



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Stanovení funkce krevních destiček u pacientů užívajících  
protidestičkovou léčbu kyselinou acetylsalicylovou**

**Determination of platelet function in patients treated  
with acetylsalicylic acid**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Ing. Jana Bílková

**Nicole Jupová**

---

**Kladno 2017**

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2016/2017

## Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e

Student: **Nicole Jupová**  
Obor: Zdravotní laborant  
Téma: **Stanovení funkce krevních destiček u pacientů užívajících protideštičkovou léčbu kyselinou acetylsalicylovou**  
Téma anglicky: Determination of Platelet Function in Patients with Acetylsalicylic Acid Treatment

### Zásady pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude zaměřit se na dvě metody využívané ke stanovení funkce krevních destiček, optickou agregometrii, LTA (Light Transmission Aggregometry), a imedanční agregometrii, MEA (Multiplate Electrode Aggregometry), které budou využity pro stanovení účinnosti protideštičkové léčby kyselinou acetylsalicylovou. Sledovanou skupinou budou pacienti s kardiovaskulárními poruchami užívající ASA v obvyklé denní dávce 100 mg. Teoretická část práce se bude věnovat stavbě a funkci krevních destiček a dále protideštičkové léčbě. V praktické části bude u vybraných pacientů zvolenými metodami stanovena účinnost protideštičkové léčby typu ASA. Pro vyhodnocení budou použity základní statistické metody.

### Seznam odborné literatury:

- [1] PECKA, M., Přehled laboratorní hematologie II. Bílá krevní řada, Krevní destička., Praha 5: Galén, 1996, 136 s., ISBN 80-85824-28-0
- [2] PECKA, M. , Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patofyziologie hemostázy., Český Tešín: Finidr, s. r. o., 2004, 237 s., ISBN 80-86682-01-3
- [3] PECKA, M. , Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patofyziologie krevní buňky, Český Tešín: Finidr, s. r. o., 2006, 304 s., ISBN 80-86682-01-3
- [4] PECKA, M. , Praktická hematologie. Laboratorní metody, ed. 1. vydání, Český Tešín: Infiniti art, s.r.o. , 2010, ISBN 978-80-903871-9-5

Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: Ing. Jana Bílková

.....  
vedoucí katedry / pracoviště

.....  
děkan

V Kladně dne 11.09.2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Stanovení funkce krevních destiček u pacientů užívajících protideštičkovou léčbu kyselinou acetylsalicylovou vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 19.05.2017

.....  
Nicole Jupová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala paní Ing. Janě Bílkové za odborné vedení a cenné rady při zpracování práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Trombotického centra a Centrální hematologické laboratoři Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

## **Abstrakt**

Úvod: Kyselina acetylsalicylová je pravděpodobně nejstarším a nejužívanějším lékem, který má nepochybný protideštičkový efekt. I přes vysokou účinnost ASA bylo v metaanalýsách popsáno, že až 27–28 % pacientů neodpovídá na terapii ASA adekvátním způsobem. Tato nedostatečná odpovídavost na protideštičkovou léčbu ASA je jednou z příčin zhoršení kardiovaskulární morbidity a mortality. Existují laboratorní metody založené na vyšetření indukované agregability krevních destiček, pomocí nichž je možné účinnost této léčby stanovit.

Cíl: Zjistit účinnost protideštičkové léčby ASA pomocí optické a imedanční agregometrie (LTA a MEA), dále pomocí základních statistických metod porovnat vyjádření účinku léčby mezi metodami a jednotlivými induktory. Sledovaným souborem bylo 64 pacientů, 43 žen a 21 mužů, vyšetřených v roce 2016, s průměrným věkem 59 let.

Výsledky: Ze skupiny vyšetřených pacientů dosáhlo dostatečnou odpovídavost na léčbu ASA 81 % a nedostatečnou 19 %. Impedanční agregometrie (MEA – agregometr Multiplate) se jeví jako citlivější k tomuto typu protideštičkové léčby ve srovnání s optickou agregometrií (LTA – agregometr PAP 8E). V případě MEA bylo 10 z 11 rezistentních pacientů vyhodnocených jako „neúčinných“ (jeden neměl MEA provedenou) a v případě LTA 7 (AA) a 6 (EPI) z 12 rezistentních. Obě metody i jednotlivé zvolené induktory spolu korelovaly. Nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi podáváním pouze ASA či duální léčbou.

Závěr: Laboratorní vyšetření účinnosti ASA u zvoleného souboru pacientů potvrdilo potřebu monitorování vlivu protideštičkové léčby. Obě použité metody jsou vhodné k tomuto účelu. Záleží na laboratoři, jakou metodu zvolí, na jejích možnostech časových i zohlednění nákladnosti vyšetření. Nedílnou součástí je kromě správně provedené analýzy a spolehlivě interpretovaných laboratorních výsledků také spolupráce s klinikou a dodržení doporučených postupů v preanalytické fázi.

## **Klíčová slova**

Protideštičková léčba; agregace destiček; ASA rezistence.

## **Abstract**

**Introduction:** Acetylsalicylic acid is one of the oldest and most used therapies, that has undeniable antiplatelet effect. Even though the effect of ASA is high, there has been written in meta-analyses, that 27–28 % of patients do not answer to this therapy adequately. This insufficient answer to antiplatelet therapy ASA is one of the reasons of cardiovascular morbidity and mortality impairment. There are laboratory methods based on evaluation of induced aggregability of platelets, with the help of them it is possible to determine the effect of this therapy.

**Targets:** At first, to find out the effect of antiplatelet therapy ASA with the help of optical and impedance aggregometry (LTA and MEA), further to compare the expression of the ASA effect between methods and single inductors. The monitored group was 64 patients, 43 women and 21 men, examined in 2016, with the average age of 59 years.

**Results:** 81 % patients of the monitored group reached sufficient answer to ASA, 19 % insufficient. Impedance aggregometry (MEA – aggregometer Multiplate) looks like slightly more sensitive to this type of antiplatelet therapy when compared with optical aggregometry (LTA – aggregometer PAP 8E). In case of MEA, there were 10 of 11 resistant patients evaluated as „not efficient“ (one patient had no MEA results) and in case of LTA, 7 (AA) and 6 (EPI) of 12 resistant patients. Both methods and also single inductors correlated well. There was no statistically significant difference between ASA and dual antiplatelet therapy.

**Conclusion:** Laboratory evaluation of the effect of ASA confirmed the need of antiplatelet therapy monitoring. The both chosen methods are suitable to this purpose. It is up to the laboratory, what methods are chosen, up to their time and financial possibilities. The important part except for correctly done analysis and reliably interpreted results is also cooperation with a clinic and compliance with recommended practices in the preanalytical phase.

## **Key words**

Antiplatelet therapy; platelet aggregation; ASA resistance.

## Obsah

1	Úvod.....	10
2	Současný stav.....	11
2.1	Krev.....	11
2.1.1	Složení krve.....	12
2.2.1	Složky hemostázy.....	14
2.2.2	Úloha některých adhezivních proteinů v hemostáze.....	15
2.2.3	Mechanismy hemostatických procesů.....	16
2.3	Krevní destičky (trombocyty).....	17
2.3.1	Megakaryocytopoéza.....	17
2.3.2	Charakteristiky buněk megakaryocytové řady.....	17
2.3.3	Regulace trombopoézy.....	18
2.3.4	Morfologie trombocytů.....	18
2.3.5	Funkce trombocytů.....	20
2.3.6	Aktivace trombocytů.....	20
2.3.7	Metabolismus trombocytů.....	23
2.4	Induktory agregace destiček.....	23
2.5	Antiagregační léčba.....	25
2.5.1	Užití protideštičkové léčby.....	25
2.5.2	Blokáda adheze krevních destiček na subendoteliální matrix.....	26
2.5.3	Blokáda aktivačních cest a cyklů – blokáda enzymů cyklu kyseliny arachidonové (tvorba TXA <sub>2</sub> ).....	26
2.5.4	Blokáda aktivačních cest a cyklů – blokáda membránových receptorů trombocytů.....	27
2.5.5	Blokáda agregace krevních destiček.....	27
2.6	Kyselina acetylsalicylová (aspirin, acylpyrin).....	29
2.6.1	Účinek ASA.....	29
2.6.2	ASA rezistence.....	31

3	Cíl práce .....	33
4	Metodika .....	34
4.1	Odběr krve a použítá antikoagulační činidla .....	34
4.2	Použité analyzátory a jiné přístroje .....	35
4.3	Optická agregometrie (LTA).....	35
4.3.1	Vyšetřovaný materiál.....	35
4.3.2	Princip měření .....	37
4.3.3	Referenční hodnoty LTA .....	37
4.3.4	Postup měření.....	38
4.3.5	Agregometr pro LTA .....	38
4.3.6	Monitorování léčby ASA epinefrinem a kyselinou arachidonovou na principu optické agregometrie .....	39
4.4	Impedanční agregometrie (MEA, Multiplate Electrode Aggregometry) .....	41
4.4.1	Vyšetřovaný materiál.....	41
4.4.2	Princip měření .....	42
4.4.3	Referenční hodnoty MEA u vybraných testů .....	43
4.4.4	Postup měření.....	43
4.4.5	Agregometr Multiplate.....	44
4.4.6	Monitorování léčby ASA pomocí přístroje Multiplate.....	45
5	Výsledky .....	47
5.1	Charakteristika souboru.....	47
5.2	Deskriptivní statistika .....	48
5.3	Vyjádření účinnosti léčby .....	49
5.4	Korelace.....	51
5.5	Porovnání ASA a duální léčby.....	53
6	Diskuze .....	54
7	Závěr .....	58
8	Seznam použitých zkratk .....	59



9	Seznam použité literatury .....	61
10	Seznam použitých obrázků .....	64
11	Seznamu použitých tabulek.....	65
12	Seznam Příloh .....	66

# 1 ÚVOD

Krevní destičky hrají významnou roli při uzávěru cév krevní sraženinou a při hemostáze, tedy zástavě krvácení. Hlavní složkou hemostázy je cévní stěna, složka tkáňová, krevní destičky a činitelé plazmatického koagulačního systému. K morfologickým projevům aktivace destiček patří změna tvaru, adheze, agregace a retrakce. Agregace neboli vzájemné shlukování trombocytů může být vyvolána působením řady induktorů.

Pro omezení nežádoucí agregace destiček se využívá antiagregační léčba. Antiagregační léčba bývá indikovaná především u osob s kardiovaskulárními poruchami. Zavedení vhodné léčby pomáhá život ohrožující stavy eliminovat.

V současné době dostupné protideštičkové léky snižují riziko arteriální trombózy, ale mohou také zvýšit riziko krvácení při předávkování. Jedním z nejznámějších léků je kyselina acetylsalicylová. ASA snižuje riziko úmrtí a závažné ischemické cévní příhody až o 22 %.

Pro stanovení účinnosti léčby kyselinou acetylsalicylovou je možné využít optickou a impedanční agregometrii. Při optické agregometrii se sleduje změna průchodu světla míchanou plazmou s definovaným počtem trombocytů, měří se rychlost a celková velikost vzestupu transmise. Při impedanční agregometrii se měří změna impedance v kyvetě se vzorkem plné krve v antikoagulantu hirudin.

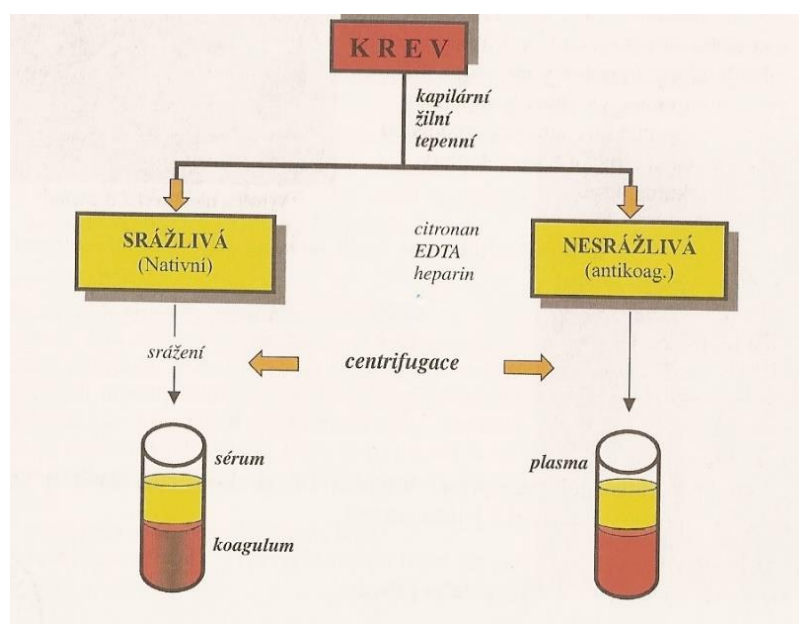
## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Krev

Krev rozdělujeme na srážlivou a nesrážlivou.

Srážlivá krev je bez antikoagulačních přísad a za normálních okolností se v této krvi aktivují srážecí procesy a dochází k jejímu srážení.

Nesrážlivá krev obsahuje antikoagulační přísady. (1)



Obrázek 1 Rozdělení krve (1)

#### Vlastnosti krve a fyziologická funkce:

- Krev je vysoce specializovaná tělesná tekutina proudící uzavřeným cévním systémem.
- Je důležitým spojovacím a transportním systémem a zajišťuje nepřetržitou výměnu látek mezi buňkami.

- Napomáhá udržovat stálost vnitřního prostředí, jak tkáňových, tak krevních buněk.
- Je to tekutý orgán, u něhož můžeme rozeznat část buněčnou a část tekutou.
- Privádí tkáním živiny, kyslík, odvádí CO<sub>2</sub> a pomáhá udržet stálé pH vnitřního prostředí.
- Odvádí odpadní produkty metabolismu.
- Přenáší hormony, vitaminy, minerály a podílí se na udržování tělesné teploty.
- Zajišťuje obranné mechanismy organismu. (1)

### 2.1.1 Složení krve

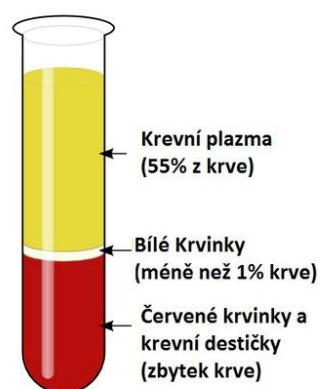
Krev se skládá z plazmy (asi 55 % z celkového objemu krve) a buněčných součástí (asi 45 % z celkového objemu). (1)

#### Plazma

- Je extracelulárně světle žlutá, průhledná, lehce zkalená tekutina, ve které jsou pohybující se krevní buňky. Získá se centrifugací nesrážlivé krve.
- Za určitých okolností může být plazma:
  - lehce zakalená (chylózní – zvýšený obsah tukových látek – po jídle, při metabolických poruchách);
  - žlutě zbarvená (ikterická – hyperbilirubinémie);
  - červeně zbarvená (hemolytická – rozpad erytrocytů).
- Obsahuje vodu, bílkoviny, zbylé látky (anorganické a organické látky). (1)

## Buněčné součásti krve

- Červené krvinky (erytrocyty) jsou bezjaderné neúplné buňky bikonkávního tvaru, které mají cytoplazmatickou membránu a cytoskelet. Obsahují hemoglobin a přenášejí  $O_2$  a  $CO_2$ .
- Bílé krvinky (leukocyty) se účastní obranných a metabolických pochodů v organismu. Je možné je rozdělit na dvě skupiny:
  - polymorfonukleární (granulocyty) – obsahují lysozomy a sekreční granula, podle jejich barvitelnosti se dělí na neutrofilní (pohlcují a ničí bakterie), eozinofilní (narušují větší parazity a účastní se zánětlivých reakcí) a bazofilní (uvolňují ze sekrečních granulí histamin a serotonin);
  - mononukleární (agranulocyty) – jedná se o buňky s nečleněným jádrem, patří sem lymfocyty (zajišťují imunitní odpovědi organismu), monocyty (mají jádro nepravidelně členěné, ve tkáních se transformuje v makrofágy) a plazmatické buňky.
- Krevní destičky (trombocyty) jsou neúplné bezjaderné buňky, které se účastní zejména při srážení krve. (1)



Obrázek 2 Složení krve (2)

## 2.2 Hemostáza (srážení krve)

Hemostáza je schopnost organismu zastavit krvácení a udržet tekutost krve v neporušeném cévním řečišti. (3) Jedná se o komplexní proces, na kterém se podílí řada složek a mechanismů s rozdílnými účinky. (4)

*„Krev je oddělena od vnějšího prostředí cévní stěnou, která ji chrání před unikáním. Při poškození cévní výstelky se začíná uplatňovat hemostatický mechanismus, který přemění tekutou krev na krevní sraženinu, která cévu uzavře. Po určité době se rána postupně zhojí, krevní sraženina se rozpustí a obnoví se původní cirkulace tekuté krve. Systém krevního srážení je tedy velmi důležitý pro zachování integrity (celistvosti) oběhového systému.“*  
(5, s. 26)

### 2.2.1 Složky hemostázy

Mezi hlavní složky hemostázy patří:

- cévní stěna, která má schopnost vazokonstrikce (dochází při ní ke stažení cévy), je místem interakce jednotlivých složek všech systémů hemostázy a je zdrojem některých faktorů, inhibitorů a dalších látek důležitých pro zástavu krvácení; (5), při poranění dochází během několika sekund k reflexnímu spazmu arterií, venul a menších cév s relativní ischemií postižené oblasti s vytvořením podmínek pro vznik primární hemostatické zátky; (6)
- složka tkáňová (uvolněná z porušené tkáně) – ADP (vyvolává primární agregaci), tkáňový faktor (způsobí přeměnu protrombinu na trombin); (5)
- krevní destičky – úloha krevních destiček v hemostáze je mnohostranná, klíčovou úlohu mají v primární hemostáze; (7)
- plazmatický koagulační systém tvořený koagulačními faktory – jde o plazmatické polypeptidy a glykoproteiny. (8)

### 2.2.2 Úloha některých adhezivních proteinů v hemostáze

#### FIBRONECTIN (lidský)

Lidský fibronectin je adhezivní glykoprotein, který se nachází v subendotelu a plazmě. Je syntetizován fibroblasty, endotelem, buňkami hladké svaloviny a epitelem. Je přítomen v plazmě, subendotelu a granulích krevních destiček. Rozlišujeme dva typy fibronectinu - plazmatický a buněčný.

Podílí se v komplexu s ostatními makromolekulami na ovlivnění buněčných vlastností zahrnujících adhezi, morfologii, migraci, fagocytózu, diferenciaci, hemostázu a antigenní transformaci. (5)

#### VITRONECTIN

Vitronectin je adhezivní glykoprotein, který se nachází v lidské plazmě, tkáních a extracelulární tekutině. Vitronectin má ústřední regulační úlohu v systému komplementu, koagulace a fibrinolýzy. (5)

#### TROMBOSPONDIN

Trombospondin je velký multifunkční glykoprotein uvolňovaný trombinem z  $\alpha$ -granulí aktivovaných krevních destiček. Je rovněž syntetizován a uvolňován fibroblasty, buňkami endotelu a hladkých svalů. Podporuje agregaci krevních destiček a angiogenezi. Hraje důležitou roli ve zpevnění hemostatické zátky. Štěpí se trombinem. (5)

#### OSTEONECTIN

Je protein vázající měď, který stimuluje angiogenezi a vede ke změně tvaru, „zakulacení“, buněk dosud neznámým mechanismem. (5)

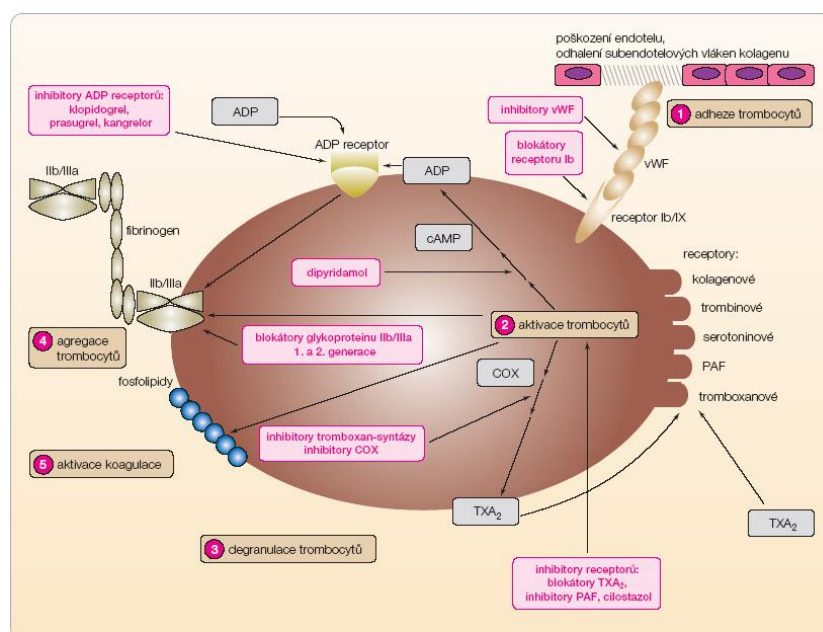
#### TENASCIN

Působí přímo proti adhezivní funkci fibronectinu, ale podporuje adhezi k endoteliálním buňkám. (5)

### 2.2.3 Mechanismy hemostatických procesů

Mezi základní mechanismy hemostázy patří:

- primární hemostáza – proces tvorby primární hemostatické zátky, která uzavírá místo narušení celistvosti cévní stěny a zastavuje tak krvácení. Účastní se krevní destičky a cévní složka;
- plazmatický koagulační systém – představuje skupinu dějů, které vedou ke vzniku nerozpustného fibrinu;
- fibrinolytický systém – je odpovědný za lýzu fibrinového koagula, ale hraje také podstatnou úlohu při degradaci kolagenu, v angiogenezi, u metastáz tumoru;
- inhibitory krevního srážení a fibrinolýzy – inhibitory krevního srážení jsou přirozené složky krve, které tlumí antikoagulačními mechanismy proces jejího srážení vyvolaný plazmatickým koagulačním systémem a fibrinolýzou. Tyto látky inhibují aktivní složky hemostatického procesu – proteolytické enzymy. V organismu slouží inhibitory k zabránění nekontrolovaného srážení, a tím k udržení dynamické koagulační rovnováhy. (5)



Obr. 2 Schematické znázornění primární (trombocytární) hemostázy a farmakologických možností jejího ovlivnění. vWF – von Willebrandův faktor; PAF – faktor aktivující destičky; TXA<sub>2</sub> – tromboxan A<sub>2</sub>; COX – cyklooxygenáza; cAMP – cyklický adenosinmonofosfát; ADP – adenosindifosfát

Obrázek 3 Znárodnění primární hemostázy a možností jejího ovlivnění (9)



## 2.3 Krevní destičky (trombocyty)

Krevní destička je nejmenší částice v krvi. Jsou to bezjaderné krevní elementy vznikající odštěpením periferní cytoplazmy megakaryocytů. (10)

V nativním nátěru se jeví jako silně světlolomná, okrouhlá nebo protáhlá granulární bezjaderná tělíska diskoidního tvaru o průměru 1,5–3,5  $\mu\text{m}$ , tloušťky 1–1,5  $\mu\text{m}$  a objemu 8–12 fl. V panopticky obarveném nátěru představují bazofilní granulární tělíska. (11)

Normální počet trombocytů je  $150\text{--}400 \cdot 10^9/\text{l}$ . (12)

### 2.3.1 Megakaryocytopoéza

Megakaryocyty vznikají z pluripotentní kmenové buňky. Trvání celé megakaryopoézy se odhaduje na 8–10 dní. Ze zralého megakaryocytu se může vytvořit až několik tisíc krevních destiček (2–4 tisíce). Proces tvorby destiček ze zralého megakaryocytu trvá přibližně 5 hodin.

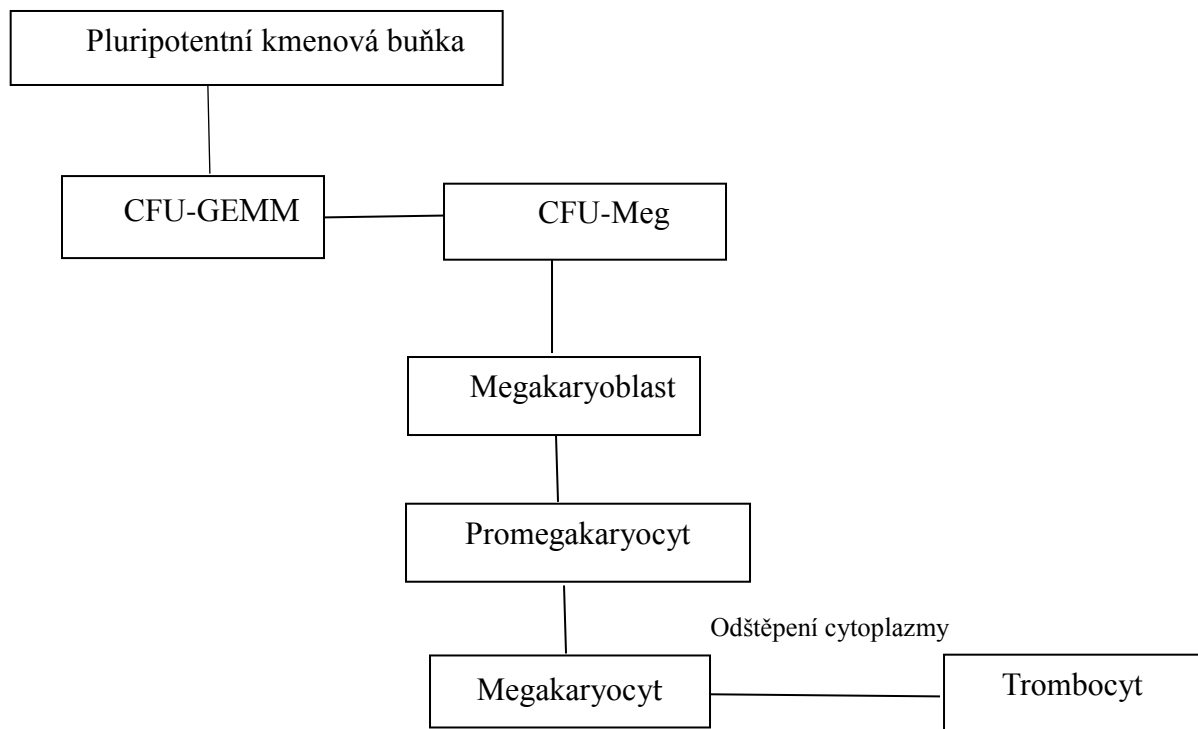
Megakaryocyty se za normálních podmínek nenachází v obvodové krvi, ale pouze v kostní dřeni. U některých nemocí (CML) se mohou i v obvodové krvi nacházet fragmenty megakaryocytů. Zvýšený počet megakaryocytů se nachází u některých idiopatických trombocytopenií. Snížení až úplné vymizení je u dřeňových útlumů. (11)

### 2.3.2 Charakteristiky buněk megakaryocytové řady

Megakaryoblast má jádro kulaté, někdy až ledvinovité s více jadérky, centrálně uložené a vyplňuje větší část buňky. Cytoplazma je středně bazofilní, neobsahuje granula a tvoří úzký lem kolem jádra.

Promegakaryocyt má zářez naznačující rozčlenění jádra na více laloků a nemá jadérka. Cytoplazma je bazofilní, bez granul a chromatin se barví červenofialově.

Megakaryocyt má jádro vícelaločnaté, chromatin je hutný, cytoplazma je růžovofialová, dozráváním přibývá zrnění. (11)



Obrázek 4 Vznik krevních destiček (1)

### 2.3.3 Regulace trombopoézy

Regulace trombopoézy je humorální, podílí se na ní jak trombopoetin (růstový faktor), tak i několik dalších endogenních faktorů. Mezi cytokiny, které se podílejí na trombopoéze patří: IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, GM-CSF, EPO, FGF, SCF. TPO je pravděpodobně hlavním humorálním regulátorem trombopoézy. (1)

TPO je zodpovědný za diferenciaci buněk do megakaryocytového řádu, proliferaci buněk, replikaci DNA, cytoplazmatickou diferenciaci megakaryocytů. (13)

### 2.3.4 Morfologie trombocytů

V elektronovém mikroskopu můžeme v trombocytech rozlišit některé mikrostruktury: granula, otevřený kanálkový systém, mitochondrie, mikrotubuly, denzní tubulární systém a jiné struktury. (11)

Strukturu trombocytu lze rozdělit na 4 oblasti podle funkce a biochemie: periferní zónu, zónu sol-gel, zónu organel a membránové systémy. (4)

## 1. Periferní zóna

Skládá se z destičkové membrány a submembránové oblasti. Glykokalyx (zevní plášť) je složen z glykoproteinů, zasahuje do výstelky otevřeného kanálkového systému. (11)

Vlastní destičková membrána se skládá z dvojvrstvy fosfolipidů, které hrají důležitou roli v plazmatické koagulaci. V nitru trombocytu je fosfatidyletanolamin, fosfatidylserin a fosfatidylinozitol. Na povrchu se nachází sfingomyelin a fosfatidylcholin.

Hlavní složkou membrány je cholesterol, který má schopnost udržet pružnost membrán, ovlivňuje transport přes membrány a jejich propustnost (permeabilitu).

Submembránová oblast obsahuje krátká aktinová vlákna spojená s plazmatickou membránou, která napomáhají udržet tvar destičky a podílí se na změnách při její aktivaci. (4)

Na membráně trombocytu nalézáme množství antigenů krevních skupinových systémů (specifické destičkové antigeny, antigeny HLA a jiné). (11)

## 2. Zóna sol-gel – cytoskeleton

Cytoskelet je tvořen strukturami složenými z molekul proteinů. Podle morfologie a základních proteinů rozdělujeme cytoskelet na základní strukturální a funkční komponenty:

- Mikrotubuly – základní stavební jednotkou je protein tubulin, udržují diskoidní tvar trombocytu, podílejí se na přesunech granulí a na sekreci jejich obsahu.
- Mikrofilamenta – základní stavební jednotkou je aktinomyosinový komplex, jsou zodpovědné za změnu tvaru destičky. (11)

## 3. Zóna organel

Zajišťuje metabolické procesy trombocytu. (4)

Trombocyty obsahují řadu morfologicky odlišných granulí:

- alfa granula – obsahují řadu proteinů, důležitá role v interakci trombocytů s cévní stěnou nebo subendotelem, důležité pro regulaci rovnováhy mezi tvorbou koagula a jeho lýzou. (11) Obsahují velmi významný růstový faktor, který podporuje hojení poraněné cévní stěny; (14)
- denzní granula – obsahují ADP + ATP, serotonin,  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- peroxizomy – obsahují katalázy, které reagují s peroxidem vodíku;
- lysozomy – obsahují hydrolytické enzymy. (11)

#### 4. Membránové systémy

Patří sem otevřený kanálkový systém (OKS) a denzní tubulární systém (DTS).

OKS umožňuje obsahu alfa granulí dostat se na povrch buňky, dále vycytává tekuté látky a částice z okolí, zvětšuje mnohonásobně povrch destičky a usnadňuje látkovou přeměnu. (4)

DTS vytváří síť úzkých kanálků, je místem syntézy prostaglandinů,  $\text{TXA}_2$  a některých bílkovin. Slouží jako zásobník  $\text{Ca}^{2+}$ . (11)

#### 2.3.5 Funkce trombocytů

Krevní destičky mají vliv na správnou funkci endotelových buněk, účastní se při zástavě krvácení, mají důležitou úlohu při chorobném uzavírání nebo ucpání cévy krevní sraženinou – trombogeneze a vykazují fagocytární aktivitu. (15)

#### 2.3.6 Aktivace trombocytů

Krevní destičky mohou být aktivovány stykem se subendoteliálními strukturami (při poškození cévní stěny) nebo aktivátory (kolagenem a trombinem) vyplavenými do krevního oběhu. Na aktivaci destiček se podílí cyklus kyseliny arachidonové, aktivace fosfolipázy C, metabolismus fosfoinositidů, mobilizace  $\text{Ca}^{2+}$ .

Při aktivaci dochází k deformaci destiček (zvětšuje se plocha, na níž se uskutečňuje interakce faktorů koagulační kaskády), extruzi pseudopodií, degranulaci (z destičkových granulí se uvolňuje APD, TXA<sub>2</sub>), uvolnění prokoagulačních faktorů a k sekreci dalších aktivátorů destiček.

Uvnitř buňky při aktivaci dochází k přesunům nitrobuněčného vápníku (uvnitř buňky se zvyšuje koncentrace volných Ca<sup>2+</sup>) a ke změnám membránové struktury (fenomén flip-flop – přetočení fosfolipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány).

Mezi morfologické projevy aktivace patří: změna tvaru, adheze, agregace a retrakce. Při adhezi a agregaci může dojít k uvolňovací reakci – uvolnění obsahu granulí. (15)

### **Změna tvaru krevní destičky**

Změna tvaru probíhá velmi rychle, je morfologickým projevem aktivace kontraktálního aparátu krevní destičky, ty vytvářejí pseudopodie a rozprostírají se po povrchu. (15)

### **Adheze**

Adheze je proces, při kterém destičky přiléhají k jiným než destičkovým povrchům. Adheze ke kolagenu a subendoteliálním strukturám je závislá na destičkovém vWF, fibrinogenu, fibronektinu a částečně na Ca<sup>2+</sup>. VWF má vazebná místa pro GP Ib, GP IIb/IIIa a pro kolageny typu I, III, a IV. Tato vazebná místa jsou důležitá pro návázání vWF na obnažená kolagenní vlákna a připojení trombocytů vyvázáním vWF na GP Ib v komplexu GP Ib/V/IX.

Přímá adheze trombocytů ke kolagenním vláknům probíhá přes receptorový komplex GP Ia/IIa.

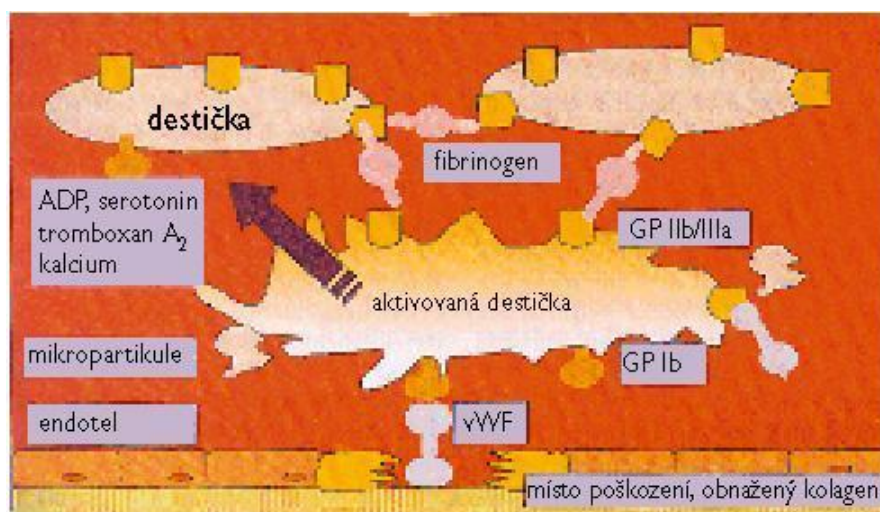
Krevní destička po styku se subendotelovými strukturami změni svůj tvar a pomocí pseudopodií přilne k povrchu. Zvětšení může být až desetinásobné. Adhezi trombocytu na kolagen zvyšuje přítomnost Mg<sup>2+</sup> až 5krát. (15)

## Agregace

Agregace je vzájemné shlukování krevních destiček. Nejprve dochází ke spojování trombocytů většinou přes receptory na jejich výběžcích. Tento děj se nazývá primární agregace, při které dochází jen k částečnému spojování trombocytů menším počtem glykoproteinových struktur GP IIb/IIIa. Je vyvolána ADP uvolněným z porušených tkání a tato agregace má reverzibilní průběh.

Sekundární agregace má průběh ireverzibilní. Při velké koncentraci vnějšího ADP nebo obsazením receptorů jinými induktory, dojde k sekreci obsahu denzních granulí, které obsahují zásobní ADP a ke spuštění mechanismu přeměny kyseliny arachidonové na  $\text{TXA}_2$ .

Agregace většinou následuje po adhezi, ale může být vyvolána přímo působením induktorů (ADP,  $\text{TXA}_2$ , kolagen, adrenalin, trombin, serotonin, kyselina arachidonová, vasopresin, PAF a jiné). (15)



Obrázek 5 Adheze a agregace krevních destiček (16)

## Uvolňovací reakce

Při uvolňovací reakci se krevní destička se centruje, nabývá kulovitého tvaru a granula se přesouvají do centra destičky.

Dochází k sekreci obsahu alfa granulí, a při silnějším podnětu i denzních granulí, pomocí kanálkového systému ven z trombocytu.

Také dochází k syntéze a uvolnění dalších aktivačních látek – látky zesilující agregační efekt (ADP, TXA<sub>2</sub>), vazokonstrikční látky (adrenalin, serotonin), látky zasahující do procesu srážení krve (PF4). (15)

### **Retrakce**

Působením cytoskeletárního systému krevní destičky dochází ke stažení destičkového trombu. Obnovuje se tak průchodnost poraněné cévy uzavřené primární hemostatickou zátkou.

Retrakce jsou schopné jen živé a funkční destičky. Ke své funkci vyžadují velký přísun energie (ATP), kterou získávají v mitochondriích. Dochází k vytlačení séra ze smršťujícího se koagula.

Vazba fibrinogenu trombocytu na destičkový aktin prostřednictvím GP IIb/IIIa podporuje retrakci koagula a kontrakci cévní stěny. (15)

### **2.3.7 Metabolismus trombocytů**

Krevní destička nemůže syntetizovat DNA a neprobíhá v ní buněčné dělení, protože nemá jádro. Přesto může vykonávat většinu buněčných funkcí, ke kterým potřebuje velké množství energie. Hlavním energetickým zdrojem je glykogen, který je ve velkém množství přítomen v trombocytech. Produkty glykolytického štěpení jsou oxidovány v mitochondriích za vzniku ATP. Pouze 1/3 ATP se účastní metabolismu krevní destičky a je přítomna v tzv. metabolickém poolu, který je lokalizovatelný v cytoplazmě, membráně a mitochondriích. Nemetabolický pool je lokalizován v denzních granulích, neúčastní metabolismu trombocytu a při sekreci je vypuzen do vnějšího prostředí. (15)

## **2.4 Induktory agregace destiček**

Po přidání induktoru k plazmě bohaté na destičky dochází k aktivaci a agregaci destiček, které změni svůj diskoidní tvar na kulatý s výběžky. Většina induktorů má na destičce receptor, kdy po interakci s ním dochází k aktivaci trombocytu. Induktory je možné rozdělit na silné (trombin, tromboxan A<sub>2</sub>, kolagen), které způsobují kromě agregace a syntézy TXA<sub>2</sub> také sekreci obsahu destičkových granulí, a na slabé (ADP, epinefrin), které sekreci granulí nezpůsobují. (17)

### **Adenosindifosfát (ADP)**

ADP má dva receptory  $P_2Y_1$  a  $P_2Y_{12}$ . Vazba k  $P_2Y_1$  iniciuje primární agregační vlnu, díky imobilizaci  $Ca^{2+}$ . Průběh primární vlny je reverzibilní. Vazba k  $P_2Y_{12}$  iniciuje sekundární agregační vlnu, ADP se uvolní z destičkových granulí. Při vyšších koncentracích induktorů jsou obě agregační vlny spojené v jednu. Při nižších koncentracích jsou patrné obě agregační vlny. Pokud nedojde k vytvoření sekundární agregační vlny, zesílení agregace další ADP, dochází k tzv. desagregaci. (17)

### **Epinefrin (adrenalin)**

EPI vyvolává agregaci sám o sobě, je-li v dávkách, které vysoce překračují jeho fyziologickou koncentraci. (15)

Agregační křivka zdravých jedinců má zpravidla dvě vlny.

Váže se na  $\alpha_2$  adrenergní receptor prostřednictvím G-proteinu. Jedinci s fyziologicky sníženou agregací po EPI mají snížený počet adrenergních receptorů. (17)

### **Kyselina arachidonová (AA)**

Kyselina arachidonová je prekurzorem silného induktoru  $TXA_2$ , k jehož vzniku dochází pomocí enzymů cyklooxygenázy a tromboxansyntázy. (15)

### **Kolagen**

Kolagen aktivuje trombocyty, je-li ve formě polymeru a je nezbytná přítomnost ADP. Dochází k adhezi destiček ke kolagenovým vláknům a dále k vyvolání agregačního signálu po obsazení příslušných receptorů. (15)

### **Trombin**

Trombin vzniká na povrchu trombocytů účinkem enzymu protrombinázy na protrombin. Aktivuje trombocyty prostřednictvím proteázou aktivovaného receptoru PAR-1 a působí i na GP Ib. (15)



## **Ristocetin**

Ristocetin je antibiotikum, které se používá k diagnostice stavů jako je von Willebrandova choroba. Tvoří ve vzorku komplex s vWF, který se váže na destičkový receptor GP Ib, a ten způsobí aktivaci a agregaci trombocytů. (18)

## **PAF (faktor aktivující destičky)**

PAF je jedním z nejsilnějších známých stimulátorů trombocytů. Je uvolňován při infekčních a zánětlivých procesech z aktivovaných neutrofilů, bazofilů a makrofágů. PAF pochází i z endotelu a destiček samotných. (19)

## **Kationický propylgalát**

Kationický propylgalát je induktor speciálně zavedený pro sledování účinku ASA. (17)

## **2.5 Antiagregační léčba**

Protideštičkové léky interferují s různými kroky aktivačních procesů a snižují riziko arteriální trombozy. Při předávkování mohou zvýšit riziko krvácení. Léčba je zaměřena na omezení shlukovací schopnosti trombocytů. Její indikace vyplývá z přítomnosti rizikových faktorů tepenné okluze. (5)

Protideštičková léčba vede k narušení výstavby primární cévní zátky (agregátu krevních destiček). (20)

### **2.5.1 Užití protideštičkové léčby**

- u nemocných s akutními formami ICHS – ASA, clopidogrel, eptifibatid, tirofiban;
- v sekundární prevenci aterosklerózy u nemocných, kteří prodělali IM, iktus nebo tranzitorní ischemickou příhodu – ASA, clopidogrel;
- u nemocných s němou myokardiální ischemií, u klaudikujících při ICHDK – ASA, clopidogrel, eventuálně ticlopidin;

- v rámci primární prevence u rizikových osob (diabetici či hypertonici s dalším rizikovým faktorem) – ASA;
- po revaskularizačních operacích, po zákrocích na koronárních tepnách či v periférii – ASA, clopidogrel, ticlopidin, abciximab;
- při fibrilaci síní (je-li perorální antikoagulační medikace kontraindikována či není-li tolerována) – ASA. (21)

Existuje rozsáhlé spektrum možností ovlivnění procesů primární hemostázy – na úrovni receptorů destičkové membrány, kanalikulárního systému, metabolismu prostaglandinů, cAMP. (22)

Krevní destičky mohou být inhibovány ve fázi adheze, agregace, popřípadě můžeme potencovat jejich stabilitu. (5)

### **2.5.2 Blokáda adheze krevních destiček na subendoteliální matrix**

1. Blokátory GP Ib/IIa: blokace kyselinou aurinkarboxylovou nebo proteiny izolovanými z jedu hada Bothrops jararaca.
2. Antagonisté vWF: používají se nefunkční fragmenty vWF, které obsazují vazebná místa. Blokace zabrzdí vazbu krevních destiček na obnažená kolagenní vlákna. (5)

### **2.5.3 Blokáda aktivačních cest a cyklů – blokáda enzymů cyklu kyseliny arachidonové (tvorba TXA<sub>2</sub>)**

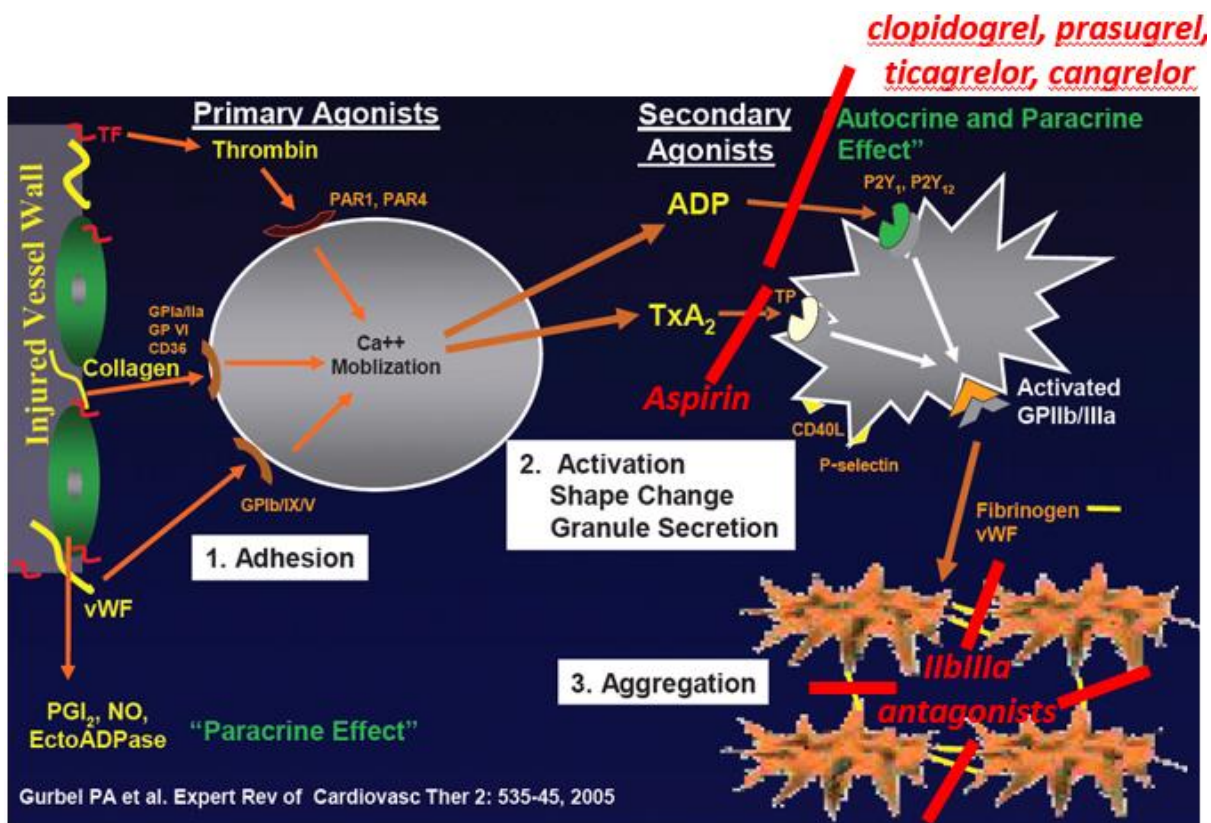
1. Blokace ASA: vyvolá ireverzibilní inhibici cyklooxygenázy, potlačí syntézu tromboxanu A<sub>2</sub> a dalších prostaglandinů.
2. Blokace tromboxasyntetázy: blokátory receptorů TXA<sub>2</sub> a tromboxansyntázy. Využívají se imidazolové přípravky (vapiprost, ridogrel). (5)

#### **2.5.4 Blokáda aktivačních cest a cyklů – blokáda membránových receptorů trombocytů**

1. Selektivní inhibitory receptorů ADP ticlopidin a clopidogrel jsou thienopyrimidinové deriváty, které nevratně blokují receptory aktivace destiček pro ADP typu P2Y<sub>1</sub>.
2. Jako selektivní inhibitory receptorů trombinu se používají blokátory trombinových destičkových receptorů PAR-1, jejichž účinek je založen na principu protilátek proti vlastnímu receptoru. Také se používá trombostatin, který se váže na aktivní místo receptoru.
3. Komplexní inhibitory jsou léčiva s komplexním působením. Anagrelid inhibuje aktivaci po řadě podnětů (např. ADP, trombin, kyselina arachidonová a jiné). (5)

#### **2.5.5 Blokáda agregace krevních destiček**

1. Blokátory receptorů GP IIb/IIIa blokují připojení fibrinogenu k receptoru IIb/IIIa na trombocytech tím, že obsadí receptorové místo konformačně změněné molekule GP IIb/IIIa. Využívá se abciximab, eptifibatid, tiroxiban, lamifiban.
2. Blokátory aktivátoru agregace trombocytů – trombinu, nízkomolekulární hepariny (LMWH), v přítomnosti AT potencují jeho účinek na aktivovaný faktor Xa, a tím snižují produkci aktivátoru trombocytů – trombinu. (5)



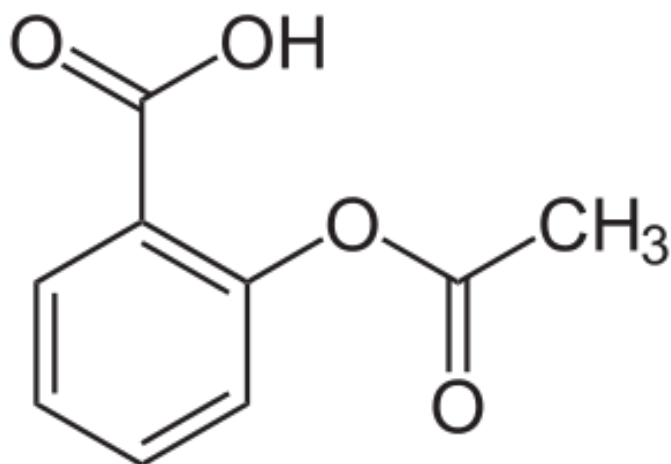
Obrázek 6 Působení protideštičkové léčby (23)

Tabulka 1 Inhibitory krevních destiček (24)

Látka	Mechanismus	Klinické užití	Poločas	Metabolismus
K. acetylsalicylová (Aspirin)	inhibitor COX	ICHS, AKS, CVN, PVN, PCI	10 dní	ledviny, játra
Clopidogrel (Plavix)	inhibice vazby ADP	PCI, AKS, CVN, PVN	5 dní	játra
Ticlopidin (Ticlid)	inhibice vazby ADP	PCI, AKS, CVN, PVN	12 h	játra
Dipyridamol (Curantyl)	inhibice adheze	PVN	8 h	játra
Abciximab (ReoPro)	antagonista IIb/IIIa rec.	PCI, AKS	12-18 h	proteázy plazmy
Eptifibatid (Integrilin)	antagonista IIb/IIIa rec.	PCI, AKS	2-4 h	ledviny
Tirofiban (Aggrastat)	antagonista IIb/IIIa rec.	PCI, AKS	2-4 h	ledviny

## 2.6 Kyselina acetylsalicylová (aspirin, acylpyrin)

ASA patří mezi hlavní protidestičkové léky. Ireverzibilně inhibuje cyklooxygenázu a brání tak vzniku tromboxanu A<sub>2</sub>. COX-1 je nezbytná pro tvorbu TXA<sub>2</sub> z kyseliny arachidonové. Denní dávka používaná k antiagregační léčbě je mezi 60–325 mg. (25)



Obrázek 7 Vzorec kyseliny acetylsalicylové (26)

### 2.6.1 Účinek ASA

Účinek ASA přetrvává po dobu cirkulace léčbou zasažené generace trombocytů, tedy 7–10 dní. (25)

K nástupu účinku dochází po 30 až 40 minutách. ASA je bezpečná a její rezistence je 5–10 %. (27)

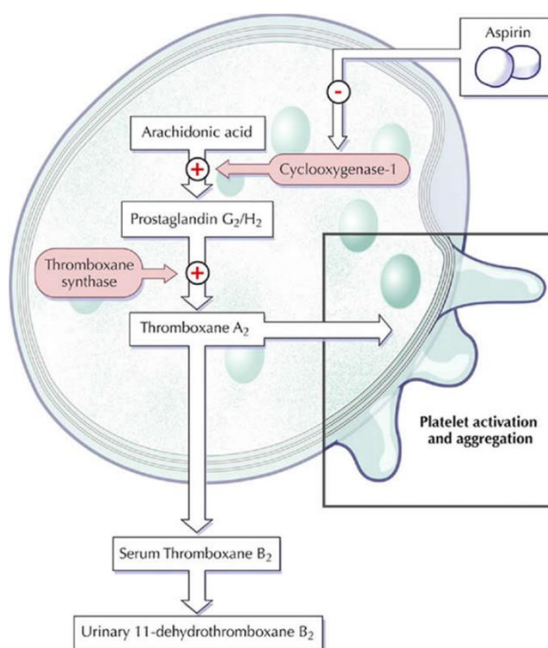
Působí jako antitrombotikum, analgetikum, antipyretikum a antiflogistikum. (28)

Účinkem ASA na trombocyty a endotelové buňky je ireverzibilní acetylace cyklooxygenázy (COX-1) v cyklu kyseliny arachidonové, acetylace COX-1 v endotelových buňkách a ireverzibilní inaktivace COX-1 v trombocytech, kterou zamezí kyselině arachidonové vázat se částí své molekuly ke COX-1. (5)

Nízkodávkovaná kyselina acetylsalicylová je stejně účinná jako vysoké dávky ASA. Kombinace s jiným protidestičkovým lékem (clopidogrel) je pro nemocné výhodná. (29)

Mezi nežádoucí účinky a rizika aspirinu patří:

- žaludeční vředy a perforace;
- jiné narušení funkce trávicího traktu – pocit tlaku v břiše, nevolnost, zvracení;
- krvácení do žaludku a střev;
- poruchy nervového systému – závratě, hučení v uších;
- poruchy ledvin a močových cest;
- alergické reakce – nejčastěji kožní vyrážka;
- Reyův syndrom – těžké poškození jater u dětí, z tohoto důvodu se aspirin nesmí podávat dítěti do 15 let. (30)



Obrázek 8 Protidestičkový účinek ASA (28)

### 2.6.2 ASA rezistence

Situace, kdy prevence acetylsalicylovou kyselinou nezabránila další trombotické příhodě, se nazývá klinická rezistence. Jedná se o komplexní problém, kde jde o důsledek progresivního průběhu nemoci či jiným způsobem vyvolanou aktivaci trombocytu. (29)

#### Faktory ovlivňující aspirinovou rezistenci

Klinické faktory:

- nízké nebo nepravidelné dávkování ASA;
- noncompliance nemocného;
- poruchy vstřebávání ASA;
- arteritidy;
- interakce s ibuprofenem;
- akcentace shlukování destiček zevními faktory (stres, kouření);
- cévní uzávěry, které nevznikají na podkladě aterotrombózy (umělé látky, embolizace). (29)

Buněčné faktory:

- aktivace destiček (aktivitou erytrocytů);
- zvýšená senzitivita destiček na kolagen a ADP;
- zvýšený obrat destiček v kostní dřeni jako odpověď na stres;
- zvýšení noradrenalinu;
- tvorba 8-izo-PGF<sub>2α</sub>;
- zvýšená exprese COX-2 mRNA;
- regenerovaná, neinhibovaná cyklooxygenáza-1 v jaderných buňkách. (29)

Genetické faktory:

- polymorfismus COX-1;
- polymorfismus GPIa/IIa, Ib/V/IX a IIb/IIIa receptoru;
- polymorfismus kolagenového receptoru;
- polymorfismus receptoru pro von Willebradův faktor;
- polymorfismus faktoru XIII Val34Leu, který vede k inhibici aktivace faktoru XIII při léčbě ASA. (29)

Rezistence na ASA se považuje za nový rizikový faktor arteriální trombózy. Jednou z možností, jak se vyhnout ASA rezistenci, by mohlo být použití protidestičkových léků, které neblokuje syntézu prostaglandinů. Thienopyridiny blokuje ADP a inhibuje vazbu na fibrinogen, dále dochází i k blokádě uvolňování ADP z denzních granulí, a tím se blokuje sekundární agregace vyvolaná  $Ca^{2+}$  a serotoninem. ASA rezistence nejspíše odhaluje destičkovou hyperaktivitu. (29)



### **3 CÍL PRÁCE**

Primárním cílem této práce bylo stanovit účinnost protideštičkové léčby kyselinou acetylsalicylovou pomocí optické agregometrie (LTA) na analyzátoru PAP-8E a pomocí impedanční agregometrie (MEA) na analyzátoru Multiplate. Sledovanou skupinou byli pacienti užívající ASA nebo duální protideštičkovou léčbu.

Sekundárními cíli bylo porovnat zvolené metody mezi sebou a porovnat vyšetření účinnosti ASA hodnocené pomocí vybraných induktorů agregace destiček, dále zjistit rozdíl v účinnosti ASA u pacientů užívajících pouze ASA či duální protideštičkovou léčbu. Pro vyhodnocení byly použity základní statistické metody.

## 4 METODIKA

### 4.1 Odběr krve a použitá antikoagulační činidla

Odběr krve byl proveden za standardních podmínek v laboratoři, abychom zabránili chybám v preanalytické fázi při zpracování. V případě odběru krve na jiném pracovišti byl zajištěn šetrný a rychlý transport krve do laboratoře do 30 minut.

- provádí se ráno na lačno, protože většina látek a počet krvinek v krevní plazmě během dne významně kolísá;
- 12 hodin před odběrem se doporučuje nejíst, nepít slazené a alkoholické nápoje, nekouřit;
- před samotným odběrem vyloučit fyzickou námahu a stres;
- nutno předcházet hemolýze;
- odebraný vzorek se nesmí posílat potrubní poštou, aby nedocházelo k aktivaci destiček, nutný osobní transport do laboratoře.

#### **Antikoagulační činidla:**

- Citrát sodný –  $\text{Ca}^{2+}$  ionty mají výraznější afinitu k citrátovému aniontu než sodné ionty, tvoří se citrát vápenatý a sodné ionty se uvolňují do okolního prostředí; použito pro stanovení LTA.
- $\text{K}_3\text{EDTA}$ ,  $\text{K}_2\text{EDTA}$  (chelatonát trojdraselný a dvojdraselný) – rozdíl mezi nimi spočívá ve fyziologickém působení na krvinky, v pH a rozpustnosti. Mají vysokou afinitu k iontům kovů, které vyvazují z plazmy. Vyvázáním kalciových kationtů udržují krev a plazmu v nesrážlivém stavu; použito pro stanovení počtu destiček.
- Hirudin – inhibuje trombin, nevyvazuje ionizovaný vápník; použito pro stanovení MEA.

## 4.2 Použité analyzátory a jiné přístroje

- Multiplate (Roche, Switzerland): vyšetření agregace trombocytů;
- Platelet Aggregation Profiler - PAP 8E (Bio/Data Corporation, USA): vyšetření agregace trombocytů;
- Eppendorf centrifuge 5840 R, 5840 (Eppendorf, Germany): příprava PPP, PRP;
- Eppendorf centrifuge Mini Spin (Eppendorf, Germany): příprava bezdestičkové plazmy.

## 4.3 Optická agregometrie (LTA)

LTA se využívá u pacientů s protideštičkovou léčbou, u krvácivých stavů s podezřením na vWD a destičkové dysfunkce, při podezření na HIT, při hyperagregabilitě. LTA sleduje změnu průchodu světla míchanou plazmou s definovaným počtem trombocytů. Po přidání agonisty trombocyty změni tvar z diskoidního na kulatý s pseudopodií (malý pokles průchodu světla) a poté vytvoří agregáty (velký vzestup intenzity prošlého světla).

Mezi výhody patří možnost hodnocení agregační křivky, cenová dostupnost. Nevýhodou LTA je časová náročnost, nízká specifita pro clopidogrel u duální protideštičkové léčby a vliv hemolytické a chylózní plazmy.

### 4.3.1 Vyšetřovaný materiál

#### Odběr krve

Pro stanovení se využívá žilní krev odebraná do zkumavek s citrátem sodným v poměru 1:10 (1 díl citrátu sodného s koncentrací 0,109 mol/l nebo 0,126 mol/l a 9 dílů krve).

#### Příprava plazem

Pro přípravu plazem se k odběru používají výhradně nádoby z umělé hmoty nebo silikonového skla.

- **Příprava citrátové plazmy bohaté na obsah krevních destiček (Platelet Rich Plasma – PRP):** Citrátová krev se dobře promísí jemným převrácením obsahu odběrové nádoby a centrifuguje se standardním způsobem (při 20 °C, 200–250 g,

15 min). Plazma se odebere do jiné nádoby, pokud centrifugací nedosáhneme požadovaného množství PRP, proces opakujeme. Počet destiček by měl být vyšší než  $100 \cdot 10^9/l$ . (31)

- **Příprava citrátové plazmy chudé na obsah krevních destiček (Platelet Poor Plasma – PPP):** Citrátová krev se centrifuguje za standardních podmínek (při 20 °C, 2000–2500 g, 15 min). Plazma se oddělí od sedimentovaných krvinek. Používá se pro úpravu PRP na optimální počet destiček. (31)
- **Bezdestičková plazma:** PPP centrifugujeme 5 minut při 12 500 g. Používá se jako tzv. BLANK k nastavení optické „stovky“ (100 % agregace).



Obrázek 9 Centrifuga (vlastní zdroj)



Obrázek 10 Příprava materiálu před stanovením (vlastní zdroj)

### 4.3.2 Princip měření

Měří se rychlost a celková velikost vzestupu transmise ve vzorku plazmy bohaté na destičky po přidání zvoleného induktoru.

#### Používané induktory:

- vliv clopidogrelu: ADP;
- vliv ASA: epinefrin, AA, kolagen;
- kontrolní: peptid aktivující trombinový receptor (TRAP);
- dysfunkce vWF: ristocetin.

### 4.3.3 Referenční hodnoty LTA

Referenční hodnoty jsou uváděny výrobcem jen pro některé induktory jako je ADP, epinefrin, kolagen a kyselina arachidonová. V laboratoři Trombotického centra byly stanovené ze souboru zdravých dárců (n = 100).

*Tabulka 2 Referenční hodnoty LTA*

Induktory	Referenční meze (%)
ADP	63–95
EPI	61–93
COL	66–96
Lag COL	12–46
RIS	70–100
AA	59–96
Lag AA	3–37
TRAP	68–96

#### 4.3.4 Postup měření

##### Obecná doporučení

Po centrifugaci by se měly vzorky PRP nechat 15 min stát. LTA měření by mělo být provedeno do 4 hodin od odběru vzorku při teplotě 37 °C. Používají se plastové nebo silikonové zkumavky, aby destičky nenasedaly na stěny, a jednorázová magnetická míchadla. Objem induktoru by měl být jednotný, nikdy ne větší než 10 % z celkového objemu. Agregace trombocytů by měla být monitorována minimálně 10 minut po přidání agonisty, který nevyvolá do 5 minut maximální agregaci většiny kontrolních vzorků.

Výsledkem indukované agregace je agregační křivka. Na ose y je agregace v procentech a na ose x čas v minutách. Sledovaným parametrem bývá zpravidla maximální agregace destiček, popř. tzv. desagregace křivky (křivka se vrací směrem k nulové hodnotě, destičky se od sebe oddělují, tj. deagregují) nebo lag-fáze.



Obrázek 11 Agregační křivka LTA (32)

##### Vlastní měření

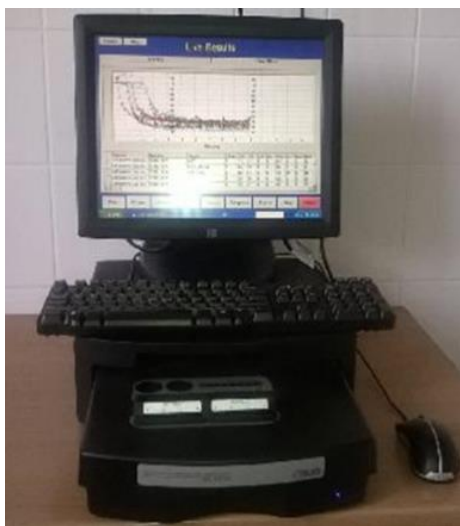
Nejprve jsem nastavila optickou „stovku“ pomocí bezdestičkové plazmy (250 µl). PRP jsem před měřením 2 min temperovala při 37°C. Ke 225 µl PRP jsem přidávala 25 µl induktoru a monitorovala průběh agregační křivky po dobu 10 min.

#### 4.3.5 Agregometr pro LTA

Měření probíhalo na osmikanálovém agregometru PAP 8E (Platelet Aggregation Profiler) od firmy Bio Data Corporation, USA.

Tento agregometr umožňuje před vlastním stanovením inkubaci analyzované plazmy i reagií v inkubačních pozicích pracovní desky. Výhodou je 8 měřících kanálů (ve srovnání se staršími modely), tj. stanovení agregace po indukci současně 8 induktory.

Pomocí softwaru je možné hodnotit různé parametry agregací křivky: maximální a finální agregaci, desagregaci, primární a sekundární slope (směrnici křivky), plochu pod agregací křivkou a lag-fází.



Obrázek 12 PAP 8E (27)

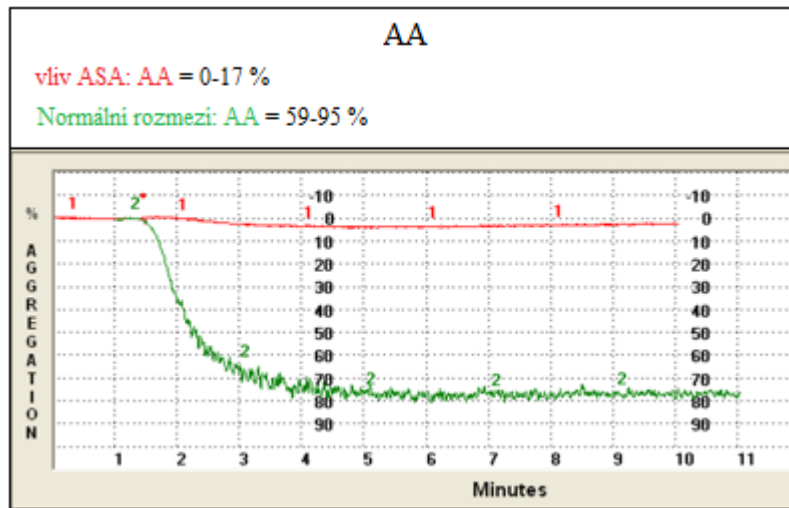
#### 4.3.6 Monitorování léčby ASA epinefrinem a kyselinou arachidonovou na principu optické agregometrie

Zjišťovala jsem hodnotu maximální amplitudy agregací křivky po stimulaci zvolenými induktory; epinefrinem a kyselinou arachidonovou. Jako kontrolní induktor jsem použila peptid aktivující trombinový receptor, kde jsem také hodnotila maximální agregaci. Tato hodnota by neměla být ovlivněna protideštičkovou léčbou ASA.

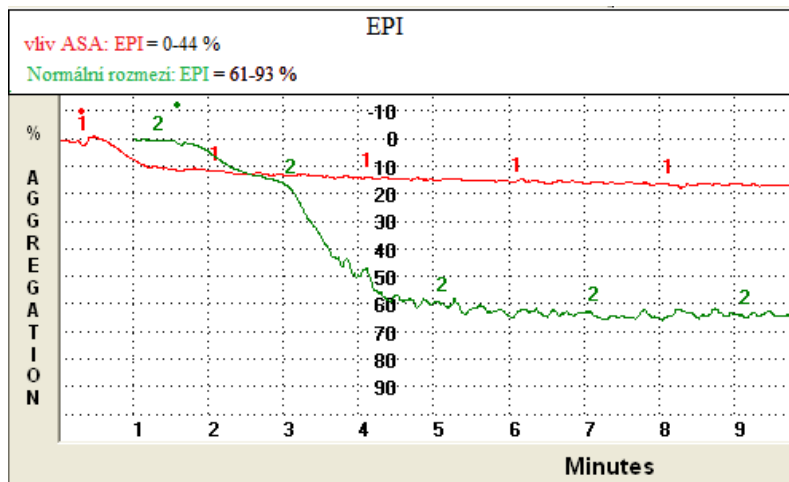
##### Interpretace výsledků

Pro vyhodnocení účinnosti ASA jsem použila rozmezí hodnot pro zvolené induktory vytvořené v laboratoři dříve pomocí rozsáhlého souboru pacientů, (n = 292):

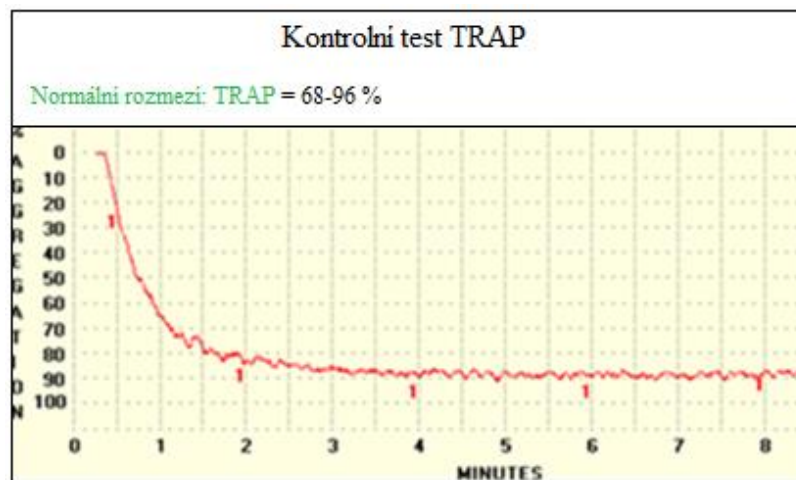
- agregace po indukci EPI = 0–44 %;
- agregace po indukci AA = 0–17 %.



Obrázek 13 Agregáčnı křivka po indukci AA (28)



Obrázek 14 Agregáčnı křivka po indukci EPI (vlastnı zdroj)



Obrázek 15 Agregáčnı křivka po indukci TRAP (28)



## **4.4 Impedanční agregometrie (MEA, Multiplate Electrode Aggregometry)**

Impedanční agregometrie se využívá zejména ke stanovení účinnosti protidestičkové léčby, dále je možné hodnotit destičkové dysfunkce, dysfunkce vWF, HIT či funkci destiček u trombokoncentrátů. Měření na přístroji Multiplate je založeno na principu MEA.

Výhodami Multiplate jsou jednoduchá příprava vzorku, odpadá centrifugace, je šetrná k pacientovi – malá spotřeba vzorku, rychlé provedení, praktické a přehledné diagnostické sety.

Nevýhodou je potřeba stanovení max. do 1,5 hod. od odběru (později dochází ke zkrácení vyšetření účinnosti protidestičkové léčby) a vliv příliš nízkého či příliš vysokého počtu destiček.

Speciální antikoagulant hirudin je výhodou pro zachování více fyziologického prostředí v plné krvi i nevýhodou pro horší dostupnost zkumavek, které nejsou zcela běžné.

### **4.4.1 Vyšetřovaný materiál**

Vyšetření probíhá z plné krve. Krev se odebírá do odběrové zkumavky s hirudinem (koncentrace 25 µg/l).

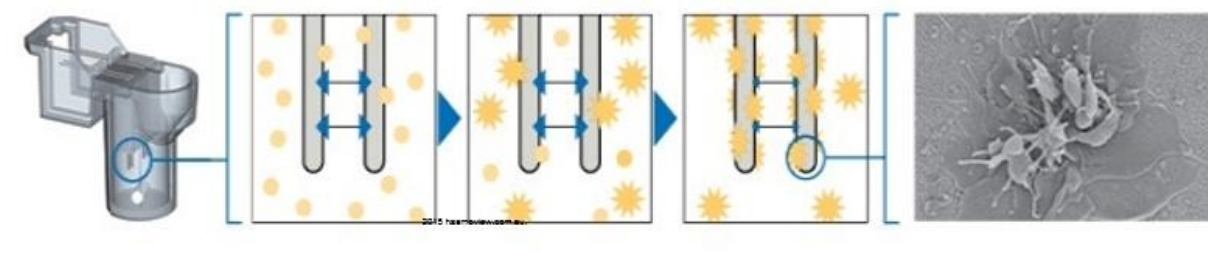
Hirudin je enzym ze slin pijavic. Patří mezi nejsilnější inhibitory trombinu a s trombinem tvoří dimerní komplex. Takto vyvázaný trombin ztrácí své proteolytické schopnosti v hemostatických procesech i mimo ně.

V případě MEA je výhodou, že hirudin antikoaguluje krev přímo působením na trombin, čímž je ve zkumavce zachována fyziologická koncentrace vápenatých iontů (na rozdíl od běžně užívaného citrátu sodného).

V lidském organismu hirudin v krvi inhibuje produkci cytokinů, chemotaxi. Inhibuje agregaci, uvolňovací reakci a syntézu TXA<sub>2</sub> trombocytů. Ovlivňuje aktivaci faktorů V, VIII a XIII.

#### 4.4.2 Princip měření

Měří se změna měrného odporu (impedance) v kyvetě se vzorkem plné krve po indukci vybranými induktory. Ve vzorku plné krve dochází po indukci vybranými induktory k přilnutí aktivovaných trombocytů k povrchu senzorů. Vysoká spolehlivost testu je zajištěna paralelním měřením pomocí dvojice nezávislých senzorů v každé testovací kyvetce. Sensory se skládají ze dvou vysoce vodivých měděných drátků potažených stříbrem. Agregace trombocytů přilnutých na senzorech je detekována změnou elektrického odporu mezi dvěma drátky.



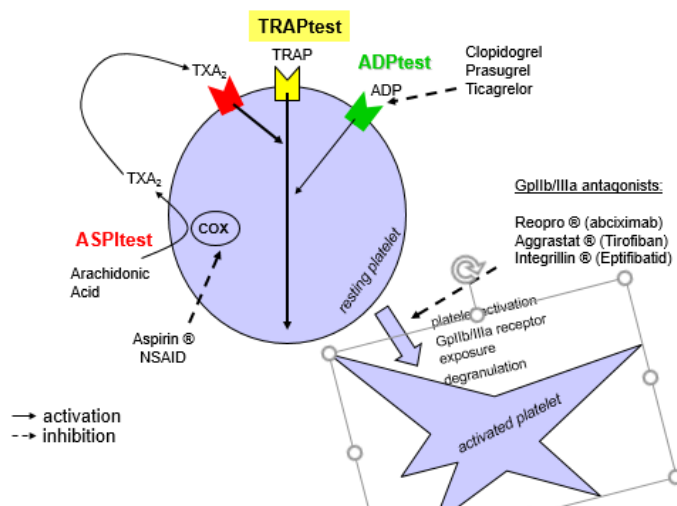
Obrázek 16 Adheze destiček k elektrodám (23)

Z jednoho měřicího kanálu se tímto získávají dva agregační výstupy (křivky), které udávají závislost agregace destiček, vyjádřenou v agregačních jednotkách [AU], na čase [min]. Z průměrných hodnot obou křivek jsou vypočteny hodnoty sledovaných parametrů, jako je plocha pod křivkou: AUC [AU/min nebo U], maximální amplituda agregace [AU], maximální sklon agregace [AU/min].

#### Dostupné testy:

- vliv clopidogrelu: ADP test (agregace po indukci ADP), APD test HS (citlivější ADPtest, kde je kromě ADP přítomný také prostaglandin E1);
- vliv ASA: ASPI test (agregace po indukci AA), ASPI ASA test (kontrolní test pro rezistenci na ASA s přidavkem ASA před měřeným vzorkem);
- TRAP test (zachycuje GP IIb/IIIa poruchy, agregace po indukci peptidem aktivujícím trombinový receptor);

- COL test (agregace po indukci kolagenem);
- vWF: RISTO test (agregace po indukci ristocetinem).



Obrázek 17 Multiplate - testy (27)

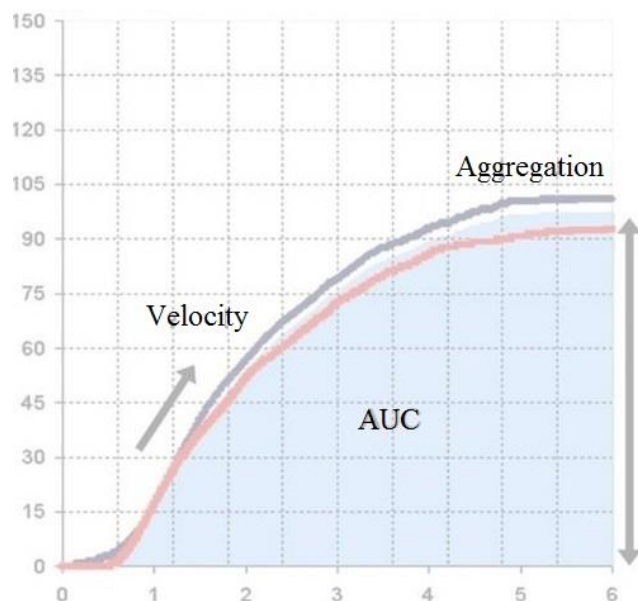
#### 4.4.3 Referenční hodnoty MEA u vybraných testů

Normální rozmezí hodnot bylo v laboratoři dříve stanovené ze souboru zdravých dárců (n = 100).

- TRAP test: muži: 696–1172 AU/min; ženy: 745–1287 AU/min.
- ASPI test: muži: 501–1029 AU/min; ženy: 627–1151 AU/min.
- ASPI ASA: muži i ženy: 0–95 AU/min.

#### 4.4.4 Postup měření

Plná hirudinová krev se ředí fyziologickým roztokem, který se do měřících kyvet pipetuje jako první (300  $\mu$ l). V případě ASPI ASA testu se přidává ASA *in vitro* předem (20  $\mu$ l). Dále jsem pipetovala plnou hirudinovou krev (300  $\mu$ l) a po 3 minutové inkubaci přidávala zvolené inuktory. Agregace destiček se monitoruje 6 minut, poté je analýza ukončena.



Obrázek 18 Agregiční křivka MEA (33)

#### 4.4.5 Agregometr Multiplate

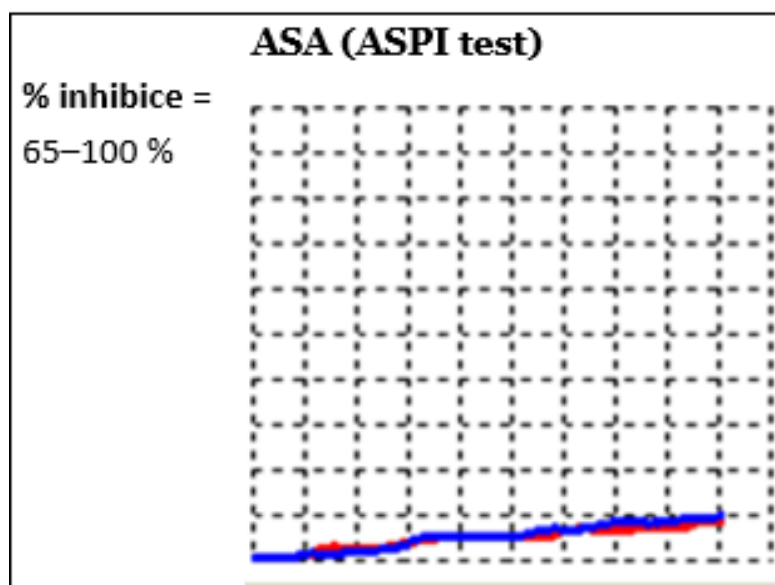
Měření probíhalo na agregometru Multiplate od firmy Roche (Switzerland). Tento agregometr má 5 nezávislých měřících kanálů. Pomocí elektronicky řízené automatické pipety a softwaru, který popisuje krok po kroku jednotlivé body analýzy, je měření velmi usnadněno. Příprava vzorku je jednoduchá (z plné krve). Provedení testu je komfortní a rychlé (do 10 minut).



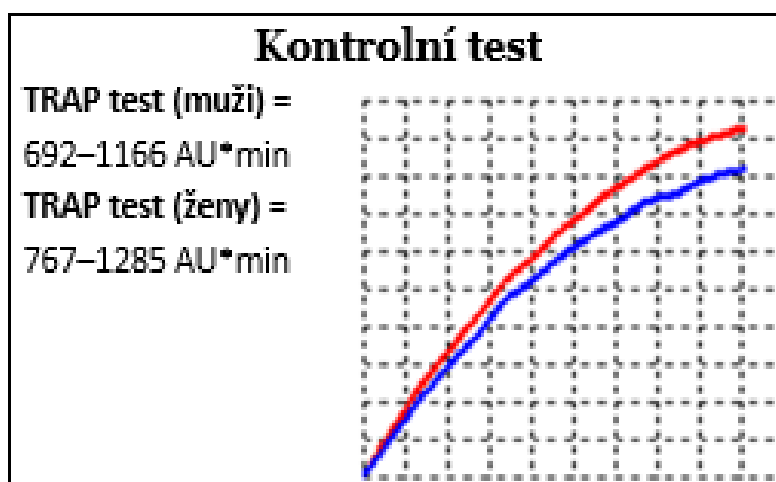
Obrázek 19 Multiplate (34)

#### 4.4.6 Monitorování léčby ASA pomocí přístroje Multiplate

K monitorování léčby ASA jsem zvolila jako induktor kyselinu arachidonovou (ASPI test), která je citlivá k blokadě cyklooxygenázy. Test je citlivý i na léčbu nesteroidními antirevmatiky a ostatními inhibitory destičkové cyklooxygenázy. Test může sloužit k detekci rezistence na léčbu ASA. Pro doplnění je vhodný test ASPI ASA, u kterého se přidává ASA *in vitro* předem. Jako kontrolní test jsem použila TRAP test, kde je induktorem peptid aktivující trombinový receptor, tento test by neměl být ovlivněn protideštičkovou léčbou ASA.



Obrázek 20 Agregace křivka (ASPI test) (35)



Obrázek 21 Agregace křivka (kontrolní TRAP test) (35)

## Interpretace výsledků

Výsledky jsem interpretovala pomocí výpočtu procentuální inhibice agregace destiček po indukci kyselinou arachidonovou (účinnost ASA). Výchozí hodnotou je naměřená plocha pod agregační křivkou AUC (AU/min).

Nejprve se vyjádří teoretická hodnota ASPI testu pacienta před léčbou pomocí kontrolního souboru dárců.

ASPI TEST (pacient před léčbou):

$$\frac{\text{průměrná hodnota ASPI test (dárce)} \cdot \text{TRAP test (pacient)}}{\text{TRAP test (dárce)}} = x$$

Poté účinnost léčby vyjádřená jako míra inhibice agregace po indukci kyselinou arachidonovou (%):

$$\text{Účinnost (\%)} = \left(1 - \frac{\text{ASPI test (pacient)}}{x}\right) \cdot 100$$

Pro vyhodnocení účinnosti ASA jsem použila terapeutické rozmezí (vytvořené pomocí rozsáhlého souboru pacientů, (n = 292)):

- % inh. (ASPI test) = 65–100 %

## 5 VÝSLEDKY

Naměřená data byla zpracována v systému Microsoft Office Excel 2016 a statistické výpočty provedené v programu Statistica 12.

### 5.1 Charakteristika souboru

Sledovanou skupinou pacientů bylo 43 žen a 21 mužů vyšetřených v roce 2016, s průměrným věkem 59 let a průměrným počtem destiček  $279 \cdot 10^9/l$ . Protidestičkovou léčbu kyselinou acetylsalicylovou dlouhodobě užívalo 43 pacientů, 21 pacientů užívalo dlouhodobě duální protidestičkovou léčbu, tzn. zároveň ASA i clopidogrel.

Před vyšetřením vyplňují pacienti dotazník, ve kterém jim jsou kladeny otázky ohledně osobní anamnézy, rodinné anamnézy, výšky, váhy a kuřáctví. 84 % pacientů vyplnilo osobní anamnézu, 78 % pacientů informace o výšce a váze a 77 % pacientů o kuřáctví. U 60 % pacientů byla zjištěna nadváha, 39 % pacientů jsou bývalý kuřáci, 45 % nekuřáci a 16 % kuřáci.

Tabulka 3 Osobní anamnéza pacientů

Osobní anamnéza									
	DM	Hypertenze	Hyperlipidémie	Žilní trombóza	Plicní embolie	Infarkt myokardu	ICHS	CMP	Nádorové onemocnění
n = 64	6	28	27	16	3	19	8	20	6

Tabulka 4 Soubor pacientů (muži i ženy)

Soubor pacientů (muži i ženy)	
n = 64	věk
Minimum	22
Maximum	87
Medián	60
Průměr	59
Směrodatná odchylka	14

Tabulka 5 Soubor pacientů (muži)

Soubor pacientů (muži)	
n = 21	věk
Minimum	22
Maximum	80
Medián	62
Průměr	59
Směrodatná odchylka	13

Tabulka 6 Soubor pacientů (ženy)

Soubor pacientů (ženy)	
n = 43	věk
minimum	28
maximum	87
medián	58
průměr	58
směrodatná odchylka	15

## 5.2 Deskriptivní statistika

Tabulka 7 Deskriptivní statistika – celý soubor pacientů (muži i ženy)

Všichni pacienti	N	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Kvantil (5,00)	Kvantil (95,00)	Sm.odch.
Věk	64	59	60	22	87	32	80	14,53
EPI	55	31	27	7	91	8	75	18,75
AA	55	12	8	0	83	2	59	17,01
TRAP	55	72	71	50	105	52	96	11,73
TRAPtest	57	1101	1126	727	1848	767	1419	214,21
ASPItest	57	230	197	19	887	32	698	184,79
ASPI inh.	57	74	80	0	97	0	96	22,67
ASPI ASA	57	72	60	0	249	2	184	51,98
PLT	58	279	252	130	525	175	449	86,51

V tabulce 7 uvádím základní statistickou charakteristiku celého souboru pacientů: počet pacientů pro jednotlivé sledované parametry, průměr, medián, minimální a maximální hodnoty, horní a dolní kvantil a směrodatnou odchylku.

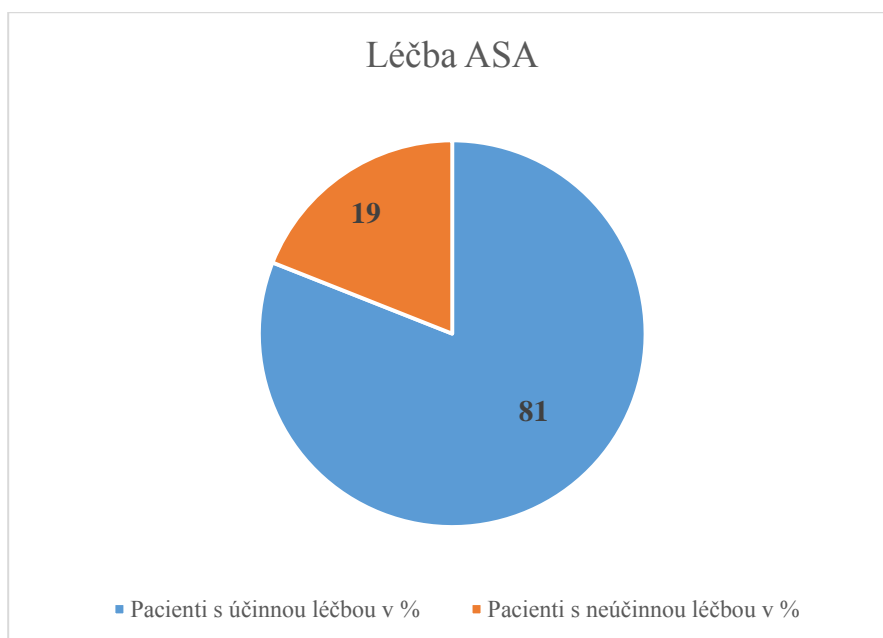


Tabulka 8 Deskriptivní statistika – pacienti s účinnou léčbou

Pacienti s účinnou léčbou	N	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Kvantil (5,00)	Kvantil (95,00)	Sm.odch.
EPI	41	25	27	7	44	8	41	10,55
AA	43	7	7	0	17	2	14	4,23
TRAP	43	70	70	50	105	55	88	10,62
TRAPtest	46	1130	1136	727	1848	821	1407	203,70
ASPItest	46	161	168	19	360	32	271	84,91
ASPI inh.	46	82	82	65	97	67	96	9,27
ASPI ASA	46	65	59	0	193	9	177	44,94

V tabulce 8 uvádím základní statistickou charakteristiku pacientů s účinnou léčbou.

### 5.3 Vyjádření účinnosti léčby



Obrázek 22 Grafické znázornění účinnosti a neúčinnosti léčby ASA

Na obrázku 22 je graficky znázorněn procentuální počet pacientů s účinnou a neúčinnou léčbou. Za celkově neúčinné byli vyhodnoceni ti, kteří se jeví jako „neúčinní“ při stanovení alespoň jednou ze dvou zvolených metod.

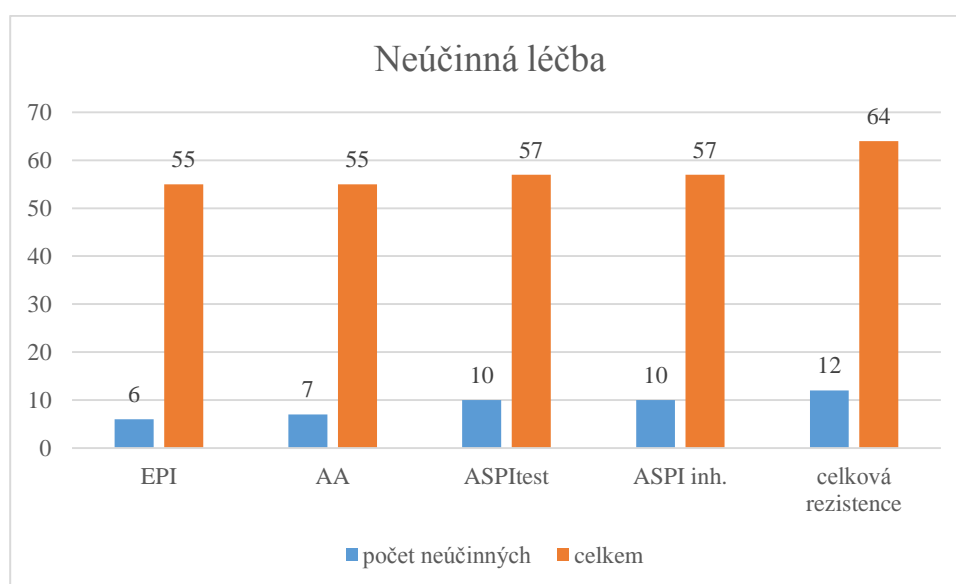
Tabulka 9 Soubor pacientů s neúčinnou léčbou

Pohlaví	Věk	EPI	AA	TRAP	TRAPtest	ASPItest	ASPI inh.	ASPI ASA
muž	55	91	83	96	863	887	0	0
muž	65	23	3	68	767	272	56	106
muž	71	27	5	75	1192	576	40	49
muž	58	13	2	91	1294	442	57	161
žena	65	13	59	70	747	698	0	30
muž	63	88	26	100	933	478	36	133
muž	54	54	47	52	chybí			
žena	76	19	11	72	1420	506	58	102
žena	71	50	20	75	1037	530	40	146
muž	62	37	9	73	819	329	50	249
žena	39	75	82	81	876	789	0	59
žena	50	55	20	89	855	210	71	88

V tabulce 9 jsou červenou barvou označena čísla značící neúčinnost léčby. Vidíme zde rozdíl v citlivosti stanovení mezi LTA a MEA a mezi jednotlivými induktory.

Tabulka 10 Procentuální vyjádření neúčinnosti léčby

	EPI	AA	ASPItest	ASPI inh.	Celková rezistence
Neúčinná léčba %	11	13	18	18	19



Obrázek 23 Grafické znázornění neúčinnosti léčby pomocí vybraných parametrů

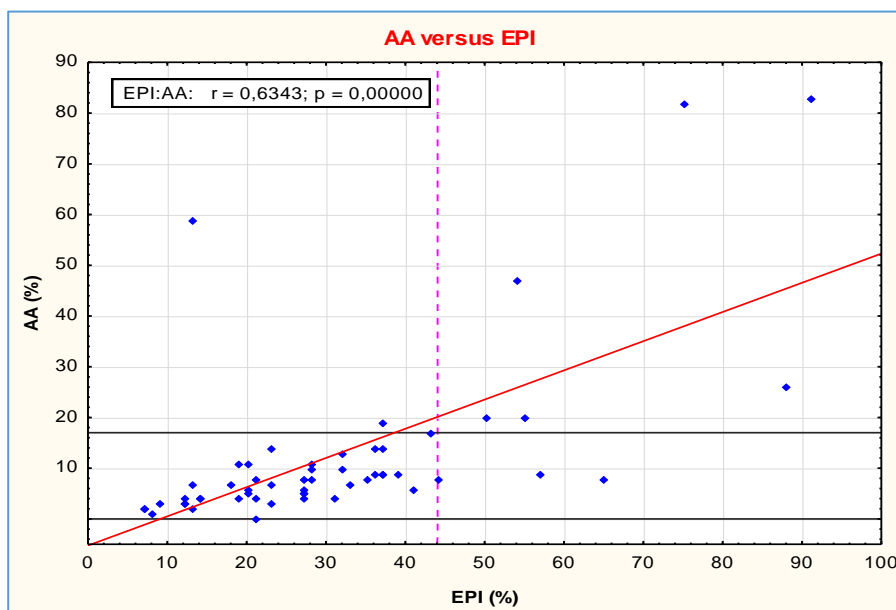
Na obrázku 23 je oranžovou barvou označen celkový počet vybraných pacientů a modrou barvou počet pacientů s neúčinnou léčbou u jednotlivých parametrů.

## 5.4 Korelace

Tabulka 11 Korelace

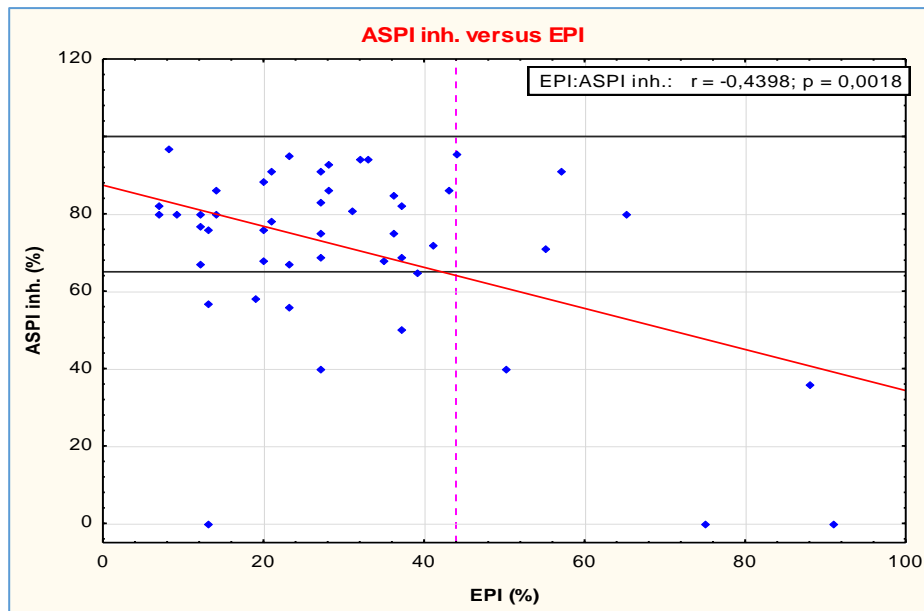
celý soubor	Korelace			
	EPI	AA	ASPItest	ASPI inh.
EPI	1,000	0,609	0,438	-0,466
AA	0,609	1,000	0,781	-0,842
ASPItest	0,438	0,781	1,000	-0,959
ASPI úč.	-0,466	-0,842	-0,959	1,000

V tabulce 11 jsou označené korelace významné na hladině  $p < 0,05$ . Čím vyšší korelační koeficient tím lepší korelace. Nejvyšších korelačních koeficientů dosahují testy s kyselinou arachidonovou jako induktorem.



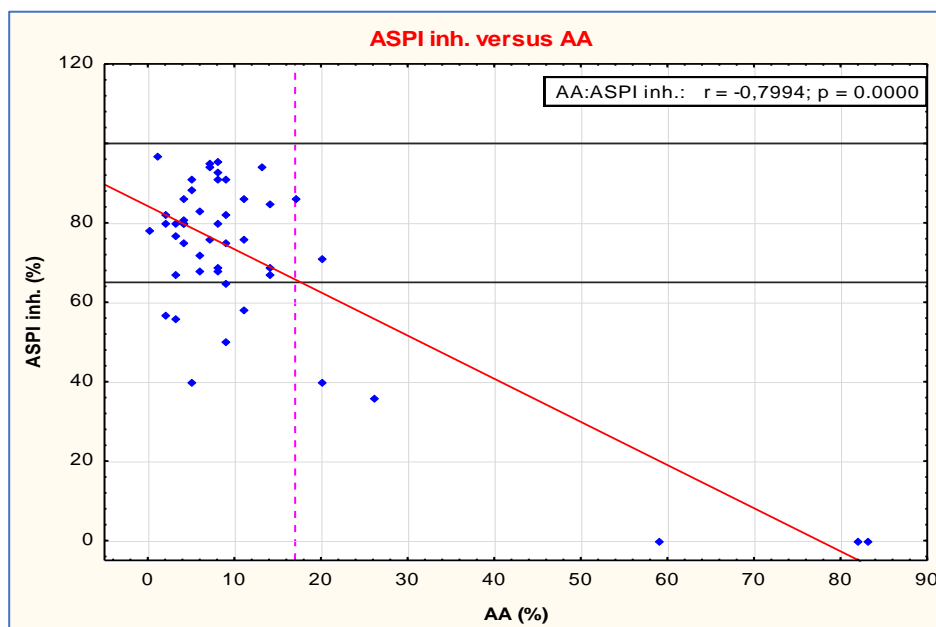
Obrázek 24 Grafické znázornění porovnání parametrů EPI a AA

Na obrázku 24 je znázorněna přímá korelace. Na ose X je přerušovanou čarou vyznačené cut-off pro epinefrin (44 %) a na ose Y je vyznačené cut-off pro kyselinu arachidonovou (17 %).



Obrázek 25 Grafické znázornění porovnání parametrů EPI a ASPI inhibice

Na obrázku 25 je znázorněná nepřímá korelace. Na ose X je přerušovanou čarou vyznačené cut-off pro epinefrin a na ose Y je vyznačené cut-off pro účinnou léčbu ASA.



Obrázek 26 Grafické znázornění porovnání parametrů AA a ASPI inhibice

Na obrázku 26 je znázorněná nepřímá korelace. Na ose X je přerušovanou čarou vyznačené cut-off pro kyselinu arachidonovou (17 %) a na ose Y je vyznačené cut-off pro účinnou léčbu ASA.

## 5.5 Porovnání ASA a duální léčby

Tabulka 12 Kolmogorov-Smirnovův test

celý soubor	Kolmogorov-Smirnovův test						
	p-hodn.	Průměr (skup. 1)	Průměr (skup. 2)	Sm.odch. (skup. 1)	Sm.odch. (skup. 2)	N singl	N duální
EPI	p > 0,10	25,93	22,54	10,65	10,37	28	13
AA	p > 0,10	7,37	7,23	4,43	3,90	30	13
TRAP	p > 0,10	70,83	68,15	11,73	7,53	30	13
TRAPtest	p > 0,10	1148,90	1094,63	154,70	275,97	30	16
ASPItest	p > 0,10	160,63	161,06	85,78	86,04	30	16
ASPI inh.	p > 0,10	82,65	82,03	8,83	10,34	30	16

V tabulce 12 jsme použili Kolmogorov-Smirnovův test pro statistické porovnání mezi léčbou ASA a duální léčbou.

## 6 DISKUZE

Cílem této práce bylo stanovit účinnost protidestičkové léčby kyselinou acetylsalicylovou pomocí optické a impedanční agregometrie.

V teoretické části práce jsme popsali vlastnosti a fyziologické funkce krve, složky hemostázy, a uvedli jsme některé adhezivní proteiny hemostázy. Dále jsme se zabývali vývojem, funkcemi, morfologií a aktivací krevních destiček. Uvedli jsme induktory, které vyvolávají agregaci destiček, antiagregační léčbu a její využití. Popsali jsme účinek jednoho z nejdůležitějších protidestičkových léků, kyselinu acetylsalicylovou a její rezistenci.

V praktické části jsme se zabývali účinností protidestičkové léčby, kterou jsme sledovali na skupině 64 pacientů užívajících léčbu kyselinou acetylsalicylovou ( $n = 43$ ) a duální léčbu ( $n = 21$ ), vyšetřených v roce 2016. Pro zjištění účinnosti jsme použili optickou agregometrii (Light Transmission Aggregometry – analyzátor PAP 8E) a impedanční agregometrii (Multiplate Electrode Aggregometry). Stanovení dvěma metodami je spolehlivější pro potvrzení snížené odpovědnosti pacientů k protidestičkové léčbě ASA. Obě metody spolu vzájemně korelovaly na hladině pravděpodobnosti  $p < 0,05$ , viz tabulka 11. Každá z těchto metod má svoje výhody, ale i úskalí.

Optická agregometrie dle Borna, která je stále považována za „zlatý standard“ vyšetření funkce krevních destiček, je metoda laboratorním snadno dostupná pro nízké náklady, umožňuje snadnou interpretaci výsledků hodnocením různých parametrů agregační křivky (možnost hodnotit i desagregaci křivky na rozdíl od MEA) a stanovení není tak časově omezené (až do 4 hod od odběru). Na druhou stranu má zdlouhavější přípravu vzorku a vzhledem k tomu, že je to metoda optická, měření je vždy ovlivněno chylózní, ikterickou či hemolytickou plazmou.

Pomocí impedanční agregometrie jsme zachytili více pacientů s neúčinnou antiagregační léčbou (10 z 11 celkově rezistentních pacientů, procentuální neúčinnost 91 %) na rozdíl od LTA (6 a 7 z 12 celkově rezistentních pacientů, procentuální neúčinnost 50 a 58 %), jeví se tedy senzitivnější než optická agregometrie, viz tabulka 9. Další výhodou MEA je vyšetření z plné krve, rychlost stanovení a potřeba malého objemu krve. Měření probíhá v doubletu, což umožňuje automatickou kontrolu kvality. Nevýhodou je náročnější interpretace

výsledků, závislost na době od odběru a počtu destiček. Také jsou zde vhodnější zkumavky s neobvyklým antikoagulantem – hirudinem, které nejsou běžně dostupné.

V deskriptivní statistice uvádíme základní statistickou charakteristiku souboru pacientů (kromě hodnot popisujících agregaci destiček, jsou zde zahrnuté také obecné charakteristiky – věk a počet destiček): počet pacientů pro jednotlivé sledované parametry průměr, medián, minimální a maximální hodnoty, horní a dolní kvantil a směrodatnou odchylku, viz tabulka 7.

Podle výsledků agregace po indukci uvedenými induktory jsme vyhodnocovali účinnost či neúčinnost léčby. V tabulce 8 jsou uvedené kvantily, které odpovídají hodnotám v normálním rozmezí. Pacienti s účinnou léčbou se pohybují v referenčním rozmezí.

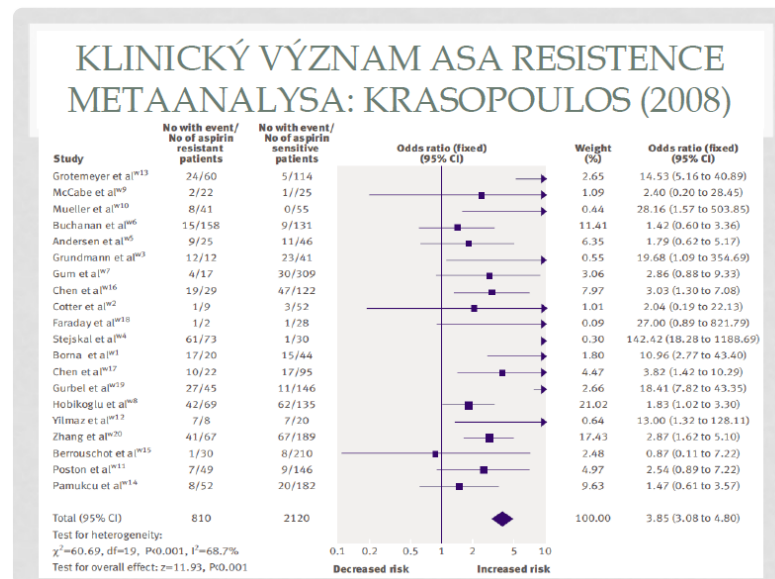
Při měření jsme si ověřili, že je agregace v případě ASA výrazně ovlivněna po indukci epinefrinem a kyselinou arachidonovou. V tabulce 9 je uveden přehled pacientů, kteří byli vyhodnoceni jako celkově rezistentní, na základě „neúčinnosti“ vyhodnocené alespoň jednou metodou. Parametry EPI a AA jsou pro hodnocení srovnatelné (6 a 7 rezistentních), vzájemně dobře korelují, viz tabulka 11. Pokud budeme uvažovat, že hodnota 20 % je v případě AA hraniční, pak se tento parametr jeví jako citlivější k ASA, tj. méně vhodný pro odhalení neúčinnosti této léčby. Parametry ASPI test a AA mají nejlepší korelační koeficient,  $r = 0,8$ , pravděpodobně díky tomu, že je zde použitý stejný induktor (kyselina arachidonová).

Rozdíl mezi duální a singl léčbou jsme vyhodnocovali pomocí neparametrického Kolmogorova-Smirnovova testu. Hodnotili jsme parametry pro účinnost aspirinu. U hodnot pod 0,05 je statistický rozdíl mezi duální a singl léčbou. Naše výsledné hodnoty ukazují, že mezi duální a singl léčbou rozdíl není. Tento test jsme vybrali, abychom dokázali, že clopidogrel neovlivňuje parametry používané k hodnocení účinku ASA.

V bakalářské práci jsme sledovali skupinu 64 pacientů a z toho bylo 19 % rezistentních, viz tabulka 10.

Ve studii Metaanalýza: Krasopoulos (2008) se sledoval výskyt ASA rezistence. Bylo vybráno 2930 pacientů (20 studií), kdy většina z nich měla koronární syndrom. Stanovení bylo provedeno různými metodami od TXB<sub>2</sub> po Verify Now. Z vybraných pacientů bylo

810 rezistentních (28 %), měli vyšší riziko smrti, selhání cévní intervence a cerebrovaskulární příhody. (36)



Obrázek 27 Metaanalýza Krasopoulos (36)

Ve studii Kempferta et al. 2009 se ASA rezistence zjišťovala po aortokoronárním bypassu (CBG). Ke stanovení byla použita optická agregometrie a bylo vybráno 59 pacientů. U 17 (28,8 %) pacientů byla prokázána předoperační rezistence, kdy pacienti nereagovali na *in vitro* přidanou ASA nebo předoperačně vysadili léčbu ASA. Pacientů, u kterých se vyvinula rezistence pooperačně, bylo 29 (49,2 %). Tito pacienti byli předoperačně citliví a pooperačně se stali rezistentními, kritickým byl 5. den. Celkem od 5. dne byla rezistence u 46 (78 %) pacientů. Došlo ke třem úmrtím ve skupině rezistentních pacientů. (36)

V uvedených studiích je rozdíl v počtu vybraných pacientů, ve zvoleném způsobu stanovení, v onemocnění. Měření účinnosti ASA krátce po operačním výkonu s sebou pravděpodobně ponese vyšší procento rezistentních pacientů. V případě této práce se ale jednalo o pacienty, kteří ASA užívali jako sekundární prevenci kardiovaskulárních a tromboembolických příhod.

Snahou objektivizovat vliv antiagregační léčby u nemocných s vysokým rizikem arteriálních uzávěrů se zabývá řada prací. Výsledkem je, že protidestičková léčba je vhodná u všech rizikových nemocných, snižuje závažné cévní příhody, srdeční infarkt, embolii při fibrilaci síní. Léčba se má podávat dlouhodobě, nízkodávková ASA je stejně účinná jako



její vysoké dávky. Kombinace ASA s jiným protidestičkovým lékem je pro nemocné výhodná. Antagonisté ADP receptorů jsou jediné léky, o kterých můžeme říci, že jsou účinnější než ASA. (29) Obecně se v literatuře uvádí, že kombinace ASA s clopidogrelem je účinnější v prevenci trombotických komplikací než jednotlivé protidestičkové léky samotné. (21)

Výskyt aspirinové rezistence je významně ovlivněn klinickou situací. V případě zdravých jedinců je výskyt rezistence mizivý a rovněž korelace mezi metodami je vyšší než v případě vzorků u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním. (37)

Je zaznamenán vyšší výskyt ASA rezistence u pacientů, kteří předoperačně vysadili ASA, oproti těm, kterým byl aspirin podáván po celé perioperační období. (41)

U pacientů se stabilním kardiovaskulárním onemocněním je výskyt ASA rezistence také nízký (38,39), ale významně stoupá v případě akutního stavu. (40,41)

Naše zjištění odpovídá hodnotám uváděným v literatuře, pokud je zohledněn fakt, že pacienti léčbu užívají dlouhodobě jako sekundární prevenci.

## 7 ZÁVĚR

Antiagregační léčba se používá jako prevence vzniku kardiovaskulárních chorob, kdy snižuje krevní srážlivost narušením funkce krevních destiček. Účinnost léčby je vhodné stanovit, aby se předešlo dalším možným trombotickým příhodám. Způsob monitorování je třeba pečlivě vybírat, jak z hlediska časové náročnosti, ceny vyšetření dostupných metod, tak z hlediska interpretace naměřených výsledků.

V naší práci jsme zjistili, že pro sledování účinnosti protideštičkové léčby ASA a duální protideštičkové léčby je vhodná optická i impedanční agregometrie, obě metody spolu korelují. Pomocí impedanční agregometrie jsme zachytili více pacientů s neúčinnou antiagregační léčbou, má tedy mírně vyšší senzitivitu než optická agregometrie.

Při stanovení účinnosti léčby ASA jsme zjistili, že 81 % pacientů mělo léčbu účinnou a 19 % pacientů léčbu neúčinnou. Příčiny neúčinnosti léčby jsou variabilní, od genetických polymorfismů, buněčných vlivů až k pouhé non-compliance, kdy pacient doporučenou léčbu neužívá.

Každá laboratoř by si měla zavést vlastní normální rozmezí hodnot, protože při použití rozdílných analyzátorů a metodik se výsledky mohou výrazně lišit. Normální rozmezí hodnot a správně nastavené cut-off pro interpretaci výsledků je pro stanovení účinnosti léčby zásadní.

V ideálním případě by bylo vhodné vyšetřit funkci krevních destiček ještě před zahájením léčby a dále sledovat její účinnost, kvůli reakci pacienta na léčbu, která je individuální. V praxi bohužel není možné tento postup dodržet.

Naměřené výsledky je třeba hodnotit v souladu s dalšími výsledky a závěr stanovit i s ohledem na pacientovu anamnézu.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	Kyselina arachidonová
ADP	Adenosindifosfát
AKS	Akutní koronární syndrom
ASA	Kyselina acetylsalicylová
AT	Antitrombin
ATP	Adenosintrifosfát
AU	Aggregation Unit
AUC	Area Under the Curve
Ca <sup>2+</sup>	Vápenaté ionty
CABG	Coronary Artery Bypass Surgery
cAPM	Cyklický adenosinmonofosfát
CFU – GEMM	Colony Forming Unit – Granulocyte, Erythrocyte, Megakaryocyte, Macrophage,
CFU – Meg	Colony Forming Unit - Megakaryocyte
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
CML	Chronická myeloidní leukémie
CMP	Cévní mozková příhoda
COL	Kolagen
CVN	Kardiovaskulární nemoc
COX	Cyklooxygenáza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DM	Diabetes Mellitus
DTS	Denzní tubulární systém
EPI	Epinefrin
EPO	Erytropoetin
FGF	Fibroblast Growth Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor
GP	Glykoprotein
HIT	Heparinem indukovaná trombocytémie
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICHDK	Ischemická choroba dolních končetin

ICHS	Ischemická choroba srdeční
IL	Interleukin
IM	Infarkt myokardu
K <sub>2</sub> EDTA	Chelatonát dvojdraselný
K <sub>3</sub> EDTA	Chelatonát trojdraselný
LMWH	Low Molecular Weight Heparin
LTA	Light Transmission Aggregometry
Mg <sup>2+</sup>	Hořečnaté ionty
MEA	Multiplate Electrode Aggregometry
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NSAIDs	Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs
O <sub>2</sub>	Kyslík
OKS	Otevřený kanálkový systém
PAF	Destičkový aktivační faktor
PAP 4D	Platelet Aggregation Profiler 4D
PAP 8E	Platelet Aggregation Profiler 8E
PCI	Perkutánní koronární intervence
PF4	Destičkový faktor 4
PPP	Plasma chudá na destičky
PRP	Plasma bohatá na destičky
PVN	Periferní vaskulární nemoc
RISTO	Ristocetin
SCF	Stern Cell Factor
TPO	Trombopoetin
TRAP	Peptid aktivující trombinový receptor
TXA <sub>2</sub>	Tromboxan A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Tromboxan B <sub>2</sub>
vWF	von Willebrandův faktor

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Buňka a krvetvorba*. Český Těšín: FINIDR, 2002, 160 s. ISBN 80-86682-01-3.
2. Omniveda Group s.r.o. *Věda nás baví* [online]. 2011-2017, [cit. 2017-04-10]. Dostupné na: <[http://www.vedanasbavi.cz/orisek-38-zs-vnb-ii-12-prvni-pomoc?ID\\_mesta=3&IDp=2](http://www.vedanasbavi.cz/orisek-38-zs-vnb-ii-12-prvni-pomoc?ID_mesta=3&IDp=2)>.
3. POSPÍŠILOVÁ, Šárka, Dana DVOŘÁKOVÁ a Jiří MAYER. *Molekulární hematologie*. Praha: Galén, c2013, 316 s. ISBN 978-80-7262-942-8.
4. MATÝŠKOVÁ, Miloslava a Ingrid HRACHOVINOVÁ. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1999, 203 s. ISBN 80-7013-278-7.
5. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie hemostázy*. Český Těšín: FINIDR, 2004, 237 s. ISBN 80-86682-01-3.
6. PENKA, Miroslav a Alena BULIKOVÁ. *Neonkologická hematologie*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2009, 248 s. ISBN 978-80-247-2299-3.
7. KLENER, Pavel. *Vnitřní lékařství*. Praha: Galén, 2003, 115 s. Scripta. ISBN 80-7262-210-2.
8. KUBISZ, Peter. *Hematologia a transfuziologia*. Praha: Grada, 2006, 324 s. ISBN 978-80-247-1779-4.
9. CZ Pharma s.r.o. *Remedia* [online]. 2007, [cit. 2017-04-12]. Dostupné na: <<http://www.cobas.com/home/product/hemostasis-testing/multiplate-analyzer.html>>.
10. INDRÁK, Karel, ALUŠÍK, Štefan a Magdaléna LEJSKOVÁ, ed. *Hematologie*. Praha: Triton, 2006, 280 s. Postgraduální klinický projekt. ISBN 80-7254-868-9.
11. PECKA, Miroslav. *Přehled laboratorní hematologie II.: Bílá krevní řada, Krevní destička*. Praha: Galén, 1996, 132 s. ISBN 80-85824-43-4.
12. VAŇÁSEK, Jaroslav. *Hematologie a transfuziologie*. Brno: Inst. pro další vzděl. prac. ve zdrav., 1992, 162 s. ISBN 8070131330.
13. BOHONĚK, M. Hematologie a transfuzní služba. Přednáška. *Trombocyt*. Praha. ÚVN. 2015-2016.
14. MOUREK, Jindřich. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2005, 204 s. ISBN 80-247-1190-7.

15. PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: FINIDR, 2006, 304 s. ISBN 80-86682-02-1.
16. DocPlayer. *Hemostáza- definice* [online]. 2017, [cit. 2017-04-10]. Dostupné na: <<http://docplayer.cz/39547933-Hemostaza-definice-vybalancovana-rovnovaha-udrzujici-krev-cirkulujici-v-krevnim-obehu-v-tekutem-stavu-a-lokalizujici-proces-krevniho-srazeni-na-misto.html>>.
17. BÍLKOVÁ, Jana a Karolína KETTNEROVÁ. Hematologie. Prezentace. *Induktory agregace destiček. Interpretace výsledků vyšetření*. Praha. 2015.
18. Wikipedia. *Ristocetin* [online]. 2016, [cit. 2017-04-10]. Dostupné na: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Ristocetin>>.
19. TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003, 772 s. ISBN 80-247-0512-5.
20. ŠEVČÍK, Pavel a Martin MATĚJOVIČ, ed. *Intenzivní medicína*. 3., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Galén, c2014, 1195 s. ISBN 978-80-7492-066-0.
21. Antiagregační léčba. *Farmakoterapeutické informace: Měsíčník pro lékaře a farmaceuty* [online]. 2004, (2) [cit. 3. dubna 2017]. ISSN 1211 - 0647. Dostupné také z: <http://www.sukl.cz/sukl/archiv-fi-2004-2006>.
22. PENKA, Miroslav. *Hematologie*. Praha: Grada, 2001, 214 s. ISBN 80-247-0023-9
23. BÍLKOVÁ, Jana a Karolína KETTNEROVÁ. Hematologie. Prezentace. *Protideštičková léčba a porovnání metod k vyšetření její účinnosti*. Praha. 2015.
24. WAGNER, Robert. *Kardioanestezie a perioperační péče v kardiochirurgii*. Praha: Grada, 2009, 336 s. ISBN 978-80-247-1920-7.
25. MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2007, 380 s. ISBN 978-80-247-1356-4.
26. Wikiskripta. *Kyselina acetylsalicylová* [online]. 2014, [cit. 2017-04-10]. Dostupné na: <[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Kyselina\\_acetylsalicylov%C3%A1](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Kyselina_acetylsalicylov%C3%A1)>.
27. KETTNEROVÁ, Karolína a Jana BÍLKOVÁ. Hematologie. Prezentace. *Interpretace výsledků metod k vyšetření funkce krevních destiček*. Praha. 2016.
28. BÍLKOVÁ, Jana a J. HARTINGER. Hematologie. Prezentace. *Vliv metamizolu (Novalginu) na účinek protideštičkové terapie s ASA*. Praha. 2016.
29. MALÝ, Jaroslav. Vyšetření aktivity destičkových funkcí. *Vnitřní lékařství* [online]. 2005, 51(2). Dostupné také z: [http://www.prolekare.cz/pdf?ida=vl\\_05\\_02\\_06.pdf](http://www.prolekare.cz/pdf?ida=vl_05_02_06.pdf).

30. Mujlekarnik. *Aspirin por.tbl.nob.20x500mg* [online]. 2017, [cit. 2017-04-10]. Dostupné na: <[https://www.mujlekarnik.cz/aspirin-por-tbl-nob-20x500mg\\_detail/](https://www.mujlekarnik.cz/aspirin-por-tbl-nob-20x500mg_detail/)>.
31. PECKA, Miroslav a Milan BLÁHA. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art, 2010, 343 s. ISBN 978-80-903871-9-5.
32. KETTNEROVÁ, Karolína a Jana BÍLKOVÁ. Hematologie. Prezentace. *Metodika vyšetřování funkce destiček optickou agregometrií*. Praha. 2013.
33. DocPlayer. *Možnosti monitorace protideštičkové léčby ve FN Plzeň. J.Šlechtová, I. Korelusová Hematologický úsek ÚKBH FN a LF v Plzni* [online]. 2017, [cit. 2017-05-13]. Dostupné na: <<http://docplayer.cz/8359594-Moznosti-monitorace-protidestickove-lecby-ve-fn-plzen-j-slechtova-i-korelusova-hematologicky-usek-ukbh-fn-a-lf-v-plzni.html>>.
34. Roche Diagnostics Limited. *Multiplate Analyzer* [online]. 1996-2016, [cit. 2017-04-10]. Dostupné na: <<http://www.cobas.com/home/product/hemostasis-testing/multiplate-analyzer.html>>.
35. BÍLKOVÁ, Jana. Hematologie. Prezentace. *Naše zkušenosti s agregometrem Multiplate*. Praha. 2015.
36. HARTINGER, Jan. Oddělení klinické farmakologie a farmacie. Prezentace. *Účinnost antiagregace po operačních výkonech*, Praha. 2016.
37. HENRY P., VERMILLET A., BOVAL B. et al. *24-hour time-dependent aspirin efficacy in patients with stable coronary artery disease*. Thromb Haemost 2011; 105: 336-344.
38. LORDKIPANIDZE M., PHARAND C., SCHAMPAERT E. et al. *A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease*. Eur Heart J 2007; 28: 1702-1708.
39. HOMORODI N., KOVACS E. G., LEE S. et al. *The lack of aspirin resistance in patients with coronary artery disease*. J Transl Med 2016; 14: 74.
40. GASPAROVIC H., PETRICEVIC M., KOPJAR T. et al. *Impact of dual antiplatelet therapy on outcomes among aspirin-resistant patients following coronary artery bypass grafting*. Am J Cardiol 2014; 113: 1660-1666.
41. KEMPFERT J., ANGER K., RASTAN A. et al. *Postoperative development of aspirin resistance following coronary artery bypass*. Eur J Clin Invest 2009; 39: 769-774.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Rozdělení krve.....	11
Obrázek 2 Složení krve .....	13
Obrázek 3 Znázornění primární hemostázy a možností jejího ovlivnění .....	16
Obrázek 4 Vznik krevních destiček .....	18
Obrázek 5 Adheze a agregace krevních destiček .....	22
Obrázek 6 Působení protideštičkové léčby .....	28
Obrázek 7 Vzorec kyseliny acetylsalicylové .....	29
Obrázek 8 Protideštičkový účinek ASA.....	30
Obrázek 9 Centrifuga .....	36
Obrázek 10 Příprava materiálu před stanovením .....	36
Obrázek 11 Agregiční křivka LTA.....	38
Obrázek 12 PAP 8E.....	39
Obrázek 13 Agregiční křivka po indukci AA .....	40
Obrázek 14 Agregiční křivka po indukci EPI.....	40
Obrázek 15 Agregiční křivka po indukci TRAP .....	40
Obrázek 16 Adheze destiček k elektrodám .....	42
Obrázek 17 Multiplate - testy.....	43
Obrázek 18 Agregiční křivka MEA.....	44
Obrázek 19 Multiplate.....	44
Obrázek 20 Agregiční křivka (ASPI test).....	45
Obrázek 21 Agregiční křivka (kontrolní TRAP test).....	45
Obrázek 22 Grafické znázornění účinnosti a neúčinnosti léčby ASA .....	49
Obrázek 23 Grafické znázornění neúčinnosti léčby pomocí vybraných parametrů .....	50
Obrázek 24 Grafické znázornění porovnání parametrů EPI a AA .....	51
Obrázek 25 Grafické znázornění porovnání parametrů EPI a ASPI inhibice .....	52
Obrázek 26 Grafické znázornění porovnání parametrů AA a ASPI inhibice.....	52
Obrázek 27 Metaanalýza Krasopoulos.....	56



## 11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Inhibitory krevních destiček (24) .....	28
Tabulka 2 Referenční hodnoty LTA .....	37
Tabulka 3 Osobní anamnéza pacientů .....	47
Tabulka 4 Soubor pacientů (muži i ženy) .....	47
Tabulka 5 Soubor pacientů (muži) .....	48
Tabulka 6 Soubor pacientů (ženy).....	48
Tabulka 7 Deskriptivní statistika – soubor pacientů (muži i ženy).....	48
Tabulka 8 Deskriptivní statistika – pacienti s účinnou léčbou .....	49
Tabulka 9 Soubor pacientů s neúčinnou léčbou .....	50
Tabulka 10 Procentuální vyjádření neúčinnosti léčby .....	50
Tabulka 11 Korelace.....	51
Tabulka 12 Kolmogorov-Smirnovův test.....	53

## 12 SEZNAM PŘÍLOH

### Obsah CD

- Abstrakt CZ.pdf
- Abstrakt EN.pdf
- Bakalářská práce.pdf
- Klíčová slova.pdf
- Zadání bakalářské práce.pdf