

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Anna Komosa

**Ocena wartości prognostycznej wybranych parametrów klinicznych
(Predict Score) oraz testu oporności płytek krwi na kłopidogrel
(Multiplate) w przewidywaniu zdarzeń niedokrwienych u pacjentów
po zabiegach przezskórnej interwencji wieńcowej.**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. n. med. Maciej Lesiak prof. UM

Poznań 2013

*Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi
Szanownemu Panu Profesorowi Maciejowi Lesiakowi
za ogromne zaangażowanie i pomoc w realizacji pracy
oraz za życzliwość i przyjazną atmosferę.*

*Wyrazy wdzięczności składam również Panu Profesorowi
Stefanowi Grajkowi za możliwość rozwoju naukowego.
Pragnę podziękować Pani Profesor Tatianie Mularek – Kubzdeli
za wsparcie i życzliwość,
oraz Koleżankom i Kolegom z I Kliniki Kardiologii
za przyjaźń i pomoc w realizacji pracy.*

*Serdecznie dziękuję mojemu Mężowi Markowi i Dzieciom,
a także Rodzicom i całej Rodzinie za nieustanne
wsparcie, mobilizację i wyrozumiałość.*

Spis treści

| | |
|--|-----------|
| 1. Wstęp..... | 9 |
| 1.1 Patogeneza choroby niedokrwiennej serca i ostrych zespołów wieńcowych..... | 9 |
| 1.2 Fizjologia i patofizjologia płytek krwi..... | 10 |
| 1.3 Leki przeciwplatekcyjne..... | 12 |
| 1.4 Zabiegi przezskórnych interwencji wieńcowych i towarzysząca im farmakoterapia | 18 |
| 1.5 Zjawisko oporności płytek krwi na działanie leków przeciwplatekcyjnych..... | 19 |
| 1.6 Przyczyny oporności płytek krwi na kłopidogrel..... | 20 |
| 1.7 Sposoby monitorowania wpływu leków przeciwplatekcyjnych na zahamowanie funkcji płytek | 25 |
| 2. Cele badania..... | 28 |
| 3. Materiał i metody | 29 |
| 3.1 Badana populacja..... | 29 |
| 3.2 Oznaczenie zahamowania agregacji płytek krwi..... | 30 |
| 3.3 Predict Score | 34 |
| 3.4 Badania genetyczne | 35 |
| 3.5 Pozostałe badania..... | 36 |
| 3.6 Obserwacje | 36 |
| 3.7 Analiza statystyczna..... | 39 |
| 4. Wyniki..... | 40 |
| 4.1 Analiza czynników wpływających na wystąpienie oporności płytek krwi na kłopidogrel..... | 42 |
| 4.2 Wyniki badania polimorfizmu CYP2C19..... | 58 |
| 4.3 Obserwacje kliniczne..... | 61 |
| 4.4 Wpływ czynników klinicznych, laboratoryjnych, oraz genotypu na występowanie zdarzeń klinicznych..... | 65 |
| 5. Dyskusja | 75 |
| 6. Wnioski..... | 86 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 7. Wykaz rycin i tabel | 87 |
| 7.1 Wykaz rycin..... | 87 |
| 7.2 Wykaz tabel..... | 89 |
| 8. Streszczenie | 91 |
| 9. Abstract | 94 |
| 10. Piśmiennictwo | 97 |

Wykaz użytych skrótów

| | |
|----------|---|
| ACCF/AHA | ang. <i>american college of cardiology foundation/american heart association</i> |
| ACS | ang. <i>acute coronary syndrome</i> , ostry zespół wieńcowy |
| ADP | adenozynodifosforan |
| ALT | aminotransferaza alaninowa |
| API | łac. <i>angina pectoris instabilis</i> , niestabilna dławica piersiowa |
| ARC | ang. <i>academic research consortium</i> |
| ASA | aspiryna, kwas acetylosalicylowy |
| ATP | adenozynotrifosforan |
| AUC | ang. <i>area under the curve</i> , pole pod krzywą |
| BMI | ang. <i>body mass index</i> , wskaźnik masy ciała |
| BMS | ang. <i>bare metal stent</i> , stent metalowy |
| CABG | ang. <i>coronary artery bypass grafting</i> , pomostowanie aortalno-wieńcowe |
| CAD | ang. <i>coronary artery disease</i> , choroba niedokrwienna serca |
| CK-MB | izoenzym kinazy fosfokreatynowej pochodzenia sercowego |
| COX-1 | cyklooksygenaza 1 |
| CPK | kinaza fosfokreatynowa |
| CRP | białko C-reaktywne |
| DAG | diacyloglicerol |
| DAT | ang. <i>dual antiplatelet therapy</i> , podwójna terapia przeciwplateletowa |
| DES | ang. <i>drug eluting stent</i> , stent uwalniający lek antyproliferacyjny |
| DNA | ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> , kwas deoksyrybonukleinowy |
| EDTA | kwas edetynowy |
| EF | ang. <i>ejection fraction</i> , frakcja wyrzutowa |
| EKG | badanie elektrokardiograficzne |
| ESC | ang. <i>european society of cardiology</i> , europejskie towarzystwo kardiologiczne |
| GFR | ang. <i>glomerular filtration rate</i> , współczynnik przesączania kłębuszkowego |
| GP | glikoproteina |
| HDL | ang. <i>high-density lipoprotein</i> , lipoproteina wysokiej gęstości |
| HRM | ang. <i>high resolution melting</i> , wysokorozdzielcza analiza krzywych topnienia produktów reakcji PCR |
| HTPR | ang. <i>high on-treatment platelet reactivity</i> , zwiększona reaktywność płytek krwi pomimo leczenia przeciwplateletowego |
| IP3 | inozytol trójfosforanu |

| | |
|-----------|--|
| LDL | <i>ang. low-density lipoprotein</i> , lipoproteina niskiej gęstości |
| LTA | <i>ang. light transmission aggregometry</i> , agregometria oparta o transmisję światła widzialnego |
| MACCE | <i>ang. major adverse cardiac and cerebrovascular events</i> |
| MF | morfina |
| MPV | <i>ang. mean platelet volume</i> , średnia objętość płytki krwi |
| NS | <i>ang. non-significant</i> , nieistotne statystycznie |
| NSTEMI | <i>ang. non-ST-segment elevation myocardial infarction</i> , zawał serca bez uniesienia odcinka ST |
| NT-proBNP | <i>ang. brain natriuretic peptide</i> , mózgowy peptyd natriuretyczny typu B |
| OB | odczyn Biernackiego |
| PCI | <i>ang. percutaneous coronary intervention</i> , przezskórna angioplastyka wieńcowa |
| PCR | <i>ang. polymerase chain reaction</i> , reakcja łańcuchowa polimerazy |
| PGE1 | prostaglandyna E1 |
| PGH2 | prostaglandyna H2 |
| PLT | płytki krwi |
| PS | <i>ang. predict score</i> |
| SNP | <i>ang. single-nucleotide polymorphism</i> , polimorfizm pojedynczego nukleotydu |
| ST | <i>ang. stent thrombosis</i> , zakrzepica w stencie |
| STEMI | <i>ang. ST-elevation myocardial infarction</i> , zawał serca z uniesieniem odcinka ST |
| T1-3 | tercyl 1-3 |
| TG | trójglicerydy |
| TIA | <i>ang. transient ischemic attack</i> , przejściowe niedokrwienie mózgu |
| TXA2 | tromboksan A2 |
| UAP | <i>ang. unstable angina pectoris</i> , dławica piersiowa niestabilna |
| WBC | leukocyty |
| VASP | <i>ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein</i> , fosfoproteina stymulowana przez związki rozszerzające naczynia |
| vWF | <i>ang. von Willebrand factor</i> , czynnik von Willebranda |

1. Wstęp

Leki przeciwplatekcyjne od wielu lat stanowią podstawę terapii choroby niedokrwiennej serca (CAD). Badania patomorfologiczne już w latach 60. ubiegłego wieku wskazywały na wiodącą rolę procesów krzepnięcia w patogenezie zawału serca¹. W kolejnych latach udowodniono rolę aktywacji płytek krwi także w innych postaciach ostrych zespołów wieńcowych (ACS). Uzyskane wyniki badań doprowadziły do wprowadzenia leków hamujących funkcję płytek krwi do rutynowej terapii CAD. Stosowanie kwasu acetylosalicylowego (ASA) zmniejsza o 25% ryzyko wystąpienia zawału serca i udaru mózgu w prewencji wtórnej, a także, choć z mniejszym efektem, w prewencji pierwotnej u chorych obciążonych dużym ryzykiem sercowo-naczyniowym². Skuteczność ASA, tak jak większości leków stosowanych w monoterapii w chorobach wieloczynnikowych jest ograniczona. Dlatego łączenie dwóch leków przeciwplatekcyjnych o odmiennych mechanizmach działania w terapii lub prewencji chorób sercowo-naczyniowych odgrywa kluczową rolę w redukcji zdarzeń sercowo-naczyniowych.

1.1 Patogeneza choroby niedokrwiennej serca i ostrych zespołów wieńcowych

Choroba niedokrwienności serca to zespół objawów wynikających z niedostatecznego zaopatrzenia komórek mięśnia sercowego w tlen i substancje odżywcze. Najczęstszą jej przyczyną jest miażdżyca, która powodując uszkodzenie ściany naczyń wieńcowych prowadzi do zwężenia ich światła.

Do zawału serca dochodzi najczęściej na skutek nagłego zamknięcia tętnicy wieńcowej, spowodowanego formacją skrzepliny w miejscu uszkodzenia niestabilnej blaszki miażdżycowej^{3,4}. Uszkodzenie śródbłonna lub pęknięcie pokrywy blaszki aktywuje procesy krzepnięcia poprzez ekspozycję kolagenu oraz uwolnienie substancji aktywujących płytki, takich jak czynnik von Willebranda i inne, będące ligandami receptorów płytek krwi. W momencie pęknięcia pokrywy blaszki miażdżycowej jej składniki mogą przedostać się do światła naczynia stanowiąc materiał zatorowy. Aktywowane trombocyty uwalniają substancje pobudzające chemotaksję i migrowanie leukocytów⁵. Płytki krwi inicjują kaskadę krzepnięcia i stymulują proces formowania zakrzepu, wchodząc dalej w jego skład poprzez wiązanie się z fibrynogenem. W konsekwencji dochodzi do zawężenia lub zamknięcia światła naczynia, i niedokrwienia mięśnia sercowego. Jeżeli zakrzep całkowicie zamyka światło tętnicy wieńcowej dochodzi zazwyczaj do zawału serca z uniesieniem odcinka ST (STEMI). Zawał

serca bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI) spowodowany jest zwykle niezupełnym zamknięciem tętnicy wieńcowej z tworzeniem obszarów mikromartwicy wywołanych zatorami mikrokrążenia. Materiał zatorowy stanowią najczęściej agregaty płytek krwi oraz fragmenty uszkodzonej blaszki miażdżycowej. Podobnie jak w zawale STEMI w surowicy krwi można wykryć podwyższone stężenia enzymów nekrotycznych, takich jak kinaza fosfokreatyninowa (CPK, CKMB) lub troponiny. Uszkodzenie niestabilnej blaszki miażdżycowej jest także najczęstszą przyczyną wystąpienia objawów niestabilnej dławicy piersiowej (UAP, *ang. unstable angina pectoris*), z tą różnicą, że nie dochodzi tu do wytworzenia ognisk mikromartwicy prowadzących do podwyższenia stężeń markerów nekrotycznych we krwi.

1.2 Fizjologia i patofizjologia płytek krwi

Hemostaza jest zespołem procesów fizjologicznych prowadzących do zahamowania krwawienia i ograniczenia utraty krwi⁶. W procesie krzepnięcia i fibrynolizy bierze udział szereg białek, komórki śródbłonna oraz płytki krwi, które są podstawowymi składowymi układami zapewniającego hemostazę. Należą one do najmniejszych (o średnicy 2-4 μm) upostaciowionych, pozbawionych jądra, elementów krwi. Powstają w wyniku fragmentacji cytoplazmy megakariocytów szpiku kostnego. Mają kształt płaskiego dysku o gładkich zarysach. W trójwarstwowej błonie trombocytów występuje system mikrotubuli, dzięki któremu uwalniane są substancje z wewnątrzkomórkowych ziarnistości. W ziarnistościach α zmagazynowane są białka adhezyjne, takie jak czynnik tkankowy, czynnik von Willebranda (vWF), czynniki wzrostu, krzepnięcia i fibrynolizy, zaś ziarnistości gęste δ zawierają ATP, ADP, serotoninę oraz jony wapnia. W warstwie zewnętrznej błony komórkowej znajdują się glikoproteiny o właściwościach receptorów dla czynników aktywujących oraz hamujących płytki krwi. U ludzi zdrowych liczba płytek wynosi 150-400 $\times 10^3/\text{L}$. W warunkach fizjologicznych płytki krwi żyją ok. 10 dni. Płytki stare lub wadliwej budowy są usuwane z udziałem makrofagów układu siateczkowo-śródbłonkowego śledziony.

Płytki krwi spełniają zasadniczą rolę w procesie hemostazy pierwotnej, aktywacji kaskady krzepnięcia krwi oraz formowaniu skrzepu. Biorą udział w procesach naprawy śródbłonna w przypadku jego uszkodzenia. Ułatwiają również powstawanie blaszki miażdżycowej poprzez uwalnianie miejscowych czynników wzrostu oraz stymulację lokalnego procesu zapalnego⁷. Aktywowane trombocyty uwalniają mediatory zapalne pobudzające właściwości chemotaktyczne oraz adhezyjne komórek śródbłonna.

W następstwie tych procesów dochodzi do migracji monocytów i granulocytów do miejsca, gdzie toczy się proces zapalny⁸. W prawidłowych warunkach komórki śródbłonka ściany naczynia hamują proces aktywacji płytek poprzez produkcję tlenku azotu, prostaglandyny PGI₂ oraz śródbłonkowej ADP-azy. W miejscu uszkodzenia naczynia osoczowy czynnik vWF łączy się z kolagenem, który następnie wiąże się z płytkowym kompleksem glikoprotein (GP) GPIb/IX/V⁹. Pod wpływem działania śródbłonkowych proteaz multimery czynnika vWF ulegają fragmentacji do mniejszych cząsteczek, spośród których te o dużej masie wykazują silne właściwości agregacyjne. W warunkach działania wysokich sił ścinających czynnik vWF może być uwalniany z ziarnistości trombocytów i komórek endotelium nasilając agregację płytek. GPI ułatwia wiązanie trombocytów ze sobą i z czynnikiem VWF oraz z komórkami śródbłonka w miejscu uszkodzenia naczynia. Łączenie kolagenu z GPVI skutkuje trwałą adhezją płytek krwi do ściany naczynia. Kompleks GPIb/IX/V oraz GPVI regulują wzajemne oddziaływanie trombocytów i leukocytów odgrywając znaczącą rolę w patogenezie procesów zapalnych i miażdżycowych w obrębie naczyń¹⁰.

Aktywacja płytek krwi, wywołana kontaktem z powierzchnią uszkodzonego naczynia lub działaniem agonistów (ADP, trombina), obejmuje szereg następujących po sobie etapów (inicjacja, ekstensja i perpetuacja), w trakcie których zachodzą następujące procesy: zmiana kształtu, adhezja, degranulacja i agregacja płytek. W wyniku aktywacji dochodzi do reorganizacji cytoszkieletu płytki zbudowanego z zorganizowanej sieci mikrotubul i filamentów aktyny oraz szeregu białek. Trombocyty przybierają formę trójwymiarową, sferyczną z licznymi wypustkami umożliwiającymi agregację. Aktywacja płytek odbywa się poprzez czynniki powierzchniowe w naczyniu, doprowadzające do stymulacji receptorów, w których zachodzi konwersja dwufosforanu adenozyiny (ADP) w monofosforan adenozyiny (AMP). ADP oddziałuje na płytki poprzez receptory purynergiczne: dwa receptory związane z GPVI (P2Y₁ i P2Y₁₂) oraz receptor związany z kanałem wapniowym (P2X₁). Dalsza reakcja odbywa się przez degradację AMP do adenozyiny, która dalej stymuluje płytki do agregacji¹¹. Receptory dla ADP, tromboksanu A₂ (TXA₂) i trombiny sprzężone z GPVI aktywują fosfolipazę C. Aktywacja fosfolipazy C z udziałem receptora P2Y₁ powoduje powstanie dwóch wtórnych przekaźników: diacyloglicerolu (DAG) i inozytolu trójfosforanu (IP₃). DAG pośredniczy w napływie jonów wapnia, podczas gdy IP₃ uwalnia wapń z wnętrza komórki. Napływ wapnia może być indukowany bezpośrednio przez niektórych agonistów, takich jak ATP, wiążący się z ligandem receptora kanału jonowego, P2X₁¹². Wzrost stężenia jonów wapnia w płytkach stymuluje aktywność fosfolipazy A₂, która uwalnia kwas arachidonowy z fosfolipidów błony trombocyta. Kwas arachidonowy jest konwertowany

przez cyklooksygenazę 1 (COX-1) do produktu pośredniego: prostaglandyny H₂ (PGH₂). PGH₂ jest dalej metabolizowana do TXA₂ przez syntazy tromboksanu. TXA₂ przez receptory płytkowe TP α i TP β aktywuje fosfolipazę C stymulując proces agregacji płytek krwi¹³. Receptor P2Y₁₂ odgrywa kluczową rolę w zakończeniu procesu agregacji płytek indukowanego ADP. Ich aktywacja prowadzi do uwolnienia zawartości ziarnistości gęstych, aktywacji receptora dla fibrynogenu, zwiększenia ekspresji selektyny P, a ostatecznie do formowania skrzepu. Pobudzenie receptora P2Y₁₂ hamuje również wytwarzanie cykazy adenylowej, która odpowiada za powstawanie cAMP będącego silnym inhibitorem agregacji płytek. Jednoczasowa aktywacja receptorów P2Y₁ i P2Y₁₂ jest konieczna do pełnej aktywacji procesu agregacji płytek krwi¹⁴.

W następstwie uwalniania jonów wapnia dochodzi do przemiany receptora płytkowego GPIIb/IIIa dla fibrynogenu (integryna α IIb β 3 (CD41/CD61)). Zmiana właściwości integryny, która staje się zdolna do wiązania rozpuszczonego w osoczu fibrynogenu umożliwia płytkom przyłączanie białek adhezyjnych. Związany z integryną fibrynogen działa jako most pomiędzy dwoma cząsteczkami GPIIb/ IIIa sąsiadujących płytek. Dzięki białkom adhezyjnym płytki łączą się ze sobą oraz z komórkami tkanki łącznej leżącymi pod warstwą śródbłonna. Jest to końcowy efekt wspólnego szlaku agregacji płytek krwi pod wpływem działania agonistów. Zaktywowane trombocyty pobudzają kolejne do uwalniania agonistów: ADP i serotoniny (magazynowanych w ziarnistościach α) oraz syntezy *de novo* czynnika agregacyjnego- TXA₂¹⁵.

1.3 Leki przeciwplatekcyjne

Aspiryna

Aspiryna nieodwracalnie blokuje COX-1 płytek krwi powodując zahamowanie syntezy cyklicznych nadtlenków prostaglandyn PGG₂ i PGH₂ z kwasu arachidonowego, a w konsekwencji tromboksanu A₂¹⁶. Zahamowanie enzymu jest nieodwracalne i trwa aż do wytworzenia się nowej puli płytek. Średni czas życia płytki wynosi ok. 10 dni, tak więc po upływie 5–6 dni ok. 50% płytek jest znów zdolna do pełnienia swoich funkcji. Kwas acetylosalicylowy istotnie zmniejsza śmiertelność i występowanie powtórnych zawałów serca, jeśli zostanie podany w ostrej fazie zawału serca lub niestabilnej dławicy piersiowej (UAP) oraz w przewlekłym leczeniu profilaktycznym. Wyniki metaanalizy Antithrombotic

Trialist' Collaboration, dotyczące leczenia przeciwplatekowego w profilaktyce zdarzeń sercowo-naczyniowych, wykazały, że kilkuletnie stosowanie ASA u osób z podwyższonym ryzykiem sercowo-naczyniowym zmniejsza ryzyko zawału serca o ok. 34%, udaru mózgu o ok. 25%, natomiast ryzyko zgonu sercowo-naczyniowego o ok. 15%². W ostrej fazie zawału serca lub niestabilnej choroby wieńcowej dawka ASA powinna wynosić 162–325 mg, a w profilaktyce pierwotnej i wtórnej 75–100 mg/dobę¹⁷.

Klopidogrel

Klopidogrel jest prolekiem, pochodną tienopirydyny, która w fazie absorpcji jelitowej, pod wpływem esterazy ulega hydrolizie do pośredniego metabolitu - estru. Następnie jest on dwukrotnie metabolizowany w wątrobie z udziałem enzymów cytochromu P450. W wyniku tych procesów 85% leku ulega hydrolizie do nieaktywnej formy kwasu węglowego. Pozostałe 15% zostaje przekształcone w postać czynnego metabolitu zawierającego grupę tiolową o właściwościach antyagregacyjnych¹⁸. Lek w ok. 50% wydalany jest z moczem, a w ok. 46% z kałem¹⁹.

Klopidogrel jest doustnym lekiem przeciwplatekowym hamującym agregację płytek krwi zależną od ADP. Poprzez wytworzenie mostków dwusiarczkowych z cysteiną nieodwracalnie modyfikuje strukturę receptora platekowego P2Y₁₂²⁰. Efekt jego działania utrzymuje się przez cały okres życia płytki krwi (7-10 dni). Tylko 60-70% receptorów wykazuje wrażliwość na działanie klopidogrelu, dlatego zastosowanie standardowej dawki nie prowadzi do całkowitego zablokowania receptorów P2Y₁₂ pozwalając na zahamowanie agregacji około połowy trombocytów²¹. Siła działania leku zależy nie tylko od dawki, lecz także od czasu rozpoczęcia terapii. Maksymalny efekt przeciwplatekowy osiągnąć jest w ok. 2-3 godziny od podania jednorazowej dawki nasycającej 600 mg i w ok. 3-7 dni po zastosowaniu dawki 75 mg/dzień²². W badaniu CLEAR-PLATELET podanie klopidogrelu w dawce nasycającej 600 mg wiązało się z lepszym efektem farmakodynamicznym w porównaniu z dawką 300 mg²³. W badaniu ISAR-CHOICE również wykazano silniejszą inhibicję aktywności płytek krwi po podaniu dawki 600 mg²⁴. Nie odnotowano jednak istotnych korzyści ze zwiększenia dawki do 900 mg. Badanie CURE, a zwłaszcza PCI-CURE wykazało, że terapia klopidogrelem w połączeniu z ASA, stosowana przez 9-12 miesięcy u pacjentów z ACS zmniejsza ryzyko wystąpienia złożonego punktu końcowego (łącznie: zgon, zawał serca, udar mózgu) o 26,9%, w porównaniu do grupy leczonej samą aspiryną²⁵. W badaniu tym wykazano również zwiększenie ryzyka wystąpienia dużych krwawień w okresie

roku (klopidogrel vs. placebo; 8,8% vs. 6,7%, $p=0,07$)²⁶. Badanie CREDO miało na celu ocenę bezpieczeństwa oraz skuteczności stosowania dawki nasycającej klopidogrelu przed planowym zabiegiem przezskórnej angioplastyki wieńcowej (PCI) oraz przez 12 miesięcy od zabiegu. Zastosowanie dawki nasycającej klopidogrelu 300 mg, a następnie kontynuacja leczenia w dawce 75 mg dziennie przez okres średnio ok. 9 miesięcy (3-12 miesięcy) spowodowało istotną redukcję złożonego punktu końcowego w porównaniu do grupy otrzymującej placebo (11,4% vs. 9,3%, $p<0,001$). Obserwowano również znamienne zmniejszenie ryzyka wystąpienia ponownego niedokrwienia podczas pobytu w szpitalu, a korzyść ta była odnotowywana już w kilka godzin od momentu włączenia do badania. Ta korzyść była ograniczona jednak do grupy pacjentów, którzy otrzymali lek przynajmniej 6 godzin przed zabiegiem PCI. Zastosowanie klopidogrelu łączyło się też niestety z istotnym wzrostem odsetka powikłań krwotocznych w porównaniu do grupy otrzymującej placebo²⁷. Inne duże badanie CURRENT-OASIS 7, w grupie ponad 17 tysięcy chorych z ACS, porównało dwa sposoby stosowania klopidogrelu. Pierwszy zakładał podanie dawki nasycającej 600 mg, następnie przez tydzień 150 mg i dalej 75 mg dziennie. Drugi, standardowy sposób leczenia zakładał podanie niższej dawki nasycającej: 300 mg, a następnie 75 mg dziennie przez okres 30 dni. W badaniu tym porównywano również stosowanie wyższej dawki nasycającej aspiryny 300–325 mg i dawki podtrzymującej 75-100 mg dziennie. Udowodniono, że w grupie leczonej PCI w porównaniu ze standardową dawką klopidogrelu, zastosowanie podwójnej dawki wiązało się z redukcją pierwszorzędownego punktu końcowego (3,9% vs. 4,5%, $p=0,039$) oraz redukcją występowania zakrzepicy w stencie (0,7% vs. 1,3%, $p=0,0001$). Natomiast zastosowanie wysokiej lub niskiej dawki aspiryny pozostawało tu bez istotnego wpływu. Duże krwawienia stwierdzano częściej po zastosowaniu podwójnej niż standardowej dawki klopidogrelu (1,6% vs. 1,1%, $p=0,009$). Nie odnotowano natomiast istotnej różnicy zależnej od dawki kwasu acetylosalicylowego (1,5% vs. 1,3%, $p=0,20$)²⁸. Istotnym problemem leczenia przeciwplatekowego jest zwiększone ryzyko wystąpienia powikłań krwotocznych. Badanie CHARISMA wykazało, że stosowanie podwójnej terapii, złożonej z aspiryny i klopidogrelu, w dawkach odpowiednio 75- 162 oraz 75 mg/dzień, zwiększa znamienne ryzyko krwawienia przez około 250 dni od momentu rozpoczęcia terapii²⁹.

Do roku 2011 klopidogrel, obok aspiryny, posiadał najwyższe rekomendacje światowych towarzystw kardiologicznych (ESC/ACC/AHA) w leczeniu ACS.

Prasugrel

Prasugrel jest tienopirydyną trzeciej generacji, która w sposób nieodwracalny blokuje receptor dla ADP P2Y₁₂. Prasugrel jest także prolekiem, a od klopidoogrelu różni go jednoetapowy proces aktywacji w wątrobie z udziałem enzymów cytochromu P450³⁰. Aktywny metabolit powstaje szybciej, a więc w krótszym czasie osiąga wyższe stężenie we krwi, co istotnie wpływa na szybkość i skuteczność działania leku. U zdrowych ochotników już po 30 min od podania osiąga on maksymalne stężenie w osoczu³¹. Zróżnicowany stopień wrażliwości chorych na prasugrel oraz interakcje z innymi lekami nie występują w stopniu istotnym klinicznie³². W badaniu PRINCIPLE-TIMI-44, na 200 pacjentach poddawanych zabiegowi elektywnej PCI, prasugrel w dawce nasycającej 60 mg i podtrzymującej 10 mg wykazywał wyższy stopień zahamowania płytek niż klopidoogrel w dawkach odpowiednio 600 i 150 mg³³. Badanie TRITON-TIMI-38, na grupie 13,600 pacjentów leczonych z powodu ACS wykazało, że prasugrel w porównaniu do klopidoogrelu istotnie zmniejsza ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych (9,9% vs. 12,1%, OR:0,81), kosztem istotnego zwiększenia ryzyka krwawień zarówno w populacji całkowitej jak i w grupie leczonej oraz nieleczonej operacją pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG). Szczególnie często krwawienia występowały u pacjentów powyżej 75 roku życia, po wcześniejszych incydentach mózgowych i z niską masą ciała³⁴.

Tikagrelor

Tikagrelor jest analogiem trójfosforanu adenozyiny, który odwracalnie blokuje receptor płytkowy P2Y₁₂. Działa bezpośrednio; nie ma formy pro-leku, dzięki czemu szybciej niż klopidoogrel hamuje funkcję płytek. Stopień zahamowania aktywności płytek jest zależny od osoczowego stężenia leku. Tikagrelor podaje się w jednorazowej dawce nasycającej 180 mg, a następnie kontynuuje się terapię dawką podtrzymującą 90 mg dwa razy dziennie. W badaniu ONSET/OFFSET, na grupie 123 pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową wykazano znacznie szybsze i silniejsze hamowanie czynności płytek krwi za pomocą tikagreloru w porównaniu z klopidoogrelem (600 mg, następnie 75 mg w ciągu doby). Powrót funkcji płytek obserwowano również szybciej po zaprzestaniu podawania tikagreloru niż klopidoogrelu³⁵. W badaniu PLATO, na grupie 18,624 pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym z lub bez uniesienia odcinka ST, leczenie tikagrelorem w porównaniu do klopidoogrelu istotnie zmniejszyło częstość zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych, zawałów serca i udarów mózgu (9,8% vs. 11,7%, HR:0,84). Tikagrelor w porównaniu do klopidoogrelu nie zwiększał ryzyka

krwawień w całej populacji oraz w grupie leczonej CABG. Zwiększone ryzyko, obserwowane w grupie nie leczonej CABG, nie dotyczyło krwawień zagrażających życiu³⁶.

Kolejne preparaty: kangrelor i elinogrel, podobnie jak tikagrelor hamują receptor P2Y₁₂ w sposób odwracalny³⁷. Leki te metabolizowane są w wątrobie oraz jelitach, gdzie powstają aktywne metabolity, które wiążą się z receptorem płytkowym P2Y₁₂ odwracalnie hamując ich aktywność.

Kangrelor

Kangrelor jest nietienopirydynowym, dożylnym, odwracalnym antagonistą receptora P2Y₁₂. Efekt zahamowania płytek osiąga już po ok. 30 minutach od podania, a w przeciągu godziny po odstawieniu leku aktywność płytek wraca do stanu wyjściowego³⁸. Okres półtrwania wynosi 3-5 min, co zapewnia właściwie natychmiastowe zaprzestanie działania leku po jego odstawieniu. Pojawiły się jednak doniesienia o możliwym kompetycyjnym hamowaniu efektu antyagregacyjnego metabolitów tienopirydynowych po podaniu kangreloru³⁹. Badania CHAMPION-PCI oraz CHAMPION-PLATFORM zostały przerwane przedwcześnie ze względu na brak spodziewanej korzyści ze stosowania leku pod względem redukcji ryzyka pierwotnego punktu końcowego (zgon, zawał serca, konieczność ponownej rewaskularyzacji z powodu niedokrwienia w ciągu 48h) w porównaniu z kłopidogrelem. Wykazano natomiast zwiększenie ryzyka wystąpienia dużych krwawień (3,6 v. 2,9% OR 1,26; 95% CI, 0,99 v. 1,60; p=0,06). Zastosowanie kangreloru wiązało się z redukcją ryzyka zakrzepicy w stencie i zgonu w pierwszych 48 godzinach⁴⁰.

W czasie kongresu American College of Cardiology w 2013 roku w San Francisco, przedstawiono najnowsze wyniki badania CHAMPION-PHOENIX. Jest to duże, wieloośrodkowe badanie kliniczne oceniające skuteczność stosowania kangreloru u chorych leczonych PCI z powodu zarówno stabilnej CAD, jak i wszystkich postaci ACS. Do badania włączono 11 145 pacjentów, których randomizowano do dożylnego podania kangreloru (grupa badana, bolus 30 mg / kg + wlew 4 µg/kg/min przez 2-4 godzin) lub do doustnego podania kłopidogrelu (grupa kontrolna, 300 mg lub 600 mg dawki nasycającej + 75 mg dawki podtrzymującej). Pierwszorzędnym złożonym punktem końcowym było wystąpienie zgonu, zawału serca, konieczności rewaskularyzacji z powodu niedokrwienia lub ostrej zakrzepicy w stencie w ciągu 48 od PCI. Pierwszorzędnym punktem końcowym wystąpił istotnie rzadziej w

grupie leczonej kangrelorem: 4,7% vs 5,9%, ($p=0,005$). Na uzyskany wynik wpłynęła głównie mniejsza częstość zawałów serca (3,8% vs 4,7%, $p=0,02$) oraz ostrej zakrzepicy w stencie (0,8% vs 1,4%, $p=0,005$). Obserwowane różnice utrzymały się w obserwacji 30 dniowej. Analiza podgrup wykazała efekt działania kangreloru bez względu na wskazanie do PCI. Krwawienia występowały równie często w grupie badanej i kontrolnej (0,16% vs. 0,11%, $p=0,44$)⁴¹. Korzystny wynik tego badania z pewnością „otworzy furtkę” dożylnym postaciom blokerów receptora P2Y12.

Elinogrel

Elinogrel jest także bezpośrednim inhibitorem receptora P2Y12. Hamuje agregację płytek odwracalnie i jest dostępny w formie doustnej i dożylniej. W dotychczasowych badaniach udowodniono silniejsze działanie antyagregacyjne w porównaniu do klopidogrelu jednak przy większej skłonności do wystąpienia małych (wg protokołu badania) powikłań krwotocznych. Lek jest wciąż w fazie badań klinicznych. W 2012 roku opublikowano wyniki badania INNOVATE PCI. Zostało ono zaprojektowane przede wszystkim w celu oceny bezpieczeństwa, skuteczności i tolerancji elinogrelu u pacjentów poddanych planowej PCI. W części farmakodynamicznej badania pacjenci leczeni elinogrelem w dawce 100 i 150 mg dwa razy dziennie wykazywali większe zahamowanie agregacji płytek w porównaniu z leczonymi klopidogrelem, przy czym u osób otrzymujących dawkę 150 mg obserwowano silniejszy efekt leku. Jeśli chodzi o powikłania krwotoczne u pacjentów leczonych elinogrelem podawanym dożylnie w dawce 120 mg, badacze nie zgłaszali częstszych krwawień dużych i mniejszych w ciągu 24 godzin lub do czasu wypisu ze szpitala. W porównaniu z klopidogrelem wystąpiło więcej krwawień wymagających pomocy medycznej, pod postacią powikłań w miejscu dostępu naczyniowego (elinogrel 47/408 [11.5%] v. klopidogrel 13/208 [6.3%]). Poza tym częstsze krwawienia wymagające pomocy medycznej wystąpiły w ciągu 24 godzin do 120 dni u osób leczonych elinogrelem w dawce 150 mg. Trzeba dodać, że badanie nie miało odpowiedniej siły statystycznej, by ocenić niedokrwienne punkty końcowe⁴². Znaczenie tych wyników musi zostać potwierdzone w badaniach trzeciej fazy.

W roku 2011 ukazały się wytyczne europejskie dotyczące leczenia pacjentów z ACS bez uniesienia odcinka ST⁴³. Jeśli chodzi o terapię przeciwplatekową, po raz pierwszy klopidogrel przesunął się na plan dalszy (IC), ustępując miejsca dwóm nowszym blokerom receptora P2Y12 (prasugrel i tikagrelor), które uzyskały wyższą rekomendację (I B). W roku

2012 ukazały się nowe wytyczne europejskie odnośnie leczenia zawału serca z uniesieniem odcinka ST⁴⁴. Zgodnie z ich treścią, zaleca się stosowanie jednocześnie kwasu acetylosalicylowego (ASA) oraz blokera receptora ADP: a) prasugrelu – u chorych w wieku <75 lat, nieprzyjmujących dotychczas kłopidogrelu, u których nie wystąpił wcześniej udar mózgu ani napad przemijającego niedokrwienia mózgu, b) tikagreloru, c) kłopidogrelu, jeśli prasugrel i tikagrelor są niedostępne lub przeciwwskazane. Jak widać, tu także prasugrel i tikagrelor uzyskały wyższą klasę zaleceń IB, podczas gdy kłopidogrel jedynie IC.

1.4 Zabiegi przezskórnych interwencji wieńcowych i towarzysząca im farmakoterapia

Od czasów kiedy Andreas Grüntzig wykonał pierwszą angioplastykę balonową (wrzesień 1977) dokonał się znaczący postęp w zabiegach PCI. Wprowadzenie stentów metalowych (BMS), a później stentów uwalniających leki antyproliferacyjne (DES) znakomicie poprawiło bezpieczeństwo zabiegów oraz poprawiło wyniki odległe^{45,46}. O ile problem restenozy został skutecznie ograniczony przez DES, o tyle nadal pozostaje problem zakrzepicy w stencie (ST). Jej przyczyny są złożone⁴⁷. Ostra (okołozabiegowa) lub podostra (w pierwszych tygodniach) ST jest najczęściej skutkiem suboptymalnego wyniku zabiegu PCI (niewłaściwe rozprężenie stentu, pozostawienie istotnej dyssekcji ściany naczynia i inne) lub niewłaściwej farmakoterapii przeciwzakrzepowej. W czasach kiedy stosowano wyłącznie stenty BMS ogromna większość przypadków ST zdarzała się w czasie pierwszych 30 dni po zabiegu⁴⁸. W miarę rozpowszechniania się stentów DES obserwowano rosnącą liczbę przypadków późnej (do roku) oraz bardzo późnej (powyżej roku) ST. Za podstawowe przyczyny tego zjawiska uznaje się opóźnioną odbudowę ochronnej warstwy śródbłonka pokrywającego stent oraz prozapalne działanie polimerów uwalniających lek z powierzchni stentu⁴⁹. Bez względu jednak na czas, w którym wystąpi ST uważa się, że najważniejszą jej przyczyną jest niewłaściwe lub przedwczesne zaprzestanie podwójnej terapii przeciwplatekowej (DAT)⁴⁷.

Zgodnie z wytycznymi ESC (European Society of Cardiology) u pacjentów z ACS zaleca się wczesne podanie leków przeciwplatekowych bez względu na to czy ostateczny sposób terapii będzie zachowawczy czy inwazyjny^{44,44}. Wczesne podanie leków odgrywa szczególną rolę u pacjentów poddawanych zabiegom PCI, ze względu na prozakrzepowe działanie samego zabiegu. Zaleca się łączne stosowanie kwasu acetylosalicylowego oraz jednego z blokerów receptora ADP P2Y12 (w połączeniu z ASA); tj. prasugrelu – u chorych

w wieku <75 lat, nieprzyjmujących dotychczas kłopidogrelu, u których nie wystąpił wcześniej udar mózgu ani epizod przemijającego niedokrwienia mózgu, tikagreloru lub kłopidogrelu - jeśli prasugrel i tikagrelor są niedostępne lub przeciwwskazane. Należy zaznaczyć, że prasugrel i tikagrelor uzyskały klasę zaleceń IB, podczas gdy kłopidogrel jedynie IC. Zabiegi planowe powinny być także wykonywane w „osłonie” podwójnej terapii przeciwplatekowej, z tym że nadal preferowany jest kłopidogrel⁵⁰. W czasie PCI konieczne jest także podawanie leków przeciwkrzepliwych, przy czym u chorych stabilnych zaleca się heparynę lub enoksaparynę, natomiast u pacjentów z ACS preferowana jest biwalirudyna lub enoksaparyna. U wszystkich pacjentów wysokiego ryzyka, a także w przypadku wystąpienia niedokrwienych powikłań w czasie zabiegu, zaleca się dożylne podanie inhibitorów receptora glikoproteinowego GP IIb/IIIa.

Aktualne wytyczne mówią także, że wszyscy pacjenci z ACS, bez względu na sposób leczenia (zachowawcze lub inwazyjne) powinni otrzymywać DAT przez minimum 12 miesięcy^{44,45}. Pacjenci poddawani zabiegom planowym powinni stosować DAT przez minimum miesiąc, jeśli użyte stenty należały do grupy BMS oraz 6 – 12 miesięcy po implantacji DES.

1.5 Zjawisko oporności płytek krwi na działanie leków przeciwplatekowych

Pierwsze doniesienie o indywidualnym zróżnicowaniu odpowiedzi na kłopidogrel u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca opublikowane zostało w 2002 roku przez Jaremo i wsp⁵¹. Definicja oporności została podana rok później przez Gurbela i wsp. jako upośledzona reakcja płytek na lek przeciwplatekowy, z zachowaniem zdolności do agregacji. Za kryterium oporności przyjęto wtedy hamowanie zdolności agregacyjnej u nie więcej niż 10% płytek w porównaniu do wartości agregacji zmierzonej wyjściowo⁵². Pomiar odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe, jako bezwzględnej różnicy w odsetku zahamowanych płytek w stosunku do wartości wyjściowej, wydawał się wiarygodnym wskaźnikiem efektywności leczenia. Po wielu latach badań wykazano, że nie jest to jednak optymalna metoda służąca identyfikacji pacjentów podwyższonego ryzyka wystąpienia zdarzeń niedokrwienych. Z uwagi na znaczne osobnicze zróżnicowanie wartości wyjściowej agregacji indukowanej przez ADP, u pacjentów z początkową niską agregacją, którzy pomimo słabej odpowiedzi na lek przeciwplatekowy wciąż posiadali niskie wartości agregacji ryzyko wystąpienia zdarzeń niedokrwienych było przeszacowane. Natomiast niedoceniane było ryzyko u pacjentów,

którzy, co prawda dobrze odpowiadali na kłopidogrel, ale wciąż pozostawali w przedziale wysokich wartości ze względu na wysoką wyjściową reaktywność płytek. Z tego powodu, w roku 2010 Bonello i wsp. opublikowali konsensus, w którym zaproponowali nową definicję oporności na kłopidogrel⁵³. Postulowano podanie bezwzględnej wartości punktu odcięcia reaktywności płytek podczas terapii przeciwplateletowej dla powszechnie stosowanych metod pomiaru. Wprowadzono pojęcie *high on-treatment platelet reactivity* (HTPR), a więc zwiększonej reaktywności płytek krwi pomimo leczenia przeciwplateletowego. Wiele badań wykazało istotny wpływ HTPR na niekorzystne zdarzenia kliniczne. Praca Breet i wsp. z 2010 roku, przeprowadzona na grupie 1069 chorych poddanych planowej PCI wykazała istotny wzrost częstości występowania zdarzeń niedokrwiennych w obserwacji rocznej u pacjentów z wysoką aktywnością płytek krwi (HR:2,0)⁵⁴. Podobnie Sibbing i wsp. udowodnili istotnie częstsze występowanie zakrzepicy w stencie w grupie 1608 pacjentów poddanych PCI z implantacją stentu uwalniającego lek antyproliferacyjny DES (ang. Drug Eluting Stent), u których stwierdzono zwiększoną reaktywność płytek podczas leczenia kłopidogrelem w obserwacji 30 dniowej (OR:9,4)⁵⁵.

1.6 Przyczyny oporności płytek krwi na kłopidogrel

Częstość występowania zjawiska oporności na kłopidogrel szacowana jest w piśmiennictwie na 5-44%⁵⁶. Osłabienie odpowiedzi na lek spowodowane jest przez wiele czynników takich jak brak właściwej współpracy pacjenta z lekarzem⁵⁷, czy też różnice indywidualne we wchłanianiu leku z przewodu pokarmowego - szczególnie u pacjentów otyłych, w starszym wieku oraz z cukrzycą^{58, 59}. Wpływ otyłości to nie tylko problem niedostatecznej dawki leku w stosunku do masy ciała chorego ale również stanu zapalnego aktywującego płytki poprzez receptor dla leptyny (produkowanej przez komórki tłuszczowe)⁶⁰. Inne czynniki odpowiedzialne za oporność na lek to osobnicza odmienność genetyczna warunkująca zróżnicowaną szybkość przemiany kłopidogrelu na kilku etapach: oksydacji przez cytochrom P 450 (polimorfizm genetyczny cytochromu)^{61,62}, aktywacji receptorów trombinowych⁶³ oraz obecność innych enzymów warunkujących agregację płytek (np. paroxonaza-1). Istotną rolę odgrywają również możliwe interakcje z innymi lekami (np. inhibitorami pompy protonowej)⁶⁴, a także stan immunologiczny chorego (infekcje, choroby nowotworowe i inne). Wiele badań wskazuje także na zasadniczy wpływ wyjściowego poziomu aktywności płytek, na efektywność leczenia przeciwplateletowego⁶⁵.

W dużym badaniu farmakodynamicznym z 2005 roku wykazano wpływ dawki kłopidogrelu na zjawisko oporności. Wśród pacjentów, którzy otrzymali dawkę nasycającą 300 mg odnotowano ok. 30% przypadków oporności, natomiast zastosowanie 600 mg dawki nasycającej zmniejszyło ten odsetek do zaledwie 8%⁶⁶. Muller i wsp. wykazali znaczenie nie tylko wielkości dawki kłopidogrelu, ale również czasu podania dawki nasycającej⁶⁷.

W badaniu ISAR-CHOICE najsilniejszy efekt antyagregacyjny również obserwowano po zastosowaniu dawki nasycającej 600 mg kłopidogrelu, przy czym zwiększenie dawki do 900 mg nie wiązało się już z dalszym istotnym hamowaniem aktywności płytek, prawdopodobnie z uwagi na ograniczone możliwości jelitowej absorpcji leku⁶⁸.

Zjawisko występowania osobniczych różnic w odpowiedzi na działanie kłopidogrelu wciąż nie zostało do końca wyjaśnione. Badacze podejmują próby znalezienia nowych czynników, które mogą mieć wpływ na oporność na leki przeciwplatekcyjne. Geisler i wsp. w 2007 roku opublikowali badanie, w którym stworzyli kwestionariusz „Predict Score” składający się z jedenastu czynników klinicznych. Do badania włączono 1092 pacjentów poddanych przezskórnej angioplastyce wieńcowej z powodu stabilnej choroby wieńcowej jak również ACS. Celem pracy było zidentyfikowanie cech klinicznych, które wywierają wpływ na zwiększoną reaktywność płytek pomimo stosowania podwójnej terapii przeciwplatekcyjnej. W badaniu udowodniono istotny wpływ rozpoznania ACS, zmniejszonej frakcji wyrzutowej (EF<55%), cukrzycy, niewydolności nerek oraz wieku powyżej 65 lat na zwiększoną rezydualną aktywność płytek krwi. Wykazano również, że pacjenci, którzy mieli 7-9 punktów w tej skali cechowali się ponad 3 razy większym prawdopodobieństwem wystąpienia zwiększonej aktywności płytek w porównaniu do pacjentów z wynikiem PS=0. Wysokie wartości PS korelowały również ze zwiększoną częstością wystąpienia niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych w obserwacji 30- dniowej (zgon, zawał serca, udar mózgu)⁶⁹.

Polimorfizm genetyczny

Istotnym zagadnieniem pozostaje oporność na kłopidogrel uwarunkowana genetycznie- związana z ekspresją zmutowanego allelu upośledzonego metabolizmu kłopidogrelu CYP2C19*2⁷⁰. Do bioaktywacji kłopidogrelu dochodzi w dwuetapowym procesie wątrobowej oksydacji z udziałem enzymów cytochromu P450. Podczas pierwszego etapu katalizowanego przez CYP1A2, CYP2B6 i CYP2C19 dochodzi do wytworzenia 2-oxo-

klopidogrelu⁷¹. Etap drugiego przejścia przez wątrobę i wytworzenia aktywnej formy leku odbywa się przy udziale enzymów CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 i CYP3A4⁷². Najważniejszą rolę odgrywa CYP2C19 odpowiedzialny za wytworzenie metabolitu posiadającego grupę tiolową, którego stereoizomer H4 jest aktywną formą leku. U zdrowych nosicieli allelu CYP2C19*2 wykazano zmniejszone stężenie aktywnego metabolitu klopidogrelu we krwi oraz słabsze zahamowanie agregacji w porównaniu z tzw. „noncarriers” którzy nie posiadali tej mutacji. Wiele dużych badań klinicznych potwierdziło, iż obecność polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (*ang. single-nucleotide polymorphism, SNP*) CYP2C19*2 lub *3 koreluje ze słabszą inhibicją płytek krwi, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zdarzeń niedokrwienych, m.in.. zakrzepicy w stencie⁷³. W niedawno opublikowanej przez Hullota i wsp. metaanalizie wykazano, że nosiciele allelu CYP2C19*2 z chorobą niedokrwinną serca mają o ponad 30% wyższe ryzyko wystąpienia niepożądanych zdarzeń sercowych MACE (*ang. major adverse clinical events*) w porównaniu do tzw. „noncarriers” (9,7% v. 7,8%; (OR):1,29, p<0,001)⁷⁴. Doniesienia naukowe podają, że częstość występowania zmutowanego allelu CYP2C19*2 w populacji rasy kaukaskiej wynosi ok. 30%⁷⁵.

Przełamywanie oporności na klopidogrel

Teoretycznie istnieją dwa podstawowe sposoby przełamania zjawiska oporności na klopidogrel: zwiększenie dawki klopidogrelu lub zastosowanie nowych, skuteczniejszych leków przeciwplatek. Należy zaznaczyć, że dotychczasowe badania nie wykazały w sposób jednoznaczny znaczenia klinicznego przełamania oporności płytek na ten lek.

W 2011 r. opublikowano wyniki dużego badania GRAVITAS, na grupie ponad 2000 pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwinną serca lub zawałem serca bez uniesienia odcinka ST leczonych PCI. Badano wpływ zastosowania dużej dawki podtrzymującej klopidogrelu (150 mg/dzień) w porównaniu ze standardową dawką leku (75 mg/dzień) u chorych ze zwiększoną reaktywnością płytek ocenianą za pomocą aparatu VerifyNow. Wykazano, iż podwojenie dawki podtrzymującej klopidogrelu u pacjentów z HTPR nie wiązało się ze zmniejszeniem częstości występowania zdarzeń wieńcowych: zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych, niezakończonych zgonem zawałów serca oraz zakrzepicy w stencie⁷⁶. Wyniki badania GRAVITAS nie potwierdziły zatem zasadności stosowania wyższych dawek klopidogrelu u chorych z opornością na lek.

TRIGGER-PCI to kolejne duże badanie mające na celu wykazanie klinicznych korzyści z przełamania oporności laboratoryjnej na leki przeciwplatek. Pierwotnie zaplanowano włączenie do badania 2150 chorych. Okres obserwacji wynosił sześć miesięcy z oceną pierwszorzędnego punktu końcowego (zawał serca lub zgon z przyczyn sercowych). Zwiększona reaktywność płytek u chorych leczonych kłopidogrelem stwierdzana była jednak istotnie rzadziej niż zakładano. Wyniki badania TRIGGER-PCI opublikowane w 2012 r. wykazały, że zmiana leczenia z kłopidogrelu 75mg/dzień na prasugrel 10mg/dzień u pacjentów poddanych elektywnej PCI przełożyła się na istotną redukcję liczby tych z wysoką aktywnością płytek mimo leczenia. Niestety, niższa od zakładanej częstość występowania pierwszorzędnego punktu końcowego spowodowała, że ocena klinicznego efektu zastosowanej strategii leczenia była niemierniadowa i badanie zostało przedwcześnie przerwane⁷⁷.

Na konferencji EuroPCR w 2011r. przedstawiono wyniki badanie RECLOSE 2 ACS. Wykazano w nim, że słaba odpowiedź na nasycającą dawkę kłopidogrelu (600 mg) dwukrotnie zwiększa ryzyko zgonu sercowego pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym w ciągu pierwszych dwóch lat. Zwiększenie dawki podtrzymującej do 150-300 mg/dzień lub zmiana leku na tiklopidynę w dawce 500-1000 mg/dzień nie zmniejszyły jednak tego ryzyka. RECLOSE 2 ACS jest pierwszym badaniem z prospektywną oceną rezydualnej czynności płytek po podaniu nasycającej dawki kłopidogrelu u pacjentów z ACS i z długoterminową obserwacją (mediana czasu obserwacji: 2,8 roku)⁷⁸. Wyniki tego badania były oczekiwane z uwagi na niepowodzenie wcześniejszych prób korzystnej modyfikacji terapii w oparciu o przyłóżkowe testy VerifyNow, które podjęto w badaniach TRIGGER PCI oraz GRAVITAS. Oba badania przeprowadzono w populacji pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową, co skutkowało zbyt małą częstością występowania niekorzystnych zdarzeń koniecznych do wykazania różnic między grupami. W badaniu RECLOSE 2 ACS u 248 spośród 1789 chorych (13,9%) obserwowano wysoką rezydualną aktywność płytek definiowaną tu jako agregację płytek >70% po stymulacji 10 μ mol/l ADP w agregometrze świetlnym (*ang. light transmission aggregometry, LTA*). W ciągu dwuletniej obserwacji pierwszorzędnego punktu końcowego (zgon sercowy, zawał, pilna rewaskularyzacja lub udar) stwierdzono istotnie częściej w grupie HRPR. Częstość zgonów sercowych była ponad dwukrotnie wyższa w tej grupie, podobnie dwa razy częściej występowała tu zakrzepica w stencie. Trzyletni okres wolny od pierwszorzędnego punktu końcowego obserwowano u 88% badanych z prawidłową odpowiedzią na kłopidogrel oraz u 79% w grupie HRPR (log rank $p < 0,001$).

Podobnie 3-letni okres wolny od zgonu z przyczyn sercowych wystąpił odpowiednio u 94% i 87% (log rank $p < 0,001$). Różnice te utrzymywały się pomimo prób redukcji ryzyka w grupie HRPR poprzez podwojenie dawki podtrzymującej ze 150 mg do 300 mg lub konwersji do tiklopidyny w dawce 500–1000mg. Niestety, badanie RECLOSE 2 nadal nie udzieliło odpowiedzi na dwa podstawowe pytania dotyczące zasadności rutynowego oznaczenia aktywności płytek w podobnej populacji pacjentów oraz sposobu przełamania stwierdzonej oporności.

Nowe, silniejsze blokery receptora P2Y₁₂, przynajmniej w teorii powinny skuteczniej przełamywać oporność na kłopidogrel. Zarówno prasugrel, jaki i tikagrelor charakteryzują się większą niż kłopidogrel skutecznością w zapobieganiu wystąpieniu incydentów sercowo-naczyniowych. Wykazały to, cytowane wcześniej, badania TRITON-TIMI-38, oraz PLATO. Badanie RESPOND wykazało, że u pacjentów opornych na kłopidogrel, po zmianie leczenia na tikagrelor, stopień zahamowania agregacji płytek krwi był istotnie silniejszy i znajdował się poniżej punktu odcięcia związanego z podwyższonym ryzykiem wystąpienia zdarzeń niedokrwienych. Udowodniono również, że niezależnie od tego czy pacjenci przed konwersją do tikagreloru zakwalifikowani byli jako wrażliwi czy oporni na kłopidogrel, stopień zahamowania aktywności płytek był podobny w obu grupach⁷⁹. Mimo wielu dowodów przewagi działania obu nowych leków antyagregacyjnych w porównaniu z kłopidogrelem, nadal brakuje bezpośrednich dowodów uzasadniających rutynową zamianę leków u pacjentów z wysoką aktywnością płytek w czasie leczenia kłopidogrelem.

W badaniu RESET GENE TRIAL z 2012 roku wykazano, iż przełamanie oporności zwiększeniem dawki kłopidogrelu do 150 mg dziennie było możliwe jedynie u chorych, którzy nie posiadali niekorzystnej mutacji allelu CYP2C19. Natomiast zastosowanie prasugrelu, w dawce 10 mg/dzień umożliwiło przełamanie oporności niezależnie od obecności wadliwego wariantu tego allelu⁸⁰.

1.7 Sposoby monitorowania wpływu leków przeciwplatek na zahamowanie funkcji płytek

Efekt antyagregacyjny leków przeciwplatek można oceniać oznaczając fenotyp, a więc stopień zahamowania agregacji płytek krwi lub genotyp, czyli mutacje alleli kodujących powstawanie enzymów odpowiedzialnych za upośledzenie metabolizmu kłopidogrelu m.in. CYP2C19, CYP3A4, CYP1A2.

W niedawno opublikowanym badaniu PEGASUS oceniano wartość prognostyczną obu tych metod. U 416 pacjentów oznaczano występowanie alleli upośledzonej aktywacji kłopidogrelu – CYP2C19*2 oraz ultra szybkiego metabolizmu leku – CYP2C19*17. Z użyciem trzech różnych metod oznaczano również stopień zahamowania agregacji płytek krwi (fenotypowanie). Oznaczenie fenotypu okazało się lepszym prognostykiem wystąpienia zakrzepicy w stencie podczas rocznej obserwacji. Badanie to wykazało również jednoznacznie, że pacjenci z upośledzoną odpowiedzią na kłopidogrel zidentyfikowani za pomocą agregometrii impedancyjnej (metoda stosowana także w moim badaniu), mieli istotnie większe ryzyko wystąpienia zakrzepicy w stencie oraz MACE niż grupa chorych wrażliwych na kłopidogrel (12,5% vs. 0,3%, $P < 0,001$, oraz 18,5% vs. 11,3%, $P = 0,022$)⁸¹.

Metody laboratoryjne pomiaru stopnia zahamowania aktywności płytek krwi

Istnieje wiele metod oznaczania skuteczności blokowania funkcji płytek krwi przez leki. Obok złożonych urządzeń wykonujących skomplikowane pomiary laboratoryjne istnieją proste aparaty do zastosowania przyłóżkowego (*ang. point-of-care POC*). Do najczęściej stosowanych metod laboratoryjnych oceniających odpowiedź na leczenie przeciwplatekowe należą: cytometria przepływowa, agregometria światła widzialnego oraz agregometria impedancyjna.

Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa jest wygodną techniką diagnostyczną pozwalającą na szybki pomiar liczby komórek podczas ich liniowego przepływu w komorze pomiarowej. Strumień komórek przepływa przed układami rejestrującymi (fotokomórkami lub fotopowielaczami), w którym pojedyncze komórki są oświetlane przez cienkie wiązki spolaryzowanego światła lasera. Komórki rozpraszają, załamują, odbijają i absorbują światło przechodzące przez

komorę pomiarową, powodując chwilowe zmiany sygnału elektrycznego w elementach rejestrujących. Metoda umożliwia pomiar aktywności płytek oraz monitorowanie terapii przeciwplatek. Ocenia również interakcję między płytkami i leukocytami, a także pozwala na wykrywanie nabytych i wrodzonych defektów trombocytów⁸². Pomiary muszą być jednak wykonywane w wyspecjalizowanym laboratorium.

Agregometria oparta o transmisję światła widzialnego (ang. Light Transmission Aggregometry, LTA)

Metoda została opracowana w 1960 roku i jest wykorzystywana do diagnozowania zarówno nabytych jak i wrodzonych defektów płytek krwi. Agregację płytek ocenia się ilościowo, mierząc transmisję promienia świetlnego przechodzącego przez ich zawiesinę. Zjawisko to jest proporcjonalne do gęstości zaktywowanych płytek w agregometrze. W badaniach klinicznych agregację bada się z użyciem bogatego w płytki osocza z cytrynianem (cPRP). Krew jest gromadzona w probówkach z cytrynianem sodu i odwirowywana przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Metoda ta jest dokładna, jednak czasochłonna i powinna być stosowana jedynie w specjalistycznych laboratoriach⁸³.

PFA-100

Aparat PFA-100 (Dade-Behring, Deerfield, IL) został wprowadzony jako alternatywa dla mierzenia czasu krwawienia w ocenie funkcji płytek. W porównaniu z innymi aparatami każde laboratorium używające PFA-100 musi ustalić wartości wyjściowe i zakresy norm w zdrowej grupie kontrolnej. PFA-100 cechuje się brakiem czułości w stosunku do łagodnych wrodzonych oraz indukowanych lekami defektów płytek. Na wynik tego badania wpływa wiele czynników dodatkowych, takich jak: liczba płytek, reakcja płytek na kolagen, krwinki czerwone, czynnik von Willebranda i inne. Dlatego też PFA-100 nie jest polecany dla monitorowania skuteczności terapii przeciwplatek⁸⁴.

VASP

Jest to szeroko rozpowszechniona metoda, która również bazuje na zastosowaniu cytometrii przepływowej. VASP (ang. *Vasodilator Stimulated Phosphoprotein Phosphorylation*) to wewnątrzkomórkowe białko regulatorowe aktyny. Defosforylacja VASP skutkuje aktywacją receptora płytkowego P2Y₁₂. Natomiast zahamowanie tego receptora przez klopidogrel oraz aktywacja prostaglandyny E₁ (PGE₁) indukuje fosforylację VASP z udziałem kinaz. Poziom ufosforylowanego VASP w próbkach krwi pełnej odzwierciedla zatem

stopień zahamowania aktywności płytek krwi przez leki przeciwplatekcyjne. Do pomiaru VASP służy cytometria przepływowa, co sprawia, że pozyskanie wyników wymaga zaangażowania doświadczonego personelu w laboratorium⁸⁵.

Do najczęściej stosowanych testów przyłóżkowych (*ang. point-of-care assay, POC*) należą VerifyNow oraz agregometria impedancyjna (Multiplate).

VerifyNow

VerifyNow (Accumetrics, Inc., San Diego, CA) jest prostym w użyciu, zautomatyzowanym urządzeniem do mierzenia zdolności płytek do wiązania się z fibrynogenem za pośrednictwem receptora GPIIb/IIIa - w próbkach krwi pełnej. Gdy aktywne płytki wiążą się z fibrynogenem i rozpraszają w roztworze, następuje zmiana w transmisji świetlnej, która jest rejestrowana w jednostkach agregacji płytek. Metoda ta jest wygodna ze względu na łatwość obsługi aparatu, szybkość pomiarów (około 5 minut) oraz dużą swoistość wyników, które w badaniu agregacji indukowanej ADP jakościowo przewyższają LTA⁸⁶. Podstawową wadą urządzenia jest wysoka cena testów.

Multiplate

Multiplate (Dynabyte, Monachium) analizuje funkcję płytek z wykorzystaniem zasad agregometrii impedancyjnej. Płytki ściśle przylegają do metalowych elektrod prowadząc do zmiany przewodnictwa (oporności), które jest rejestrowane w sposób ciągły. Rozcieńczenie próbki oraz hematokryt wpływają na wyniki oznaczenia jedynie w niewielkim stopniu. Do aktywacji płytek wykorzystuje się ADP lub kolagen. Krew pełną pobiera się do probówek z cytrynianem lub hirudyną, a następnie rozcieńcza solą fizjologiczną i po dodaniu testów zawierających aktywatory płytek, poddaje analizie. Metoda jest wygodna ze względu na prostotę, niski koszt i niewielką ilość krwi potrzebnej do jej wykonania⁸⁷.

2. Cele badania

Podstawowym celem badania była ocena wartości prognostycznej wybranych parametrów klinicznych i laboratoryjnych (Predict Score, PS) w przewidywaniu wystąpienia oporności płytek krwi na leczenie kłopidogrelem oraz związanego z tym ryzyka wystąpienia niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych i mózgowych (MACCE) u pacjentów poddawanych zabiegom przezskórnej interwencji wieńcowej.

Ponadto praca miała na celu zbadać:

- Częstość występowania oporności na kłopidogrel u pacjentów poddawanych zabiegom przezskórnej interwencji wieńcowej, badanej metodą agregometrii impedancyjnej (Multiplate)
- Wpływ oporności płytek krwi na kłopidogrel na wystąpienie niekorzystnych zdarzeń niedokrwiennych i krwotocznych w badanej populacji pacjentów
- Częstość występowania polimorfizmu allelu CYP2C19 w populacji pacjentów poddawanych zabiegom przezskórnej interwencji wieńcowej
- Wpływ obecności niekorzystnych wariantów allelu CYP2C19 na stopień zahamowania agregacji płytek krwi oraz niekorzystne zdarzenia sercowo-naczyniowe niedokrwienne i krwotoczne.

3. Materiał i metody

Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 86/11). Przed włączeniem do badania uzyskano świadomą, pisemną zgodę od wszystkich pacjentów, zgodną ze wzorem zatwierdzonym przez Komisję Bioetyczną.

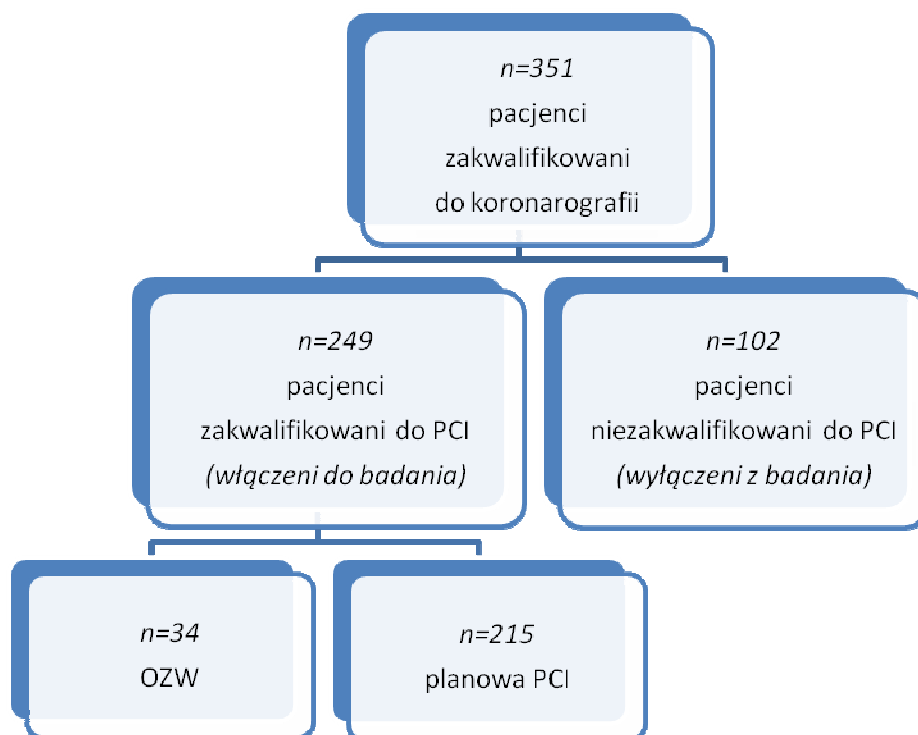
3.1 Badana populacja

Kryteria włączenia do badania:

- 1) Wiek powyżej 18 lat
- 2) Pisemna zgoda na udział w badaniu
- 3) Pacjenci leczeni zabiegiem angioplastyki wieńcowej z implantacją stentu z powodu stabilnej choroby wieńcowej, dławicy niestabilnej lub zawału serca bez przetrwałego uniesienia odcinka ST.

Do badania wstępnie zakwalifikowano 351 chorych przyjętych do I Kliniki Kardiologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu celem wykonania koronarografii. U 102 z nich nie stwierdzono wskazań do PCI i wyłączono ich z badania. Ostatecznie, kryteria włączenia spełniło 249 pacjentów (*Ryc.1.*).

Do badania włączeni zostali zarówno pacjenci poddawani zabiegom elektywnej przezskórnej angioplastyki wieńcowej (n=215; 61 kobiet i 154 mężczyzn) jak i chorzy z ostrym zespołem wieńcowym (n=34, 12 kobiet i 22 mężczyzn). Wśród pacjentów przyjętych z powodu ACS u 28 rozpoznano zawał serca bez uniesienia odcinka ST (NSTEMI), a u pozostałych 6 niestabilną dławicę piersiową. Okres włączania do badania wynosił 11 miesięcy i trwał od marca 2011 do stycznia 2012 roku.



Ryc.1. Schemat badania

Pacjentom przyjmującym kłopidogrel wraz z ASA przynajmniej 5 dni przed zabiegiem nie podawano dodatkowej dawki nasycającej leków. Chorym nie otrzymującym wcześniej kłopidogrelu podawano dawkę nasycającą 300 mg dzień przed zabiegiem, jeśli byli przyjmowani w trybie planowym, lub dawkę 600 mg w dniu zabiegu, jeśli powodem przyjęcia był ACS.

3.2 Oznaczenie zahamowania agregacji płytek krwi

Od wszystkich 249 pacjentów pobrane zostały próbki krwi celem oznaczenia stopnia zahamowania agregacji płytek krwi przy użyciu agregometru impedancyjnego Multiplate (Dynabyte). U pacjentów przyjętych do planowego zabiegu PCI przyjmujących kłopidogrel przed hospitalizacją próbki krwi pobierane były w dzień po zabiegu PCI natomiast u chorych z ACS próbka krwi pobrana była w 3. dniu po zabiegu.

Zgodnie z obowiązującą definicją oporności dla tej metody (zwiększona reaktywność płytek pomimo leczenia), z ang. High On-Treatment Platelet Reactivity, HTPR, z 2010 roku⁵³ za

punkt odcięcia przyjęto wartości powyżej 468 AU/min. Chorzy z wynikami poniżej 468 AU/min byli kwalifikowani jako wrażliwi na kłopidogrel.

W związku z tym, że zaproponowany powyżej podział binarny (oporny/wrażliwy), mimo że powszechnie stosowany, jest mało dokładny, pacjentów przydzielono do jednej z trzech grup (tercyli), w zależności od uzyskanego wyniku pomiaru. Wyniki uporządkowano od wartości najmniejszej do największej. Mieściły się one w przedziale od 45-975 AU/min (Ryc. 5). Punktem odcięcia dla poszczególnych tercyli była wartość wyznaczająca 1/3 uporządkowanych rosnąco wyników pomiaru zahamowania agregacji w badanej grupie (190 AU/min) oraz wartość odpowiadająca 2/3 wyników (312 AU/min). Po zastosowaniu tych punktów odcięcia uzyskano trzy tercyle zawierające następujący przedział wartości oznaczeń: tetryl 1 (T1): 45-190 AU/min, tetryl 2 (T2): 191-312 AU/min, tetryl 3 (T3): 313-975 AU/min (Tab. 1.).

Tab. 1. Punkty odcięcia wartości zahamowania agregacji płytek krwi dla poszczególnych tercyli.

| | | AU/min |
|-----------------|------|---------|
| Tercyl 1 | (T1) | 45-190 |
| Tercyl 2 | (T2) | 191-312 |
| Tercyl 3 | (T3) | 313-975 |

Pobieranie i przygotowanie próbek krwi

Próbki krwi z żyły obwodowej (około 5 ml, z pominięciem pierwszych 2-3 ml) zostały pobrane do probówek z hirudyną w sposób zgodny z zaleceniami producenta aparatury pomiarowej oraz odczynników. Stosowano igły o rozmiarze 21 G lub większym celem redukcji ryzyka potencjalnej aktywacji płytek krwi w trakcie pobierania próbek. Procedura pomiaru odbywała się zgodnie z zaleceniami producenta odczynników. U pacjentów przyjętych do planowego zabiegu PCI przyjmujących kłopidogrel przed hospitalizacją próbki krwi pobierane były w dzień po zabiegu PCI (rano przed otrzymaniem dawki podtrzymującej

leku). U pacjentów z ACS próbka krwi pobrana była w 3. dniu po zabiegu PCI (rano przed otrzymaniem dawki podtrzymującej kłopidogrelu).

Metodyka pomiaru zahamowania agregacji

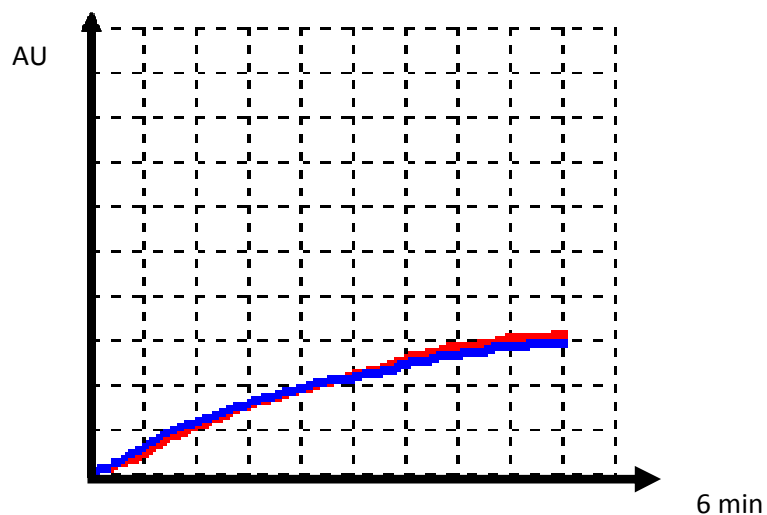
Stopień zahamowania agregacji płytek krwi został określony za pomocą agregometru impedancyjnego Multiplate Analyzer firmy Dynabyte, MEA (ang. Multiplate Electrode Aggregometry, Ryc. 2) przy użyciu testu ADP w próbce krwi pełnej (20 μ M roztwór ADP). System wykrywa zmianę przewodnictwa elektrycznego spowodowanego adhezją i agregacją płytek krwi na dwóch niezależnych elektrodach umieszczonych w kuwetach. Do próbki krwi zmieszanej z antykoagulantem - hirudyną dodawano roztwór 0,9% NaCl w stosunku 1:2. Roztwór poddawano inkubacji w temperaturze 37 °C przez 3 minuty. Następnie dodano agonistę - ADP, a zapis zmian impedancji elektrod był rejestrowany przez aparat w sposób ciągły przez 6 minut. Średnie wartości z dwóch niezależnych pomiarów (z dwóch elektrod) były wyrażane w jednostkach pola pod krzywą AUC (ang. *area under the curve*). Pacjenci, którzy uzyskali wynik > 468 AU/min zostali sklasyfikowani jako oporni na działanie kłopidogrelu, natomiast pacjentów z wynikiem <468 uznano za wrażliwych na działanie leku.



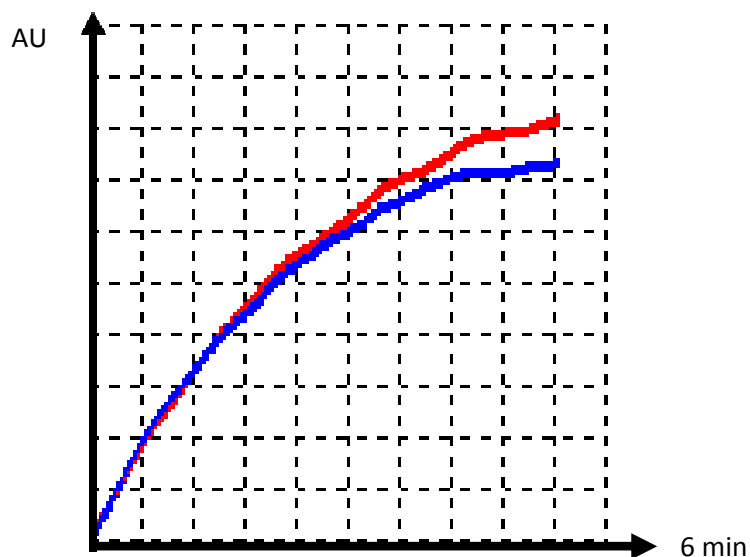
Ryc.2. Aparat Multiplate Electrode Analyser

Poniżej przedstawiono przykładowe wyniki pomiarów uzyskiwane przy użyciu aparatu Multiplate (Ryc. 3.).

(A)



(B)



Ryc.3. Analiza czynności płytek krwi w systemie Multiplate, przykładowe wyniki pomiarów zahamowania agregacji: A) Pole pod krzywą: 122 AU/min, pacjent wrażliwy na kłopidogrel, B) Pole pod krzywą: 783 AU/min, pacjent oporny na kłopidogrel.

3.3 Predict Score

Celem znalezienia czynników ryzyka wystąpienia oporności płytek krwi na kłopidogrel oraz wystąpienia niekorzystnych zdarzeń sercowo naczyniowych analizowano wybrane parametry demograficzne, kliniczne oraz laboratoryjne, które wpisywano do kwestionariusza Predict Score (Tab. 2). Powyższe czynniki wybrano na podstawie analizy danych z piśmiennictwa^{88,89,90,91,92,93} oraz z wcześniejszych własnych obserwacji klinicznych. Dla każdego czynnika ryzyka jaki występował u danego pacjenta przydzielano 1 punkt. Ich suma u danego pacjenta dawała sumaryczną wartość Predict Score. Wartość Predict Score mogła się wahać między 0 a 14.

Tab. 2. Kwestionariusz Predict Score

| <i>Predict Score</i> |
|--|
| Ostry zespół wieńcowy |
| Wiek > 65lat |
| EF < 55% |
| Cukrzyca |
| Niewydolność nerek (GFR < 60 ml/min/1,73m²) |
| CRP > 9 mg/L |
| BMI > 25 |
| NT-proBNP > 125 pg/ml |
| PLT > 390 tys./ mm³ |
| WBC > 10 tys./ mm³ |
| Bilirubina > 17 µmol/l |
| Zastosowanie Morfiny |
| Stosowanie statyn |
| Przyjmowanie PPI |

EF - frakcja wyrzutowa, CRP - białko c-reaktywne, NTpro BNP - mózgowy peptyd natriuretyczny, BMI - body mass index - wskaźnik masy ciała, PLT - płytki krwi, WBC - leukocyty, PPI – inhibitory pompy protonowej

3.4 Badania genetyczne

Celem rozpoznania wariantów genetycznych CYP2C19 zastosowano metodę reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym *HRM Real-Time PCR* (ang. *high resolution melting, HRM; polymerase chain reaction, PCR*). Celem wykrycia polimorfizmu użyto metody SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*). Badania zostały wykonane w Centrum Badań DNA w Poznaniu.

Do badania wybrano następujące SNP zlokalizowane w obrębie genu CYP2C19:

- rs4244285 – w sekwencji kodującej gen odpowiada za istnienie polimorfizmu CYP2C19*2 (681G>A)
- rs4986893) – w sekwencji kodującej gen odpowiada za istnienie polimorfizmu CYP2C19*3 (636G>A)

Materiałem do badań było DNA uzyskane z limfocytów krwi obwodowej na drodze izolacji zgodnie z protokołem zestawu Dneasy Blood Mini Kit firmy A&A Biotechnology. Krew pacjentów zbierano do probówek z EDTA i przechowywano w temperaturze -20°C. Pacjenci byli informowani o celu badań i wyrażali zgodę na formularzu zatwierdzonym przez Komisję Bioetyczną. Otrzymane próbki z czystym materiałem genetycznym posłużyły, jako matryca w reakcji HRM real-time PCR z użyciem specyficznych primerów.

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) opiera się na metodzie kopiowania i powielania wybranych odcinków DNA. Reakcja PCR składa się z kilku powtarzających się w kolejnych cyklach etapów. Należą do nich: denaturacja podwójnych nici, przyłączenie starterów oraz synteza nowych, komplementarnych nici. Metoda ta pozwala na szybką, wydajną i tanią amplifikację *in vitro* fragmentów DNA, ponadto stała się podstawą do stworzenia i rozwoju wielu innych metod. W kolejnych etapach amplifikacji użyto następujących primerów specyficznych dla genu CYP2C19 do oceny wariantów *2 i *3:

CYP2C19*2 F 5' TGCAATAATTTTCCCACTATCA 3'

CYP2C19*2 R 5' CCTTGCTTTTATGGAAAGTGA 3'

oraz

CYP2C19*3 F 5' CCTTGCTTTTATGGAAAGTGA 3'
CYP2C19*3 R 5' TTTTGGCTTCCTGAGAAACCA 3'

Do przeprowadzenia reakcji PCR użyto 23,5 µl mieszaniny do każdej probówki, w której znajdowało się 1,5 µl DNA. Mieszaninę przygotowano wcześniej w ilości wystarczającej dla wszystkich badanych prób.

3.5 Pozostałe badania

U wszystkich pacjentów, przy przyjęciu do szpitala, pobrano krew do wykonania następujących badań: morfologia (WBC- liczba krwinek białych, RBC- liczba krwinek czerwonych, hemoglobina, hematokryt, MPV- średnia objętość trombocytu), OB, glukoza, elektrolity, kreatynina, lipidogram (HDL, LDL, trójglicerydy), AlAT, AspAT, CRP, NT-proBNP, bilirubina, CPK, CK-MB. U chorych z ACS dodatkowo wykonywano oznaczenia troponiny. Badania laboratoryjne zostały wykonane w Centralnym Laboratorium Medycznym Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego w Poznaniu.

U wszystkich chorych wykonano standardowy 12-odprowadzeniowy zapis EKG z przesuwem papieru 25mm/s i cechą 1mV przy przyjęciu na oddział oraz po wykonaniu zabiegu PCI.

U każdego pacjenta wykonano przezklatkowe badanie echokardiograficzne aparatem VIVID 7 GE Medical System przy użyciu głowicy sektorowej o częstotliwości 2,5 MHz.

3.6 Obserwacje

Wszyscy pacjenci (n=249) zostali poddani obserwacji szpitalnej oraz 12. miesięcznej (kontakt telefoniczny), w trakcie której oceniano wystąpienie następujących zdarzeń klinicznych: zgon, zawał serca, zakrzepica w stencie, udar mózgu, przejściowe niedokrwienie mózgu, oraz krwawienia do OUN oraz łagodne powikłania krwotoczne wg klasyfikacji GUSTO⁹⁴: krew w moczu, stolcu, krwawienie z nosa i dziąseł (wg).

Definicje zdarzeń klinicznych:

Zawał serca

W czasie hospitalizacji, u pacjentów z wyjściowo prawidłowymi wartościami poziomu enzymów martwiczych, zawał serca rozpoznawano, jeśli w kontrolnym badaniu wykonanym nie wcześniej niż 24 godziny po zabiegu stwierdzano wzrost poziomu CKMB, przynajmniej trzy razy powyżej normy. U pacjentów z wyjściowo podwyższonym poziomem CKMB zawał serca rozpoznawano w przypadku stwierdzenia wzrostu CKMB przynajmniej trzy razy powyżej normy i przynajmniej dwukrotnie większy od najniższego poziomu zmierzonego przed zabiegiem PCI. W każdym przypadku zawał serca rozpoznawano, jeśli po zabiegu PCI stwierdzano w zapisie EKG wytworzenie nowych, patologicznych załamków Q, których nie stwierdzano przy przyjęciu (zawał serca z załamkiem Q).

W czasie obserwacji odległych zawał serca rozpoznawano na podstawie kart informacyjnych z hospitalizacji pacjentów (STEMI lub NSTEMI).

Udar mózgu

W czasie hospitalizacji udar mózgu rozpoznawano na podstawie objawów klinicznych, takich jak pojawienie się nagłego ubytku neurologicznego (objawy ogniskowe, z lub bez utraty przytomności, afazja i inne) kończącego się zgonem lub trwającego ponad 24 godziny, potwierdzonego w badaniu tomografii komputerowej. Udary w obserwacji odległej rozpoznawano jeśli potwierdzała je dokumentacja szpitalna lub rozpoznanie było postawione przez neurologa.

Przejściowe niedokrwienie mózgu (TIA)

TIA rozpoznawano w przypadku wystąpienia nagłych ubytków neurologicznych (objawy ogniskowe, z lub bez utraty przytomności, afazja i inne), które ustępowały całkowicie w ciągu 24 godzin, potwierdzonych przez neurologa.

Zakrzepica w stencie

Zastosowano definicję wg Academic Research Consortium (ARC)⁹⁵:

- Zakrzepica pewna: potwierdzona w koronarografii lub badaniem autopsyjnym.
- Zakrzepica prawdopodobna: każdy niewyjaśniony zgon w pierwszych 30 dniach od zabiegu, lub zawał serca dotyczący obszaru zaopatrywanego przez stentowaną tętnicę.
- Zakrzepica możliwa: każdy niewyjaśniony zgon w okresie > 30 dni od implantacji stentu.

Przewlekła choroba nerek

Wyliczona z wzoru Cockcroft-Gault'a wartość GFR < 60 ml/min/1,73m²

Krwawienia

W ocenie występowania krwawień przyjęto klasyfikację wg GUSTO (*Tab.3.*).

Tab. 3. Klasyfikacja krwawień wg GUSTO⁹⁴

| | Rodzaj krwawienia |
|--------------------------------------|--|
| Ciężkie lub zagrażające życiu | Krwotok wewnątrzczaszkowy albo krwawienie wywołujące niestabilność hemodynamiczną i wymagające interwencji |
| Umiarkowane | Krwawienie wymagające przetoczenia krwi, które nie prowadzi jednak do niestabilności hemodynamicznej |
| Łagodne | Każde krwawienie, które nie spełnia kryteriów krwawienia ciężkiego ani umiarkowanego |

3.7 Analiza statystyczna

Analizowane dane pochodziły z trzech skal pomiarowych: interwałowej, porządkowej i nominalnej. Zgodność danych ze skali interwałowej sprawdzano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Ponieważ dane interwałowe wykazały brak zgodności z rozkładem normalnym obliczenia wykonano przy pomocy testów nieparametrycznych, podobnie analizowano dane pochodzące ze skali porządkowej. Do porównania dwóch grup stosowano test Manna-Whitney'a. Porównując więcej niż dwie grupy jednocześnie zastosowano test Kruskala-Wallisa. Gdy test Kruskala-Wallisa wskazywał na występowanie istotnych różnic między badanymi grupami zastosowano test post-hoc Dunn'a, w celu wyznaczenia grup jednorodnych.

Dane ze skali nominalnej analizowano testem niezależności chi-kwadrat, a w przypadku występowania licznosci zerowych w tabelach zastosowano dokładny test Fishera. Dla istotnych predyktorów wystąpienia powikłań lub przynależności do badanych grup wyznaczano dodatkowo iloraz szans wraz z 95% przedziałem ufności.

Porównanie przeżycia między analizowanymi grupami dokonano przy pomocy testu log-rank. Natomiast krzywe przeżycia obrazowano za pomocą metody Kaplana-Meiera.

Do oceny prognostycznej poszczególnych czynników ryzyka pod względem występowania oporności na kłopidogrel, czy przynależności do grup T1-T3 zastosowano krzywe ROC (*ang. Receiver operating characteristics curves*). Oceny istotności danego parametru dokonano przy pomocy pola pod krzywą (AUC). Ponadto wyznaczono optymalny punkt odcięcia kierując się najwyższą wartością czułości i swoistości.

Wszystkie testy były analizowane na poziomie istotności $\alpha=0,05$. Obliczenia wykonano przy pomocy pakietu statystycznego Statistica 10 firmy StatSoft, pakietu GraphPad 3.06 (GraphPad Software) oraz MedCalc version 10.3.2 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

W przypadku, gdy uzyskane p-wartości przekraczały 0,1 wynik wyrażano jako ns –nie istotny statystycznie (*ang. non significant*).

4. Wyniki

Do badania włączono 249 chorych, w tym 74 kobiety i 175 mężczyzn. Średnia wieku wynosiła 64,6 lat (od 39 do 89 lat). Planowemu zabiegowi PCI zostało poddanych 215 chorych (61 kobiet i 154 mężczyzn), a z powodu ACS 34 chorych (12 kobiet i 22 mężczyzn). Podstawowe dane kliniczne i demograficzne zestawiono w tabeli 4.

Tab. 4. Podstawowe dane kliniczne i demograficzne badanej grupy

| | Grupa badana |
|--|--------------|
| Liczba (%) | 249 (100) |
| Wiek w latach (\pmSD) | 64,6 (9,9) |
| Kobiety (%) | 74 (29,7) |
| Mężczyźni (%) | 175 (70,3) |
| Masa ciała w kilogramach (\pmSD) | 82,3 (15,1) |
| Wzrost w metrach (\pmSD) | 1,7 (0,1) |
| BMI (\pmSD) | 28,6 (4,5) |
| Stabilna choroba wieńcowa (%) | 215 (86,4) |
| Ostry zespół wieńcowy (%) | 34 (13,6) |

Podczas zabiegów angioplastyki wieńcowej w badanej populacji łącznie wszczepiono 251 stentów, w tym 218 (87,5%) stentów uwalniających lek antyproliferacyjny DES (*ang. Drug Eluting Stent*) oraz 33 (13,3%) stenty metalowe BMS (*ang. Bare Metal Stent*). Zabieg PCI u wszystkich, z wyjątkiem dwóch leczonych dotyczył jednego naczynia wieńcowego. W 176 przypadkach zabieg został wykonany z dostępu promieniowego (71%), natomiast u 73 chorych z nakłucia tętnicy udowej (29%).

175 chorych (w tym 10 pacjentów z ACS), przynajmniej przez pięć dni przed przyjęciem do szpitala przyjmowało kłopidogrel w dawce 75mg dziennie. U pozostałych pacjentów ze stabilną CAD (n=74), w przeddzień PCI podano dawkę nasycającą kłopidogrelu w dawce 300 mg. Grupa 24 pacjentów przyjętych z powodu ACS nie pobierała wcześniej leków antyagregacyjnych. Chorzy otrzymali, zgodnie z wytycznymi, dawkę nasycającą kłopidogrelu 600 mg oraz 300 mg aspiryny w momencie przyjęcia do szpitala. W grupie chorych przyjętych do planowej angioplastyki wieńcowej 6 osób nie przyjmowało wcześniej aspiryny, zastosowano u nich dawkę nasycającą 300 mg. Wszyscy pacjenci otrzymywali dalej aspirynę i kłopidogrel, w dawce 75 mg dziennie przez 12 miesięcy po zabiegu PCI, po czym odstawiano kłopidogrel pozostawiając tylko ASA. Żaden z pacjentów nie wymagał

zastosowania inhibitora IIb/IIIa. Leczenie chorób towarzyszących prowadzone było zgodnie z aktualnymi wytycznymi. W tabeli 5 zestawiono najważniejsze leki podawane badanym pacjentom.

Tab. 5. Leki stosowane w czasie hospitalizacji w badanej grupie.

| <i>Grupa leków</i> | <i>Grupa badana</i> | |
|----------------------------------|---------------------|----------|
| | <i>N</i> | <i>%</i> |
| Aspiryna | 249 | 100 |
| Klopidogrel | 249 | 100 |
| Beta adrenolityki | 224 | 90,0 |
| ACE-I | 195 | 78,3 |
| PPI | 91 | 36,5 |
| Statyny | 248 | 99,6 |
| Blokery kanału wapniowego | 54 | 21,7 |
| Nitraty | 46 | 18,5 |
| Morfina | 7 | 2,8 |
| Leki moczopędne | 110 | 44,2 |

PPI- inhibitory pompy protonowej, ACE-I – inhibitory konwertazy angiotensynowej

W tabeli 6 zestawiono dane z wywiadów badanej populacji pacjentów.

Tab. 6. Czynniki ryzyka oraz dane z wywiadów badanej grupy

| <i>Dane z wywiadu</i> | <i>N</i> | <i>%</i> |
|---|----------|----------|
| Przebyty zawał serca (STEMI/NSTEMI) | 109 | 43,8 |
| Nadciśnienie tętnicze | 198 | 79,5 |
| Cukrzyca | 80 | 32,1 |
| Przebyty udar niedokrwieny mózgu lub TIA | 16 | 6,4 |
| Stan po operacji CABG | 23 | 9,2 |
| Przebyty zabieg PCI | 96 | 38,6 |
| Hiperlipidemia | 122 | 49,0 |
| Niewydolność serca | 13 | 5,2 |
| Niewydolność nerek | 54 | 21,7 |
| POCHP | 9 | 3,6 |
| Palenie tytoniu | 51 | 20,5 |

STEMI - zawał serca z uniesieniem odcinka ST, NSTEMI - zawał serca bez uniesienia odc. ST, POCHP - przewlekła obturacyjna choroba płuc, TIA - przejściowe niedokrwienie mózgu, PCI – przezskórna angioplastyka wieńcowa, CABG - pomostowanie aortalno-wieńcowe

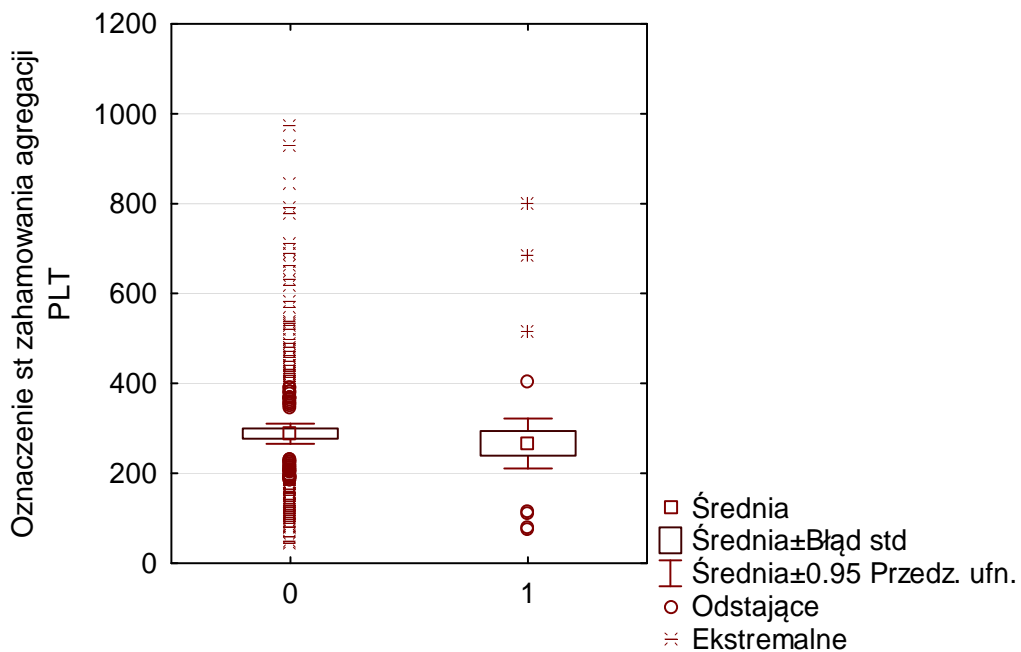
4.1 Analiza czynników wpływających na wystąpienie oporności płytek krwi na kłopidogrel

Na podstawie uzyskanych wyników pomiaru agregacji płytek krwi, chorych podzielono na opornych i wrażliwych na działanie kłopidogrelu. Do grupy opornych zaliczono 28 osób tj. 11,24% (5 kobiet i 23 mężczyzn), zaś 221 pacjentów (88,7%), zakwalifikowano do grupy wrażliwych na kłopidogrel (69 kobiet i 152 mężczyzn). Spośród pacjentów poddanych planowemu zabiegowi PCI 25 osób było opornych a 190 wrażliwych na kłopidogrel. W grupie chorych z ostrym zespołem wieńcowym 3 pacjentów było opornych a 31 wrażliwych na kłopidogrel (Tab. 7).

Tab. 7. Zestawienie danych klinicznych i demograficznych badanej grupy z podziałem na pacjentów opornych i wrażliwych na działanie kłopidogrelu.

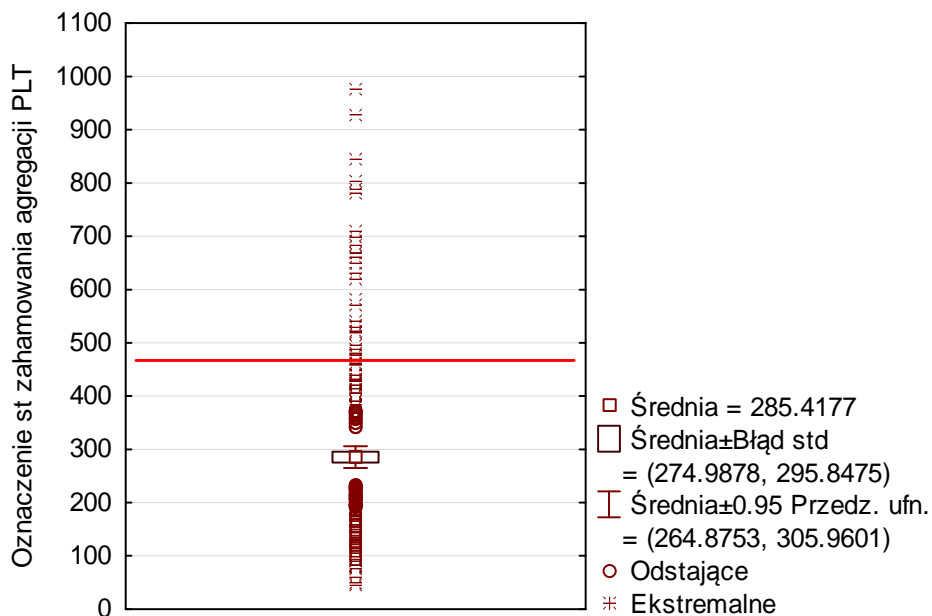
| | <i>Wrażliwi</i> | <i>Oporni</i> | <i>p</i> |
|--|-----------------|---------------|-----------|
| Liczba (%) | 221 (88,8) | 28 (11,2) | |
| Wiek w latach (\pmSD) | 64,8 (9,9) | 63,3 (9,5) | <i>ns</i> |
| Kobiety (%) | 69 (31,2) | 5 (17,9) | <i>ns</i> |
| Mężczyźni (%) | 152 (68,8) | 23 (82,1) | |
| Masa ciała w kilogramach (\pmSD) | 81,9 (15,1) | 85,5 (14,9) | <i>ns</i> |
| Wzrost w metrach (\pmSD) | 1,69 (0,1) | 1,7 (0,1) | <i>ns</i> |
| BMI (\pmSD) | 28,5 (4,5) | 29,6 (4,5) | <i>ns</i> |
| Stabilna choroba wieńcowa (%) | 190 (86,0) | 25 (89,3) | <i>ns</i> |
| Ostry zespół wieńcowy (%) | 31 (14,0) | 3 (10,7) | <i>ns</i> |

Na rycinie 4 przedstawiono wykres ilustrujący rozkład wartości pomiarów zahamowania agregacji płytek w badanej populacji z uwzględnieniem powodu przyjęcia do szpitala. Stopień agregacji płytek nie różnił się istotnie między badanymi grupami. Grupa ze stabilną chorobą wieńcową charakteryzowała się większą zmiennością wewnątrz grupową oraz wyższymi wartościami skrajnymi.



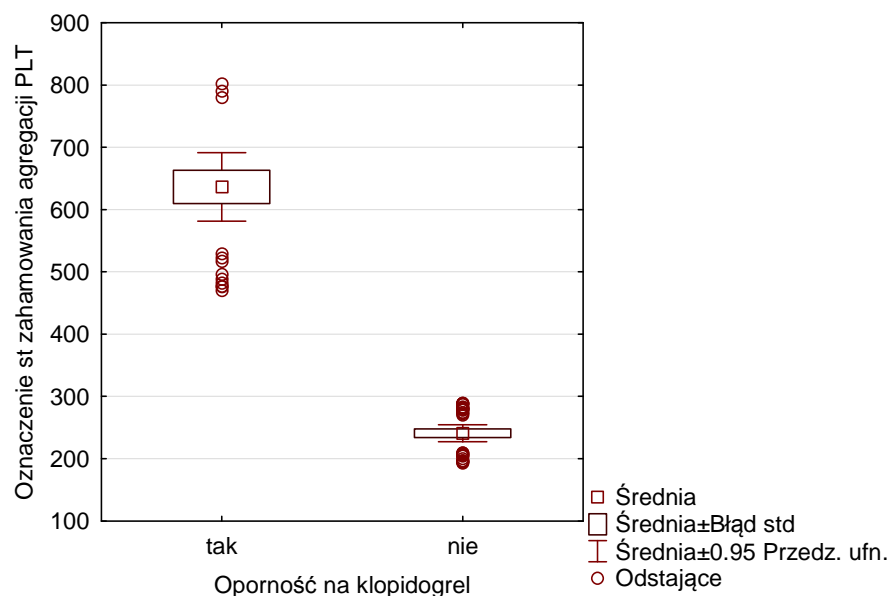
Ryc.4. Oznaczenie stopnia zahamowania agregacji płytek krwi u pacjentów z dławicą stabilną oraz z ostrym zespołem wieńcowym (0 - pacjenci stabilni, 1- pacjenci z ostrym zespołem wieńcowym).

Rycina 5 przedstawia rozkład wartości hamowania agregacji płytek krwi dla badanej populacji chorych. Czerwoną linią zaznaczono punkt odcięcia dla oporności na kłopidogrel (468 AU/min).



Ryc. 5. Rozkład wartości zahamowania agregacji płytek krwi dla grupy badanej.

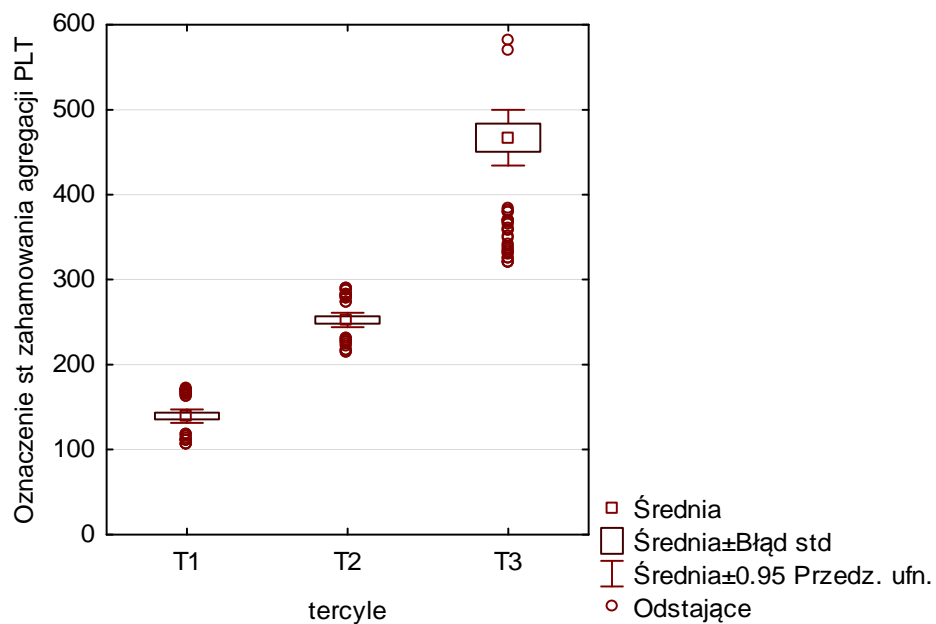
Na rycinie 6 przedstawiono rozkład wartości zahamowania agregacji płytek krwi z podziałem na chorych opornych i wrażliwych na klopidoogrel. Średnia wartość u pacjentów wrażliwych wynosiła $241 \pm 102,1$ AU/min, a dla chorych opornych wynosiła $636 \pm 141,6$ AU/min.



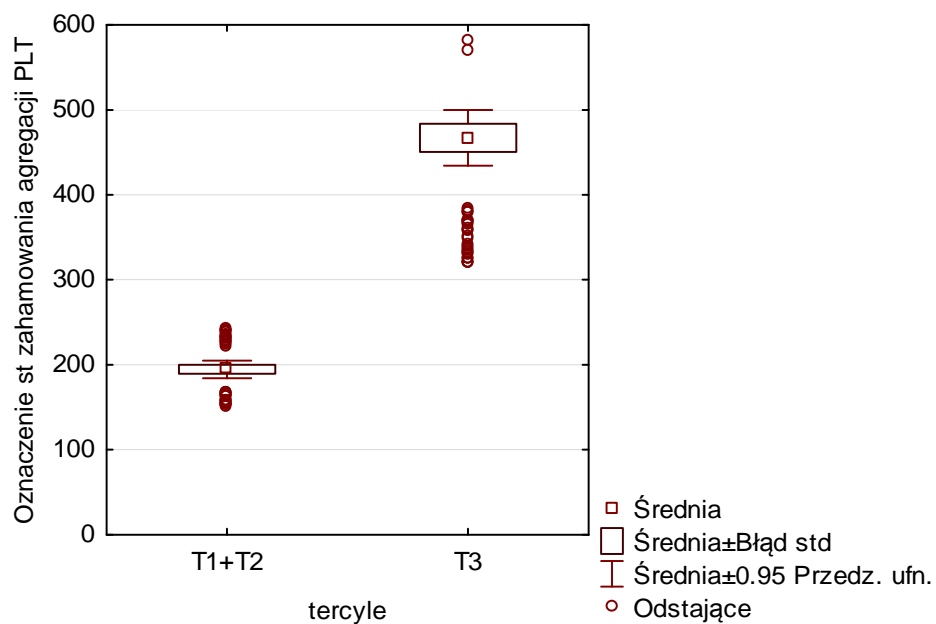
Ryc.6. Rozkład wartości pomiaru zahamowania agregacji płytek krwi z podziałem na opornych i wrażliwych na klopidoogrel.

Na podstawie wyników testu hamowania agregacji płytek pacjentów przydzielono do jednego z trzech tercyl, zgodnie z tabelą 1 rozdziału *Materiał i metody*. W związku z tym, że przy małej liczebności podgrup, analiza porównawcza wykazała jedynie trendy sugerujące możliwe różnice zdecydowano o połączeniu podgrup T1 i T2 (n=166) i zestawieniu ich łącznie z podgrupą T3 (n=83). Średnia wartość agregacji pacjentów T1 wynosiła $139 \pm 36,6$ AU/min, T2 – $252 \pm 38,5$ AU/min, a T3 – $467 \pm 150,3$ AU/min. Średnia wartość agregacji dla połączonej podgrupy T1 + T2 wynosiła $194 \pm 67,9$ AU/min.

Na rycinach 7 i 8 przedstawiono rozkład wartości zahamowania agregacji płytek w wyznaczonych tercylach.



Ryc. 7. Rozkład wartości pomiaru zahamowania agregacji płytek krwi z podziałem na tercyle.

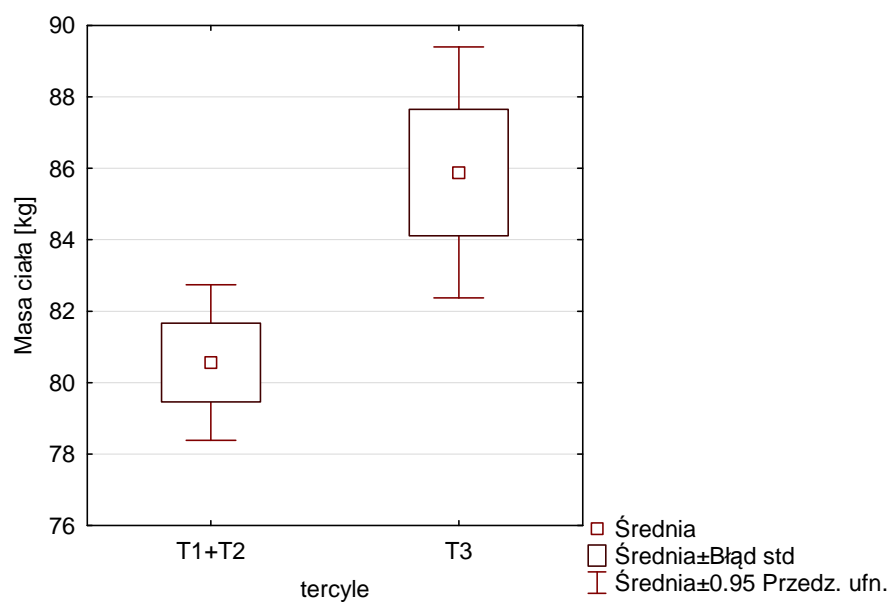


Ryc. 8. Oznaczenie stopnia zahamowania agregacji płytek krwi grupowane pod względem tercyl; zsumowanie wartości dla tercyl T1 i T2.

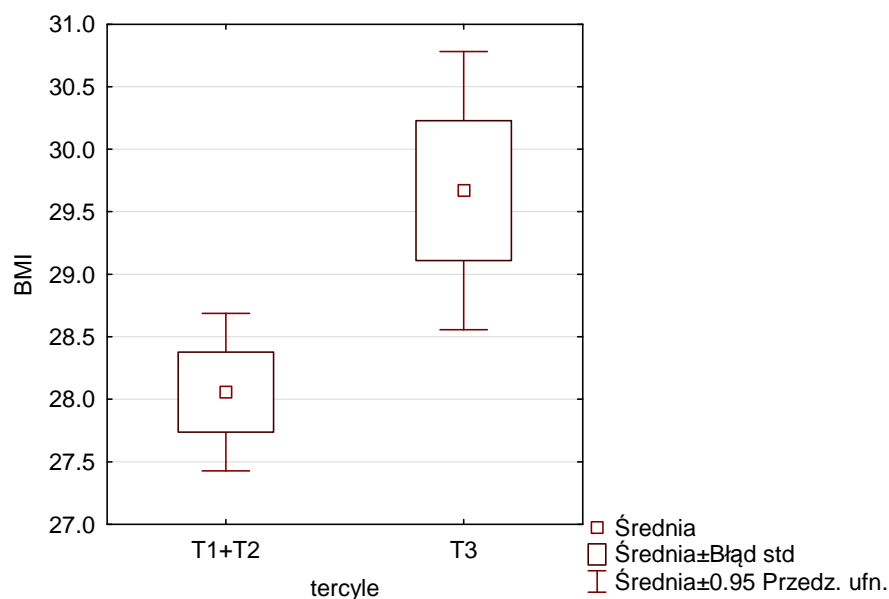
Pacjenci w grupie T1+T2, w porównaniu do grupy T3 nie różnili się istotnie pod względem wieku i płci. Stwierdzono natomiast istotną różnicę w masie ciała oraz BMI. Stwierdzone różnice przedstawia tabela 8 oraz ryciny 9 i 10.

Tab.8. Zestawienie danych klinicznych i demograficznych z podziałem pacjentów na tercyle.

| | <i>Tercyl T1+T2</i> | <i>Tercyl T3</i> | <i>p</i> |
|--|---------------------|------------------|---------------|
| Liczba (%) | 166 (66,7) | 83 (33,3) | |
| Wiek w latach (\pmSD) | 64,6 (10,0) | 64,5 (9,7) | <i>ns</i> |
| Kobiety (%) | 50 (30,1) | 24 (28,9) | <i>ns</i> |
| Mężczyźni (%) | 116 (69,9) | 59 (71,1) | <i>ns</i> |
| Masa ciała w kilogramach (\pmSD) | 80,6 (14,2) | 85,9 (16,1) | <i>0,0175</i> |
| Wzrost w centymetrach (\pmSD) | 170 (0,1) | 170 (0,1) | <i>ns</i> |
| BMI (\pmSD) | 28,06 (4,1) | 29,7 (5,1) | <i>0,0497</i> |
| Stabilna choroba wieńcowa (%) | 143 (86,1) | 72 (86,7) | <i>ns</i> |
| Ostry zespół wieńcowy (%) | 23 (13,9) | 11 (13,3%) | <i>ns</i> |



Ryc.9. Rozkład masy ciała u pacjentów z tercyla T1+T2 i T3.



Ryc. 10. Rozkład wartości BMI u pacjentów z tercyla T1+T2 i T3.

Poza tym, pacjenci oporni i wrażliwi na kłopidogrel, podobnie jak chorzy z tercyla T1+T2 względem T3 nie różnili się istotnie pod względem częstości występowania większości czynników ryzyka CAD oraz chorób współistniejących (Tab. 9. i 10.). Jediną istotną różnicę zaobserwowano w cukrzycy, która u pacjentów z tercyla T3 występowała istotnie częściej niż w tercylach T1+T2 ($p=0,0072$, CI [1,220-3,697]). Nie odnotowano tej zależności przy porównaniu pacjentów wrażliwych z opornymi ($p= ns$).

Tab. 9. Zależność między występowaniem czynników ryzyka oraz chorób współistniejących a opornością na kłopidogrel.

| | Wrażliwi (n=221) | | Oporni (n=28) | | p |
|----------------------------------|------------------|------|---------------|------|----|
| | N | % | N | % | |
| Ostry zespół wieńcowy | 97 | 43,9 | 12 | 42,9 | ns |
| Nadciśnienie tętnicze | 174 | 78,7 | 24 | 85,7 | ns |
| Cukrzyca | 69 | 31,2 | 11 | 39,3 | ns |
| Udar/TIA | 15 | 6,8 | 1 | 3,6 | ns |
| CABG | 21 | 9,5 | 2 | 7,1 | ns |
| Angioplastyka wieńcowa | 85 | 38,5 | 11 | 39,3 | ns |
| Hiperlipidemia | 105 | 47,5 | 17 | 60,7 | ns |
| Niewydolność serca | 11 | 5,0 | 2 | 7,1 | ns |
| Niewydolność nerek | 50 | 22,6 | 4 | 14,3 | ns |
| POCHP | 7 | 3,2 | 2 | 7,1 | ns |
| Palenie tytoniu | 44 | 19,9 | 7 | 25,0 | ns |
| Obciążony wywiad rodzinny | 52 | 23,5 | 11 | 39,3 | ns |

Skróty jak w tabeli 7.

Tab. 10. Zależność między występowaniem czynników ryzyka oraz chorób współistniejących a opornością na kłopidogrel w podziale na tercyle.

| | Tercyl 1 + 2 (n=166) | | Tercyl 3 (n=83) | | <i>p</i> |
|----------------------------------|----------------------|-------|-----------------|------|-----------|
| | <i>N</i> | % | <i>N</i> | % | |
| Ostry zespół wieńcowy | 74 | 44,6 | 35 | 42,2 | <i>ns</i> |
| Nadciśnienie tętnicze | 132 | 79,5 | 66 | 79,5 | <i>ns</i> |
| Cukrzyca | 44 | 26,50 | 36 | 43,4 | 0,0072 |
| Udar/TIA | 11 | 6,6 | 5 | 6,0 | <i>ns</i> |
| CABG | 16 | 9,6 | 7 | 8,4 | <i>ns</i> |
| Angioplastyka wieńcowa | 64 | 38,6 | 32 | 38,6 | <i>ns</i> |
| Hiperlipidemia | 83 | 50,0 | 39 | 47,0 | <i>ns</i> |
| Niewydolność serca | 7 | 4,2 | 6 | 7,2 | <i>ns</i> |
| Niewydolność nerek | 37 | 22,3 | 17 | 20,5 | <i>ns</i> |
| POCHP | 4 | 2,4 | 5 | 6,0 | <i>ns</i> |
| Palenie tytoniu | 36 | 21,7 | 15 | 18,1 | <i>ns</i> |
| Obciążony wywiad rodzinny | 42 | 25,3 | 21 | 25,3 | <i>ns</i> |

Skróty jak w tabeli 7.

Wpływ stosowanych leków na agregację płytek krwi

Nie wykazano istotnego wpływu leków na wystąpienia zjawiska oporności na kłopidogrel (Tab. 11. i 12.).

Tab.11. Wpływ farmakoterapii na występowanie oporności na kłopidogrel.

| Grupa leków | Wrażliwi (n=221) | | Oporni (n=28) | | p |
|------------------------|------------------|------|---------------|------|----|
| | N | % | N | % | |
| Aspiryna | 221 | 100 | 28 | 100 | ns |
| Kłopidogrel | 221 | 100 | 28 | 100 | ns |
| Beta Bloker | 197 | 89,1 | 27 | 96,4 | ns |
| ACE-I | 172 | 77,8 | 23 | 82,1 | ns |
| PPI | 78 | 35,3 | 13 | 46,4 | ns |
| Statyny | 220 | 99,5 | 28 | 100 | ns |
| Ca-bloker | 48 | 21,7 | 6 | 21,4 | ns |
| Nitraty | 40 | 18,1 | 6 | 21,4 | ns |
| Morfina | 6 | 2,7 | 1 | 3,6 | ns |
| Leki moczopędne | 99 | 44,8 | 11 | 39,3 | ns |

Skróty jak w tabeli 6.

Tab. 12. Wpływ farmakoterapii na występowanie oporności na kłopidogrel; podział grupy badanej na tercyle.

| Grupa leków | Tercyl T1+T2 (n=166) | | Tercyl T3 (n=83) | | p |
|--------------------|----------------------|------|------------------|------|----|
| | N | % | N | % | |
| Aspiryna | 166 | 100 | 83 | 100 | ns |
| Kłopidogrel | 166 | 100 | 83 | 100 | ns |
| Beta Bloker | 146 | 88,0 | 78 | 94,0 | ns |
| ACE-I | 128 | 77,1 | 67 | 80,7 | ns |
| PPI | 54 | 32,5 | 37 | 44,6 | ns |
| Statyny | 165 | 99,4 | 83 | 100 | ns |
| Ca-bloker | 35 | 21,1 | 19 | 22,9 | ns |
| Nitraty | 27 | 16,3 | 19 | 22,9 | ns |
| Morfina | 6 | 3,6 | 1 | 1,2 | ns |
| Diuretyki | 68 | 41,0 | 42 | 50,6 | ns |

Skróty jak w tabeli 6.

Predict Score

Analiza danych klinicznych i parametrów laboratoryjnych zawartych w kwestionariuszu PS dla sumy uzyskanych punktów nie wykazała istotnej zależności z wystąpieniem oporności na kłopidogrel lub przyporządkowaniem chorego do określonego tercyla. Nie znaleziono zatem wskaźnika mogącego być czynnikiem prognostycznym wystąpienia oporności na kłopidogrel w badanej populacji pacjentów. Wykazano natomiast korelację pojedynczych czynników zawartych w PS z przyporządkowaniem do T3: cukrzyca, liczby płytek krwi i krwinek białych (Tab. 13. i 14.).

Tab. 13. Analiza roli czynników klinicznych i parametrów laboratoryjnych kwestionariusza PS w prognozowaniu wystąpienia oporności na kłopidogrel.

| | Wrażliwi | | Oporni | | p |
|---------------------------------|----------|------|--------|------|----|
| | N | % | N | % | |
| Ostry zespół wieńcowy | 31 | 14,0 | 3 | 10,7 | ns |
| Wiek > 65lat | 105 | 47,5 | 12 | 42,9 | ns |
| Fracja wyrzutowa < 55% | 70 | 31,7 | 12 | 42,9 | ns |
| Cukrzyca | 69 | 31,2 | 11 | 39,3 | ns |
| Niewydolność nerek (GFR<60) | 50 | 22,6 | 4 | 14,3 | ns |
| CRP > 9 mg/l | 25 | 11,3 | 3 | 10,7 | ns |
| BMI > 25 | 183 | 82,8 | 25 | 89,3 | ns |
| NT-proBNP > 125 pg/ml | 129 | 58,4 | 14 | 50,0 | ns |
| PLT > 390 tys./ mm ³ | 13 | 5,9 | 1 | 3,6 | ns |
| WBC > 10 tys./ mm ³ | 31 | 14,0 | 5 | 17,9 | ns |
| Bilirubina >17 μmol/l | 18 | 8,1 | 3 | 10,7 | ns |
| Zastosowanie Morfiny | 6 | 2,7 | 1 | 3,6 | ns |
| Zastosowanie Statyn | 199 | 90,0 | 25 | 89,3 | ns |
| Zastosowanie PPI | 78 | 35,3 | 13 | 46,4 | ns |

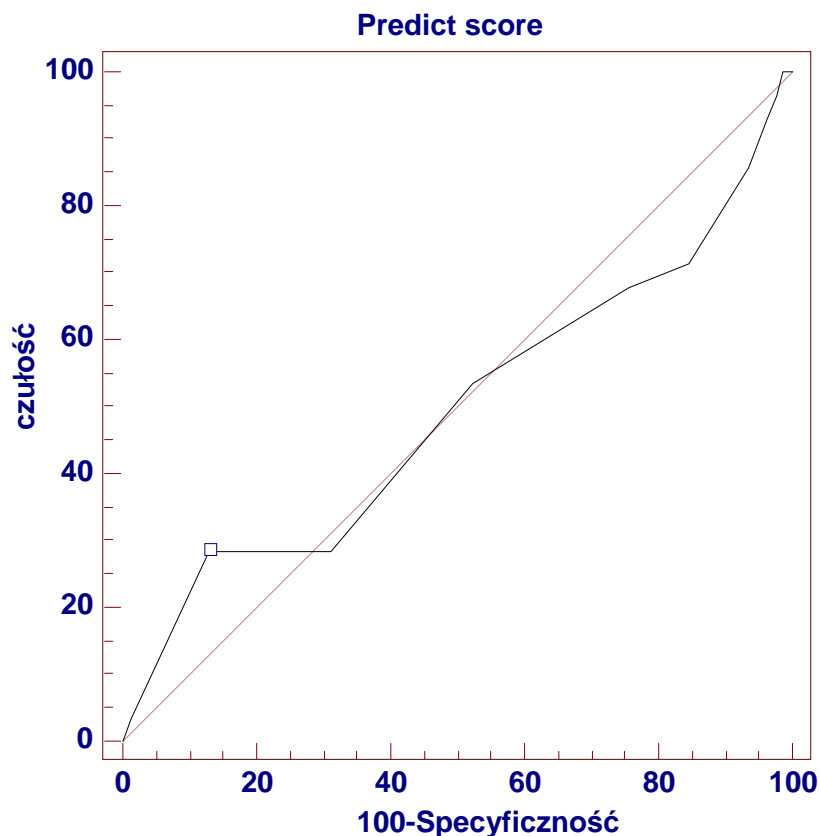
GFR - współczynnik przesączania kłębuszkowego, CRP - białko c-reaktywne, BMI - body mass index - wskaźnik masy ciała, NT-proBNP - mózgowy peptyd natriuretyczny, PLT- płytki krwi, WBC- leukocyty, PPI - inhibitory pompy protonowej

Tab. 14. Analiza roli czynników klinicznych i parametrów laboratoryjnych kwestionariusza PS w prognozowaniu wystąpienia oporności na klopidogrel z podziałem pacjentów na tercyle.

| | <i>Tercyl T1+T2</i> | | <i>Tercyl T3</i> | | <i>p</i> |
|--|---------------------|----------|------------------|----------|---------------|
| | <i>N</i> | <i>%</i> | <i>N</i> | <i>%</i> | |
| Ostry zespół wieńcowy | 23 | 13,9 | 11 | 13,3 | <i>ns</i> |
| Wiek > 65lat | 79 | 47,6 | 38 | 45,8 | <i>ns</i> |
| Fracja wyrzutowa < 55% | 53 | 31,9 | 29 | 34,9 | <i>ns</i> |
| Cukrzyca | 44 | 26,5 | 36 | 43,4 | <i>0,0072</i> |
| Niewydolność nerek (GFR<60) | 37 | 22,3 | 17 | 20,5 | <i>ns</i> |
| CRP > 9 mg/l | 19 | 11,4 | 9 | 10,8 | <i>ns</i> |
| BMI > 25 | 133 | 80,1 | 75 | 90,4 | <i>ns</i> |
| NT-proBNP > 125 pg/ml | 94 | 56,6 | 49 | 59,0 | <i>ns</i> |
| PLT > 390 tys./ mm³ | 8 | 4,8 | 6 | 7,2 | <i>0,0366</i> |
| WBC > 10 tys./ mm³ | 23 | 13,9 | 13 | 15,7 | <i>0,0198</i> |
| Bilirubina >17 μmol/l | 11 | 6,6 | 10 | 12,0 | <i>ns</i> |
| Zastosowanie Morfiny | 6 | 3,6 | 1 | 1,2 | <i>ns</i> |
| Zastosowanie Statyn | 149 | 89,8 | 75 | 90,4 | <i>ns</i> |
| Zastosowanie PPI | 54 | 32,5 | 37 | 44,6 | <i>ns</i> |

Skróty jak w tabeli 13.

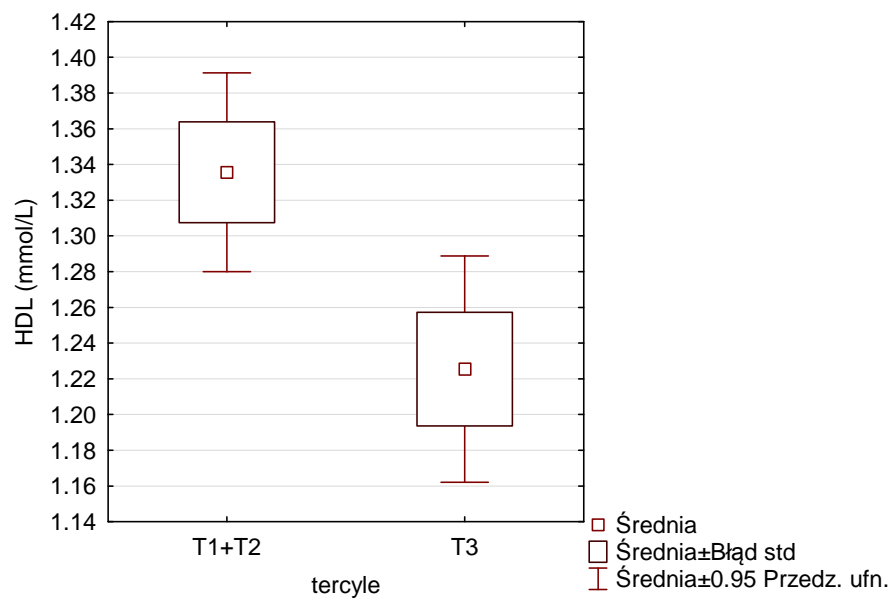
Celem sprawdzenia czy łączna suma punktów wskaźnika Predict Score ma wartość prognostyczną w przewidywaniu wystąpienia oporności na klopidogrel wykreślono krzywe ROC. Wykazano, że suma poszczególnych cech klinicznych i parametrów laboratoryjnych wymienionych w kwestionariuszu PS nie ma wartości prognostycznej w przewidywaniu wystąpienia oporności ($p=0,8908$, $AUC=0,492$, *Ryc. 11.*).



Ryc.11. Krzywa ROC; ocena sumy punktów wskaźnika Predict Score jako wartości prognostycznej wystąpienia oporności na kłopidogrel.

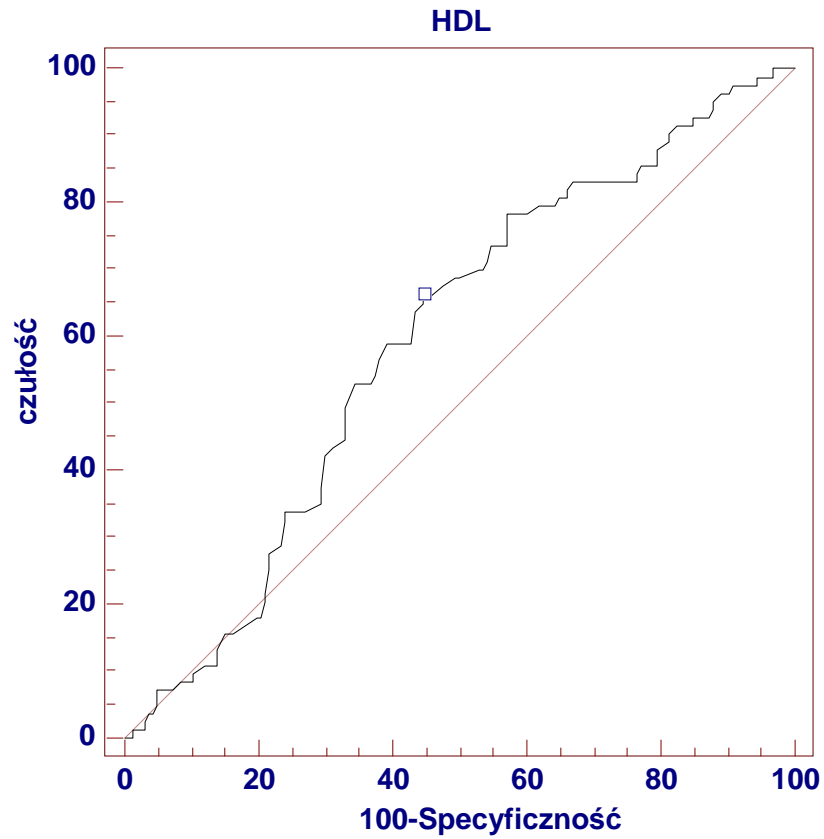
Wpływ pozostałych parametrów na wystąpienie oporności na kłopidogrel

W analizie wyników podstawowych badań biochemicznych krwi wykazano, że pacjenci oporni na kłopidogrel mieli istotnie wyższe wartości OB w stosunku do grupy wrażliwej ($p=0,0363$), (Tab.15., Ryc. 14.). Ponadto wykazano, że pacjenci w tercylu T3 mieli istotnie wyższe wartości liczby płytek krwi ($p=0,0366$), krwinek białych ($p=0,0198$) oraz niższe wartości poziomu cholesterolu frakcji HDL ($p=0,0157$), w porównaniu z grupą T1+T2 (Tab.16., Ryc.12. i 13.).

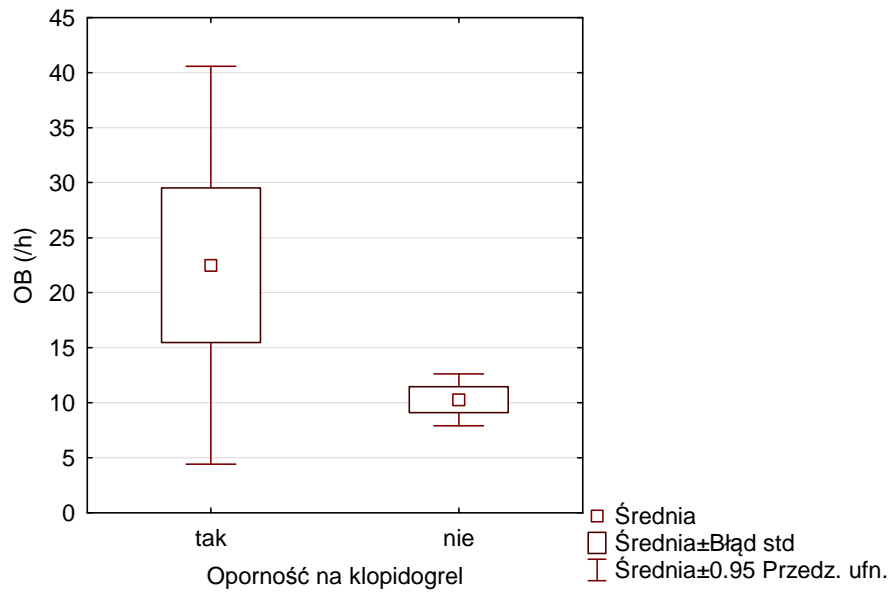


Ryc. 12. Rozkład wartości HDL dla pacjentów T1+T2 i T3.

Po wykreśleniu krzywych ROC wykazano, że niski poziom HDL predysponuje do przynależności chorych do tercyla T3. Optymalny punkt odcięcia 1,26 mmol/L dawał czułość 66,27 i specyficzność 55,42 ($p=0,0116$, $AUC=0,594$), (Ryc. 13.).



Ryc.13. Krzywa ROC. Wpływ wartości HDL na przewidywanie przynależności do T3.



Ryc. 14. Rozkład wartości OB w grupie opornych („tak”) i wrażliwych na klopidogrel („nie”).

Tab.15. Analiza parametrów laboratoryjnych z podziałem pacjentów na opornych i wrażliwych na kłopidogrel.

| | Wrażliwi | | Oporni | | p |
|---------------------------------------|----------|--------|---------|--------|--------|
| | Średnia | SD | Średnia | SD | |
| Glukoza (mmol/l) | 6,7 | 2,4 | 6,6 | 2,5 | ns |
| Cholesterol całkowity (mmol/l) | 4,6 | 1,3 | 4,8 | 1,5 | ns |
| LDL (mmol/l) | 2,7 | 1,1 | 2,9 | 1,3 | ns |
| HDL (mmol/l) | 1,3 | 0,3 | 1,2 | 0,3 | ns |
| Trójglicerydy (mmol/l) | 1,4 | 1,7 | 1,4 | 0,7 | ns |
| Kreatynina (μmol/l) | 92,0 | 31,3 | 91,5 | 21,6 | ns |
| OB (/h) | 10,3 | 9,6 | 22,5 | 17,2 | 0,0363 |
| Hemoglobina (mmol/l) | 8,9 | 0,8 | 8,7 | 0,9 | ns |
| Hematokryt (L/L) | 42,1 | 126,1 | 43,2 | 189,0 | ns |
| PLT (tys/mm³) | 234,4 | 67,7 | 266,5 | 89,7 | ns |
| MPV (fL) | 9,4 | 1,0 | 9,3 | 0,8 | ns |
| RBC (mln/mm³) | 4,7 | 0,5 | 4,6 | 0,4 | ns |
| WBC (tys/mm³) | 7,9 | 4,6 | 8,1 | 2,7 | ns |
| CPK (U/L) | 1029,7 | 3082 | 685,7 | 827,7 | ns |
| CK-MB (U/L) | 30,5 | 87,3 | 37,2 | 80,5 | ns |
| Bilirubina (μmol/l) | 10,7 | 4,7 | 12,3 | 7,9 | ns |
| NT-proBNP (pg/ml) | 650,02 | 1024,3 | 922,8 | 1557,8 | ns |
| CRP (mg/l) | 9,3 | 29,8 | 7,1 | 9,9 | ns |

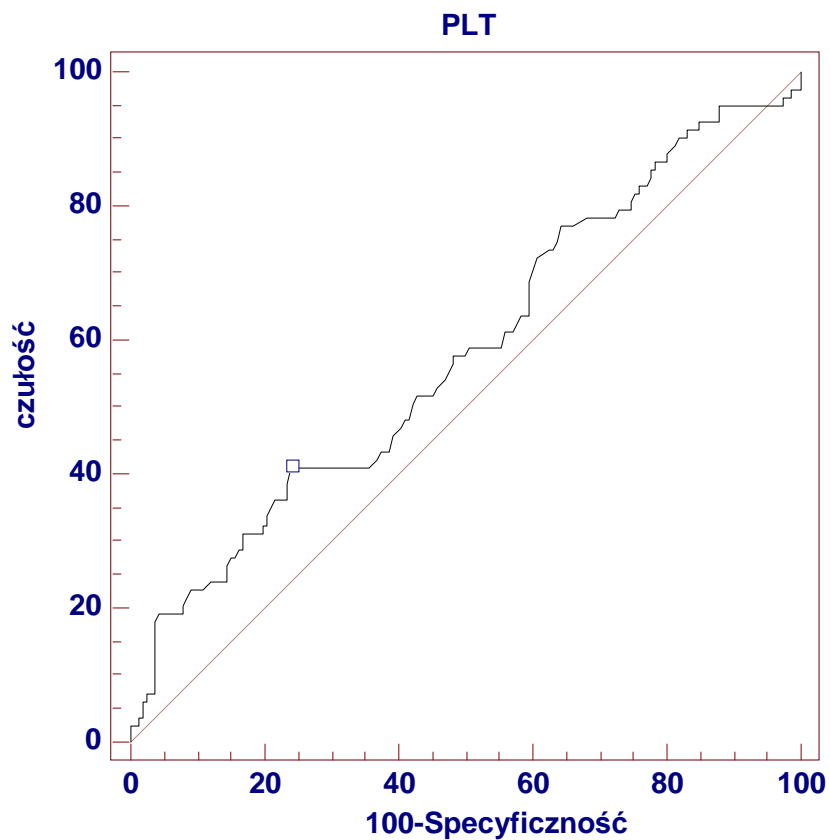
LDL – lipoproteina niskiej gęstości, HDL – lipoproteina wysokiej gęstości, OB – odczyn Biernackiego, PLT – płytki krwi, MPV- średnia objętość trombocyta, RBC – krwinki czerwone, WBC- krwinki białe, NT-proBNP –mózgowy peptyd natriuretyczny typu B, CRP – białko C reaktywne

Tab. 16. Analiza parametrów laboratoryjnych z podziałem pacjentów na tercyle.

| | Tercyl T1+T2 | | Tercyl T3 | | p |
|---------------------------------------|--------------|--------|-----------|--------|--------|
| | Średnia | SD | Średnia | SD | |
| Glukoza (mmol) | 6,5 | 2,3 | 7,0 | 2,7 | ns |
| Cholesterol całkowity (mmol/l) | 4,6 | 1,2 | 4,6 | 1,4 | ns |
| LDL (mmol/l) | 2,7 | 1,1 | 2,7 | 1,3 | ns |
| HDL (mmol/l) | 1,3 | 0,4 | 1,2 | 0,3 | 0,0157 |
| Trójglicerydy (mmol/l) | 1,5 | 1,9 | 1,4 | 0,6 | ns |
| Kreatynina (μmol/l) | 90,3 | 22,7 | 95,3 | 41,5 | ns |
| OB (/h) | 10,2 | 9,6 | 13,5 | 12,8 | ns |
| Hemoglobina (mmol/l) | 8,9 | 0,8 | 8,7 | 0,9 | ns |
| Hematokryt (L/L) | 41,2 | 125,7 | 55,0 | 153,6 | ns |
| PLT (tys/mm³) | 230,4 | 61,2 | 253,2 | 85,9 | 0,0366 |
| MPV (fL) | 9,4 | 1,0 | 9,4 | 0,9 | ns |
| RBC (mln/mm³) | 4,7 | 0,5 | 4,6 | 5,9 | ns |
| WBC (tys/mm³) | 7,8 | 5,1 | 8,0 | 2,5 | 0,0198 |
| CPK (U/L) | 1049,7 | 3483,6 | 897,2 | 1646,7 | ns |
| CK-MB (U/L) | 24,2 | 64,5 | 45,9 | 118,1 | ns |
| Bilirubina (μmol/l) | 10,6 | 4,5 | 11,3 | 6,2 | ns |
| NT-proBNP (pg/ml) | 681,9 | 1140,9 | 674,7 | 998,1 | ns |
| CRP (mg/l) | 8,4 | 29,0 | 10,9 | 28,1 | ns |

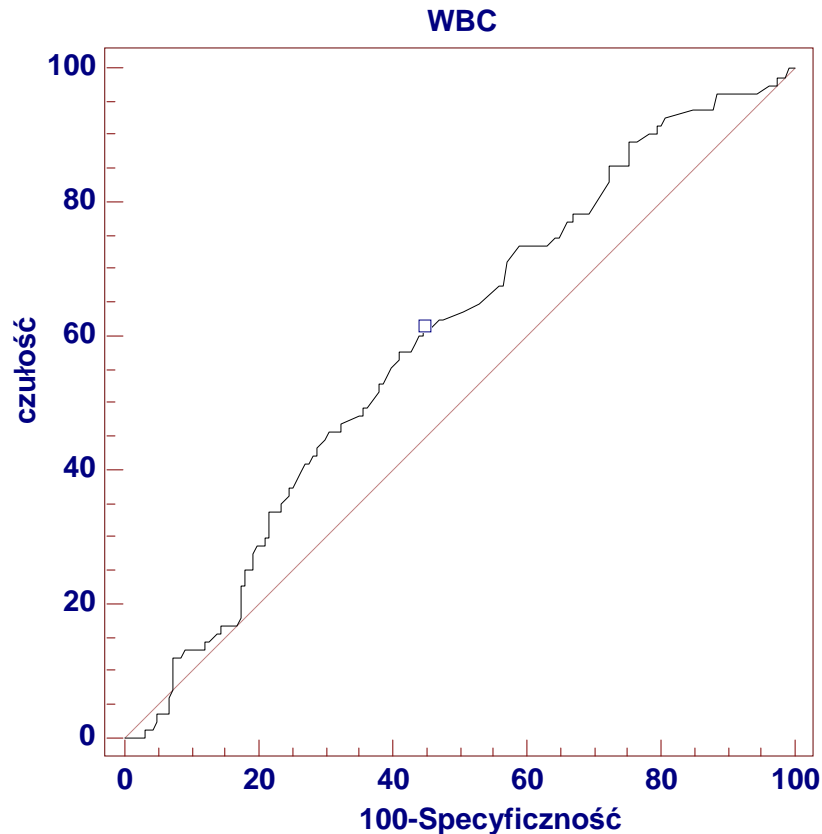
Skróty jak w tabeli 15

W analizie ROC wykazano także, że liczba PLT ma słabą ale istotną wartość prognostyczną, w kwalifikowaniu przynależności do tercyla T3. Optymalny punkt odcięcia o wartości $264 \times 10^9/L$ dawał czułość 40,96 i specyficzność 75,9 ($p=0,0368$, $AUC=0,581$, Ryc. 15.).



Ryc.15. Krzywa ROC. Wpływ liczby płytek krwi (PLT) na przewidywanie przynależności do T3.

Wykazano, że poziom WBC ma także słabą, ale istotną wartość prognostyczną, w kwalifikowaniu chorych do tercyla T3. Optymalny punkt odcięcia $6,99 \times 10^9/L$ dawał czułość 61,45 i specyficznosc 55,42 ($p=0,0197$, $AUC=0,591$), (Ryc. 16.).



Ryc.16. Krzywa ROC. Wpływ liczby krwinek białych (WBC) na przewidywanie przynależności do T3.

4.2 Wyniki badania polimorfizmu CYP2C19

Badanie genetycznej predyspozycji do wystąpienia zjawiska oporności na kłopidogrel (polimorfizm CYP2C19) dokonano u 147 pacjentów. Próbkę krwi pobrano od pierwszych 150 osób, jednak w trzech przypadkach doszło do zniszczenia identyfikatorów. W badanej populacji nie wykazano żadnego przypadku polimorfizmu CYP2C19*3. Przeanalizowano zgodność poszczególnych polimorfizmów: *1/*1, *2/*1 i *2/*2 wg modelu równowagi Hardy-Weinberga (H-W) i wykazano, że rozkład w badanej grupie nie jest zgodny z modelem równowagi ($p=0,013$). Można to interpretować na korzyść badania, gdyż w grupie 147 chorych wykryto aż 10 przypadków polimorfizmu *2/*2, który predysponuje do wystąpienia upośledzonej odpowiedzi na kłopidogrel, podczas gdy według modelu H-W oczekiwano wystąpienia zaledwie 4 przypadków. Szczegółowa analiza wyników badania genetycznego

nie wykazała wpływu genotypu na wystąpienie zjawiska oporności na kłopidogrel, ani na przynależność do poszczególnych tercyl (Tab. 17. i 18., Ryc. 18A i B).

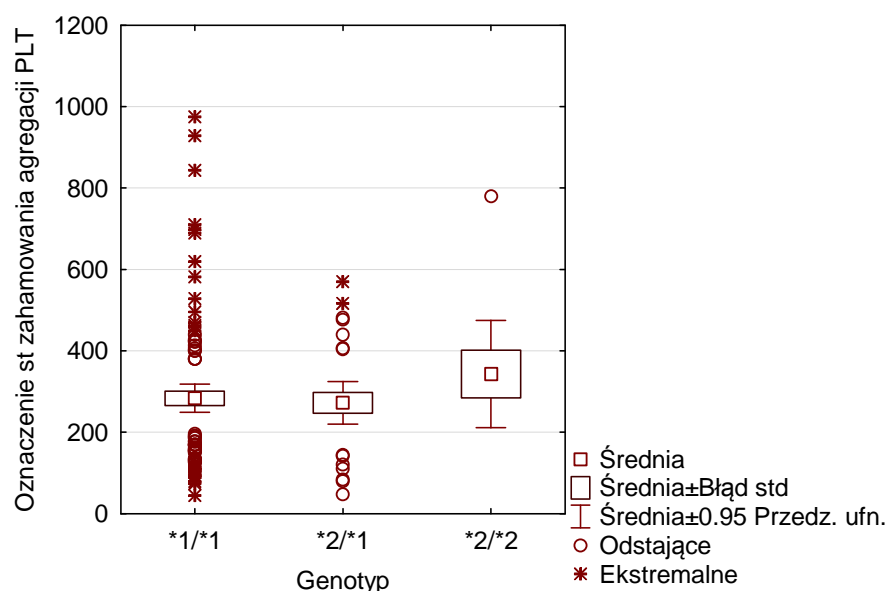
Tab. 17. Rozkład polimorfizmów CYP2C19 u pacjentów wrażliwych i opornych na kłopidogrel.

| Polimorfizm | Grupa badana | | Wrażliwi | | Oporni | |
|-------------|--------------|------|----------|------|--------|------|
| | N=147 | % | N=131 | % | N=16 | % |
| *1/*1 | 106 | 72,1 | 95 | 72,5 | 11 | 68,8 |
| *2/*1 | 31 | 21,1 | 27 | 20,6 | 4 | 25,0 |
| *2/*2 | 10 | 6,8 | 9 | 6,9 | 1 | 6,3 |

Tab. 18. Rozkład polimorfizmów CYP2C19 z uwzględnieniem tercyl.

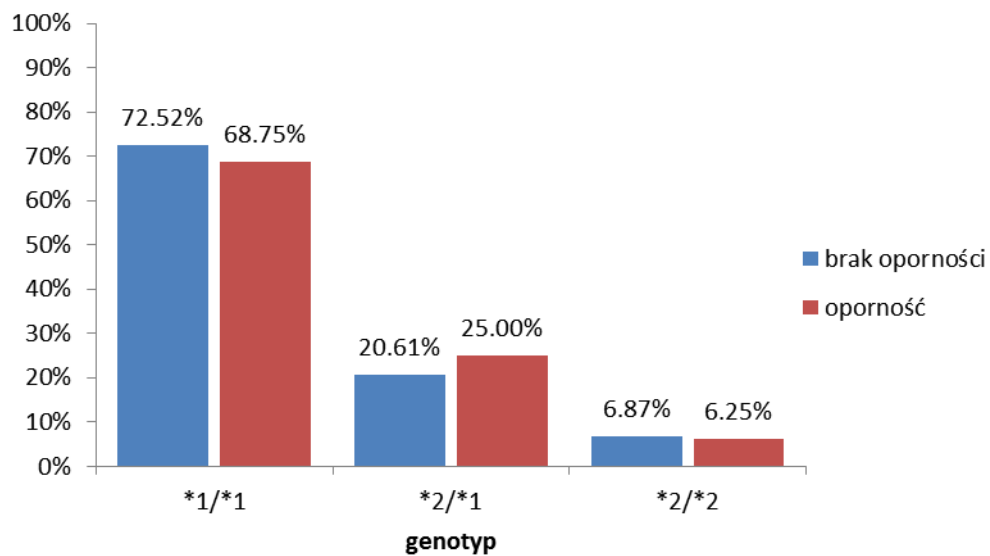
| Polimorfizm | Grupa badana | | Tercyl 1+2 | | Tercyl 3 | |
|-------------|--------------|------|------------|------|----------|------|
| | N=147 | % | N=95 | % | N=52 | % |
| *1/*1 | 106 | 72,1 | 71 | 74,7 | 35 | 67,3 |
| *2/*1 | 31 | 21,1 | 19 | 20,0 | 12 | 23,1 |
| *2/*2 | 10 | 6,8 | 5 | 5,3 | 5 | 9,6 |

Stopień zahamowania agregacji płytek krwi nie różnił się istotnie między badanymi polimorfizmami genetycznymi. Genotyp *1/*1 charakteryzował się największą zmiennością wewnątrz grupową (45-975 AU/min), natomiast dla genotypu *2/*1 i *2/*2 występowały następujące przedziały wartości, odpowiednio: 48-570 Au/min i 154-780 AU/min (Ryc. 17.).

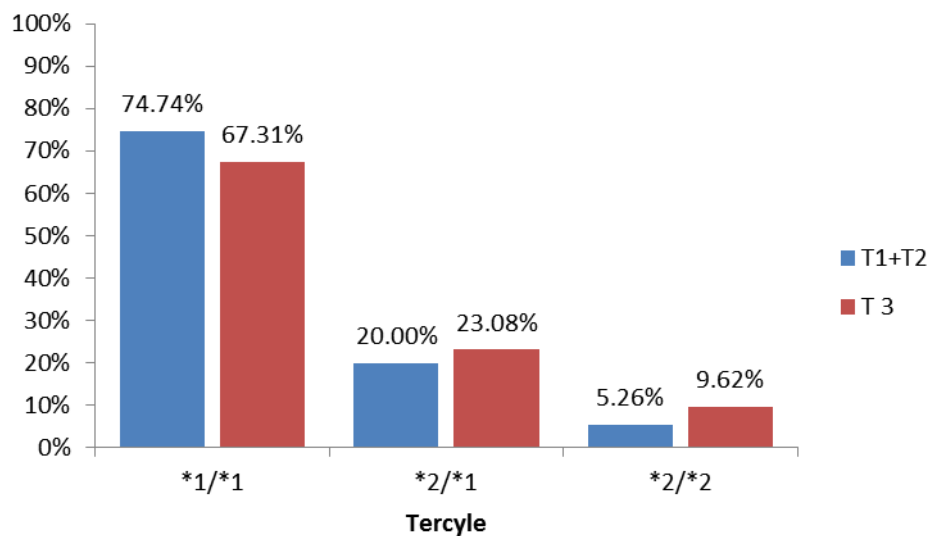


Ryc.17. Stopień zahamowania agregacji płytek krwi dla poszczególnych polimorfizmów genu CYP2C19.

(A)



(B)



Ryc. 18. Procentowy rozkład występowania polimorfizmów CYP2C19 w populacji badanej z podziałem na: (A) opornych i wrażliwych oraz (B) tercyle.

4.3 Obserwacje kliniczne

Obserwacja wewnątrzszpitalna

W czasie obserwacji wewnątrzszpitalnej wystąpiło 6 zdarzeń niedokrwiennych, które zgodnie z definicją podaną w rozdziale „Materiał i metody” uznano za zawał serca. W żadnym z przypadków nie obserwowano wytworzenia nowych, patologicznych załamków Q w zapisie EKG. Pięciu z tych chorych było wrażliwych na kłopidogrel (3%), natomiast jeden był oporny na działanie leku (1,2%). Różnica nie była istotna statystycznie ($p=ns$). Ponadto w czasie hospitalizacji wystąpiły 4 przypadki krwawień, wszystkie łagodne, pod postacią krwiaka w miejscu nakłucia tętnicy udowej. W każdym przypadku wykluczono obecność tętniaka rzekomego z użyciem metody USG Doppler. Żadne powikłanie krwotoczne nie wymagało interwencji medycznej. Wszystkie 4 zdarzenia odnotowano w grupie chorych wrażliwych na działanie kłopidogrelu.

Obserwacja 12.miesięczna

Z obserwacji rocznej utracono 39 pacjentów (15,7%). Częstość zdarzeń klinicznych zestawiono w tabeli (*Tab.19.*). Zgon wystąpił u 9 pacjentów, niestety tylko w 4 przypadkach udało się ustalić przyczynę zgonu. W dwóch przyczyną zgonu był nowotwór, jeden pacjent zmarł z powodu zawału serca w 12. miesiącu obserwacji w przebiegu zakrzepicy w stencie (0,5%). Jeden chory zmarł z powodu udaru niedokrwiennego mózgu potwierdzonego badaniem tomografii komputerowej 6 miesięcy po wypisaniu z naszego oddziału. Obaj chorzy należeli do grupy wrażliwych na działanie kłopidogrelu, pierwszy pacjent znajdował się w tercylu T1+T2, a drugi w T3. Żaden ze zgonów nie zdarzył się w pierwszych 30 dniach po opuszczeniu szpitala. Zawał serca wystąpił u 9 pacjentów. Jedyne zawały STEMI stwierdzono u wspomnianego chorego, który zmarł. Pozostałe przypadki to zawały NSTEMI. Tabela 19 przedstawia zdarzenia niedokrwiennie oraz krwotoczne, które wystąpiły u badanych pacjentów w ciągu 12 miesięcy od opuszczenia szpitala.

U pacjentów opornych na kłopidogrel częściej stwierdzano niedokrwienny udar mózgu ($p=0,0351$, $OR=16,818$, 95% CI [1,464-193,23]) oraz jakiegokolwiek niedokrwienny incydent mózgowy (udar lub TIA, $p=0,0339$, $OR=6,5$, 95% CI [1,36 – 31,07]). Wszystkie krwawienia, z wyjątkiem jednego przypadku krwotoku do ośrodkowego układu nerwowego należały do łagodnych. W ocenie łącznej wszystkich zdarzeń niedokrwiennych i krwotocznych nie stwierdzono istotności statystycznej (*Tab. 19.*).

Tab.19. Zdarzenia niedokrwienne i krwotoczne w obserwacji 12. miesięcznej; podział chorych na opornych i wrażliwych. (n=210).

| | Grupa badana | | Wrażliwi | | Oporni | | p |
|---|--------------|------|----------|------|--------|------|--------|
| | N | % | N | % | N | % | |
| Powikłania niedokrwienne | | | | | | | |
| ZGON | 9 | 4,3 | 8 | 4,3 | 1 | 4,2 | ns |
| Zawał serca | 9 | 4,3 | 8 | 4,3 | 1 | 4,2 | ns |
| Udar mózgu | 3 | 1,4 | 1 | 0,5 | 2 | 8,3 | 0,0351 |
| TIA | 4 | 1,9 | 3 | 1,6 | 1 | 4,2 | ns |
| Łącznie niedokrwienne incydenty mózgowo | 7 | 3,3 | 4 | 2,2 | 3 | 12,5 | ns |
| Wszystkie zdarzenia niedokrwienne | 16 | 7,6 | 12 | 6,5 | 4 | 16,7 | ns |
| Razem | 23 | 11,0 | 18 | 9,7 | 5 | 20,8 | ns |
| Powikłania krwotoczne | | | | | | | |
| Krwawienie do OUN | 1 | 0,5 | 1 | 0,5 | 0 | 0 | ns |
| Krew w moczu | 5 | 2,4 | 5 | 2,7 | 0 | 0 | ns |
| Krew w stolcu | 7 | 3,3 | 6 | 3,2 | 1 | 4,2 | ns |
| Krwawienie z nosa | 19 | 9,0 | 15 | 8,1 | 4 | 16,7 | ns |
| Krwawienie z dziąseł | 6 | 2,9 | 6 | 3,2 | 0 | 0 | ns |
| Wszystkie zdarzenia krwotoczne | 38 | 18,1 | 33 | 17,7 | 5 | 20,8 | ns |

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

Pacjenci z grupy T3 mieli istotnie częściej niedokrwienny udar mózgu (1,4%), w porównaniu do chorych z T1+T2 (0%), ($p=0,0376$, $OR=14,255$, 95% [CI [0,7255-280,10]]). Wykazano także, że pacjenci, u których wystąpił jakikolwiek niedokrwienny incydent mózgowy (udar lub TIA) istotnie częściej znajdowali się w tercylu T3 ($p=0,0452$, $OR=5,19$, 95% CI [0,98 – 27,47]). Ponadto u pacjentów z tercyla T3 krew w moczu odnotowano istotnie częściej (5,6%) niż w grupie T1+T2 (0,7%), ($p=0,0457$, $OR=8,239$, 95% CI [0,9027-75,193]). W ocenie łącznej wszystkich powikłań krwotocznych nie stwierdzono istotności statystycznej. Natomiast w ocenie łącznej zgonu i wszystkich zdarzeń niedokrwiennych wykazano istotną korelację z przynależnością chorych do tercyla T3 ($p=0,0481$, $OR=2,37$ 95% CI [0,99 – 5,67]), (Tab. 20.).

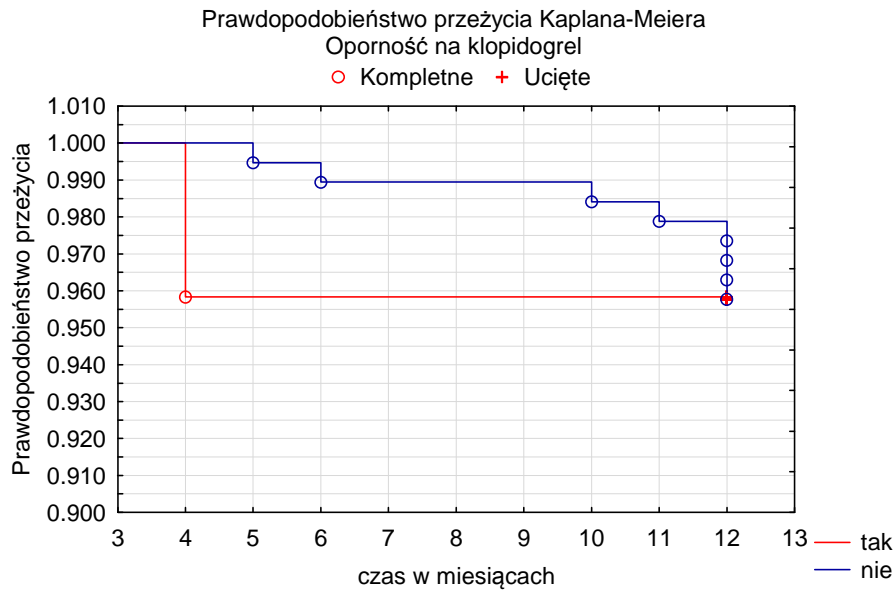
Tab. 20. Zdarzenia niedokrwienne i krwotoczne w obserwacji 12. miesięcznej; przyporządkowanie chorych do tercylu (n=210).

| | <i>Grupa badana</i> | | <i>Tercyl 1+2</i> | | <i>Tercyl 3</i> | | <i>p</i> |
|--|---------------------|----------|-------------------|----------|-----------------|----------|---------------|
| | <i>N</i> | <i>%</i> | <i>N</i> | <i>%</i> | <i>N</i> | <i>%</i> | |
| <i>Powikłania niedokrwienne</i> | | | | | | | |
| ZGON | 9 | 4,3 | 4 | 2,9 | 5 | 7,0 | <i>ns</i> |
| Zawał serca | 9 | 4,3 | 6 | 4,3 | 3 | 4,2 | <i>ns</i> |
| Udar mózgu | 3 | 1,4 | 0 | 0 | 3 | 4,2 | <i>0,0376</i> |
| TIA | 4 | 1,9 | 2 | 1,4 | 2 | 2,8 | <i>ns</i> |
| Łącznie niedokrwienne incydenty mózgowie | 7 | 3,3 | 2 | 1,4 | 5 | 7,0 | <i>ns</i> |
| Wszystkie zdarzenia niedokrwienne | 16 | 7,6 | 8 | 5,8 | 8 | 11,3 | <i>ns</i> |
| Razem | 23 | 11,0 | 11 | 7,9 | 12 | 16,9 | <i>0,0481</i> |
| <i>Powikłania krwotoczne</i> | | | | | | | |
| Krwawienie do OUN | 1 | 0,5 | 1 | 0,7 | 0 | 0 | <i>ns</i> |
| Krew w moczu | 5 | 2,4 | 1 | 0,7 | 4 | 5,6 | <i>0,0457</i> |
| Krew w stolcu | 7 | 3,3 | 6 | 4,3 | 1 | 1,4 | <i>ns</i> |
| Krwawienie z nosa | 19 | 9,0 | 9 | 6,5 | 10 | 14,1 | <i>ns</i> |
| Krwawienie z dziąseł | 6 | 2,9 | 3 | 2,2 | 3 | 4,2 | <i>ns</i> |
| Wszystkie zdarzenia krwotoczne | 38 | 18,1 | 20 | 14,4 | 18 | 25,4 | <i>ns</i> |

Skróty jak w tabeli 19

Analiza krzywych przeżycia Kaplana-Meiera

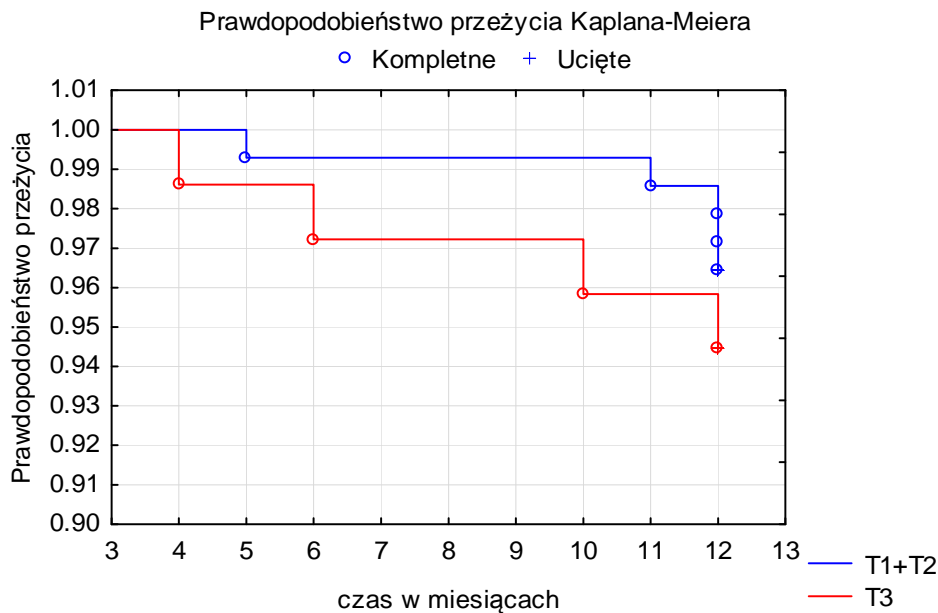
Rycina 19 przedstawia krzywe przeżycia pacjentów opornych i wrażliwych na kłopidogrel. Przeżycie po 12 miesiącach nie różniło się istotnie i wynosiło odpowiednio 95.83% vs. 95.76% (p=0,9933).



„tak”: oporni na kłopidogrel, „nie”: wrażliwi na kłopidogrel

Ryc.19. Krzywe przeżycia Kaplana - Meiera dla chorych opornych i wrażliwych na kłopidogrel.

Podobnie, nie stwierdzono różnic jeśli chodzi o przeżycie pacjentów z tercyla T1+T2 oraz T3, które wynosiło odpowiednio 96.45% vs. 94.44% ($p=0,7071$, Ryc. 20.).



Ryc.20. Krzywe przeżycia Kaplana - Meiera dla chorych przyporządkowanych do odpowiednich tercyl.

4.4 Wpływ czynników klinicznych, laboratoryjnych, oraz genotypu na występowanie zdarzeń klinicznych

Obserwacje szpitalne

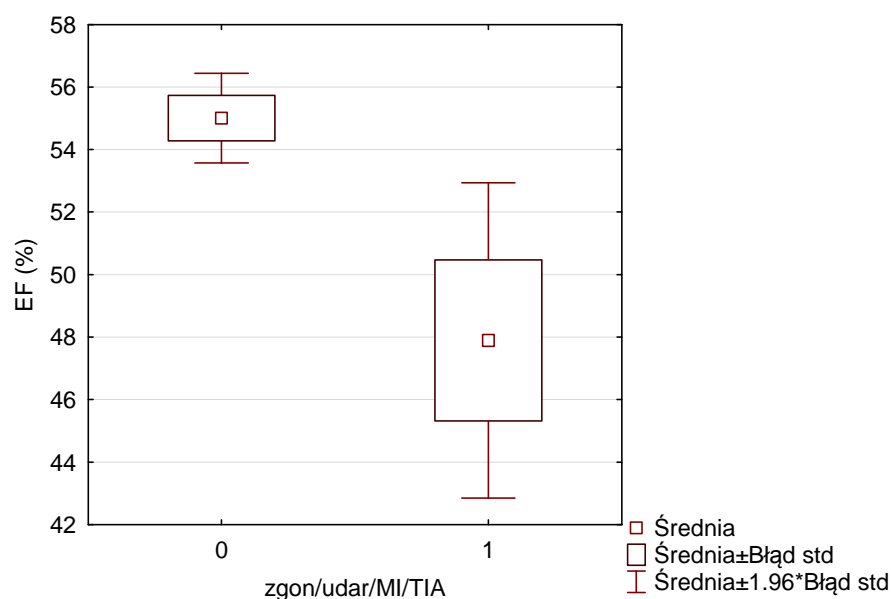
W czasie hospitalizacji, u 6 pacjentów przyjętych z rozpoznaniem stabilnej CAD (2,8%), (5 wrażliwych i 1 opornego na kłopidogrel) stwierdzono podwyższone poziomy markerów martwiczych po zabiegu PCI uprawniający do rozpoznania zawału serca. Ponadto, w czterech przypadkach doszło do łagodnych, niewymagających interwencji medycznej powikłań krwotocznych (wszystkie w grupie chorych wrażliwych na działanie kłopidogrelu). Żaden z badanych parametrów klinicznych jak i laboratoryjnych nie wykazał istotnej korelacji z wyżej wymienionymi zdarzeniami.

Obserwacje odległe

Pacjenci po opuszczeniu szpitala pozostali w 12. miesięcznej obserwacji klinicznej. W tym czasie 9 z nich zmarło (jeden zgon z powodu zawału serca, jeden z powodu udaru niedokrwiennego mózgu, dwa z powodu nowotworu, a w pozostałych przypadkach przyczyny nie są znane). U 9 chorych rozpoznano zawał serca, z czego tylko 1 STEMI, w następstwie zakrzepicy w stencie, prowadzącej do zgonu.

Predict Score

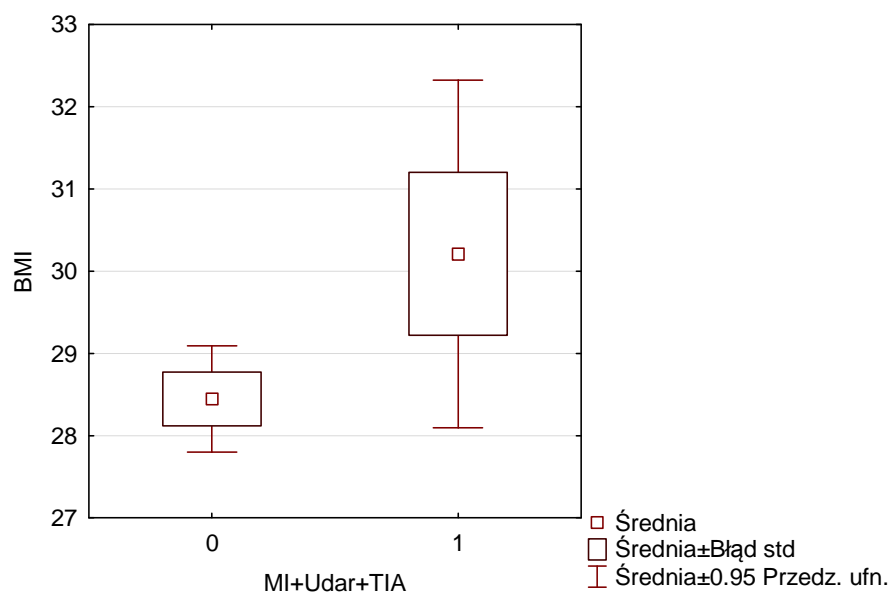
Stwierdzono, że zawał serca, a także zdarzenia niedokrwienne łącznie, występowały istotnie częściej u pacjentów leczonych pierwotnie z powodu ACS (15,38%), w porównaniu do chorych poddanych planowej PCI (2,73%, $p=0,0171$, $OR= 3.745$, 95% CI [1,185-11,830]). Podobnie łączne wystąpienie zgonu i zdarzeń niedokrwienych obserwowano istotnie częściej w grupie ACS ($p= 0,0073$, $OR=4,44$, 95% CI [1,59 - 12,36]), a także u pacjentów z obniżoną frakcją wyrzutową ($p=0,0417$, $OR=2,82$, 95% CI [1,1 - 7,4]). (Ryc. 21.).



Ryc. 21. Zależność między frakcją wyrzutową (EF) a wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zgonu / zawału serca / niedokrwiennych zdarzeń mózgowych); „0” – nie, „1” – tak.

Wpływ pozostałych czynników klinicznych

Nie wykazano istotnego wpływu na wystąpienie niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych takich czynników jak: wiek, płeć, masa ciała, wzrost. Natomiast u pacjentów, u których wystąpił złożony niedokrwienny punkt końcowy (zawał serca, niedokrwienny udar mózgu lub TIA) odnotowano istotnie statystycznie wyższe wartości BMI ($30,21 \pm 3,97$, $p=0,0353$), w porównaniu do pozostałych chorych ($28,45 \pm 4,55$), Ryc. 22.



Ryc. 22. Analiza korelacji BMI z wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zawału serca / MI / udaru niedokrwinnego mózgu oraz przejściowego niedokrwienia mózgu; TIA); „0” – nie, „1” – tak.

Analiza korelacji wybranych parametrów laboratoryjnych ze zdarzeniami klinicznymi

Oceniane parametry laboratoryjne zestawiono w tabeli 21.

Tab.21. Parametry laboratoryjne poddane analizie.

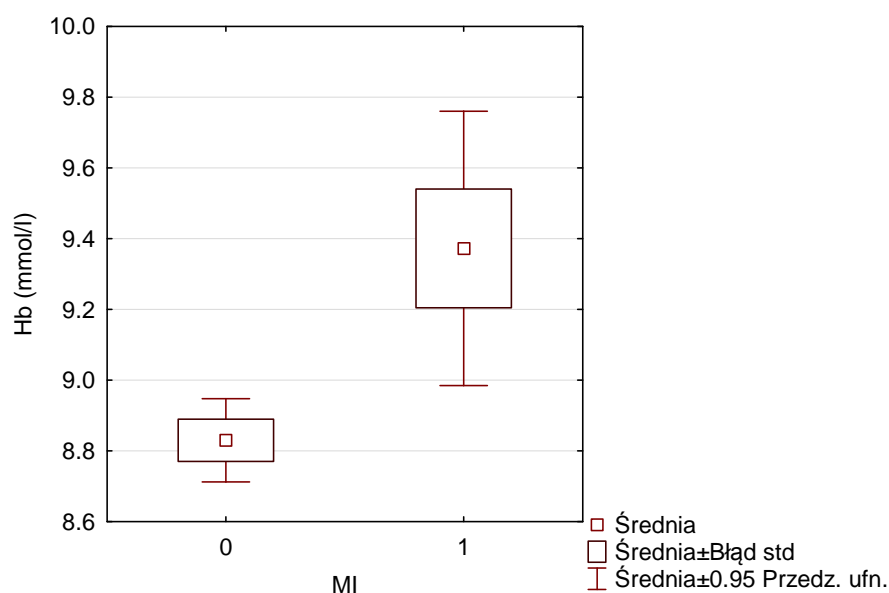
| |
|---------------------------------------|
| Glukoza (mmol/l) |
| Cholesterol całkowity (mmol/l) |
| LDL (mmol/l) |
| HDL (mmol/l) |
| Trójglicerydy (mmol/l) |
| Kreatynina (μmol/l) |
| OB (/h) |
| Hemoglobina (mmol/l) |
| Hematokryt (L/L) |
| PLT (tys/mm³) |
| MPV (fL) |
| RBC (mln/mm³) |
| WBC (tys/mm³) |
| CPK (U/L) |
| CK-MB (U/L) |
| Bilirubina (μmol/l) |
| NT-proBNP (pg/ml) |
| CRP (mg/l) |

Wykazano, że pacjenci, u których w obserwacji 12. miesięcznej wystąpił zawał serca (n=9) różnili się istotnie statystycznie pod względem wyjściowych wartości poziomu hemoglobiny (Hb), średniej objętości trombocyta (MPV) oraz liczby krwinek białych (WBC). Szczegóły przedstawiono w tabeli 22.

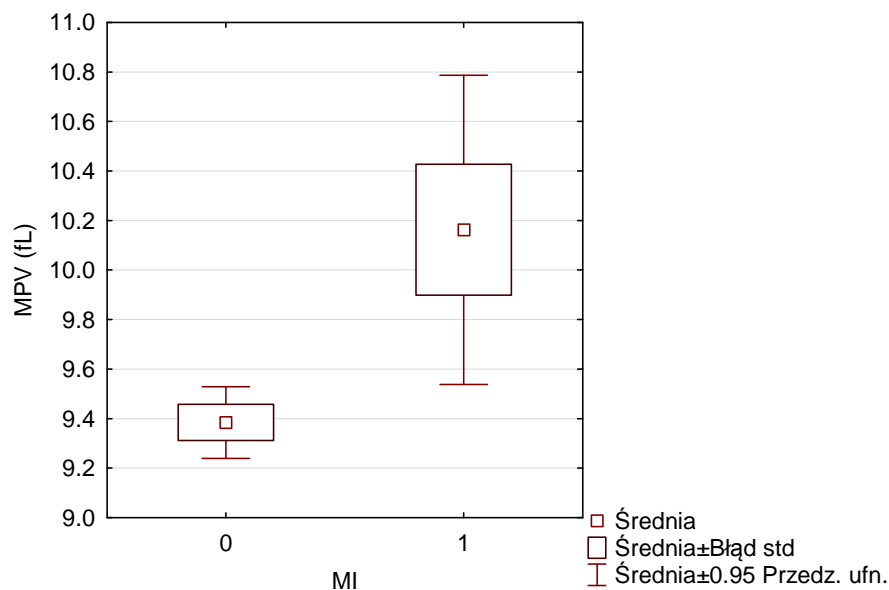
Tab.22. Analiza korelacji wybranych parametrów laboratoryjnych z wystąpieniem zawału serca w obserwacji 12. miesięcznej.

| | <i>Chorzy z zawałem serca</i> | | <i>Chorzy bez zawału serca</i> | | <i>p</i> |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|--------------------------------|-----------|----------|
| | <i>Średnia</i> | <i>SD</i> | <i>Średnia</i> | <i>SD</i> | |
| Hb (mmol/l) | 8,83 | 0,84 | 9,37 | 0,51 | 0,0427 |
| MPV (fL) | 9,38 | 0,98 | 10,16 | 0,75 | 0,0119 |
| WBC (tys/mm³) | 7,79 | 4,62 | 9,07 | 1,90 | 0,0113 |

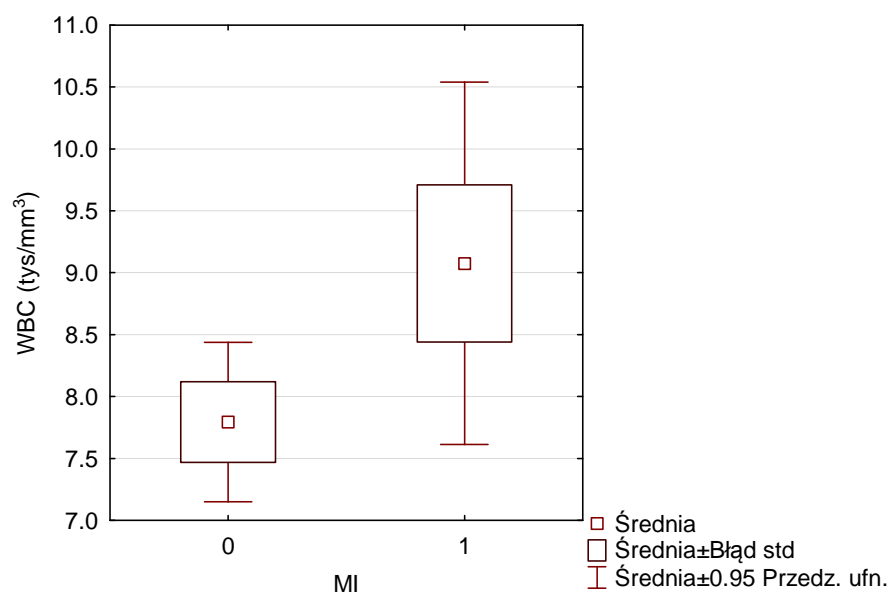
Ryciny 23, 24 i 25 przedstawiają średni poziom hemoglobiny (Hb), średnią objętość trombocyta (MPV) oraz liczbę krwinek białych (WBC).



Ryc. 23. Poziom hemoglobiny (Hb) w grupach z zawałem serca- MI (1) i bez zawału (0).

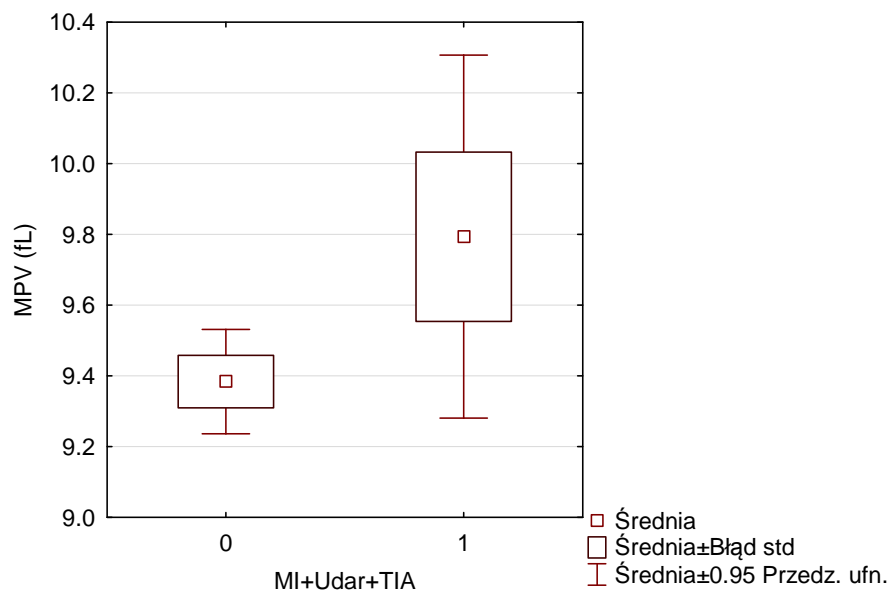


Ryc. 24. Objętość trombocyta (MPV) w grupach z zawałem serca- MI (1) i bez zawału (0).



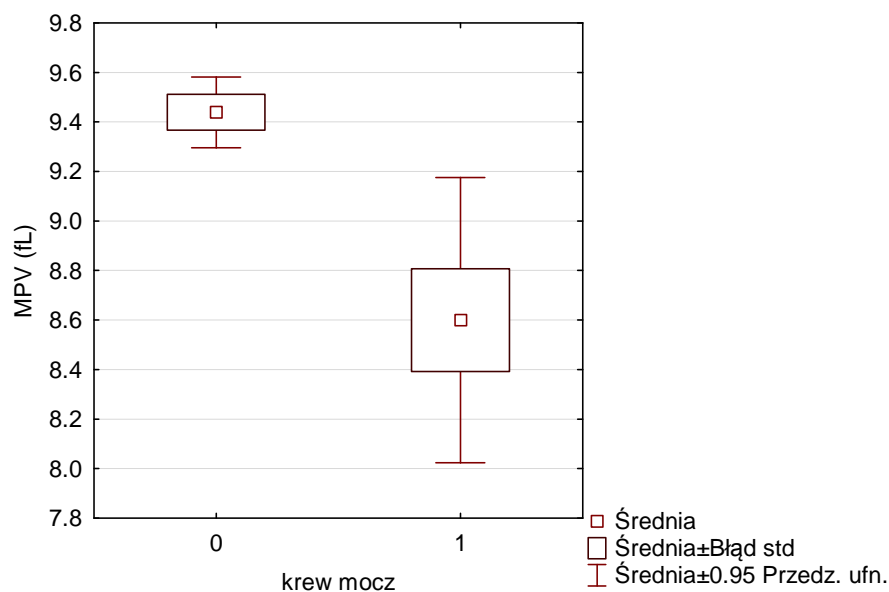
Ryc. 25. Liczba krwinek białych (WBC) w grupach z zawałem serca- MI (1) i bez zawału (0).

Podobnie stwierdzono istotnie wyższą wartość średniej objętości trombocyta u pacjentów, u których łącznie wystąpił zawału serca, udaru niedokrwienego mózgu lub TIA (n=16) – MPV ($9,79 \pm 0,93$ fL, $p=0,0221$), w porównaniu do pozostałych chorych ($9,38 \pm 0,98$ fL). (Ryc. 26.).



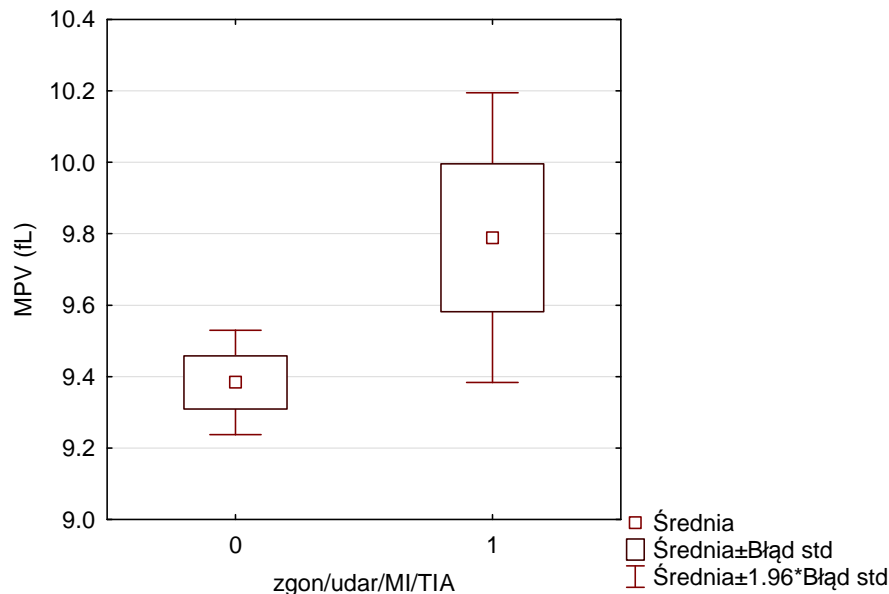
Ryc. 26. Zależność między średnią objętością trombocyta (MPV) a wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zawału serca / niedokrwiennego zdarzenia mózgowego); „tak” – 1, „nie” – 0.

Pacjenci, u których odnotowano wystąpienie krwi w moczu (n=5), mieli istotnie statystycznie niższe wartości średniej objętości trombocyta; MPV ($9,5 \pm 0,99$ fL, $p=0,0257$) w porównaniu do pozostałych chorych ($8,6 \pm 0,46$ fL). (Ryc. 27.).

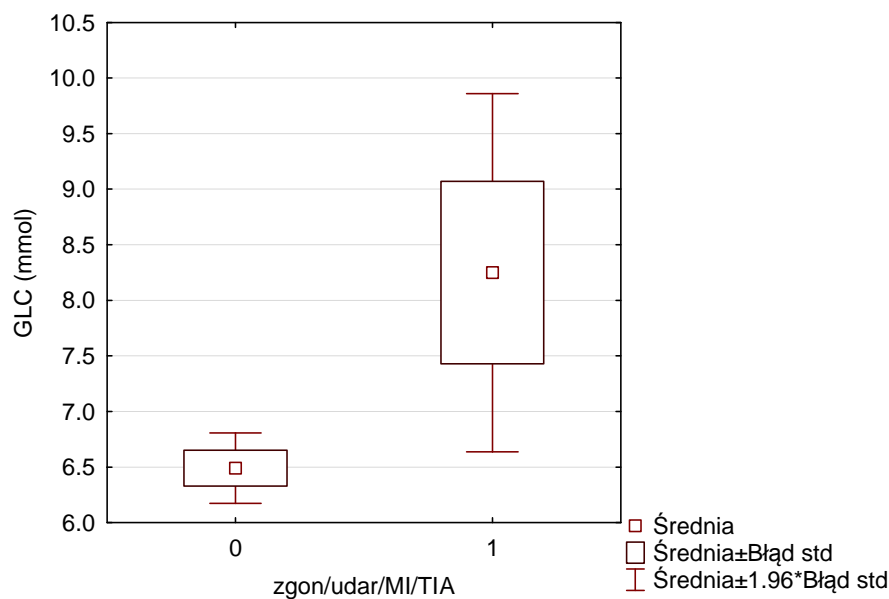


Ryc. 27. Analiza korelacji średniej objętości trombocyta (MPV) z wystąpieniem krwi w moczu; „tak” - 1, „nie” - 0.

Pacjenci, u których wystąpił zgon lub niedokrwienne zdarzenia mózgowie również mieli istotnie wyższe wartości średniej objętości trombocyta; MPV ($9,8 \pm 0,88$ fL, $p=0,0137$), w porównaniu do pozostałych chorych ($9,4 \pm 0,98$ fL). Ponadto u tych pacjentów stwierdzono wyższe poziomy glikemii w surowicy krwi ($8,25 \pm 3,68$ mmol/l, $p=0,0187$) w porównaniu do osób, u których zdarzeń tych nie odnotowano ($6,5 \pm 2,24$ mmol/l), (Ryc. 28., 29.).

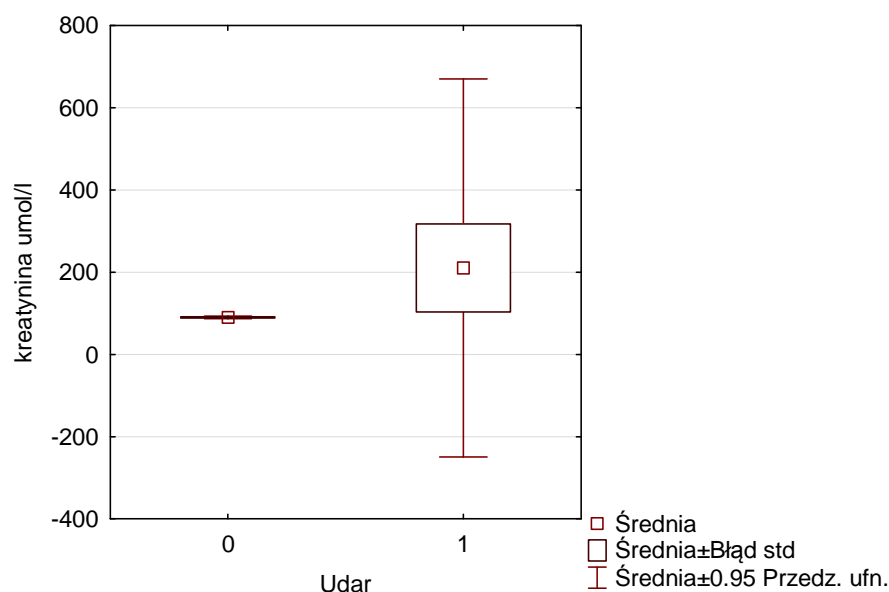


Ryc. 28. Zależność między średnią objętością trombocyta (MPV) a wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zgonu / zawału serca / niedokrwiennych zdarzeń mózgowych); „tak” - 1, „nie” - 0.



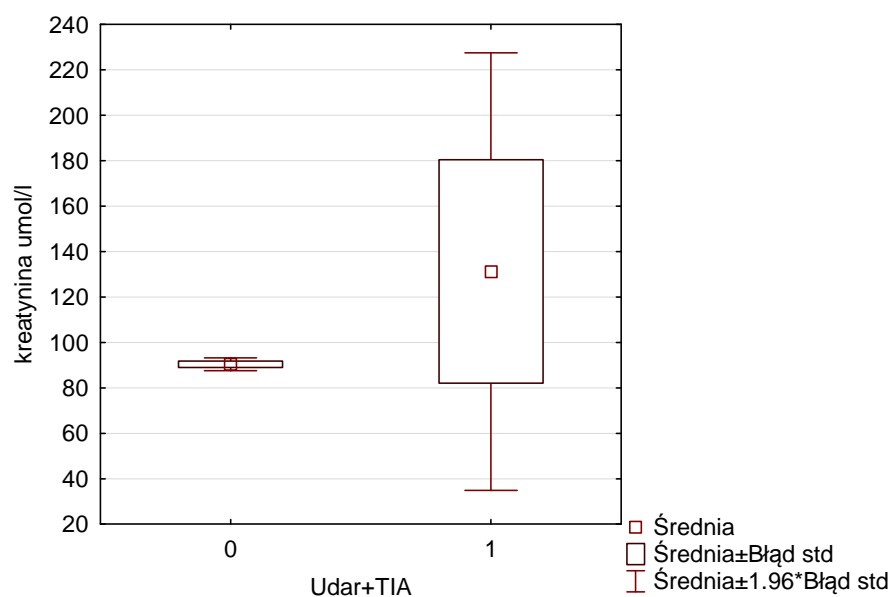
Ryc. 29. Zależność między poziomem glikemii (GLC) a wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zgonu / zawału serca / niedokrwiennych zdarzeń mózgowych); „tak” - 1, „nie” - 0.

Wykazano istotną różnicę w poziomie kreatyniny u osób, u których wystąpił udar niedokrwienny mózgu w porównaniu do pozostałej populacji badanej ($p=0,0321$). W grupie pacjentów, u których udar nie wystąpił, średni poziom kreatyniny wynosił $90,03 \pm 20,97 \mu\text{mol/l}$, natomiast w grupie, w której odnotowano udar, średni poziom kreatyniny wynosił $210,20 \pm 185,1 \mu\text{mol/l}$ (Ryc. 30.).



Ryc. 30. Analiza korelacji poziomu kreatyniny z wystąpieniem udaru niedokrwiennego mózgu; „tak” – 1, „nie” - 0.

Podobną zależność obserwowano u osób, u których wystąpił jakikolwiek niedokrwienny incydent mózgowy (Ryc. 31.). W grupie wolnej od zdarzeń mózgowych średni poziom kreatyniny wynosił $90,39 \pm 21,02 \mu\text{mol/l}$ natomiast w grupie, w której odnotowano zdarzenia średni poziom kreatyniny wynosił $131,26 \pm 130,0 \mu\text{mol/l}$ ($p=0,0410$).



Ryc. 31. Analiza korelacji poziomu kreatyniny z wystąpieniem niedokrwiennych zdarzeń mózgowych (udar lub TIA); „tak” – 1, „nie” - 0.

Ocena korelacji wariantów allelu CYP2C2C19 ze zdarzeniami klinicznymi

Jedynym zdarzeniem niedokrwiennym, które korelowało z obecnością niekorzystnego wariantu allelu CYP2C19 (*2/*2) było wystąpienie niedokrwiennego zdarzenia mózgowego ($p=0,0489$, $OR=10$; 95% CI [1,39 – 71,80]). Nie wykazano istotnych korelacji pomiędzy genotypem a powikłaniami krwotocznymi.

Zakrzepica w stencie

Zgodnie z definicją ARC (rozdział Materiał i metody) w badanej grupie, w okresie 12 miesięcy po opuszczeniu szpitala stwierdzono jeden przypadek zakrzepicy pewnej (potwierdzona angiograficznie), co stanowi 0,5% badanej populacji oraz 5 przypadków zakrzepicy możliwej (zgony o niewyjaśnionej przyczynie w czasie przekraczającym 30 dni od implantacji stentu), co stanowi 2,4% populacji. Zakrzepica pewna wystąpiła u pacjenta wrażliwego na kłopidogrel, zaś spośród 5 pacjentów zmarłych z nieznanych przyczyn 4 było wrażliwych (2,1% pacjentów wrażliwych), a 1 oporny (4,2% pacjentów opornych). Można zatem przyjąć, że łącznie jakakolwiek zakrzepica w stencie wydarzyła się u 5 pacjentów z grupy wrażliwych na kłopidogrel (2,7%) oraz u jednego z grupy opornych (4,2%). Nie znaleziono istotnej statystycznie korelacji pomiędzy badanymi czynnikami klinicznymi,

laboratoryjnymi (z uwzględnieniem badania oporności na kłopidogrel) oraz genetycznymi a wystąpieniem zakrzepicy w stencie zgodnej z definicją ARC.

5. Dyskusja

Od wielu lat zjawisko oporności na klopidoogrel jest badane, jednak wciąż niedokładnie poznane. Do podstawowych problemów należą: różne definicje, rozmaite metody jej oznaczania oraz rozbieżne dane dotyczące wpływu przełamania, stwierdzonej w danym teście oporności na przyszłe zdarzenia kliniczne. Definicja zaproponowana przez Gurbela, opierająca się na porównaniu funkcji płytek po podaniu leku z ich czynnością wyjściową⁵² nie uzyskała powszechnego uznania, ponieważ nie uwzględniała dużego zróżnicowania wartości wyjściowej. Nawet istotna różnica w aktywności płytek po podaniu leku nie przełoży się na zmniejszenie zdarzeń niedokrwiennych u pacjentów, u których wyjściowo agregacja była bardzo wysoka. Z kolei u pacjentów z niską agregacją, pomimo słabej odpowiedzi na lek przeciwplateletowy ryzyko wystąpienia zdarzeń niedokrwiennych będzie przeszacowane. Z tego powodu Bonello i wsp. zaproponowali w 2010 roku nową definicję postulując przyjęcie bezwzględnej wartości punktu odcięcia reaktywności płytek podczas terapii przeciwplateletowej dla powszechnie stosowanych metod pomiaru. Wprowadzono pojęcie *high on-treatment platelet reactivity* (HTPR), a więc zwiększonej reaktywności płytek krwi pomimo leczenia przeciwplateletowego⁵³. Niestety, praktyka kliniczna wykazała, że taki sztywny podział, na pacjentów opornych i wrażliwych, przy użyciu jednego punktu odcięcia niesie ze sobą duże ryzyko błędów, ponieważ w grupie zarówno powyżej, jak i poniżej punktu odcięcia znajduje się cały szereg wartości o znacznym rozrzucie.

Uwagi na temat badanej populacji

Wyniki stosowania danej strategii terapeutycznej niewątpliwie zależą od wyjściowego ryzyka leczonej grupy. Pacjenci z dużym zagrożeniem wystąpienia niekorzystnych zdarzeń niedokrwiennych odniosą większe korzyści ze skutecznej blokady funkcji płytek niż chorzy o małym zagrożeniu. Z kolei u osób o dużym ryzyku powikłań krwotocznych korzystny wpływ leku zostanie zniwelowany wystąpieniem krwawień. Populacja badana w niniejszej pracy, z pewnością należy do grupy niskiego ryzyka. Zdecydowana większość to względnie młodzi pacjenci, przyjęci na planowy zabieg koronarografii. Tylko niespełna 14 procent leczonych było z powodu ACS, nie było przypadków STEMI. Zabieg PCI u wszystkich, z wyjątkiem dwóch leczonych dotyczył jednego naczynia wieńcowego. W obserwacji rocznej odsetek zdarzeń niedokrwiennych wynosił odpowiednio: zawał serca (4,2%), udar niedokrwienny mózgu (1,4%), przejściowe niedokrwienie mózgu (1,9%). Łącznie zawał serca lub

niedokrwienny udar mózgu wystąpił u 12 pacjentów (5,7%), zaś łącznie zgon, zawał serca lub udar wystąpiły u 19 pacjentów (9,0%). Trzeba zaznaczyć, że w związku z brakiem dokładnych informacji uwzględniliśmy wszystkie zgony, a nie tylko sercowo-naczyniowe. Tymczasem większość ważnych badań randomizowanych oceniających znaczenie kłopidogrelu u pacjentów z CAD przeprowadzono na populacji z ACS. W badaniu PCI-CURE⁹⁶, TRITON TIMI-38³⁴ oraz PLATO⁹⁷ w grupie stosującej kłopidogrel, złożony niedokrwienny punkt końcowy (odsetek zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych, zawałów serca niepowikłanych zgonem lub udarów mózgu) w obserwacji 12. miesięcznej wyniósł odpowiednio 9,3%, 12,1% oraz 11,7%. W naszym przypadku odsetek ten wyniósł 9%, z tym, że jak już wspomniano, prawdopodobnie większość z 9 zgonów nie była pochodzenia sercowego. Wynik ten jest bardziej zbliżony do obserwacji u pacjentów ze stabilną CAD. W badaniu CREDO złożony punkt końcowy (zgon, zawał, udar) stwierdzono u 8%, zaś w badaniu CHARISMA, w obserwacji ponad dwuletniej 6,8%. Jeszcze raz przypomnę, że we wszystkich wymienionych badaniach brano pod uwagę wyłącznie zgony z przyczyn sercowo-naczyniowych, a nie śmiertelność ogólną.

Podobnie, badana populacja należała do grupy niskiego ryzyka wystąpienia powikłań krwotocznych. Stosunkowo młody wiek pacjentów (średnia wieku 64,6 lat), niestosowanie blokerów IIb/IIIa, osłona inhibitorami pompy protonowej oraz wykonywanie większości zabiegów z dostępu promieniowego (71%) zdecydowanie ograniczyły częstość tych powikłań. Odsetek krwawień podczas zabiegów PCI wykonywanych z dostępu promieniowego, w porównaniu do udowego, opisywany jest w literaturze odpowiednio: 0,7%-1,1% vs. 1,2%- 2,9%⁹⁸. Trzeba też odnotować, że żaden z naszych pacjentów nie wymagał operacji CABG. W czasie hospitalizacji wystąpiły tylko cztery przypadki łagodnych krwawień, wyłącznie w grupie leczonej z dostępu udowego, w postaci dużego krwiaka w miejscu wkłucia. Powikłania te nie wymagały interwencji leczniczej ani odstawienia leków przeciwplatekcyjnych. W obserwacji rocznej stwierdziliśmy zaledwie jeden przypadek ciężkiego powikłania krwotocznego (wg klasyfikacji GUSTO), pod postacią krwawienia do ośrodkowego układu nerwowego (0,5%). Poza tym obserwowano tylko krwawienia łagodne: 19 epizodów krwawienia z nosa (9,1%), 7 przypadków krwi w stolcu (3,3%), 6 obserwacji krwawienia z dziąseł (2,9%) i 5 przypadków krwi w moczu (2,4%). Tymczasem w badaniu CURE, w obserwacji rocznej, ciężkie powikłania krwotoczne, w grupie leczonych kłopidogrelem + ASA wystąpiły u 3,7% pacjentów, częściej niż u leczonych tylko ASA - 2,7% (p=0.001). Zaobserwowano tu dodatkowo zależność od stosowanej dawki ASA. Dla dawek 100 mg, 101-199 mg lub powyżej 200 mg na dobę, częstość poważnych powikłań

krwotocznych wynosiła odpowiednio: 3,0%, 3,4% i 4,9% ($p < 0,001$). W naszej grupie dawka podtrzymująca ASA wynosiła 75 mg na dobę. W badaniach TRITON TIMI-38 oraz PLATO bardzo ciężkie powikłania krwotoczne (wg tamtej definicji: zakończone zgonem, wstrząsem, wewnątrzczaszkowe, do worka osierdziowego oraz wymagające interwencji chirurgicznej lub przetoczenia > 4 jednostek krwi) w grupie klopidoogrelu wystąpiły odpowiednio u 1,8 i 2,2% badanych. W badaniu CREDO odsetek dużych krwawień wg definicji TIMI, w grupie klopidoogrelu wystąpił aż u blisko 9% leczonych. Z kolei w populacji niskiego ryzyka badania CHARISMA, w obserwacji 28. miesięcznej częstość poważnych krwawień wg. klasyfikacji GUSTO (krwawienie zakończone zgonem, krwotok wewnątrzczaszkowy lub krwawienie wymagające przetoczenia krwi lub płynu, wspomaganie inotropowego lub interwencji chirurgicznej) wynosiła 1,7%, krwawienie zakończone zgonem 0,3%, krwawienie do OUN 0,3% i krwawienia umiarkowane 2,1%. Łącznie spośród 15 603 włączonych pacjentów 487 (3,1%) doznało umiarkowanego lub poważnego krwawienia. Badana populacja, bardziej przypomina populację niskiego ryzyka tego badania, z tym że oczywiście wszyscy pacjenci byli tu leczeni zabiegiem PCI. Ponadto przyjęto tę samą definicję krwawień.

Parametry kliniczne i laboratoryjne a występowanie oporności na klopidoogrel

To relatywnie niskie ryzyko, zarówno zdarzeń niedokrwienych jak i krwotocznych w badanej grupie z pewnością mogło przełożyć się na uzyskane w pracy wyniki. Zdając sobie sprawę z tego faktu podjęto próbę opracowania dokładniejszej metody podziału chorych ze względu na stopień zahamowania aktywności płytek. Oprócz typowego podziału binarnego, z punktem odcięcia typowym dla pomiaru aparatem Multiplate (468 AU/min), grupę badaną podzielono na tercyle, uzyskując tym samym 3 przedziały. Dwa pierwsze mieściły się poniżej punktu odcięcia kwalifikującego chorych jako opornych (zgodnie z definicją oporności), dlatego tę grupę potraktowano jako wrażliwą na klopidoogrel. Do tercyla trzeciego zakwalifikowani zostali pacjenci z wartościami najwyższymi, a więc najslabiej odpowiadający na leczenie. Stosując te dwa różne sposoby kwalifikacji pacjentów stwierdzono, że wg definicji klasycznej w naszej populacji znalazło się 11,2% opornych, natomiast przy podziale na tercyle, w grupie z największą opornością T3 znalazła się 1/3 badanych (33,3%). Wartości te pokrywają się z odsetkiem pacjentów opornych na klopidoogrel spotykanym w różnych badaniach, określanym na 5 – 44%^{99,116,117}. W odróżnieniu do klasycznego podziału, podział na tercyle ujawnił, że w grupie T3 znaleźli się pacjenci z istotnie większą masą ciała, wyższym BMI oraz niższymi średnimi poziomem HDL. Krzywe ROC wskazują, że niski HDL predysponuje do przynależności do tercyla T3. Optymalny

punkt odcięcia – 1,26 mmol/L dawał czułość 66,3% i specyficzność 55,4% ($p=0,0116$, $AUC=0,594$). Ponadto, pacjenci w tercylu T3 mieli istotnie wyższą liczbę płytek krwi ($p=0,0366$) i krwinek białych ($p=0,0198$). Poziomy WBC jak i PLT również wykazały słabą, aczkolwiek istotną wartość prognostyczną w kwalifikowaniu chorych do danego tercyla ($p=0,0197$ i $p=0,0368$). Z kolei analizując klasyczny podział „oporni / wrażliwi” zauważono istotnie wyższe wartości OB w grupie opornych (0,0363). Pacjenci oporni i wrażliwi na kłopidogrel oraz chorzy z tercyla T1+T2 w porównaniu z tercylem T3 nie różnili się istotnie pod względem częstości występowania większości czynników ryzyka CAD oraz chorób współistniejących. Jediną istotną różnicę zaobserwowano w cukrzycy, która u pacjentów z tercyla T3 występowała dwukrotnie częściej niż w tercylach T1+T2 ($p=0,0072$). Zastanawia, dlaczego nie odnotowano tej zależności przy podziale klasycznym. W literaturze znajduje się wiele doniesień na temat zwiększonej aktywności płytek krwi u pacjentów z cukrzycą^{100,101,102}. Uważa się, że właśnie dysfunkcja płytek przyczynia się do zwiększonego ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca u cukrzyków¹⁰³. Cukrzyca wiąże się z 2 – 4-krotnie większym ryzykiem wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych, a także z większą częstością występowania zwiększonej reaktywności płytek krwi mimo stosowania zarówno kwasu acetylosalicylowego, jak i kłopidogrelu¹⁰⁴. W przytaczanej już pracy Geislera, cukrzyca, obok niewydolności nerek, dysfunkcji lewej komory, ostrego zespołu wieńcowego i wieku powyżej 65 lat była czynnikiem prognostycznym zwiększonej rezydualnej aktywności płytek krwi pomimo leczenia kłopidogrelem¹⁰⁵. Angillo i wsp. udowodnili, że efekt przeciwplatekowy po zastosowaniu dawki nasycającej kłopidogrelu 300 mg był opóźniony w czasie nawet o 24 godziny w stosunku do grupy wrażliwej na działanie leku¹⁰⁶. Inna praca donosi o zmniejszonej wrażliwości cukrzyków poddawanych zabiegom PCI na zastosowane dawki 600 mg kłopidogrelu. Wykazano też, że poziom wyrównania metabolicznego u chorych z cukrzycą, mierzony stężeniem hemoglobiny glikowanej we krwi, może determinować stopień zahamowania aktywności płytek krwi¹⁰⁷. Ponadto powikłania narządowe cukrzycy, zwłaszcza nefropatia cukrzycowa i związane z nią zaburzenia metaboliczne, mogą wpływać na zdolność płytek krwi do agregacji¹⁰⁸. W mojej pracy pacjenci, u których wystąpił zgon lub niedokrwienne zdarzenia mózgowe również mieli istotnie wyższe poziomy glikemii w surowicy krwi ($8,25\pm 3,68$ mmol/l, $p=0,0187$) w porównaniu do osób, u których zdarzeń tych nie odnotowano ($6,5\pm 2,24$ mmol/l). Być może brak istotnych różnic w odsetku cukrzyków w grupach „wrażliwych” i „opornych” wynika z niewielkiej liczby pacjentów w tej drugiej grupie ($n=28$) wyznaczonej zgodnie z klasyczną definicją oporności.

Wskaźnik Predict Score (PS) a oporność na klopidogrel

Celem znalezienia czynników klinicznych lub laboratoryjnych mogących wpływać na wystąpienie zjawiska oporności płytek krwi na klopidogrel, w oparciu o publikację z 2007⁶⁹ roku oraz obserwacje własne utworzyłam kwestionariusz Predict Score. W badaniu Geislera i wsp. autorzy dowiedli, że niektóre cechy kliniczne i laboratoryjne istotnie wpływają na występowanie osłabionej odpowiedzi na klopidogrel. Należą do nich: ostry zespół wieńcowy, obniżona frakcja wyrzucania lewej komory, cukrzyca, niewydolność nerek, wiek >65 lat. Wykazano również, że chorzy z liczbą punktów 7 – 9 (z 11 zawartych w kwestionariuszu) mają ponad trzykrotnie większe prawdopodobieństwo wystąpienia upośledzonej odpowiedzi na klopidogrel, w porównaniu do pacjentów z sumą punktów równą zero. W badaniu wykorzystano zestaw 5 cech o udowodnionym wpływie na wyniki zahamowania agregacji ze wspomnianej pracy Geislera. Ponadto podjęto próbę zidentyfikowania kolejnych cech klinicznych i laboratoryjnych (PS), które mogłyby pomóc lekarzom wyłonić grupę chorych szczególnie narażonych na nieadekwatne działanie leków przeciwplatek, już przy pierwszym kontakcie z pacjentem. Znajomość takiego prostego wskaźnika ułatwiłaby szybkie podjęcie stosownej decyzji terapeutycznej w grupie wysokiego ryzyka. W moim kwestionariuszu badałam między innymi wpływ stężenia bilirubiny, która jest substancją o możliwym działaniu ochronnym przeciwmiżdżycowym i antyoksydacyjnym¹⁰⁹. Badano wpływ poziomu CRP, uznanego markera procesów zapalnych oraz parametru pomagającego wykryć podwyższone ryzyko niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z ACS¹¹⁰. Badano także NT-proBNP, czynnik korelujący ze stopniem nasilenia choroby niedokrwiennej serca oraz markerem śmiertelności u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową¹¹¹. W kwestionariuszu ujęłam także stosowanie morfiny, która spowalniając motorykę przewodu pokarmowego upośledza wchłanianie klopidogrelu. Niestety liczebność grupy, której podano lek, z uwagi na niski odsetek ACS, była bardzo niska. Spośród badanych cech znalazłam istotną korelację między rozpoznaniem cukrzycy oraz wysokim BMI a wystąpieniem zwiększonej reaktywności płytek krwi u pacjentów tercyla T3. Nadwaga lub otyłość, podobnie jak cukrzyca jest uznanym czynnikiem upośledzającym działanie leków przeciwplatek na płytki krwi. Jak wiemy, wpływ otyłości to nie tylko problem niedostatecznej dawki leku w stosunku do masy ciała chorego ale również stanu zapalnego aktywującego płytki poprzez receptor dla leptyny (produkowanej przez komórki tłuszczowe)¹¹². Moja analiza nie wykazała jednak przydatności większości parametrów zawartych w kwestionariuszu PS w prognozowaniu wystąpienia upośledzonej odpowiedzi na

leczenie przeciwplatek. Analiza czynników ujętych w kwestionariuszu PS nie wykazała również istotnej korelacji z przyporządkowaniem chorego do odpowiedniego tercyla. Celem dodatkowego sprawdzenia przydatności PS wykreślono krzywe ROC. Niestety, także suma punktów uzyskanych z poszczególnych składowych testów nie wykazała przydatności w przewidywaniu wystąpienia oporności na lek ($p=0,8908$, $AUC=0,492$). Być może jest to związane ze zbyt małą liczebnością grupy oraz stosunkowo niskim odsetkiem niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych, co jest charakterystyczne w populacjach o małym ryzyku. W cytowanej już pracy niemieckiej liczebność grupy badanej wynosiła 1125, a powodem hospitalizacji połowy pacjentów włączonych do badania był ostry zespół wieńcowy.

Ciekawą obserwacją badania jest znalezienie istotnie wyższych wartości OB w grupie pacjentów opornych na kłopidogrel ($p=0,0363$). Ponadto zauważono, że pacjenci w tercylu T3 mieli istotnie wyższą liczbę krwinek białych ($p=0,0198$). Wielu badaczy poszukuje związku między wykładnikami procesu zapalnego a osłabioną odpowiedzią na leczenie przeciwplatek^{113,114}. W wielu wcześniejszych badaniach obserwowano wyższe poziomy markerów zapalnych (CRP, P-selektyny, interleukiny-6 i CD 40) u pacjentów z osłabioną odpowiedzią na kłopidogrel.¹¹⁵ Mimo, że w mojej pracy nie udało się wykazać istotnej korelacji poziomu CRP z funkcją płytek krwi, to jestem przekonana, że dalsze poszukiwania związku rezydualnej aktywności płytek z wykładnikami procesu zapalnego wymagają kontynuacji.

Metody wykrywania oporności płytek krwi na kłopidogrel

Częstość występowania zjawiska oporności na kłopidogrel szacowana jest w piśmiennictwie na 5-44%^{116,117,118}. To zróżnicowanie związane jest z charakterystyką badanej populacji, wielkością zastosowanej dawki i czasem pobrania próbek krwi po podaniu leku. Jednakże znaczącą rolę wydaje się odgrywać metoda oznaczania zahamowania agregacji płytek krwi, jak i definicja oporności przyjęta przez badaczy. Brak standaryzacji metod i norm jest swoistą „piętą achillesową” w ocenie skuteczności działania kłopidogrelu. W omawianej populacji, na podstawie uzyskanych wyników pomiaru agregacji płytek krwi przy użyciu aparatu Multiplate, zidentyfikowano 28 osób opornych (11,24%) oraz 221 pacjentów wrażliwych na działanie kłopidogrelu (88,7%). Wyniki wielu dużych badań wciąż nie są jednoznaczne odnośnie przydatności testów laboratoryjnych służących określeniu fenotypu pacjentów w codziennej praktyce klinicznej. Problemem pozostaje wciąż brak jednej, wiarygodnej metody pomiaru aktywności płytek krwi, którą można by uznać za złoty standard. Wielu badaczy używa w codziennej praktyce różnych metod. Nie opracowano też,

jak dotąd, sprawdzonej formuły umożliwiającej porównywanie wyników uzyskiwanych przy użyciu różnych aparatów. Ten brak standaryzacji badań przysparza wiele problemów z ich interpretacją. W opublikowanym w 2012 roku badaniu PEGASUS wykorzystano 4 różne metody badania zjawiska agregacji płytek krwi. Udowodniono, że spośród następujących metod: VASP (*ang. vasodilator-stimulated phosphoprotein*), CPA (*ang. cone and platelet analyser*), PFA-100 i Multiplate, ten ostatni okazał się być najlepszym narzędziem w przewidywaniu ryzyka wystąpienia zakrzepicy w stencie. Co więcej, wykazano, że wyniki uzyskiwane z użyciem aparatu Multiplate korelowały lepiej z wystąpieniem zakrzepicy w stencie, niż badania genetyczne polimorfizmu CYP2C19¹¹⁹.

Wpływ genotypu na występowanie oporności na kłopidogrel

Wiele wątpliwości wiąże się z wykorzystywaniem testów genetycznych w celu wykrywania chorych będących nosicielami genów upośledzonego metabolizmu leków przeciwplatek. Szacuje się, że nawet 30% populacji rasy białej jest nosicielami wadliwego wariantu genu, czego konsekwencją jest zwiększone ryzyko wystąpienia niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych^{120,121}. Pomimo możliwości wykrywania wariantów genetycznych predysponujących do upośledzonej odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe, nie mamy dotąd jednoznacznej wiedzy jak „oporność genetyczna” przełoży się na zdarzenia kliniczne u chorych. Obszarem największych badań jest oporność na kłopidogrel uwarunkowana ekspresją zmutowanego allelu upośledzonego metabolizmu kłopidogrelu CYP2C19*2¹²². Wiele dużych badań klinicznych potwierdziło, iż obecność polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (*ang. single-nucleotide polymorphism, SNP*) CYP2C19*2 lub *3 koreluje ze słabszą inhibicją płytek krwi, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zdarzeń niedokrwiennych, m. in. zakrzepicy w stencie¹²³. W opublikowanej przez Hullota i wsp. metaanalizie wykazano, że nosiciele allelu CYP2C19*2 z chorobą niedokrwienną serca mają o ponad 30% wyższe ryzyko wystąpienia niepożądanych zdarzeń sercowych, w porównaniu do tzw. „noncarriers” (9,7% v. 7,8%; (OR):1,29, p<0,001)¹²⁴. W roku 2011 opublikowano wyniki metaanalizy 32 dużych badań, w których badano wpływ polimorfizmu CYP2C19 na stopień zahamowania agregacji płytek krwi i zdarzenia kliniczne u ponad 42 tys. pacjentów. Wykazano występowanie zmniejszonego poziomu aktywnego metabolitu kłopidogrelu oraz zwiększonej aktywności płytek krwi pomimo leczenia antyagregacyjnego u nosicieli allelu upośledzonego metabolizmu kłopidogrelu. Mimo tak dużej liczby pacjentów nie stwierdzono jednak istotnego wpływu genotypu na wystąpienie zdarzeń sercowo-naczyniowych¹²⁵. W omówionej grupie badanej

(n=147) wystąpiło 106 przypadków polimorfizmu *1/*1 (72,1%), 31 przypadków *2/*1 (21,1%) i 10 przypadków *2/*2 (6,8); zsumowany odsetek homozygot i heterozygot *2/*2 i *2/*1 wyniósł 27%. W pracy Sibbinga z 2009 roku, w populacji 2485 pacjentów, rozkład procentowy poszczególnych polimorfizmów wynosił odpowiednio: *1/*1 (73%), suma polimorfizmów *2/*2 i *2/*1 (27%). W omawianej populacji wystąpiło więcej przypadków polimorfizmu *2/*2 (6,8%), podczas gdy spodziewano się zaledwie 4. Z tego powodu nie został spełniony model równowagi Hardy-Weinberga, co potraktowano jako zaletę badania. Mimo jednak częstszego wystąpienia wadliwego wariantu *2/*2 nie wykazano istotnej zależności między genotypem a częstością występowania oporności na kłopidogrel. Podobnie, częstość występowania danych genotypów nie różniła się istotnie względem analizowanych tercyl: T1+T2 i T3. Co ciekawe, badanie nasze wykazało istotną korelację między obecnością niekorzystnego wariantu allelu CYP2C19 (*2/*2) a wystąpieniem niedokrwiennych zdarzeń mózgowych (p=0,0489, OR=10; 95% CI [1,39 – 71,80]). Nie wykazano natomiast istotnych korelacji pomiędzy genotypem a innymi zdarzeniami niedokrwiennymi oraz powikłaniami krwotocznymi. Ten brak korelacji z takimi zdarzeniami jak zgon czy zawał serca może się oczywiście wiązać z małą liczbą tych zdarzeń w populacji niskiego ryzyka, jednakże w piśmiennictwie można znaleźć wiele sprzecznych informacji na ten temat¹²⁵.

Wpływ oporności na kłopidogrel na występowanie niekorzystnych zdarzeń klinicznych

Fakt zaistnienia oporności na kłopidogrel przełożył się w badanej populacji na częstość występowania niektórych zdarzeń niedokrwiennych i krwotocznych. Pacjenci oporni na kłopidogrel oraz chorzy z grupy T3 przebyli istotnie częściej niedokrwienny udar mózgu w czasie obserwacji, w porównaniu do chorych wrażliwych lub populacji T1+T2. Jest to wyraźna korelacja świadcząca o istotnym wpływie blokady funkcji płytek krwi w prewencji niedokrwiennego udaru mózgu w populacji dotkniętej miażdżycą tętnic¹²⁶. Podobne obserwacje znajdziemy w pracy z 2006 roku, oraz innych, w której autorzy wykazali, że upośledzona odpowiedź na kłopidogrel u chorych z objawową CAD wiązała się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia niedokrwiennych zdarzeń sercowo-naczyniowych^{127,128}. Z kolei u pacjentów grupy T3 ośmiokrotnie częściej diagnozowano krwimocz (5,6%) w porównaniu z grupą T1+T2 (0,7%). Powyższa różnica była istotna statystycznie (p=0,0457). Wzrost ryzyka krwawień jest obserwacją znajdowaną w większości badań porównujących stosowanie podwójnej terapii przeciwpłytkowej, złożonej z kłopidogrelu i ASA, w porównaniu do monoterapii samą aspiryną (CURE¹²⁹, CREDO¹³⁰, CHARISMA¹³¹). Nadal

nierozwiązanym problemem jest sposób postępowania z pacjentami po zabiegach PCI, u których stwierdzono wysoką reaktywność płytek pomimo leczenia przeciwplatekowego. W badaniu GRAVITAS, w grupie ponad 2000 pacjentów ze stabilną chorobą niedokrwienną serca lub zawałem serca bez uniesienia odcinka ST leczonych PCI badano wpływ zastosowania dużej dawki podtrzymującej kłopidogrelu (150 mg/dzień) w porównaniu ze standardową dawką leku (75 mg/dzień) u chorych ze zwiększoną reaktywnością płytek ocenianą za pomocą aparatu VerifyNow¹³². Wykazano, iż podwojenie dawki podtrzymującej kłopidogrelu nie wiązało się ze zmniejszeniem częstości występowania zdarzeń takich jak: zgon z przyczyn sercowo-naczyniowych, niezakończony zgonem zawał serca oraz zakrzepica w stencie¹³². Wyniki badania GRAVITAS nie potwierdziły zatem, zasadności stosowania wyższych dawek kłopidogrelu u chorych z opornością na lek. Innym rozwiązaniem jest zamiana kłopidogrelu na nowe, silniejsze blokery receptora P2Y12. Badanie RESPOND wykazało, że niezależnie od tego czy pacjenci przed zamianą kłopidogrelu na tikagrelor zakwalifikowani byli jako wrażliwi czy oporni na kłopidogrel, stopień zahamowania aktywności płytek był podobnie wysoki w obu grupach¹³³. Mimo wielu dowodów przewagi działania obu nowych leków antyagregacyjnych w porównaniu z kłopidogrelem, nadal brakuje bezpośrednich dowodów uzasadniających rutynową zamianę leków u pacjentów z wysoką aktywnością płytek w czasie leczenia kłopidogrelem. Podobnie, badanie RESET GENE TRIAL wykazało, że przełamanie oporności zwiększeniem dawki kłopidogrelu do 150 mg dziennie jest możliwe jedynie u chorych, którzy nie posiadali niekorzystnej mutacji allelu CYP2C19. Natomiast zastosowanie prasugrelu, w dawce 10 mg/dzień umożliwiło przełamanie oporności niezależnie od obecności wadliwego wariantu tego allelu¹³⁴. Wydawałoby się więc, że zamiana kłopidogrelu na skuteczniejszy lek przeciwplatekowy poprawi rokowanie „opornych” pacjentów po zabiegach PCI. Problem w tym, że większość z nich, mimo potwierdzonej oporności na kłopidogrel nie będzie miało niekorzystnych zdarzeń niedokrwiennych w obserwacji odległej. Zamiana na silniejszy lek antyagregacyjny nie poprawi więc ich rokowania pod tym względem, a zwiększy ryzyko wystąpienia powikłań krwotocznych.

Wpływ czynników klinicznych i laboratoryjnych na występowanie niekorzystnych zdarzeń klinicznych

Przede wszystkim stwierdzono, że zawał serca, a także zdarzenia niedokrwienne łącznie, występowały istotnie częściej u pacjentów leczonych pierwotnie z powodu ACS (15,38%), w porównaniu do chorych poddanych planowej PCI (2,73%, $p=0,0171$, $OR= 3.745$, 95% CI [1,185-11,830]). Podobnie łączne wystąpienie zgonu i zdarzeń niedokrwienych obserwowano istotnie częściej w grupie ACS ($p= 0,0073$, $OR=4,44$, 95% CI [1.59 - 12,36]), a także u pacjentów z obniżoną frakcją wyrzutową ($p=0,417$, $OR=2,82$, 95% CI [1,1 - 7,4]). Jak wiadomo oba parametry są uznanym czynnikiem ryzyka u pacjentów z CAD. Wśród pacjentów, u których wystąpił złożony punkt końcowy (zawał serca, udar niedokrwienno mózgu oraz przejściowe niedokrwienie mózgu) odnotowano także istotnie statystycznie wyższe wartości BMI ($30,21\pm 3,97$, $p=0,0353$). Można się zastanawiać czy ten niekorzystny wpływ zwiększonej masy ciała jest efektem bezpośrednim, czy też wiąże się z wykazanim przez nas negatywnym wpływem na blokowanie funkcji płytek przez klopidoogrel. Wykazano też, że pacjenci, u których w obserwacji 12-miesięcznej wystąpił zawał serca ($n=9$) różnili się istotnie statystycznie pod względem następujących parametrów laboratoryjnych: hemoglobina (Hb), średnia objętość trombocyta (MPV) oraz liczba krwinek białych (WBC). Dla wszystkich wymienionych parametrów grupa chorych, w której wystąpił zawał serca charakteryzowała się wyższymi wartościami średnimi tych parametrów w porównaniu do pacjentów, którzy nie mieli zawału serca podczas rocznej obserwacji. Choć nie można wykluczyć tu przypadku, wykazano, że większa objętość trombocyta może świadczyć o lepszej agregacji. Płytki o większych rozmiarach charakteryzują się większą aktywnością metaboliczną i enzymatyczną oraz charakteryzują się większym potencjałem protrombotycznym¹³⁵. W literaturze naukowej pojawiły się doniesienia traktujące o wpływie podwyższonych wartości MPV, na zwiększone ryzyko wystąpienia zawału serca a nawet zgonu z powodu choroby niedokrwiennej serca¹³⁶. Istotność tego parametru porównywana jest nawet do palenia tytoniu i otyłości¹³⁷. Znaczenie wielkości płytki krwi potwierdzać może także inna obserwacja, a mianowicie obecność istotnie mniejszych trombocytów u pacjentów z krwimoczem ($MPV=9,5\pm 0,99$, $p=0,0257$), w porównaniu do pozostałych chorych ($8,6\pm 0,46$). Duża liczba krwinek białych często odpowiada stanowi zapalnemu, który jest uznanym czynnikiem prozakrzepowym. Wykazano także istotną różnicę w poziomie kreatyniny u osób, u których wystąpił udar niedokrwienno mózgu (1,4%) w porównaniu do pacjentów, u których to zdarzenie nie miało miejsca ($p=0,0321$). Podobną zależność

obserwowano u osób, u których wystąpił jakikolwiek niedokrwienny incydent mózgowy – udar lub TIA. Przewlekła choroba nerek jest uznanym czynnikiem ryzyka nie tylko zgonów sercowo-naczyniowych i zawałów serca, lecz także udarów mózgu^{138,139}.

6. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej analizy sformułowano następujące wnioski:

1. Wskaźnik Predict Score, w postaci sumy punktów, nie wykazał wartości prognostycznej w przewidywaniu wystąpienia oporności na kłopidogrel oraz niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych i mózgowych w populacji pacjentów niskiego ryzyka leczonych angioplastyką wieńcową z implantacją stentu.
2. Oporność płytek krwi na kłopidogrel częściej spotyka się u pacjentów z cukrzycą oraz zwiększoną masą ciała, a także z wyższą wartością liczby płytek krwi, krwinek białych, OB i niższym poziomem cholesterolu frakcji HDL.
3. Stwierdzenie oporności na kłopidogrel w badaniu agregometrii impedancyjnej jest czynnikiem ryzyka wystąpienia niedokrwienych zdarzeń mózgowych.
4. Polimorfizm allelu CYP2C19 nie koreluje istotnie ze zjawiskiem oporności płytek krwi na kłopidogrel w badaniu agregometrii impedancyjnej.
5. Postać homozygotyczna allelu CYP2C19*2/*2 wykazuje dodatnią korelację z wystąpieniem niedokrwienych zdarzeń mózgowych.

7. Wykaz rycin i tabel

7.1 Wykaz rycin

Ryc.1. Schemat badania

Ryc.2. Aparat Multiplate Electrode Analyser

Ryc.3. Analiza czynności płytek krwi w systemie Multiplate, przykładowe wyniki pomiarów zahamowania agregacji: A) Pole pod krzywą: 122 AU/min, pacjent wrażliwy na klopidogrel, B) Pole pod krzywą: 783 AU/min, pacjent oporny na klopidogrel.

Ryc.4. Oznaczenie stopnia zahamowania agregacji płytek krwi u pacjentów z dławicą stabilną oraz z ostrym zespołem wieńcowym (0 - pacjenci stabilni, 1- pacjenci z ostrym zespołem wieńcowym).

Ryc. 5. Rozkład wartości zahamowania agregacji płytek krwi dla grupy badanej.

Ryc.6. Rozkład wartości pomiaru zahamowania agregacji płytek krwi z podziałem na opornych i wrażliwych na klopidogrel.

Ryc. 7. Rozkład wartości pomiaru zahamowania agregacji płytek krwi z podziałem na tercyle.

Ryc. 8. Oznaczenie stopnia zahamowania agregacji płytek krwi grupowane pod względem tercylu; zsumowanie wartości dla tercylu T1 i T2.

Ryc.9. Rozkład masy ciała u pacjentów z tercyla T1+T2 i T3.

Ryc.10. Rozkład wartości BMI u pacjentów z tercyla T1+T2 i T3.

Ryc.11. Krzywa ROC; ocena sumy punktów wskaźnika Predict Score jako wartości prognostycznej wystąpienia oporności na klopidogrel.

Ryc .12. Rozkład wartości HDL dla pacjentów T1+T2 i T3.

Ryc.13. Krzywa ROC. Wpływ wartości HDL na przewidywanie przynależności do T3.

Ryc. 14. Rozkład wartości OB w grupie opornych i wrażliwych na klopidogrel.

Ryc.15. Krzywa ROC. Wpływ liczby płytek krwi (PLT) na przewidywanie przynależności do T3.

Ryc.16. Krzywa ROC. Wpływ liczby krwinek białych (WBC) na przewidywanie przynależności do T3.

Ryc.17. Stopień zahamowania agregacji płytek krwi dla poszczególnych polimorfizmów genu CYP2C19.

Ryc. 18. Procentowy rozkład występowania polimorfizmów CYP2C19 w populacji badanej z podziałem na: (A) opornych i wrażliwych oraz (B) tercyle.

Ryc.19. Krzywe przeżycia Kaplana - Meiera dla chorych opornych i wrażliwych na kłopidogrel.

Ryc.20. Krzywe przeżycia wg Kaplana - Meiera dla chorych przyporządkowanych do odpowiednich tercyl.

Ryc. 21. Zależność między frakcją wyrzutową a wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zgonu / zawału serca / niedokrwiennych zdarzeń mózgowych); „0” – nie, „1” – tak.

Ryc. 22. Analiza wpływu BMI na wystąpienie złożonego punktu końcowego (zawału serca / MI / udaru niedokrwiennego mózgu oraz przejściowego niedokrwienia mózgu; TIA) ; „0” – nie, „1” – tak..

Ryc. 23. Poziom hemoglobiny (Hb) w grupach z zawałem serca- MI (1) i bez zawału (0)

Ryc. 24. Objętość trombocyta (MPV) w grupach z zawałem serca- (MI) i bez zawału (0).

Ryc. 25. Liczba krwinek białych (WBC) w grupach z zawałem serca- (MI) i bez zawału (0).

Ryc. 26. Zależność między średnią objętością trombocyta (MPV) a wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zawału serca / niedokrwiennego zdarzenia mózgowego); „0” – nie, „1” – tak.

Ryc. 27. Analiza korelacji średniej objętości trombocyta (MPV) z wystąpieniem krwi w moczu; „0” – nie, „1” – tak.

Ryc. 28. Zależność między średnią objętością trombocyta (MPV) a wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zgonu / zawału serca / niedokrwiennych zdarzeń mózgowych); „tak” - 1, „nie” - 0.

Ryc. 29. Zależność między poziomem glikemii a wystąpieniem złożonego punktu końcowego (zgonu / zawału serca / niedokrwiennych zdarzeń mózgowych); „0” – nie, „1” – tak..

Ryc. 30. Analiza korelacji poziomu kreatyniny z wystąpieniem udaru niedokrwiennego mózgu; „0” – nie, „1” – tak..

Ryc. 31. Analiza korelacji poziomu kreatyniny z wystąpieniem niedokrwiennych zdarzeń mózgowych (udar lub TIA); „0” – nie, „1” – tak..

7.2 Wykaz tabel

Tab. 1. Punkty odcięcia wartości zahamowania agregacji płytek krwi dla poszczególnych tercyl.

Tab. 2. Kwestionariusz Predict Score

Tab. 3. Klasyfikacja krwawień wg GUSTO

Tab. 4. Podstawowe dane kliniczne i demograficzne badanej grupy

Tab. 5. Leki stosowane w czasie hospitalizacji w badanej grupie.

Tab. 6. Czynniki ryzyka oraz dane z wywiadów badanej grupy

Tab. 7. Zestawienie danych klinicznych i demograficznych badanej grupy z podziałem na pacjentów opornych i wrażliwych na działanie klopidogrelu.

Tab. 8. Zestawienie danych klinicznych i demograficznych z podziałem pacjentów na tercyle.

Tab. 9. Zależność między występowaniem czynników ryzyka oraz chorób współistniejących a opornością na klopidogrel.

Tab. 10. Zależność między występowaniem czynników ryzyka oraz chorób współistniejących a opornością na klopidogrel w podziale na tercyle.

Tab. 11. Wpływ farmakoterapii na występowanie oporności na klopidogrel.

Tab. 12. Wpływ farmakoterapii na występowanie oporności na klopidogrel; podział grupy badanej na tercyle.

Tab. 13. Analiza roli czynników klinicznych i parametrów laboratoryjnych kwestionariusza PS w prognozowaniu wystąpienia oporności na klopidogrel.

Tab. 14. Analiza roli czynników klinicznych i parametrów laboratoryjnych kwestionariusza PS w prognozowaniu wystąpienia oporności na klopidogrel z podziałem pacjentów na tercyle.

Tab. 15. Analiza parametrów laboratoryjnych z podziałem pacjentów na opornych i wrażliwych na klopidogrel.

Tab. 16. Analiza parametrów laboratoryjnych z podziałem pacjentów na tercyle.

Tab. 17. Rozkład polimorfizmów CYP2C19 u pacjentów wrażliwych i opornych na klopidogrel.

Tab. 18. Rozkład polimorfizmów CYP2C19 z uwzględnieniem tercyl.

Tab. 19. Zdarzenia niedokrwienne i krwotoczne w obserwacji 12. miesięcznej; podział chorych na opornych i wrażliwych. (n=210).

Tab. 20. Zdarzenia niedokrwienne i krwotoczne w obserwacji 12. miesięcznej; przyporządkowanie chorych do tercyli (n=210).

Tab.21. Parametry laboratoryjne poddane analizie.

Tab.22. Analiza korelacji wybranych parametrów laboratoryjnych z wystąpieniem zawału serca w obserwacji 12.miesięcznej.

8. Streszczenie

Wstęp

Płytki krwi spełniają zasadniczą rolę w procesie hemostazy i aktywacji kaskady krzepnięcia krwi oraz formowania skrzepu. Ze względu na wiodącą rolę procesów krzepnięcia w patogenezie choroby niedokrwiennej serca, podwójna terapia przeciwplatekowa stanowi podstawę w jej leczeniu zarówno zachowawczym, jak i interwencyjnym. Istotnym ograniczeniem ich skuteczności jest jednak zjawisko zwiększonej reaktywności płytek krwi pomimo leczenia przeciwplatekowego (*ang. high on-treatment platelet reactivity, HTPR*). Pomimo możliwości laboratoryjnego oznaczania stopnia zahamowania płytek krwi jak i wykrywania genetycznej predyspozycji do wystąpienia upośledzonej odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe, nie mamy dotąd jednoznacznej wiedzy jak oporność laboratoryjna i genetyczna przekłada się na zdarzenia kliniczne u chorych.

Cele badania

Podstawowym celem badania była ocena wartości prognostycznej wybranych parametrów klinicznych i laboratoryjnych (Predict Score, PS) w przewidywaniu wystąpienia oporności płytek krwi na leczenie klopidoogrelem oraz związanego z tym ryzyka wystąpienia niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych i mózgowych (MACCE) u pacjentów poddawanych zabiegom przezskórnej interwencji wieńcowej. Ponadto praca miała na celu zbadanie częstości występowania oporności na klopidoogrel i częstości występowania polimorfizmu allelu CYP2C19 u pacjentów poddawanych zabiegom przezskórnej interwencji wieńcowej oraz wpływu występowania niekorzystnych wariantów allelu CYP2C19 na stopień zahamowania agregacji płytek krwi i niekorzystne zdarzenia sercowo-naczyniowe.

Materiał i metody

Do badania włączono 249 chorych (74 kobiety i 175 mężczyzn, średnia wieku wynosiła 64,6 lat) leczonych zabiegiem angioplastyki wieńcowej z implantacją stentu z powodu stabilnej choroby wieńcowej (n=215; 61 kobiet i 154 mężczyzn), oraz ostrego zespołu wieńcowego (n=34, 12 kobiet i 22 mężczyzn). U wszystkich pacjentów pobrane zostały próbki krwi celem oznaczenia stopnia zahamowania agregacji płytek krwi przy użyciu agregometru impedancyjnego Multiplate (Dynabyte). Analizie poddano parametry demograficzne, kliniczne oraz laboratoryjne, które wpisano do kwestionariusza Predict Score.

Ponadto pobrano próbki krwi od 147 pacjentów poddano badaniom genetycznym w kierunku polimorfizmu genu CYP2C19. Wszyscy pacjenci zostali poddani obserwacji szpitalnej oraz 12. miesięcznej, w trakcie której oceniano wystąpienie zdarzeń klinicznych niedokrwienych: zgon, zawał serca, zakrzepica w stencie, udar mózgu, przejściowe niedokrwienie mózgu, oraz krwawienia.

Wyniki

Przezkorną angioplastykę wieńcową wykonano u 215 chorych ze stabilną chorobą wieńcową oraz u 34 chorych z ostrym zespołem wieńcowym. U wszystkich określono stopień zahamowania agregacji płytek krwi za pomocą agregometru impedancyjnego Multiplate. Na podstawie uzyskanych wyników pomiaru agregacji płytek krwi chorych podzielono na opornych (n=28, 11,24%) i wrażliwych na działanie kłopidogrelu (n=221, 88,76%) a także przyporządkowano do poszczególnych tercylu.

Analiza danych klinicznych i parametrów laboratoryjnych zawartych w kwestionariuszu Predict Score, pojedynczo jak i zsumowanych, nie wykazała istotnej zależności z wystąpieniem oporności na kłopidogrel i nie miała wartości prognostycznej w przewidywaniu wystąpienia HTPR (p=0,8908, AUC=0,492).

Z obserwacji rocznej utracono 39 pacjentów (15,7%). U pacjentów opornych na kłopidogrel częściej stwierdzano niedokrwieny udar mózgu (p=0,0351) oraz jakikolwiek niedokrwieny incydent mózgowy (udar lub TIA, p=0,0339). Wszystkie krwawienia, z wyjątkiem jednego przypadku krwotoku do ośrodkowego układu nerwowego, należały do łagodnych. W ocenie łącznej wszystkich zdarzeń niedokrwienych i krwotocznych nie stwierdzono istotności statystycznej.

Stwierdzono, że zawał serca, a także zdarzenia niedokrwienne łącznie, występowały istotnie częściej u pacjentów leczonych pierwotnie z powodu ACS (15,38%), w porównaniu do chorych poddanych planowej PCI (2,73%, p=0,0171). Podobnie, łączne wystąpienie zgonu i zdarzeń niedokrwienych obserwowano istotnie częściej w grupie ACS (p= 0,0073), a także u pacjentów z obniżoną frakcją wyrzutową (p=0,0417).

Pacjenci z grupy T3 mieli istotnie częściej niedokrwieny udar mózgu (1,4%), w porównaniu do chorych z T1+T2 (p=0,0376). Wykazano także, że pacjenci, u których wystąpił jakikolwiek niedokrwieny incydent mózgowy (udar lub TIA) istotnie częściej znajdowali się w tercylu T3 (p=0,0452) aniżeli w T1+T2. U pacjentów z tercylu T3 krew w

moczu odnotowano istotnie częściej (5,6%) niż w grupie T1+T2 (0,7%, $p=0,0457$). W ocenie łącznej wszystkich powikłań krwotocznych nie stwierdzono istotności statystycznej. Natomiast w ocenie łącznej zgonu i wszystkich zdarzeń niedokrwiennych wykazano istotną korelację z przynależnością chorych do tercyla T3 ($p=0,0481$).

Jedynym zdarzeniem niedokrwiennym, które korelowało z obecnością niekorzystnego wariantu allelu CYP2C19 (*2/*2) było wystąpienie niedokrwiennego zdarzenia mózgowego ($p=0,0489$, OR=10; 95% CI [1,39 – 71,80]). Nie wykazano istotnych korelacji pomiędzy genotypem a powikłaniami krwotocznymi.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej analizy sformułowano następujące wnioski:

1. Wskaźnik Predict Score, w postaci sumy punktów, nie wykazał wartości prognostycznej w przewidywaniu wystąpienia oporności na kłopidogrel oraz niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych i mózgowych w populacji pacjentów niskiego ryzyka leczonych angioplastyką wieńcową z implantacją stentu.
2. Oporność płytek krwi na kłopidogrel częściej spotyka się u pacjentów z cukrzycą oraz zwiększoną masą ciała, a także z wyższą wartością liczby płytek krwi, krwinek białych, OB i niższym poziomem cholesterolu frakcji HDL.
3. Stwierdzenie oporności na kłopidogrel w badaniu agregometrii impedancyjnej jest czynnikiem ryzyka wystąpienia niedokrwiennych zdarzeń mózgowych.
4. Polimorfizm allelu CYP2C19 nie koreluje istotnie ze zjawiskiem oporności płytek krwi na kłopidogrel w badaniu agregometrii impedancyjnej.
5. Postać homozygotyczna allelu CYP2C19*2/*2 wykazuje dodatnią korelację z wystąpieniem niedokrwiennych zdarzeń mózgowych.

9. Abstract

Background

Platelets fulfill an essential function in the process of hemostasis and activation of blood coagulation and thrombus formation. Dual antiplatelet therapy is the basic of conservative and interventional treatment due to main role of coagulation processes in the pathogenesis of ischemic heart disease. High on-treatment platelet reactivity (HTPR) however, significantly limits the effectiveness of antiplatelet drugs. Despite the possibility of laboratory measurement of the level of inhibition of platelet aggregation and determining genetic predispositions associated with attenuated response to antiplatelet treatment, we do not have conclusive evidence yet, about association of laboratory and genetic resistance with clinical events in patients.

The aim of this study

The main purpose of this study was to assess the prognostic value of selected clinical and laboratory parameters (Predict Score, PS) in predicting platelet resistance to clopidogrel and associated risk of major adverse cardiovascular and cerebral events (MACCE) in patients treated with percutaneous coronary intervention (PCI). This assessment was performed to determine the frequency of clopidogrel resistance and genetic polymorphism of CYP2C19 in patients undergoing percutaneous coronary intervention, and association of loss-of-function allele with the level of inhibition of platelet aggregation and adverse cardiovascular events.

Material and methods

The study population included 249 patients (74 females, 175 males, the mean age was 64,6 years) with stable coronary artery disease (n=215; 64 females and 154 males) and acute coronary syndrome (ACS) (n=34; 12 females and 22 males) who underwent percutaneous coronary intervention with stent implantation. Blood samples were collected from all of the patients to assess the level of platelets inhibition with impedance aggregometer Multiplate (Dynabyte). Various demographic, clinical and laboratory variables listed in Predict Score were analyzed. Moreover, blood samples were collected from 147 patients and genotyped for the CYP2C19 polymorphism. All patients were observed in hospital and followed-up for 12 months, and the rate of adverse ischemic events: death, myocardial infarction, stent thrombosis, stroke, transient ischemic attack and bleeding events was assessed.

Results

Percutaneous coronary intervention was performed in 215 patients with stable coronary artery disease and in 34 patients with acute myocardial infarction. The level of inhibition of platelet aggregation was assessed in all patients using impedance aggregometer Multiplate. Given the platelet aggregation results the study population was divided into resistant (n=28, 11,24%) and sensitive to clopidogrel (n=221, 88,76%), and distributed into tertiles.

Single parameter and cumulative analysis of clinical and laboratory variables did not show any significant correlation with clopidogrel resistance and did not have any prognostic value in HTPR prediction (p=0,8908, AUC=0,492).

39 patients (15,7%) have been lost from follow-up. Among clopidogrel resistant patients ischemic stroke was more frequent (p=0,0351) as well as any kind of cerebral event (stroke or TIA, p=0,0339). All bleeding events, except one case of intracerebral hemorrhage, were classified as mild. Overall rating of all ischemic and bleeding events did not show any statistical significance.

It has been found that myocardial infarction and other ischemic events were found more often in patients with ACS (15,38%) than in patients treated with elective coronary intervention (2,73%, p=0,0171). Similarly, the composite of death and ischemic events were observed significantly more often in ACS patients (p=0,0073) and in patients with reduced ejection fraction (p=0,0417).

The patients in T3 developed ischemic stroke (1,4%) more frequently than patients in T1+T2 (p=0,0376). It's been shown that patients with any kind of cerebral event (stroke or TIA) were distributed to T3 (p=0,0452) significantly more often than to T1+T2. Hematuria was found significantly more often in patients in tertile T3 (5,6%) than in group T1+T2 (0,7%, p=0,0457). Overall rating of all bleeding events did not show any statistical significance. Whereas, overall rating of all ischemic events showed a significant correlation with distribution to T3 (p=0,0481).

Conclusions

Based on the analysis, the following conclusions were made:

1. The Predict Score, calculated with multivariable analysis as a sum of points, did not show any prognostic value in prediction of clopidogrel resistance or major adverse cardiovascular and cerebral events in low risk patients treated with coronary angioplasty with stent implantation.
2. Clopidogrel resistance is more frequent in patients suffering from diabetes mellitus, with increased body weight and raised number of platelets, white blood cells, ESR and reduced cholesterol HDL.
3. Clopidogrel resistance assessed by impedance aggregometer is a risk factor of ischemic cerebral events.
4. CYP2C19 polymorphism has no correlation with clopidogrel resistance assessed by impedance aggregometer.
5. Homozygous carriers of CYP2C19*2/*2 have an increased rate of ischemic cerebral events.

10. *Piśmiennictwo*

-
- ¹ Spain D.M., Bradess V.A., Mohr C.: Coronary atherosclerosis as a cause of unexpected and unexplained death: An autopsy study from 1949-1959. *J. Am. Med. Assoc.* 1960; 174: 384-388.
- ² Chandler A.B., Chapman I., Erhardt L.R., et al. Coronary thrombosis in myocardial infarction. Report of a workshop on the role of coronary thrombosis in the pathogenesis of acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 1974; 34: 823-833.
- ³ Roberts W.C.: The coronary arteries in ischemic heart disease: facts and fancies. *Triangle* 1977; 16: 77-90.
- ² Antithrombotic Trialists Collaboration: Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*, 2002; 324: 71-86.
- ³ Finn, A. V., Nakano, M., Narula, J., et al. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2010; 30 (7): 1282-1292.
- ⁴ Vancraeynest, D., Pasquet, A., Roelants, et al. Imaging the vulnerable plaque. *Journal of the American College of Cardiology*, 2011; 57 (20): 1961-1979.
- ⁵ Pawlus J, Rusak M, Chociej-Stypułkowska J, et al. Parametry aktywacji płytek krwi i stężenie mieloperoksydazy, jako markery choroby niedokrwiennej serca. *Pol. Merk. Lek.*, 2010; XXIX: 172-259.
- ⁶ Lewandowski K. Wybrane problemy trombofilii. *Acta Haematologica Polonica* 2010; 41, 2: 201-207
- ⁷ Page C.P.: Platelets as inflammatory cells. *Immunopharmacology*, 1989; 17: 51-59.
- ⁸ Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115; 3378-3384.
- ⁹ Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, et al. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 2006; 107: 3537-3545.
- ¹⁰ Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, et al. Platelet interaction in thrombosis. *IUBMB Life* 2004; 56: 13-18.
- ¹¹ Authi K.S. Orail: a channel to safer antitrombotic therapy. *Blood* 2009; 113: 1872.
- ¹² Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 403-412.
- ¹³ Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep* 2008; 60: 3-11.
- ¹⁴ Mahaut-Smith MP, Tolhurst G, Evans RJ. Emerging roles of P2X1 receptors in platelet activation. *Platelets* 2004; 15: 131-144.
- ¹⁵ Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84: 289-297.
- ¹⁶ Berger J.S, Brown D.L, Becker R.C. Low-dose aspirin in patients with stable cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am. J. Med.*, 2008; 121: 43-49

-
- ¹⁷ Patrono C, Bachmann F, Baigent C et al. The Task Force on the Use of Antiplatelet Agents in Patients with Atherosclerotic Cardiovascular Disease of the European Society of Cardiology. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. *Eur Heart J* 2004; 25: 166-181.
- ¹⁸ Husted S, Emanuelsson H, Heptinstall S, et al. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y₁₂ antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin. *Eur Heart J*. 2006; 27 (9): 1038-1047.
- ¹⁹ Plavix: Product monograph. Sanofi-Aventis Canada Inc. 2150 St. Elzear Blvd. West Laval, Quebec H7L 4A8. s-a version 9.0 dated April 5, 2012.
- ²⁰ Ding Z, Kim S, Dorsam R, et al. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues Cys 17 and Cys 270. *Blood* 2003; 101: 3908-3914.
- ²¹ Thebault J, Kieffer G, Lowe G, et al. Single-dose pharmacodynamics of clopidogrel. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25, 2: 3-8.
- ²² Kandzari D, Berger P, Kastrati A, et al. Influence of treatment duration with a 600mg dose of clopidogrel before percutaneous coronary revascularization. *JACC* 2004; 44: 2133-2136.
- ²³ Gurbel PA, Bliden KP, Zaman KA, et al. US. Clopidogrel loading with eptifibatide to arrest the reactivity of platelets: results of the Clopidogrel Loading With Eptifibatide to Arrest the Reactivity of Platelets (CLEAR PLATELETS) study. *Circulation* 2005; 111: 1153–1159.
- ²⁴ Von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G et al. Absorption, metabolism and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effects) Trial, *Circulation* 2005; 112: 2946-2950.
- ²⁵ Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet*. 2001; 358: 527-533.
- ²⁶ Yusuf S, Zhao F, Mehta SR et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001;345:494-502. Errata, *N Engl J Med* 2001; 345: 1506, 1716.
- ²⁷ Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT 3rd, et al. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Nov 20;288(19):2411-2420.
- ²⁸ Mehta SR, Tanguay JF, Eikelboom JW et al.: Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes (CURRENT-OASIS 7): a randomised factorial trial. *Lancet* 2010; 376: 1233-1243.
- ²⁹ Bhatt DL, Fox KA, Hacke W et al. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2006; 354: 1706–1717.
- ³⁰ Jakubowski J, Winters K, Naganuma H et al. Prasugrel: a novel thienopyridine antiplatelet agent. A review of preclinical and clinical studies and the mechanistic basis for its distinct antiplatelet profile. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007; 25 (4): 357-374.
- ³¹ Jernberg T, Payne CD, Winters KJ et al. Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and lower rate of nonresponders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *Eur. Heart J* 2006; 27: 1166-1173.

-
- ³² Dobesh PP. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel, a thienopyridine P2Y₁₂ inhibitor. *Pharmacotherapy*. 2009;29 (9): 1089-1102.
- ³³ Wiviott S, Trenk D, Frelinger A, et al. Myocardial Infarction 44 Trial Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and Aggregation-Thrombolysis in With Planned Percutaneous Coronary Intervention : The Prasugrel in Comparison to Prasugrel Compared With High Loading- and Maintenance-Dose Clopidogrel in Patients. *Circulation* 2007; 116: 2923-2932.
- ³⁴ Montalescot G, Wiviott SD, Braunwald E, et al. Prasugrel compared with clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction (TRITON-TIMI 38): double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2009; 373: 723-731.
- ³⁵ Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, et al. Randomized double-blind assessment of the ONSET and OFFSET of the antiplatelet effects of ticagrelor versus clopidogrel in patients with stable coronary artery disease. The ONSET/ OFFSET study. *Circulation* 2009; 120: 2577-2585.
- ³⁶ Wallentin L, Becker R C, Budaj A et al. Tikagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *New England Jpurnal Med*. 2009; 361: 1-13.
- ³⁷ Storey RF, Oldroyd KG, Wilcox RG. Open multicentre study of the P2T receptor antagonist AR-C69931MX assessing safety, tolerability and activity in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2001; 85: 401-407.
- ³⁸ Dovlatova NL, Jakubowski JA, Sugidachi A, et al. The reversible P2Y antagonist cangrelor influences the ability of the active metabolites of clopidogrel and prasugrel to produce irreversible inhibition of platelet function. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1153-1159.
- ³⁹ Steinhubl SR, Oh JJ, Oestreich JH, Ferraris S, et al. Transitioning patients from cangrelor to clopidogrel: pharmacodynamic evidence of a competitive effect. *Thromb Res* 2008; 121: 527-534.
- ⁴⁰ RA Harrington, Stone G, McNulty S, et all. Platelet inhibition with cangrelor in patients undergoing PCI. *N Engl J Med*, 2009; 361: 2318-2329.
- ⁴¹ Bhatt DL. Cangrelor at PCI cuts ischemic events vs clopidogrel: Preliminary phase 3 results *N Engl J Med*. 2013;doi:10.1056/NEJMoa1300815. Bhatt DL. Late-breaking clinical trials II: Interventional. Presented at: American College of Cardiology Scientific Sessions; March 9-11, 2013; San Francisco.
- ⁴² Welsh RC, Rao SV, Zeymer U, et al. A randomized, double-blind, active-controlled phase 2 trial to evaluate a novel selective and reversible intravenous and oral P2Y₁₂ inhibitor elinogrel versus clopidogrel in patients undergoing nonurgent percutaneous coronary intervention: the INNOVATE-PCI trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012; 5 (3): 336-346.
- ⁴³ C.W. Hamm, J.P. Bassand, S. Agewall, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 2011. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr236.
- ⁴⁴ Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2012.
- ⁴⁵ Betriu A., Masotti M., Serra A. et al. Randomized Comparison of Coronary Stent Implantation and Balloon Angioplasty in the Treatment of De Novo Coronary Artery Lesions (START). A Four-Year Follow-up. *J. Am. Coll. Cardiol*. 1999; 34: 1498-1506.

-
- ⁴⁶ Moses J., Leon M., Popma J. et al. (for the SIRIUS Investigators). Sirolimus-Eluting Stents versus Standard Stents in Patients with Stenosis in a Native Coronary Artery. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 1315-1323.
- ⁴⁷ Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, et al. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA.* 2005; 293: 2126–2130.
- ⁴⁸ Lesiak M., Grajek S., Pyda M. et al. Subacute stent thrombosis following coronary angioplasty: incidence and risk factors. *Kardiol. Pol.* 2003; 59: 408-411 (412-415).
- ⁴⁹ Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, et al. Pathological Mechanisms of Fatal Late coronary Stent Thrombosis in Humans. *Circulation.* 2003; 108: 1701-1706.
- ⁵⁰ Wijns W, Kolh P, Danchin N et al. Guidelines on myocardial revascularization. The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *European Heart Journal* 2010; 31: 2501–2555.
- ⁵¹ Jaremo P, Lindhal T, Fransson S et al. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med* 2002; 252: 23-28.
- ⁵² Gurbel P, Blinden K, Hiatt B, et al. Clopidogrel for coronary stenting response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003; 107: 2908-2913.
- ⁵³ Bonello L, Tantry U, Marucci R et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *JACC* 2010, Vol. 56, No.12.
- ⁵⁴ Breet N, Werkum J, Bouman H et al. Comparison of Platelet Function Tests in Predicting Clinical Outcome in Patients Undergoing Coronary Stent Implantation. *JAMA* 2010; 303: 754-762.
- ⁵⁵ Sibbing D, Braun S, Morath T et al. Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 849-856.
- ⁵⁶ Gurbel P, Tantry U. Clopidogrel resistance? *Thrombosis Research* 2007; 120, 311–321.
- ⁵⁷ Serebruany VL, Oshrine BR, Malinin AI, et al.. Noncompliance in cardiovascular clinical trials. *Am Heart J* 2005; 150: 882-886.
- ⁵⁸ Feher G, Koltani K, Papp E, et al. Clopidogrel resistance: role of body mass and concomitant medications. *International Journal of Cardiology* 2007; 120: 188-192.
- ⁵⁹ Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S, et al. Pharmacokinetics of klopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost* 2004; 92: 311-316.
- ⁶⁰ Bhatt D. What makes platelet angry: diabetes, fibrinogen, obesity and impaired response to antiplatelet therapy? *JACC* 2008; 13: 1060-1001.
- ⁶¹ Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, et al. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of klopidogrel resistance. *Circulation* 2004; 109: 166-171.
- ⁶² Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to klopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1895–1900.
- ⁶³ A. Abdel-Latif, S.S. Smyth. Preventing platelet thrombosis with a PAR1 pepducin. *Circulation* 2012; 126: 13-15.

-
- ⁶⁴ Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, et al. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 2003; 107: 32–37.
- ⁶⁵ Marucci R, Gori AM, Panizza R et al. Cardiovascular health and nonfatal myocardial infarction in acute coronary syndrome patients receiving coronary stenting are predicted by residual platelet activity to ADP detected by point-of-care assay: a 12-month follow-up. *Circulation* 2009; 119: 237-342.
- ⁶⁶ Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, et al. The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1392–1396.
- ⁶⁷ Muller I, Besta F, Schulz C, et al. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003; 89: 783–787.
- ⁶⁸ von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G, et al. Absorption, metabolism, and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effect) Trial. *Circulation* 2005; 112: 2946–2950.
- ⁶⁹ Geissler T, Grass D, Bigalke B, et al. The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007, 6: 54–61.
- ⁷⁰ T. Yin, T. Miyata. Pharmacogenomics of clopidogrel: evidence and perspectives. *Thrombosis research*; 128: 307-316.
- ⁷¹ Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos.* 2010; 38 (1): 92-99
- ⁷² Steinhubl S. Genotyping, clopidogrel metabolism and the search for the therapeutic window of tienopyridines. *Circulation* 2010;121:481-483.
- ⁷³ Pena A, Collet JP, Hulot JS, et al. Can we override clopidogrel resistance? *Circulation* 2009;119:2854-2857.
- ⁷⁴ Hulot JS, Collet JP, Pena A, et al. Cardiovascular risk in clopidogrel-treated patients according to cytochrome P450 2C10*2 loss-of-function allele or proton pump inhibitor coadministration: a systematic metaanalysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 134-143.
- ⁷⁵ Gong I, Crown N, Suen C, et al. Clarifying the importance of CYP2C19 and PON1 in the mechanism of clopidogrel bioactivation and in vivo antiplatelet response. *Eur Heart J* (2012) 33 (22): 2856-2864.
- ⁷⁶ Price MJ, Berger PB, Teirstein PS et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention. The GRAVITAS randomized trial. *JAMA*, 2011; 305: 1097–1105.
- ⁷⁷ Trenk D, Stone G, Gawaz M, et al. A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59 (24): 2159-2164.
- ⁷⁸ Parodi G, Marucci R, Valenti R, et al. High Residual Platelet Reactivity After Clopidogrel Loading and Long-term Cardiovascular Events Among Patients With Acute Coronary Syndromes Undergoing PCI. *JAMA* 2011; 306 (11): 1215-1223.

-
- ⁷⁹ Gurbel P, Blinden K, Butler K, et al. Response to Tikagrelor in Clopidogrel Nonresponders and Responders and Effect of Switching Therapies The RESPOND Study. *Circulation* 2010; 121: 1188-1199.
- ⁸⁰ Sardella G, Calcagno S, Mancone M, et al. Pharmacodynamic effect of switching therapy in patients with high on-treatment platelet reactivity and genotype variation with high clopidogrel Dose versus prasugrel: the RESET GENE trial. *Circ Cardiovasc Interv.* 2012;5 (5): 698-704.
- ⁸¹ Siller-Matula JM, Delle-Karth G, Lang IM, et al. Phenotyping vs. genotyping for prediction of clopidogrel efficacy and safety: the PEGASUS-PCI study. *J Thromb Haemost.* 2012; 10 (4): 529-542.
- ⁸² Loken MR (1990). *Immunofluorescence Techniques in Flow Cytometry and Sorting* (2nd ed.). Wiley. pp. 341–353.
- ⁸³ Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927–929.
- ⁸⁴ Francis JL. The platelet function analyzer (PFA)-100. In: Michelson AD(ed.). *Platelets*. 2nd ed. Burlington, MA: Elsevier 2007. p. 519–534.
- ⁸⁵ Aleil B, Ravanat C, Cazenave P, et al. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 85–92.
- ⁸⁶ Steinhubl SR. The VerifyNow system. In: Michelson AD (ed.). *Platelets*. 2nd ed. Burlington, MA: Elsevier; 2007. p. 509–518.
- ⁸⁷ Mueller T, Dieplinger B, Poelz W et al. Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate analyzer--comparison with two flow cytometric methods. *Thromb Res* 2007; 121: 249-258.
- ⁸⁸ Geisler T, Grass D, Biglake B, et al. The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007; 6: 54–61.
- ⁸⁹ Juurlink D, Gomes T, Ko D, et al. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ* 2009; 180 (7): 713-718.
- ⁹⁰ Sthurthers A, Davies J. B-type natriuretic peptide: a simple new test to identify coronary artery disease? *Q J Med* 2005; 98: 765-769.
- ⁹¹ Bertrand-Thiebault C, Berrahmoune H, Thompson A, et al. Genetic polymorphism of CYP2C19 gene in the stanislas cohort. A link with inflammation. *Annals of Human Genetics* 2008; 72: 178-183.
- ⁹² Siller-Matula J, Lang I, Christ G, et al. Calcium channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1557-1563.
- ⁹³ Silvain J, Cayla G, Hulot JS, et al. High on-thienopyridyne platelet reactivity in elderly coronary patients: the SENIOR-PLATELET study. *Eur H Jour* 2012; 33: 1241-1250.
- ⁹⁴ The GUSTO Investigators. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329: 673–682.
- ⁹⁵ Cutlip D, Windecker S, Mehran R et al. Academic Research Consortium. Clinical end points in coronary stent trials: a case for standardized definitions. *Circulation* 2007; 115 (17): 2344-2351.

-
- ⁹⁶ CURE Study Investigators. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme: rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease. *Eur Heart J* 2000; 21: 2033-2041.
- ⁹⁷ Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. The PLATO Investigators. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009; 361: 1045-1057.
- ⁹⁸ Rao SV, Ou FS, Wang TY, et al. Trends in the prevalence and outcomes of radial and femoral approaches to percutaneous coronary intervention: A report from the national cardiovascular data registry. *J Am Coll Cardiol Intv.* 2008; 1: 379-386.
- ⁹⁹ Dziejewicz A, Dudek D, Heba G, et al. Inter-individual variability in response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Kardiol Pol* 2005; 62: 108–117.
- ¹⁰⁰ Wang L, Wang X, and Chen F. Clopidogrel Resistance is Associated with Long-Term Thrombotic Events in Patients Implanted with Drug-Eluting Stents. *Drugs R D* 2010; 10 (4): 219-224.
- ¹⁰¹ Creager MA, Loescher TF, Cosentino F, et al. Diabetes and Vascular Disease Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I. *Circulation* 2003; 108: 1527-1532.
- ¹⁰² Geisler T, Anders N, Paterok M, et al. Platelet response to clopidogrel is attenuated in diabetic patients undergoing coronary stent implantation. *Diabetes Care* 2007; 30: 372-374.
- ¹⁰³ Hall HM, Banerjee S, McGuire DK. Variability of clopidogrel response in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes & Vascular Disease Research* 8 (4) 245-253.
- ¹⁰⁴ Undas A. Cukrzyca, zwiększona reaktywność płytek mimo leczenia i incydenty sercowo–naczyniowe po zawale serca. *Kardiologia Polska* 2011; 69, 6: 538–539.
- ¹⁰⁵ Geisler T, Grass D, Biglake B, et al. The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6: 54–61.
- ¹⁰⁶ Angillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes* 2005; 54: 2430-2435.
- ¹⁰⁷ Geisler T, Gawaz M. Individualized antiplatelet therapy. What can a clinical score contribute? *Haemostaseologie* 2009; 29: 360-367.
- ¹⁰⁸ Undas A. Cukrzyca, zwiększona reaktywność płytek mimo leczenia i incydenty sercowo–naczyniowe po zawale serca. *Kardiologia Polska* 2011; 69, 6: 538–539.
- ¹⁰⁹ Turfan M, Duran M, Poyraz F. et al. Inverse relationship between serum total bilirubin levels and severity of disease in patients with stable coronary artery disease. *Coronary Artery Disease*, 2013; 24: 29–32.
- ¹¹⁰ Danchin N. C-reactive protein for risk assessment in coronary artery disease. *Heart* 2010; 96: 325-327.
- ¹¹¹ Kragelund C, Grønning B, Køber L, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 666-675.
- ¹¹² Bhatt D. What makes platelet angry: diabetes, fibrinogen, obesity and impaired response to antiplatelet therapy? *JACC* 2008; 13: 1060-1071.
- ¹¹³ Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel resistance? *Thrombosis Research* 2007; 120: 311–321.
- ¹¹⁴ Acikel S, Sadik R, Akdemir E. The Relationship Between Inflammation, Platelet Activation and Antiplatelet Resistance. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 2010 ; 18: 364-381.

-
- ¹¹⁵ Ge H, Zhou Y, Liu X, et al. Relationship Between Plasma Inflammatory Markers and Platelet Aggregation in Patients With Clopidogrel Resistance After Angioplasty. *Angiology* 2012; 63(1): 62-66.
- ¹¹⁶ Gurbel P., Tantry U. Clopidogrel resistance? *Thrombosis Research* 2007; 120, 311–321.
- ¹¹⁷ Muller I, Besta F, Schulz C, et al. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003; 89: 783–787.
- ¹¹⁸ Dziewierz A, Dudek D, Heba G, et al. Inter-individual variability in response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Kardiol Pol* 2005; 62: 108–117.
- ¹¹⁹ Siller-Matula JM, Delle-Karth G, Lang IM, et al. Phenotyping vs. genotyping for prediction of clopidogrel efficacy and safety: the PEGASUS-PCI study. *J Thromb Haemost.* 2012; 10 (4): 529-542.
- ¹²⁰ Pena A, Collet J-P, Hulot J-S. Can we override clopidogrel resistance? *Circulation* 2009; 119: 2854-2857.
- ¹²¹ Gong I, Crown N, Suen C, et al. Claryfying the importance of CYP2C19 and PON1 in the mechanism of clopidogrel bioactivation and in vivo antiplatelet response. *Eur Heart J* (2012) 33 (22): 2856-2864.
- ¹²² T. Yin, T. Miyata. Pharmacogenomics of clopidogrel: evidence and perspectives. *Thrombosis research*; 128: 307-316.
- ¹²³ Pena A, Collet JP, Hulot JS, et al. Can we override clopidogrel resistance? *Circulation* 2009; 119: 2854-2857.
- ¹²⁴ Hulot JS, Collet JP, Pena A, et al. Cardiovascular risk in clopidogrel-treated patients according to cytochrome P450 2C10*2 loss-of-function allele or proton pump inhibitor coadministration: a systematic metaanalysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 134-143.
- ¹²⁵ Holmes M, Perel P, Shah T, et al. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function and cardiovascular events. A systemic review and meta-analysis. *JAMA* 2011; 306 (24): 2704-2714.
- ¹²⁶ Geisler T, Langer H, Wydymus M, et al. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *European Heart Journal* 2006; 27: 2420–2425.
- ¹²⁷ Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, et al. Clopidogrel Resistance Is Associated With Increased Risk of Recurrent Atherothrombotic Events in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2004; 109: 3171-3175.
- ¹²⁸ Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, et al. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41: 961–965.
- ¹²⁹ Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, et al. Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001; 358: 527-533.
- ¹³⁰ Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, et al. CREDO investigators. Clopidogrel for reduction of events during observation. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary ontervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 2411-2420.
- ¹³¹ Bhatt DL, Topol EJ. Clopidogrel added to aspirin versus aspirin alone in secondary prevention and high-risk primary prevention: rationale and design of the Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance (CHARISMA) trial. *Am Heart J* 2004; 148: 263-268.

-
- ¹³² Price MJ, Berger PB, Teirstein PS et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention. The GRAVITAS randomized trial. *JAMA*, 2011; 305: 1097–1105.
- ¹³³ Gurbel P, Blinden K, Butler K, et al. Response to Ticagrelor in Clopidogrel Nonresponders and Responders and Effect of Switching Therapies The RESPOND Study. *Circulation* 2010; 121: 1188-1199.
- ¹³⁴ Sardella G, Calcagno S, Mancone M, et al. Pharmacodynamic effect of switching therapy in patients with high on-treatment platelet reactivity and genotype variation with high clopidogrel Dose versus prasugrel: the RESET GENE trial. *Circ Cardiovasc Interv.* 2012;5 (5): 698-704.
- ¹³⁵ Gasparyan A, Ayzvazyan L, Mikhailidis D, et al. Mean Platelet Volume: A Link Between Thrombosis and Inflammation? *Current Pharmaceutical Design*, 2011; 17: 47-58.
- ¹³⁶ Chu H, Chen WL, Huang CC, et al. Diagnostic performance of mean platelet volume for patients with acute coronary syndrome visiting an emergency department with acute chest pain: the Chinese scenario. *Emerg Med J.* 2011 Jul; 28 (7): 569-574.
- ¹³⁷ Slavka G, Perkmann T, Haslacher H, et al. Mean Platelet Volume May Represent a Predictive Parameter for Overall Vascular Mortality and Ischemic Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, 31: 1215-1218.
- ¹³⁸ Parfrey PS. Cardiac and cerebro vascular diseases in chronic uremia. *Am J Kidney Dis.* 1993; 21: 77–80.
- ¹³⁹ National Kidney Foundation. DOQI Kidney disease outcome quality initiative. *Am J Kidney Dis.* 2002; 39: 1–266.