leki hamujące receptor $ADP\ P_2Y_{12}$ (grupa tienopirydyn m.in. tiklopidyna, kłopidogrel, prasugrel) czy też leki hamujące powierzchniowe glikoproteiny płytkowe (abciximab, eptifibatyd, tirofiban). Leki te najczęściej stosuje się w połączeniu z ASA, bądź jako jedyny lek przeciwplatekowy w przypadku nietolerancji lub przeciwwskazań do leczenia kwasem acetylosalicylowym.

Stwierdzono, że w terapii z zastosowaniem ASA i kłopidogrelu u chorych z OZW dochodzi do 20% redukcji złożonego punktu końcowego obejmującego incydenty niedokrwienne w porównaniu z leczeniem samym ASA [2].

Należy podkreślić, że hamowanie funkcji płytek krwi przez leki przeciwplatekowe nie jest jednakowe u poszczególnych chorych. Istnieje duża zmienność osobnicza odpowiedzi na leczenie, co szczególnie dobrze udokumentowano dla kwasu acetylosalicylowego i kłopidogrelu, określając brak odpowiedzi na zastosowaną terapię (nawroty zakrzepicy tętniczej) jako oporność na leki przeciwplatekowe [3]. Aktualnie przyjmuje się, że 5 – 40% chorych przewlekłe przyjmujących leki przeciwplatekowe

wykazuje oporność na jeden lub oba stosowane preparaty [4-5]. W chwili obecnej, pomimo ciągle prowadzonych badań, trudno jednoznacznie określić, których pacjentów należałoby poddać badaniom w kierunku oporności, aby wyniki przełożyć na efektywne (dotąd jednoznacznie nie ustalono jakie) działania kliniczne. Biorąc pod uwagę znaczną liczbę chorych, którzy są lub mogą być dotknięci tym problemem, przebadania wymagałoby wiele (wszyscy chorzy z OZW?) osób. Informacje dotyczące mechanizmów wywołujących to zjawisko oraz proponowane metody leczenia, choć coraz powszechniej – z uwagi na rosnącą liczbę badań - dostępne, nadal pozostają niejednoznaczne. Konieczne są dalsze badania pozwalające na wyodrębnienie chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne oraz opracowanie w tym celu szybkich i wiarygodnych testów umożliwiających dalsze właściwe leczenie [6-7].

W warunkach fizjologicznych w miejscu uszkodzenia naczynia w ciągu kilku sekund dochodzi do przylegania płytek krwi, z których uwalniane są czynniki powodujące zlepianie kolejnych płytek. W procesie miażdżycowym, w momencie pęknięcia bogatej m.in. we włókna kolagenowe blaszki miażdżycowej, dochodzi do adhezji płytek z wytworzeniem skrzepiny na powierzchni uszkodzenia.

Zasadnicze znaczenie ma fakt, że proces krzepnięcia nie przebiega z fizjologicznie znaczącą szybkością w fazie płynnej osocza, lecz na fosfolipidach błon komórkowych. W błonie zewnętrznej trombocytów zbudowanej z podwójnej warstwy lipidowej zlokalizowane są receptory dla czynników zarówno aktywujących, jak i hamujących funkcje płytek krwi. W momencie uszkodzenia ściany naczynia dochodzi do odsłonięcia elementów śródbłonna, które są ligandami dla odpowiednich receptorów płytkowych. Płytki, które uległy adhezji w miejscu uszkodzenia ściany naczyniowej dostarczają

fosfolipidów, na których zachodzi aktywacja krzepnięcia w układzie zewnątrzpoходnym. Takie prokoagulacyjne właściwości mają fosfatydyloseryna (PS) i fosfatydyloetanolamina (PE). W niebudzonych trombocytach wymienione fosfolipidy zlokalizowane są głównie na powierzchni błony zwróconej do wnętrza płytki; pod wpływem czynników aktywujących t.j. trombiny lub kolagenu dochodzi do odślonięcia PS i PE na powierzchni płytek, a także zmian konfiguracji przestrzennej glikoproteinowych receptorów płytkowych (m.in. GP IIb/IIIa), a w dalszej konsekwencji do adhezji płytek do kolagenu. W kolejnych etapach procesu obejmujących aktywację wewnątrzkomórkowej fosfolipazy, kinazy białkowej C i fosfolipazy A2 dochodzi do uwolnienia z fosfolipidów błonowych kwasu arachidonowego. Związek ten ulega dalszym przemianom – najpierw tworzą się pod wpływem cyklooksygenazy-1 (COX-1) cykliczne nadtlenki prostaglandynowe (PGG₂, PGH₂) – które pod wpływem syntazy tromboksanu A₂ (ST) ulegają przekształceniu w tromboksan A₂. Agoniści kompleksu GP IIb/IIIa, t.j.:TXA₂, trombina, kolagen, adrenalina i ADP powodują zmianę jego kształtu i konfiguracji. Tak zmieniony receptor uzyskuje zdolność przyłączania multiwalentnych białek adhezyjnych, ze szczególnie wysokim powinowactwem do fibrynogenu i czynnika von Willebranda. Do agregacji kolejnych płytek dochodzi, gdy białka adhezyjne przyłączą się do receptorów GP IIb/IIIa na różnych płytkach powodując ich zlepianie. Powstały czop płytkowy staje się nieprzepuszczalny dla krwi.

Agregacja płytek krwi poprzedza proces krzepnięcia zachodzący z udziałem osoczowych czynników krzepnięcia.

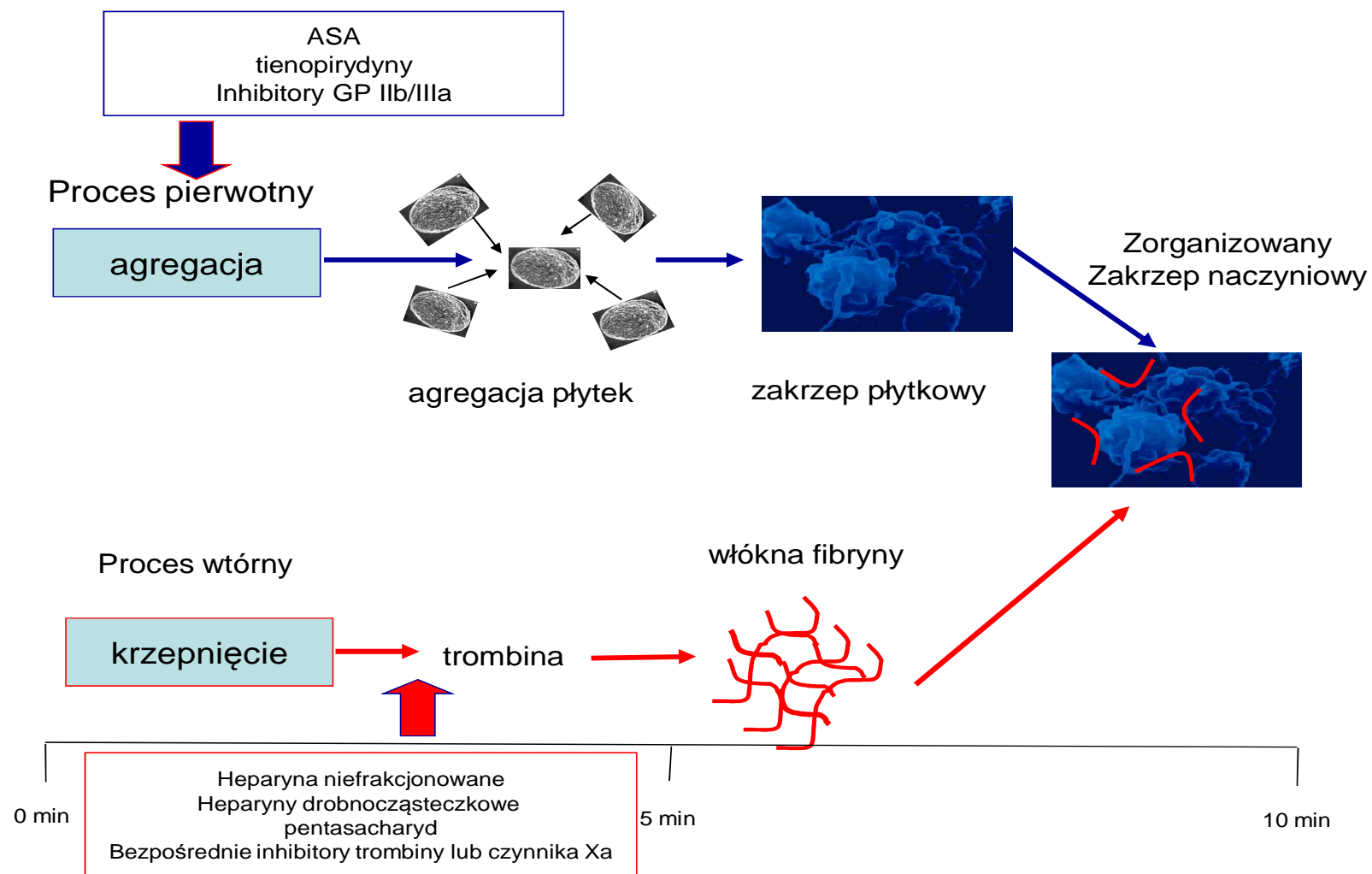
Omówione zjawisko agregacji płytek krwi jest zależne od wielu czynników występujących zarówno w samych trombocytach, jak i w ścianie naczynia. Uważa się, że proces

zlepiania płytek krwi nasila się wraz ze zmniejszeniem się w nich ilości cyklicznego adenozymonofosforanu (cAMP). Substancje (leki) aktywujące cyklazę adenylową - enzym nieodzowny do powstania cAMP lub hamujące fosfodiesterazę – enzym rozkładający cAMP, wykazują właściwości hamujące agregację trombocytów. Z kolei czynniki stale obecne w ścianie naczynia, takie jak kolagen, katecholaminy, ADP znacznie nasilają procesy zlepiania i agregacji płytek [8-9].

W regulacji omawianych zjawisk istotną rolę odgrywają dwa przeciwstawne mechanizmy: powstawanie w płytkach powodującego i nasilającego ich agregację oraz działającego silnie wazokonstrykcyjnie tromboksanu A_2 oraz powstawanie w śródbłonku naczynia naturalnego antagonisty tromboksanu – prostacykliny, hamującej agregację płytek krwi oraz powodującej rozszerzenie naczyń [1].

U chorych z miażdżycą stwierdzono skrócenie czasu przeżycia trombocytów oraz zwiększoną skłonność do agregacji i nasilenia ich aktywacji. Oprócz udziału płytek w powstawaniu zakrzepu naczyniowego, krążące w mikrokrążeniu agregaty płytkowe mogą być jednym z istotnych czynników prowadzących do zaburzeń przepływu krwi w naczyniach włosowatych nasilających niedokrwienie [10-11].

Rycina przedstawia schemat tworzenia się zakrzepu naczyniowego poprzez interakcję procesów aktywacji, adhezji i agregacji płytek z wytworzeniem zakrzepu płytkowego oraz proces wtórnej aktywacji układu krzepnięcia wraz z zaznaczonymi miejscami działania leków wpływających na procesy krzepnięcia.



Ryc. 1. Miejsce i czas rozpoczęcia działania głównych grup leków przeciwplatekcyjnych i przeciwtrombinowych stosowanych w ostrych zespołach wieńcowych.

1.2. CHARAKTERYSTYKA LEKÓW PRZECIWPŁYTKOWYCH

Najczęściej stosowanym lekiem hamującym czynność płytek krwi jest **kwas acetylosalicylowy**, który w czystej formie został zsyntetyzowany i wprowadzony jako lek (aspiryna) w 1897r. W lecznictwie wykorzystuje się także jego działanie przeciwbólowe, przeciwgorączkowe i przeciwzapalne. Jednym z głównych mechanizmów działania tego leku jest hamowanie syntezy prostanoidów (prostaglandyn, prostacykliny i tromboksanu), które są wytwarzane z udziałem cyklooksygenaz (COX-1, COX-2). Prostanoidy produkowane z udziałem COX-2 są odpowiedzialne za rozwój reakcji zapalnej, natomiast te, których synteza jest katalizowana przez COX-1 odgrywają rolę m.in. w procesie agregacji płytek krwi, ochronie błony śluzowej żołądka oraz w wielu innych funkcjach fizjologicznych decydujących o utrzymaniu homeostazy w organizmie. Kwas acetylosalicylowy jest 150 - 200 razy bardziej skuteczny w zahamowaniu aktywności enzymatycznej COX-1 – izoformy obecnej przede wszystkim w płytkach krwi niż aktywności COX-2. Fakt ten tłumaczy, dlaczego do wywołania działania przeciwzakrzepowego (COX-1) lub przeciwzapalnego (COX-2) wymagane są różne dawki. Hamowanie przez ASA aktywności obu izoform może wywoływać działania niepożądane np. w postaci utraty ochrony błony śluzowej żołądka wynikłe z ograniczenia syntezy prostacykliny. Doniesienia z ostatnich lat sugerują, że podanie leku w niewielkiej dawce (75 - 150 mg/d) wystarcza do zahamowania syntezy TxA₂, nie powodując upośledzenia syntezy prostacykliny.

ASA jest stosunkowo słabym inhibitorem aktywacji płytek krwi. Hamuje w sposób nieodwracalny aktywność obu izoform cyklooksygenazy, co prowadzi m.in. do ograniczenia syntezy TxA_2 . Działanie to prowadzi nie tylko do hamowania agregacji i aktywacji płytek krwi, ale także do ograniczenia zależnego od TxA_2 skurczu naczyń oraz uwalniania czynników wzrostu i cytokin z ziarnistości trombocytów. Kwas acetylosalicylowy nie ogranicza natomiast agregacji płytek indukowanej przez inne niż tromboksan A_2 czynniki aktywujące receptory GP IIb/IIIa (np. trombina).

Pomimo krótkotrwałego okresu biologicznej aktywności ASA we krwi (15 – 20 minut), w krótko żyjących komórkach organizmu jakimi są płytki krwi, zablokowanie aktywności COX przez aspirynę jest równoznaczne z bezpowrotnym obniżeniem ich funkcjonalności. Fakt ten wynika ze spadku zdolności do syntezy nowych białek, jaka występuje w komórkach bezjądrzastych. Ponieważ aktywność płytkowej COX-1 jest nieodwracalnie zahamowana, obniżenie zdolności krwinek płytkowych do agregacji trwa 7–10 dni, czyli tak długo, aż pula płytek z zablokowanymi cząsteczkami COX-1 zostanie zastąpiona przez pulę młodych i w pełni funkcjonalnych komórek.

ASA znajduje szerokie zastosowanie w leczeniu stabilnej i niestabilnej choroby wieńcowej, w profilaktyce powikłań zawałowych, zwłaszcza w prewencji wystąpienia powtórnego zawału i nagłego zgonu sercowego. Nie udowodniono natomiast, aby ASA stosowany w prewencji pierwotnej choroby wieńcowej miał istotny wpływ na zmniejszenie śmiertelności z powodu chorób układu krążenia. Stosowanie aspiryny w tym celu może być uzasadnione u osób (zwłaszcza mężczyzn), u których istnieją nasilone czynniki ryzyka wystąpienia choroby wieńcowej czy udaru mózgu.

Nie ustalono jednoznacznie, jaka dawka leku jest optymalna dla działania przeciwapagregacyjnego. Na ogół dawkę 75 – 150 mg/d uważa się za wystarczającą.

Drugą grupą leków stosowanych w profilaktyce i leczeniu zakrzepicy tętniczej są tienopirydyny.

Tiklopidyna, podobnie jak klopidoogrel, jest pochodną pirydynową (inhibitorem płytkowego receptora P_2Y_{12}) hamującą czynność płytek krwi i powodującą powstanie stanu zbliżonego do trombastenii Glanzmanna. Lek ten hamuje działanie ADP aktywujące receptory IIb/IIIa, uniemożliwiając wiązanie się fibrynogenu z tymi receptorami, a tym samym hamuje agregację płytek. Działanie tiklopidyny ujawnia się w ciągu dwóch dni od rozpoczęcia stosowania leku w dawce 2 razy 250 mg/dobę. Pełen efekt działania tiklopidyny osiąga się po 3–5 dniach stosowania. Jest ona metabolizowana w wątrobie, a uszkodzenie tego narządu może zmniejszać jej działanie przeciwapagregacyjne wywierane przez aktywny metabolit [12].

Lek jest szybko i prawie całkowicie wchłaniany z przewodu pokarmowego. Po doustnym podaniu leku maksymalne stężenie w surowicy krwi występuje po około 2 h. Pokarm ułatwia wchłanianie tiklopidyny. Metabolizm tiklopidyny zachodzi głównie w wątrobie. W moczu lek nie występuje w postaci niezmienionej. U chorych z upośledzeniem czynności wątroby stężenia tiklopidyny w surowicy ulegają zwiększeniu.

Czas krwawienia po tiklopidynie może być przedłużony nawet dwukrotnie. Po odstawieniu leku czas krwawienia i inne parametry czynności płytek krwi normalizują się zwykle w ciągu 1 tygodnia. Poza hamowaniem czynności płytek tiklopidyna w dawkach terapeutycznych nie wykazuje innych działań farmakologicznych.

Nie wykazano, aby działanie tiklopidyny, zarówno w prewencji pierwotnej jak i wtórnej przewyższało efekty stosowania aspiryny [13].

Obecnie wskazaniami do stosowania tiklopidyny jest: nietolerancja ASA, okres przed planowaną PCI [14].

Klopidogrel jest pochodną tienopirydyny, inhibitorem agregacji płytek krwi indukowanej przez ADP; w nieodwracalny sposób modyfikuje strukturę powierzchniowego receptora płytkowego dla ADP – P₂Y₁₂, bezpośrednio i wybiórczo zapobiegając wiązaniu się ADP z receptorem i powodując zahamowanie wywołanej przez ADP aktywacji glikoprotein powierzchniowych GP IIb/IIIa [15]. Doprowadza to do zmniejszenia liczby receptorów dla fibrynogenu na powierzchni płytki i ograniczenia możliwości wiązania się płytek między sobą za pośrednictwem tych receptorów i cząsteczek fibrynogenu tworzących mostki fibrynowe. Klopidogrel hamuje również agregację płytek z udziałem innych agonistów, blokując nasiloną aktywację płytek wywołaną przez uwolniony ADP.

Od pierwszego dnia stosowania leku następuje znaczne zahamowanie indukowanej przez ADP agregacji płytek, zjawisko to narasta stopniowo i osiąga stan równowagi pomiędzy 3 a 5 dniem podawania [16].

W ostrych zespołach wieńcowych lek stosuje się w dawce nasycającej (od 300-600 mg jednorazowo w zależności od sytuacji klinicznej), a następnie kontynuuje dawkę 75 mg/24h w skojarzeniu z ASA w dawce 75 mg/24h [14, 17].

W tabeli 1 zestawiono różnice terapeutyczne pomiędzy tiklopidyną a klopidogrelem.

Tab. 1. Różnice terapeutyczne między tiklopidyną a kłopidogrelem.

TIKLOPIDYNA	KLOPIDOGREL
Podawana 2 x na dobę	Podawany 1 x na dobę
Wolniejszy początek działania (kilka dni)	Szybszy początek działania (kilka godzin)
Ryzyko wystąpienia neutropenii	Ryzyko neutropenii jak przy ASA
Brak prospektywnych badań klinicznych	Duża liczba prospektywnych badań klinicznych
Nie zarejestrowana w OZW	Zarejestrowany w OZW
Brak wiedzy na temat stosowania z DES*	Rekomendowany z DES*

*DES – stent uwalniający lek

Odkrycie receptorów płytkowych receptorów glikoproteinowych IIb/IIIa oraz poznanie ich wiodącej roli w zjawisku agregacji płytek otworzyło nowe możliwości leczenia przeciwagregacyjnego. Stosowane do tego czasu leki antyagregacyjne blokowały tylko niektóre z czynników aktywujących te receptory, dlatego idealnym lekiem jest **bezpośredni inhibitor receptorów IIb/IIIa**.

Zsyntetyzowano szereg związków wykazujących takie działanie. Wśród nich wyróżniamy następujące 3 grupy:

1. Przeciwciała monoklonalne: np. abciximab (Reo Pro).
2. Peptydy drobnocząsteczkowe: np. eptifibatyd (Integrilin).
3. Fibany:
 - a. do stosowania pozajelitowego: np. tirofiban (Aggrastat),
 - b. do stosowania doustnego: np. sibrafiban.

Badania ostatnich lat wykazały, że stosowanie dożylnych leków blokujących receptory glikoproteinowe IIb/IIIa u chorych z niestabilną dławicą piersiową oraz poddanych leczeniu inwazyjnemu ostrym zespołom wieńcowym (OZW) zapobiega nawrotom dolegliwości oraz zakrzepicy po zabiegach PCI. Natomiast preparaty doustne nie znalazły zastosowania w leczeniu OZW, ponieważ wykazano zwiększenie śmiertelności z powodu powikłań leczenia w obserwacji długoterminowej [18].

Jednym ze starszych leków przeciwplatekcyjnych jest **dipirydamol**. Mechanizm działania tego leku polega na zwiększeniu stężenia adenozyliny poprzez zahamowanie jej rozpadu [19]. Pod koniec XX wieku znaczenie dipirydamolu jako preparatu przeciwplatekowego zmalało z powodu występującego u niektórych chorych tzw. efektu podkradania powodującego nasilenie niedokrwienia mięśnia sercowego w obszarze zaopatrywanym przez zwężoną tętnicę wieńcową.

Początek XXI wieku to badania oceniające wykorzystanie dipirydamolu u chorych po udarze niedokrwinnym mózgu oraz w stabilnej dławicy piersiowej [20-21].

Adenozyna hamuje agregację płytek krwi wywołaną przez adenylozodifosforan (ADP) najprawdopodobniej w mechanizmie inhibicji kompetycyjnej nie ulegając wychwytywaniu przez płytki krwi. Ze względu na bardzo szybkie działanie i krótki okres półtrwania nie znalazła zastosowania klinicznego [8].

Prostacykliny należą do grupy autakoidów, wykazują właściwości antagonistyczne w stosunku do tromboksanu działając poprzez pobudzenie aktywności cykazy adenylowej w płytkach krwi i w śródbłonku uszkodzonego naczynia. W komórkach śródbłonka zmienionych miażdżycowo naczyń stwierdzono zmniejszenie aktywności syntazy prostacykliny.

Prostacyklina jest związkiem nietrwałym, rozpadającym się po kilku minutach do nieczynnego metabolitu. Z uwagi na poczynione obserwacje, że u chorych poddanych przezskórnym zabiegom rewaskularyzacyjnym (PCI) z zastosowaniem syntetycznych analogów prostacykliny zmniejsza się częstość zjawiska braku powrotu przepływu (no reflow phenomenon), epizodów nawrotu niedokrwienia i restenoz obecnie prowadzi się badania nad jej zastosowaniem podczas PCI w szerszym, niż dotąd zakresie [22].

Prasugrel, stosowana doustnie pochodna tienopirydynowa, hamuje agregację płytek krwi poprzez blokowanie wiązania ADP z receptorem na ich powierzchni. Preparat stosuje się jednocześnie z aspiryną w celu zapobiegania zdarzeniom sercowo-naczyniowym u pacjentów z ostrymi zespołami wieńcowymi poddawanych przezskórnej angioplastyce wieńcowej [23].

W badaniu TRITON, porównującym leki przeciwplatekcyjne – **prasugrel** i **klopidogrel** u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym zakwalifikowanych do przezskórnych zabiegów rewaskularyzacyjnych tętnic wieńcowych, wskazują, że leczenie prasugrelem jest powiązane z odwrotną tendencją w liczbie zgonów w populacjach STEMI i NSTEMI.

Tab. 2. Zgony jako pierwsze raportowane zdarzenia w badaniu TRITON [24].

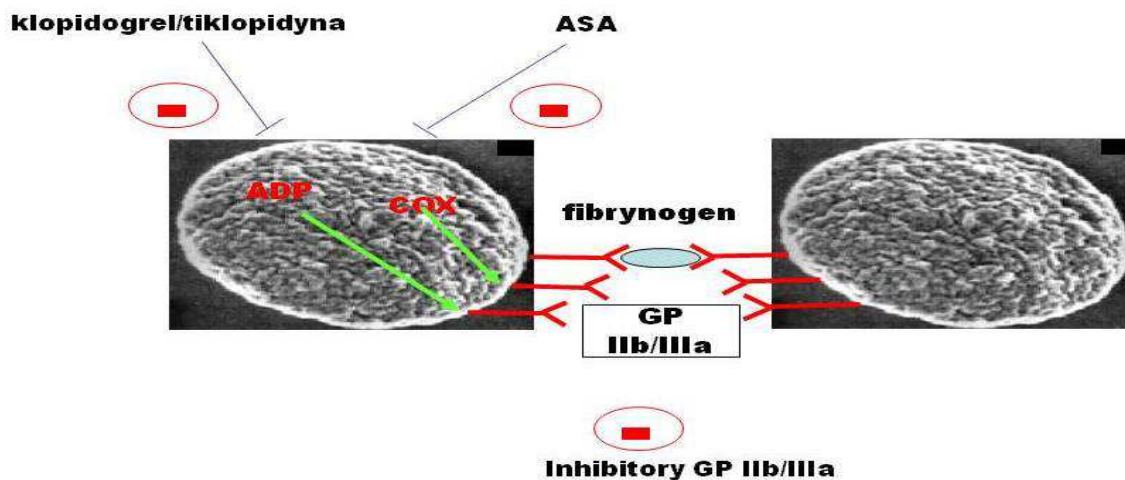
Grupa	Prasugrel	Klopidogrel	Różnica
UA/NSTEMI	113	83	+30
STEMI	49	58	-9
Łącznie	162	141	+21

Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że istnieją grupy chorych, którzy z uwagi na zwiększoną częstość występowania krwawień nie powinni być leczeni prasugrelem.

Zalecany w zapobieganiu zawałowi serca i zakrzepicy w stencie u chorych z ostrym zawałem serca kłopidogrel jest prolekiem, który w wątrobie ulega konwersji do aktywnego metabolitu hamującego aktywność płytek. Od momentu podania doustnego do zahamowania istotnej części płytek upływają co najmniej 2 godziny. Innym słabym punktem tego leku jest tzw. zmienna osobnicza wrażliwość receptorów płytkowych P2Y₁₂. Wydaje się, że może ona prowadzić do nieodpowiedniego zahamowania czynności płytek nawet u prawie 1/3 osób.

Tych wad może być pozbawiony **tikagrelor** - który nie jest pochodną tienopirydyny, nie jest też prolekiem i nie musi być aktywowany enzymatycznie - który w porównaniu z kłopidogrelem powoduje szybsze i silniejsze zahamowanie czynności płytek, bez zmienności międzyosobniczej. Badanie PLATelet inhibition and patients Outcomes (PLATO) wykazało, że u chorych z ostrym zespołem wieńcowym (OZW) tikagrelor był skuteczniejszy od kłopidogrelu w zapobieganiu zgonom (ze wszystkich przyczyn i z przyczyn sercowo-naczyniowych), zawałom serca i zakrzepicy w stencie, bez widocznego zwiększenia powikłań krwotocznych [25]. Ostatnio opublikowano subanalizę dotyczącą chorych, u których planowano strategię inwazyjną.

Rycina 2 przedstawia miejsce działania poszczególnych leków przeciwplatek na płytce krwi.



Ryc. 2. Miejsce działania poszczególnych leków przeciwplatek na płytkę krwi.

Zastosowanie różnorodnych testów oceniających funkcję płytek krwi pozwoliło na wykazanie międzyosobniczej zmienności farmakologicznego działania leków przeciwplatek, zwłaszcza aspiryny i klopidogrelu. W ostatnich latach zaznaczył się wyraźny wzrost zainteresowania rutynowym stosowaniem testów oceny funkcji płytek, które pozwoliłyby na monitorowanie działania wymienionych leków w celu ewentualnej modyfikacji ich dawkowania; innym z możliwych zastosowań byłaby ocena nowych preparatów przed wprowadzeniem ich do leczenia.

Kolejną przewidywaną korzyść upatruje się w prognostycznej wartości tych badań, które pozwoliłyby na stratyfikację ryzyka i identyfikację grup pacjentów ze zwiększoną gotowością zakrzepową, szczególnie wśród chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi.

W chwili obecnej dysponujemy kilkoma metodami pozwalającymi na prowadzenie badań oceniających funkcję płytek krwi:

1.3. METODY OCENY FUNKCJI PŁYTEK

1.3.1. Metody oceny funkcji płytek podczas leczenia ASA

a) niezautomatyzowane

- ⇒ stężenie 11-dehydro TxB₂ w moczu - metoda uznana za referencyjną
- ⇒ stężenie TxA₂ w surowicy
- ⇒ agregometria turbidymetryczna i impedancyjna
- ⇒ ekspresja P-selektyny, aktywowanych receptorów GP lib/IIIa lub agregatów płytkowo-leukocytarnych (cytometria przepływowa)

b) zautomatyzowane (typu point-of-care)

- ⇒ PFA-100
- ⇒ Verify Now (Aspirin)
- ⇒ Impact Cone and Plate(let) Analyzer
- ⇒ Plateletworks
- ⇒ tromboelastometria

1.3.2. Metody oceny funkcji płytek podczas leczenia tienopirydynami

1.3.2.1. Niezautomatyzowane

- ⇒ VASP (cytometria przepływowa) – metoda referencyjna
- ⇒ agregometria turbidymetryczna i impedancyjna
- ⇒ ekspresja P-selektyny, aktywowanych receptorów GP lib/IIIa lub agregatów płytkowo-leukocytarnych (cytometria przepływowa)

1.3.2.2. Zautomatyzowane

- ⇒ Verify Now (P₂Y₁₂)

- ⇒ Impact Cone and Plate(let) Analyzer
- ⇒ Plateletworks
- ⇒ Tromboelastometria

1.3.3. Metody oceny funkcji płytek podczas leczenia antagonistami receptora płytkowego GP IIb/IIIa

1.3.3.1. Niezautomatyzowane

- ⇒ agregometria turbidymetryczna i impedancyjna
- ⇒ ekspresja P-selektyny, aktywowanych receptorów GP IIb/IIIa (metoda referencyjna) lub agregatów płytkowo-leukocytarnych (cytometria przepływowa)

1.3.3.2. Zautomatyzowane (typu point-of-care)

- ⇒ Verify Now (IIb/IIIa)
- ⇒ Plateletworks

Pomimo rozwoju wielu innych metod **klasyczna agregometria** nadal stanowi “złoty standard” oceny funkcji płytek krwi. Zasadę testu stanowi pomiar stopnia agregacji płytkowo-płytkowej przy wykorzystaniu turbidymetrii w osoczu bogatopłytkowym lub impedancji elektrycznej w krwi pełnej. Jego główną zaletą jest możliwość pomiaru (w warunkach *ex vivo*) najważniejszej funkcji płytek, czyli agregacji warunkowanej stopniem ekspresji aktywowanego receptora GP IIb/IIIa [26].

Cytometria przepływowa polega na pomiarze rozproszenia światła i intensywności fluorescencji składników komórki lub zastosowanych barwników czy przeciwciał w pojedynczych komórkach lub cząsteczkach przepływających przez mikrokanal optyczny w strumieniu cieczy. Metoda ta wykorzystywana jest w badaniach

hemostazy głównie do ilościowej identyfikacji populacji płytek aktywowanych (najczęściej z użyciem specyficznych przeciwciał dla powierzchniowych receptorów zlokalizowanych na płytkach krwi, takich jak P-selektyna, CD40L czy receptor GP IIb/IIIa) lub do oceny stężenia agregatów płytkowo-leukocytarnych.

Ostatnio metoda cytometrii przepływowej stała się referencyjną metodą oceny zjawiska oporności/ zmiennej odpowiedzi na leczenie kłopidogrelem. Metoda ta zwana jest stanem aspirynowych VASP (vasoactive-stimulated phosphoprotein). Końcowy wynik testu stanowi tzw. współczynnik reaktywności receptora P_2Y_{12} , obliczony jako iloraz poziomu aspirynowych VASP po stymulacji PGE-1 i ADP oraz poziomu fosforyzacji VASP po stymulacji PGE-1. Interpretacji wyniku służy zależność: im niższy współczynnik, tym skuteczniejsza inhibicja receptora P_2Y_{12} na płytce krwi poprzez badany lek.

Platelet Function Analyzer – 100 (PFA-100) jest w pełni zautomatyzowanym instrumentem do testowania funkcji płytek krwi *in vitro*. Pełna krew pobierana z dodatkiem cytrynianu jest analizowana w aparacie zawierającym dwa rodzaje pojemników, których ściany pokryte są agonistami stymulującymi aktywację i następczą agregację płytek krwi. Wykorzystuje się pojemniki zawierające kolagen typu I z dwufosforanem adenozyiny (CADP – szlak aktywacji zależny od ADP) lub kolagen typu I z dwuwinianem epinefryny (CEPI – szlak aktywacji zależny od COX-1). Jedyłą w swoim rodzaju cechą PFA-100 jest zdolność do symulacji *in vitro* warunków fizjologicznych przepływu krwi w zwężonych tętnicach wieńcowych, czyli symulacja tzw. sił ścinających. Krew z pojemników jest zasysana do membrany z mikrootworami, pokrytej odpowiednimi agonistami aktywacji płytek. Aktywność płytek jest mierzona ilościowo

jako czas do całkowitego zamknięcia mikrootworów membrany i ustania przepływu krwi, tzw. czas zamknięcia (CT – closure time). Prawidłowe wartości CT w przypadku ADP (CADP-CT) zawarte są w granicach 71 – 118 s, a w przypadku epinefryny (CEPI-CT) – w zakresie 85 – 165 s. Krótsze CT oznaczają wyższy stopień aktywności płytek, podczas gdy wydłużone CT wskazują na ich mniejszą aktywność.

Udowodniono, że oporność na ASA określona jako CEPI-CT < 190 s związana jest ze zwiększonym ryzykiem niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych. Ponadto wykazano, że wyjściowy pomiar aktywności płytek z użyciem PFA-100 może mieć znaczenie w przewidywaniu stopnia rozległości zawału serca określonego maksymalnym stężeniem CK-MB i troponiny T oraz stopnia perfuzji mikrokrążenia wieńcowego i funkcji lewej komory w obserwacji długoterminowej [27-28].

Szybki test funkcji płytek (RPFA) mierzy agregację płytek w krwi pełnej z cytrynianem przy użyciu turbidymetrycznego systemu detekcji optycznej. Aglutynację mikrocząsteczek aspirynowych fibrynogenem aktywuje kationowy tiogalusan propylu. Adhezja jest proporcjonalna do liczby dostępnych receptorów płytkowych, a wynik podaje się w jednostkach odpowiedzi na ASA (ARU). Wynik > 550 ARU definiuje oporność na ASA. Swoistość metody określa się na 85% [29].

Plateletworks jest zautomatyzowanym aparatem wykorzystującym w swym działaniu ocenę stopnia agregacji przez porównanie ilości płytek w próbce krwi pobranej na EDTA i po stymulacji ADP lub kolagenem. Udowodniono istnienie korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi za pomocą tej metody a konwencjonalną agregometrią oraz wykazano pierwsze zastosowanie tej metody w monitorowaniu leczenia za pomocą leków przeciwplateletowych [30-31]

Tromboelastometria jest metodą służącą do oceny czasu krzepnięcia i elastycznych właściwości skrzepu pełnej krwi w warunkach odpowiadających krążeniu żylnemu. Tromboelastometria pozwala na szybką i całościową ocenę procesu krzepnięcia i fibrynolizy pełnej krwi. Interpretacja wyników polega na analizie porównawczej obrazów graficznych i danych numerycznych, przedstawiających tworzenie się skrzepu w różnym czasie i z zastosowaniem różnych odczynników. Aparatura wykorzystywana w tej metodzie jest mobilna i pozwala na wykonywanie badań przy łóżku chorego, co znacznie skraca czas diagnozowania. Umożliwia to również wielokrotne kontrolowanie stanu hemostazy pacjenta w czasie rzeczywistym. Przedstawienie graficzne dynamiki i jakości procesu krzepnięcia oraz fibrynolizy ułatwia zrozumienie zaburzeń tych układów, które mogą być spowodowane wieloma czynnikami, np.: małym stężeniem czynników krzepnięcia, małopłytkowością, utratą masywną krwi i następowymi przetoczeniami, nasiloną fibrynolizą oraz niekiedy hipotermią. Zastosowanie tej metody diagnostycznej ogranicza leczenie empiryczne i umożliwia celowaną substytucję poszczególnych składników hemostazy lub wykorzystanie leków antyfibrynolitycznych. Wynikiem takiego postępowania jest lepsze wykorzystanie zasobów krwi i preparatów krwiopochodnych. Jednocześnie możliwość wykrycia nadkrzepliwości pozwala na skuteczne jej leczenie i kontrolowanie. Wydaje się, że tromboelastometria ma szerokie zastosowanie kliniczne, jednak pełna ocena tej metody wymaga dalszych randomizowanych i obejmujących liczne grupy pacjentów badań. Przy obecnym stanie wiedzy tromboelastometrię należy traktować jako metodę diagnostyczną, która wspomaga decyzje terapeutyczne w przypadku chorych z zaburzeniami hemostazy [32-33].

Zaletą systemu jest jego prostota i brak konieczności preparowania próbki pełnej krwi, jednak na razie brak jest wystarczających dowodów, aby uznać tromboelastometrię za test przydatny klinicznie w ocenie działania leków przeciwplatek.

Impact Cone and Plate(let) Analyzer pozwala na ocenę adhezji i agregacji płytek w pobranej z dodatkiem antykoagulantu krwi pełnej w warunkach symulacji przepływu krwi tętniczej. W komorze aparatu dochodzi do adhezji białek osocza, a następnie do adhezji i agregacji płytek krwi na powierzchni komory. Po wyznaczeniu komórek ulegających adhezji dokonuje się oceny ilościowej. Wyniki przedstawiane są jako odsetek pokrytej powierzchni (adhezja) i średnia wielkość agregatów (agregacja). W metodzie tej, po użyciu odpowiednich agonistów, możliwa jest ocena funkcji płytek krwi w trakcie terapii ASA, kłopidogrelem lub antagonistami receptora GP IIb/IIIa [34].

Verify Now Ultegra jest testem typu point-of-care służącym do oceny oporności na ASA i kłopidogrel. Zasada działania jest analogiczna do klasycznej agregometrii, czyli opiera się na ocenie agregacji płytkowo-płytkowej zależnej od aktywacji receptorów GP IIb/IIIa; wynik podawany jest w jednostkach reaktywności. Zaletą metody jest możliwość niezależnej oceny skuteczności trzech podstawowych leków przeciwplatek przy zastosowaniu odpowiednich agonistów (ADP/PGE1 dla tienopirydyn, kwasu arachidonowego dla ASA i α -sp-TRAP dla antagonistów receptora GP IIb/IIIa) [35].

W badaniu oporności na ASA duże znaczenia ma **ocena stężenia TxB₂ w surowicy i moczu**. Ze względu na krótki czas półtrwania TxA₂ jego powstawanie ex vivo najlepiej oceniać mierząc stężenie 11-dehydro-TxB₂ w osoczu lub moczu. Nie

ustalono dokładnych kryteriów oceny wyników tego testu. Aktualnie mianem opornych na leczenie określa się osoby ze stężeniem TxB₂ w moczu > 33,8 ng/mmol kreatyniny, a za reagujących częściowo uznano chorych z TxB₂ w moczu 15,1 – 33,8 ng/mmol kreatyniny [36].

Aspirin Works Test Kit jest testem opartym na technice immuno-enzymatycznej (ELISA) pozwalającym określić stężenie 11-dehydro tromboksanu B₂ w moczu badanego a tym samym określić odpowiedź na działanie przeciwplatek ASA.

Najczęściej stosowanymi w ocenie funkcji płytek podczas terapii tienopirydynami metodami są wymienione już wcześniej:

1) metody niezautomatyzowane:

- ⇒ fosforylacja VASP (cytometria przepływowa)
- ⇒ agregometria turbidymetryczna i impedancyjna
- ⇒ ekspresja P-selektyny, aktywowanych receptorów GP IIb/IIIa lub agregatów płytkowo-leukocytarnych

2) zautomatyzowane:

- ⇒ Verify Now (P₂Y₁₂)
- ⇒ Impact Cone and Plate(let) Analyzer
- ⇒ Plateletworks
- ⇒ Tromboelastometria

Turbidymetryczny test z ADP jest najczęściej wykorzystywanym badaniem odpowiedzi na leczenie kłopidogrelem. Procent zahamowania odpowiedzi agregacyjnej płytek poddanych działaniu 5 µM ADP mniejszy niż 10% zdefiniowano jako całkowitą

oporność na lek [37]. Do grupy z częściową odpowiedzią zakwalifikowano pacjentów z zahamowaniem agregacji w granicach 10 – 29%, a do grupy pacjentów reagujących na leczenie osoby z zahamowaniem agregacji powyżej 30% w trakcie leczenia klopidoogrelem, w porównaniu z wartościami wyjściowymi. Według kryteriów określonych powyżej, aż 22% chorych nie reaguje na leczenie klopidoogrelem, a kolejne 32% to chorzy słabo reagujący [38].

W tabeli 3 porównano zalety i wady wybranych metod stosowanych do oceny czynności płytek krwi.

Tab. 3. Porównanie zalet i wad wybranych metod stosowanych do oceny czynności płytek krwi.

Test	Rodzaj pomiaru	Zalety metody	Wady metody
Czas krwawienia	Przesiewowy test in vitro	Proste wykonanie, fizjologiczny charakter pomiaru	Mała czułość, ograniczona powtarzalność, nie koreluje z kliniką
Metody agregometryczne i ich modyfikacje	Odpowiedź płytek na podawane substancje agonistyczne	Testy wykonywane w krwi pełnej pozwalają na procentowe wyliczenie stopnia zahamowanie agregacji płytek	Wymagająca zaplecza laboratoryjnego
Tromboelastometria	Pomiar całkowitej hemostazy	Ułatwia przewidywanie krwawienia	Wymagająca zaplecza laboratoryjnego. Mała czułość w wykrywaniu działania leków przeciwplatekcyjnych.
Testy oceniające	Pomiar stężenia	Duża dokładność	Pozwala ocenić tylko

markery uwalniające przez płytki	markerów wydzielanych przez płytki		wybrane szlaki aktywacji płytek
Badanie metabolitów tromboksanu A₂ w moczu	Pomiar wydalania 11-dehydrotromboksanu B ₂ z moczem	Dokładna ocena stopnia zahamowania tromboksanozależnej aktywności płytek	Kłopotliwe pobieranie materiału i wykonywanie oznaczeń, koreluje jedynie z oceną wpływu ASA
Testy PFA-100	Metoda zautomatyzowana, przyłóżkowa	Prostota wykonania, testy wykonywane z krwi pełnej	Ocena odpowiedzi krwi pełnej tylko na: epinefrynę i ADP
Cytometria przepływowa	Kompleksowa ocena receptorów powierzchniowych płytek, markerów aktywacji	Test najwyższej czułości	Wysokie koszty oznaczeń i sprzętu, przeprowadzana przez wykwalifikowany personel

Badania naukowe z ostatnich lat wskazują na to, że dwa allele genu dla glikoproteiny GP Ia opisane jako C 807 i T 807 są powiązane z małą lub dużą gęstością receptora (bez zmiany składu aminokwasów) na powierzchni płytek i w konsekwencji - z wolną lub szybką adhezją płytek do kolagenu typu I. Dlatego też polimorfizm ten może wskazywać na genetyczną predyspozycję do rozwoju zmian zakrzepowo-zatorowych. Dotychczasowe prace dotyczą zarówno wpływu tego polimorfizmu na naczynia wieńcowe, jak i na tętnice ośrodkowego układu nerwowego.

Od kilku lat hiperhomocysteinemię zaczęto postrzegać jako niezależny czynnik ryzyka wystąpienia niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych związanych z procesem miażdżycowym (zawał serca, udar mózgu) [39].

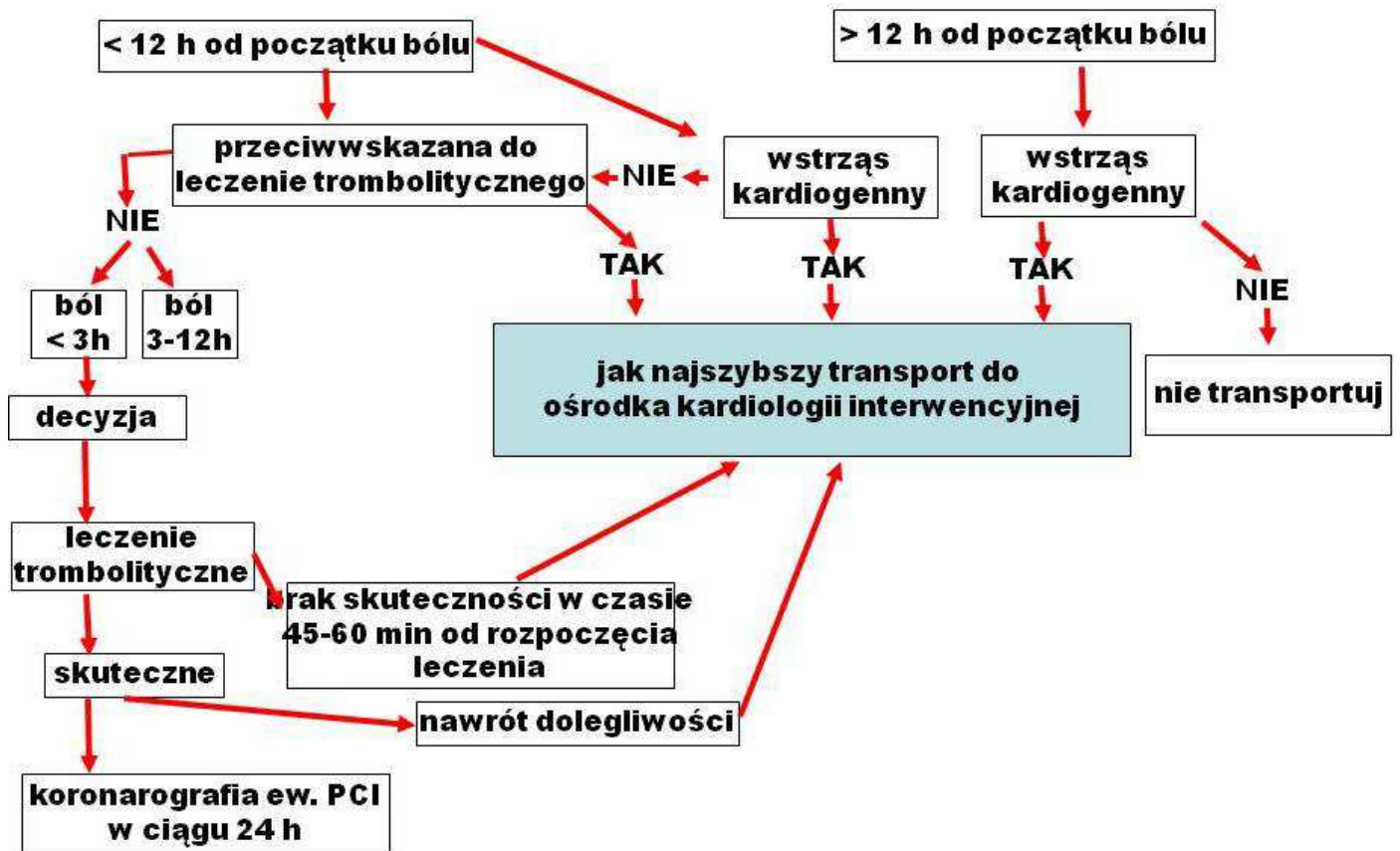
Przyczyny niekorzystnego oddziaływania homocysteiny na układ krążenia są w dużej mierze niejasne. Choć z dotychczasowych danych wynika, że niekorzystne działanie podwyższonego stężenia homocysteiny na układ krążenia jest wielostronne, jak dotąd trudno określić, który z czynników i mechanizmów ma podstawowe lub decydujące znaczenie w patogenezie zjawisk prowadzących do zmian w układzie sercowo-naczyniowym.

Zawał serca z uniesieniem odcinka ST (STEMI) jest najczęściej spowodowany zakrzepem krwi zamykającym światło tętnicy wieńcowej i powstającym w miejscu uszkodzenia niestabilnej blaszki miażdżycowej, najczęściej jej pęknięcia. Martwica komórek mięśnia sercowego zaczyna się rozwijać w okresie 15 – 30 minut od ustania przepływu krwi i postępuje od warstwy podwsierdziowej do nasierdziowej. Czas, w jakim dochodzi do martwicy zależy od kalibru zamkniętego naczynia, rozległości unaczynionego przez *nie* obszaru oraz obecności i stopnia rozwoju krążenia obocznego. Okresem najczęstszego występowania STEMI są godziny poranne i przedpołudniowe, co prawdopodobnie ma związek ze zwiększoną aktywnością adrenergiczną, jak i wzmożoną aktywacją płytek krwi [40].

Ze względu na z reguły dużą dynamikę toczącego się procesu niedokrwienego niezwykle istotne znaczenie ma czas rozpoczęcia – najlepiej równoległe – zarówno działań diagnostycznych, jak i terapeutycznych u chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi. Ponieważ wraz z upływającym czasem powiększa się obszar martwicy mięśnia sercowego przyjęto, dla podkreślenia wagi tego czynnika, określać, że „czas to mięsień” – ustalone i przyjęte w codziennej praktyce standardy postępowania zalecają jak najszybszy transport chorego do pracowni naczyniowej.

Aktualne zalecenia dotyczące postępowania w zawale serca z uniesieniem odcinka ST przedstawia rycina 3.

STEMI



Ryc. 3. Schemat postępowania z chorym ze STEMI.

PCI – percutaneous cardiac intervention - przezskórna interwencja wieńcowa.

2. CELE PRACY

W związku z istniejącym w piśmiennictwie rozbieżnościami dotyczącymi częstości występowania oporności na leki przeciwplatekcyjne, jej przyczyn i ewentualnych skutków, przyjęto następujące **cele pracy**:

- 1. Określenie u chorych z troponinododatnim ostrym zespołem wieńcowym leczonych inwazyjnie częstości występowania oporności na leki przeciwplatekcyjne po 30 dniach leczenia farmakologicznego.**
- 2. Ustalenie czy występuje zależność pomiędzy opornością na leczenie przeciwplatekcyjne a polimorfizmem genu C807T dla glikoproteiny Ia oraz stężeniem homocysteiny w tej grupie chorych.**
- 3. Ocena wpływu w/w oporności na stopień uszkodzenia mięśnia sercowego ocenianego za pomocą oznaczenia stężenia troponiny I oraz na wartość frakcji wyrzucania lewej komory.**
- 4. Określenie zależności pomiędzy polimorfizmem genu C807T dla glikoproteiny Ia a stopniem uszkodzenia miokardium w poszczególnych grupach chorych.**
- 5. Ocena zmienności czasowej zjawiska oporności na leczenie przeciwplatekcyjne i określenie stopnia zmienności zjawiska oporności na leczenie przeciwplatekcyjne w zależności od polimorfizmu C807T GPI.**
- 6. Określenie częstości występowania zdarzeń sercowo-naczyniowych (zgon, zawał serca, udar mózgu, konieczność rewaskularyzacji) w trakcie sześcioletniej obserwacji badanej grupy pacjentów w skojarzeniu z ocenianą opornością na leki przeciwplatekcyjne.**

3. MATERIAŁ

Badaną grupę stanowią chorzy obu płci z ostrym troponino-dodatnim zespołem wieńcowym (zawał mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST - STEMI), poddani leczeniu inwazyjnemu zmiany odpowiedzialnej za zawał (pierwotna angioplastyka wieńcowa – primary PTCA, PCI). Przyjęto następujące:

3.1. KRYTERIA WŁĄCZENIA CHORYCH DO BADANIA:

1. Chorzy w wieku 18-80 lat z ostrym zespołem wieńcowym z uniesieniem odcinka ST – STEMI.
2. Chorzy zakwalifikowani do pierwotnej przezskórnej angioplastyki tętnic wieńcowych – primary PTCA/PCI.
3. Chorzy, którzy wyrazili i podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu.

3.2. KRYTERIAMI WYŁĄCZENIA CHORYCH Z BADANIA BYŁY:

1. Chirurgiczna rewaskularyzacja mięśnia sercowego (CABG) - kiedykolwiek.
2. Przezskórna rewaskularyzacja mięśnia sercowego (PTCA/PCI) w ostatnich 6 miesiącach.
3. Stosowanie kłopidogrelu w ostatnich 10 dniach.
4. Leczenie doustnymi antykoagulantami.
5. Udokumentowane zaburzenia krzepnięcia krwi (trombofilie, schorzenia wątroby).
6. Małopłytkowość z $PLT < 100\ 000\ G/l$.
7. Niewydolność nerek w wywiadzie ze stężeniem kreatyniny $> 1,5\ mg\%$.
8. Choroby, w których 3-letnia przeżywalność jest wątpliwa (np. nowotwory złośliwe).

9. Choroby znacznie ograniczające mobilność badanego (np. chory z porażeniem połowicznym).
10. Cięża.
11. Brak współpracy z chorym.
12. Chorzy nie pobierający ASA oraz ze stężeniem malonyldialdehydu (MDA) > 10,8 $\mu\text{mol}/10^9$ płytek.

Do badań zakwalifikowano wstępnie 65 chorych hospitalizowanych w latach 2004 – 2006 w Oddziale Chorób Wewnętrznych i Hematologii z Pododdziałem Intensywnej Opieki Kardiologicznej Szpitala im. J. Strusia w Poznaniu, a następnie w Oddziale Kardiologicznym tegoż Szpitala (nazwę Oddziału zmieniono po reorganizacji). Po wykluczeniu z obserwacji chorych z obecnymi kryteriami wyłączającymi z badania – łącznie 15 chorych - ostatecznej analizie poddano 50 chorych.

3.3. CHARAKTERYSTYKA BADANEJ GRUPY CHORYCH.

W tabeli 4 przedstawiono charakterystykę kliniczną badanej grupy chorych.

Tab. 4. Charakterystyka kliniczna chorych w momencie włączenia do badania.

Oceniany parametr	Cała populacja N=50
Wiek (lata)	56±9
Płeć	
Kobiety	15 (30%)
Mężczyźni	35 (70%)

Dane z wywiadu	
Nadciśnienie tętnicze	21 (42%)
Cukrzyca	8 (16%)
Nikotynizm	30 (60%)
Objawowa dławica piersiowa	30 (60%)
Wydolność wg Killipa-Kimballa	
klasa I	30 (60%)
klasa II	14 (28%)
klasa III	4 (8%)
klasa IV	2 (4%)
BMI (kg/m ²)	26,7±4,1
Częstość rytmu serca (min ⁻¹)	91±16
Ciśnienie tętnicze (mmHg)	
skurczowe	125±21
rozkurczowe	74±13
Lokalizacja zmian w EKG	
ściana przednia	20 (40%)
ściana dolna	16 (32%)
ściana boczna	8 (16%)
ściana dolno-boczna	4 (8%)
inna	2 (4%)
Ilość zajętych tętnic w	
średnio	1.8
1 tętnica	17 (34%)
2 tętnice	26 (52%)
3 tętnice	7 (14%)
Fracja wyrzucania LK (%)	48±3

3.4. KORONAROGRAFIA

U wszystkich pacjentów w dniu przyjęcia do szpitala po postawieniu (w oparciu o wywiad, badanie ekg oraz obecność podwyższonych wartości markerów martwicy mięśnia sercowego) rozpoznania ostrego zespołu wieńcowego (OZW, ACS) z uniesieniem odcinka ST w trybie pilnym przeprowadzono badanie koronarograficzne metodą Seldingera z określeniem stopnia zwężenia naczyń wieńcowych oraz oceną krążenia obocznego (przyjęto podział tętnic wieńcowych na 15 segmentów wg AHA). Jednocześnie wykonywano angioplastykę tętnicy wieńcowej odpowiedzialnej za zawał, w większości przypadków (47 osób) z implantacją stentu.

Zabieg wykonywano w Pracowni Kardiologii Inwazyjnej Szpitala im. Józefa Strusia w Poznaniu.

3.5. LECZENIE ZASTOSOWANE U BADANYCH CHORYCH OBEJMOWAŁO:

Leczenie inwazyjne

Wszyscy chorzy włączeni do badania byli poddani inwazyjnemu leczeniu zawału mięśnia sercowego z zastosowaniem przezskórnej angioplastyki wieńcowej bez/lub z użyciem stentu (primary PTCA/PCI). Plastyce poddawane było tylko naczynie odpowiedzialne za OZW (IRA). Charakterystykę naczyń poszerzonych w czasie PCI przedstawiono w tabeli 5

Tab. 5. Rozkład poszerzonych naczyń w badanej grupie.

Naczynie poddane PCI	Badana populacja N=50	
	Ze stentem	Bez stentu
GPZ	22 (44%)	1 (2%)
GO	7 (14%)	0(0%)
PTW	18 (36%)	2 (4%)

GPZ – gałąź przednia zstępująca, GO – gałąź okalająca, PTW – prawa tętnica wieńcowa, PCI – przezkórna interwencja wieńcowa.

Leczenie farmakologiczne

Po wykonaniu angioplastyki wieńcowej leczenie farmakologiczne prowadzono zgodnie z zaleceniami Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego z 2003 r. z modyfikacjami przeprowadzonymi w roku 2004 i 2005. W tabeli 6 przedstawiono procentowy udział poszczególnych grup leków zastosowanych u chorych włączonych do badania.

Tab.6. Leczenie farmakologiczne (poza lekami przeciwplatekowymi) badanej populacji.

Grupa leków	Badana populacja N=50
	Betaadrenolityki
Inhibitory konwertazy angiotensyny	44 (88%)
Blokery receptora AT II	4 (8%)

Statyny	50 (100%)
Nitraty	10 (20%)

Leczenie przeciwplatek

Po ustaleniu rozpoznania OZW, przed angioplastyką wieńcową, u wszystkich chorych podawano jednorazową dawkę nasycającą ASA, tj. 300 mg (preparat o szybkim uwalnianiu) oraz dawkę nasycającą - 300 mg - kłopidogrelu – oba leki w formie doustnej.

Następnie, w pierwszym – 30 dniowym – okresie obserwacji (do momentu pobrania krwi do badań oceniających oporność na leki przeciwplatekowe) kontynuowano leczenie podając oba leki w dawkach podtrzymujących: kwas acetylosalicylowy 150 mg/dobę i kłopidogrel 75 mg/dobę.

Leczenie kłopidogrelem w w/w dawce kontynuowano (zgodnie z zaleceniami ESC) do 6 tygodni od wystąpienia ostrego zespołu wieńcowego (STEMI), natomiast stosowanie ASA (w dawce 75 – 150mg) zalecono jako terapię bezterminową.

3.6. OCENA PO 3 LATACH

Przedstawioną grupę chorych (42 osoby) badano i oceniano po 3 latach.

Charakterystykę grupy po 3 latach przedstawiono w tabeli 7.

Tab. 7. Charakterystyka kliniczna chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach

Oceniany parametr	Cała populacja N=42*
Wiek (lata)	59±9
Płeć	
Kobiety	13 (31%)
Mężczyźni	29 (69%)
Dane z wywiadu	
Nadciśnienie	23 (55%)
Cukrzyca	16 (38%)
Nikotynizm	9 (21%)
BMI (kg/m ²)	26,7±4,4
Częstość rytmu	69±18
Ciśnienie tętnicze	
Skurczowe	120±29
Rozkurczowe	70±11

* u 8 chorych przeprowadzono oceny po 3 latach (2 zgony, 6 osób-brak kontaktu).

4. METODYKA

4.1. BADANIA PODSTAWOWE

U wszystkich chorych wyjściowo przeprowadzono:

Wywiad w kierunku: dolegliwości stanowiących powód hospitalizacji, przebytych chorób i schorzeń towarzyszących, schorzeń występujących w rodzinie.

Wyjściowo i po 3 latach określono:

- wzrost i masę ciała z wyliczeniem BMI
- wykładniki niewydolności serca
- wartość ciśnienia tętniczego krwi

Wykonano także spoczynkowe badanie elektrokardiograficzne z określeniem:

- rytmu wiodącego.
- zmian o charakterze niedokrwiennym (lokalizacja zawału),
- zaburzeń rytmu i przewodzenia,

Badania laboratoryjne (krew) przeprowadzone wyjściowo obejmowały:

- morfologię krwi z określeniem liczby płytek
- parametry gospodarki lipidowej (stężenie w osoczu)
 - cholesterolu całkowitego
 - cholesterolu LDL
 - cholesterolu HDL
 - trójglicerydów
- stężenie troponiny I
- stężenie glukozy

- stężenie homocysteiny

Badania laboratoryjne obejmujące badania morfologii krwi i badania biochemiczne wykonano w laboratorium Szpitala im. J. Strusia w Poznaniu.

Badanie echokardiograficzne z określeniem:

- wymiarów serca – badanie jednowymiarowe (M-mode) i dwuwymiarowe (2D),
- funkcji zastawek – badanie M, 2D, „klasyczny” (PW, CW) i „kolorowy Doppler” (CD),
- parametrów napełniania oraz funkcji skurczowej lewej komory

wykonano w pierwszych 72 –godzinach od włączenia chorego do badań oraz podczas badań kontrolnych w 3 lata po rozpoczęciu badań.

Badania echokardiograficzne wykonywano w Pracowni Nieinwazyjnej Diagnostyki Chorób Serca i Naczyń Szpitala im. Józefa Strusia w Poznaniu.

4.2. BADANIA OCENIAJĄCE CZYNNOŚĆ PŁYTEK KRWI

Badania wykonywano w 30 dobie (przyjęto, że 30 dniowy okres farmakoterapii będzie czsem uzyskania pełnego efektu przeciwplatekowego leków) od zawału serca i PCI, i obejmowały one (po 3 latach wykonano tylko oznaczenie CT w PFA-100):

4.2.1. OCENĘ WEWNĄTRZPŁYTKOWEGO STĘŻENIA MALONYLODIALDEHYDU (MDA)

Badanie stężenia MDA wewnątrz płytek krwi pozwala stwierdzić, czy chory rzeczywiście pobierał ASA w czasie trwania obserwacji. W przypadku ocenianych przez nas pacjentów badanie to było testem weryfikującym pobieranie leku.

Stężenie wewnątrzpłytkowego MDA oznaczano metodą Patona [41].

- ⇒ Krew pobierano *do próbki* z dodatkiem cytrynianu sodu 3,2% w stosunku 1:9,
- ⇒ Przygotowano roztwór PRP wirując krew w ciągu 15 min., przy 250G w temp. 20⁰ C,
- ⇒ Obliczono liczbę płytek w PRP metodą bezpośrednią,
- ⇒ 1 ml PRP poddawano wirowaniu w ciągu 12 min., przy 500G w temp. 20⁰ C,
- ⇒ Po odrzuceniu PPP osuszono osad płytek,
- ⇒ Osuszony osad płytek rozpuszczono w 1,8 ml 0,01 M buforu fosforanowego o pH=7,4, zawierającym 0,25% NaCl i 0,02 NaN₃,
- ⇒ Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano z 200 µl kwasu arachidonowego o stężeniu końcowym 1,5 x 10⁻⁴M w ciągu 30 min w temp. 37⁰ C,
- ⇒ Reakcję tworzenia MDA hamowano przez dodanie 0,2 ml 20% CCl₃COOH rozpuszczonego w 0,6 M HCl,
- ⇒ Utworzony osad odwirowywano przez 15 min. 1000G w temp. 20⁰ C,
- ⇒ Do 1 ml supernatantu dodawano 0.2 ml 1% soli sodowej kwasu tiobarbiturowego. Po ogrzaniu (15 min. w łaźni wodnej w temp. 100⁰ C) i oziębieniu mierzono gęstość optyczną kompleksu wywołującego różowe

zabarwienie, przy długości fali 532 nm, używając spektrofotometru Carl Zeiss VSU 2-P,

⇒ Wyniki obliczano w odniesieniu do stałej liczby płytek – $10^9/\mu\text{l}$

⇒ Obliczenie wg wzoru:

$$\mu\text{mol MDA}/10^9 \text{ płytek} = \frac{\text{ekstynkcja} \cdot 27 \cdot 10^9}{0.152 \cdot \text{liczba} \cdot \text{płytek} \cdot w \cdot 1 \mu\text{l} \cdot 1000}$$

Norma dla MDA: $16,6 \pm 5,8 \mu\text{mol}/10^9$ (N:10,8 – 22,4). O hamowaniu przez ASA syntezy prostaglandyn w płytkach świadczą wartości poniżej $10,8 \mu\text{mol}/10^9$ płytek.

4.2.2. OCENĘ CZYNNOŚCI PŁYTEK W BADANIU PFA-100

Określany w polskiej nomenklaturze tzw. czas zamknięcia (apertury) - CT (closure time) mierzony jest od momentu rozpoczęcia pomiaru do chwili pełnej okluzji apertury i jest miarą aktywności płytek we krwi pełnej.

Aparat kończy proces pomiaru po 300 s, a dłuższe czasy są raportowane jako > 300 sekund, czyli tzw. non-closure times.

Wartość czasu zamknięcia zależy m. in. od zastosowanego agonisty. Referencyjne wartości CT przedstawiono w tabeli 8.

Tab. 8. Wartość referencyjna czasu zamknięcia (CT) w zależności od użytego agonisty.

Agonista	Wartość CT (w sekundach)
Epinefryna (CEPI-CT)	85 – 165
ADP (CADP-CT)	71 – 118

Praktyczne zastosowanie wyników PFA – 100

Wyniki pomiarów CT uzyskane przy użyciu agonisty, jakim jest epinefryna, pozwalają wykryć zaburzenia pierwotnej hemostazy i mogą być przedłużone w chorobie von Willebranda (vWD) lub w przypadku ekspozycji płytek na czynniki hamujące ich aktywność.

Prawidłowy czas okluzji uzyskany przy użyciu agonisty w postaci ADP wyklucza chorobę von Willebranda jako przyczynę przedłużenia CT z epinefryną.

Krótsze CT oznaczają większy stopień aktywacji, podczas gdy dłuższe CT wskazują na mniejszą aktywność płytek krwi. Dzięki temu badanie z użyciem epinefryny może być uznane za miernik czynności płytek krwi u chorych pobierających ASA.

W tabeli 9 przedstawiono przewidywane wartości CT w zaburzeniach funkcji płytek krwi w zależności od użytego agonisty.

Tab.9. Przewidywane wartości CT w zaburzeniach funkcji płytek krwi w zależności od użytego agonisty.

Agonista	vWD	ASA
Epinefryna (CEPI-CT)	<i>wydłużony</i>	<i>Wydłużony</i>
ADP (CADP-CT)	<i>wydłużony</i>	<i>Prawidłowy</i>

W badaniu za pomocą PFA-100, oporność na ASA zdefiniowano jako czas zamknięcia CT w kuwecie kolagen/epinefryna ≤ 165 sekund. Kryteria te zastosowano w oparciu o powszechnie przyjmowane w literaturze definicje.

4.2.3. OCENA CZYNNOŚCI PŁYTEK W AGREGOMETRZE OPTYCZNYM

Krew do badań agregacji płytek pobierano w godzinach porannych na czczo z żył przedramienia do probówek z dodatkiem 3,2% cytrynianu sodu w stosunku 1:9. Testy przeprowadzano do 3 godzin od pobrania krwi. Próbkę wirowano (100G przez 10 min. w temp. pokojowej) w celu uzyskania osocza bogatopłytkowego (PRP), oraz przy 2400G przez 20 min. w temp. 4⁰ C w celu uzyskania osocza ubogopłytkowego (PPP). Przed dokonaniem pomiaru aktywacji obliczano liczbę płytek krwi i korygowano ich ilość do 250 000/ μ l. Oceniano procent agregacji indukowanej ADP w stężeniu końcowym 3,5 μ M i 5,0 μ M, kolagenem (2 μ g/ml) przy użyciu agregometru optycznego, dwukanałowego (model 490-2D firmy Chronolog z oprogramowaniem Agrolink dla systemu Windows).

- ⇒ Do 500 µl PRP dodawano 2,5 µl lub 1,75 µl roztworu ADP w celu uzyskania końcowego stężenia odpowiednio 5 µM i 3,5 µM.
- ⇒ Do 500 µl próbki dodano 1 µl kolagenu (1 mg/ml) w izotonicznym roztworze glukozy pH 2,7 dla uzyskania stężenia końcowego 2 µg/ml.
- ⇒ Do 500 µl próbki dodano 6 µl odpowiednio przygotowanego roztworu kwasu arachidonowego ADP w celu uzyskania końcowego stężenia odpowiednio 0,6 µM.

Otrzymaną krzywą agregacji płytek (ryc. 6) opisywano jako maksymalną zmianę przepuszczalności światła pod wpływem agonisty wyrażoną w procentach (maksymalna amplituda agregacji).

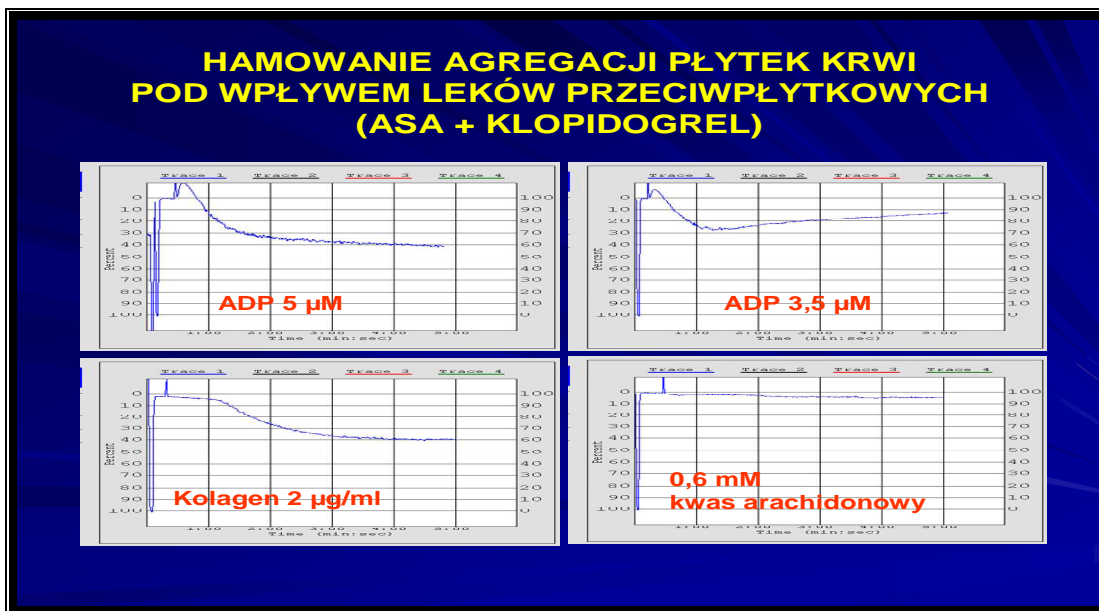
Wynik stanowi wartość różnicy pomiędzy wartościami uzyskanymi dla próbki badanej a wartościami referencyjnymi.

Wartości referencyjne maksymalnej amplitudy agregacji (%) dla poszczególnych aktywatorów przedstawiono w tabeli 10.

Tab.10. Wartości referencyjne maksymalnej amplitudy agregacji (w %) dla poszczególnych aktywatorów płytek krwi u osób zdrowych.

kolagen	2µg/ml	83 – 99
ADP	5 µM	63 – 114
ADP	3,5 µM	52 – 103

Poniżej przedstawiono rycinę z wydrukiem badania chorego MB prawidłowo reagującego na leczenie ASA.



Ryc. 4. Wydruk badania chorego MB prawidłowo reagującego na leczenie ASA.

4.3. KRYTERIA OPORNOŚCI

Oporność stwierdzono, gdy uzyskiwano następujące wyniki w badaniach agregacji płytek (maksymalna amplituda):

- ⇒ agregację indukowaną kolagenem ≥ 60%
- ⇒ agregację z 5 µM ADP ≥ 80%

OPORNOŚĆ LABORATORYJNĄ NA ASA U DANEGO CHOREGO STWIERDZANO, GDY SPEŁNIONA BYŁA DEFINICJA OPORNOŚCI W PRZYNAJMNIEJ JEDNYM Z WYŻEJ WYMIENIONYCH BADAŃ (PFA-100 i agregacji)

4.4. OCENA POLIMORFIZMU GENU C807T GLIKOPROTEINY Ia

Polimorfizm C807T GP Ia wykrywany jest za pomocą allelo-specyficznej metody PCR (ASO-PCR) wg Santoso i wsp. oraz Lewandowskiego i wsp., w której obecność allelu 807C GP Ia prowadzi do powstania produktu 221 pz, a allelu 807T – 243 pz. [42].

U badanych pacjentów określano częstość występowania obu alleli ze szczególnym uwzględnieniem obecności homozygot.

Zasada metody

Jest to metoda izolacji DNA, oparta na zdolności wiązania się DNA w wysokich stężeniach soli chaotropowych do złożów krzemionkowych umieszczonych w kolumnie. Krew poddawana jest lizie w odpowiednim buforze lizującym, zawierającym sole chaotropowe i detergenty niejonowe w obecności silnej proteazy – proteiny K. W tych warunkach dochodzi do lizy elementów morfotycznych krwi i degradacji białek. Następnie lizat nanosi się na mini kolumnę ze specjalnym złożem krzemionkowym. DNA przechodząc przez złożę, osiada na nim, podczas gdy zanieczyszczenia przechodzą przez kolumnę, nie wiążąc się z nią. Po wypłukaniu z kolumny resztek zanieczyszczeń zaadsorbowane DNA wymywane jest niskojonowymi buforami lub wodą i bezpośrednio wykorzystywane do dalszych badań, bez konieczności precypitacji.

Wykonanie:

Do każdej próbki typu Eppendorf (1,5 ml) pipetowano 100 µl krwi pełnej, dodawano 200 µl buforu lizującego LT i 20 µl proteiny K. Po starannym wymieszaniu, próbki inkubowano w termobloku w temp. 65⁰ C przez 10/min.. Po inkubacji próbkę intensywnie worteksowano 20 s, krótko wirowano oraz nanoszono na minikolumnę

zawierającą sole chaotropowe, umieszczoną w probówce Eppendorfa o objętości 2 ml. Minikolumnę wirowano w mikrowirówce Eppendorfa przy 11 000 obrotów/min. przez 60 s. Po odwirowaniu minikolumnę z zaabsorbowanym DNA przepłukiwano dwukrotnie: objętością 500 µl roztworu płuczącego A1, a następnie 500 µl roztworu płuczącego A2. Po pierwszym płukaniu minikolumnę wirowano przy 10 000 obr./min przez 60 s., a po drugim przy 13 000 obr./min przez 180 s. Następnie kolumnę szuszone przez 30 min. w termobloku, w temp. 65⁰ C. Osuszoną kolumnę umieszczono w nowej probówce Eppendorfa (1,5 ml), a zaadsorbowane na solach chaotropowych DNA eluowano przez dodanie 100 µl buforu elucyjnego LE (po 10-cio minutowej inkubacji w temp. pokojowej i odwirowaniu przy 10 00 obr./min). Bezbarwny eluat, zawierający DNA, przechowywano w temp. – 20⁰ C do dalszych analiz. Obecność DNA w eluacie potwierdzono metodą elektroforezy na żelu agarowym.

Reakcja PCR

Sekwencje starterów:

STARTER	SEKWENCJA
Primer F – 5'	GAC AGC CCA TTA ATA AAT GTC TCC TCT G3' C = 10 mmol/dm³
Primer R1 – 5'	CTT GCA TAT TGA ATT GCT ACG 3' C = 10 mmol/dm³
Primer R2 – 5'	CTT GCA TAT TGA ATT GCT ACA 3' C = 10 mmol/dm³

2 μl wyizolowanego DNA poddano *polimerazowej* reakcji łańcuchowej (PCR). Reakcję przeprowadzono stosując 1 μl 10 mM nukleotydu (DTP-Finnzymes), 0,5 μl Taq polimerazy (1U/ μl) [DNAzyme TM IIDNA polymeraze-Finnzymes], 2,5 μl 10 x bufor o składzie: 10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl_2 , 0,1% Tryton X-100 i po 1 μl 10 pM startera. Reakcję przeprowadzono w objętości 25 μl . Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze Progene firmy Techne. Etap wstępny obejmował denaturację w temperaturze 96°C przez 5 min., a następnie przeprowadzono amplifikację. Każdy etap obejmował 35 cykli. Pojedynczy cykl składał się z:

1. denaturacji w 93°C przez 50 s,
2. wiązania starterów w 55°C przez 50 s,
3. elongacji w 72°C przez 30 s.

Końcową elongację przeprowadzono w temp. 72°C przez 7 minut. Uzyskany produkt PCR trawiono enzymem restrykcyjnym – Hinf (Promesa) w temperaturze 37°C przez 60 minut, a następnie rozdzielono elektroforetycznie na 5% żelu poliakrylamidowym (Sigma). Wizualizacji żeli poliakrylamidowych dokonywano w świetle UV za pomocą kamery integracyjnej (firmy Syngen) połączonej z komputerem (oprogramowanie – Sion Image for Windows).

3. Trawienie

Restryktaza MIPS – Promesa Corporation

4. Elektroforeza

⇒ bufor TBE (Tris Bogate EDTA) 5 x (baza)

- ⇒ 0,5 M EDTA pH = 8,0 - EDTA, H₂O, NaOH
- ⇒ Trizma BASE (tris/hydroksymetylo/aminometan)
- ⇒ Kwas borny
- ⇒ Woda destylowana

Żel 8% poliakrylamidowy (baza)

- ⇒ 40% akrylamid – bufor TBE 5 x, glicerol, woda destylowana

Żel poliakrylamidowy (roztwór roboczy):

- ⇒ Żel 8% poliakrylamidowy (baza)
- ⇒ TEMED (N,N,N',N' – tetrametylenodiamina)
- ⇒ 10% roztwór APS (nadsiaroczan amonu)

Żel agarowy:

- ⇒ Agaroz, bufor TBE 0,5 x

Badania wykonywano w Pracowni Hemostazy Katedry i Kliniki Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

4.5. OZNACZANIE STĘŻENIA HOMOCYSTEINY

Stężenie homocysteiny całkowitej oznaczano w osoczu metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC).

Próbki krwi pobierane były na czczo (średnio po 12 godzinnym okresie głodzenia). Krew zbierana była do probówek zawierających 1% EDTA, następnie wirowana przez 10 min. w temp. – 20⁰ C i ok. 3 000 obr/s.

W badanym osoczu oznaczano grupę tiolową (SH).

Przygotowanie próbek:

Próbki przygotowywane były przez rozcieńczenie w wodzie w stosunku 2:1. Redukcji grup tiolowych dokonywano poprzez dodanie 1% TCEP w stosunku 1:9. Deproteinizację uzyskiwano poprzez dodanie 1 M HClO₄ w stosunku 2:1.

Probówki wprowadzono do systemu HPLC (P580A, Dione, Niemcy), połączonego z elektronicznym czujnikiem (Coul Array 5600, ESA, USA). Analizę przeprowadzono na kolumnach Thermo Hypersil BDS C18. Analizę danych przeprowadzono z użyciem systemu software (Dionex, Niemcy).

Badanie wykonywane było w laboratorium przy Klinice Neurologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

W okresie obserwacji kontynuowano leczenie podając oba leki przeciwplatekcyjne w dawkach podtrzymujących – patrz strona 44.

4.6. OBSERWACJA ODLEGŁA GRUPY WŁĄCZONEJ DO BADAŃ

W ocenianej grupie chorych wykonano po 3 latach badania kontrolne obejmujące:

1. wybrane dane z wywiadu ze szczególnym określeniem stopnia wydolności wieńcowej (klasyfikacja CCS), serca (klasyfikacja NYHA) oraz istotnych zdarzeń

- sercowo-naczyniowych (nawroty zespołów wieńcowych, ponowne rewaskularyzacje przez skórne, pomostowanie aortalno wieńcowe, udary mózgu)
2. wybrane parametry laboratoryjne z oznaczeniem morfologii krwi, lipidogramu, stężenia glukozy w surowicy krwi
 3. ocenę czynność płytek za pomocą PFA-100
 4. badanie echokardiograficzne z oceną zaburzeń kurczliwości odcinkowej oraz EF lewej komory.

Po 6 latach przeprowadzono ankietę telefoniczną z określeniem występowania zgonów, zawałów serca, udarów mózgu i konieczności ponownej rewaskularyzacji.

4.6. ANALIZA STATYSTYCZNA

Przed poddaniem wyników ocenie statystycznej zbadano zgodność ich rozkładów z rozkładem normalnym za pomocą testu normalności Shapiro – Wilka oraz testu dokładnego Fishera. Obliczono średnie i odchylenia standardowe.

Obliczenia statystyczne wykonano przy pomocy pakietu statystycznego STATISTICA Windows 2000.

4.7. KRYTYKA METODY OCENY CZYNNOSCI PŁYTEK W BADANIU PFA-100

U chorych z rozpoznaną chorobą wieńcową częstość występowania oporności na ASA, oceniana przy pomocy PFA-100™ była określona, w zależności od badania, na 9-59,5%. Brak jednoznacznej definicji oporności na ASA, opracowanej na podstawie dotychczasowych badań z użyciem PFA-100™, jest jedną z przyczyn różnic w ocenie częstości występowania oporności na ASA, obserwowanych nawet pomiędzy badaniami

w podobnych populacjach chorych. Wydaje się, że brak zaleceń dotyczących stosowania analizatora PFA-100™ do oceny odpowiedzi na ASA wynika z niewystarczających przesłanek teoretycznych dotyczących specyficznego pomiaru samego procesu agregacji płytek krwi oraz występowania wspomnianych licznych rozbieżności w literaturze [43].

Wynik testu zależy jednak od wielu zmiennych, na które ASA nie ma wpływu: liczby płytek, hematokrytu, interakcji płytek z erytrocytami i stężenia osoczowego czynnika von Willebranda (vWF). Wykazano, że stężenie vWF i jego interakcje z GP Ib oraz GP IIb/IIIa są głównymi determinantami czasu okluzji. Częstość oporności na ASA w chorobach układu sercowo-naczyniowego i mózgowo-naczyniowego wykrywana na aparacie PFA-100 jest większa w porównaniu z wykrywaną poprzez tradycyjną agregometrię. Niektórzy badacze podali w wątpliwość wartość tego testu wykazując, że leczenie ASA hamowało produkcję TxB₂ w tym samym stopniu u pacjentów z krótkim jak i długim czasem okluzji. Zatem PFA-100 może nie być optymalną metodą badania oporności na ASA, ponieważ podlega wpływowi czynników, które nie zależą od jego działania [44].

5. WYNIKI

5.1. BADANIA WSTĘPNE

Wyniki stężenia MDA w płytkach krwi.

W tabeli 11 przedstawiono wartości MDA w płytkach krwi u poszczególnych chorych. U wszystkich chorych włączonych do badania stwierdzono obniżone wartości MDA < 10.8 $\mu\text{mol}/10^9$ płytek, świadczące o przyjmowaniu ASA podczas obserwacji.

Tab. 11. Wartości MDA w płytkach krwi u poszczególnych chorych.

Inicjały chorego	Stężenie MDA (μmol) $\times 10^9$ płytek	Inicjały chorego	Stężenie MDA (μmol) $\times 10^9$ płytek
SP	7,74	KH	8,83
MB	4,11	KT	6,67
MM	5,88	BH	4,54
MM	8,31	NK	7,27
MJ	6,17	BM	8,78
ND	4,54	PG	6,56
CS	7,27	OR	8,45
SO	8,08	CE	4,83
PW	6,53	ŚA	5,67
AL.	8,16	SK	4,54
BT	7,83	DZ	7,27
PP	5,67	NJ	7,78
HA	4,54	HP	6,56
CM	7,27	NH	8,45
SM	8,78	OB	4,11

ZB	4,76	PZ	5,88
ZM	8,45	BW	8,31
GD	5,67	NM	7,74
SC	8,83	BD	7,87
BI	6,67	GJ	5,88
SM	4,84	DB	4,54
KP	7,08	JJ	4,27
GW	8,78	SK	8,78
DW	6,56	PK	5,56
CZ	6,45	SJ	7,35
Wartość średnia stężenia MDA = 6,74 ± 1.52 μmol / 10⁹ płytek			

5.2. BADANIA OCENIAJĄCE CZYNNOŚĆ PŁYTEK

5.2.1. Wyniki oceny czynności płytek wykonanej aparatem PFA-100 z użyciem epinefryny

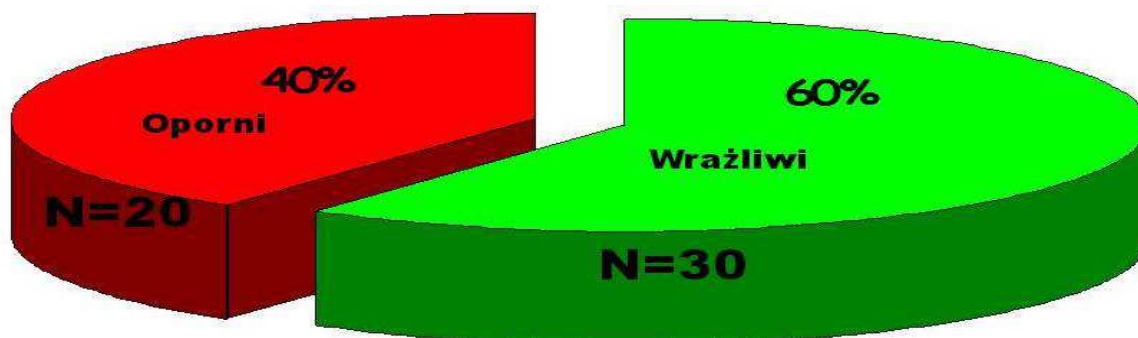
W tabeli 12 przedstawiono wyniki pomiaru czasu zamknięcia apertury (CT) dla epinefryny.

Tab.12. Średnie wartości CT (w sekundach) dla epinefryny w poszczególnych grupach chorych.

Agonista	Wszyscy N=50	Wrażliwi N=30	Oporni N=20	p <
Epinefryna	184 ± 84	258 ± 49	111 ± 28	0,001

W przedstawionych wynikach zwracają uwagę istotne statystycznie różnice CT pomiędzy grupą chorych opornych a wrażliwych na leczenie przeciwplatek w badaniach z użyciem epinefryny w PFA-100.

Ryc. 5. Odsetek chorych z ACS wykazujących oporność na leki przeciwplatekcyjne na podstawie czasu zamknięcia (CT) w aparacie PFA-100.



Oporność na leki przeciwplatekcyjne wykazana na podstawie pomiaru CT w aparacie PFA-100 wyniosła **40%**.

5.2.2. Wyniki oceny czynności płytek wykonane agregometrem optycznym z użyciem kolagenu i ADP w dwóch stężeniach

Tabela 13 przedstawia wartości intensywności agregacji dla poszczególnych induktorów agregacji.

Tab. 13. Średnie wartości maksymalnej amplitudy krzywej agregacji płytek (w procentach - %) dla poszczególnych induktorów.

Agonista	Wszyscy N=50	Wrażliwi N=30	Oporni N=20	P<
ADP 3,5 μ M	55 \pm 18	44 \pm 21	67 \pm 16	0,05
ADP 5 μ M	62 \pm 18	35 \pm 17	90 \pm 20	0,001
Kolagen 2 μ g/ml	52 \pm 24	38 \pm 21	67 \pm 21	0,05

Różnice istotne statystycznie w intensywności agregacji pomiędzy grupą pacjentów wrażliwych i wykazujących oporność na leczenie przeciwplatek stwierdzono w obu badaniach z użyciem ADP (w stężeniu 3,5 μ M i 5 μ M) i kolagenu w stężeniu 2 μ g/ml.

5.2.3. Wyniki oceny czynności płytek – chorzy wrażliwi i oporni na leki przeciwplatekowe

W tabeli 14 zestawiono wyniki badań oporności uzyskane przy wykorzystaniu PFA-100 oraz agregometru optycznego u poszczególnych chorych.

Tab. 14. Wyniki badań oporności uzyskane przy wykorzystaniu PFA-100 (czas zamknięcia apretury w sekundach) oraz agregometru optycznego (intensywność agregacji w %) u poszczególnych chorych.

Inicjały	PFA100 CEPI-CT	ADP 5 μ M	ADP 3,5 μ M	Kolagen 2 μ M/ml	oporność dla 1 bad	oporność dla 2 bad	oporność dla \geq 3 bad
SP	148	33	26	31	O		
MB	134	39	34	22	O		
MM	109	78	63	110			O
MM	300	1	0	0	W		
MJ	86	0	68	45		O	
ND	148	55	40	56	O		
CS	300	55	37	22	W		
SO	245	27	25	27	W		
PW	300	28	25	25	W		
AL.	93	55	49	60		O	
BT	300	25	25	30	W		
PP	197	19	11	18	W		
HA	199	23	42	15	W		
CM	300	24	48	36	W		
SM	83	29	21	38	O		
ZB	300	35	30	44	W		
ZM	260	37	25	30	W		
GD	188	50	38	10	W		

SC	131	35	26	1	O		
BI	300	50	41	31	W		
SM	216	53	52	40	W		
KP	87	64	57	59	O		
GW	74	25	23	38	O		
DW	205	38	29	45	W		
CZ	300	33	26	29	W		
KH	129	20	21	26	O		
KT	86	39	26	34	O		
BH	139	26	16	14	O		
NK	300	37	35	25	W		
BM	119	25	21	58	O		
PG	199	19	16	3	W		
OR	300	17	12	4	W		
CE	300	16	12	9	W		
ŚA	88	60	36	29	O		
SK	152	70	61	64			O
DZ	178	24	19	26	W		
NJ	300	34	34	24	W		
HP	81	82	69	67			O
NH	210	29	21	17	W		
OB.	84	65	97	98			O
PZ	234	40	50	32	W		
BW	221	54	48	59	W		
NM	180	55	36	30	W		
BD	300	46	23	43	W		
GJ	300	37	24	11	W		
DB	300	27	25	25	W		
JJ	202	37	25	31	W		
SK	141	38	25	38	O		
PK	300	34	32	38	W		
SJ	101	39	35	82	O		
Chorzy oporni					14	2	4

(O) – oporny na leki przeciwplatek w danym badaniu

(W) - wrażliwy na leki przeciwplatekowe w danym badaniu

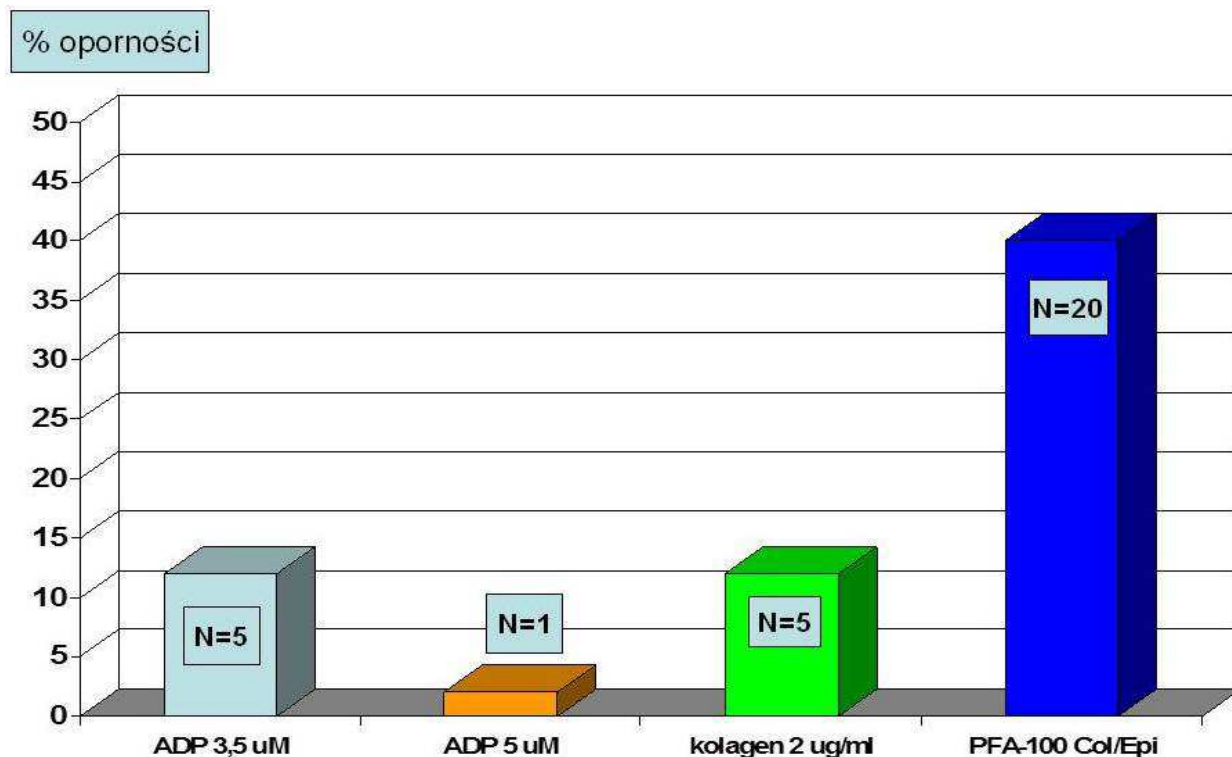
czerwoną czcionką wyróżniono wyniki spełniające kryteria oporności:

(CEPI-CT <165s, ADP 5uM >80%, ADP 3,5uM >60%, kolagen >60% agregacji)

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że najwyższy odsetek oporności na leki przeciwplatekowe wykryto za pomocą badania PFA-100. Odsetek chorych

opornych w badaniach agregacji zależy od rodzaju agonisty i waha się od 2 do 40% (ADP 3,5 μ M vs PFA-100 Clo/Epi).

Na rycinie 6 przedstawiono odsetek chorych opornych na leki przeciw płytkowe włączonych do badania.



Ryc. 6. Odsetek chorych opornych na leki przeciw płytkowe uzyskany w poszczególnych badaniach, N – liczba chorych.

W badaniu PFA-100 w całej grupie badanych wykazano oporność na leki przeciw płytkowe u 20 chorych (40%). Natomiast w badaniach agregacji płytek odsetek chorych opornych w badaniu agregacji indukowanej wyniósł odpowiednio dla: ADP 3,5 μ M – 10% (5 chorych), kolagen – 10% (5 chorych) i ADP 5 μ M – 2% (1 chory). Tylko u 1

chorego stwierdzono oporność w badaniu PFA-100 oraz wszystkich wykonanych testach agregacji płytek.

5.2.4. Charakterystyka kliniczna i wyniki badań dodatkowych uzyskanych w badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach

W tabeli 15 przedstawiono charakterystykę kliniczną i wyniki badań dodatkowych uzyskanych w badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach.

Tab.15. Charakterystyka kliniczna i wyniki badań dodatkowych uzyskanych w badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach.

Oceniany parametr	Cała populacja N=50	Wrażliwi N=30	Oporni N=20	*p
Wiek (lata)	56±9	55±11	56±8	NS
Płeć				
Kobiety	15 (30%)	10 (33%)	5 (25%)	NS
Mężczyźni	35 (70%)	20 (67%)	15 (75%)	NS
Dane z wywiadu				
Nadciśnienie tętnicze	21 (42%)	13 (43%)	8 (40%)	NS
Cukrzyca	8 (16%)	5 (17%)	3 (15%)	NS
Nikotynizm	30 (60%)	18 (60%)	12 (60%)	NS
Objawowa dławica piersiowa	30 (60%)	18 (60%)	12 (60%)	NS
Wydolność wg Killipa i				
klasa I	30 (60%)	18 (60%)	12 (60%)	NS
klasa II	14 (28%)	8 (27%)	6 (30%)	-
klasa III	4 (8%)	2 (7%)	2 (10%)	-
klasa IV	2 (4%)	2 (7%)	0 (0%)	-

BMI (kg/m ²)	26,7±4,1	27.7±3.9	25.7±3.6	NS
Częstość rytmu serca (min ⁻¹)	91±16	74±25	77±21	NS
Ciśnienie tętnicze (mmHg)				
Skurczowe	125±21	120±25	130±36	< 0.05
Rozkurczowe	74±13	72±30	78±36	< 0.05
Badania laboratoryjne:				
Płytki krwi (G/l)	263±73	257±36	275±100	NS
Cholesterol całkowity (mmol/l)	5.97±1.12	6.47±1.0	5.66±1.07	NS
Cholesterol LDL (mmol/l)	3.94±1.13	4.37±0.77	3.83±0.95	NS
Cholesterol HDL (mmol/l)	1.03±0.23	0.98±0.16	1.06±0.26	NS
Trójglicerydy (mmol/l)	1.92±1.1	2.49±1.07	1.7±0.93	< 0.05
Stężenie troponiny I (ng/ml)	16.2±7.6	14.4±15.8	17.6±19.6	< 0.01
Stężenie homocysteiny (μm/l)	19.7±6.51	14.4±15.8	16±7.62	NS
Lokalizacja zawału w EKG				
przód	20 (40%)	12 (40%)	8 (40%)	NS
dół	16 (32%)	10 (33%)	6 (30%)	NS
bok	8 (16%)	5 (16%)	3 (15%)	NS
dół+bok	4 (8%)	2 (7%)	2 (10%)	NS
inna	2 (4%)	1 (3%)	1 (5%)	NS
Ilość zajętych tętnic w				
średnio	1.8	1,7	1,9	NS
1 tętnica	17 (34%)	10 (33%)	7 (35%)	NS
2 tętnice	26 (52%)	16 (54%)	10 (50%)	NS
3 tętnice	7 (14%)	4 (13%)	3 (15%)	NS
Fracja wyrzucania LK (%)	47±5	47±3	48±2	NS

* p – różnica pomiędzy podgrupą opornych i wrażliwych na leczenie przeciwłytkowe.

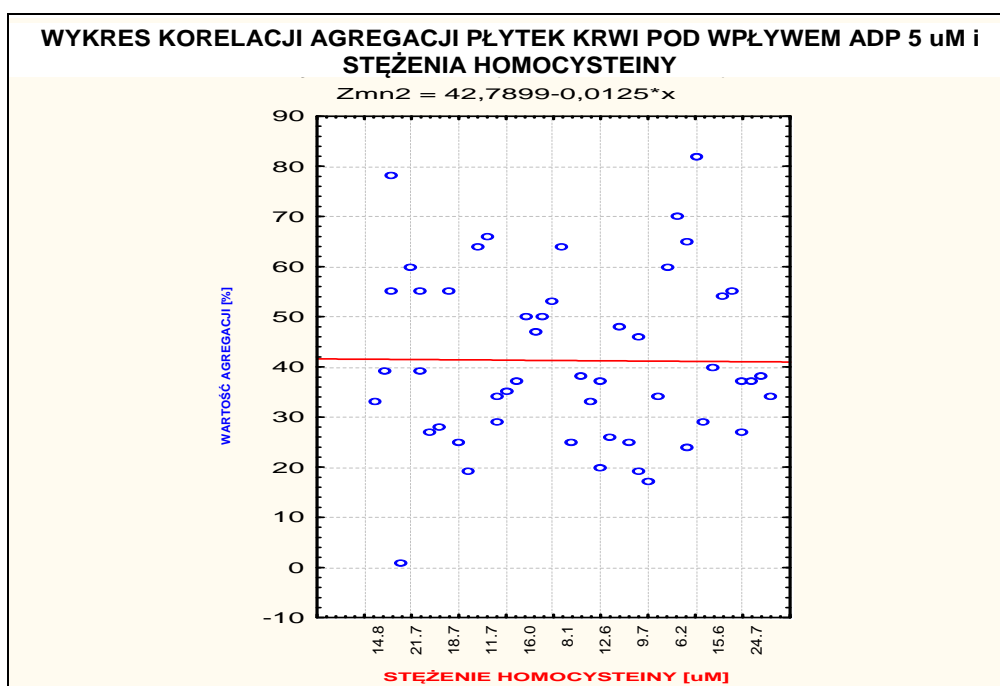
U chorych opornych na leki przeciwłytkowe stwierdzono istotnie statystycznie wyższe wartości skurczowego oraz rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi.

Statystycznie wyższe stężenia trójglicerydów oraz niższe troponiny I obserwowano w podgrupie chorych wrażliwych na leki przeciwplatekcyjne.

5.2.5. Ocena wpływu stężenia homocysteiny w osoczu na występowanie oporności na leki przeciwplatekcyjne.

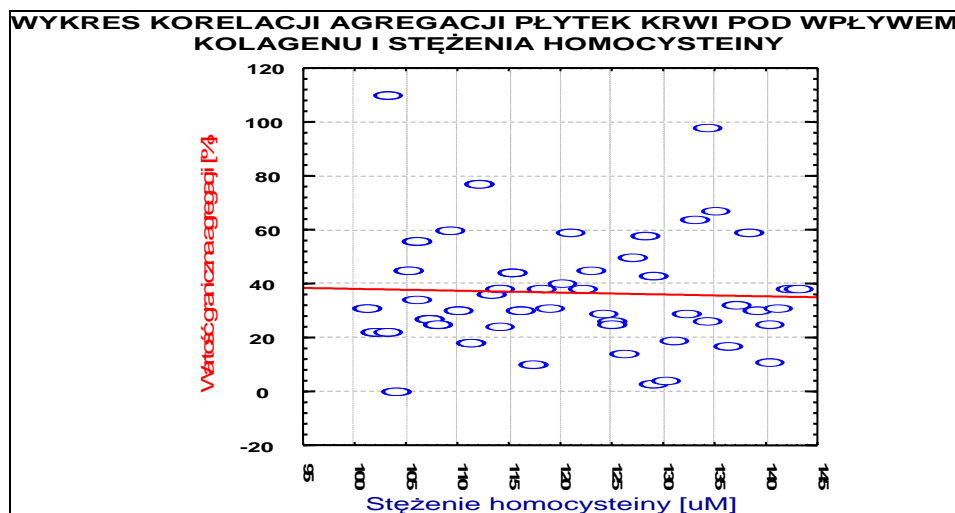
Średnie wartości stężeń homocysteiny nie różniły się w poszczególnych podgrupach (wrażliwi vs oporni) i wynosiły odpowiednio: $14,4 \pm 15,8$ vs $16 \pm 7,62$ ($p < 0,5$ -nieistotnie statystycznie).

Wykresy korelacji pomiędzy stężeniem homocysteiny a wartościami agregacji płytek krwi dla ADP i kolagenu przedstawiają ryciny 7, 8.



Ryc. 7. Korelacja pomiędzy wartościami intensywności agregacji płytek krwi pod wpływem 5 μ M ADP a stężeniem homocysteiny w osoczu.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wartościami intensywności agregacji płytek krwi pod wpływem ADP w stężeniu 5 μ M a stężeniem homocysteiny w osoczu.



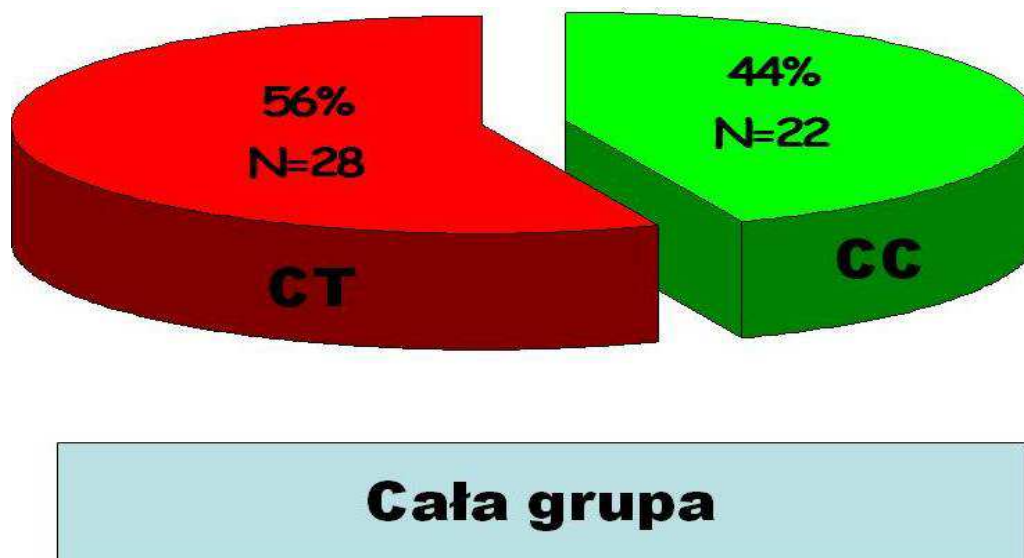
Ryc.8. Korelacja pomiędzy wartościami intensywności agregacji płytek krwi pod wpływem kolagenu 2 μ g/ml a stężeniem homocysteiny w osoczu.

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy wartościami intensywności agregacji płytek krwi pod wpływem kolagenu a stężeniem homocysteiny w osoczu.

W badanej grupie nie stwierdzono istnienia korelacji pomiędzy stężeniem homocysteiny w osoczu a występowaniem oporności na terapię lekami przeciwplatekowymi stwierdzanej za pomocą testów agregacji płytek krwi z zastosowaniem ADP i kolagenu.

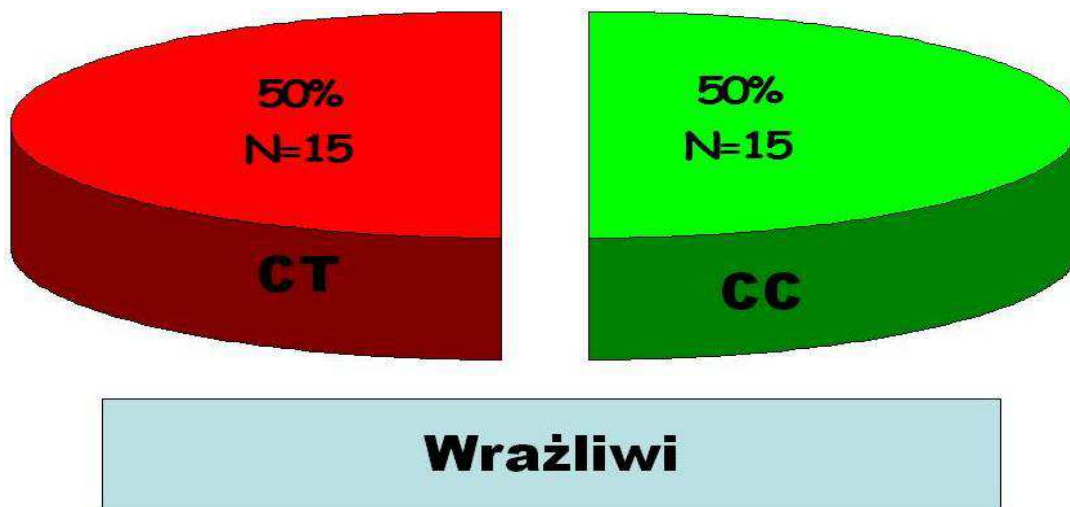
5.2.6. Ocena polimorfizmu C807T genu GP Ia

Rycina 9 przedstawia podział badanej grupy pod względem polimorfizmu genu C807T dla glikoproteiny I a. W całej badanej grupie u 28 (56%) pacjentów stwierdzono genotyp heterozygotyczny CT, a u 22 (44%) chorych genotyp CC dla genu glikoproteiny I a. Nie stwierdzono obecności homozygot TT.



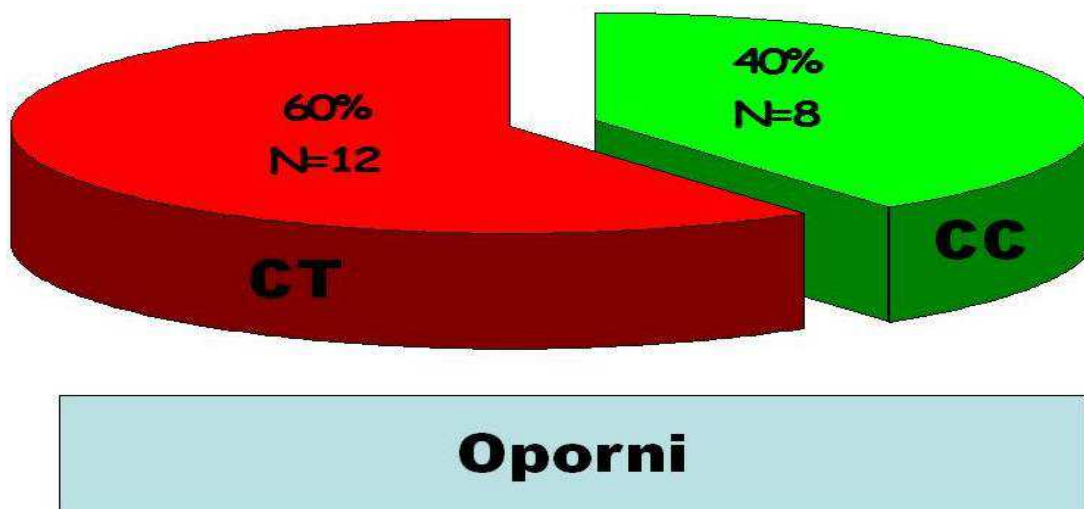
Ryc. 9. Podział całej badanej grupy pod względem polimorfizmu C807T genu dla glikoproteiny I a.

W grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym, którzy byli wrażliwi na leczenie przeciwplatekcyjne stwierdzono porównywalne liczebnie występowanie polimorfizmu CC i CT – rycina 10.



Ryc. 10. Podział grupy chorych wrażliwych na leczenie przeciwplatekcyjne pod względem polimorfizmu C807T genu dla glikoproteiny I a.

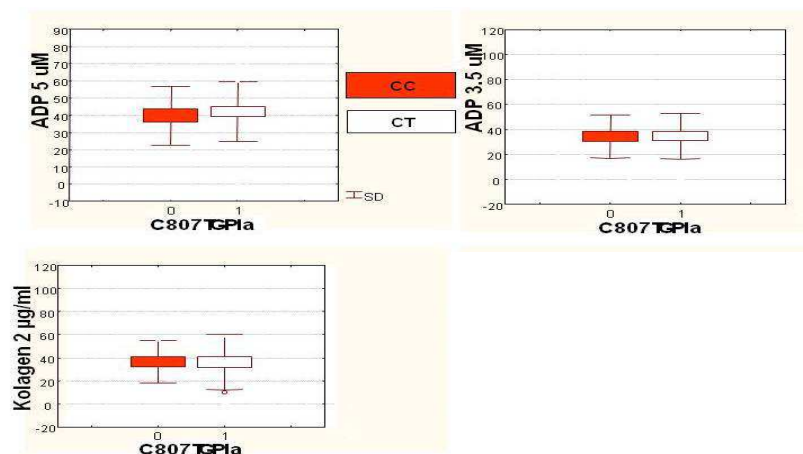
W grupie chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne polimorfizm CT występował u 60% badanych – rycina 11.



Ryc. 11. Podział grupy chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne pod względem polimorfizmu C807T genu dla glikoproteiny I a.

5.2.7. Ocena oporności na leki przeciwplatekcyjne w zależności od występowania polimorfizmu C807T GP Ia.

Wykresy korelacji pomiędzy występowaniem polimorfizmu C807T genu dla GP Ia a agregacją płytek krwi pod wpływem ADP i kolagenu przedstawia rycina 12.

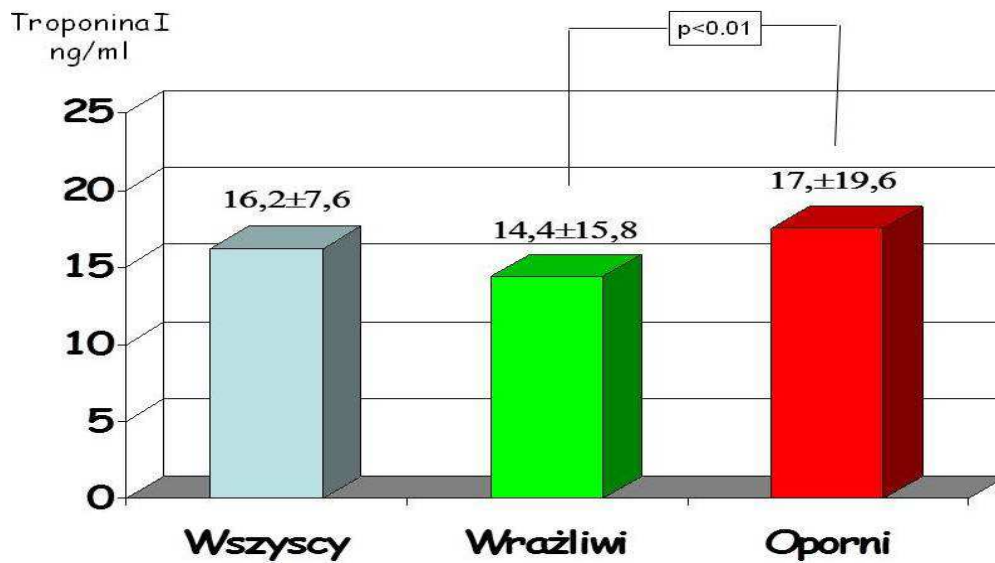


Ryc. 12. Wykres korelacji polimorfizmu C807T oraz oporności na leczenie przeciwplatekcyjne dla ADP i kolagenu.

Nie obserwowano istotnych korelacji pomiędzy występowaniem polimorfizmu genu dla GP Ia a agregacją płytek krwi pod wpływem zastosowanych agonistów.

5.2.8. Ocena stężenia troponiny I oraz frakcji wyrzutowej w zależności od występowania oporności na leki przeciwplatekcyjne

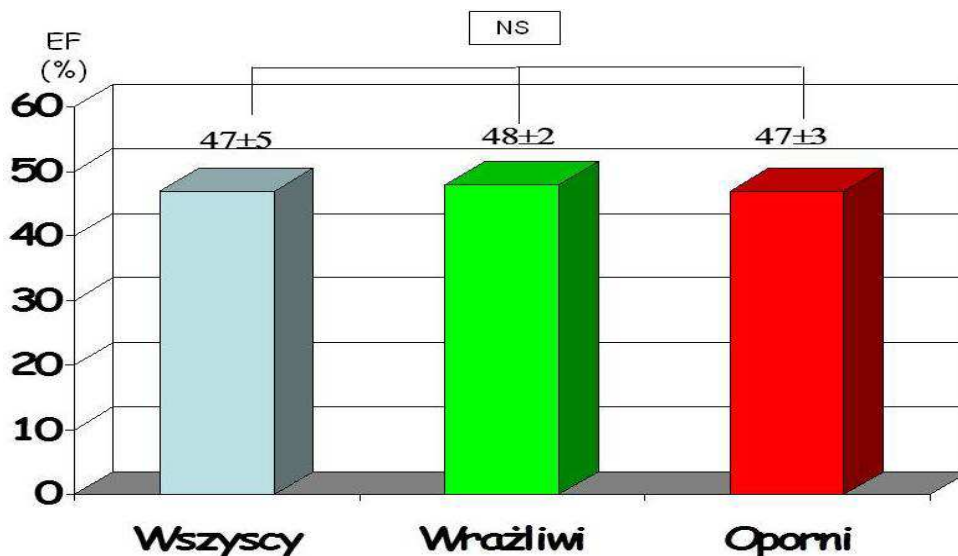
Dokonano porównania stężenia troponiny I w poszczególnych grupach chorych z ostrym zespołem wieńcowym – rycina 13.



Ryc. 13. Średnie wartości stężenia troponiny I w poszczególnych grupach chorych.

Stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenie troponiny I u chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne w porównaniu z grupą chorych wrażliwych.

Na rycinie 14 przedstawiono średnie wartości frakcji wyrzucania LK w poszczególnych grupach chorych.

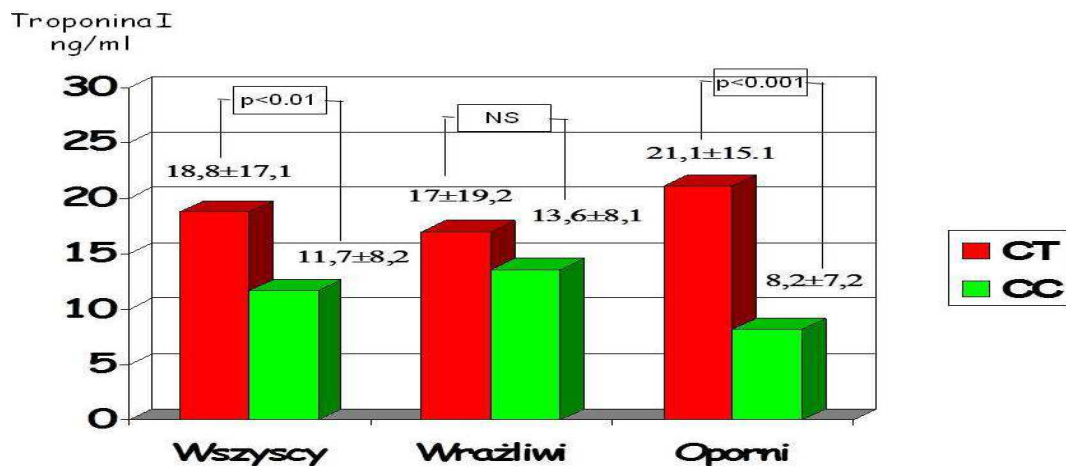


Ryc. 14. Średnie wartości frakcji wyrzucania (EF) lewej komory w poszczególnych grupach chorych.

Fracja wyrzucania LK nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy badanymi grupami.

5.2.9. Ocena wartości stężenia troponiny I, frakcji wyrzucania oraz stężenia homocysteiny w zależności od rodzaju polimorfizmu C807T genu dla GP Ia w porównywanych grupach chorych

Rycina 15 przedstawia średnie wartości stężenia troponiny I w całej badanej populacji oraz poszczególnych grupach chorych.

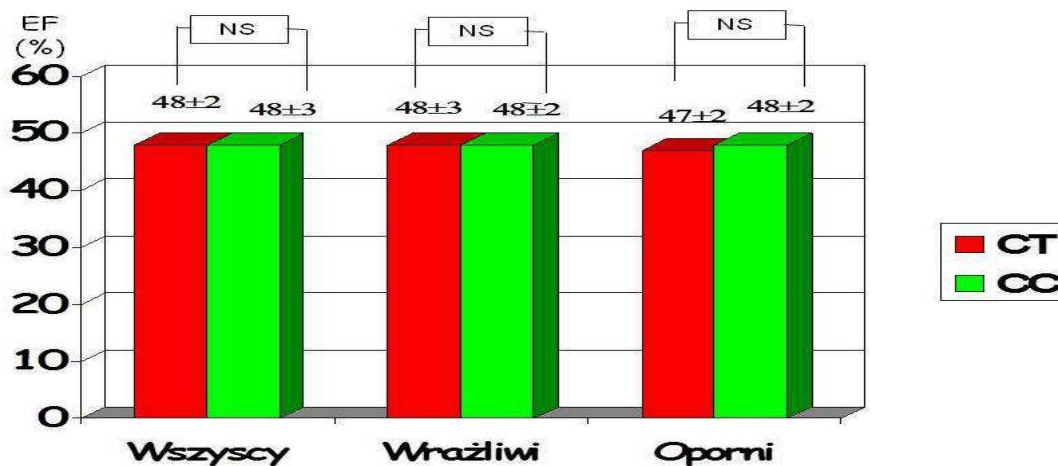


Ryc.

15. Średnie wartości troponiny I w zależności od rodzaju polimorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia.

Stwierdzono znamienne wyższe stężenia troponiny u chorych z polimorfizmem CT w całej badanej grupie oraz w grupie chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne.

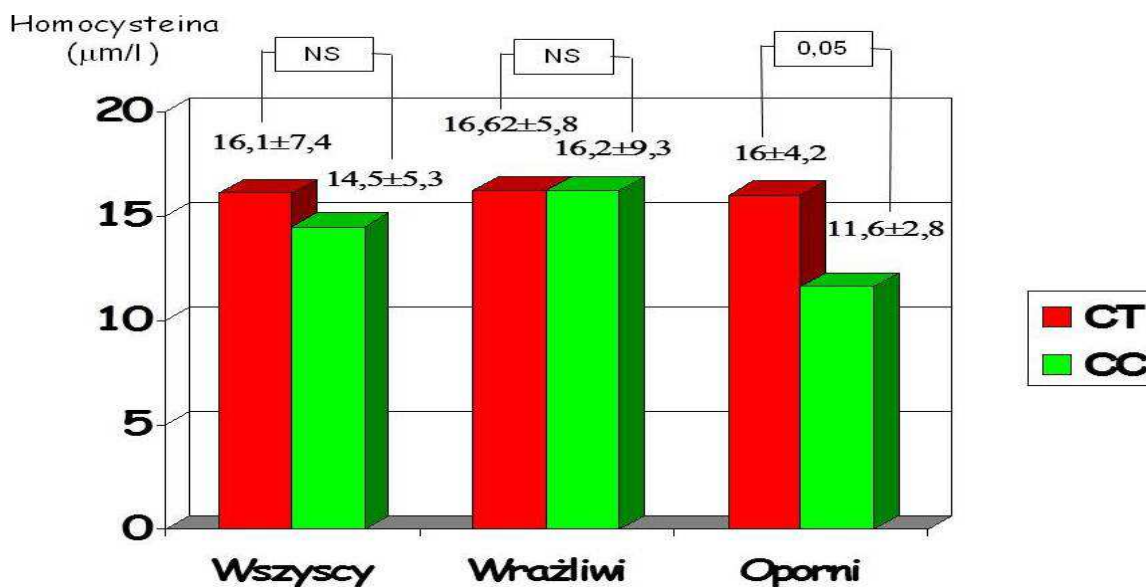
Na rycinie 16 przedstawiono średnie wartości frakcji wyrzucania w zależności od rodzaju polimorfizmu genu T807C glikoproteiny I a.



Ryc. 16. Średnie wartości frakcji wyrzucania LK (EF) w zależności od polimorfizmu C807T genu glikoproteiny I a.

Nie stwierdzono istotnych różnic w wartości frakcji wyrzucania LK w całej badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach w zależności od rodzaju polimorfizmu genu GP Ia.

Rycina 17 przedstawia średnie stężenia homocysteiny w poszczególnych grupach chorych w zależności od polimorfizmu genu C807T glikoproteiny I a.



Ryc.17. Średnie stężenia homocysteiny w poszczególnych grupach chorych w zależności od dymorfizmu C807T genu glikoproteiny I a.

W grupie chorych opornych z polimorfizmem CC stwierdzono istotnie statystycznie mniejsze stężenie homocysteiny w porównaniu z badanymi heterozygotami CT.

5.3. BADANIA KONTROLNE PO 3 LATACH

Do badań kontrolnych po 3 latach od włączenia od badania, zgłosiło się 42 chorych tj. 25 z grupy pacjentów, których wstępnie określono jako wrażliwych oraz 17 z grupy opornych na leczenie przeciwplatekcyjne. U 8 chorych z grupy wyjściowej nie przeprowadzono badań kontrolnych: 6 osób nie wyraziło chęci dalszego uczestnictwa w badaniu (uzyskano informację telefoniczną o stanie klinicznym oraz zdarzeniach

sercowo-naczyniowych) a 2 chorych zmarło w okresie obserwacji [1 osoba na udar mózgu (wcześniej przeżyła kolejny zawał serca), 1 osoba na zawał serca].

W tabeli 16 przedstawiono dane o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym przeprowadzonym po 3 latach w całej badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach.

5.3.1. Określenie częstości nawrotów incydentów wieńcowych w trakcie trzyletniej obserwacji badanej grupy pacjentów w skojarzeniu z ocenianą opornością na leki przeciwplatekcyjne.

Tab. 16. Ocena danych o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach w całej badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach.

Oceniany parametr	Cała populacja N=42	Wrażliwi N=25 (1)	Oporni N=17 (2)	P 2 vs 1
Zdarzenia				
zawał	2 (5%)	0 (0%)	2 (12%)	
udar	1 (2.5%)	0 (0%)	1 (6%)	
ponowne PCI	2 (5%)	0 (0%)	2 (12%)	
Objawowa dławica wg CCS				
klasa 1	30 (71%)	20 (80%)	10 (59%)	< 0.01
klasa 2	12 (29%)	5 (20%)	6 (35%)	
klasa 3	0 (0%)	0 (0%)	1 (6%)	
klasa 4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Wydolność serca wg NYHA				
klasa I	36 (50%)	22 (88%)	14 (82%)	< 0.05
klasa II	6 (32%)	3 (12%)	3 (18%)	< 0.01

klasa III	0	0	0
klasa IV	0	0	0

Istotne powikłania sercowo-naczyniowe (zgon, zawał, udar, konieczność rewaskularyzacji) wystąpiły tylko w grupie chorych opornych na leki przeciwplatekcyjne.

W trzyletniej obserwacji odsetek chorych, którzy mieli bardziej nasilone objawy dławicowe oraz wyższą klasę NYHA stwierdzono w podgrupie opornych na leki przeciwplatekcyjne.

Dalszą analizę uzyskanych wyników prowadzono w kontekście zależności danych klinicznych od występowania polimorfizmu C807T genu GP 1a.

Tabela 17 przedstawia dane o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach w całej badanej grupie w zależności od polimorfizmu C807T GP 1a.

Tab. 17. Ocena danych o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach w całej badanej grupie w zależności od polimorfizmu C807T GP 1a.

Oceniany parametr	Cała populacja N=42	Cała populacja (1) N=19 CC	Cała populacja (2) N=23 CT	P 2 vs 1
Zdarzenia				
zawał	2 (5%)	1 (5%)	1 (4%)	
udar	1 (2.5%)	0 (0%)	1 (4%)	
ponowne PCI	2 (5%)	0 (0%)	2 (9%)	
Objawowa dławica wg CCS				
klasa 1	29 (69%)	10 (53%)	19 (83%)	< 0.01
klasa 2	12 (29%)	9 (47%)	3 (13%)	

klasa 3	1 (2%)	0 (0%)	1 (4%)	
klasa 4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Wydolność wg NYHA				
klasa I	36 (86%)	14 (74%)	22 (96%)	< 0.05
klasa II	6 (14%)	5 (26%)	1 (4%)	
klasa III	0	0	0	
klasa IV	0	0	0	

Na podstawie analizy danych uzyskanych w trzyletniej obserwacji w całej badanej populacji stwierdzono, że objawy dławicowe oraz niewydolność serca były bardziej nasilone w grupie chorych z polimorfizmem genu C807T GP Ia typu CT.

Tabela 18 przedstawia dane o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych wrażliwych w zależności od polimorfizmu C807T GP Ia.

Tab.18. Ocena danych o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych wrażliwych w zależności od polimorfizmu C807T GP Ia.

Oceniany parametr	Wrażliwi N=25	Wrażliwi N=12 CC	Wrażliwi N=13 CT
Zdarzenia			
zawał	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
udar	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ponowne PCI	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Objawowa dławica wg CCS			
klasa 1	20 (80%)	10 (83%)	10 (78%)
klasa 2	5 (20%)	2 (17%)	3 (22%)

klasa 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
klasa 4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Wydolność wg NYHA			
klasa I	22 (88%)	10 (83%)	12 (92%)
klasa II	3 (12%)	2 (17%)	1 (18%)
klasa III	0	0	0
klasa IV	0	0	0

Ze względu na zbyt małe podgrupy nie przeprowadzono analizy statystycznej.

Tabela 19 przedstawia dane o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym w grupie chorych opornych w zależności od polimorfizmu C807T GP Ia.

Tab. 19. Ocena danych o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych opornych w zależności od polimorfizmu C807T GP Ia.

Oceniany parametr	Chorzy oporni N=17	Chorzy oporni N=7 CC	Chorzy oporni N=10 CT
Zdarzenia			
zawał	2 (12%)	1 (14%)	1 (9%)
udar	1 (6%)	0 (0%)	1 (4%)
ponowne PCI	2 (6%)	0 (0%)	2 (8%)
Objawowa dławica wg CCS			
klasa 1	10 (55%)	5 (71%)	5 (45%)
klasa 2	8 (45%)	2 (29%)	6 (55%)
klasa 3	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
klasa 4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Wydolność wg NYHA			
klasa I	14 (78%)	6 (88%)	8 (73%)
klasa II	4 (22%)	1 (12%)	3 (27%)
klasa III	0	0	0
klasa IV	0	0	0

Ze względu na zbyt małą liczebność podgrup nie przeprowadzono analizy statystycznej.

5.3.2. Ocena danych klinicznych, wyników wybranych parametrów biochemicznych oraz wskaźników echokardiograficznych uzyskanych w badaniu kontrolnym po 3 latach.

Wybrane parametry kliniczne i biochemiczne

W tabeli 20 przedstawiono wynik wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych w badaniu kontrolnym w całej badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach. Więcej mężczyzn zawierała grupa chorych wyjściowo wrażliwych.

Tab. 20. Wyniki wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych w badaniu po 3 latach w całej badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach.

Oceniany parametr	Cała populacja N=42	Wrażliw wyjściowo N=25	Oporni wyjściowo N=17	p
Wiek (lata)	59±9	58±11	58±8	NS
Płeć				

Kobiety	13 (31%)	7 (29%)	6 (33%)	NS
Mężczyźni	29 (69%)	17 (71%)	12 (57%)	< 0.05
Dane z wywiadu				
Nadciśnienie	23 (55%)	13 (55%)	10 (55%)	NS
Cukrzyca	16 (38%)	9 (37%)	7 (39%)	NS
Nikotynizm	9 (21%)	5 (20%)	4 (22%)	NS
BMI (kg/m ²)	26,7±4,4	26.3±5.1	27.3±3.5	NS
Częstość rytmu	69±18	70±20	68±16	NS
Ciśnienie tętnicze				
Skurczowe	120±29	118±25	122±36	NS
Rozkurczowe	70±11	72±12	68±10	NS
Badania				
Płytki krwi (G/l)	236±70	239±79	233±59	NS
Cholesterol	4.77±0.99	4.70±1.06	4.85±0.92	NS
Cholesterol LDL	2.70±0.79	2.62±0.72	2.82±0.87	NS
Cholesterol HDL	1.32±0.34	1.30±0.37	1.35±0.31	NS
Trójglicerydy	1.6±0.8	1.7±0.96	1.5±0.57	NS
Fracja wyrzucania	59±10	60±10	58±9	NS

W tabeli 21 przedstawiono wynik wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych w badaniu kontrolnym po 3 latach w całej badanej grupie.

Tab. 21. Porównanie wyników wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach w całej badanej grupie.

Oceniany parametr	Cała populacja wyjściowo N=50	Cała populacja bad. kontrolne N=42	p
Wiek (lata)	56 ±9	59±9	NS

Płeć			
Kobiety	15 (30%)	13 (31%)	NS
Mężczyźni	35 (70%)	29 (69%)	NS
Dane z wywiadu			
Nadciśnienie tętnicze	21 (42%)	23 (55%)	NS
Cukrzyca	8 (16%)	16 (38%)	< 0.01
Nikotynizm	30 (60%)	9 (21%)	< 0.01
BMI (kg/m ²)	26,7±4,1	26,7±4,4	NS
Częstość rytmu serca (min ⁻¹)	91±16	69±18	< 0.05
Ciśnienie tętnicze (mmHg)			
skurczowe	125±21	120±29	NS
rozkurczowe	74±13	70±11	NS
Badania laboratoryjne:			
Płytki krwi (G/l)	221±88	236±70	NS
Cholesterol całkowity (mmol/l)	5.97±1.12	4.77±0.99	< 0.05
Cholesterol LDL (mmol/l)	3.94±1.13	2.70±0.79	NS
Cholesterol HDL (mmol/l)	1.03±0.23	1.32±0.34	NS
Trójglicerydy (mmol/l)	1.92±1.1	1.6±0.8	NS
Fracja wyrzucania LK (%)	48±3	59±10	< 0.01

Średnie wartości frakcji wyrzucania LK okazały się istotnie wyższe u chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach ($p < 0.01$) w porównaniu z badaniem echokardiograficznym z początku obserwacji. W okresie trzyletniej obserwacji istotnie wzrosła liczba chorych z rozpoznaną cukrzycą ($p < 0.01$) oraz zanotowano istotne zmniejszenie ilości osób palących ($p < 0.01$). Obserwowano również znamienne obniżenie średniej częstości rytmu serca ($p < 0.05$). Stwierdzono również istotne statystycznie obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego, frakcji LDL, trójglicerydów oraz wzrost stężenia frakcji HDL).

W tabeli 22 przedstawiono wybrane dane kliniczne oraz wyniki badań laboratoryjnych uzyskanych w badaniu kontrolnym u chorych wyjściowo wrażliwych na leki przeciwplatekcyjne. Istotnie statystycznie różnice dotyczyły częstszego występowania nadciśnienia tętniczego oraz cukrzycy w badaniu kontrolnym odpowiednio 43% vs 55% ($p < 0.05$) i 17% vs 35% ($p < 0.01$). Stwierdzono również rzadsze występowanie nikotynizmu u chorych uczestniczących w badaniu kontrolnym ($p < 0.01$). Zwraca uwagę poprawa wyjściowego profilu lipidowego oraz wzrost wartości frakcji wyrzucania LK (60 ± 10 vs 47 ± 3) po 3 latach w porównaniu z badaniami z początku obserwacji ($p < 0.01$).

Tab. 22. Porównanie wyników wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych wyjściowo wrażliwych na leki przeciwplatekcyjne.

Oceniany parametr	Wyjściowo N=30	Bad. kontrolne N=25	p
Wiek (lata)	55±11	60±8	NS
Płeć			
Kobiety	10 (33%)	7 (29%)	NS
Mężczyźni	20 (67%)	17 (71%)	NS
Dane z wywiadu			
Nadciśnienie tętnicze	13 (43%)	13 (55%)	< 00.5
Cukrzyca	5 (17%)	9 (37%)	< 00.1
Nikotynizm	18 (60%)	5 (20%)	< 0.01
BMI (kg/m ²)	27.7±3.9	26.3±5.1	NS
Częstość rytmu serca (min ⁻¹)	74±25	70±20	NS
Ciśnienie tętnicze (mmHg)			
Skurczowe	120±25	118±25	NS

Rozkurczowe	72±30	72±12	NS
Badania laboratoryjne:			
Płytki krwi (G/l)	230±68	239±79	NS
Cholesterol całkowity	6.47±1.0	4.70±1.06	< 0.05
Cholesterol LDL (mmol/l)	4.37±0.77	2.62±0.72	< 0.05
Cholesterol HDL (mmol/l)	0.98±0.16	1.30±0.37	< 0.05
Trójglicerydy (mmol/l)	2.49±1.07	1.7±0.96	< 0.05
Frakcja wyrzucania LK (%)	47±3	60±10	< 0.01

W tabeli 3 przedstawiono wynik wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych w badaniu kontrolnym po 3 latach u chorych wyjściowo opornych na leki przeciwplatekcyjne.

Tab. 23. Porównanie wyników wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych opornych na leki przeciwplatekcyjne.

Oceniany parametr	Wyjściowo N=20	Bad. kontrolne N=17	p
Wiek (lata)	56±8	58±9	NS
Płeć			
Kobiety	5 (25%)	6 (33%)	NS
Mężczyźni	15 (75%)	12 (57%)	< 0.05
Dane z wywiadu			
Nadciśnienie tętnicze	8 (40%)	10 (55%)	< 0.05
Cukrzyca	3 (15%)	7 (39%)	< 0.01
Nikotynizm	12 (60%)	4 (22%)	< 0.01
BMI (kg/m ²)	25.7±3.6	27.3±3.5	NS
Częstość rytmu serca (min ⁻¹)	77±21	68±16	< 0.05
Ciśnienie tętnicze (mmHg)			
Skurczowe	130±36	122±36	< 0.05

Rozkurczowe	78±36	68±10	< 00.5
Badania laboratoryjne:			
Płytki krwi (G/l)	239±79	233±59	NS
Cholesterol całkowity (mmol/l)	5.66±1.07	4.85±0.92	< 00.5
Cholesterol LDL (mmol/l)	3.83±0.95	2.82±0.87	< 00.5
Cholesterol HDL (mmol/l)	1.06±0.26	1.35±0.31	< 00.5
Trójglicerydy (mmol/l)	1.7±0.93	1.5±0.57	NS
Fracja wyrzucania LK (%)	48±2	58±9	< 0.01

Istotnie statystycznie różnice dotyczyły wyższego odsetka mężczyzn, częstszego występowania w wywiadach nadciśnienia tętniczego oraz cukrzycy u chorych opornych w badaniu kontrolnym ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Stwierdzono również rzadsze występowanie nikotynizmu u chorych uczestniczących w badaniu kontrolnym ($p < 0.01$). Zwraca także uwagę poprawa parametrów ciśnienia tętniczego oraz wyjściowego profilu lipidowego oraz istotnie wyższa wartość frakcji wyrzucania LK ($p < 0.01$) w porównaniu z początkowym okresem badania.

W tabeli 24 przedstawiono porównanie wyników wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych wrażliwych i opornych.

Tab. 24. Porównanie wyników wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych wrażliwych i opornych.

Oceniany parametr	Wrażliwi bad. kontrolne N=25	Oporni bad. kontrolne N=17	p
Wiek (lata)	60±8	58±9	NS

Płeć				
	Kobiety	7 (29%)	6 (33%)	NS
	Mężczyźni	17 (71%)	12 (57%)	< 0.05
Dane z wywiadu				
	Nadciśnienie tętnicze	13 (55%)	10 (55%)	NS
	Cukrzyca	9 (37%)	7 (39%)	NS
	Nikotynizm	5 (20%)	4 (22%)	NS
	BMI (kg/m ²)	26.3±5.1	27.3±3.5	NS
	Częstość rytmu serca (min ⁻¹)	70±20	68±16	NS
	Ciśnienie tętnicze (mmHg)			
	Skurczowe	118±25	122±36	NS
	Rozkurczowe	72±12	68±10	NS
Badania laboratoryjne:				
	Płytki krwi (G/l)	239±79	233±59	NS
	Cholesterol całkowity (mmol/l)	4.70±1.06	4.85±0.92	NS
	Cholesterol LDL (mmol/l)	2.62±0.72	2.82±0.87	NS
	Cholesterol HDL (mmol/l)	1.30±0.37	1.35±0.31	NS
	Trójglicerydy (mmol/l)	1.7±0.96	1.5±0.57	NS

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych w badaniu kontrolnym w grupie chorych wrażliwych i opornych poza większą ilością mężczyzn w grupie chorych wrażliwych na leki przeciwplatekcyjne.

5.3.3. Wynik oceny czynności płytek wykonane aparatem PFA-100 w badaniu kontrolnym po 3 latach

W przeprowadzonych badaniach kontrolnych w ocenie czynności płytek krwi posłużono się aparatem PFA-100.

W tabeli 25 zestawiono wyniki wyjściowych oraz kontrolnych badań oceny oporności. Zwraca uwagę zmiana statusu oporności określanej w PFA-100 zarówno w grupie chorych wyjściowo opornych (7 chorych – 41%) oraz wrażliwych (4 chorych – 20%) na leki przeciwplatekcyjne. W badaniu PFA-100 wyjściowy wynik nie zmienił się po 3 latach u 31 chorych.

Tab. 25. Zestawienie wyników wyjściowych oraz kontrolnego badania oporności na leki przeciwplatekcyjne przeprowadzone w aparacie PFA-100..

Inicjały N=42	PFA100 Coll/Epi wyjściowo	Wynik oporności wyjściowej	PFA100 Coll/Epi kontrolnie po 3 latach	Wynik oporności po 3 latach	Typ zmiany
SP	148	O	184	W	O⇒W
MB	134	O	117	O	b/z
MM	109	O	111	O	b/z
MJ	86	O	243	W	O⇒W
ND	148	W	192	W	b/z
CS	300	W	300	W	b/z
SO	245	W	253	W	b/z
PW	300	W	106	O	W⇒O
AL	93	O	289	W	O⇒W
BT	300	W	300	W	b/z
HA	199	W	300	W	b/z
CM	300	W	300	W	b/z
SM	83	O	95	O	b/z
ZB	300	W	130	O	W⇒O
GD	188	W	300	W	b/z
SC	131	O	258	W	O⇒W
BI	300	W	300	W	b/z

KP	87	O	151	O	b/z
GW	74	O	118	O	b/z
CZ	300	W	300	W	b/z
KH	129	O	139	O	b/z
KT	86	O	136	O	b/z
BH	139	O	300	W	O⇒W
NK	300	W	300	W	b/z
BM	119	O	300	W	O⇒W
PG	199	W	125	O	W⇒O
OR	300	W	300	W	b/z
CE	300	W	300	W	b/z
SA	88	O	142	O	b/z
SK	221	W	254	W	b/z
DZ	178	W	300	W	b/z
NJ	300	W	240	W	b/z
NH	210	W	300	W	b/z
OB	84	O	106	O	b/z
PZ	234	W	300	W	b/z
BW	300	W	135	O	W⇒O
BD	101	O	146	O	b/z
GJ	300	W	263	W	b/z
DB	300	W	300	W	b/z
JJ	202	W	300	W	b/z
SK	141	O	206	W	O⇒W
PK	300	W	300	W	b/z

(O) – oporny na leki przeciwplytkowa w badaniu PFA-100

(W) - wrażliwy na leki przeciwplytkowa w badaniu PFA-100

b/z – bez zmian statusu

O⇒W – przejście ze statusu oporny w bad. wyjściowym na wrażliwy w bad. kontrolnym

W⇒O – przejście ze statusu wrażliwy w bad. wyjściowym na oporny w bad. kontrolnym

Obserwowane zmiany statusu oporności w ocenianej po 3 latach grupie chorych wystąpiły w znacznie większym odsetku w grupie chorych „oporny→wrażliwy” (41%) w porównaniu z grupą chorych „wrażliwy→oporny” (20%).

W tabeli 25 przedstawiono porównanie wyników średniego czasu zamknięcia apertury w badaniach z użyciem epinefryny oraz ADP dla całej badanej grupy uzyskanych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach.

Tab. 26. Średnie wartości czasu zamknięcia apertury (w sekundach) dla epinefryny uzyskane w całej badanej grupie wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach.

Agonista	Cała grupa wyjściowo N=50	Cała grupa bad. kontrolne N=42	P
Epinefryna (CEPI-CT)	184 ± 84	223 ± 80	NS

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic średniego czasu zamknięcia apertury dla epinefryny uzyskanych w całej badanej grupie w badaniu kontrolnym.

W tabeli 26 przedstawiono wyniki pomiaru czasu zamknięcia apertury dla epinefryny u chorych wrażliwych uzyskane wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym.

Tab. 27. Średnie wartości czasu zamknięcia apertury (w sekundach) dla epinefryny uzyskane u chorych wyjściowo wrażliwych na leki przeciwpłytkowe oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach.

Agonista	Wyjściowo N=30	Bad. kontrolne N=25	P
Epinefryna (CEPI-CT)	258 ± 49	257 ± 78	NS

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic średniego czasu zamknięcia apertury dla epinefryny oraz pomiędzy wynikiem wstępnym a uzyskanym w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie wyjściowo wrażliwych.

W tabeli 27 przedstawiono wyniki pomiaru średniego czasu zamknięcia apertury dla epinefryny u chorych opornych uzyskane wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym.

Tab. 28. Średnie wartości czasu zamknięcia apertury (w sekundach) dla epinefryny uzyskane u chorych wyjściowo opornych oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach.

Agonista	Oporni wyjściowo N=20	Oporni bad. kontrolne N=17	P
Epinefryna (CEPI-CT)	111 ± 28	138 ± 45	NS

Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic średniego czasu zamknięcia apertury dla epinefryny pomiędzy wartościami uzyskanymi wyjściowo a badaniami kontrolnymi.

W tabeli 28 przedstawiono średnie wartości czasu zamknięcia apertury dla epinefryny u chorych wyjściowo wrażliwych uzyskane w badaniu wstępnym i w badaniu kontrolnym.

Tab. 29. Średnie wartości czasu zamknięcia apertury (w sekundach) dla epinefryny uzyskane u chorych wyjściowo wrażliwych ocenianych w badaniu kontrolnym po trzech latach niezależnie od statusu wrażliwości.

Agonista	Wrażliwi wyjściowo N=25	Wrażliwi <i>bad. kontrolne</i> N=25	P
Epinefryna (CEPI-CT)	272 ± 48	257 ± 73	NS

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic czasu zamknięcia apertury dla epinefryny w grupie chorych wrażliwych wyjściowo pomiędzy wynikiem wstępnym a uzyskanym w badaniu kontrolnym.

W tabeli 29 przedstawiono średnie wartości czasu zamknięcia apertury dla epinefryny u chorych wyjściowo opornych uzyskane w badaniu wstępnym i w badaniu kontrolnym.

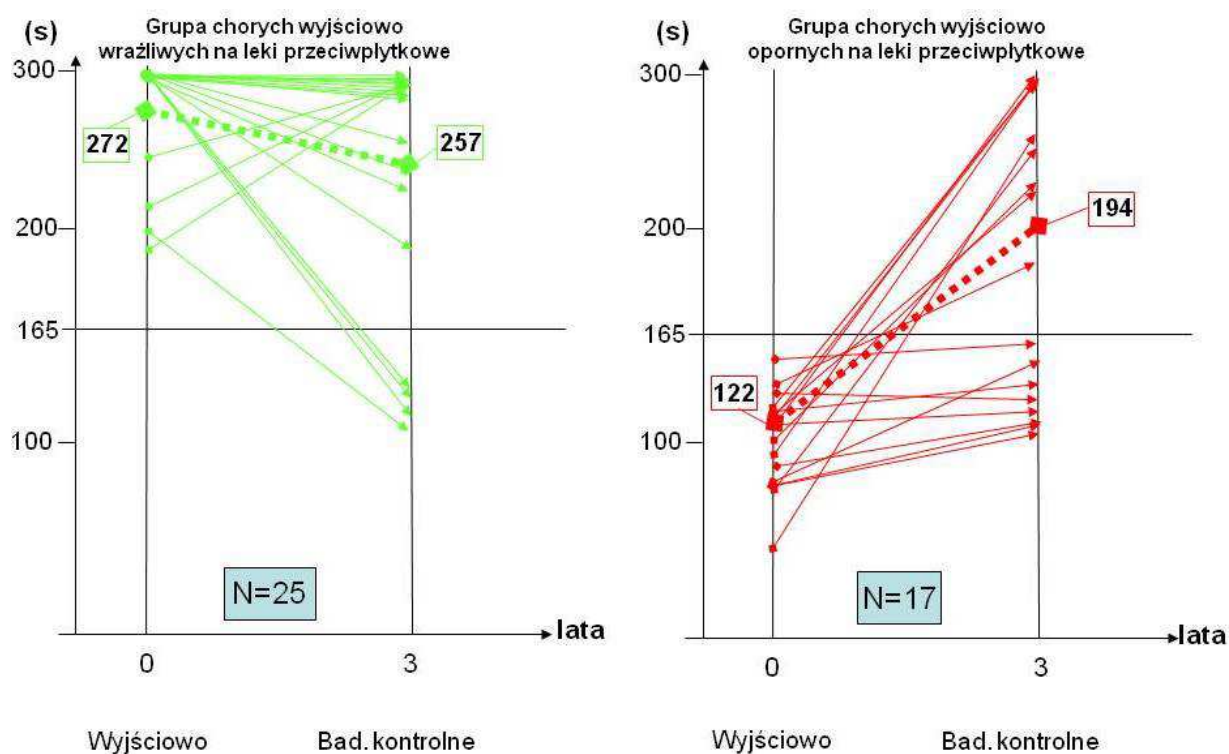
Tab. 30. Średnie wartości czasu zamknięcia apertury (w sekundach) dla epinefryny uzyskane u chorych wyjściowo opornych ocenianych w badaniu kontrolnym po trzech latach niezależnie od statusu wrażliwości .

Agonista	Oporni wyjściowo N=17	Oporni <i>bad. kontrolne</i> N=17	P
Epinefryna (CEPI-CT)	122 ± 48	194 ± 48	0.05

Stwierdzono istotne statystycznie wydłużenie ($p < 0.05$) średniego czasu zamknięcia apertury w porównaniu ze średnią wartością uzyskaną w badaniu wstępnym w grupie chorych wyjściowo opornych na leki przeciwpłytkowe

Na rycinie 18 przedstawiono zmiany czasu zamknięcia apertury w PFA-100 dla epinefryny po 3 latach w grupie chorych wyjściowo wrażliwych i opornych na leki przeciwpłytkowe.

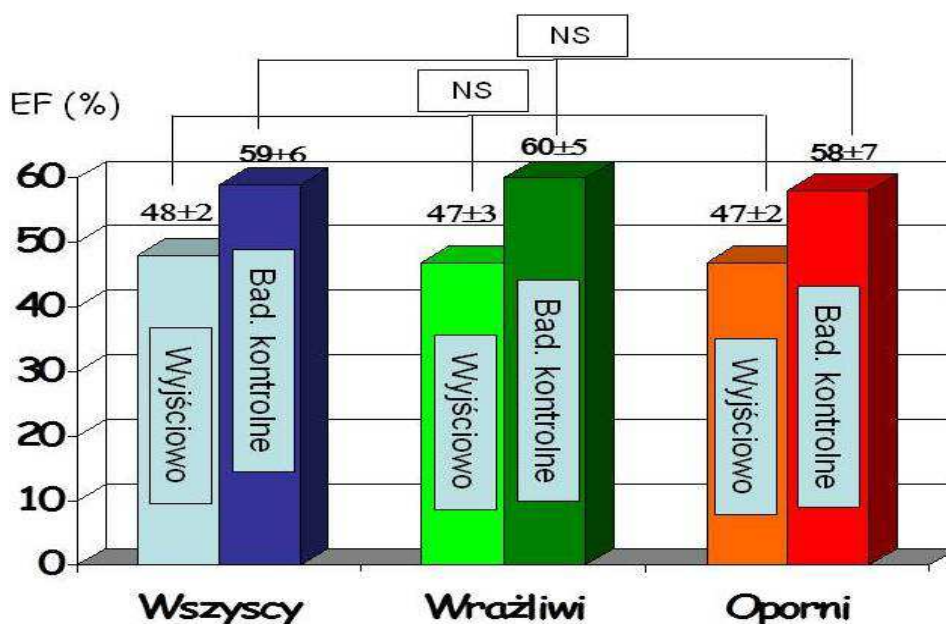
Ryc 18. Zmiany czasu zamknięcia apertury w PFA-100 dla epinefryny po 3 latach w grupie chorych wyjściowo wrażliwych i opornych na leki przeciwpłytkowe.



W badaniach kontrolnych obserwowano wydłużenie średniego czasu zamknięcia apertury w całej populacji oraz w poszczególnych podgrupach.

5.3.4. Ocena wybranych parametrów wskaźników echokardiograficznych uzyskanych w badaniu kontrolnym po 3 latach

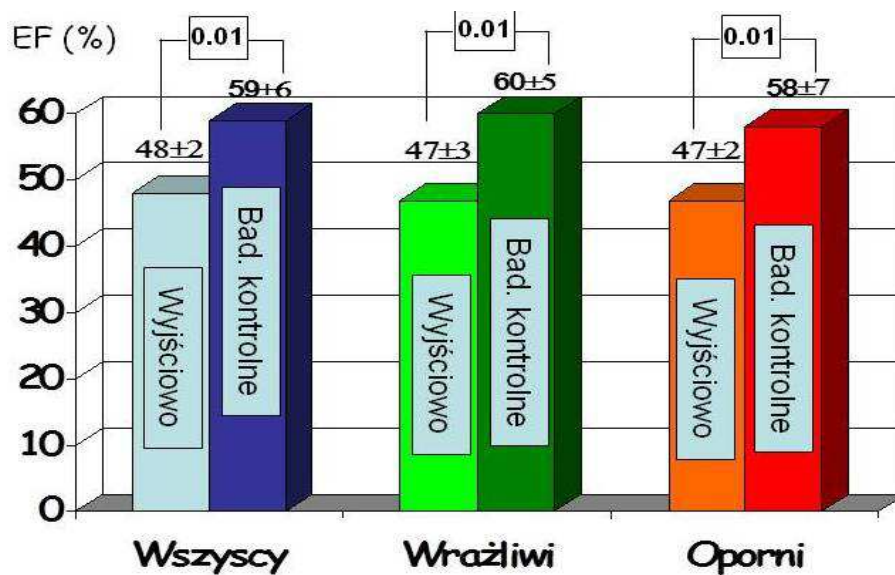
Rycina 19 przedstawia zbiorcze zestawienie wyjściowych oraz uzyskanych w badaniu kontrolnym po 3 latach średnich wartości frakcji wyrzucania LK ocenionych w całej badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach.



Ryc. 19. Średnie wartości frakcji wyrzucania (EF) lewej komory w poszczególnych grupach chorych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach

Nie wykazano istotnych różnic średniej wartości EF ocenianej wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym w całej grupie oraz w poszczególnych podgrupach.

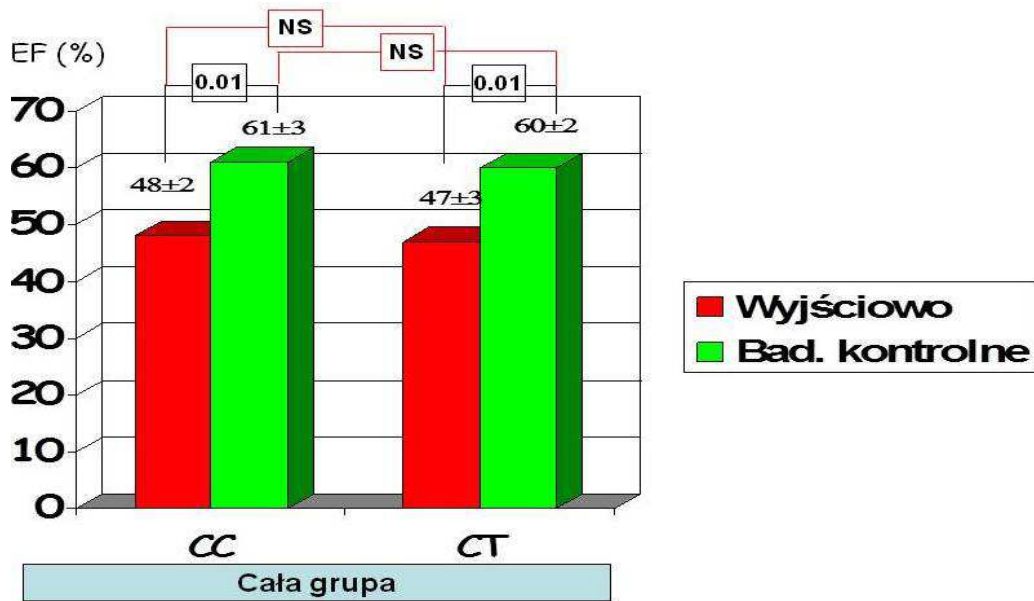
Stwierdzono natomiast istotny statystycznie przyrost wartości tego parametru w badaniu kontrolnym po 3 latach w całej badanej populacji, a także zarówno u chorych wyjściowo wrażliwych, jak i opornych na leczenie przeciwplatekcyjne (ryc. 20).



Ryc. 20. Porównanie średnich wartości frakcji wyrzucania (EF) lewej komory w poszczególnych grupach chorych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach

W badaniu kontrolnym nie stwierdzono różnic w zakresie średniej wartości frakcji wyrzucania LK pomiędzy grupą chorych wstępnie wrażliwych oraz opornych na leki przeciwplatekcyjne (60 ± 5 vs 58 ± 7).

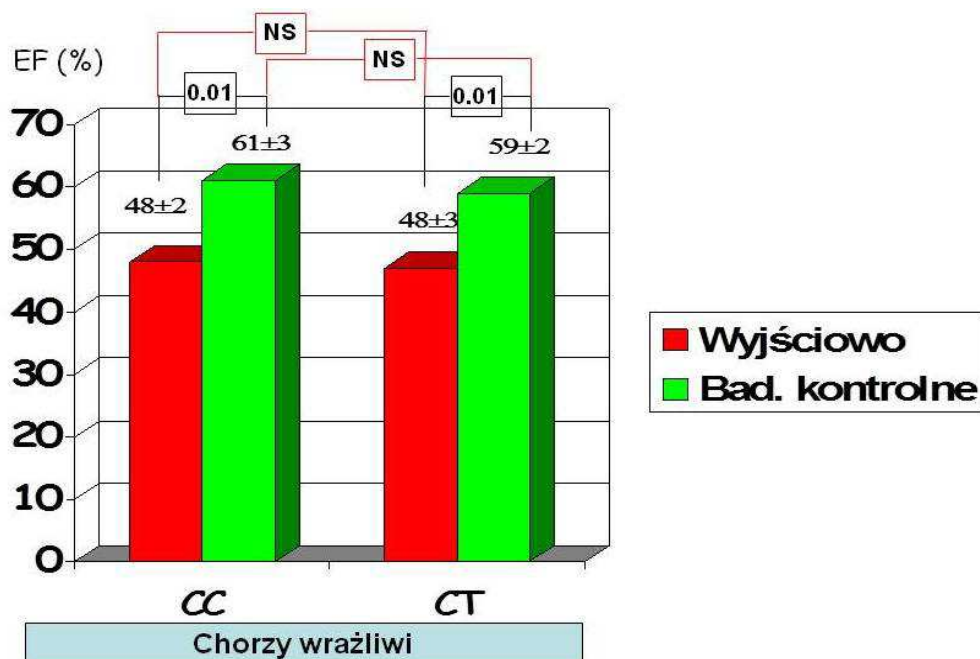
Rycina 21 przedstawia średnie wartości frakcji wyrzucania LK uzyskane w całej badanej populacji wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym w zależności od polimorfizmu genu dla GP Ia.



Ryc. 21. Średnie wartości frakcji wyrzucania LK (EF) w zależności od polimorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia uzyskane w całej grupie wyjściowo i w badaniu kontrolnym po 3 latach.

Nie stwierdzono istotnych różnic zależnych od polimorfizmu genu GP Ia w porównywanych wyjściowo i w badaniu kontrolnym wartościach frakcji wyrzucania LK w całej badanej grupie.

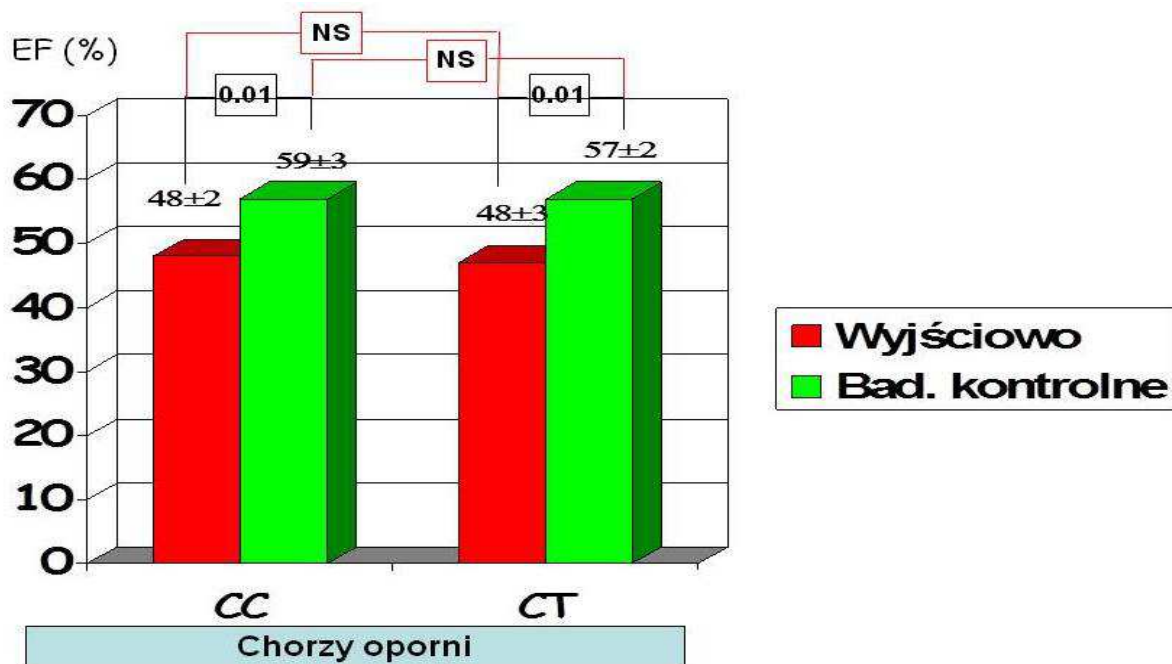
Średnie wartości frakcji wyrzucania LK uzyskane w grupie chorych wyjściowo wrażliwych oraz w badaniu kontrolnym w zależności od polimorfizmu genu GP Ia przedstawia rycina 22.



Ryc. 22. Średnie wartości frakcji wyrzucania LK (EF) w zależności od polimorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia w grupie chorych wyjściowo wrażliwych na leki przeciwplatekcyjne uzyskane w badaniu wstępnym i w badaniu kontrolnym po 3 latach.

Nie stwierdzono istotnych różnic zależnych od polimorfizmu genu GP Ia w wielkości frakcji wyrzucania LK uzyskanych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym u chorych wyjściowo wrażliwych na leki przeciwplatekcyjne.

Rycina 23 przedstawia średnie wartości frakcji wyrzucania LK uzyskane w grupie chorych wyjściowo opornych w badaniu wstępnym oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach w zależności od polimorfizmu genu GP Ia.



Ryc. 23. Średnie wartości frakcji wyrzucania LK (EF) w zależności od polimorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia uzyskane w grupie chorych wyjściowo opornych na leki przeciwplatekawe uzyskane w badaniu wstępnym i w badaniu kontrolnym po 3 latach.

Nie stwierdzono istotnych różnic zależnych od polimorfizmu genu GP Ia w wielkości frakcji wyrzucania LK uzyskanych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym u chorych wyjściowo opornych na leki przeciwplatekawe.

5.4. OBSERWACJA ODLEGŁA PO 6 LATACH - ANKIETA TELEFONICZNA

Obserwacji odległej w formie ankiety telefonicznej poddano wszystkie osoby włączone do badania.

W tabeli 31 przedstawiono dane o zdarzeniach sercowo-naczyniowych w całej badanej grupie chorych oraz w poszczególnych podgrupach.

Tab. 31. Występowanie zdarzeń sercowo-naczyniowych w trakcie 6-letniej obserwacji.

Oceniany parametr	Cała populacja N=50	Wrażliwi N=30	Oporni N=20	p 2 vs 1
Zdarzenia				
zgon	7	3	4	0,416
zawał	4	1	3	0,289
udar	1	0	1	0,400
ponowne PCI	11	4	7	0,090
CABG	2	1	1	1,000

Nie stwierdzono różnicy w wystąpieniu zgonu w grupie wrażliwych i opornych.

Stwierdzono istotnie częstsze wystąpienie złożonego punktu końcowego obejmującego incydenty niedokrwienne: zawał serca, udar mózgu, konieczność wykonania PCI i by-passów w grupie chorych opornych ($p=0,007$).

Podobnie złożony punkt końcowy obejmujący zgon, zawał serca, udar mózgu i konieczność rewaskularyzacji wystąpił częściej w grupie chorych opornych ($p=0,012$).

6. OMÓWIENIE

OCENA ZJAWISKA OPORNOŚCI NA LECZENIE PRZECIWPŁYTKOWE CHORYCH Z TROPONINODODATNIM OSTRYM ZESPOŁEM WIEŃCOWYM

Oporność na leczenie przeciwplatek stanowi duże wyzwanie dla farmakoterapii ostrych zespołów wieńcowych, leczonych za pomocą pierwotnej plastyki wieńcowej z zastosowaniem stentu wieńcowego [45]. Według różnych autorów zjawisko oporności na ASA występuje z różną częścią tj. od 10 – 60% w danej populacji [46].

W badaniach własnych największy odsetek oporności (40%) na leki przeciwplatekowe stwierdzono stosując analizator PFA-100 (w badaniu z użyciem epinefryny), a w agregometrii optycznej procent chorych opornych wahał się od 2 do 12%, w zależności od rodzaju zastosowanego induktora agregacji.

Badanie czynności płytek za pomocą aparatu PFA-100 jest najbardziej dostępną a zarazem stosunkowo prostą metodą oceny oporności na ASA [37, 47].

Wyniki testu z zastosowaniem analizatora PFA-100 zależą jednak od wielu zmiennych, na które ASA nie wywiera wpływu, w tym od hematokrytu, liczby płytek, interakcji między płytkami a erytrocytami oraz stężenia fibrynogenu i osoczowego czynnika von Willebranda (vWF). Wykazano, że stężenie vWF i jego interakcje z GP IIb oraz GP IIb/IIIa są głównymi determinantami czasu okluzji w PFA-100 [48].

Drugą metodą oznaczania oporności na leki przeciwplatekowe wykorzystaną w naszym badaniu (tylko w badaniu wyjściowym) była agregometria optyczna. Największy

odsetek oporności tj. 12% wykazano u chorych z agregacją płytek indukowaną kolagenem oraz ADP w stężeniu 3,5 μM .

Porównywano wyniki agregacji dla dwóch stężeń ADP – 3,5 μM i 5,0 μM . ADP w stężeniu 5,0 μM może maksymalnie pobudzić płytki, niezależnie od TXA_2 , natomiast ADP w stężeniu 3,5 μM jest stosunkowo słabym induktorem agregacji. Brak możliwości uwzględnienia interakcji pomiędzy płytkami a erytrocytami i leukocytami zachodzących podczas zjawisk agregacji w procesie krzepnięcia przy badaniu agregacji w osoczu bogatopłytkowym stanowi ograniczenie metody. Użyte stężenie ADP 5,0 μM wydaje się być za duże, dlatego tylko u 1 chorego wykazano oporność na leki przeciwplatekcyjne w agregacji indukowanej ADP w tym stężeniu.

W tradycyjnym aparacie do agregometrii wykorzystuje się obecność naprężeń ścinających, które są znacznie mniejsze od występujących w normalnych tętnicach [49].

Inną wadą tej metody jest słaba powtarzalność wyników. Do badania agregometrycznego wymagana jest ponadto stosunkowo duża ilość krwi, która przed pomiarem musi być odpowiednio przygotowana, a samo oznaczenie jest długotrwałe i wymaga technicznego doświadczenia [50].

Wśród badanych chorych wykazany duży odsetek oporności na leki przeciwplatekcyjne może być związany z samym zaistnieniem ostrego zespołu wieńcowego, który predysponuje do występowania oporności [52]. Według niektórych autorów, zmniejszoną wrażliwość na ASA wykazują również chorzy z: hipercholesterolemią, cukrzycą, nadwagą lub otyłością, przewlekłymi stanami zapalnymi, palący papierosy, kobiety oraz chorzy poddawani zabiegom CABG [52].

O klinicznej istotności zjawiska oporności na ASA świadczy fakt, iż chorzy niewrażliwi na leczenie kwasem acetylosalicylowym są narażeni na większe ryzyko śmiertelnych powikłań sercowo naczyniowych [53].

Zjawisko oporności na ASA związane jest z częstszym występowaniem zakrzepicy w naczyniach tętniczych. Już w latach 90-tych ubiegłego wieku Grotemeyer stwierdził 10-krotnie większą częstość poważnych incydentów wieńcowych oraz niedokrwiennych udarów mózgu chorych ze zmniejszoną wrażliwością na ASA [54].

Aspirynooporność ma szczególne znaczenie u chorych z ostrym zespołem wieńcowym leczonych za pomocą angioplastyki tętnic wieńcowych z implantacją stentu, szczególnie pokrywanego lekiem (DES). Stent jako ciało obce przylegające do ściany naczynia stanowi powierzchnię trombogenną, dlatego zahamowanie czynności płytek stanowi bezwzględnie konieczne zabezpieczenie przed wystąpieniem zakrzepicy [55]. Wniosek ten doprowadził do wprowadzenia do standardów leczenia drugiego leku przeciwplatekowego – kłopidogrelu, co poprawiło rokowanie chorych po implantacji stentu w ostrym zawale serca [45, 56].

Wkrótce jednak okazało się, że u niektórych chorych z ostrym zespołem wieńcowym zaobserwowano występowanie oporności na kłopidogrel lub na oba leki przeciwplatekowe [57]. Matetzky i wsp. stwierdzili znamienne częstsze występowanie ponownych incydentów sercowo-naczyniowych u chorych opornych na kłopidogrel [58].

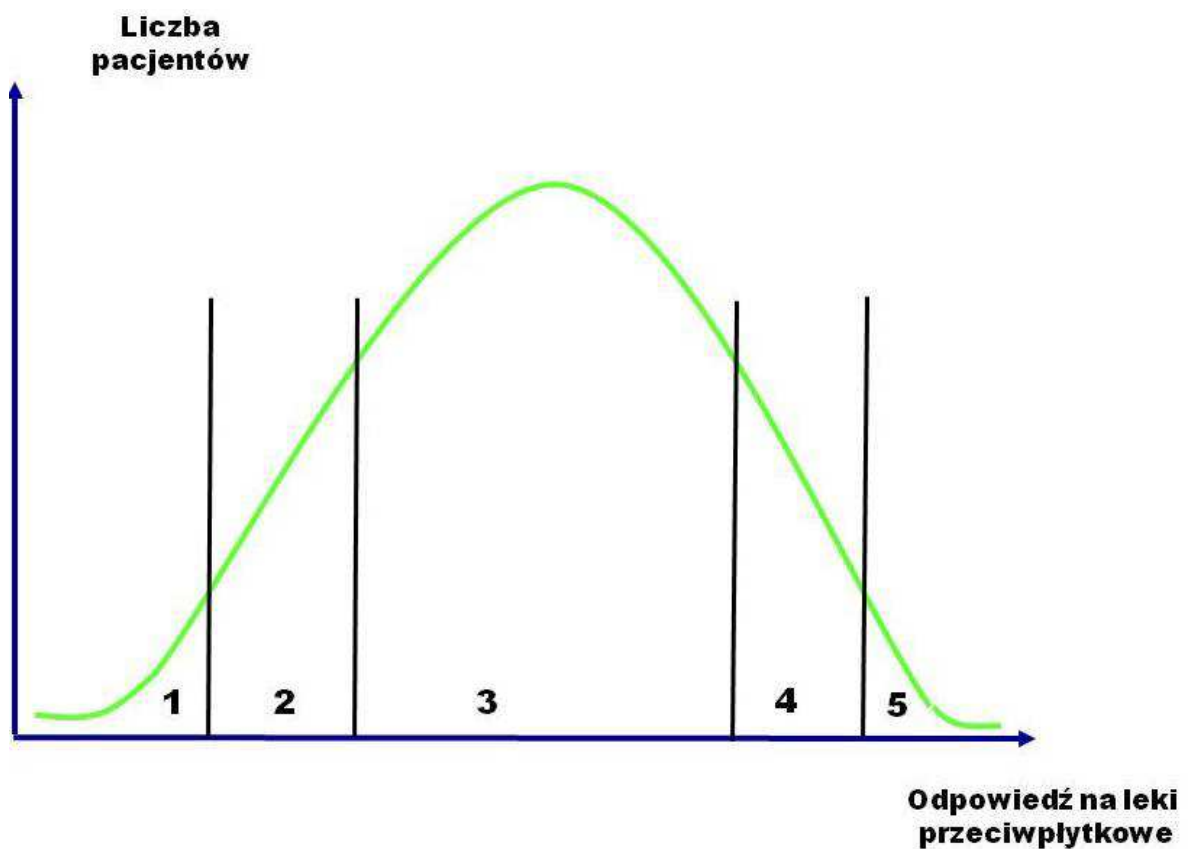
Aktualnie trwają badania nad możliwościami zmniejszenia skali zjawiska oporności na leczenie kłopidogrelem, jednak do tej pory nie ma zgodności co do tego, czy w ogóle można na nie wpłynąć. Jednym z badanych sposobów jest podawanie dużych nasycających dawek tego leku tj. 900 mg a nawet 2000 mg [59]. Alternatywą

wydaje się wprowadzenie nowych leków z grupy tienopirydyn np. prasugrelu (antagonisty płytkowego receptora P2Y₁₂) stosowanego z powodzeniem u chorych opornych na kłopidogrel [60]. Prasugrel zmniejszał liczbę nawrotów dławicy oraz częstość występowania zakrzepicy w stencie w porównaniu z kłopidogrelem, powodował jednak więcej powikłań krwotocznych, w tym zakończonych udarem krwotocznym lub zgonem [61].

Poszukiwanie najskuteczniejszego leczenia przeciwzakrzepowego u chorych z ACS leczonych inwazyjnie doprowadziło do wprowadzenia dodatkowego, trzeciego leku wpływającego na hemostazę, tj. heparyny, a w niektórych przypadkach nawet i czwartego leku - antagonisty receptora glikoproteiny IIb/IIIa [14]. Wyniki dodania do ASA i kłopidogrelu – jako alternatywy dla wcześniej omówionej terapii - cilostazolu oceniali Lee i wsp. [62] Wykazali oni znaczące zmniejszenie agregacji u chorych z ACS leczonych cilostazolem.

Wyniki naszych badań nad występowaniem oporności na leczenie przeciwplatekcyjne mogą być pomocne w wyselekcjonowaniu chorych szczególnie narażonych na wystąpienie ostrej, podostrej lub późnej zakrzepicy w stencie oraz nawrót objawowej choroby wieńcowej.

Odpowiedź na leczenie przeciwplatekcyjne ma charakter rozkładu normalnego. Wyróżniamy pacjentów niedostatecznie odpowiadających na leczenie (*pacjenci oporni – non-responders*), osoby odpowiadające prawidłowo oraz takie, u których standardowe dawki tych leków powodują groźne objawy niepożądane w postaci krwawień (*over-responders*) [63]. Hipotetyczny rozkład osobniczej wrażliwości na działanie leków przeciwplatekcyjnych przedstawiono na rycinie 24.



Ryc. 24. Osobnicza zmienność odpowiedzi na leczenie przeciwplatetkowe.

1. Osoby odporne na lek (non-responders)
2. Osoby słabo reagujące na lek (low-responders, under-responders)
3. Osoby o pożądanym zahamowaniu czynności płytek (normal-responders)
4. Osoby silnie odpowiadająca na leki przeciwplatetkowe (high-responders)
5. Osoby, u których reakcją na rekomendowane dawki leków jest krwawienie (over-responders)

W leczeniu ostrych zespołów wieńcowych (OZW) szczególną uwagę poświęca się osobom niedostatecznie reagującym na leki przeciwplatekcyjne, będące podstawą leczenia tych zespołów. Do tej pory nie ma ugruntowanych podstaw naukowych co do zmiany leczenia w przypadku stwierdzenia oporności na leki przeciwplatekcyjne. Wydaje się, że jeden ze sposobów poprawy skuteczności leczenia przeciwplatekcyjnego może stanowić indywidualizacja dawkowania tych preparatów. Niektóre doniesienia zwracają uwagę, że zwiększenie dawki ASA ze 100 mg/d do 200 mg/d zmniejsza odsetek laboratoryjnie definiowanej asporinooporności o ponad 50% [64-65].

Aktualnie brak zaleceń dotyczących oceny funkcji płytek przed włączeniem leczenia przeciwplatekcyjnego u chorych z OZW, pomimo, że grupą szczególnie narażoną na zdarzenia sercowo-naczyniowe są pacjenci ze stwierdzoną opornością zarówno na ASA, jak i na kłopidogrel (*dual drug resistance*). Według niektórych badaczy ponad połowa chorych opornych na ASA nie reaguje również na leczenie kłopidogrelem [66].

Nie określono precyzyjnie jednolitej definicji oporności na ASA [67]. Z klinicznego punktu widzenia określenie to stosuje się do opisu zjawiska występowania incydentów zakrzepicy naczyniowej (tętniczej) u osób regularnie przyjmujących aspirynę [45, 51-52]. Jest ona jednak zbyt ogólna: nie różnicuje bowiem chorych z rzeczywistą opornością i chorych z innymi czynnikami wpływającymi na działanie ASA. Konieczne jest opracowanie definicji fizjologicznej opisującej tylko przypadki prawdziwej oporności na ASA. Wymaga to opracowania takich testów diagnostycznych, których wyniki nie byłyby zależne od czynników modyfikujących [68].

To samo określenie – „oporność na kwas acetylosalicylowy” – stosowane jest także w celu określenia niezdolności ASA do:

- zahamowania agregacji płytek krwi w badaniach laboratoryjnych (obserwowany brak hamowania zlepiania płytek krwi w testach czynności płytek *ex vivo*) lub/i
- zahamowania syntezy TxA₂.

Jest to tzw. biochemiczna lub laboratoryjna oporność na kwas acetylosalicylowy.

Niekiedy stosowana jest także inna klasyfikacja (Weber i wsp.), w której w oparciu o zdolność płytek do syntezy tromboksanu A₂, wydzielono trzy typy oporności na ASA:

- farmakokinetyczną – gdy obserwujemy hamowanie syntezy TxA₂ w warunkach *in vitro*, ale nie w warunkach *in vivo*
- farmakodynamiczną, gdy występuje zahamowanie wytwarzania TxA₂, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*
- pseudooporność, gdy obserwowany brak hamowania aktywacji płytek przez ASA wydaje się niezależny od syntezy TxA₂.

Jak dotąd, tylko nieliczne prace wiążą występowanie laboratoryjnej oporności na ASA ze zwiększonym ryzykiem występowania incydentów kardiologicznych [47, 69-72].

W szeregu badań klinicznych stwierdzono, że obecność oporności na leki przeciwplatekcyjne w różnych grupach pacjentów związana była z większym ryzykiem (do 10 razy) wystąpienia niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych w przyszłości [73].

Oporność na ASA może wynikać z jego niezdolności do zahamowania aktywności COX-1 lub wzmożonej syntezy tromboksanu w szlaku alternatywnym, niezależnym od COX-1 [69].

Najbardziej precyzyjna definicja oporności na ASA oznacza brak jego wpływu na COX-1 [70].

Dotychczasowe badania doprowadziły do odkrycia różnych mechanizmów oporności na ASA, jednak większość z nich wymaga dokładniejszego poznania [74].

Tabela 32 przedstawia dotychczas zdefiniowane/określone przyczyny oporności na ASA .

Tab. 32. Potencjalne przyczyny aspirynooporności.

POTENCJALNE PRZYCZYNY ASPIRYNOOPORNOŚCI*
<p>Zmniejszenie biodostępności:</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ brak przestrzegania zaleceń lekarskich ⇒ nieodpowiednia dawka ⇒ zaburzenia wchłaniania lub zwiększony metabolizm
<p>Zaburzone wiązanie z COX-1:</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ jednoczesne przyjmowanie niektórych NLPZ (ibuprofen, indometacyna, naproksen)
<p>Alternatywne szlaki syntezy TXA₂:</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ COX-2 obecna w makrofagach/monocytach oraz komórkach śródbłonna
<p>Alternatywne szlaki aktywacji płytek krwi:</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ interakcja między erytrocytami, aktywacja płytek w odpowiedzi na kolagen, ADP, serotoninę, trombinę ⇒ zwiększona wrażliwość na kolagen i ADP ⇒ aktywacja płytek zależna od izoprostanoidów
<p>Zwiększony obrót płytek krwi</p>
<p>Aktywacja płytek zależna od katecholamin (stres, wysiłek fizyczny)</p>
<p>Polimorfizmy genetyczne:</p>

- ⇒ polimorfizmy COX-1, COX-2, TxA₂
- ⇒ polimorfizmy receptorów glikoproteinowych Ia/IIa, Ib/V/IX, IIb/IIIa, receptorów dla kolagenu i czynnika von Willebranda
- ⇒ polimorfizmy receptora GP IIb/IIIa (PIA₂)

Oslabienie działania ASA w trakcie długotrwałej terapii.

*[75]

Z wymienionych wyżej przyczyn aspirynooporności jako najczęściej występującą uznaje się brak przestrzegania zaleceń lekarskich w postaci zaprzestania przyjmowania leku. Do naszych badań włączono jedynie chorych z obniżonym stężeniem wewnątrzpłytkowego MDA.

Podobnie jak w przypadku oporności na ASA, dotychczas prowadzone badania spowodowały poszerzenie wiedzy na temat mechanizmów oporności na klopidogrel. Nadal jednak w wielu aspektach są one niejasne i wymagają dokładniejszego poznania.

W tabeli 33 przedstawiono możliwe mechanizmy oporności płytek na leczenie klopidogrelem.

Tab. 33. Przyczyny oporności na klopidogrel.

PRZYCZYNY OPORNOŚCI NA KLOPIDOGREL*
<p>Zmniejszenie biodostępności:</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ brak przestrzegania zaleceń lekarskich ⇒ nieodpowiednia dawka ⇒ zaburzenia wchłaniania lub zwiększony metabolizm

⇒ interakcje lekowe zmieniające aktywację klopidogrelu zależną od CYP3A4

Alternatywne szlaki aktywacji płytek krwi:

- ⇒ interakcja między erytrocytami, zwiększona reaktywność płytek w odpowiedzi na kolagen, ADP, serotoninę, trombinę
- ⇒ zwiększona wrażliwość na kolagen i ADP
- ⇒ zwiększona aktywacja receptorów GP IIb/IIIa

Zwiększony obrót płytek krwi

Aktywacja płytek zależna od katecholamin (stres, wysiłek fizyczny)

Polimorfizmy genetyczne:

- ⇒ polimorfizmy receptora P₂Y₁₂
- ⇒ polimorfizmy receptora GP IIb/IIIa (PIA₂)
- ⇒ polimorfizmy receptora dla kolagenu
- ⇒ zmienność genetyczna aktywności CYP₃A₄

Oslabione działanie klopidogrelu wynika z:

- ⇒ długotrwałej terapii
- ⇒ interakcji lekowych
- ⇒ współistniejących schorzeń (cukrzyca, zaburzenia gospodarki lipidowej, otyłość itp.)

*[75]

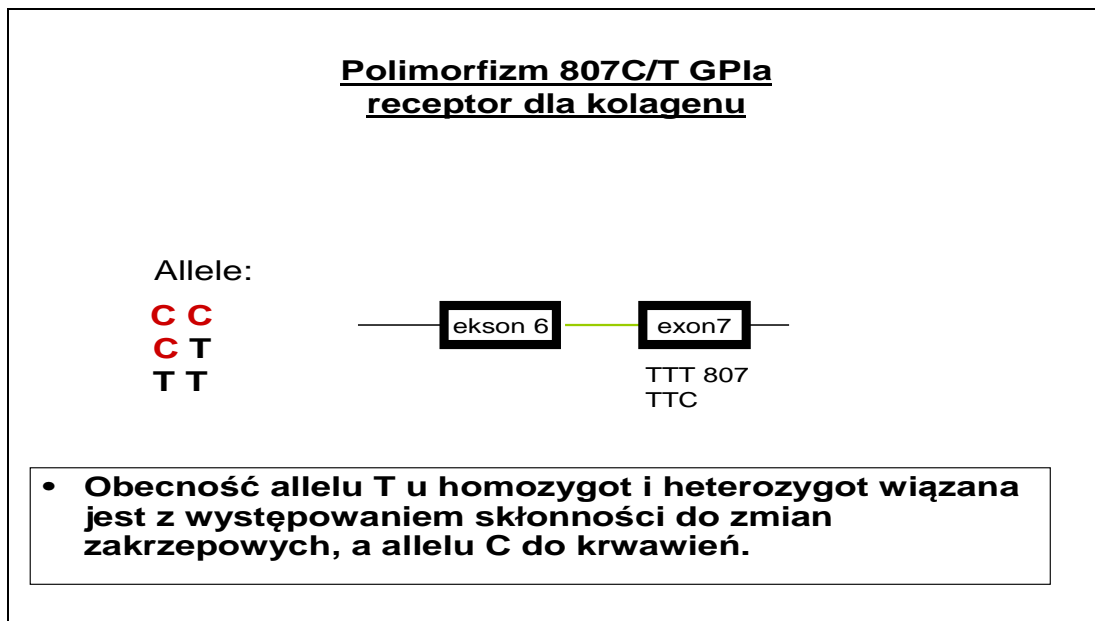
ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY OPORNOŚCIĄ NA LECZENIE PRZECIWPŁYTKOWE A POLIMORFIZMEM C807T GENU DLA GLIKOPROTEINY IA I STĘŻENIEM HOMOCYSTEINY W TEJ GRUPIE CHORYCH

Oporność na leczenie przeciwplatekcyjne a polimorfizm C807T genu GP Ia

Badania naukowe z ostatnich lat wskazują na to, że dwa allele genu dla glikoproteiny GP Ia opisane jako C 807 i T 807 są powiązane z małą lub dużą gęstością receptora (bez zmiany składu aminokwasów) na powierzchni płytek i w konsekwencji - z wolną lub szybką adhezją płytek do kolagenu typu I. Dlatego też polimorfizm ten może wskazywać na genetyczną predyspozycję do rozwoju zmian zakrzepowo-zatorowych. Dotychczasowe prace dotyczą zarówno wpływu tego polimorfizmu na naczynia wieńcowe, jak i na tętnice ośrodkowego układu nerwowego.

W literaturze opisywana jest zależność pomiędzy występowaniem allelu T, a większą częstością występowania zawałów serca czy udarów mózgu szczególnie u osób młodych (im niższy wiek, tym częstość występowania allelu T w powiązaniu z zawałem/udarem wzrasta) [42].

Rycina 25 przedstawia typy mutacji genu GP Ia.



Ryc. 25. Polimorfizm genu GP 1a. Opis w tekście.

W badanej populacji nie wykazano statystycznie znamiennej korelacji między opornością na leki przeciwplatekcyjne a polimorfizmem C807T GP 1a.

Od wielu lat prowadzone są badania dotyczące wyselekcjonowania populacji najbardziej narażonej na ponowne epizody sercowo-naczyniowe, a w szczególności po zawale serca leczonym angioplastyką z wszczepieniem stentu do naczynia wieńcowego [76]. Szczególną uwagę zwrócono na występowanie oporności na stosowane a priori leki przeciwplatekcyjne w tej grupie chorych.

Macchi i wsp. przeprowadzili badania dotyczące oporności na małe dawki ASA i oceniali ich związek między innymi z występowaniem polimorfizmu genu C807T GP 1a [77]. Stwierdzili oni brak korelacji pomiędzy opornością na ASA a tym polimorfizmem. Okazało się jednak, iż taka zależność istnieje w stosunku do polimorfizmu receptora

płytkowego PIA1 (GP IIIa). Do nieco odmiennych wniosków doszli Cambria-Kiely i Gandhi PJ [78]. Stwierdzili oni, że występowanie allelu T genu GP Ia **może** predysponować do występowania aspirynooporności. Jednak w naszych badaniach nie wykazano związku pomiędzy opornością na leki przeciwplatekcyjne a obecnością polimorficznego wariantu C807T genu dla GP Ia.

Oporność na leczenie przeciwplatekcyjne a stężenie homocysteiny

Od kilku lat hiperhomocysteinemię zaczęto postrzegać jako niezależny czynnik ryzyka wystąpienia niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych związanych z procesem miażdżycowym (zawał serca, udar mózgu) [39].

Stwierdzono, że przy niedoborach witamin B₆, B₁₂ i kwasu foliowego dochodzi do podwyższenia stężenia homocysteiny w surowicy krwi [79]. Wartości prawidłowe homocysteiny w pewnym stopniu zależą od metody stosowanej do jej oznaczenia oraz od populacji referencyjnej. Wartości uznawane za prawidłowe mieszczą się na ogół poniżej 16 µmol/L [80].

Występowanie homocysteiny we krwi w stężeniu powyżej tej wartości określa się mianem hiperhomocysteinemii. Stopień nasilenia tej nieprawidłowości przedstawiono w tabeli 34.

Tab. 34. Stopień nasilenia hiperhomocysteinemii

Homocysteina całkowita – prawidłowe stężenie	< 16 µmol/L
Hiperhomocysteinemia umiarkowana	16 - 29 µmol/L

Hiperhomocysteinemia pośrednia	30 - 100 $\mu\text{mol/L}$
Hiperhomocysteinemia ciężka	> 100 $\mu\text{mol/L}$

Stampfer i wsp. oznaczyli stężenie homocysteiny u ok. 1500 mężczyzn, u których nie stwierdzono objawów miażdżycy [81]. Po pięcioletniej obserwacji okazało się, że osoby ze stężeniem homocysteiny przekraczającym o 12% górną granicę normy trzykrotnie częściej zapadały na zawał mięśnia sercowego w porównaniu z grupą o prawidłowym stężeniu tego aminokwasu.

Na podstawie przeprowadzonej przez Boushey'a metaanalizy ponad 30 badań stwierdzono, że hiperhomocysteinemia jest niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego oraz, że przy wzroście stężenia homocysteiny w surowicy krwi o 5.0 $\mu\text{mol/L}$ zagrożenie to wzrasta niemal dwukrotnie (1,6 – 1,8 x) [82]. Przyczyny podwyższonego stężenia homocysteiny przedstawiono w tabeli 35 [83-85].

Tab.35. Przyczyny hiperhomocysteinemii.

1. Uwarunkowane genetycznie niedobory enzymów biorących udział w metabolizmie metioniny: ⇒ reduktazy metylenotetrahydrofolianowej ⇒ β syntazy cystationiny
2. Nabyte niedobory kwasu foliowego, witaminy B ₆ i witaminy B ₁₂
3. Hiperhomocysteinemia wtórna wywołana przez schorzenia współistniejące ⇒ niewydolność nerek

⇒ choroby nowotworowe
4. Hiperhomocysteinemia wywołana wprowadzeniem do ustroju niekorzystnie działających substancji
⇒ leków:
✓ metotreksatu, fenytoiny, teofiliny
⇒ używek:
✓ alkoholu
✓ kawy
✓ dymu papierosowego

Przyczyny niekorzystnego oddziaływania homocysteiny na układ krążenia są w dużej mierze niejasne. Proponowane przez różnych autorów mechanizmy można podzielić na dwie zasadnicze grupy: aterogenny i trombogenny [86-87].

Mechanizmy oddziaływania homocysteiny przedstawiono w tabeli 36.

Tab. 36. Zaburzenia występujące w hiperhomocysteinemii.

Mechanizm	
Aterogenny	<p>Wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych i nadtlenu wodoru powodujący uszkodzenie śródbłonna naczyniowego.</p> <p>Wzrost stężenia tiolaktonu homocysteiny prowadzący do powstania silnie aterogennego kompleksu LDL-tiolakton homocysteiny.</p> <p>Zmniejszenie dostępności NO dla komórek śródbłonna – hamowanie wazodylatacji</p>

Trombogenny	Wzrost aktywności czynników V i VII. Obniżenie stężenia białka C.
Inne	Wzmożona proliferacja komórek mięśni gładkich. Zwiększenie syntezy kolagenu w komórkach mięśni gładkich tętnic.

Choć z przedstawionych danych wynika, że niekorzystne działanie podwyższonego stężenia homocysteiny na układ krążenia jest wielostronne, jak dotąd trudno określić, który z wymienionych czynników i mechanizmów ma podstawowe lub decydujące znaczenie w patogenezie zjawisk prowadzących do zmian w układzie sercowo-naczyniowym.

Większe zagrożenie miażdżycą i jej powikłaniami związane jest prawdopodobnie z działaniem homocysteiny na śródbłonkowe mechanizmy ochronne (zmniejszenie dostępności tlenu azotu, wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych), nadmierne utlenianie cząsteczek LDL, które stają się bardziej aterogenne, czy prozakrzepowym wpływem na czynniki krzepnięcia (zwiększenie aktywności czynnika V, VII oraz obniżenie stężenia białka C) [83-85, 88].

Suplementacja kwasu foliowego, witaminy B6 i B12 w dużych populacjach przyczyniła się do obniżenia stężeń homocysteiny, jednak bez wpływu na częstość zachorowań na schorzenia układu sercowo-naczyniowego.

W badanej populacji nie wykazano statystycznie znamiennych korelacji między opornością na leki przeciwplatekcyjne a stężeniem homocysteiny w osoczu.

Na podstawie uzyskanych wyników własnych nie stwierdzono korelacji pomiędzy wysokością stężeń homocysteiny a agregacją indukowaną ADP i kolagenem, wobec

czego nie znaleziono podstaw do stwierdzenia, że u chorych z hiperhomocysteinemią częściej występuje oporność na leki przeciwplatekcyjne.

WPŁYW OPORNOŚCI NA LECZENIE PRZECIWPŁYTKOWE NA STOPIEŃ USZKODZENIA MIĘŚNIA SERCOWEGO OCENIANEGO ZA POMOCĄ BADANIA STĘŻENIA TROPONINY I ORAZ WARTOŚCI FRAKCJI WYRZUCANIA LEWEJ KOMORY

Wpływ oporności na leczenie przeciwplatekcyjne na stopień uszkodzenia mięśnia sercowego ocenianego za pomocą badania stężenia troponiny

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia, w których oceniano wpływ zjawiska oporności na leki przeciwplatekcyjne na stopień uszkodzenia mięśnia sercowego u chorych poddawanych zabiegom PCI planowym oraz wykonywanych u chorych z OZW. Valles i wsp. oceniali wpływ oporności na ASA u chorych ze STEMI na stopień uszkodzenia mięśnia sercowego, określany wielkością stężenia troponiny T oraz aktywnością CK-MB. Stwierdzili oni, że u chorych opornych stężenia troponiny T oraz aktywność CK-MB były znamienne statystycznie większe w porównaniu z grupą chorych wrażliwych na ASA [89].

Podobnie w badanej przez nas grupie stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenie troponiny I u chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne, w porównaniu z grupą chorych wrażliwych.

Podobne wyniki uzyskał Hobikoglu i wsp. [90]. Poddali oni retrospektywnej analizie 140 chorych z ostrym zespołem wieńcowym leczonych ASA. Stwierdzili oni wyższe wartości troponiny T u chorych opornych na ASA.

Ostry zespół wieńcowy nie jest jednolitą jednostką chorobową. Z jednej strony dochodzi do całkowitego zamknięcia ściany naczynia skrzepliną (zawał serca), z drugiej zaś może dochodzić do wykrzepiania na zmienionej zapalnie blaszce miażdżycowej prowadzącego do tzw. zatorowości obwodowej [91]. W obu sytuacjach klinicznych najważniejszą rolę w tworzeniu się zakrzepów odgrywają zaktywowane płytki krwi. Stopień nasilenia wykrzepiania wewnątrznaczyniowego wpływa na wielkość masy uszkodzonego mięśnia sercowego, co wiąże się z odpowiadającymi jej stężeniu uwolnionych troponin (I, T), będących markerami uszkodzenia kardiomiocytów [92-93]. W wielu doniesieniach oceniano wpływ wartości stężenia troponin u chorych z ostrym zespołem wieńcowym na rokowanie wczesne i odległe [94-95]. Stwierdzono, że im są wyższe stężenia troponin u chorego z OZW, tym bardziej się zwiększa ilość powikłań sercowo-naczyniowych (ponowny zawał, zgon z przyczyn sercowo-naczyniowych).

Nasilenie uszkodzenia kardiomiocytów zależy m.in. od stopnia aktywacji płytek krwi, dlatego ważną rolę w zapobieganiu temu zjawisku odgrywają leki przeciwplatekcyjne, szczególnie u chorych leczonych interwencyjnie [96-97].

Wpływ oporności na leczenie przeciwplatek na stopień uszkodzenia mięśnia sercowego ocenianego za pomocą wartości frakcji wyrzucania lewej komory

Fracja wyrzucania lewej komory stanowi prosty parametr oceniający globalną funkcję skurczową lewej komory i jest jednym z ważniejszych czynników prognostycznych u chorych po zawale serca, a także koreluje z wielkością stężenia troponin we wczesnym okresie ACS.

U ocenianych chorych frakcja wyrzucania LK nie różniła się istotnie pomiędzy badanymi grupami (chorzy oporni i nieoporni na leki przeciwplatekowe). Nie stwierdzono także istotnych różnic w wartości frakcji wyrzucania LK w całej badanej grupie w zależności od rodzaju polimorfizmu genu GP 1a.

W badanej grupie nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic w wielkości tego parametru we wczesnym okresie OZW w poszczególnych grupach chorych, niezależnie od stężenia troponiny.

Uzyskane wyniki mają prawdopodobnie związek z obecnością obszarów ogłuszonego miokardium (odwracalne zaburzenia kurczliwości wywołane zmianami metabolicznymi - nie martwiczymi - w kardiomiocytach), występujących w pierwszych godzinach - dniach po epizodzie wieńcowym [98].

Za pomocą klasycznego badania echokardiograficznego nie jest możliwe odróżnienie martwego od ogłuszonego miokardium we wczesnym okresie OZW. Dokładniejszą metodą oceną żywotności miokardium jest tkankowa echokardiografia kontrastowa oceniająca faktyczny przepływ krwi w krążeniu unaczyniającym odpowiedni fragment mięśnia sercowego [99].

ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY POLIMORFIZMEM GENU C807T DLA GLIKOPROTEINY IA A STOPNIEM USZKODZENIA MIOKARDIUM W POSZCZEGÓLNYCH GRUPACH CHORYCH

Obserwowano znamienne wyższe stężenia troponiny u chorych z obecnością allelu T w całej badanej grupie, natomiast najwyższe stężenia troponin wystąpiły u chorych z wariantem CT jednocześnie opornych na leki przeciwplatekcyjne.

Wśród obserwowanych chorych stwierdzono istotnie wyższe stężenia troponiny u pacjentów opornych na leczenie przeciwplatekcyjne. Najwyższe stężenie troponiny I obserwowano u chorych opornych z obecnością allelu T genu dla GP I.

Pomimo, że wykazano, iż występowanie polimorficznego wariantu C807T genu GP Ia nie stanowi ryzyka wystąpienia zawału serca [42, 100]. Antoniadou i wsp. wykazali, że większa nawrotowość istotnych zdarzeń sercowo naczyniowych wystąpiła u chorych z dimorfizmem C807T w skojarzeniu z podwyższoną aktywnością czynnika von Willibranda oraz wysokim mianem płytkowego antygenu sCD40L [101]. Natomiast Zhao i wsp. stwierdzili silną korelację T807 GP Ia z występowaniem objawowej dławicy piersiowej [102].

Uzyskane przez nas wyniki mogą wskazywać, że współistnienie oporności na leki przeciwplatekcyjne z obecnością allelu 807T predysponuje do większego uszkodzenia miokardium, ocenianego za pomocą stężenia troponiny I.

ZMIENNOŚĆ CZASOWA ZJAWISKA OPORNOŚCI NA LECZENIE PRZECIWPŁYTKOWE

Ważnym aspektem oporności na ASA jest dynamika jej ujawniania się. Pracę na ten temat opublikowali Pulcinelli i wsp., którzy analizowali aktywność płytek w 2-letniej obserwacji [103]. Badacze stwierdzili, że skuteczność ASA w 24 miesiącu terapii była istotnie mniejsza niż w 2 miesiącu leczenia, zarówno w testach agregacji indukowanej ADP, jak i kolagenem. Zjawisko to nie występowało w przypadku podawania tiklopidyny. Wyniki tych badań mogą mieć szczególne znaczenie w świetle doniesień na temat stentów pokrywanych lekiem (DES), których obecność w naczyniu może usposabiać do epizodów zakrzepicy nawet w rok po ich wszczępieniu.

W czasie trzyletniej obserwacji w badanej grupie stwierdzono zmiany odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne u 11 chorych ocenianej w PFA-100. W 7 (41%) przypadkach status zmienił się z oporny na wrażliwy, a w 4 (20%) z wrażliwy na oporny na leki przeciwplatekcyjne.

Obserwowano również tendencję do wydłużania się czasu zamknięcia apertury zarówno w grupie chorych wrażliwych oraz opornych, co może świadczyć o zwiększeniu wrażliwości płytek na działanie leków przeciwplatekcyjnych w czasie (ryc.25).

Na stopień reaktywności płytek krwi u pacjentów przyjmujących leki przeciwplatekcyjne wpływa wiele czynników, takich jak dodatkowo stosowanie leki czy profil metaboliczny danego chorego. W badaniu kontrolnym odsetek chorych z cukrzycą sięgał 37%. Zależnością pomiędzy wrażliwością płytek na działanie ASA a profilem wyrównania cukrzycy u chorych z cukrzycą typu 2 zajmował się Watała i wsp. [104].

Stwierdzili oni większą oporność na ASA u chorych na cukrzycę z niekorzystnym profilem metabolicznym tj. z podwyższonym stężeniem HbA1c i cholesterolu całkowitego oraz z obniżonym stężeniem frakcji HDL-cholesterolu. Autorzy tłumaczą wysoki – bo aż 79% - odsetek chorych opornych na ASA (ocena przy użyciu aparatu PFA-100) wzmożoną glikozylacją glikoprotein płytkowych w tej grupie chorych [105]. Większe zahamowanie aktywności płytek u chorych z cukrzycą po dodaniu do ASA kłopidogrelu obserwował Serebruany I wsp. [106]. Alternatywą dla tych chorych jest wszczepienie stentu uwalniającego lek i wielomiesięczne leczenie dwoma lekami przeciwplatekowymi. Szczególnie obiecujące wyniki w tej grupie chorych uzyskał Ahn i wsp. [107]. Stwierdzili oni, że skojarzone leczenie ASA i cilostazolem lepiej zabezpiecza chorych z cukrzycą przed restenozą w stentach typu DES niż ASA z kłopidogrelem. Z kolei Lee i wsp. porównywali terapię dwulekową (ASA+kłopidogrel) z terapią trójlekową (ASA+kłopidogrel+cilostazol). Wykazali oni znamienne spadki istotnych zdarzeń sercowo-naczyniowych w okresie 6 miesięcznej obserwacji u chorych z długimi zmianami miażdżycowymi poddanych rewaskularyzacji z użyciem stentów DES w grupie, w której stosowano terapię trójlekową [108].

Na podstawie wyników naszego badania – w związku ze zmianą statusu „oporny→wrażliwy” (7 osób) oraz „wrażliwy→oporny” (4 osoby) – możemy stwierdzić, że u znacznego odsetka chorych w badanej grupie oporność na leki przeciwplatekowe oceniana po 3 latach uległa zmianie. Najbardziej prawdopodobnymi przyczynami zmian statusu (w obie strony) mogły być zwiększenie odsetka chorych na cukrzycę, ograniczenie palenia tytoniu oraz poprawa profilu lipidowego.

PORÓWNANIE WYNIKÓW WYBRANYCH DANYCH KLINICZNYCH ORAZ BADAŃ LABORATORYJNYCH UZYSKANYCH W BADANIU KONTROLNYM W GRUPIE CHORYCH WRAŻLIWYCH I OPORNYCH

W trzyletniej obserwacji stwierdzono (niezależnie od wyjściowej odpowiedzi na leki przeciwplatekcyjne) wzrost częstości występowania cukrzycy, spadek liczby chorych palących oraz korzystne zmiany profilu lipidowego (spadek stężenia cholesterolu całkowitego, frakcji LDL-cholesterolu, trójglicerydów oraz wzrost stężenia frakcji HDL-cholesterolu) w całej badanej populacji.

Nie stwierdzono różnic w wielkości frakcji wyrzucania lewej komory w poszczególnych podgrupach chorych oraz pomiędzy nimi w 3 lata po zawale serca. Należy jednak podkreślić, że po 3 latach obserwowano znamienne poprawę frakcji wyrzucania lewej komory tak dla całej badanej populacji, jak i w obrębie podgrup w stosunku do wyjściowej oceny EF. Obserwowana zmiana prawdopodobnie była efektem czasowej różnicy pomiędzy przeprowadzonym stosunkowo wcześnie po zawale serca badaniem echokardiograficznym – kiedy odcinkowe zaburzenia kurczliwości ścian lewej komory wynikają nie tylko z samej martwicy, ale z jeszcze obecnego zjawiska ogłuszenia mięśnia sercowego (i powiększenia obszaru o zaburzonej kurczliwości) – a oceną w długim okresie po rewaskularyzacji i przebyłym procesie gojenia. Nie można także wykluczyć współdziałania takich czynników jak wpływ stosowanych przewlekle leków oraz wdrożonych zachowań prozdrowotnych.

INCYDENTY SERCOWO-NACZYNIOWE W TRAKCIE OBSERWACJI ODLEGŁEJ W SKOJARZENIU Z OCENIANĄ OPORNOŚCIĄ NA LEKI PRZECIWPŁYTKOWE

W naszym badaniu oceniliśmy wystąpienie zdarzeń sercowo-naczyniowych po 3 i 6 latach. Po 3 latach wystąpiły: 1 udar (zakończony zgonem), 2 zawały serca (w tym 1 zakończony zgonem), oraz dwukrotnie konieczność pilnej rewaskularyzacji. Wymienione zdarzenia wystąpiły jedynie w grupie chorych opornych. Ponowny zawał mięśnia sercowego wystąpił u 2 chorych z grupy opornych na leki przeciwplatekcyjne niezależnie od rodzaju polimorfizmu genu C807T GP 1a.

Po 6 latach stwierdziłyśmy wystąpienie 7 zgonów, 4 zawałów serca, 1 udaru mózgu i 11 PCI oraz 2 operacji by-passów. Co prawda, nie stwierdziłyśmy związku zgonu z opornością, ale złożony punkt końcowy obejmujący zgon, zawały serca, udary mózgu, ponowne PCI oraz CABG wystąpił istotnie częściej w grupie chorych opornych na leki przeciwplatekcyjne. Podobnie złożony punkt końcowy obejmujący jedynie incydenty niedokrwienne: zawał serca, udar i konieczność powtórnej rewaskularyzacji, występował istotnie częściej w grupie chorych opornych.

Nasze obserwacje są zgodne z badaniem Pamukcu i wsp., który w swojej pracy wykazał, że u pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym i stwierdzoną opornością na ASA statystycznie znacząco rośnie ryzyko wystąpienia MACE w porównaniu do chorych aspiryno-wrażliwych oraz z metaanalizą Krasopoulou i wsp., w której u 28% badanych stwierdzono laboratoryjne cechy oporności płytek krwi na ASA z jednoczesnym wystąpieniem incydentów sercowo-naczyniowych u 41% osób z tej grupy (u 39% - ostry

zespół wieńcowy, u 5,7% - zgon). [109, 110]. Podobne obserwacje poczynili Chen, Dorsch i wsp. [111, 112].

W obserwacjach dotyczących chorych otrzymujących podwójną terapię przeciwplatekowaną Siller-Matula i wsp. stwierdzili, że brak odpowiedzi na leczenie z użyciem ASA i kłopidogrelu jest silniejszym czynnikiem prognostycznym niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych aniżeli oporność na tylko jeden z wymienionych leków [113]. Marcucci i wsp. pokazali, że u chorych po zawale serca, poddanych angioplastyce tętnic wieńcowych z implantacją stentu (zarówno BMS, jak i DES) i otrzymujących podwójną terapię przeciwplatekowaną, wysoka – pomimo stosowanego leczenia – aktywność płytek krwi (jako agonistę użyto ADP) była niezależnym czynnikiem prognostycznym zgonów sercowo-naczyniowych i zawałów serca [114]. Ta sama badaczka wykazała, że utrzymująca się wysoka reaktywność płytek (pomimo stosowanego leczenia przeciwplatekowego), indukowana przez więcej niż jednego z agonistów (ADP, AA, kolagen) jest niezależnym czynnikiem ryzyka zgonów i zawałów serca w porównaniu z nadreaktywnością płytek indukowaną tylko przez jednego agonistę [115]. W kolejnej pracy opisano, że u chorych z szybkim metabolizmem kłopidogrelu (po przebytych ostrym zespole wieńcowym, pozostających na podwójnym leczeniu przeciwplatekowym) i wysoką aktywnością płytek indukowaną ADP wzrasta ryzyko ponownego wystąpienia incydentów niedokrwienych [116]. Podobną obserwację poczynił Jiu i wsp. w odniesieniu do pacjentów po przebytych STEMI, leczonych angioplastyką tętnic wieńcowych z użyciem stentów pokrywanych lekiem i stosujących kłopidogrel [117]. Wymienione badania potwierdzają nasze obserwacje.

Stwierdziliśmy także, że większe nasilenie objawów dławicowych określanych w skali Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego (CCS) oraz objawów niewydolności serca definiowanych w skali Nowojorskiego Towarzystwa Serca (NYHA) występowało u chorych heterozygot (CT), zarówno w grupie chorych wrażliwych, jak i opornych na leczenie przeciwplatek. Jednak najbardziej nasilone objawy dławicowe oraz niewydolności serca wystąpiły w grupie chorych opornych z tym typem polimorfizmu (CT). Obserwacja ta jest zgodna z pracą Su i wsp., w której wykazano, że częstość występowania allelu T w grupie chorych z wysokim ryzykiem miażdżycy opornych na ASA, jak i tzw. semi-responderów była wyższa niż w grupie chorych wrażliwych na aspirynę ($p < 0.05$)[118].

IMPLIKACJE PRAKTYCZNE PRACY

Uzyskane wyniki potwierdzają fakt występowania oporności na leczenie przeciwplatek u chorych na zawał serca. W badanej grupie oporność stwierdzono maksymalnie u 2 - 40% badanych (w zależności od zastosowanej metody). Dane te mogą sugerować konieczność stosowania kilku leków przeciwplatekowych o różnym mechanizmie blokowania płytek oraz leków przeciwzakrzepowych o odmiennym sposobie działania (heparyny), szczególnie u chorych poddanych zabiegowi wszczepienia stentu wieńcowego (jatrogenne działanie prozakrzepowe). Uzyskane wyniki dowodzą konieczności przeprowadzania badań oraz indywidualizacji leczenia w zależności od ich wyników.

Stopień uszkodzenia miokardium w ostrej fazie zawału jest szczególnie duży u chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne i z obecnością allelu T genu GP 1a.

Naszym zdaniem chorzy ci wymagają szczególnego podejścia terapeutycznego, gdyż częściej narażeni są na powtarzalne incydenty wieńcowe [119-120].

Problem ten nabiera szczególnego znaczenia w świetle najnowszych doniesień na temat stentów pokrywanych (DES) rapamycyną (sirolimusem), bądź paklitakselem i opisywanego zjawiska późnej zakrzepicy w tego typu stentach.

Osobną kwestią pozostaje ustalenie schematu postępowania u chorych z niepełną odpowiedzią na leczenie przeciwplatekcyjne, a także u chorych ze zmienną w czasie odpowiedzią na leczenie przeciwplatekcyjne. Wydaje się, że najbardziej praktycznym sposobem na kontrolowanie tych zjawisk jest zwiększenie częstości badań w kierunku występowania oporności u pacjentów, którzy mogą stanowić najbardziej zagrożoną grupę, a więc u chorych z cechami zespołu metabolicznego i/lub cukrzycą, z nawracającymi incydentami sercowo-naczyniowymi (głównie o typie zakrzepicy tętniczej), po wielokrotnych interwencjach na naczyniach wieńcowych. Zwiększenie kontroli laboratoryjnej może ułatwić – zwłaszcza u szczególnie obciążonych chorych – podjęcie decyzji o podwyższeniu dawek leków przeciwplatekcyjnych, zmianie leku przeciwplatekcyjnego, bądź bardziej agresywnym leczeniu schorzeń dodatkowych.

Eksperti zajmujący się leczeniem ostrych zespołów wieńcowych sugerują znaczne zwiększenie dawek klopidoogrelu w pierwszej fazie leczenia: z zalecanych przed kilkoma laty 300 mg dawkę nasycającą zwiększono do 600mg, co znalazło odzwierciedlenie w aktualnych standardach; jednakże rozważa się podawanie 900 lub nawet 1200 mg klopidoogrelu w ostrej fazie zawału serca.

W chwili obecnej dysponujemy kilkoma nowymi cząsteczkami leków (prasugrel, tikagrelor, elinogrel, kangrelor) o działaniu przeciwplatekcyjnym, z których dwie [prasugrel (Effient) i tikagrelor (Brillique)] zostały zarejestrowane i dopuszczone do obrotu. Zalecenie stosowania tikagreloru i prasugrelu znalazło się w najnowszych wytycznych ESC leczenia zawału serca NSTEMI (2011) i STEMI (2012).

Wyniki dostępnych badań podkreślają brak występowania zjawiska oporności na leczenie tikagrelorem, z kolei prasugrel zmniejszył ryzyko ostrej zakrzepicy w stencie u chorych ze STEMI i współistniejącą cukrzycą nawet o 50%.

Obserwowany szybki postęp farmakologii w dziedzinie leków przeciwplatekcyjnych pozwala żywić przekonanie, że dzięki wprowadzaniu nowych substancji zwiększy się skuteczność leczenia ostrych zespołów wieńcowych, a problem oporności na leki przeciwplatekowe przejdzie do historii medycyny.

7. WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

- 1. U 2 - 40% chorych z ostrym zespołem wieńcowym leczonych inwazyjnie (w zależności od rodzaju stosowanej metody) stwierdzono występowanie laboratoryjnej oporności na leczenie przeciwplatekcyjne.**
- 2. U chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne częściej występują zdarzenia sercowo-naczyniowe w obserwacji odległej.**
- 3. Nie wykazano statystycznie znamiennej korelacji między opornością na leki przeciwplatekcyjne a polimorfizmem C807T GP IIa**
- 4. U chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne w porównaniu z grupą chorych wrażliwych frakcja wyrzucania LK nie różniła się istotnie pomiędzy badanymi grupami.**
- 5. Najwyższe stężenie troponiny I obserwowano u chorych opornych z obecnością allelu T genu dla GP IIa.**
- 6. W czasie trzyletniej obserwacji badanej grupy u 31% chorych obserwowano zmianę statusu odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne (oporny – wrażliwy, wrażliwy – oporny) oznaczanej w PFA-100.**
- 7. W obserwacji sześciolietniej stwierdzono istotnie częstsze wystąpienie złożonego punktu końcowego obejmującego incydenty niedokrwienne: zawał serca, udar mózgu, konieczność wykonania PCI i by-passów w grupie chorych opornych.**

8. STRESZCZENIE

OCENA OPORNOŚCI NA SKOJARZONE LECZENIE PRZECIWPŁYTKOWE U CHORYCH TROPONINODODATNIM OSTRYM ZESPOŁEM WIEŃCOWYM LECZONYCH INWAZYJNIE

WPROWADZENIE: Problem oporności na leczenie przeciwplatek utrudnia wyznaczenie jednolitych standardów i norm referencyjnych leczenia chorych z ostrym zespołem wieńcowym. Rozważa się możliwość indywidualizacji leczenia na podstawie wyników badań laboratoryjnych oceniających stopień zahamowania reaktywności płytek krwi pod wpływem leków blokujących czynność płytek.

CELE: Przyjęto następujące cele badawcze:

1. Określenie u chorych z troponinododatnim ostrym zespołem wieńcowym leczonych inwazyjnie częstości występowania oporności na leki przeciwplatekowe po 30 dniach leczenia farmakologicznego.
2. Ustalenie, czy występuje zależność pomiędzy opornością na leczenie przeciwplatekowe a polimorfizmem C807T genu dla glikoproteiny Ia oraz stężeniem homocysteiny w tej grupie chorych.
3. Ocena wpływu w/w oporności na stopień uszkodzenia mięśnia sercowego ocenianego za pomocą oznaczenia stężenia troponiny I oraz na wartość frakcji wyrzucania lewej komory.

4. Określenie zależności pomiędzy polimorfizmem C807T genu dla glikoproteiny Ia a stopniem uszkodzenia miokardium w poszczególnych grupach chorych.
5. Określenie zmienności czasowej zjawiska oporności na leczenie przeciwplatek i określenie stopnia zmienności zjawiska oporności na leczenie przeciwplatek w zależności od polimorfizmu C807T GPI.
6. Określenie częstości występowania zdarzeń sercowo-naczyniowych (zgon, zawał serca, udar mózgu, konieczność rewaskularyzacji) w trakcie sześciolletniej obserwacji badanej grupy pacjentów w skojarzeniu z ocenianą opornością na leki przeciwplatek.

BADANA GRUPA: Do badań włączono 50 chorych w wieku 18-80 lat, ze świeżym zawałem mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST, zakwalifikowanych do przezskórnej angioplastyki tętnic wieńcowych - PCI.

METODYKA: U każdego chorego wykonano następujące badania oceniające czynność płytek krwi:

1. Badanie stężenia wewnątrzplatekowego MDA w celu weryfikacji pobierania ASA
2. Ocena czynności płytek przy użyciu systemu PFA – 100 wyjściowo oraz 3 lata po włączeniu do badania
3. Ocena oporności na leczenie przeciwplatek przy użyciu agregometru optycznego – wyjściowo

4. Badania PCR w celu określenia polimorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia - wyjściowo
5. Oznaczenie stężenia homocysteiny - wyjściowo

Następnie określono zależność pomiędzy występowaniem oporności na leczenie przeciwplatekcyjne a stopniem uszkodzenia mięśnia sercowego (frakcja wyrzucania LK, stężenie troponiny I) oraz oceniono korelacje pomiędzy opornością na leczenie przeciwplatekcyjne a obecnością allelu T genu glikoproteiny GP Ia i stężeniem homocysteiny

WYNIKI: W badanej populacji stwierdzono, że 2 - 40% chorych (w zależności od zastosowanej metody) jest opornych na leczenie lekami przeciwplatekowymi (ASA, kłopidogrel lub oba leki).

W badanej grupie nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem homocysteiny a występowaniem oporności na leczenie lekami przeciwplatekowymi. Średnie wartości stężeń homocysteiny nie różniły się w poszczególnych podgrupach (wrażliwi vs oporni).

W badanej grupie nie uzyskano istnienia korelacji między polimorfizmem C807T genu GP Ia a występowaniem oporności na leki przeciwplatekcyjne.

W całej badanej grupie 28 (56%) okazało się nosicielami genotypu heterozygotycznego CT, a 22 chorych (44%) genotypu CC genu glikoproteiny Ia. W grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym, wrażliwych na leczenie przeciwplatekcyjne stwierdzono równe występowanie polimorfizmu CC i CT. W grupie chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne polimorfizm CT występował u 60% badanych.

Wyższe stężenie troponiny I stwierdzono u chorych opornych na leczenie przeciwplatek w porównaniu z grupą chorych wrażliwych ($17,6 \pm 19,6$ vs $14,4 \pm 15,8$ – $p < 0.01$).

Stwierdzono znamienne wyższe stężenia troponiny I u chorych z polimorfizmem C807T w postaci heterozygotycznej (CT) w całej badanej grupie oraz w grupie chorych opornych na leczenie przeciwplatek ($21,1 \pm 15,1$ vs $8,2 \pm 7,2$ – $p < 0.001$).

W grupie chorych opornych, u osób z polimorfizmem C807T w postaci homozygotycznej (CC) stwierdzono istotnie statystycznie mniejsze stężenie homocysteiny w porównaniu z badanymi heterozygotami CT ($16 \pm 4,2$ vs $11,6 \pm 2,8$ – $p < 0.05$).

Frakcja wyrzucania LK nie różniła się istotnie pomiędzy badanymi grupami (47 ± 2 vs 47 ± 3 – NS).

Nie stwierdzono istotnych różnic w wartości frakcji wyrzucania LK w całej badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach w zależności od rodzaju polimorfizmu genu GP Ia (48 ± 3 vs 48 ± 2 - NS; 47 ± 2 vs 48 ± 2 – NS) .

W czasie trzyletniej obserwacji w badanej grupie uzyskano zmianę odpowiedzi na leczenie przeciwplatek ocenianej w badaniu PFA-100 u 13 chorych. W 9 przypadkach status zmienił się z oporny na wrażliwy, a w 4 – z wrażliwy na oporny na leki przeciwplatek. Zmiany statusu wynikały prawdopodobnie ze wzrostu zachorowań na cukrzycę, ale i z poprawy profilu lipidowego oraz zaprzestania palenia przez niektórych chorych.

Poważne incydenty sercowo-naczyniowe (zgon, zawał serca, udar mózgu, ponowna rewaskularyzacja) w trzyletniej obserwacji wystąpiły łącznie u 5 chorych z grupy opornych niezależnie od rodzaju polimorfizmu C807T genu GP Ia.

W czasie sześciolletniej obserwacji wystąpiło: 7 zgonów, 4 zawały serca, 1 udar mózgu, 11 ponownych PCI oraz 2 CABG; stwierdzono istotną statystycznie zależność między złożonym punktem końcowym obejmującym zawały serca, udary, PCI i CABG a opornością na leki przeciwplatekcyjne ($p=0,007$).

Większe nasilenie objawów dławicowych określanych w skali Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego (CCS) oraz objawów niewydolności serca definiowanych w skali Nowojorskiego Towarzystwa Serca (NYHA) stwierdzono u chorych o polimorfizmie CT genu GP Ia typu C807T, zarówno w grupie chorych wrażliwych, jak i opornych na leczenie przeciwplatekcyjne, jednak najbardziej nasilone objawy dławicowe oraz niewydolności serca wystąpiły w grupie chorych opornych z tym typem polimorfizmu (CT).

WNIOSKI:

- 1. U 2 - 40% chorych z ostrym zespołem wieńcowym leczonych inwazyjnie (w zależności od rodzaju stosowanej metody) stwierdzono występowanie laboratoryjnej oporności na leczenie przeciwplatekcyjne.**
- 2. U chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne częściej występują zdarzenia sercowo-naczyniowe w obserwacji odległej**

3. Nie wykazano statystycznie znamiennej korelacji między opornością na leki przeciwplatekcyjne a polimorfizmem C807T GP Ia
4. U chorych opornych na leczenie przeciwplatekcyjne w porównaniu z grupą chorych wrażliwych frakcja wyrzucania LK nie różniła się istotnie pomiędzy badanymi grupami.
5. Najwyższe stężenie troponiny I obserwowano u chorych opornych z obecnością allelu T genu dla GP Ia.
6. W czasie trzyletniej obserwacji badanej grupy u 31% chorych obserwowano zmianę statusu odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne (oporny – wrażliwy, wrażliwy – oporny) oznaczanej w PFA-100.
7. W obserwacji sześciolletniej stwierdzono istotnie częstsze wystąpienie złożonego punktu końcowego obejmującego incydenty niedokrwienne: zawał serca, udar mózgu, konieczność wykonania PCI i by-passów w grupie chorych opornych.

9. SUMMARY

Evaluation of antiplatelet combined drug therapy resistance among patients with early invasive interventional treatment strategy in troponin positive acute coronary syndromes

Introduction:

The problem of antiplatelet therapy resistance among patients with acute coronary syndrome makes it difficult to determine uniform standards of treatment. Individualized therapy based on the laboratory tests assessing the efficiency of drug - induced platelet inhibition is a chance to increase treatment effectiveness.

Objectives:

The aims of this study were:

1 to determine the frequency of antiplatelet therapy resistance among patients with early invasive interventional treatment strategy in troponin positive acute coronary syndromes after 30 days

2 to determine whether there is a correlation between antiplatelet therapy resistance and the C807T polymorphism of the glycoprotein Ia gene and homocysteine levels

3 to assess the impact of the antiplatelet therapy resistance on myocardial damage evaluated by troponin I concentration and left ventricular ejection fraction result.

4 to determine the relationship between the C807T polymorphism of the glycoprotein Ia and the degree of myocardial injury in each group of patients.

5 to determine the temporal variation of antiplatelet therapy resistance and to determine the degree of variation antiplatelet therapy resistance depending on the GPI polymorphism C807T.

6 to determine the prevalence of cardiovascular events (death, myocardial infarction, stroke, revascularization necessity) during the six-year follow up of investigational group evaluated in combination with antiplatelet drug resistance.

The study group:

The study included 50 patients aged 18-80 years with acute myocardial infarction with ST-segment elevation qualified for percutaneous coronary intervention - PCI.

Methods:

In each patient, the following studies assessing platelet function were performed:

1 Serum Intraplatelet MDA concentration to verify the ASA treatment

2 The platelet function assessment using PFA system - 100 at the beginning of the study and three years after patient enrollment

3 Antiplatelet therapy resistance was analyzed using optical aggregometer – initially

4 PCR to determine the C807T polymorphism of glycoprotein Ia – initially

5 Serum levels of homocysteine - initially

The relationship between the antiplatelet therapy resistance occurrence and the degree of myocardial damage (LV ejection fraction, troponin I) was analyzed as well as the correlation between antiplatelet therapy resistance and the presence of the gene glycoprotein GP Ia T allele and homocysteine concentration.

Results:

2 - 40% patient of study population (depending on the method) is resistant to the antiplatelet treatment (aspirin, clopidogrel, or both agents).

There was no correlation between homocysteine levels and the prevalence of resistance to antiplatelet therapy. Average concentrations of homocysteine did not differ between subgroups (sensitive vs. resistant).

There is no correlation between the C807T polymorphism of GP Ia gene and the occurrence of antiplatelet drugs resistance

28 (56% of the whole group) patients were found to be heterozygous genotype CT, and 22 patients (44%) CC genotype of glycoprotein Ia gene. Among patients with acute coronary syndrome, sensitive to antiplatelet therapy the occurrence of polymorphism CC and CT were equal. 60% of patients resistant to antiplatelet therapy had CT polymorphism

The higher concentration of troponin I was observed in patients resistant to antiplatelet therapy compared with sensitive patients ($17,6 \pm 19,6$ vs $14,4 \pm 15,8$ – $p < 0.01$).

Statistically significant higher levels of troponin I were present in patients with the C807T polymorphism in heterozygous (CT) patient in the whole group and in the group of patients resistant to antiplatelet therapy ($21,1 \pm 15,1$ vs $8,2 \pm 7,2$ – $p < 0.001$).

Significantly lower levels of homocysteine were observed in patients resistant to antiplatelet drugs patients with C807T polymorphism in a homozygous (CC) compared with those heterozygous CT

($16 \pm 4,2$ vs $11,6 \pm 2,8$ – $p < 0.05$).

LV ejection fraction did not differ significantly between the two groups (47 ± 2 vs 47 ± 3 – NS).

There were no significant differences in LV ejection fraction in the whole group and in individual subgroups, depending on the type of GP Ia gene polymorphism (48 ± 3 vs 48 ± 2 – NS; 47 ± 2 vs 48 ± 2 – NS)

During the three-year follow-up in the 13 patients from study group a change response to antiplatelet therapy evaluated in the PFA-100 test was observed. In nine cases, the status has changed from resistant to sensitive and in 4 cases from sensitive to resistant to antiplatelet drugs. Status changes were probably due to the rising incidence of diabetes, but also the lipid profile improvement and smoking cessation

Serious cardiovascular events (death, myocardial infarction, stroke, repeat revascularization) in the three-year observation occurred in five cases in drug resistant group regardless of the C807T polymorphism of GP Ia.

During the six-year follow 7 deaths, 4 heart attacks, 1 stroke, 11 PCI, 2 CABG occurred. A statistically significant correlation was found between the composite endpoint including heart attacks, strokes, and the PCI and CABG resistance inhibitors ($p = 0.007$).

Greater severity of anginal symptoms determined with a Canadian Cardiovascular Society scale (CCS) and symptoms of heart failure defined with a scale of New York Heart Association (NYHA) were found in patients with CT polymorphism of GP Ia gene C807T type, both in patients sensitive and resistant to antiplatelet therapy. However, the most severe symptoms of angina and heart failure occurred in patients resistant to the antiplatelet treatment with this type polymorphism (CT).

Conclusions:

1 2 - 40% (depending on the type of method used) of patients with acute coronary syndrome with early invasive interventional treatment has been identified as laboratory resistant to antiplatelet therapy.

2 There are more frequent cardiovascular events among patients resistant to antiplatelet therapy in the follow-up

3 There was no statistically significant correlation between antiplatelet drugs resistance and GP Ia C807T polymorphism

4 There is no significant difference in LV ejection fraction among patients resistant to antiplatelet therapy compared with patients sensitive to this agents

5 The highest concentrations of troponin I were observed in resistant patients with the T allele of the gene for GP Ia presence

6 During the three-year study group follow-up, 31% of patients had a change in the antiplatelet therapy response status (resistant - sensitive, sensitive – resistant) measured in the PFA-100.

7 During six – year follow-up resistant group of patients had a significantly more frequent occurrence of the combined endpoint : ischemic events, myocardial infarction, stroke, PCI necessity and bypass surgery

10. PIŚMIENNICTWO

1. Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol.* 2009;103:4A-10A.
2. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, i wsp.: Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndrome without ST segment elevation. *N Eng Med.* 2001; 345: 494-502.
3. Lev EI, Patel RT, Maresh KJ i wsp.: Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a role of dual drug resistance. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45 (suppl A): 286.
4. Guthikonda S, Lev EI, Kleiman NS: Aspirin resistance. *Curr. Cardiol. Repor.* 2005;7:242-8.
5. Feher G, Feher A, Pusch G i wsp.: Clinical importance of aspirin and clopidogrel resistance. *World J Cardiol.* 2010;2:171-86.
6. Gurbel PA, Becker RC, Mann KG i wsp.: Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007 50:1822-34.
7. Gasparyan AY: Aspirin and clopidogrel resistance: methodological challenges and opportunities. *Vasc Health Risk Manag.* 2010;6:109-12.
8. Rozalski M, Nocun M, Watala C: Adenosin diphosphate receptor on blood plateles – potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Pol Biochem Pol.* 2005;52:411-5.

9. Smyth SS, Woulfe DS, Weitz JI i wsp.: 2008 Platelet Colloquium Participants. G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:449-57.
10. Massberg S, Schulz C, Gawaz M: Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome. *Semin Vasc Med.* 2003;3:147-62.
11. Linden MD, Jackson DE: Platelets: pleiotropic roles in atherogenesis and atherothrombosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:1762-6.
12. McTavish D, Faulds D, Goa KL: Ticlopidine. An updated review of its pharmacology and therapeutic use in platelet-dependent disorders. *Drugs.* 1990;40:238-59.
13. Freson K, Thys C, Wittevrongel C, Van Geet C: Mechanisms of action and targets for actual and future antiplatelet drugs. *Mini Rev Med Chem.* 2006;6:719-26.
14. Smith S C, Feldman T E, Hirszfeld i wsp.: ACC/AHA/ESC 2005 Guideline update for percutaneous coronary intervention – uummary article a report of American Collage of Cardiology,/American Hart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:216-35.
15. Dudek D, Filipiak K J, Stępińska J: Ostry zespół wieńcowy. Jak leczyć skuteczniej i szybciej. *Doustne leki przeciwplateletkowe.* Termedia. Poznań. 2006.
16. Geiger J, Teichmann L, Grossmann R i wsp.: Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. *Clin Chem.* 2005;51:957-65.
17. Padrini R, Pengo V: Dosing of clopidogrel and aspirin in acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2010; 363: 2465-6.

18. Bolognese L, Falsini G, Listro F i wsp.: Randomized comparison of upstream tirofiban versus downstream high bolus dose tirofiban or abciximab on tissue-level perfusion and troponin release in high-risk acute coronary syndromes treated with percutaneous coronary intervention: the EVERST trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:522-8.
19. Wejner-Mik P, Drozd J, Lipiec P i wsp.: Prevalence of dangerous arrhythmia during pharmacological stress echocardiography, *Pol Merkur Lekarski.* 2006;20:635-8.
20. Tirschwell D: Aspirin plus dipyridamole was more effective than aspirin alone for preventing vascular events after minor cerebral ischemia. *ACP J Club.* 2006;145:57.
21. Jagathesan R, Rosen SD, Foale RA i wsp.: Effects of long-term oral dipyridamole treatment on coronary microcirculatory function in patients with chronic stable angina: a substudy of the persantine in stable angina (PISA) study. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;48:110-6.
22. Kobsar AL, Koessler J, Rajkovic MS i wsp.: Prostacyclin receptor stimulation facilitates detection of human platelet P2Y(12) receptor inhibition by the PFA-100 system. *Platelets.* 2010;2:112-6.
23. Wilson W, Gurvitch R, Ajani AE. Prasugrel: a novel platelet ADP P2Y receptor antagonist. *Cardiovasc Ther.* 2009; 27:194-8.
24. Serebruany VL. Mortality in the TRITON trial: Update from the FDA prasugrel action package. *Am J Cardiol.* 2010; DOI:10.1016.

25. Cannon ChP, Harrington RA., James S i wsp. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study *Lancet*. 2010;375: 283-93.
26. Huczek Z, Filipiak KJ, Roik M i wsp.: Metody oceny funkcji płytek krwi w chorobie niedokrwiennej serca; *Kardiologia Po Dypl.* 2007;4,:60-8.
27. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R i wsp.: Description of an in vitro platelet function analyzer-PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21 Suppl 2:106-12.
28. Frossard M, Fuchs I, Leitner JM i wsp.: Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:1392-7.
29. Wang JC, Aucoin-Barry D, Manuelian D i wsp.: Incidence of aspirin nonresponsiveness using the Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA. *Am J Cardiol.* 2003;15;92:1492-4.
30. Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Haas NF i wsp.: Assessment of platelet function assays. *Am Heart J.* 1998;135:170-8.
31. Graft RM, Chavez JJ, Snider CC i wsp.: Comparison of modified Thrombelastograph and Plateletworks whole blood assays to optical platelet aggregation for monitoring reversal of clopidogrel inhibition in elective surgery patients. *J Lab Clin Itp.* 2005;145:309-15.
32. Graft RM, Chavez JJ, Bresee SJ I wsp.: A novel modification of the Thromboelastograph assay, isolating platelet function, correlates with optical platelet aggregation. *J Lab Clin Med.* 2004;143:301-9.
33. Tantry US, Blidę KP, Gurbel PA: Overstimulation of platelet aspirin resistance detection by thromboelastograph, platelet mapping and validation by conventional

- aggregation using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1705-9.
34. Baron D, Savion N: Impact cone and plate(let) analyzer. IN: Michelson AD (ed.) *Platelets* 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier/Academic Press. 2006;535-44.
 35. Steinhubl SR: The Verify Now system. In: Michelson AD (ed.). *Platelets*. 2nd ed. San Diego, Ca: Elsevier/Academic Press. 2006: 509-18.
 36. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI i wsp.: Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation.* 2002;105:1650-5.
 37. Van der Planken MG, Claeys MJ, Vertessen FJ i wsp.: Comparison of turbidimetric aggregation and in vitro bleeding time (PFA-100) for monitoring the platelet inhibitory profile of antiplatelet agents in patients undergoing stent implantation. *Thromb Res.* 2003;111:159-64.
 38. Wiviott S.D., Antman E.M.: Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast-moving story. *Circulation.* 2004;109:3064-7.
 39. Arenal E, Refsum H, Bonna KH i wsp.: Serum total homocysteine and coronary artery disease. *Int J Epidemiol.* 1995; 24:704-7.
 40. Budaj A, Poloński L *Choroba niedokrwienna serca w: Szczeklik A (red.) Choroby Wewnętrzne* Kraków 2001, wyd. I.
 41. Paton RC: Platelet survival in diabetes mellitus using an aspirin-labelling technique. *Tromb Res.* 1979;15:793-8.

42. Lewandowski K, Swierczyńska A, Kwasnikowski P i wsp.: The prevalence of C807T mutation of glycoprotein Ia gene among young male survivors of myocardial infarction: a relation with coronary angiography results. *Kardiol Pol.* 2005;63:107-13.
43. Christiaens L, Ragot S, Mergy J, i wsp.: Major clinical vascular events and aspirin-resistance status as determined by the PFA -100™ method among patients with stable coronary artery disease: a prospective study . *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008;19:235 -9.
44. Andersen K: Aspirin nonresponsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2003, 108:37-42.
45. Main C, Palmer S, Griffin S i wsp.: Clopidogrel used in combination with aspirin compared with aspirin alone in the treatment of non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 200; 8:1-141.
46. Gum PA, Kottke-Marchant K, Loggio ED i wsp.: Profil and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2001;88:230-5.
47. Homoncik M, Jilma B, Hergovich N i wsp.: Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost.* 2000;83:316-21.
48. Chakroun T, Gerotziakas G, Robert F i wsp.: In vitro aspirin resistance detected by PFA-100 closure time: pivotal role of plasma von Willebrand factor. *Br J Hematol.* 2004;124:80-5.

49. Cottaneo M: Aspirin and clopidogrel, efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1-8.
50. Michelson AD: Platelet function testing In cardiovascular diseases. *Circulation* 2004;110:e489-e93.
51. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E i wsp.: Influence of aspirin resistance on platelet function profiles in patients on long-term aspirin and clopidogrel after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2006;97:38-43.
52. Peters AJ, Borries M, Gradaus F: In vitro bleeding test with PFA-100-aspects of controlling individual acetylsalicylic acid induced platelet inhibition in patients with cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2001;12:263-72.
53. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR: Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2008;336:195-8.
54. Grotemyer K H: Two-years follow-up of aspirin responders and aspirin non responders. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res.* 1993;71:397-403.
55. Mehta SR, Yusuf S: Short- and long-term oral antiplatelet therapy in acute coronary syndromes and percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(4 Suppl S):79S-88S.
56. Walker CW, Dawley CA, Fletcher SF: Aspirin combined with clopidogrel (Plavix) decreases cardiovascular events in patients with acute coronary syndrome. *Am. Fam Physician.* 2007;76:1643-5.

57. Manolis AS, Tzeis S, Andrikopoulos G, Koulouris S, Melita H: Aspirin and clopidogrel: a sweeping combination in cardiology. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005;3:203-19.
58. Matetzky S i wsp: Clopidogrel resistance is associated in increased risk of recurrent atherothrombotic evnts in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109:3171-5.
59. Kastrati A, von Beckerath N, Joost A i wsp.: Loading with 600 mg clopidogrel in patients with coronary artery disease with and without chronic clopidogrel therapy. *Circulation*. 2004;110:1916-9.
60. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA: Prasugrel. *Expert Opin Investig Drugs*. 2006;15:1627-33.
61. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH i wsp.: TRITON-TIMI 38 Investigators: Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2007;357:2001-15.
62. Lee BK, Lee SW, Park SW i wsp.: Effects of triple antiplatelet therapy (aspirin, clopidogrel, and cilostazol) on platelet aggregation and P-selectin expression in patients undergoing coronary artery stent implantation. *Am J Cardiol*. 2007;100:610-4.
63. Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW i wsp.: Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1309-11.2.
64. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ: Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Hart J*. 2006;2: 647-65.

65. Maree A O, Curtis R J, Dooley M i wsp.: Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1258-63.
66. Fontana P, Nolli S, Reber G, Moerloose P: Aspirin and clopidogrel resistance: a study on 96 healthy volunteers and Role of the P2Y12 H1/H2 gene polymorphism. *Thromb Haemost.* 2005;3 (suppl.1):P0356.
67. Michos ED, Ardehali R, Blumenthal RS i wsp.: Aspirin and clopidogrel resistance. *Mayo Clin Proc.* 2006;81:518-26.
68. Lordkipanidze M, Pharand C, Palisaitis DA, Diodati JG: Aspirin resistance: Truth or dare. *Pharmacol Ther.* 2006;112:733-43.
69. Hankey GJ, Eikelboom JW.: Aspirin resistance. *BMJ.* 2004;328:477-9.
70. Eikelboom JW, Hankey GJ: Aspirin resistance: a new independent predictor of vascular events? *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:966-8.
71. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, et al.: Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events, *Circulation.* 2002;105:1650-5.
72. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, et al.: A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:961-5. Erratum in *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1918
73. Schwartz KA, Schwartz DE, Ghosheh K i wsp.: A compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2005;95:973-5.

74. Patrono C, Rocca B: Aspirin: promise and resistance in the new millennium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:25-32.
75. Postuła M, Kapłon A: Oporność na kwas acetylosalicylowy i jego kliniczne znaczenie. *Kardiologia w Praktyce.* 2007;1;3.
76. von Beckerath N, Koch W, Mehilli J i wsp.: Glycoprotein Ia gene C807T polymorphism and risk for major adverse cardiac events within the first 30 days after coronary artery stenting. *Blood.* 2000;95:3297-301
77. Macchi L, Christiaens L, Brabant S i wsp.: Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet PIA1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T(GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ibalph) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol.*2003;42:1115-9.
78. Cambria-Kiely JA, Gandhi PJ: Aspirin resistance and genetic polymorphism. *J Thromb Throbolysis.* 2002;14:51-8.
79. Robinson K, Arheart K, Refsum H i wsp.: Low circulating folate and witamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. *Circulation.* 1998;97:437-43.
80. Malinow MR, Kang SS, Taylor LM i wsp.: Prevalence of hyperhomocysteinemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation.* 1989;79:1180–8.
81. Stampfer MJ, Malinow MR, Willet WC i wsp.: A prospective study of plasma homocystein and risk of myocardial infarction in US physiscians. *J Am Coll Cardiol.* 1992;268:877-81.

82. Boushey CJ, Bareford SAA, Omenn GS, Motulski AG: A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease-probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Coll Radiol.* 1995;274:1049-57.
83. Domagała B, Sanak M, Czachór R, Szczeklik A: Hiperhomocysteinemia i jej związek z miażdżycą tętnic. *Pol Arch Med Wew.* 1997;98:153-62.
84. Chambers JC, McGeorg A, Jean-Marie J, Kooer JS: Acute hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction. *Lancet.* 1998;351:36-7.
85. Angelo A, Selhub J: Homocysteine and thrombotic disease. *Blood.* 1997;90:1-11.
86. Stobiecka M, Deeb J, Hepel M: Ligand exchange effects in gold nanoparticle assembly induced by oxidative stress biomarkers: homocysteine and cysteine. *Biophys Chem.* 2010;146:98-107.
87. Zanin RF, Campesato LF, Braganhol E i wsp.: Homocysteine decreases extracellular nucleotide hydrolysis in rat platelets. *Thromb Res.* 2010;125:e87-92.
88. Olas B, Kołodziejczyk J, Kedzierska M i wsp.: Modification of human blood platelet proteins induced by homocysteine and its thiolactone in vitro. *Thromb Res.* 2009;124:689-94.
89. Valles J, Santos MT, Fuset MP i wsp.: Partial inhibition of platelet thromboxane A2 synthesis by aspirin is associated with myonecrosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2007;99:19-25.
90. Hobikoglu GF, Norgaz T, Aksu H i wsp.: The effect of acetylsalicylic acid resistance on prognosis of patients who have developed acute coronary syndrome during acetylsalicylic acid therapy. *Can J Cardiol.* 2007;23:201-6.

91. Cannon CP, Battler A, Brindis RG i wsp.: American College of Cardiology key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with acute coronary syndromes. A report of the American College of Cardiology Task Force on clinical data standards (Acute Coronary Syndromes Writing Committee). *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:2114-30.
92. Ebbel M H, Flewelling D, Flynn C A: A systematic review of troponin T and I for diagnostic acute myocardial infarction. *J Fam Pract.* 2000;49:550-6.
93. Straburzyńska-Migaj E, Ochotny R, Szyszka A, Cieśliński A: Biochemiczne markery sercowe.Przełom w diagnostyce ostrych zespołów wieńcowych?. *Kardiol Pol.* 2001;54:352-5.
94. Luscher M S, Thygesen K, Ravkilde J i wsp.: Applicabililty of cardiac troponin T and I for early risk stratification in unstable coronary artery disease. *Circulation.* 1997;96: 2578-85.
95. Giannitsis E, Lehrze S, Wiegand U i wsp.: Risk stratification in patients with interior acute myocardial infarction treated by percutaneous coronary intervention. The role of admission troponin T. *Circulation.* 2000;102:2038-44.
96. Metha S R, Yusuf S, Peters R J i wsp: Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PRE-CURE study. *Lancet* 2001;358:527–33.
97. Chen WH, Lee PY, Ng W I i wsp.: Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment, *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1122-6.

98. Bonow R O: Myocardial viability and prognosis in patients with ischemic left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2002,;39:1159-62.
99. Laffite S, Higashiyama A, Masugata H i wsp.: Contrast echocardiography can assess risk area and infarct size during coronary occlusion and reperfusion: experimental validation. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1546–54.
100. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG i wsp.: Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2007;11:189-96.
101. Antoniadou C, Tousoulis D, Vasiliadou C i wsp.: 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.* 2006;4:1959-66.
102. Zhao Y, Wang Y, Zhu J.: Correlation between the polymorphism of glycoprotein Ia gene and acute coronary syndrome. *Chin Med Sci J.* 2004;19:13-8.
103. Pulcinelli FM, Pignatelli P, Celestyni A i wsp.: Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term patients. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43: 979-84.
104. Watala C, Golanski J, Pluta J i wsp.: Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)-its relation to metabolic control. *Thromb Res.* 2004;113:101-3.
105. Watala C, Pluta J, Golanski J, i wsp.: Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with decreased aspirin-mediated protein acetylation and reduced sensitivity of blood platelets to aspirin. *Mol Med.* 2005;83:148-58.

106. Serebruany VL, Malinin AI, Pokov A i wsp.: Effects of clopidogrel and aspirin in combination versus aspirin alone on platelet activation and major receptor expression in diabetic patients: the PLavix Use for Treatment Of Diabetes (PLUTO-Diabetes) trial. *Am Heart J.* 2008; 155:1-7.
107. Ahn Y, Jeong MH, Jeong JW i wsp.: Randomized comparison of cilostazol vs clopidogrel after drug-eluting stenting in diabetic patients. *Circ J.* 2008;72:35-9.
108. Lee SW, Park SW, Kim YH i wsp.: DECLARE-Long Study Investigators: Comparison of triple versus dual antiplatelet therapy after drug-eluting stent implantation (from the DECLARE-Long trial). *Am J Cardiol.* 2007;100:1103-8.
109. Pamukcu B, Oflaz H, Oncul A i wsp.: The role of aspirin resistance on outcome in patients with acute coronary syndrome and the effect of clopidogrel therapy in the prevention of major cardiovascular events. *J Thromb Thrombolysis.* 2006;22:103-110.
110. Jaapjan D, Snoep JD, Marcel M. C. i wsp.: Association of Laboratory-Defined Aspirin Resistance With a Higher Risk of Recurrent Cardiovascular Events. A Systematic Review and Meta-analysis *Arch Intern Med.* 2007;167:1593-9.
111. Chen WH, Cheng X, Lee PY i wsp.: Aspirin resistance and adverse clinical events in patients with coronary artery disease. *Am J Med.* 2007;120:631-5.
112. Dorsch MP, Lee JS, Lynch DR i wsp.: Aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease with and without a history of myocardial infarction. *Ann Pharmacother.* 2007;41:737-41.

113. Siller-Matula JM, Delle-Karth G, Christ G i wsp.: Dual non-responsiveness to antiplatelet treatment is a stronger predictor of cardiac adverse events than isolated non-responsiveness to clopidogrel or aspirin. *Int J Cardiol.* 2012 Feb 1.
114. Marcucci R, Gori AM, Paniccia R i wsp.: Cardiovascular death and nonfatal myocardial infarction in acute coronary syndrome patients receiving coronary stenting are predicted by residual platelet reactivity to ADP detected by a point-of-care assay: a 12-month follow-up. *Circulation.* 2009 Jan 20;119:237-42.
115. Marcucci R, Gori AM, Paniccia R i wsp.: High on-treatment platelet reactivity by more than one agonist predicts 12-month follow-up cardiovascular death and non-fatal myocardial infarction in acute coronary syndrome patients receiving coronary stenting. *Thromb Haemost.* 2010 Aug;104:279-86.
116. Marcucci R, Giusti B, Paniccia R, i wsp.: High on-treatment platelet reactivity by ADP and increased risk of MACE in good clopidogrel metabolizers. *Platelets.* 2012;23(8):586-93.
117. Jin HY, Yang TH, Kim DI i wsp.: High post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay predicts long-term clinical outcomes in patients with ST-segment elevation myocardial infarction who underwent primary coronary stenting. *Int J Cardiol.* 2012 Jun 9.
118. Su G, Wang Z, Ding Y i wsp.: Association of the platelet membrane glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with aspirin resistance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007 Dec; 27: 664-7.

119. Templin C, Schaefer A, Stumme B i wsp.: Combined aspirin and clopidogrel resistance associated with recurrent coronary stent thrombosis. *Clin Res Cardiol.* 2006;95:122-126.
120. Marcucci R, Paniccia R, Antonucci E i wsp.: Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol.* 2006;98:1156-9.

11. SPIS TABEL

- Tabela 1.** Różnice terapeutyczne między tiklopidyną a kłopidogrelem.
- Tabela 2.** Zgony jako pierwsze raportowane zdarzenia w badaniu TRITON.
- Tabela 3.** Porównanie zalet i wad wybranych metod stosowanych do oceny czynności płytek krwi.
- Tabela 4.** Charakterystyka kliniczna chorych w momencie włączenia do badania.
- Tabela 5.** Rozkład poszerzonych naczyń w badanej grupie.
- Tabela 6.** Leczenie farmakologiczne (poza lekami przeciwplatekowymi) badanej populacji.
- Tabela 7.** Charakterystyka kliniczna chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach
- Tabela 8.** Wartość referencyjna czasu zamknięcia (CT) w zależności od użytego agonisty.
- Tabela 9.** Przewidywane wartości CT w zaburzeniach funkcji płytek krwi w zależności od użytego agonisty.
- Tabela 10.** Wartości referencyjne maksymalnej amplitudy agregacji (w %) dla poszczególnych aktywatorów płytek krwi u osób zdrowych.
- Tabela 11.** Wartości MDA w płytkach krwi u poszczególnych chorych.
- Tabela 12.** Średnie wartości CT (w sekundach) dla epinefryny w poszczególnych grupach chorych.
- Tabela 13.** Średnie wartości maksymalnej amplitudy krzywej agregacji płytek (w procentach - %) dla poszczególnych induktorów.
- Tabela 14.** Wyniki badań oporności uzyskane przy wykorzystaniu PFA-100 (czas zamknięcia apretury w sekundach) oraz agregometru optycznego (intensywność agregacji w %) u poszczególnych chorych.
- Tabela 15.** Charakterystyka kliniczna i wyniki badań dodatkowych uzyskanych w badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach.

- Tabela 16.** Ocena danych o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach w całej badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach.
- Tabela 17.** Ocena danych o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach w całej badanej grupie w zależności od polimorfizmu C807T GP Ia.
- Tabela 18.** Ocena danych o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych wrażliwych w zależności od polimorfizmu C807T GP Ia.
- Tabela 19.** Ocena danych o zdarzeniach sercowo-naczyniowych i stanie klinicznym chorych w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych opornych w zależności od polimorfizmu C807T GP Ia.
- Tabela 20.** Wyniki wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych w badaniu po 3 latach w całej badanej grupie oraz w poszczególnych podgrupach.
- Tabela 21.** Porównanie wyników wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach w całej badanej grupie.
- Tabela 22.** Porównanie wyników wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych wyjściowo wrażliwych na leki przeciwplatekcyjne.
- Tabela 23.** Porównanie wyników wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych opornych na leki przeciwplatekcyjne.
- Tabela 24.** Porównanie wyników wybranych danych klinicznych oraz badań laboratoryjnych uzyskanych w badaniu kontrolnym po 3 latach w grupie chorych wrażliwych i opornych.
- Tabela 25.** Zestawienie wyników wyjściowych oraz kontrolnego badania

oporności na leki przeciwplatekcyjne przeprowadzone w aparacie PFA-100.

- Tabela 26.** Średnie wartości czasu zamknięcia apertury (w sekundach) dla epinefryny uzyskane w całej badanej grupie wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach.
- Tabela 27.** Średnie wartości czasu zamknięcia apertury (w sekundach) dla epinefryny uzyskane u chorych wyjściowo wrażliwych na leki przeciwplatekcyjne oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach.
- Tabela 28.** Średnie wartości czasu zamknięcia apertury (w sekundach) dla epinefryny uzyskane u chorych wyjściowo opornych oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach.
- Tabela 29.** Średnie wartości czasu zamknięcia apertury (w sekundach) dla epinefryny uzyskane u chorych wyjściowo wrażliwych ocenianych w badaniu kontrolnym po trzech latach niezależnie od statusu wrażliwości.
- Tabela 30.** Średnie wartości czasu zamknięcia apertury (w sekundach) dla epinefryny uzyskane u chorych wyjściowo opornych ocenianych w badaniu kontrolnym po trzech latach niezależnie od statusu wrażliwości .
- Tabela 31.** Występowanie zdarzeń sercowo-naczyniowych w trakcie 6-letniej obserwacji.
- Tabela 32.** Potencjalne przyczyny aspirynooporności.
- Tabela 33.** Przyczyny oporności na kłopidogrel.
- Tabela 34.** Stopień nasilenia hiperhomocysteinemii
- Tabela 35.** Przyczyny hiperhomocysteinemii.
- Tabela 36.** Zaburzenia występujące w hiperhomocysteinemii.

12. SPIS RYCIN

- Rycina 1. Miejsce i czas rozpoczęcia działania głównych grup leków przeciwplatek i przeciwtrombinowych stosowanych w ostrych zespołach wieńcowych.
- Rycina 2. Miejsce działania poszczególnych leków przeciwplatek na płytce krwi.
- Rycina 3. Schemat postępowania z chorym ze STEMI.
- Rycina 4. Wydruk badania chorego MB prawidłowo reagującego na leczenie ASA.
- Rycina 5. Odsetek chorych z ACS wykazujących oporność na leki przeciwplatekowe na podstawie czasu zamknięcia (CT) w aparacie PFA-100.
- Rycina 6. Odsetek chorych opornych na leki przeciwplatekowe uzyskany w poszczególnych badaniach, N – liczba chorych.
- Rycina 7. Korelacja pomiędzy wartościami intensywności agregacji płytek krwi pod wpływem 5 μ M ADP a stężeniem homocysteiny w osoczu.
- Rycina 8. Korelacja pomiędzy wartościami intensywności agregacji płytek krwi pod wpływem kolagenu 2 μ g/ml a stężeniem homocysteiny w osoczu.
- Rycina 9. Podział całej badanej grupy pod względem polimorfizmu C807T genu dla glikoproteiny I a.
- Rycina 10. Podział grupy chorych wrażliwych na leczenie przeciwplatekowe pod względem polimorfizmu C807T genu dla glikoproteiny I a.
- Rycina 11. Podział grupy chorych opornych na leczenie przeciwplatekowe pod względem polimorfizmu C807T genu dla glikoproteiny I a.
- Rycina 12. Wykres korelacji polimorfizmu C807T oraz oporności na leczenie przeciwplatekowe dla ADP i kolagenu.
- Rycina 13. Średnie wartości stężenia troponiny I w poszczególnych grupach chorych.
- Rycina 14. Średnie wartości frakcji wyrzucania (EF) lewej komory w poszczególnych grupach chorych.

- Rycina 15. Średnie wartości troponiny I w zależności od rodzaju polimorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia.
- Rycina 16. Średnie wartości frakcji wyrzucania LK (EF) w zależności od polimorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia.
- Rycina 17. Średnie stężenia homocysteiny w poszczególnych grupach chorych w zależności od dymorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia.
- Rycina 18. Zmiany czasu zamknięcia apertury w PFA-100 dla epinefryny po 3 latach w grupie chorych wyjściowo wrażliwych i opornych na leki przeciwplatekcyjne.
- Rycina 19. Średnie wartości frakcji wyrzucania (EF) lewej komory w poszczególnych grupach chorych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach.
- Rycina 20. Porównanie średnich wartości frakcji wyrzucania (EF) lewej komory w poszczególnych grupach chorych wyjściowo oraz w badaniu kontrolnym po 3 latach
- Rycina 21. Średnie wartości frakcji wyrzucania LK (EF) w zależności od polimorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia uzyskane w całej grupie wyjściowo i w badaniu kontrolnym po 3 latach.
- Rycina 22. Średnie wartości frakcji wyrzucania LK (EF) w zależności od polimorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia w grupie chorych wyjściowo wrażliwych na leki przeciwplatekcyjne uzyskane w badaniu wstępnym i w badaniu kontrolnym po 3 latach.
- Rycina 23. Średnie wartości frakcji wyrzucania LK (EF) w zależności od polimorfizmu C807T genu glikoproteiny Ia uzyskane w grupie chorych wyjściowo opornych na leki przeciwplatekcyjne uzyskane w badaniu wstępnym i w badaniu kontrolnym po 3 latach.
- Rycina 24. Osobnicza zmienność odpowiedzi na leczenie przeciwplatekcyjne.
- Rycina 25. Polimorfizm genu GP Ia. Opis w tekście.

13. PODZIAŁ PRACY DOKTORANTÓW

1. Wspólnie:

- a. określenie celów pracy doktorskiej
- b. określenie kryteriów włączenia i wyłączenia chorych do badań
- c. stworzenie protokołów poszczególnych etapów badania
- d. wstępna obróbka uzyskanych wyników
- e. przeprowadzenie obserwacji odległych u chorych włączonych do badań
- f. uzyskiwanie środków finansowych na przeprowadzenie badań

2. Małgorzata Duszyńska-oddział kardiologiczny:

- a. włączenie chorych do badań-uzyskiwanie zgód oraz wypełnianie protokołów włączenia
- b. analiza i wprowadzenie danych z kardiologicznych badań laboratoryjnych
- c. analiza i wprowadzanie z wyników badań koronarograficznych
- d. analiza i wprowadzanie danych dotyczących leczenia farmakologicznego chorych
- e. wykonywanie i analiza badań echokardiograficznych.

3. Maria Jamrozek-Jedlińska-oddział chorób wewnętrznych i hematologii:

- a. uzyskiwanie danych z zakresu homeostazy
- b. analiza i wprowadzanie danych z badań dotyczących oceny czynności płytek krwi
- c. okresowa kontrola jakości wykonywanych badań w pracowni homeostazy
- d. koordynacja wysyłania oraz uzyskiwania wyników badań genetycznych związanych z polimorfizmem C807T genu GP Ia
- e. koordynacja wysyłania oraz uzyskiwania wyników stężenia homocysteiny.