

Marcin Żyłkiewicz

Praca została wykonana w:

Pracowni Hemostazy

**Katedry Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

**STĘŻENIE IZOPROSTANU (8-EPIPROSTAGLANDYNY $F_{2\alpha}$) W OSOCZU
A OPORNOŚĆ NA ASPIRYNĘ
U CHORYCH PO NIEDOKRWIENNYM UDARZE MÓZGU**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor:

prof. dr hab. n. med. Krystyna Zawilska

Poznań 2013

PODZIĘKOWANIA

Bardzo dziękuję Pani Profesor Krystynie Zawilskiej za umożliwienie mi wykonania niniejszej pracy w Pracowni Hemostazy Katedry Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz za całą pomoc jakiej mi udzieliła.

Składam podziękowania Panu Profesorowi Piotrowi Psuja za wielokierunkową nieocenioną pomoc jaką otrzymałem.

Dziękuję bardzo Paniom magister Ewelinie Wojtasińskiej, Irminie Gaik i Zofii Turowieckiej za pomoc podczas pracy w Pracowni Hemostazy.

SPIS TREŚCI

Słowa kluczowe	5
Opis stosowanych skrótów	5
Streszczenie w języku polskim	6
Streszczenie w języku angielskim	9
1. Wstęp	12
1.1. Udar niedokrwienny (zawał) mózgu	13
1.2. Płytki krwi	14
1.3. Kwas acetylosalicylowy	16
1.4. Rola kwasu acetylosalicylowego w leczeniu zawału mózgu i jego wtórnej profilaktyce	17
1.5. Oporność na aspirynę	18
1.6. Metody badania czynności płytek krwi	21
1.7. Uzasadnienie podjęcia tematu	22
2. Cele	22
3. Materiał	23
3.1. Grupa badana	23
3.2. Grupa kontrolna	24
3.3. Zgoda Komisji Bioetycznej	24
4. Metody	25
4.1. Agregometria optyczna	25
4.2. PFA-100®	26
4.3. 11-dehidrotromboksan B ₂	27
4.4. 8-epiprostaglandyna F _{2α}	30
4.5. Malonyldialdehyd	30
4.6. Metody statystyczne	30
5. Wyniki	31
5.1. Agregometria optyczna oraz PFA-100®	31
5.2. 11-dehidrotromboksan B ₂ i 8-epiprostaglandyna F _{2α}	32
5.3. Oporność na kwas acetylosalicylowy	34
5.4. Zależności pomiędzy wynikami badań	35
5.5. Malonyldialdehyd	41
6. Omówienie wyników i dyskusja	43

7. Wnioski	50
8. Spis tabel	51
9. Spis rycin	51
10. Spis wykresów	51
11. Literatura	52
12. Załącznik	57

SŁOWA KLUCZOWE

oporność na aspirynę, oporność na kwas acetylosalicylowy, wysoka reaktywność płytek krwi w trakcie leczenia, 8-epiprostaglandyna F_{2α}, 11-dehidrotromboksan B₂, agregacja płytek krwi, PFA-100, udar mózgu

OPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

8-epiPgF _{2α}	- 8-epiprostaglandyna F _{2α}
11-dehidroTxB ₂	- 11-dehidrotromboksan B ₂ (w tabelach 11-dTxB ₂)
ADP	- adenylozodifosforan (ang. adenosine diphosphate)
ASA	- kwas acetylosalicylowy (ang. acetylsalicylic acid)
COX	- cyklooksygenaza (ang. cyclooxygenase)
COX-1	- cyklooksygenaza 1
COX-2	- cyklooksygenaza 2
LTA	- agregometria optyczna (ang. light transmission aggregometry)
MDA	- malonylodialdehyd
PFA	- analizator czynności płytek krwi (ang. platelet function analyzer)
PgH ₂	- prostaglandyna H ₂
TxA ₂	- tromboksan A ₂
TxB ₂	- tromboksan B ₂

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wstęp

Badania ostatnich lat wskazują, że częstą przyczyną nieskuteczności wtórnej profilaktyki udaru niedokrwinnego mózgu jest tzw. oporność na kwas acetylosalicylowy (ASA). Występuje ona u około 25% chorych, otrzymujących ASA w dawce dobowej 75-150 mg. Powodem oporności na ASA może być, obok wielu innych czynników, nieenzymatyczne powstawanie izoprostanów aktywujących płytki krwi.

Cele

Postanowiono określić częstości występowania oporności na ASA we własnym materiale chorych po niedokrwinnym udarze mózgu, ocenić przydatności wybranych badań laboratoryjnych w rozpoznawaniu oporności na ASA i poszukiwać związku pomiędzy opornością na ASA a stężeniem izoprostanu.

Materiał

Do badania zakwalifikowano 44 chorych, u których co najmniej 1 miesiąc wcześniej wystąpił niedokrwenny udar mózgu. Wszyscy chorzy otrzymywali przez przynajmniej 1 miesiąc przed badaniem ASA w dawce 75-150 mg/dobę. Grupę kontrolną dla oznaczenia stężeń 11-dehydrotromboksanu B_2 (11-dehydroTx B_2) i 8-epiprostaglandyny $F_{2\alpha}$ (8-epiPg $F_{2\alpha}$) w osoczu stanowiło 9 osób, które nie przebyły zawału mózgu i w okresie badania nie przyjmowały żadnych leków.

Metody

Czynność płytek krwi badano pomiarami agregacji indukowanej ADP w stężeniu 3,5 $\mu\text{mol/l}$ i 5 $\mu\text{mol/l}$, kolagenem (2 $\mu\text{g/ml}$), kwasem arachidonowym (0,6 mmol/l) oraz pomiarami czasu zamknięcia otworu testowego na płytce pokrytej kolagenem i epinefryną (adrenaliną) w analizatorze PFA-100®. Ponadto metodą immunoenzymatyczną mierzono stężenia osoczowe 11-dehydroTx B_2 (metabolitu tromboksanu A_2) i 8-epiPg $F_{2\alpha}$, posługując się zestawami EIA Kit firmy Cayman Chemicals z USA. Potwierdzeniem stosowania ASA było obniżenie wewnątrzpłytkowego stężenia malonyldialdehydu (MDA).

W obecnej pracy oporność na ASA stwierdzano w przypadku zachowanej agregacji płytek pod wpływem ADP >60%, pod wpływem kolagenu >70% i pod wpływem kwasu arachidonowego >20% oraz skróconego poniżej 165 s czasu zamknięcia w analizatorze PFA-100®, a także pozostającego w granicach normy stężenia 11-dehydroTxB₂.

Wyniki

Średnie stężenie 11-dehydroTxB₂ w grupie pacjentów przyjmujących ASA było niższe niż w grupie kontrolnej i wynosiło ono odpowiednio 2,1 pg/ml (ASA) i 3,0 pg/ml (bez ASA). Różnica była istotna statystycznie (p=0,041).

Średnie stężenie 8-epiPgF_{2α} w grupie pacjentów było wyższe niż w grupie kontrolnej zdrowych ochotników i wynosiło ono odpowiednio 68,9 pg/mL (pacjenci), 29,9 pg/ml (zdrowi ochotnicy). Różnica była istotna statystycznie (p=0,027).

Częstość oporności na ASA u chorych po niedokrwiennym udarze mózgu					
Agregometria optyczna				PFA-100®	11-dehydro TxB ₂
ADP 3,5 μmol/l	ADP 5,0 μmol/l	Kolagen	Kwas arachidonowy		
45%	52%	20%	7%	52%	43%

Stwierdzono statystycznie istotną ujemną korelację pomiędzy czasem zamknięcia w analizatorze PFA-100® a stężeniem 11-dehydroTxB₂ (r= -0,31; p=0,039) oraz stężeniem 8-epiPgF_{2α} (r= -0,36; p=0,019).

Starszy wiek badanych związany był z krótszym czasem zamknięcia otworu przez skrzep w analizatorze PFA-100® oraz starszy wiek badanych związany był ze zwiększonym stężeniem 11-dehydroTxB₂.

U badanych, którzy mieli stwierdzoną hiperlipidemię wyniki agregometrii z użyciem ADP w stężeniach końcowych 3,5 μmol/l oraz 5,0 μmol/l były istotnie statystycznie wyższe (odpowiednio p=0,010 i p=0,004).

Wnioski

1. Oporność na kwas acetylosalicylowy występuje u 7-52% chorych po udarze niedokrwiennym mózgu w zależności od rodzaju zastosowanej metody badawczej. Najsilniejsza korelacja istnieje pomiędzy oznaczonym immunoenzymatycznie stężeniem 11-dehydrotromboksanu B₂ w osoczu a czasem zamknięcia w analizatorze PFA-100®.
2. U pacjentów po udarze niedokrwiennym mózgu leczonych kwasem acetylosalicylowym przemiana kwasu arachidonowego zachodząca z udziałem

cyklooksygenazy ulega obniżeniu. Zależność stężenia 11-dehidrotromboksanu B₂ w osoczu i czasu zamknięcia w analizatorze PFA-100® od wieku badanych może ponadto świadczyć o tendencji do zwiększonej aktywacji płytek krwi u osób starszych w tej grupie chorych.

3. U pacjentów po udarze niedokrwiennym mózgu stosujących w prewencji wtórnej kwas acetylosalicylowy hiperlipidemia powoduje zwiększenie agregacji płytek krwi pod wpływem ADP.
4. Nieenzymatyczne tworzenie izoprostanów (8-epiprostaglandyny F_{2a}) w wyniku działania wolnych rodników jest zwiększone u pacjentów po udarze niedokrwiennym mózgu. Proces ten może przyczyniać się do oporności na kwas acetylosalicylowy (obserwowanej w badaniach analizatorem PFA-100®), co mogłoby stanowić podstawę nowych implikacji terapeutycznych.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

ISOPROSTANE (8-EPI PROSTAGLANDIN F_{2α}) PLASMA CONCENTRATION AND ASPIRIN RESISTANCE IN PATIENTS AFTER ISCHEMIC STROKE

Introduction

Studies published in recent years show that ineffectiveness of ischemic stroke secondary prevention often is caused by phenomenon called aspirin resistance. Aspirin resistance is revealed in about 25% patients on acetylsalicylic acid (aspirin) treatment (75-150 mg daily). Besides other mechanisms, an oxidant stress along with nonenzymatic biosynthesis of isoprostanes stimulating the platelet activation has been suggested as a cause of aspirin resistance.

Aims

The aims of this study were estimation of aspirin resistance incidence among survivors of ischemic stroke, evaluation of usefulness of some platelet function tests in aspirin resistance exploration and searching for relationship between isoprostane concentration and aspirin resistance.

Material

44 patients at least a month after acute onset of ischaemic stroke were included into the study. All of them were receiving 75-150 mg aspirin daily at least for a month. The control group for plasma 11-dehydrothromboxane B₂ measurements consisted of 9 healthy volunteers who did not take any medicines prior to blood sampling.

Methods

The platelet function was investigated by platelet aggregation induced by either ADP (3.5 and 5.0 μmol/L), collagen (2 μg/mL) or arachidonic acid (0.6 mmol/L) and measurement of closure time on the collagen and epinephrine cartridge in PFA-100® analyzer. Thromboxane A₂ metabolite – 11-dehydrothromboxane B₂ (11-dehydroTxB₂) and isoprostane – 8-epiprostaglandin F_{2α} (8-epiPgF_{2α}) plasma concentration were determined using immunoenzymatic method (EIA Kits from Cayman Chemicals). The aspirin ingestion was controlled by diminished intraplatelet concentration of malonyldialdehyde.

In this study aspirin resistance has been determined by the following criteria: the intensity of platelet aggregation induced by ADP >60%, collagen >70%, AA >20%, PFA-100® closure time <165 s and 11-dehydroTxB₂ concentration within normal range.

Results

Mean concentration of 11-dehydroTxB₂ in the group of patients taking aspirin was lower than in the control group, respectively 2,1 pg/ml (taking aspirin) i 3,0 pg/ml (not taking aspirin). This difference was statistically significant.

Mean concentration of 8-epiPgF_{2α} in the group of patients was higher than in the control group of healthy volunteers, respectively 68,9 pg/mL (patients), 29,9 pg/ml (healthy volunteers). This difference was statistically significant.

The frequency of aspirin resistance in patients after ischemic stroke					
Light transmission aggregometry (LTA)				PFA-100®	11-dehydro TxB ₂
ADP 3,5 μmol/L	ADP 5,0 μmol/L	Collagen	Arachidonic acid		
45%	52%	20%	7%	52%	43%

Statistically significant inverse correlations have been found between the plasma concentration of 11-dehydroTxB₂ and PFA-100® closure time ($r = -0,31$; $p = 0,039$) as well as between plasma concentration of 8-epiPgF_{2α} and PFA-100® closure time ($r = -0,36$; $p = 0,019$).

Older age of patients was associated with shorter closure time in PFA-100® method and also older age of patients was associated with higher concentration of 11-dehydroTxB₂.

Patients with hyperlipidemia had statistically higher aggregation with ADP in concentration 3,5 μmol/l and 5,0 μmol/l (respectively $p = 0,010$ i $p = 0,004$).

Conclusions

1. Different laboratory tests reveal resistance to aspirin in 7-52% of patients after ischemic stroke. The most significant correlation is observed between 11-dehydrothromboxane B₂ plasma concentration measured with immunoenzymatic assay and closure time in PFA-100® method.
2. Patients after ischemic stroke taking aspirin present decreased activity of cyclooxygenase metabolising arachidonic acid. The relationship of age and 11-dehydrothromboxane B₂ plasma concentration and closure time in PFA-100® method suggests that platelet activation is increased in this group of patients.

3. Hyperlipidemia in patients after ischemic stroke taking aspirin causes increased platelet aggregation induced by ADP.
4. A nonenzymatic production of isoprostane (8-epiprostaglandin F_{2α}) caused by free radicals is increased in patients after ischemic stroke. This process may contribute to aspirin resistance (noticed in PFA-100® method) and gives chances for new therapeutic opportunities.

1. WSTĘP

Choroby układu krążenia są współcześnie najczęstszą przyczyną zgonów w krajach rozwiniętych. Są one również jedną z głównych przyczyn chorobowości, inwalidztwa, niezdolności do pracy i samodzielnej egzystencji. Do narządów uszkodzanych przez te choroby należy między innymi mózgowie. Wobec powyższego naczyniowe choroby mózgowia stanowią poważny problem społeczny. Najczęstszą jednostką chorobową spośród naczyniowych chorób mózgowia jest niedokrwienny udar mózgu (zawał mózgu).

Do zawału mózgu dochodzi głównie w mechanizmie zakrzepu lub zatoru. Zarówno w jednym jak i drugim mechanizmie istotną rolę odgrywają płytki krwi. Sposobem zapobiegania wystąpieniu zawału mózgu jest hamowanie fizjologicznej czynności płytek krwi. Lekiem najczęściej stosowanym w tym celu jest aspiryna (kwas acetylosalicylowy, ang. acetylsalicylic acid, ASA). Jest to lek znany od wielu lat, bardzo dobrze przebadany i tani. Z tych względów jest bardzo szeroko stosowany m. in. we wtórnej profilaktyce zawału mózgu. Ma on duże znaczenie we współczesnej medycynie.

Jednakże u części chorych leczonych ASA, dochodzi do kolejnych zawałów mózgu. Co więcej, u części chorych leczonych ASA badania laboratoryjne pokazują, iż oczekiwane, znaczne zahamowanie czynności płytek krwi nie występuje. Stwierdzane jest tylko niewielkie zahamowanie czynności płytek krwi. Zjawisko to nazywane jest opornością na aspirynę (opornością na ASA). Występowanie oporności na ASA jest niepokojące. Tym bardziej, iż rutynowo nie bada się odpowiedzi płytek krwi na podawany pacjentom lek. W ostatnich latach opublikowano wiele doniesień na temat oporności na ASA. Jednakże dotychczasowe ich wyniki nie pozwoliły ustalić jednoznacznie jej przyczyn i mechanizmów.

Jedną z wysuwanych hipotez tłumaczących zjawisko oporności na ASA jest agonistyczne oddziaływanie izoprostanów, powstających na drodze nieenzymatycznych przemian, na receptory dla tromboksanu A_2 (TxA_2) na powierzchni płytek krwi. Wówczas pomimo zahamowania powstawania TxA_2 , pobudzany jest szlak aktywowania płytek krwi zależny od receptora dla TxA_2 .

Skutkuje to pozostawianiem płytki krwi w stanie gotowości do tworzenia zakrzepu pomimo przyjmowania leku. W niniejszej pracy postanowiono zweryfikować tę hipotezę.

1.1. Udar niedokrwienny (zawał) mózgu

Według definicji WHO z 1980 roku udar mózgu to nagłe wystąpienie ogniskowych lub uogólnionych zaburzeń czynności mózgu, trwających dłużej niż 24 godziny (o ile wcześniej nie doprowadzą do zgonu) i spowodowanych wyłącznie przyczynami naczyniowymi, związanymi z mózgowym przepływem krwi.

W obrębie tej definicji nie mieści się przemijający napad niedokrwienia mózgu (ang. transient ischemic attack – TIA), w którym objawy ustępują przed upływem 24 godzin. Aktualnie traktuje się zawał mózgu i przemijające niedokrwienie mózgu jako spektrum objawów klinicznych jednej jednostki chorobowej (tj. naczyniopochodnego uszkodzenia mózgu).

Jeżeli przed upływem 3 tygodni objawy udaru mózgu ustąpią to mówi się o udarze odwracalnym, jeżeli nie ustąpią to mamy do czynienia z udarem dokonanym.

Ze względu na mechanizm udar mózgu dzielimy na niedokrwienny – zawał mózgu (ok. 84%), krwotoczny (ok. 15%) – krwotok śródmózgowy i krwotok podpajęczynówkowy oraz żylny (ok. 1%) – w zakrzepicy zatok żylnych mózgowia. Poza powyższymi stosuje się również klasyfikację TOAST (według etiologii) i klasyfikację Oxfordshire Community Stroke Project (według umiejscowienia ogniska udarowego i związanych z nim objawów klinicznych).

W Polsce częstość zapadania na pierwszy w życiu zawału mózgu szacuje się na 111/100 000 na rok.

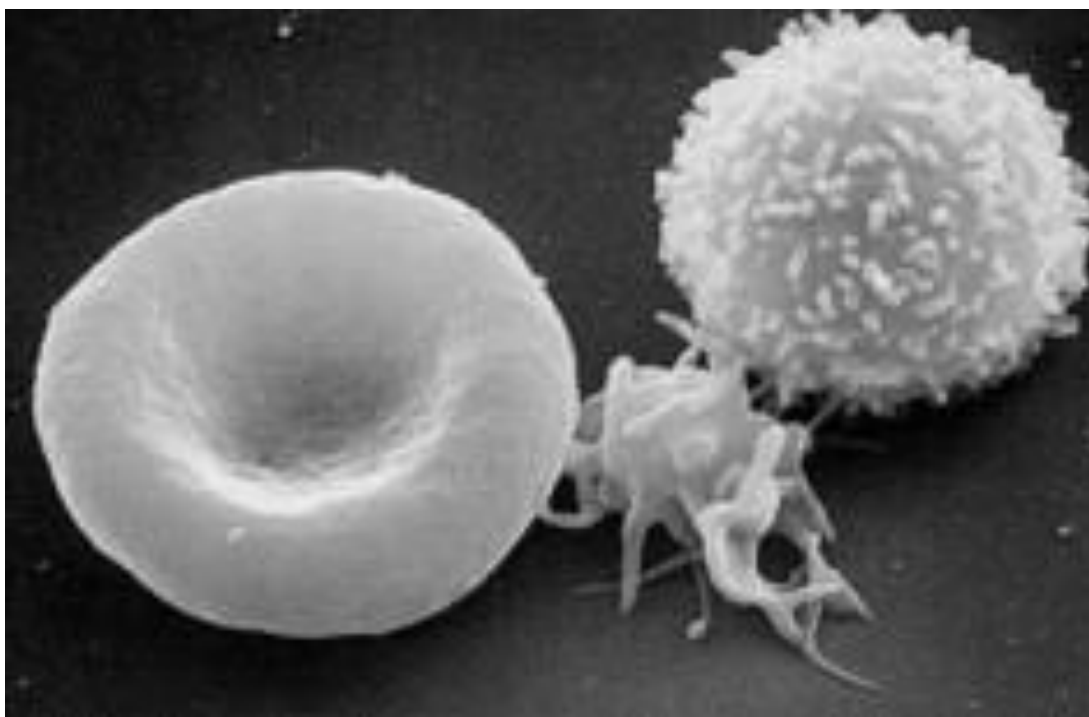
Pod względem patogenetycznym zawały mózgu wynikają z niedostatecznego w stosunku do potrzeb zmniejszenia przepływu w tętnicy

mózgowej. Przyczyną może być zakrzep (skrzeplina), który powstał na przykład w lewym przedsionku serca w trakcie migotania przedsionków i przemieścił się do tętnicy mózgowej. Na materiale zatorowym gromadzą się płytki krwi formując czop płytkowy i nasilając zaburzenie przepływu. Innym patomechanizmem zawału mózgu jest pęknięcie blaszki miażdżycowej i wytworzenie się w tym miejscu czopu płytkowego zamykającego częściowo lub całkowicie światło tętnicy mózgowej.

1.2. Płytki krwi

Płytki krwi odgrywają dwie główne funkcje w hemostazie: tworzą czop płytkowy (hemostaza pierwotna) i uczestniczą w krzepnięciu krwi (hemostaza wtórna). Wyróżnia się następujące czynności płytek krwi podczas tworzenia czopu płytkowego: adhezja, aktywacja i agregacja.

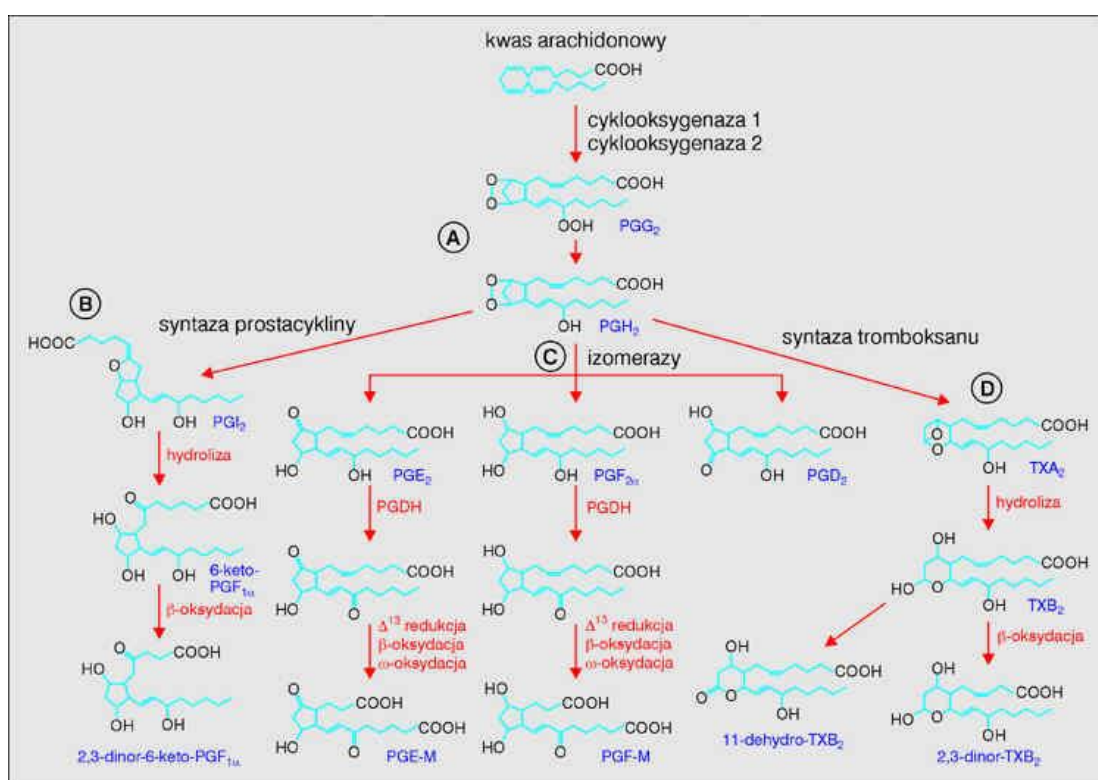
Rycina 1. Płytki krwi pomiędzy erytrocytem i leukocytem.



Płytki krwi poprzez swoje receptory łączą się (adhezja) z odstąniętymi (na skutek uszkodzenia naczynia) białkami tkanki łącznej, głównie kolagenem. To połączenie z kolagenem, jak również działanie agonistów receptorów błonowych [adenozynodifosforan (ADP), trombina, tromboksan A₂ (TxA₂), epinefryna (adrenalina), czynnik aktywujący płytki (PAF) i inne], powoduje

aktywację płytek krwi. Trombina i inni agonści powodują fosforylację miozyny i aktywację fosfolipazy A₂. Fosfolipaza A₂ uwalnia kwas arachidonowy z fosfolipidów błonowych. Kwas arachidonowy jest przekształcany przez cyklooksygenazę 1 (COX-1) w prostaglandynę G₂, a ta z kolei w prostaglandynę H₂ (P_gH₂). Następnie syntaza TxA₂ przekształca P_gH₂ w tromboksan A₂ (TxA₂). Działa on na płytce na zasadzie autokrynej (jest on produkowany przez płytke i wydzielany na zewnątrz komórki) nasilając ich adhezję, aktywację i agregację.

Rycina 2. Szlak przemian kwasu arachidonowego.



Zaktywowane płytki krwi łączą się ze sobą oraz z fibrynogenem i czynnikiem von Willebranda poprzez receptory – glikoproteinę (GP) IIb/IIIa. Jedna cząsteczka fibrynogeny może łączyć się z dwiema sąsiednimi płytkami. Efektem jest powstanie czopu płytkowego, który następnie w przebiegu hemostazy wtórnej jest stabilizowany i umacniany przez fibrynę.

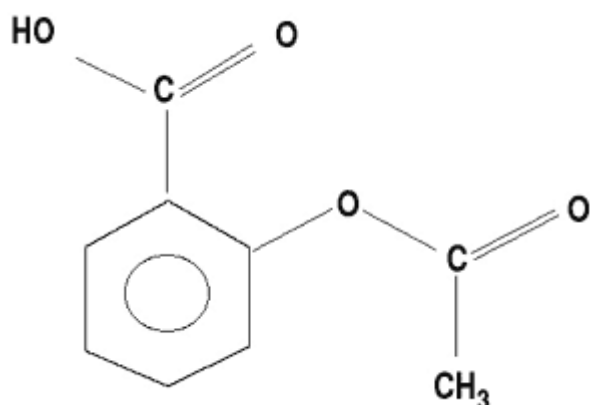
Szlak przemian kwasu arachidonowego zwięźzony wytworzeniem tromboksanu A₂ służy wzmocnieniu sygnału wewnątrzkomórkowego prowadzącego do aktywacji GP IIb/IIIa – receptora dla fibrynogeny czyli

białka kluczowego dla oddziaływań między płytkami krwi. Tromboksan A₂ oprócz pobudzania płytek krwi powoduje również skurcz tętnic (1).

1.3. Kwas acetylosalicylowy

Kwas acetylosalicylowy (ang. acetylsalicylic acid – ASA) jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym, przeciwzapalnym i przeciwzakrzepowym.

Rycina 3. Wzór chemiczny kwasu acetylosalicylowego.



Wchłanianie po podaniu doustnym jest szybkie i całkowite, zachodzi w żołądku i jelicie cienkim na drodze biernej dyfuzji. Tabletki powlekane są przystosowane do wchłaniania w jelicie cienkim, aby uniemożliwić bezpośrednio uszkodzające działanie leku na błonę śluzową żołądka.

Kwas acetylosalicylowy charakteryzuje się dużą zdolnością penetracji do tkanek i płynów ustrojowych, w tym także do płynu mózgowo-rdzeniowego, do płynu stawowego, do mleka i przez łożysko. Wiąże się z białkami w 70-90%, w stopniu zależnym od stężenia w surowicy.

Kwas acetylosalicylowy metabolizowany jest na drodze hydrolizy katalizowanej przez esterazy do kwasu salicylowego, w 50-80% w mechanizmie pierwszego przejścia przez wątrobę. Proces dalszej hydroksylacji w wątrobie, nerkach oraz w aktywowanych granulocytach

obojętnochłonnych prowadzi do powstania nieaktywnych metabolitów. Główną drogą eliminacji metabolitów jest wydalanie przez nerki.

Przeciwwkrzepowo (antyagregacyjnie) stosuje się 75-150 mg kwasu acetylosalicylowego na dobę, przeciwgorączkowo i przeciwbólowo do 2 500 mg na dobę a przeciwzapalnie do 5 000 mg na dobę.

1.4. Rola kwasu acetylosalicylowego w leczeniu zawału mózgu i jego wtórnej profilaktyce

Cyklooksygenaza 1 (konstytutywna) jest enzymem, który w warunkach fizjologicznych odpowiada za produkcję prostaglandyn o działaniu ochronnym. Cyklooksygenaza 2 (indukowalna), syntetyzowana pod wpływem reakcji zapalnej, przyczynia się do powstawania nadmiaru prostaglandyn i podtrzymywania procesu zapalnego. W płytkach krwi znajduje się COX-1, nie jest tam obecna COX-2.

Kwas acetylosalicylowy jest substancją, która poprzez nieodwracalną acetylację seryny (w pozycji 529 w COX-1 i 516 w COX-2) hamuje aktywność cyklooksygenazy (COX). Acetylacja seryny tworzy przeszkodę przestrzenną uniemożliwiającą dotarcie kwasu arachidonowego do centrum katalitycznego COX-1. W przypadku COX-2 acetylacja seryny prowadzi do zmiany czynności enzymu, który nie wytwarza PgH₂. ASA ma zdecydowanie większe (3,12 razy większe) powinowactwo do COX-1 niż do COX-2. Ponieważ płytki krwi nie posiadają jądra komórkowego, nie są w stanie zsyntetyzować nowej COX-1. Więc do końca życia danej płytki krwi jej COX-1 pozostaje nieaktywna i płytka nie jest w stanie zsyntetyzować TxA₂ będącego jednym z najważniejszych jej aktywatorów. ASA blokuje działanie COX również w śródbłonku, który wytwarza prostacyklinę (Pgl₂) działającą przeciwstawnie do tromboksanu A₂. Jednakże ze względu na zdolność komórek śródbłonka do stałej produkcji białek (dzięki posiadaniu jądra komórkowego) działanie to jest nieistotne klinicznie.

Z powyższych względów kwas acetylosalicylowy jest jednym z najważniejszych leków w leczeniu ostrej fazy zawału mózgu jak i w zapobieganiu kolejnym zawałom mózgu (wtórna profilaktyka).

Skuteczność działania leku dowiedziono w licznych badaniach. Ich metaanalizy (2) (3) wykazały, iż u osób mających wysokie ryzyko wystąpienia epizodu naczyniowego, stosowanie ASA powoduje zmniejszenie liczby zawałów mózgu niezakończonych zgonem o 25% oraz zmniejszenie liczby zgonów pochodzenia naczyniowego (między innymi w przebiegu zawału mózgu) o 17%. Stosowanie terapii przeciwplatekowej przez 3 tygodnie podczas (ostrej fazy) zawału mózgu zmniejsza liczbę zgonów z powodów naczyniowych o 5 na 1000 przypadków. Natomiast przyjmowanie ASA przez chorych przez 2 lata po zawale mózgu lub przemijającym niedokrwieniu mózgu zmniejszyło występowanie epizodów naczyniowych o 36 na 1000 leczonych. Przedstawione korzyści przeważały nad ryzykiem krwawienia pozaczaszkowego. W innej metaanalizie u chorych ze stabilną chorobą układu sercowo-naczyniowego wyniki były podobne (4).

Tran i Anand w swojej metaanalizie podsumowują, iż stosowanie ASA (w porównaniu do placebo lub do grupy kontrolnej) przez 29 miesięcy umożliwia redukcję o 22% łącznie przypadków zawału mózgu, zawału serca i śmierci z przyczyn naczyniowo-sercowych (5).

1.5. Oporność na aspirynę

Pomimo udowodnionej statystycznie dużej skuteczności ASA, część chorych doznaje kolejnych niedokrwienych epizodów naczyniowych podczas stosowania wtórnej profilaktyki za pomocą ASA. U tych chorych dochodzi do kolejnego zawału mózgu.

Problem ten skłonił do przeprowadzenia badań nad oceną hamowania czynności płytek krwi przez lek. U części chorych w badaniach laboratoryjnych stwierdza się brak (oczekiwanego) zmniejszenia aktywności płytek krwi. Problem ten został nazwany „opornością na aspirynę” („opornością na kwas acetylosalicylowy”, „opornością na ASA”). Zjawisko to

nie jest precyzyjnie zdefiniowane (6). Ostatnio preferuje się używanie terminu „wysoka reaktywność płytek krwi w trakcie leczenia” (high on-treatment platelet reactivity”) zamiast terminu „oporność na aspirynę/ASA”. W niniejszej pracy konsekwentnie stosowano termin „oporność na ASA” ze względu na zatwierdzony tytuł rozprawy doktorskiej.

Częstość występowania oporności na ASA zależy od dawki (7) i użytej metody laboratoryjnej. W badaniach gdzie mierzono stężenie tromboksanu, czyli produktu cyklooksygenazy, którą hamuje lek, u 1,8% chorych stwierdzono brak zahamowania jego wytwarzania (8). Natomiast w badaniach czynnościowych podgrupa z niedostatecznym zahamowaniem czynności płytek krwi jest znacznie większa i wynosi 27-34% (9) (10). Kontynuowane są badania nad testami najlepiej identyfikującymi oporność na aspirynę (11).

W przeszłości, obok laboratoryjnej oporności na ASA rozpoznawanej na podstawie badań laboratoryjnych, występowało pojęcie „klinicznej oporności na ASA” określające sytuację, kiedy podczas leczenia ASA dochodziło do incydentu niedokrwienego. Obecnie zaleca się niestosowanie określenia „kliniczna oporność na ASA” ponieważ w sposób mało precyzyjny i zbyt szeroki wiąże wystąpienie incydentów niedokrwienych z brakiem odpowiedzi na leki przeciwplatekcyjne (12).

W licznych pracach są podnoszone potencjalne przyczyny oporności na ASA (13). Są to:

I. Zmniejszona biodostępność

- nieprzestrzeganie zaleceń przez pacjentów
- zbyt mała dawka leku
- równoległe przyjmowanie określonych niesteroidowych leków przeciwzapalnych blokujących cyklooksygenazę odwracalnie i uniemożliwiających dostęp ASA do COX

II. Wzmoczona czynność płytek krwi

- hipercholesterolemia, przeważnie z towarzyszącą wzmoczoną produkcją trombiny

- stany nadkrzepliwości po zawale serca lub niestabilnej dławicy piersiowej

- biosynteza TxA_2 szlakami, które nie są blokowane przez ASA np. przez COX-2 w monocytach i makrofagach

- zwiększona wrażliwość płytek krwi na ADP i kolagen

- zwiększone uwalnianie płytek krwi ze szpiku kostnego w odpowiedzi na stres np. po pomostowaniu aortalno-wieńcowym, nowopowstałe płytki krwi nie miały kontaktu z ASA

- międzykomórkowy transport metabolitów kwasu arachidonowego między komórkami śródbłonna a zahamowanymi przez ASA płytkami

III. Polimorfizm genetyczny

- polimorfizm płytkowej glikoproteiny IIb/IIIa, nosiciele allele P1A2 są mniej wrażliwi na przeciwzakrzepowe działanie ASA in vivo

- polimorfizm czynnika krzepnięcia XIII Val34Leu

- warianty COX-2 u chorych po pomostowaniu aortalno-wieńcowym

- polimorfizm płytkowych receptorów dla kolagenu

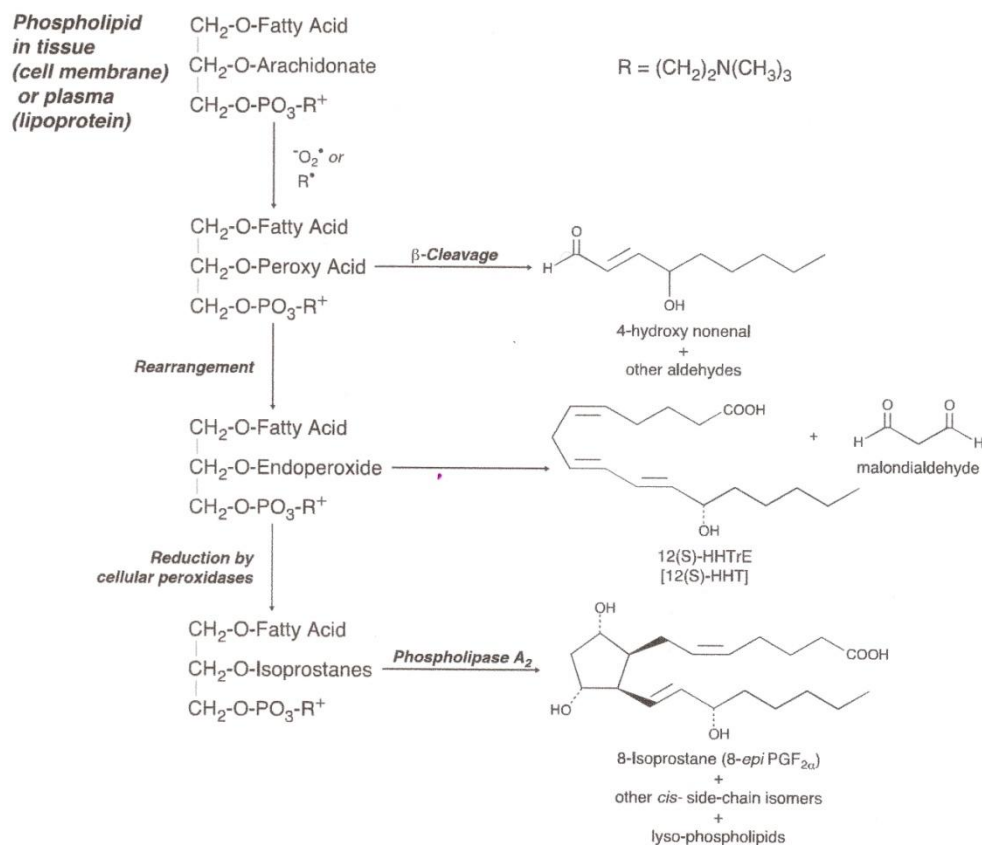
IV. Inne czynniki

- palenie tytoniu

- zwiększone stężenie norepinefryny (noradrenaliny) podczas dużego wysiłku fizycznego lub stresy psychicznego)

- stres oksydacyjny i biosynteza 8-epiprostaglandyny $F_{2\alpha}$ (8-epiPg $F_{2\alpha}$)

Hipotezą tłumaczącą występowanie oporności na ASA, wartą szczególnego zainteresowania, jest powstawanie na drodze nieenzymatycznej 8-epiprostaglandyny $F_{2\alpha}$ jako agonisty płytkowego działającego analogicznie do tromboksanu A_2 . (14). Kwas arachidonowy będący składnikiem fosfolipidów błon komórkowych oraz lipoprotein osocza krwi pod wpływem wolnych rodników ulega peroksydacji. Następnie na skutek rearanżacji powstaje endonadtlenek, który przez komórkową peroksydazę ulega redukcji do izoprostanu. Wówczas fosfolipaza A_2 odłącza z fosfolipidu 8-epiprostaglandynę $F_{2\alpha}$. Powyższe procesy szczegółowo prezentuje rycina 4.

Rycina 4. Powstawanie 8-epiprostaglandyny F_{2α} (8-izoprostanu).

1.6. Metody badania czynności płytek krwi

Istnieje wiele metod służących badaniu czynności płytek krwi. Wykorzystuje się je między innymi do oceny działania leków. Do oceny działania kwasu acetylosalicylowego najczęściej są wykorzystywane: agregometria optyczna (LTA – light transmission aggregometry) (15), Ultegra Rapid Platelet Function Assay – VerifyNow® ASA (Accumetrics, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone Ameryki), oznaczanie stężenia tromboksanu B₂ w surowicy (16), ocena wytwarzania tromboksanu B₂ po indukcji agonistą w osoczu (17), ocena wytwarzania 11-dehydrotromboksanu B₂ w moczu (12) (18) (19). Aktualnie mniejsze znaczenie ma pomiar czasu zamknięcia w analizatorze PFA-100® (Dade Behring, Marburg, Niemcy) (20) (21).

Natomiast do oceny działania antagonistów płytkowego receptora P2Y₁₂ dla ADP – pochodnych tienopirydyny (klopidogrelu, prasugrelu, tiklopidyny) oraz tikagreloru najczęściej wykorzystuje się: agregometrię optyczną, Ultegra Rapid Platelet Function Assay – VerifyNow® P2Y₁₂ (Accumetrics, San Diego,

Kalifornia, Stany Zjednoczone Ameryki), Platelet VASP® (BioCytex, Marsylia, Francja) opartą na cytometrii przepływowej oraz agregometrię impedancyjną, między innymi, z użyciem aparatu Multiplate® ADP test (Verum Diagnostica, Monachium, Niemcy). (22)

Do oceny działania pochodnych tienopirydyny nie może być używany system PFA-100® z dotychczas używanymi kasetkami. W trakcie oceny jest nowa kasetka (Innovance PFA P2Y), która z większą czułością ocenia aktywność płytek krwi zależną od receptorów P2Y₁₂.

Niestety, występuje niezadawalająca korelacja pomiędzy wynikami różnych testów.

1.7. Uzasadnienie podjęcia tematu

Zjawisko oporności na ASA nie jest dostatecznie poznane, a dostępna wiedza nie jest wystarczająca do sformułowania powszechnie obowiązujących zaleceń (12) (23) (24) (25).

Dlatego też zaplanowano badania mające zweryfikować hipotezę o istotnej roli 8-epiprostaglandyny $F_{2\alpha}$ w występowaniu oporności na ASA. Nowe informacje mogłyby w przyszłości pomóc w zapobieganiu występowania oporności na aspirynę, a także zaproponować ewentualną modyfikację leczenia, jeśli oporność wystąpi.

2. CELE

W niniejszej pracy postanowiono zbadać zjawisko oporności na kwas acetylosalicylowy u chorych po niedokrwiennym udarze mózgu. Zaplanowano określenie częstości występowania tego fenomenu we własnym materiale chorych po udarze niedokrwiennym mózgu, a także ocenę przydatności wybranych badań czynności płytek krwi w rozpoznawaniu oporności na kwas acetylosalicylowy. Kolejnym celem było poszukiwanie związku pomiędzy stężeniem powstającego na drodze

nieenzymatycznej proagregacyjnego izoprostanu (8-epi prostaglandyny F_{2α}), a wynikami badań czynności płytek krwi.

3. MATERIAŁ

3.1. Grupa badana

Do badania włączono 44 pacjentów w wieku od 22 do 83 lat (średnio 53,5 lat) będących ponad miesiąc po niedokrwinnym udarze mózgu (minimum – 1 miesiąc, maksimum – 17 lat, mediana – 2 lata i 10 miesięcy). 23 spośród nich stanowiły kobiety, a 21 mężczyźni. Wszyscy oni przyjmowali kwas acetylosalicylowy w dawce od 75 do 150 mg na dobę, przez co najmniej miesiąc przed pobraniem krwi do badań. Szczegółową charakterystykę prezentuje tabela 1.

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej (n=44)

Cecha	Liczba przypadków (odsetek grupy)
Płeć męska	21 (48%)
Wiek	średnia: 53,5 lat minimum: 22 lata maksimum: 83 lata
Czas od zawału mózgu	mediana: 2 lata i 10 miesięcy minimum: 1 miesiąc maksimum: 17 lat
Aktualni palacze tytoniu	15 (34%)
Nadciśnienie tętnicze	22 (50%)
Hiperlipidemia	17 (39%)
Cukrzyca	8 (18%)
Przebyty zawał serca	10 (23%)
Stosowanie statyny	9 (20%)
Zawał mózgu w rodzinie	25 (57%)

Wszyscy chorzy mieli liczbę płytek krwi nie mniejszą niż 100 G/l (100 x 10⁹/l), stężenie hemoglobiny nie mniejsze niż 6,2 mmol/l (10 g/dl), stężenie kreatyniny nie większe niż 220 μmol/l (2,5 mg/dl). Nie przebyli w ciągu ostatniego miesiąca zawału serca.

Hiperlipidemię definiowano jako stężenie cholesterolu LDL ≥3,0 mmol/l (115 mg/dL) lub stężenie cholesterolu całkowitego ≥5,0 mmol/l (190 mg/dl) lub stężenie trójglicerydów ≥1,7 mmol/l (150 mg/dl).

3.2. Grupa kontrolna

Grupa kontrolna dla oznaczania stężenia 11-dehydrotromboksanu B₂ i 8-epiprostaglandyny F_{2α} składała się z 9 osób, które nie przebyły zawału mózgu i w okresie badania nie przyjmowały żadnych leków.

Tabela 2. Charakterystyka grupy kontrolnej (n=9)

Cecha	Liczba przypadków (odsetek grupy)
Płeć męska	4 (44%)
Wiek	średnia: 48 lat minimum: 31 lat maksimum: 60 lat
Aktualni palacze tytoniu	3 (33%)
Nadciśnienie tętnicze	1 (11%)
Hiperlipidemia	0 (0%)
Cukrzyca	0 (0%)
Przebyły zawał serca	0 (0%)
Stosowanie statyny	0 (0%)
Zawał mózgu w rodzinie	0 (0%)

3.3. Zgoda Komisji Bioetycznej

Przed rozpoczęciem badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr 651/04 i 25/07 – kopie w posiadaniu autora), a badani pacjenci wyrazili zgodę na udział w badaniu.

4. METODY

Poniżej zostaną omówione metody wykorzystane w niniejszej pracy. Wszystkie badania zostały przeprowadzone w laboratorium Pracowni Hemostazy Katedry Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego w Poznaniu przy ulicy Szkolnej 8/12.

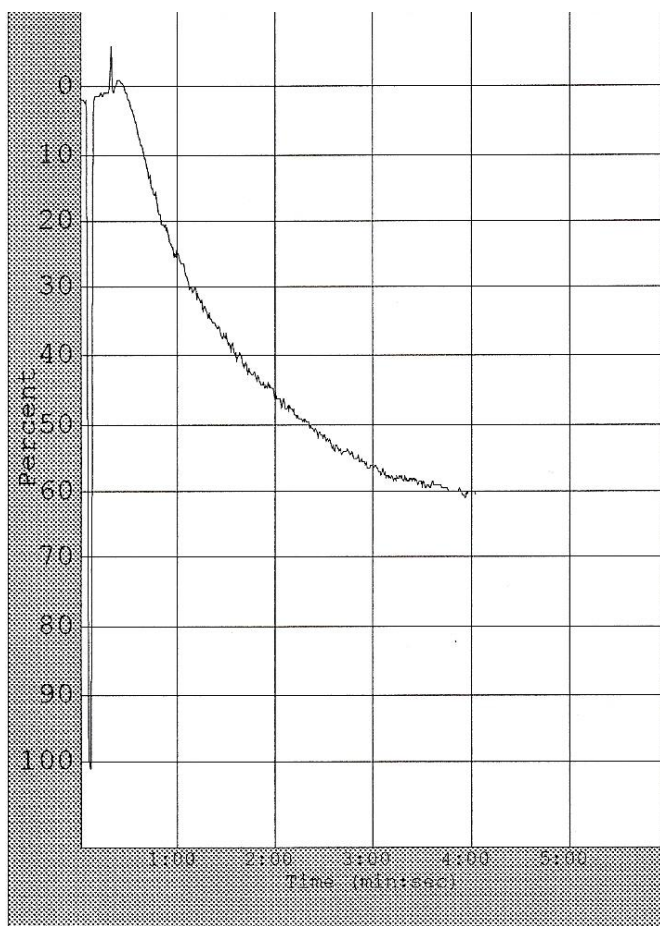
4.1. Agregometria optyczna

Agregację płytek krwi metodą Borna (26) (27) (28) badano z użyciem agregometru optycznego dwukanałowego (model 490-2D firmy Chronolog z oprogramowaniem Agrolink dla systemu Windows). Chorym pobierano krew w godzinach porannych z żyły przedramienia do probówek z dodatkiem 3,2% cytrynianu sodu (stosunek 9:1). Próbkę wirowano z prędkością 800 obrotów/min w temperaturze pokojowej przez 10 min. Odciągano nadsącz czyli osocze bogatopłytkowe (platelet rich plasma – PRP). Następnie pozostałą zawartość probówki wirowano z prędkością 4000 obrotów/min w temperaturze pokojowej przez 10 min. Uzyskany nadsącz stanowił osocze ubogopłytkowe (platelet poor plasma – PPP). W osoczu bogatopłytkowym obliczano liczbę płytek krwi i jeśli była większa niż 250 G/l to korygowano ich ilość do 250 G/l poprzez dodanie osocza ubogopłytkowego. Po dodaniu induktora agregacji, osocze bogatopłytkowe w miarę postępowania agregacji płytek krwi stawało się bardziej przepuszczalne dla światła. Intensywność agregacji płytek krwi wyrażano w procentach, gdzie 0% odpowiadało przepuszczalności światła przez osocze bogatopłytkowe danego pacjenta, a 100% odpowiadało przepuszczalności światła przez osocze ubogopłytkowe danego pacjenta. Rejestrowano maksymalną intensywność agregacji.

Stosowano następujące induktory agregacji:

- adenozynodifosforan (ADP) w stężeniu końcowym 3,5 $\mu\text{mol/l}$,
- adenozynodifosforan (ADP) w stężeniu końcowym 5,0 $\mu\text{mol/l}$,
- kolagen w stężeniu końcowym 2 $\mu\text{g/ml}$,
- kwas arachidonowy w stężeniu końcowym 0,6 mmol/l .

Wykres 1. Wykres agregometrii optycznej indukowanej ADP w stężeniu końcowym 3,5 $\mu\text{mol/l}$



Oporność na ASA stwierdzano w przypadku agregacji płytek pod wpływem:

- ADP (3,5 $\mu\text{mol/l}$ i 5 $\mu\text{mol/l}$) >60%,
- kolagenu >70%,
- kwasu arachidonowego >20%.

4.2. PFA-100®

Badania czynności płytek krwi za pomocą analizatora PFA-100® firmy Dade Behring przeprowadzono w krwi pełnej, według zaleceń producenta. Mierzono czas zamknięcia przez czop płytkowy otworu w błonie pokrytej kolagenem i epinefryną (adrenaliną). Wartości referencyjne według producenta wynoszą 85-165 sekund.

Płytki krwi po kontakcie z ASA powinny mieć zmniejszoną aktywność prozakrzepową co skutkowałoby wydłużeniem czasu potrzebnego do wytworzenia czopu płytkowego zamykającego otwór w błonie i zatrzymującego przepływ w kapilarze. Jeżeli czas zamknięcia nie był przedłużony (wynosił ≤ 165 s), stwierdzano występowanie oporności na ASA (29).

4.3. 11-dehydrotromboksan B₂

W osoczu oznaczono stężenie 11-dehydrotromboksanu B₂ (11-dehydroTxB₂) będącego stabilnym metabolitem aktywnego biologicznie tromboksanu A₂ (TxA₂). Tromboksan A₂ jest szybko nieenzymatycznie hydrolizowany do Tromboksanu B₂ a następnie metabolizowany do 11-dehydrotromboksanu B₂. Zastosowano metodę immunoenzymatyczną (zestaw EIA Kit firmy Cayman Chemicals). Procedurę przeprowadzono zgodnie z instrukcją. Przed wykonaniem testu immunoenzymatycznego dokonano oczyszczenia próbek w kolumnach absorpcyjnych z jednoczesnym ich zagęszczeniem.

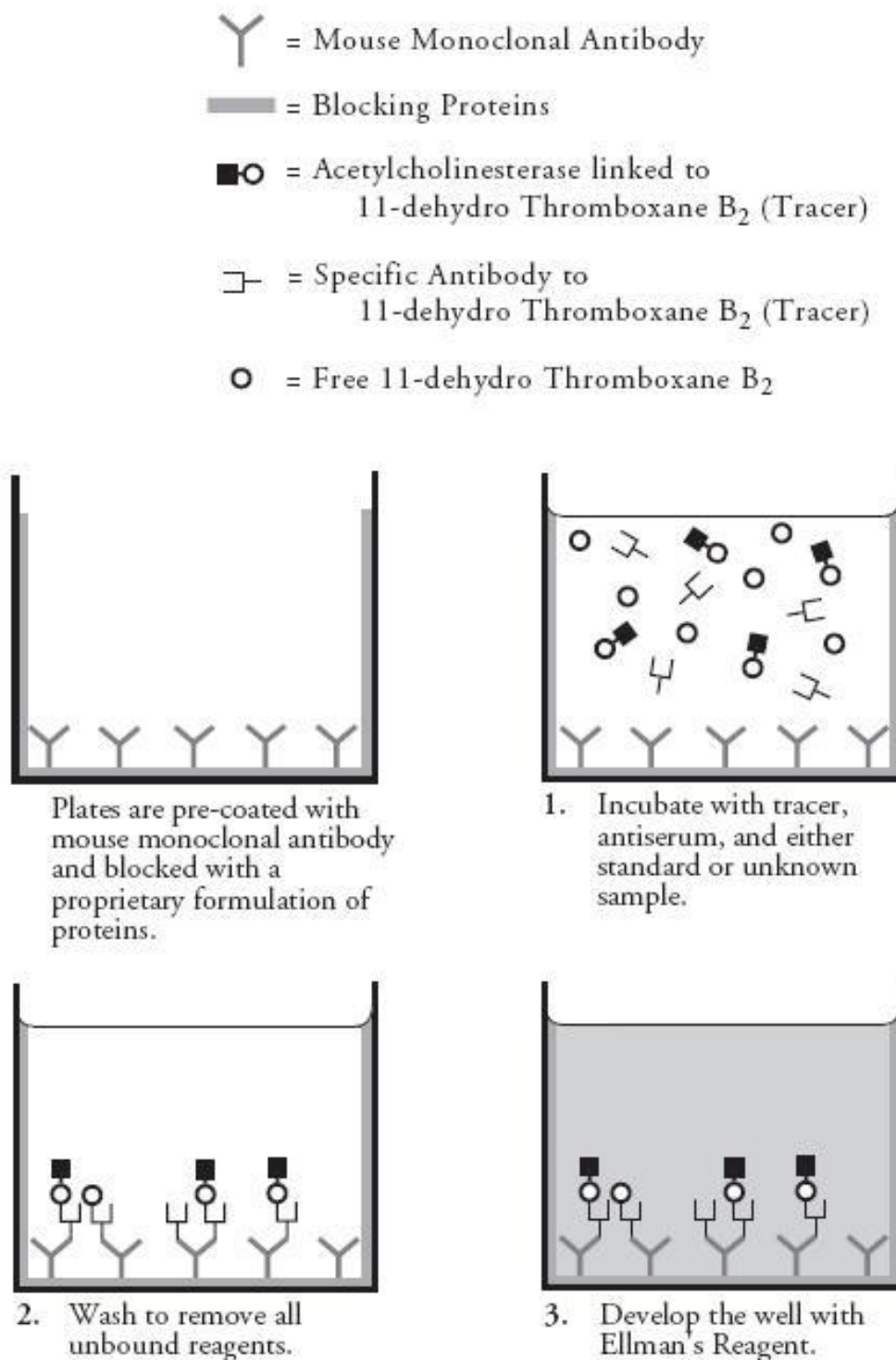
Krew od pacjenta była pobierana do probówki z heparyną i dodatkowo indometacyną w celu zahamowania cyklooksygenazy in vitro. Następnie po odwirowaniu otrzymywano osocze.

Oczyszczanie przeprowadzano następująco. Osocze rozcieńczano buforem A (63 milimolowym dwuwęglanem amonu, pH 8,6) i wlewano do aktywowanych uprzednio kolumn, przemywano kolumny buforem B (0,63 milimolowym dwuwęglanem amonu, pH 8,6), pozbawioną jonów wodą oraz metanolem. 11-dehydrotromboksan B₂ wyłukiwano metanolem z dodatkiem 2% kwasu mrówkowego. Roztwór osuszono strumieniem wysoko oczyszczonego azotu. Tak oczyszczoną suchą substancję 11-dehydrotromboksan B₂ użyto do testu immunoenzymatycznego.

Płytką do testu zawierała dołki pokryte mysimi przeciwciałami przeciwko króliczym przeciwciałom przeciwko 11-dehydroTxB₂. Test ten jest oparty na konkurencji pomiędzy badanym 11-dehydroTxB₂ a 11-dehydroTxB₂ o

określonym stężeniu sprzężonym z acetylocholinoesterazą o ograniczoną liczbę miejsc na swoistych przeciwciałach. W następnym etapie acetylocholinoesteraza unieruchomiona w dołku z substratu wytwarza żółty barwnik absorbujący falę o długości 412 nm. Ponieważ stężenie 11-dehydroTxB₂ sprzężonej z AChE jest stałe a stężenie 11-dehydroTxB₂ badanej zmienne w różnych próbkach więc liczba cząsteczek 11-dehydroTxB₂ sprzężonych z AChE, która może związać się ze swoistymi przeciwciałami jest odwrotnie proporcjonalna do liczby cząsteczek 11-dehydroTxB₂ w badanej próbce. Z czego wynika, że liczba unieruchomionych w dołku cząsteczek 11-dehydroTxB₂ sprzężonych z AChE determinuje intensywność koloru żółtego. Tę intensywność mierzy się w postaci absorbancji mikroczytnikiem ELISA.

Rycina 5. Etapy testu immunoenzymatycznego (11-dehydro Thromboxane B₂ EIA Kit, Cayman Chemical, Catalog No 519501).



Na płytce wykonuje się również oznaczenia określonych stężeń 11-dehydroTx_{B2} w celu przygotowania krzywej wzorcowej, z której odczytuje się stężenia 11-dehydroTx_{B2} w badanych próbkach.

Oporność na ASA stwierdzano jeśli stężenie 11-dehydroTxB₂ wynosiło więcej niż średnia minus odchylenie standardowe stężenia 11-dehydro TxB₂ w grupie kontrolnej.

4.4. 8-epiprostaglandyna F_{2α}

Badano również stężenie 8-epiPgF_{2α} w osoczu (frakcji wolnej – odłączonej przez fosfolipazę A₂ od fosfolipidów). 8-epiPgF_{2α} jest powstającym na drodze nieenzymatycznej izoprostanem. Działa ona proagregacyjnie na płytki krwi (w sposób zbliżony do tromboxanu A₂). Korzystano z zestawu EIA Kit firmy Cayman Chemicals (30). Test przeprowadzono według instrukcji, analogicznie do oznaczania 11-dehydroTxB₂ (włącznie z oczyszczaniem i zagęszczaniem próbek).

4.5. Malonyldialdehyd

Aby obiektywnie ocenić przyjmowanie przez pacjentów ASA, oznaczano wewnątrzpłytkowe stężenie malonyldialdehydu (MDA) metodą Patona w osoczu bogatopłytkowym (31). O hamowaniu przez ASA syntezy prostaglandyn w płytkach krwi świadczy stężeni MDA <10,8 μmol/10⁹ płytek krwi.

4.6. Metody statystyczne

Uzyskane dane opracowano statystycznie za pomocą programów Instat, Microsoft Excel i Statistica 10.

Cechy ilościowe charakteryzowane były przez podanie wartości średniej, mediany, minimum, maksimum i odchylenia standardowego.

Zależność między dwiema cechami ilościowymi oceniano z zastosowaniem współczynnika korelacji liniowej Pearsona lub współczynnika korelacji rang Spearmana.

Do analizy różnic pomiędzy grupami wykorzystano test U Manna-Whitneya.

Wynik testu statystycznego uznawano za znamienny przy poziomie istotności p<0,05.

5. WYNIKI

Wszystkie zaplanowane badania przeprowadzono u 44 pacjentów. Nie brano pod uwagę danych pacjentów, u których nie uzyskano kompletu wyników.

5.1. Agregometria optyczna oraz PFA-100®.

Wyniki agregometrii optycznej oraz PFA-100® przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Wyniki agregometrii optycznej oraz PFA-100®.

Numer pacjenta	Agregometria optyczna (maksymalna intensywność agregacji) [%]				PFA-100® (czas okluzji) [s]
	ADP		Kolagen [2 µg/ml]	Kwas arachidonowy [mmol/l]	
	[3,5 µmol/l]	[5 µmol/l]			
1.	58	79	62	13	300
2.	74	68	74	75	139
3.	50	48	48	8	300
4.	83	68	53	2	175
5.	80	48	101	75	116
6.	72	69	62	18	212
7.	84	63	67	17	300
8.	58	54	37	4	300
9.	71	54	21	12	300
10.	52	52	25	15	300
11.	68	62	75	74	107
12.	60	47	34	16	93
13.	73	73	48	18	85
14.	73	69	68	12	247
15.	48	38	29	4	107
16.	32	32	24	5	300
17.	41	41	16	5	106
18.	69	66	27	5	300
19.	70	59	69	7	129
20.	50	45	53	2	147
21.	80	83	74	2	87
22.	58	62	64	4	93
23.	81	52	60	15	100
24.	51	58	61	2	76
25.	54	68	50	11	75
26.	36	50	25	10	171
27.	54	64	63	4	171
28.	50	79	62	1	80
29.	50	53	29	2	258
30.	77	72	79	3	79
31.	70	75	62	2	280
32.	99	113	51	6	168
33.	62	72	71	0	72

Numer pacjenta	Agregometria optyczna (maksymalna intensywność agregacji) [%]				PFA-100® (czas okluzji) [s]
	ADP		Kolagen [2 µg/ml]	Kwas arachidonowy [mmol/l]	
	[3,5 µmol/l]	[5 µmol/l]			
34.	44	60	71	1	191
35.	65	68	106	0	89
36.	44	46	39	0	300
37.	63	66	66	2	72
38.	26	72	23	0	86
39.	56	58	63	1	93
40.	57	68	68	4	84
41.	25	38	34	3	72
42.	19	25	14	0	140
43.	83	87	100	3	102
44.	35	48	29	2	254
Średnia	59	61	54	11	165
Mediana	58	62	61	4	134

Najniższe wartości agregacji uzyskano po użyciu kwasu arachidonowego (średnia 11%, mediana 4%), a najwyższe z użyciem ADP w stężeniu 5 µmol/l (średnia 61%, mediana 62%). Przeciętne wartości agregacji z obydwoma stężeniami ADP i kolagenem były bardzo zbliżone. W metodzie PFA-100® średnia wyniosła 165 s, a mediana 134 s.

5.2. 11-dehydrotromboksan B₂ i 8-epiprostaglandyna F_{2α}

Otrzymane wyniki oznaczeń stężenia 11-dehydroTx_{B2} i 8-epiPg_{F2α} przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Wyniki oznaczeń stężenia 11-dehydroTx_{B2} i 8-epiPg_{F2α}.

PACJENCI		
Numer pacjenta	Stężenia	
	11-d Tx _{B2} (pg/ml)	8-epi Pg _{F2α} (pg/ml)
1.	1,4	72
2.	0,6	27
3.	0,2	25
4.	1,1	41
5.	3,3	37
6.	2,5	55
7.	0,5	32
8.	1,6	29
9.	0,5	47

PACJENCI					
Numer pacjenta	Stężenia				
	11-d TxB₂ (pg/ml)	8-epi PgF_{2α} (pg/ml)			
10.	2,0	31			
11.	1,9	60			
12.	4,1	149			
13.	4,1	93			
14.	0,4	28			
15.	2,5	155			
16.	3,7	74			
17.	2,6	147			
18.	3,7	129			
19.	1,9	90			
20.	3,1	123			
21.	1,9	69			
22.	2,9	129			
23.	2,7	133			
24.	2,2	80			
25.	2,7	65			
26.	1,4	106			
27.	2,2	58			
28.	1,7	24			
29.	1,2	21			
30.	5,0	32			
31.	0,9	16			
32.	1,1	55			
33.	1,4	27			
34.	0,5	16			
35.	0,9	25			
36.	0,7	74			
37.	6,7	120			
38.	0,5	92			
39.	0,8	62			
40.	1,6	169			
41.	8,7	75			
42.	0,7	72			
43.	0,5	34			
44.	4,4	35			
	2,1	68,9	Średnia	3,0	29,9
	1,8	61	Mediana	3,6	32
	1,7	43,1	Odchylenie standardowe	1,1	15,1
			Średnia minus odchylenie standardowe	1,9	

GRUPA KONTROLNA		
Numer badanego	Stężenia	
	11-d TxB₂ (pg/ml)	8-epi PgF_{2α} (pg/ml)
1.	2,4	40
2.	3,4	34
3.	3,6	32
4.	3,7	31
5.	3,7	54
6.	3,7	32
7.	1,6	8
8.	4,4	33
9.	0,9	5

Średnie stężenie 11-dehydroTxB₂ w grupie pacjentów przyjmujących ASA było niższe niż w grupie kontrolnej i wynosiło ono odpowiednio 2,1 pg/ml (ASA) i 3,0 pg/ml (bez ASA). Mediana wyników pacjentów wynosiła 1,8 pg/ml i była również niższa niż grupy kontrolnej (3,6 pg/ml). Aby wyznaczyć wartość stężenia 11-dehydroTxB₂ powyżej, którego będzie rozpoznawana oporność na ASA, od średniej wyników grupy kontrolnej odjęto wartość odchylenia standardowego i otrzymano wartość 1,9 pg/ml. Przekroczenie powyższej wartości świadczy o tym, iż pacjent pobierający ASA wytwarza 11-dehydroTxB₂ w ilości zbliżonej do osoby nieprzyjmującej ASA. Różnica średnich stężeń 11-dehydroTxB₂ w grupie badanej i grupie kontrolnej była istotna statystycznie (p=0,041).

Zarówno średnie stężenie jak i mediana stężeń 8-epiPgF_{2α} w grupie pacjentów były wyższe niż w grupie kontrolnej zdrowych ochotników. Pacjenci: średnia – 68,9 pg/ml, mediana 61 pg/ml; grupa kontrolna – średnia 29,9 pg/ml, mediana 32 pg/ml. Rozrzut wyników u pacjentów był duży. Różnica średniego stężenia 8-epiPgF_{2α} w grupie badanej i grupie kontrolnej była istotna statystycznie (p=0,027).

Statystyki opisowe wyników badań laboratoryjnych prezentuje tabela 10 „Statystyki opisowe wyników badań laboratoryjnych” znajdująca się w Załączniku.

5.3. Oporność na kwas acetylosalicylowy

Otrzymane wyniki odsetka osób opornych na ASA w poszczególnych badaniach przedstawia tabela 5.

Tabela 5. Częstość oporności na ASA u chorych po zawale mózgu n=44

Agregometria optyczna				PFA-100®	11-dehydro TxB ₂
ADP 3,5 μmol/l	ADP 5,0 μmol/l	Kolagen	Kwas arachidonowy		
20 (45%)	23 (52%)	9 (20%)	3 (7%)	23 (52%)	19 (43%)

Odsetek osób opornych na ASA wynosił od 7% w agregometrii optycznej z kwasem arachidonowym do 52% w agregometrii optycznej z 5,0 μmol/l ADP i PFA-100®. Większość wartości mieściła się pomiędzy 43 a 52%.

5.4. Zależności pomiędzy wynikami badań

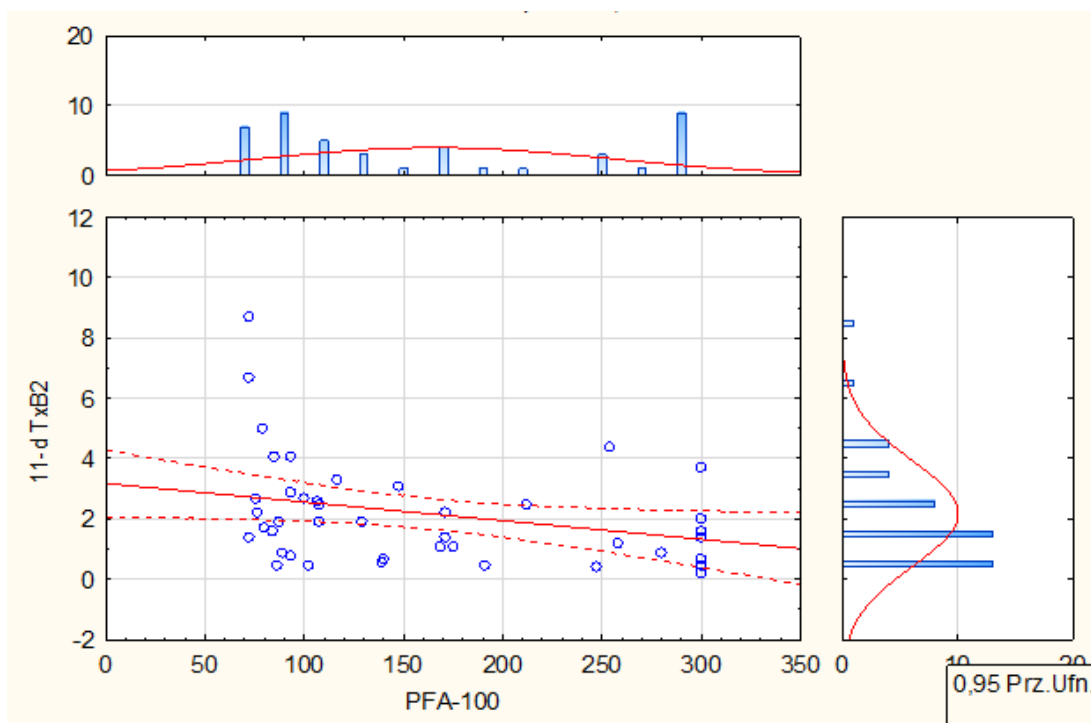
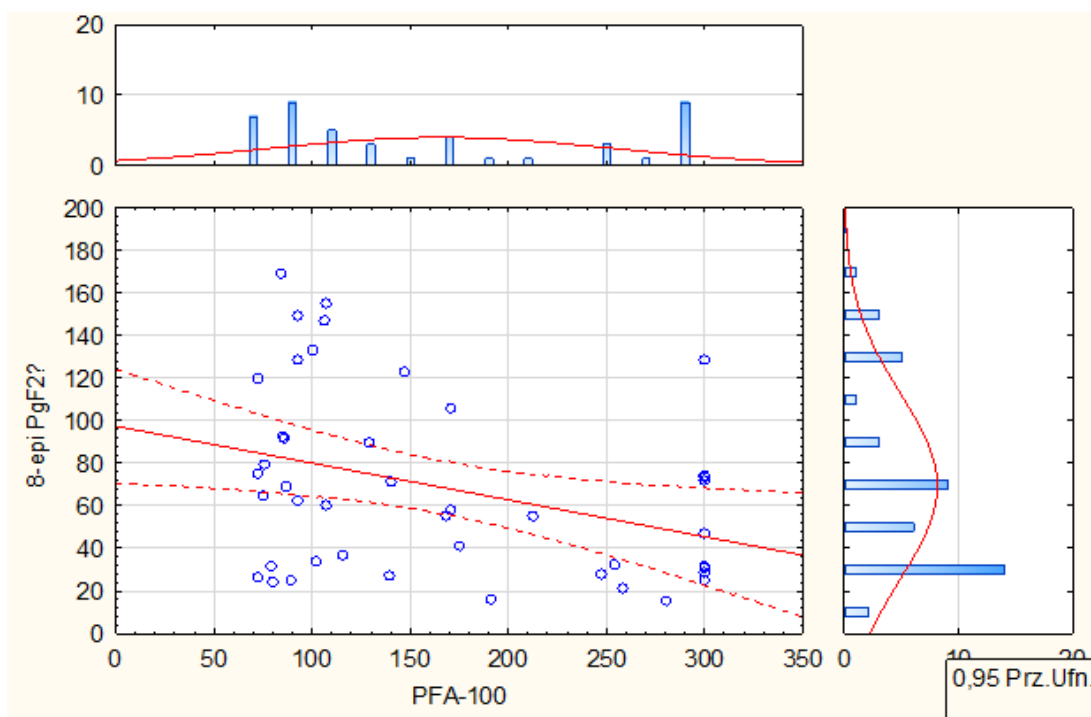
Stwierdzono występowanie statystycznie istotnej ujemnej korelacji (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r=-0,31$; $p=0,039$) pomiędzy stężeniem w osoczu 11-dehydrotromboksanu B₂ a czasem zamknięcia otworu przez czop płytkowy w analizatorze PFA-100®.

Zaobserwowano również statystycznie istotną ujemną korelację pomiędzy czasem zamknięcia w analizatorze PFA-100® a osoczym stężeniem 8-epiPgF_{2α} (współczynnik korelacji liniowej Pearsona $r=-0,36$; $p=0,019$).

Tabela 6. Zależności pomiędzy stężeniem 11-dehydroTxB₂ a czasem w PFA-100® oraz czasem w PFA-100® a stężeniem 8-epiPgF_{2α}

	Stężenie 11-dehydroTxB₂	Stężenie 8-epiPgF_{2α}
Czas w PFA-100®	$r = -0,31$ ($p = 0,039$)	$r = -0,36$ ($p = 0,019$)

Obie stwierdzone zależności są istotne statystycznie. Siła korelacji jest umiarkowana, jednakże ze względu na to, iż dotyczy ona układu wieloczynnikowego jest warta odnotowania.

Wykres 2. Zależność pomiędzy 11-dehydroTx B_2 i PFA-100®Wykres 3. Zależność pomiędzy 8-epiPgF $_{2\alpha}$ i PFA-100®

Ponadto obliczono średnie stężenia 8-epiPgF $_{2\alpha}$ w podgrupach pacjentów określonych jako oporni (czas zamknięcia otworu ≤ 165 s) i jako wrażliwi (czas zamknięcia otworu > 165 s) na ASA w metodzie PFA-100®. Średnia podgrupy chorych opornych na ASA wyniosła 78,2 pg/mL. Natomiast średnia podgrupy

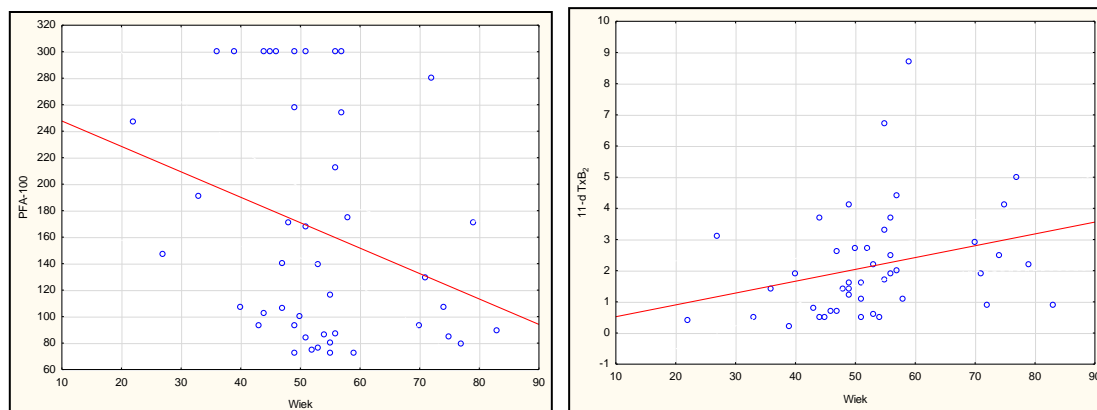
pacjentów wrażliwych na ASA wyniosła 49,7 pg/mL. Różnica powyższych średnich stężeń była istotna statystycznie ($p=0,022$).

Korelacje pomiędzy wynikami pozostałych metod przedstawiały się następująco:

- agregacja (agr.) z ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a agr. z ADP 5,0 $\mu\text{mol/l}$: $r = 0,59$ $p = 0,00003$
- agr. z ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a agr. z kolagenem: $r = 0,58$ $p = 0,00003$
- agr. z ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a agr. z kwasem arachidonowym: $r = 0,42$ $p = 0,004$
- agr. z ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a PFA-100®: $r = -0,15$ $p = 0,92$
- agr. z ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a 11-dehydroTxB₂: $r = -0,09$ $p = 0,56$
- agr. z ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a 8-epiPgF_{2α}: $r = -0,18$ $p = 0,22$
- agr. z ADP 5,0 $\mu\text{mol/l}$ a agr. z kolagenem: $r = 0,53$ $p = 0,0002$
- agr. z ADP 5,0 $\mu\text{mol/l}$ a agr. kwasem arachidonowym: $r = 0,03$ $p = 0,85$
- agr. z ADP 5,0 $\mu\text{mol/l}$ a PFA-100®: $r = -0,24$ $p = 0,12$
- agr. z ADP 5,0 $\mu\text{mol/l}$ a 11-dehydroTxB₂: $r = -0,24$ $p = 0,12$
- agr. z ADP 5,0 $\mu\text{mol/l}$ a 8-epiPgF_{2α}: $r = -0,31$ $p = 0,04$
- agr. z kolagen a agr. z kwasem arachidonowym: $r = 0,02$ $p = 0,87$
- agr. z kolagen a PFA-100®: $r = -0,33$ $p = 0,03$
- agr. z kolagen a 11-dehydroTxB₂: $r = -0,11$ $p = 0,46$
- agr. z kolagen a 8-epiPgF_{2α}: $r = -0,33$ $p = 0,03$
- agr. z kwas arachidonowy a PFA-100®: $r = 0,25$ $p = 0,10$
- agr. z kwas arachidonowy a 11-dehydroTxB₂: $r = 0,18$ $p = 0,24$
- agr. z kwas arachidonowy a 8-epiPgF_{2α}: $r = 0,14$ $p = 0,35$

Tabela 7. Zależności pomiędzy wiekiem badanych, a wynikami badań laboratoryjnych

	N	r	t(N-2)	p
ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a wiek	44	0,170890	1,12403	0,267384
ADP 5,0 $\mu\text{mol/l}$ a wiek	44	0,207536	1,37492	0,176447
Kolagen a wiek	44	0,069392	0,45079	0,654456
Kwas arachidonowy a wiek	44	-0,058730	-0,38127	0,704923
PFA-100® a wiek	44	-0,307187	-2,09195	0,042527
11-dehydroTxB ₂ a wiek	44	0,434827	3,12933	0,003182
8-epiPgF _{2α} a wiek	44	0,044228	0,28691	0,775591
MDA a wiek	44	0,039828	0,25832	0,797422

Wykres 4. Zależności pomiędzy wiekiem badanych a czasami PFA-100® i stężeniami 11-dehydroTxB₂.

Zaobserwowano, iż starszy wiek badanych związany jest z krótszym czasem zamknięcia otworu przez skrzep w analizatorze PFA-100®, a także iż starszy wiek badanych związany jest ze zwiększonym stężeniem 11-dehydroTxB₂.

Tabela 8. Zależności pomiędzy cechami demograficzno-klinicznymi, a wynikami badań laboratoryjnych.

Test U Manna-Whitneya

Płeć	Sum.rang	Sum.rang	U	Z	p	Z	p	N ważn.	N ważn.	2*1str.
ADP 3,5	564,5000	425,5000	194,5000	1,09261	0,274567	1,09338	0,274229	23	21	0,272441
ADP 5,0	583,0000	407,0000	176,0000	1,52730	0,126688	1,52924	0,126206	23	21	0,127590
Kolagen	608,0000	382,0000	151,0000	2,11472	0,034454	2,11636	0,034315	23	21	0,033491
Kwas arachidonowy	501,5000	488,5000	225,5000	-0,36420	0,715707	-0,36601	0,714356	23	21	0,709720
PFA-100®	528,0000	462,0000	231,0000	0,23497	0,814233	0,23605	0,813392	23	21	0,816089
11-dTxB ₂	422,5000	567,5000	146,5000	-2,22046	0,026388	-2,22336	0,026192	23	21	0,024540
8-epiPgF _{2α}	460,0000	530,0000	184,0000	-1,33932	0,180466	-1,33937	0,180451	23	21	0,182329
MDA	453,5000	536,5000	177,5000	-1,49205	0,135686	-1,49242	0,135590	23	21	0,133652
Tytoń										
	Sum.rang	Sum.rang	U	Z	p	Z	p	N ważn.	N ważn.	2*1str.
ADP 3,5	682,5000	307,5000	187,5000	0,730402	0,465145	0,730917	0,464830	29	15	0,462023
ADP 5,0	704,0000	286,0000	166,0000	1,262728	0,206688	1,264333	0,206111	29	15	0,209287
Kolagen	655,0000	335,0000	215,0000	0,049519	0,960506	0,049557	0,960475	29	15	0,960974
Kwas arachidonowy	676,0000	314,0000	194,0000	0,569466	0,569041	0,572296	0,567122	29	15	0,573161
PFA-100®	673,5000	316,5000	196,5000	0,507567	0,611757	0,509908	0,610116	29	15	0,607040
11-dTxB ₂	662,0000	328,0000	208,0000	0,222834	0,823665	0,223125	0,823438	29	15	0,825693
8-epiPgF _{2α}	654,0000	336,0000	216,0000	0,024759	0,980247	0,024760	0,980246	29	15	0,980482
MDA	646,5000	343,5000	211,5000	-0,136177	0,891682	-0,136210	0,891655	29	15	0,883287

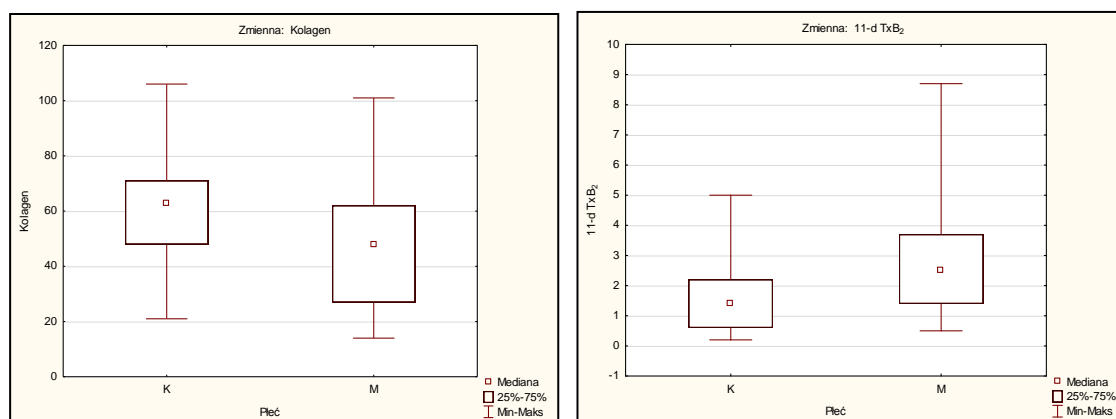
Nadciśnienie										
	Sum.rang	Sum.rang	U	Z	p	Z	p	N ważn.	N ważn.	2*1str.
ADP 3,5	436,5000	553,5000	183,5000	-1,36141	0,173384	-1,36237	0,173081	22	22	0,171390
ADP 5,0	448,0000	542,0000	195,0000	-1,09148	0,275064	-1,09286	0,274454	22	22	0,278110
Kolagen	448,0000	542,0000	195,0000	-1,09148	0,275064	-1,09232	0,274691	22	22	0,278110
Kwas arachidonowy	512,0000	478,0000	225,0000	0,38730	0,698536	0,38922	0,697111	22	22	0,701357
PFA-100®	522,5000	467,5000	214,5000	0,63376	0,526237	0,63668	0,524331	22	22	0,522352
11-dTxB ₂	443,0000	547,0000	190,0000	-1,20884	0,226725	-1,21042	0,226119	22	22	0,229242
8-epiPgF _{2α}	554,5000	435,5000	182,5000	1,38488	0,166089	1,38493	0,166074	22	22	0,164090
MDA	450,5000	539,5000	197,5000	-1,03280	0,301700	-1,03305	0,301581	22	22	0,299471
Hiperlipidemia										
	Sum.rang	Sum.rang	U	Z	p	Z	p	N ważn.	N ważn.	2*1str.
ADP 3,5	501,0000	489,0000	123,0000	-2,55496	0,010620	-2,55676	0,010566	27	17	0,009552
ADP 5,0	489,0000	501,0000	111,0000	-2,84420	0,004453	-2,84781	0,004402	27	17	0,003677
Kolagen	572,0000	418,0000	194,0000	-0,84362	0,398883	-0,84427	0,398517	27	17	0,402920
Kwas arachidonowy	577,5000	412,5000	199,5000	-0,71105	0,477054	-0,71458	0,474867	27	17	0,473721
PFA-100®	664,5000	325,5000	172,5000	1,36184	0,173249	1,36812	0,171275	27	17	0,171281
11-dTxB ₂	598,5000	391,5000	220,5000	-0,20488	0,837667	-0,20515	0,837458	27	17	0,830108
8-epiPgF _{2α}	620,5000	369,5000	216,5000	0,30129	0,763192	0,30130	0,763184	27	17	0,756576
MDA	616,5000	373,5000	220,5000	0,20488	0,837667	0,20493	0,837627	27	17	0,830108
Cukrzyca										
	Sum.rang	Sum.rang	U	Z	p	Z	p	N ważn.	N ważn.	2*1str.
ADP 3,5	829,5000	160,5000	124,5000	0,57815	0,563162	0,57856	0,562887	36	8	0,559932
ADP 5,0	765,5000	224,5000	99,5000	-1,33888	0,180612	-1,34058	0,180058	36	8	0,179216
Kolagen	811,0000	179,0000	143,0000	0,01521	0,987861	0,01523	0,987852	36	8	0,988100
Kwas arachidonowy	814,5000	175,5000	139,5000	0,12172	0,903124	0,12232	0,902645	36	8	0,893208
PFA-100®	824,0000	166,0000	130,0000	0,41079	0,681225	0,41269	0,679836	36	8	0,686866
11-dTxB ₂	793,5000	196,5000	127,5000	-0,48686	0,626355	-0,48750	0,625904	36	8	0,622048
8-epiPgF _{2α}	830,5000	159,5000	123,5000	0,60858	0,542803	0,60860	0,542789	36	8	0,539889
MDA	773,5000	216,5000	107,5000	-1,09545	0,273323	-1,09572	0,273204	36	8	0,272494
Zawał serca										
	Sum.rang	Sum.rang	U	Z	p	Z	p	N ważn.	N ważn.	2*1str.
ADP 3,5	731,5000	258,5000	136,5000	-0,92418	0,355391	-0,92484	0,355051	34	10	0,353786
ADP 5,0	726,5000	263,5000	131,5000	-1,06421	0,287233	-1,06557	0,286621	34	10	0,285848
Kolagen	714,5000	275,5000	119,5000	-1,40028	0,161430	-1,40137	0,161105	34	10	0,159629
Kwas arachidonowy	771,0000	219,0000	164,0000	0,15403	0,877586	0,15480	0,876982	34	10	0,879535
PFA-100®	802,0000	188,0000	133,0000	1,02220	0,306685	1,02692	0,304459	34	10	0,311923
11-dTxB ₂	761,0000	229,0000	166,0000	-0,09802	0,921917	-0,09815	0,921815	34	10	0,923172
8-epiPgF _{2α}	738,5000	251,5000	143,5000	-0,72815	0,466525	-0,72817	0,466509	34	10	0,464022

MDA	775,0000	215,0000	160,0000	0,26605	0,790198	0,26612	0,790148	34	10	0,793440
Zawał mózgu										
	Sum.rang	Sum.rang	U	Z	p	Z	p	N ważn.	N ważn.	2*1str.
ADP 3,5	781,0000	209,0000	151,0000	-0,17457	0,861414	-0,17470	0,861317	35	9	0,863824
ADP 5,0	743,0000	247,0000	113,0000	-1,28021	0,200472	-1,28184	0,199900	35	9	0,204261
Kolagen	795,5000	194,5000	149,5000	0,21822	0,827259	0,21839	0,827128	35	9	0,819096
Kwas arachidonowy	816,0000	174,0000	129,0000	0,81468	0,415256	0,81873	0,412942	35	9	0,421825
PFA-100®	797,0000	193,0000	148,0000	0,26186	0,793428	0,26307	0,792497	35	9	0,796934
11-dTxB ₂	808,5000	181,5000	136,5000	0,59646	0,550867	0,59724	0,550347	35	9	0,547544
8-epiPgF _{2α}	775,5000	214,5000	145,5000	-0,33460	0,737926	-0,33461	0,737918	35	9	0,731453
MDA	778,5000	211,5000	148,5000	-0,24731	0,804666	-0,24737	0,804618	35	9	0,796934

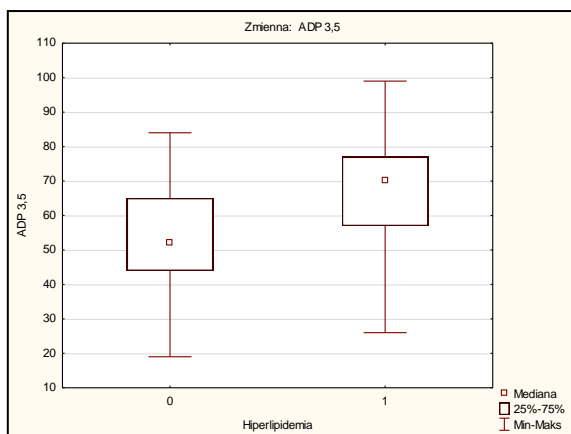
Sum.rang – suma rang; U – wartość testu U Manna-Whitneya; Z – wartość testu U Manna-Whitneya przeliczona na rozkład normalny; p – poziom istotności; N ważn. – liczba danych; 2*1str. – poziom istotności dla testu dwustronnego

W badaniu agregometrycznym z użyciem kolagenu zaobserwowano istotnie statystycznie mniejsze wartości wyników u mężczyzn niż u kobiet. Podobnie, stężenia 11-dehydroTxB₂ u mężczyzn były niższe niż u kobiet.

Wykres 5. Wykresy zależności płci i wyników agregometrii z kolagenem oraz 11-dehydroTxB₂



Ponadto zauważono, że u badanych, którzy mieli stwierdzoną hiperlipidemię wyniki agregometrii z użyciem ADP w stężeniach końcowych 3,5 μmol/l oraz 5,0 μmol/l były istotnie statystycznie wyższe (odpowiednio p=0,010 i p=0,004).

Wykres 6. Wykres zależności hiperlipidemii i agregometrii z ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ 

Nie stwierdzono zależności pomiędzy pozostałymi cechami demograficzno-klinicznymi grupy badanej (palenie tytoniu, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, przebyty zawał serca, stosowanie statyny, zawał mózgu w rodzinie) a wynikami badań laboratoryjnych.

W obrębie badań agregometrycznych najsilniejszą dodatnią korelację obserwowano pomiędzy badaniami z użyciem ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a ADP 5 $\mu\text{mol/l}$ ($r=0,59$; $p=0,000026$), ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a kolagenu ($r=0,58$; $p=0,000034$) i ADP 5 $\mu\text{mol/l}$ a kolagenu ($r=0,53$; $p=0,000228$).

5.5. Malonyldialdehyd

W celu potwierdzenia przyjmowanie ASA przez pacjentów, oznaczano wewnątrzpłytkowe stężenie malonyldialdehydu (MDA) metodą Patona w osoczu bogato płytkowym (31). Wszyscy badani pacjenci mieli stężenie MDA mniejsze niż $10,8 \mu\text{mol}/10^9$ płytek krwi co świadczy o hamowaniu przez ASA syntezy prostaglandyn w płytkach krwi oraz o przyjmowaniu ASA. Średnie stężenie MDA wynosiło $5,384 \mu\text{mol}/10^9$ płytek krwi.

Tabela 9. Wyniki oznaczania stężenia malonyldialdehydu [$\mu\text{mol}/10^9$ płytek krwi].

Numer pacjenta	Stężenie MDA
1.	6,471
2.	3,266
3.	4,544
4.	5,112
5.	8,733

Numer pacjenta	Stężenie MDA
6.	5,538
7.	5,538
8.	3,266
9.	4,047
10.	2,556
11.	6,461
12.	4,118
13.	4,473
14.	3,763
15.	5,538
16.	3,971
17.	5,238
18.	5,041
19.	5,609
20.	6,248
21.	8,094
22.	8,804
23.	5,740
24.	7,242
25.	6,248
26.	4,189
27.	5,396
28.	6,121
29.	5,041
30.	4,893
31.	5,625
32.	3,884
33.	6,861
34.	5,855
35.	3,065
36.	4,679
37.	6,922
38.	5,681
39.	4,927
40.	3,757
41.	7,689
42.	5,334
43.	6,021
44.	5,311

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Niniejsza praca jest kolejnym elementem szerokich badań w kierunku poznania ważnego medycznie i społecznie zjawiska jakim jest oporność na kwas acetylosalicylowy. Analogiczne zjawisko dotyczy innego leku przeciwplatekowego – kłopidogrelu, który jest nieodwracalnym antagonistą platekowego receptora P2Y₁₂ dla ADP.

W ostatnim czasie preferuje się nie używanie terminu „oporność” ponieważ zwrot ten powinien dotyczyć sytuacji kiedy lek nie jest w stanie fizycznie dotrzeć do swojego celu. W przypadku ASA byłby to aminokwas seryna cyklooksygenazy (w pozycji 529 w COX-1, a w pozycji 516 w COX-2), którą ASA acetyluje. Termin „oporność” byłby właściwy gdyby ASA nie była biodostępna, była inaktywowana przed osiągnięciem celu, wchodziłaby w interakcję z innymi lekami skutkującą zniesieniem swojej aktywności lub zmianie ulegałby enzym cyklooksygenaza. Wobec powyższego aktualnie najpowszechniej używanym terminem jest „wysoka reaktywność płytek krwi w trakcie leczenia” (high on-treatment platelet reactivity) (32). W niniejszej pracy doktorskiej konsekwentnie posługiwano się pojęciem „oporność” (na kwas acetylosalicylowy/ASA/aspirynę) ponieważ taki termin występował w tytule przewodu doktorskiego zaakceptowanym przez Radę Wydziału. W obrębie tego zjawiska można wyodrębnić 2 podgrupy. Pierwsza to chorzy, u których płytki krwi wyjściowo są przeciętnie reaktywne i efekt działania leku jest mniejszy od spodziewanego. Druga grupa to pacjenci u których wyjściowo płytki krwi są bardziej reaktywne niż przeciętnie i w efekcie standardowa dawka leku nie jest wystarczająca do właściwego obniżenia ich reaktywności.

Niezależnie od zmiany nazwy zjawiska, nadal nie wypracowano kryteriów rozpoznawania go. Wartości referencyjne dla poszczególnych testów powinny zostać wyznaczone kierując się ryzykiem wystąpienia w przyszłości epizodów mózgowo- i sercowo-naczyniowych. W taki sposób, aby móc odróżnić chorych ze zwiększonym ryzykiem od chorych z przeciętnym ryzykiem epizodu naczyniowego. Do wyznaczenia wartości referencyjnych

potrzebne jest przeprowadzenie badań prospektywnych z udziałem dużej grupy pacjentów.

Dotychczas nie potwierdzono ponad wszelką wątpliwość, aby pojedyncze badanie lub zestaw badań laboratoryjnych identyfikował oporność na działanie ASA sprzyjającą nawrotowi zawału mózgu. Aczkolwiek w niektórych badaniach uzyskano zachęcające wyniki. Aradi i współpracownicy w metaanalizie obejmującej ponad 4000 pacjentów wykazali, że dostosowywanie terapii przeciwplatekowej (kierując się wynikami badań reaktywności płytek krwi) w porównaniu do standardowej terapii kłopidogrelem umożliwiło zmniejszenie liczby incydentów zakrzepowych. Osiągnięto również istotne obniżenie śmiertelności sercowo-naczyniowej, bez zwiększenia liczby istotnych krwawień (33). Dlatego istnieje konieczność prowadzenia dalszych badań.

W niniejszej pracy wykorzystano 3 metody oceny oporności na ASA: agregometrię optyczną płytek krwi (z użyciem 3 induktorów agregacji, jednego z nich w 2 stężeniach), PFA-100® i immunoenzymatyczne oznaczenie stężenia metabolitu tromboksanu A₂. Przedstawione wyniki badań wskazują na częste występowanie zjawiska oporności na ASA (u prawie połowy chorych), jednakże występują duże różnice pomiędzy poszczególnymi testami. Dwie trzecie metod (agregometria optyczna z ADP w stężeniach 3,5 μmol/l i 5,0 μmol/l oraz PFA-100® i immunoenzymatyczne oznaczenie stężenia 11-dehydroTxB₂) wykazało istnienie oporności na ASA u 43-52% badanych osób. Wśród nich była też metoda referencyjna - immunoenzymatyczne oznaczenie stężenia 11-dehydroTxB₂. Pozostałe dwie metody (agregometria optyczna z kolagenem i kwasem arachidonowym) wykazywały mniejszy odsetek osób opornych na ASA, odpowiednio 20% i 7%.

W przypadku każdej z metod ważne jest przy jakiej wartości jest ustalona granica odcięcia wyników prawidłowych od wyników wskazujących na oporność na działanie leku. A w przypadku agregometrii również istotne jest jakiego induktora użyjemy i w jakim stężeniu końcowym. W literaturze spotyka się różne wartości.

We wcześniejszych publikacjach spotyka się równie szeroki rozrzut częstości występowania oporności na ASA. Lordkipanidze i współbadacze porównali sześć metod u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową przyjmujących co najmniej 80 mg ASA dziennie i uzyskali następujące spektrum wyników: agregometria optyczna (LTA – light transmission agregometry) z 1,6 mmol/l kwasem arachidonowym – 4%, agregometria optyczna z 5, 10, 20 μmol/l ADP – 10-52%, agregometria krwi pełnej – 18%, PFA-100® – 60%, VerifyNow Aspirin – 7%, stężenie w moczu 11-dehydro Tx B₂ – 23% (34).

W niniejszej pracy najsilniejsza korelacja wyników badań w kierunku oporności na ASA wystąpiła pomiędzy stężeniem 11-dehydroTx_{B2} a PFA-100®. Związek powyższych dwóch zestawów danych był istotny statystycznie ($p < 0,05$) ponieważ wartość p była równa 0,039. Współczynnik korelacji liniowej Pearsona uzyskał wartość -0,31. Świadczy on o tym, iż podwyższonym stężeniom 11-dehydroTx_{B2} (świadczącym o oporności na ASA) odpowiadały u tych samych chorych nieprzedłużone wartości czasu zamknięcia w badaniu analizatorem PFA-100® (również świadczące o oporności na ASA). Traktując pomiar stężenia metabolitu tromboksanu A₂ jako badanie referencyjne, wówczas należy uznać PFA-100® za najbardziej zbliżone do ideału badanie czynności płytek krwi.

PFA-100® jest badaniem w dużej mierze zautomatyzowanym i możliwym do wykonania dla pojedynczego pacjenta. Jest to jego atutem, gdyż niestety oznaczanie stężenia 11-dehydroTx_{B2} wymaga tworzenia krzywej wzorcowej oraz dodatniej i ujemnej kontroli co podwyższa koszty i powoduje, że jest ono nieoptyczne przy niewielkiej liczbie próbek. A oczekiwanie na większą liczbę próbek w celu wykonania serii oznaczeń opóźnia otrzymanie wyniku i co za tym idzie zmniejsza wartość praktyczną testu. W publikacjach naukowych spotkać można sprzeczne opinie na temat użyteczności systemu PFA-100® (15) (35). Z dużą czułością wykrywa chorobę von Willebranda i ciężkie patologie płytek takie jak trombostenia Glanzmanna i zespół Bernard-Soulier (20). Natomiast w ostatnim czasie przeważają krytyczne poglądy na temat stosowania systemu PFA-100® do oceny efektu leków przeciwplatek (32). Czułość wykrywania patologii małego i średniego stopnia, a także zmian

aktywności po zastosowaniu leków przeciwplatek jest mała. Czas zamknięcia otworu testowego w PFA-100® jest przedłużony u części, ale nie u wszystkich pacjentów przyjmujących ASA. Natomiast u chorych przyjmujących kłopidogrel, czas zamknięcia otworu testowego przeważnie jest niewydłużony (36) (37) (38) (39). Mała czułość w wykrywaniu powyższych zmian aktywności płytek wynika ze zmiennej liczby płytek w jednostce objętości, zmiennej liczby czerwonych krwinek w jednostce objętości i przede wszystkim osoczowego stężenia czynnika von Willebranda na wynik w tej metodzie.

Spośród korelacji pomiędzy pozostałymi badaniami istotne statystycznie ($p < 0,05$) i wykazujące pożądany kierunek były związki pomiędzy agregacją (agr.) z ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a agr. z ADP 5,0 $\mu\text{mol/l}$, agr. z ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a agr. z kolagenem, agr. z ADP 3,5 $\mu\text{mol/l}$ a agr. z kwasem arachidonowym, agr. z ADP 5,0 $\mu\text{mol/l}$ a agr. z kolagenem oraz agr. z kolagenem a czasem zamknięcia w analizatorze PFA-100®. Natomiast Lordkipanidze i współbadacze stwierdzili słabą korelację pomiędzy następującymi testami: agregometria optyczna (LTA – light transmission agregometry) z 1,6 mmol/l kwasem arachidonowym, agregometria optyczna z 5, 10, 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP, agregometria krwi pełnej, PFA-100®, VerifyNow Aspirin, stężenie w moczu 11-dehydroTxB₂ (34). Również Frelinger z współbadaczami stwierdzili brak korelacji pomiędzy stężeniem TxB₂ w surowicy a wynikami testów czynności płytek krwi służącymi ocenie w kierunku oporności na ASA (40).

Kulickowski i współpracownicy (12) wymieniają agregację optyczną wywołaną kwasem arachidonowym (stężenie 0,5 mg/ml, wartość nieprawidłowa >10-20%) oraz stężenie tromboksanu B₂ w surowicy za najlepsze spośród specyficznych metod oceny działania ASA. W niniejszej pracy posługiwano się agregacją z kwasem arachidonowym w stężeniu końcowym 0,6 mmol/l czyli 0,18 mg/ml (masa molowa kwasu arachidonowego wynosi 304,47 g/mol). Natomiast pomiar produktu szlaku cyklooksygenazy w niniejszej pracy przeprowadzono w osoczu (nie w surowicy), co Kulickowski i współpracownicy uważają za trudne do wykonania z powodów laboratoryjnych. Oznaczanie tromboksanu w osoczu

jest trudne ponieważ występuje on tam w bardzo niskim stężeniu, inaczej niż w surowicy gdzie stężenie jest znacznie większe z powodu wcześniej przebiegającego procesu krzepnięcia (z wytwarzaniem tromboksanu na szlaku przemian kwasu arachidonowego). W związku z powyższym przed pomiarem stężenia należy wykonać zagęszczanie próbek wraz oczyszczaniem osocza. Opisane w instrukcji testu oczyszczanie i zagęszczanie osocza zostało przeprowadzone przed wykonaniem badań opisanych w niniejszej pracy. Natomiast Sadilkowa i współpracownicy stwierdzili w swojej pracy, że oczyszczanie nie jest niezbędnym etapem przed pomiarem stężenia 11-dehydroTxB₂ (41). Pomiar stężenia metabolitu TxB₂ w osoczu jest wartościowy ponieważ pokazuje nam stan płytek krwi w okresie „spoczynku” czyli przed rozpoczęciem krzepnięcia. Z powodu powyższych trudności laboratoryjnych istnieje niewiele prac dotyczących pomiaru stężenie 11-dehydroTxB₂ w osoczu. Takasaki i współpracownicy opisali metodę immunoenzymatycznego oznaczania stężenia 11-dehydroTxB₂ i oznaczyli je u 6 zdrowych ochotników. Otrzymali wyniki zbliżone do autora niniejszej pracy: $4,0 \pm 0,3$ pg/ml (42). Niccoli i współbadacze stwierdzili, iż wyższe stężenie tromboksanu B₂ w osoczu pozytywnie korelowało z bardziej rozległą miażdżycą w układzie krążenia (43) (44).

W literaturze spotyka się publikacje dotyczące stężenia TxB₂ w surowicy (w przeciwieństwie do stężenia mierzonego w osoczu, w niniejszej pracy) (15) (45). Pulcinelli i współpracownicy badali stężenie TxB₂ w osoczu po stymulacji kolagenem i stwierdzili, iż u niektórych pacjentów leczonych przewlekle kwasem acetylosalicylowym wytwarzanie TxA₂ (metabolizowanego następnie do TxB₂) w płytkach krwi utrzymuje się i odpowiada za zwiększoną agregację płytek (26). McAdam i współpracownicy oznaczali stężenie TxB₂ jako metabolitu TxA₂ w surowicy. Opisali oni, że COX-2 ma udział w zwiększonym wytwarzaniu TxA₂ u palaczy, prawdopodobnie z komórek zapalnych (46). Larsen i współpracownicy stwierdzili, że stężenie tromboksanu B₂ w surowicy było istotnie statystycznie wyższe u chorych po zawale serca w stosunku do chorych, którzy dotychczas nie przebyli zawału serca (47).

Natomiast Gengo i współbadacze poszukiwali zależności pomiędzy wynikiem badania laboratoryjnego w kierunku oporności a nawrotami zawału mózgu. Posługiwali się agregometrią z użyciem kolagenu i kwasu arachidonowego jako induktorów. Występowanie oporności na ASA w badaniach agregometrii optycznej było statystycznie wyższe wśród pacjentów z nawrotem zawału mózgu w stosunku do pacjentów, którzy nie doznali ponownego zawału mózgu w okresie obserwacji (48). W metaanalizie autorstwa J. Snoep i współpracowników zaobserwowano, że pacjenci, u których w badaniach biochemicznych stwierdzono oporność na ASA mają zwiększone ryzyko nawrotu incydentu sercowo-naczyniowego w porównaniu do pacjentów, u których w badaniach biochemicznych stwierdzono wrażliwość na ASA (49). Gum i współpracownicy zaobserwowali u pacjentów ze stwierdzoną w agregometrii optycznej z użyciem ADP i kwasu arachidonowego opornością na ASA trzykrotnie zwiększone ryzyko wystąpienia śmierci, zawału serca lub incydentu naczyniowo-mózgowego (50).

W obecnej pracy zaobserwowano, iż starszy wiek badanych związany jest z krótszym czasem zamknięcia otworu przez skrzep w analizatorze PFA-100®. Natomiast inni autorzy nie odnotowali takiego związku w swoich badaniach (51). Zauważono również związek wieku i stężenia 11-dehydroTxB₂. Pomędzy nimi występowała dodatnia korelacja co oznacza, że chorzy w starszym wieku mieli wyższe stężenie 11-dehydroTxB₂.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły ponadto stwierdzić, że u badanych, którzy mieli rozpoznaną hiperlipidemię wyniki agregometrii z użyciem ADP w stężeniach końcowych 3,5 μmol/l oraz 5,0 μmol/l były istotnie statystycznie wyższe. Jest to spójne ze spostrzeżeniami innych autorów (52) (53).

Minuz i współpracownicy wykazali, iż 8-epiPgF_{2α} zwiększa reaktywność płytek krwi (54). Dochodzi do tego pod wpływem stężenia 8-epiPgF_{2α} występującego w osoczu krwi. Aktywacja płytek krwi przez 8-epiPgF_{2α} jest uniemożliwiana w obecności antagonisty receptora dla tromboksanu natomiast nie jest zakłócana przez obecność ASA. Powyższe fakty

potwierdzają działanie 8-epiPgf_{2α} poprzez receptor dla tromboksanu oraz niezależność powstawania 8-epiPgf_{2α} od cyklooksygenazy. Inni badacze, Morrow i współpracownicy stwierdzili, że 8-epiPgf_{2α} w stężeniach od 1 nmol/l do 1 μmol/l indukuje proporcjonalną do stężenia zmianę kształtu płytek krwi (55). 8-epiPgf_{2α} powoduje agregację płytek krwi w obecności podprogowych stężeń agonistów płytek krwi (kolagen, ADP, kwas arachidonowy, analogi P_gH₂/TxA₂) (56).

W niniejszej pracy zaobserwowano zależność pomiędzy czasem zamknięcia otworu testowego w analizatorze PFA-100®, a stężeniem 8-epiPgf_{2α} w badaniu metodą immunoenzymatyczną w osoczu. Była ona istotna statystycznie (wartość p wynosiła 0,019). Współczynnik korelacji liniowej Pearsona uzyskał wartość -0,36. Świadczy on o tym, że skróconym wartościom czasu zamknięcia w analizatorze PFA-100® u poszczególnych chorych odpowiadały podwyższone stężenia 8-epiPgf_{2α} w osoczu. Ponadto obliczono średnie stężenia 8-epiPgf_{2α} w podgrupach pacjentów określonych jako oporni (czas zamknięcia otworu ≤165 s) i jako wrażliwi (czas zamknięcia otworu >165 s) na ASA w metodzie PFA-100®. Różnica powyższych średnich stężeń była istotna statystycznie (p=0,022). Informacje te mogą wskazywać na istotną rolę proagregacyjnych prostanoidów powstających drogą nienzymatyczną w oporności na ASA. W sytuacji zahamowania wytwarzania TxA₂ pod wpływem leczenia ASA, podwyższone stężenie aktywującego płytki krwi izoprostanu może odpowiadać za nadmierną aktywność płytek stwierdzaną w badaniach czynności płytek krwi.

W niniejszym badaniu średnia wartość stężenia 8-epiPgf_{2α} u osób chorych była znacznie wyższa niż u osób zdrowych. Może być to spowodowane faktem, iż badanie osoby chorej mają podwyższony poziom „stresu oksydacyjnego”, który jest przyczyną lub skutkiem zawału mózgu. Do zbliżonych wniosków doszli Ames i współbadacze (57). Mierząc stężenie 8-epiPgf_{2α} w moczu ustalili, że u pacjentów z cukrzycą jest ono istotnie wyższe niż u pacjentów nie chorujących na cukrzycę. Może to sugerować, że stres oksydacyjny może podtrzymywać aktywność płytek krwi, niezależnie od zablokowanego szlaku cyklooksygenazy 1.

Przedstawione wyniki, potwierdzające rolę produktów powstających na skutek stresu oksydacyjnego wskazują na przydatność stosowania leków antyoksydacyjnych. Do podobnych wniosków dochodzą Cipollone i współbadacze. Zauważyli oni, iż u pacjentów z niestabilną dławicą piersiową stężenie 8-epiPgF_{2α} odwrotnie koreluje ze osoczym stężeniem witaminy E. (14).

Przedstawiona powyżej interpretacja upoważnia do przedstawienia następujących wniosków.

7. WNIOSKI

- 7.1. Oporność na kwas acetylosalicylowy występuje u 7-52% chorych po udarze niedokrwiennym mózgu w zależności od rodzaju zastosowanej metody badawczej. Najsilniejsza korelacja istnieje pomiędzy oznaczonym immunoenzymatycznie stężeniem 11-dehydrotromboksanu B₂ w osoczu a czasem zamknięcia w analizatorze PFA-100®.
- 7.2. U pacjentów po udarze niedokrwiennym mózgu leczonych kwasem acetylosalicylowym przemiana kwasu arachidonowego zachodząca z udziałem cyklooksygenazy ulega obniżeniu. Zależność stężenia 11-dehydrotromboksanu B₂ w osoczu i czasu zamknięcia w analizatorze PFA-100® od wieku badanych może ponadto świadczyć o tendencji do zwiększonej aktywacji płytek krwi u osób starszych w tej grupie chorych.
- 7.3. U pacjentów po udarze niedokrwiennym mózgu stosujących w prewencji wtórnej kwas acetylosalicylowy hiperlipidemia powoduje zwiększenie agregacji płytek krwi pod wpływem ADP.
- 7.4. Nieenzymatyczne tworzenie izoprostanów (8-epiprostaglandyny F_{2α}) w wyniku działania wolnych rodników jest zwiększone u pacjentów po udarze niedokrwiennym mózgu. Proces ten może przyczyniać się do oporności na kwas acetylosalicylowy (obserwowanej w badaniach analizatorem PFA-100®), co mogłoby stanowić podstawę nowych implikacji terapeutycznych.

8. SPIS TABEL

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej (n=44).

Tabela 2. Charakterystyka grupy kontrolnej (n=9)

Tabela 3. Wyniki agregometrii optycznej oraz PFA-100®.

Tabela 4. Wyniki oznaczeń stężenia 11-dehydroTx B_2 i 8-epiPgF $_{2\alpha}$.

Tabela 5. Częstość oporności na ASA u chorych po zawale mózgu.

Tabela 6. Zależności pomiędzy stężeniem 11-dehydroTx B_2 a czasem w PFA-100® oraz czasem w PFA-100® a stężeniem 8-epiPgF $_{2\alpha}$.

Tabela 7. Zależności pomiędzy wiekiem badanych a wynikami badań laboratoryjnych.

Tabela 8. Zależności pomiędzy cechami demograficzno-klinicznymi, a wynikami badań laboratoryjnych.

Tabela 9. Wyniki oznaczania stężenia malonyldialdehydu [$\mu\text{mol}/10^9$ płytek krwi].

Tabela 10. Statystyki opisowe wyników badań laboratoryjnych.

9. SPIS RYCIN

Rycina 1. Płytką krwi pomiędzy erytrocytem i leukocytem.

Rycina 2. Szlak przemian kwasu arachidonowego.

Rycina 3. Wzór chemiczny kwasu acetylosalicylowego.

Rycina 4. Powstawanie 8-epiprostaglandyny $F_{2\alpha}$ (8-izoprostanu).

Rycina 5. Etapy testu immunoenzymatycznego.

10. SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Wykres agregometrii optycznej indukowanej ADP w stężeniu końcowym 3,5 $\mu\text{mol}/\text{l}$.

Wykres 2. Zależność pomiędzy 11-dehydroTx B_2 i PFA-100®.

Wykres 3. Zależność pomiędzy 8-epiPgF $_{2\alpha}$ i PFA-100®.

Wykres 4. Zależności pomiędzy wiekiem badanych a czasami PFA-100® i stężeniami 11-dehydroTx B_2 .

Wykres 5. Wykresy zależności płci i wyników agregometrii z kolagenem oraz 11-dehydroTx B_2 .

Wykres 6. Wykres zależności hiperlipidemii i agregometrii z ADP 3,5 mmol/l.

11. LITERATURA

1. Nocuń M, Watała C. Potencjalne przyczyny nieskuteczności aspiryny (ASA) jako leku przeciwplateletowego w profilaktyce i leczeniu chorób o podłożu naczyniowym. *Acta Haemat Pol* 2004; 35: 53-61.
2. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction and stroke in high risk patients. *Brit Med J* 2002; 324: 71-86.
3. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy. *Brit Med J* 1994; 308: 81-106.
4. Berger J, Brown D, Becker R. Low-dose aspirin in patients with stable cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am J Med* 2008; 121: 43-49.
5. Tran H, Anand SS. Oral antiplatelet therapy in cerebrovascular disease, coronary artery disease, and peripheral arterial disease. *JAMA* 2004; 292: 1867-1874.
6. Abacı O, Kilickesmez K. Aspirin resistance: Where are we now? *Anadolu Kardiyol Derg* 2013; 13: 370-373.
7. Meves S, Overbeck U, Endres H. Dose-dependent effect of early antiplatelet therapy in acute ischaemic stroke. *J Thromb Haemost* 2012; 107: 69-79.
8. Frelinger A, Furman M, Linden M et al. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1-and cyclooxygenase-2-independent pathway – a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation* 2006; 113: 2888-2896.
9. Lee P, Chen W, Ng W. Low-dose aspirin increases resistance in patients with coronary artery disease. *Am J Med* 2005; 118: 723-727.
10. Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B et al. Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. *J Neurol* 2003; 250: 63-66.
11. Raichand S, Moore D, Riley RD et al. Protocol for a systematic review of the diagnostic and prognostic utility of tests currently available for the detection of aspirin resistance in patients with established cardiovascular or cerebrovascular disease. *Systematic Reviews* 2013; 2: 16. doi: 10.1186/2046-4053-2-16.
12. Kulczkowski W, Witkowski A, Watała C et al. Stanowisko Grupy Roboczej powołanej przy Sekcji Interwencji Sercowo-Naczyniowych Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego na temat zjawiska tzw. „oporności” na doustne leki przeciwplatetowe. *Kardiol Pol* 2008; 66: 470-476.

13. Szczeklik A, Musiał J, Undas A et al. Aspirin resistance. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1655-1662.
14. Cipollone F, Ciabattone G, Patrignani P. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation* 2000; 102: 1007-1013.
15. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 2007; Suppl 1: 230-237.
16. Fontana P, Nolli S, Reber G et al. Biological effects of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 volunteers. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 813-819.
17. Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T et al. Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1271-1278.
18. Undas A, Stępień E, Branicka A et al. Thrombin formation and platelet activation at the site of vascular injury in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel combined with aspirin. *Kardiol Pol* 2009; 67: 591-598.
19. Rocca B, Dragani A, Pagliaccia F. Identifying determinants of variability to tailor aspirin therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2013; 11: 365-379.
20. Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M et al. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 312-319.
21. Harrison P, Segal H, Blasbery K et al. Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function test with optical aggregometry. *Stroke* 2005; 36: 1001-1005.
22. Dahlen J, Prince M, Parise H et al. Evaluating the clinical usefulness of platelet function testing: Considerations for the proper application and interpretation for performance measures. *Thromb Haemost* 2013; 109: 808-816.
23. Michelson A, Cattaneo M, Eikelboom J et al. Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1309-1311.
24. Pulcinelli FM, Riondino S. More on aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. Proposal for a Laboratory Test Guiding Algorithm. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 485-487.

25. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S et al. Wytyczne ESC dotyczące postępowania w stabilnej chorobie wieńcowej w 2013 roku. *Kardiol Pol* 2013; 71, supl. X: 243–318.
26. Pulcinelli F, Riondino S, Celestini A et al. Persistent production platelet thromboxane A₂ in patients chronically treated with aspirin. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2784-2789.
27. Pulcinelli F, Pignatelli P, Celestini A et al. Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term treated patients. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 979–984.
28. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L et al. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 1998; 91: 484–940.
29. Kundlu SK, Heilmann EJ, Sio R et al. Characterization of an in vitro platelet function analyzer, PFA-100;. *Clinical applications in thrombosis/hemostasis* 1996; 2: 241-249.
30. Pradelles P, Grassi J and Maclouf J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using AChE as label: An alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem* 1985; 57: 1170-1173.
31. Paton R. Platelet survival in diabetes mellitus using an aspirin labelling technique. *Thromb Res* 1979; 15: 793-798.
32. Cattaneo M. High on-treatment platelet reactivity - definition and measurement. *Thromb Haemost* 2013; 109: 792-798.
33. Arad D, Komosci A, Price MJ et al. Efficacy and safety of intensified antiplatelet therapy on the basis of platelet reactivity testing in patients after percutaneous coronary interventions: Systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* 2013; 167: 2140-2148.
34. Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E et al. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2007; 28: 1702-1708.
35. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L et al. Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100. *Thromb Haemost* 2008; 99: 14-26.
36. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel. Efficacy, safety and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1980-1987.
37. Harrison P, Segal H, Blasbery K et al. Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. *Stroke* 2005; 36: 1001-1005.

38. Agarwal S, Coakley M, Reddy K et al. Quantifying the effect of antiplatelet therapy: a comparison of the platelet function analyzer (PFA-100) and modified thromboelastography (mTEG) with light transmission platelet aggregometry. *Anesthesiology* 2006; 105: 676-683.
39. Mani H, Linnemann B, Luxembourg B et al. Response to aspirin and clopidogrel monitored with different platelet function methods. *Platelets* 2006; 17: 303-310.
40. Frelinger A, Li Y, Linden M et al. Aspirin 'resistance': role of pre-existent platelet reactivity and correlation between tests. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 2035-2044.
41. Sadilkowa L, Paluch Z, Mottlova J et al. The purification step is not crucial in EIA measurement of thromboxane B₂ and 11-dehydrothromboxane B₂ in human plasma. *Clin Lab* 2012; 58 (1-2): 177-183.
42. Takasaki W, Nakagawa A, Tanaka Y et al. Enzyme immunoassay of human plasma 11-dehydrothromboxane B₂. *Thromb Res* 1991; 63 (3): 331-341.
43. Niccoli G, Giubilato S, Leo A. Predictors of thromboxane levels in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes on chronic aspirin therapy. *J Thromb Haemost* 2012; 108: 133-139.
44. Renda G, De Caterina R. Measurements of thromboxane production and their clinical. *J Thromb Haemost* 2012; 108: 6-8.
45. Zawilska K, Prątnicka-Rozynek M, Zozulińska M et al. F₂-Isoprostanoid (8-epi Prostaglandin F_{2a}) and thromboxane formation in acute myocardial infarction. *Kardiologia Pol* 2001; 54: 10-16.
46. McAdam B, Byrne D, Morrow J. Contribution of cyclooxygenase-2 to elevated biosynthesis of thromboxane A₂ and prostacyclin in cigarette smokers. *Circulation* 2005; 112: 1024-1029.
47. Larsen S, Neergaard-Petersen S, Grove E et al. Increased platelet aggregation and serum thromboxane levels in aspirin-treated patients with prior myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2012; 108: 140-147.
48. Gengo F, Rainka M, Robson M et al. Prevalence of platelet nonresponsiveness to aspirin in patients treated for secondary stroke prophylaxis and in patients with recurrent ischemic events. *J Clin Pharmacol* 2008; 48: 335-343.
49. Snoep J, Hovens M, Eikenboom J et al. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1593-1599.

50. Gum P, Kottke-Marchant K, Welsh P et al. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *JACC* 2003; 41: 961-965.
51. Łabuz-Roszak B, Pierzchała P, Trautsołt W et al. Resistance to aspirin in secondary stroke prevention. A pilot study. *Wiad Lek* 2010; 63: 171-179.
52. El-Mitwalli A, Azzam H, Abu-Hegazy M et al. Clinical and biochemical aspirin resistance in patients with recurrent cerebral ischemia. *Clin Neurol Neurosurgery* 2013; 115: 944-947.
53. Salama MM, Morad AR, Saleh MA et al. Resistance to low-dose aspirin therapy among patients with acute coronary syndrome in relation to associated risk factors. *J Clin Pharm Ther* 2012; 37: 630-636.
54. Minuz P, Andrioli G, Degan M et al. The F₂-isoprostan 8-epi P_gF_{2a} increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1248-1256.
55. Morrow J, Minton T, Roberts L II. The F₂-isoprostan, 8-epi-prostaglandin F₂, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* 1992; 44: 155-163.
56. Praticò D, Smyth EM, Violi F, FitzGerald GA. Local amplification of platelet function by 8-epi prostaglandin F₂ is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem* 1996; 271: 14916-14924.
57. Ames P, Batuca J, Muncy I. Aspirin insensitive thromboxane generation is associated with oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* 2012; 130: 350-354.

12. ZAŁĄCZNIK

Tabela 10. Statystyki opisowe wyników badań laboratoryjnych.

Pleć=K									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	23	63,0870	60,0000	1451,000	44,00000	99,0000	193,447	13,90851	2,90012
ADP 5,0	23	64,9130	68,0000	1493,000	38,00000	113,0000	275,538	16,59932	3,46120
Kolagen	23	60,0000	63,0000	1380,000	21,00000	106,0000	461,091	21,47303	4,47744
Kwas arachidonowy	23	8,7391	4,0000	201,000	0,00000	75,0000	234,383	15,30959	3,19227
PFA-100®	23	167,5217	139,0000	3853,000	72,00000	300,0000	7918,715	88,98716	18,55511
11-dTxB ₂	23	1,6043	1,4000	36,900	0,20000	5,0000	1,526	1,23527	0,25757
8-epiPgF _{2α}	23	62,9957	55,5000	1448,900	15,70000	169,0000	2090,001	45,71653	9,53256
MDA	23	5,0202	4,9270	115,465	2,55600	8,0940	1,834	1,35421	0,28237
Pleć=M									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	21	54,9524	58,0000	1154,000	19,00000	84,0000	428,748	20,70622	4,51847
ADP 5,0	21	56,1429	58,0000	1179,000	25,00000	79,0000	199,529	14,12546	3,08243
Kolagen	21	46,5238	48,0000	977,000	14,00000	101,0000	527,662	22,97089	5,01266
Kwas arachidonowy	21	12,5714	4,0000	264,000	0,00000	75,0000	459,057	21,42562	4,67545
PFA-100®	21	162,0476	116,0000	3403,000	72,00000	300,0000	7799,848	88,31675	19,27229
11-dTxB ₂	21	2,7667	2,5000	58,100	0,50000	8,7000	4,124	2,03085	0,44317
8-epiPgF _{2α}	21	75,2762	74,0000	1580,800	21,30000	147,0000	1624,066	40,29970	8,79412
MDA	21	5,7831	5,5380	121,445	3,26600	8,8040	2,087	1,44469	0,31526
Palenie tytoniu=0									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	29	60,9310	58,0000	1767,000	19,00000	99,0000	309,281	17,58638	3,26571
ADP 5,0	29	62,9655	64,0000	1826,000	25,00000	113,0000	296,034	17,20565	3,19501
Kolagen	29	53,6552	61,0000	1556,000	14,00000	101,0000	543,591	23,31504	4,32949
Kwas arachidonowy	29	10,4828	4,0000	304,000	0,00000	75,0000	341,044	18,46739	3,42931
PFA-100®	29	165,5862	140,0000	4802,000	75,00000	300,0000	6816,037	82,55929	15,33088
11-dTxB ₂	29	2,0172	1,9000	58,500	0,40000	5,0000	1,567	1,25188	0,23247
8-epiPgF _{2α}	29	69,1862	58,0000	2006,400	15,70000	169,0000	2026,915	45,02127	8,36024
MDA	29	5,3840	5,3340	156,135	2,55600	8,8040	2,382	1,54328	0,28658
Palenie tytoniu=1									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	15	55,8667	60,0000	838,000	25,00000	84,0000	331,695	18,21250	4,70245
ADP 5,0	15	56,4000	58,0000	846,000	32,00000	72,0000	155,829	12,48313	3,22313
Kolagen	15	53,4000	60,0000	801,000	23,00000	106,0000	533,543	23,09855	5,96402
Kwas arachidonowy	15	10,7333	3,0000	161,000	0,00000	74,0000	353,495	18,80147	4,85452
PFA-100®	15	163,6000	100,0000	2454,000	72,00000	300,0000	9974,971	99,87478	25,78756
11-dTxB ₂	15	2,4333	1,4000	36,500	0,20000	8,7000	6,092	2,46827	0,63731
8-epiPgF _{2α}	15	68,2200	62,3000	1023,300	21,30000	149,0000	1668,143	40,84291	10,54559
MDA	15	5,3850	5,5380	80,775	3,06500	7,6890	1,556	1,24753	0,32211
Nadciśnienie=0									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	22	55,5000	56,5000	1221,000	19,00000	99,0000	406,833	20,17011	4,30028
ADP 5,0	22	59,0000	59,0000	1298,000	25,00000	113,0000	382,190	19,54969	4,16801
Kolagen	22	49,5909	50,5000	1091,000	14,00000	100,0000	495,301	22,25536	4,74486
Kwas arachidonowy	22	11,9545	5,0000	263,000	0,00000	75,0000	433,474	20,82004	4,43885
PFA-100®	22	170,4545	139,5000	3750,000	72,00000	300,0000	8223,212	90,68193	19,33345

11-dTxB ₂	22	1,9909	1,5000	43,800	0,20000	8,7000	3,736	1,93290	0,41210
8-epiPgF _{2α}	22	77,7364	71,8000	1710,200	16,40000	169,0000	2062,212	45,41158	9,68178
MDA	22	5,1001	5,1395	112,202	3,26600	7,6890	1,422	1,19255	0,25425
Nadciśnienie=1									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	22	62,9091	64,0000	1384,000	35,00000	84,0000	209,991	14,49108	3,08951
ADP 5,0	22	62,4545	63,5000	1374,000	38,00000	83,0000	130,450	11,42148	2,43507
Kolagen	22	57,5455	62,0000	1266,000	21,00000	106,0000	552,069	23,49615	5,00940
Kwas arachidonowy	22	9,1818	3,5000	202,000	0,00000	75,0000	252,918	15,90339	3,39061
PFA-100®	22	159,3636	122,5000	3506,000	72,00000	300,0000	7452,242	86,32637	18,40484
11-dTxB ₂	22	2,3273	1,9500	51,200	0,50000	6,7000	2,437	1,56119	0,33285
8-epiPgF _{2α}	22	59,9773	44,0000	1319,500	15,70000	155,0000	1587,674	39,84563	8,49512
MDA	22	5,6685	5,5380	124,708	2,55600	8,8040	2,622	1,61917	0,34521
Hiperlipidemia=0									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	27	53,8889	52,0000	1455,000	19,00000	84,0000	280,333	16,74316	3,22222
ADP 5,0	27	55,5926	54,0000	1501,000	25,00000	87,0000	224,866	14,99554	2,88589
Kolagen	27	50,9259	53,0000	1375,000	14,00000	106,0000	592,840	24,34832	4,68584
Kwas arachidonowy	27	8,3333	4,0000	225,000	0,00000	74,0000	204,385	14,29631	2,75133
PFA-100®	27	178,4074	147,0000	4817,000	72,00000	300,0000	8334,405	91,29296	17,56934
11-dTxB ₂	27	2,2222	1,9000	60,000	0,20000	8,7000	3,913	1,97821	0,38071
8-epiPgF _{2α}	27	70,1963	69,0000	1895,300	16,40000	155,0000	1863,149	43,16421	8,30696
MDA	27	5,4231	5,3340	146,423	2,55600	8,8040	2,346	1,53161	0,29476
Hiperlipidemia=1									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	17	67,6471	70,0000	1150,000	26,00000	99,0000	268,368	16,38193	3,97320
ADP 5,0	17	68,8824	68,0000	1171,000	48,00000	113,0000	200,485	14,15928	3,43413
Kolagen	17	57,7647	62,0000	982,000	21,00000	101,0000	424,316	20,59894	4,99598
Kwas arachidonowy	17	14,1176	5,0000	240,000	0,00000	75,0000	552,235	23,49969	5,69951
PFA-100®	17	143,4706	116,0000	2439,000	72,00000	300,0000	6319,390	79,49459	19,28027
11-dTxB ₂	17	2,0588	1,7000	35,000	0,50000	5,0000	1,804	1,34306	0,32574
8-epiPgF _{2α}	17	66,7294	55,5000	1134,400	15,70000	169,0000	1971,850	44,40551	10,76992
MDA	17	5,3228	5,3960	90,487	3,26600	8,7330	1,711	1,30815	0,31727
Cukrzyca=0									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	36	59,7500	61,0000	2151,000	19,00000	99,0000	350,479	18,72107	3,12018
ADP 5,0	36	59,4167	59,5000	2139,000	25,00000	113,0000	272,707	16,51385	2,75231
Kolagen	36	53,6667	56,5000	1932,000	14,00000	106,0000	579,657	24,07607	4,01268
Kwas arachidonowy	36	11,5556	4,0000	416,000	0,00000	75,0000	403,397	20,08474	3,34746
PFA-100®	36	166,6389	134,0000	5999,000	72,00000	300,0000	7780,752	88,20857	14,70143
11-dTxB ₂	36	2,2028	1,6000	79,300	0,20000	8,7000	3,643	1,90870	0,31812
8-epiPgF _{2α}	36	70,3333	61,1500	2532,000	16,40000	169,0000	1961,315	44,28674	7,38112
MDA	36	5,2744	5,2745	189,877	3,06500	8,7330	1,664	1,28985	0,21497
Cukrzyca=1									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	8	56,7500	54,0000	454,000	36,00000	80,0000	175,929	13,26381	4,68946
ADP 5,0	8	66,6250	66,0000	533,000	50,00000	83,0000	144,554	12,02304	4,25079
Kolagen	8	53,1250	62,0000	425,000	25,00000	74,0000	342,982	18,51978	6,54773
Kwas arachidonowy	8	6,1250	4,0000	49,000	1,00000	15,0000	26,696	5,16686	1,82676
PFA-100®	8	157,1250	132,0000	1257,000	75,00000	300,0000	8231,268	90,72633	32,07660
11-dTxB ₂	8	1,9625	1,9500	15,700	0,90000	2,9000	0,428	0,65452	0,23141

8-epiPgF _{2α}	8	62,2125	61,5500	497,700	15,70000	129,0000	1577,021	39,71173	14,04022
MDA	8	5,8791	5,8730	47,033	2,55600	8,8040	3,979	1,99474	0,70525
Zawał serca=0									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	34	57,7353	58,0000	1963,000	19,00000	99,0000	355,110	18,84435	3,23178
ADP 5,0	34	59,7059	58,0000	2030,000	25,00000	113,0000	293,365	17,12791	2,93741
Kolagen	34	50,8235	52,0000	1728,000	14,00000	101,0000	550,150	23,45527	4,02255
Kwas arachidonowy	34	11,8824	4,5000	404,000	0,00000	75,0000	420,652	20,50981	3,51740
PFA-100®	34	174,7941	143,5000	5943,000	72,00000	300,0000	8276,047	90,97278	15,60170
11-dTxB ₂	34	2,2235	1,7500	75,600	0,20000	8,7000	3,644	1,90900	0,32739
8-epiPgF _{2α}	34	65,1176	61,1500	2214,000	15,70000	149,0000	1555,478	39,43955	6,76383
MDA	34	5,3970	5,3225	183,497	2,55600	8,7330	2,036	1,42706	0,24474
Zawał serca=1									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	10	64,2000	61,5000	642,000	48,00000	84,0000	168,400	12,97690	4,10366
ADP 5,0	10	64,2000	66,0000	642,000	38,00000	79,0000	117,733	10,85050	3,43123
Kolagen	10	62,9000	63,5000	629,000	29,00000	106,0000	378,767	19,46193	6,15440
Kwas arachidonowy	10	6,1000	4,0000	61,000	0,00000	18,0000	39,878	6,31489	1,99694
PFA-100®	10	131,3000	100,0000	1313,000	80,00000	300,0000	4756,678	68,96867	21,80981
11-dTxB ₂	10	1,9400	1,8000	19,400	0,50000	4,1000	1,112	1,05430	0,33340
8-epiPgF _{2α}	10	81,5700	74,0000	815,700	24,00000	169,0000	2966,049	54,46145	17,22222
MDA	10	5,3413	5,4670	53,413	3,06500	8,8040	2,361	1,53653	0,48589
Stosowanie statyny=0									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	35	59,0000	58,0000	2065,000	25,00000	84,0000	247,118	15,71998	2,65716
ADP 5,0	35	59,0571	60,0000	2067,000	32,00000	87,0000	172,938	13,15058	2,22285
Kolagen	35	53,7143	60,0000	1880,000	16,00000	106,0000	489,387	22,12208	3,73931
Kwas arachidonowy	35	10,4286	4,0000	365,000	0,00000	75,0000	289,723	17,02124	2,87712
PFA-100®	35	167,8000	139,0000	5873,000	72,00000	300,0000	8072,224	89,84555	15,18667
11-dTxB ₂	35	2,2743	1,9000	79,600	0,20000	8,7000	3,487	1,86742	0,31565
8-epiPgF _{2α}	35	67,0343	60,0000	2346,200	16,40000	155,0000	1745,627	41,78070	7,06223
MDA	35	5,3464	5,3110	187,125	2,55600	8,8040	2,102	1,44968	0,24504
Stosowanie statyny=1									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	9	60,0000	69,0000	540,000	19,00000	99,0000	643,500	25,36730	8,45577
ADP 5,0	9	67,2222	68,0000	605,000	25,00000	113,0000	567,444	23,82109	7,94036
Kolagen	9	53,0000	62,0000	477,000	14,00000	101,0000	756,000	27,49545	9,16515
Kwas arachidonowy	9	11,1111	4,0000	100,000	0,00000	75,0000	580,611	24,09587	8,03196
PFA-100®	9	153,6667	129,0000	1383,000	80,00000	300,0000	6831,500	82,65289	27,55096
11-dTxB ₂	9	1,7111	1,6000	15,400	0,50000	3,7000	1,256	1,12076	0,37359
8-epiPgF _{2α}	9	75,9444	71,7000	683,500	15,70000	169,0000	2524,645	50,24585	16,74862
MDA	9	5,5317	5,6090	49,785	3,75700	8,7330	2,097	1,44814	0,48271
Zawał mózgu w rodzinie=0									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	19	59,5789	65,0000	1132,000	19,00000	99,0000	494,368	22,23440	5,10092
ADP 5,0	19	64,2632	68,0000	1221,000	25,00000	113,0000	358,982	18,94683	4,34670
Kolagen	19	54,8947	60,0000	1043,000	14,00000	106,0000	526,544	22,94654	5,26430
Kwas arachidonowy	19	11,0526	2,0000	210,000	0,00000	75,0000	523,386	22,87763	5,24849
PFA-100®	19	140,8421	100,0000	2676,000	72,00000	300,0000	5858,140	76,53849	17,55913
11-dTxB ₂	19	2,1316	1,2000	40,500	0,50000	8,7000	4,345	2,08435	0,47818
8-epiPgF _{2α}	19	61,6684	60,0000	1171,700	15,70000	169,0000	1605,186	40,06477	9,19149

MDA	19	5,2186	5,1120	99,153	3,06500	8,0940	1,714	1,30917	0,30034
Zawoł mózgu w rodzinie=1									
	N ważnych	Średnia	Mediana	Suma	Minimum	Maksimum	Wariancja	Odch.std	Standard.
ADP 3,5	25	58,9200	58,0000	1473,000	32,00000	84,0000	193,910	13,92516	2,78503
ADP 5,0	25	58,0400	59,0000	1451,000	32,00000	87,0000	167,373	12,93728	2,58746
Kolagen	25	52,5600	61,0000	1314,000	16,00000	101,0000	548,090	23,41132	4,68226
Kwas arachidonowy	25	10,2000	5,0000	255,000	0,00000	75,0000	211,250	14,53444	2,90689
PFA-100®	25	183,2000	171,0000	4580,000	72,00000	300,0000	8571,750	92,58375	18,51675
11-dTxB ₂	25	2,1800	2,2000	54,500	0,20000	6,7000	2,194	1,48127	0,29625
8-epiPgF _{2α}	25	74,3200	65,1000	1858,000	16,40000	155,0000	2062,315	45,41272	9,08254
MDA	25	5,5103	5,5380	137,757	2,55600	8,8040	2,363	1,53714	0,30743