

**A trombocita alpha-2<sub>A</sub> adrenerg receptorának szerepe a thienopyridin rezisztencia kialakulásában stabil koronária betegekben – A gátlószer rezisztencia klinikai vonatkozásai és kezelési lehetőségei**

Doktori értekezés

**Dr. Béres Bernát János**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



**Témavezető: Dr. Kiss Róbert Gábor PhD osztályvezető főorvos**

**Hivatalos bírálók: Dr. Dávid Marianna PhD egyetemi docens  
Dr. Zima Endre PhD egyetemi adjunktus**

**A szigorlati bizottság elnöke: Dr. Machovich Raymond PhD, DSc egyetemi tanár  
A szigorlati bizottság tagjai: Dr. Blaskó György PhD, DSc egyetemi tanár  
Dr. Geller László PhD egyetemi adjunktus**

**Semmelweis Egyetem, Budapest, 2011**

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>5</b>
1.1 A trombociták fiziológias szerepe .....	5
1.2 A trombociták szerepe kóros körülmények között – atherosclerosis, gyulladás és atherotrombózis .....	8
1.3 Trombocita gátlók .....	9
1.4 A trombocita gátlószer „rezisztencia” .....	15
1.5 A trombocita alpha-2 <sub>A</sub> adrenerg receptora.....	32
<b>2. Célkitűzések .....</b>	<b>38</b>
<b>3. Módszerek .....</b>	<b>41</b>
3.1 Betegek.....	41
3.2 Trombocita aggregációs vizsgálatok.....	43
3.3 Áramlási citometria.....	46
3.4 ELISA vizsgálatok .....	47
3.5 Statisztikai analízis .....	49
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>50</b>
4.1 A thienopyridin rezisztencia felmérése.....	50
4.2 Algoritmus a stent trombózison átesett clopidogrel rezisztens betegek kezelésére.....	53
4.3 Esettanulmány: gyógyszerinterakció okozta nagyon késői DES-trombózis és szerzett thienopyridin rezisztencia .....	55
4.4 A trombocita adrenerg receptor szerepe a thienopyridin rezisztenciában .	57
<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>68</b>
5.1 A thienopyridin rezisztencia felmérése.....	69
5.2 Algoritmus a stent trombózison átesett clopidogrel rezisztens betegek kezelésére.....	70

<b>5.3 Esettanulmány: gyógyszerinterakció okozta nagyon késői DES-trombózis és szerzett thienopyridin rezisztencia .....</b>	<b>71</b>
<b>5.4 A trombocita adrenerg receptor szerepe a thienopyridin rezisztenciában .</b>	<b>72</b>
<b>6. Következtetések és új eredmények.....</b>	<b>81</b>
<b>7. Összefoglalás .....</b>	<b>83</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>84</b>
<b>9 Irodalomjegyzék .....</b>	<b>85</b>
<b>10. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>111</b>
<b>11. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>116</b>

## Rövidítések jegyzéke

ACC/AHA – „American College of Cardiology / American Heart Association”

ACE – angiotenzin konvertáz enzim

ADP – adenzin-difoszfát

ARB – angiotenzin receptor blokkoló

ATI - atipamezol

ATP – adenzin-trifoszfát

BMI – testtömegindex

BMS – „bare-metal stent”

CABG – „coronary artery bypass grafting”

cAMP – cyclic adenosine monophosphate

CD40L – CD40-ligand

CICR – „calcium-induced calcium-release”

COX-1 – ciklooxygenáz-1

cPLA<sub>2</sub> – citoplazmatikus foszfolipáz-A<sub>2</sub>

CRP – C-reaktív protein

DAG – diacilglicerol

DES – „drug-eluting stent”

EDTA – etilén diamino tetraecetsav

ELISA – „enzyme-linked immunosorbent assay”

FACS – „fluorescein activated cell sorter”

HbA<sub>1c</sub> – hemoglobin A<sub>1c</sub>

hs-CRP – „high-sensitivity C-reactive protein”

ICAM – „intercellular cell adhesion molecule”

IP<sub>3</sub> – inozitol-trifoszfát

IQR – „interquartile range”

LMWH – „low molecular weight heparin”

MDR – „multidrug resistance”

MPV – „mean platelet volume”

mRNS – „messenger” ribonukleinsav

NO – nitrogén-monoxid

NSAID – „non-steroidal antiinflammatory drug”

NSTEMI – nem ST-elevációs akut miokardiális infarktus

OPD – „orto-phenylenediamine”

p38-MAPK – „mitogen activated protein kinase”  
PAR – „proteinase activated receptor”  
PBS – „phosphate buffered saline”  
PCI – „percutaneous coronary intervention”  
PE – fikoeritrin  
PerCP – peridin klorofill protein  
PFA-100 – „platelet function analyzer”  
PGE1 – prosztaglandin E1  
PGG2 – prosztaglandin G2  
PGH2 – prosztaglandin H2  
PGI<sub>2</sub> – prosztaciklin  
PI3K – foszfatidil inozitol-3-kináz  
PKC – protein kináz C  
PLC – foszfolipáz-C  
POBA – „plain-old balloon angioplasty”  
PTCA – perkután transluminális koronária angioplasztika  
SC – „shape change”  
SD – standard deviáció  
SSRI – „selective serotonin reuptake inhibitor”  
STEMI – ST-elevációs akut myocardialis infarktus  
TFPI – „tissue factor pathway inhibitor”  
TMB - tetrametilbenzidin  
TP – „thromboxane protein”  
TXA<sub>2</sub> – tromboxán-A<sub>2</sub>  
TXB<sub>2</sub> – tromboxán-B<sub>2</sub>  
VASP – „vasodilator-associated stimulated phosphoprotein”  
VCAM – „vascular cell adhesion molecule”

## 1. Bevezetés

### 1.1 A trombociták fiziológias szerepe

A trombociták a vér legkisebb alakos elemei, melyek a csontvelőben képződnek a megakaryocytákból való lefűződés során. Sejtmagjuk nincs, méretük 2-4  $\mu\text{m}$  közöttire tehető. A nyugvó trombociták diszkoid alakúak, azonban aktivációkor vagy az adhézió során alakváltozáson („shape change”) mennek keresztül. Az alakváltozás során állábak (pszeudopodium) képződnek, felszínük így kétszeresére növekszik. A citoskeleton mozgó struktúrfehérjéi (aktin, miozin) aktívan vesznek részt a granulumszekrécióban. A trombocita négyféle granulomot tartalmaz:  $\alpha$ -granulum, denz granulom, lizoszóma, peroxiszóma. Az  $\alpha$ -granulumokból felszabaduló anyagok az adhézió, aggregáció, kemotaxis, gyulladás, sejtproliferáció és a koaguláció folyamataiban vesznek részt. A denz granulomokban található azok a kis molekulású anyagok, melyek fontosak a trombocita aggregáció felerősödésében (amplifikáció) és a stabil aggregátum kialakulásában (ATP, ADP, szerotonin, kalcium). A lizoszómák elasztázt, kollagenázt, katepszint tartalmaznak és szekréciójuk hozzájárul a környező struktúrák degradációjához (proteolízis), hasonlóképpen a peroxidáz enzimeket hordozó peroxiszómákhoz.

A trombociták élettartama átlagosan 7-10 nap, normális körülmények között naponta a keringő mennyiség 10-20%-a termelődik újra. Degradációjuk a retikulo-endotheliális rendszerben, főként a májban és a lépben történik meg.

### A trombociták szerepe a hemosztázisban

A hemosztázis az érfal sérülésére adott komplex válasz, melynek eredménye a vérzés megállításán túl a képződő alvadék oldódása (fibrinolízis) és a sérült érfali struktúrák gyógyulása. A hemosztázisnak időben három fázisa van: primer, szekunder és fibrinolitikus. A primer hemosztázis során a trombociták érintkeznek a szubendotheliális mátrixszal, adhézió, aktiváció és aggregáció történik, mely létrehozza a trombocitadús primer trombuszt. A trombocitadús - vagy fehér - trombus törekeny és könnyedén eltávolítható a felszínről. A trombocitadús aggregátum szerepe, hogy a szekunder

hemosztázis (koagulációs kaszkád) végeredményeképpen képződő fibrin képződéséig átmenetileg dugót képezzen az érfalon. A képződő fibrinháló teszi stabilá az alvadékot (vörös vagy fibrindús trombus).

### **A primer hemosztázis lépései**

#### **Adhézió**

Az endothel sérülés helyén olyan extracelluláris mátrix molekulák érintkeznek a vérrel, mint a von Willebrand faktor és a kollagén. A trombociták adhéziója ezekhez a fehérjékhez a trombus képződés első lépése. A trombociták a von Willebrand faktorhoz a GPIIb/IX/V receptorral, a kollagénhez a GPVI receptorral kötődnek. A kötődés a trombocita aktivációját okozza, melynek során a GPIIb/IIIa receptor (fibrinogén-receptor) és az  $\alpha_2\beta_1$  kollagén receptor konformációváltozása történik meg, lehetővé téve az erősebb kötődést az extracelluláris mátrix komponenseihez (Romo et al. 1999). A folyamatok a trombocita és az endothel aktivációjához és bizonyos érfali gyulladáshoz vezetnek.

#### **Aktiváció és szekréció**

A fent részletezett adhézió aktiváló hatására megemelkedik az intracelluláris kalcium szint, mely a trombocita granulumszekrécióját váltja ki. Így lokálisan nagy koncentrációban szekretálódó ADP, trombin, és tromboxán- $A_2$  tovább aktiválják a trombocitákat. Az aktiváció autokrin és parakrin módon történik, minden agonista a saját receptorán hat, beindítva számos jelátviteli utat. Ezek közül az aktivációban legnagyobb jelentősége a foszfolipáz-C (PLC), a foszfolipáz- $A_2$  (PLA $_2$ ) enzimek aktiválódásának valamint az adenilát-cikláz enzimnek van. Az aktivációt közvetítő receptorok egy része a Gi-fehérje kapcsolt receptorok az adenilát-cikláz enzim gátlásán keresztül hatnak, így a cAMP-szintet csökkentve számos központi jelentőségű jelátviteli utat indítanak be. Ez utóbbi utat használja a P2Y $_{12}$  ADP receptor, valamint az  $\alpha_2$ -adrenerg receptor is.

#### **Aggregáció és amplifikáció**

Az aktiváció és szekréció során felszabaduló ADP két receptoron keresztül hat és váltja ki a trombocita aggregációt. A trombocita aggregációhoz a GPIIb/IIIa fibrinogén receptorok

aktiválódása szükséges. Ehhez nem elegendő egy jelátviteli út működése, párhuzamosan több rendszernek (Gq fehérje által kiváltott kalcium szint emelkedés és Gi fehérje által mediált cAMP szint csökkenés) kell aktiválnia. A két ADP receptor közül a Gq-kapcsolt P2Y<sub>1</sub> receptor aktiválódásakor csupán „shape change” és kezdeti reverzibilis aggregáció jön létre, valamint a GPIIb/IIIa receptor kezdeti átmeneti aktivációját is létrehozza (Gachet 2008). A Gi-kapcsolt P2Y<sub>12</sub> receptor által kiváltott jelátviteli események a denz granulumok szekréciójával további ADP felszabadulást hoznak létre, amplifikációt és irreverzibilis aggregációt (Jin et al. 1998). A Gi-fehérje  $\alpha$ -alegysége az adenilát-cikláz enzim aktivitását csökkenti. Így a cAMP szint, és a protein-kináz-A aktivitás csökken, ami a VASP fehérje defoszforilációjához vezet. A defoszforilált VASP a GPIIb/IIIa receptort tartósan magas affinitású állapotában tartja. A foszforilált VASP meghatározó endogén gátlója a GPIIb/IIIa receptornak. Az a jelenség, hogy a fenti intracelluláris változások a GPIIb/IIIa receptor konformációváltozását okozzák az irodalomban az „inside-out signaling” néven vált ismertté. A Gi fehérje  $\beta\gamma$ -alegysége pedig a PI3K enzimet aktiválva a denz és  $\alpha$ -granulumok szekréciójához vezet. Ez utóbbi folyamat további ADP felszabadulásával az aggregáció amplifikációjához vezet, valamint CD40L felszabaduláshoz, P-szelektin expresszióhoz, trombocita-leukocita aggregátumok létrejöttéhez vezet és fokozza az atherotrombózis helyén a lokális gyulladással reagálókat (lásd 2.ábra). Az ADP továbbá a trombin és a TXA<sub>2</sub> által létrehozott aktivációt/aggregációt is felerősíti (Storey et al. 2000). Természetesen ha két „nem-ADP receptor” hozza létre a Gq és Gi fehérjék aktivációját például a Gq-PLC utat aktiváló szerotoninreceptor és a Gi aktiváló  $\alpha$ -2<sub>A</sub> adrenoreceptor, akkor is létrejön teljes aggregáció (Jin et al. 1998).

### **A trombociták szerepe a szekunder hemosztázisban**

Az aktivált trombocita membrán az a prokoaguláns felszín, amin *in vivo* a koaguláció (szekunder hemosztázis), vagyis a trombin és fibrinképződés végbemegy. A prokoaguláns membránfelszín (más néven trombocita 3-as faktor) óriási affinitással köti meg a tenáz (aktivált IX-es faktor, aktivált VIII-as faktor, ionizált kalcium) és a protrombináz (aktivált X-es faktor, V-ös faktor, ionizált kalcium) komplexek elemeit. Az alvadási kaszkád



eredményeképpen képződő fibrin háló erősíti meg a kezdetben gyenge trombocitadús trombust.

## **1.2 A trombociták szerepe kóros körülmények között – atherosclerosis, gyulladás és atherotrombózis**

A modern szemlélet szerint a trombociták jelentik a kapcsolódási pontot az atherogenezis, a vaszkuláris gyulladás, és az atherotrombózis között. A trombociták kapcsolata az endotheliummal és a fehérvérsejtekkel olyan autokrin és parakrin gyulladásos reakciókat indíthatnak be, melyek az atherosclerosis folyamatának kezdő lépései. Ezek a gyulladásos folyamatok képezik az alapját az atherosclerotikus lézió kialakulásának, illetve az érfali struktúrák kóros átalakulásának. A későbbiekben ugyanezen gyulladásos folyamatok vezetnek az atherosclerotikus plakk vulnerabilitásának a kialakulásához, a következményes plakkruptúrához és atherotrombózishoz, mely utóbbi folyamatban szintén alapvető szerep jut a trombocitáknak. A plazmában keringő CD40L 80%-a trombocita eredetű, a trombociták nagy mennyiségben tartalmazzák és az aktivációt követő másodpercekben képesek kibocsájtani (Henn et al. 1998). Az endothelsejt felületén található CD40 molekula a CD40L kötődésekor olyan jelátviteli utakat indít be, melyek az IL-8 és az MCP-1 termelését váltják ki, az előbbi a neutrofilek az utóbbi a monociták legfőbb kemoattraktánsa. A CD40-CD40L kötődés fokozza az E-szelektin, a VCAM-1, és az ICAM-1 endotheliális expresszióját, elősegítve a gyulladásos sejtek érfalhoz való letapadását. A CD40L az endotheliális szöveti faktor expresszió fokozásával prokoaguláns hatású (Slupsky et al. 1998). A trombocita eredetű CD40L szintjét a clopidogrel kezelés jelentősen csökkenti (Hermann et al. 2001). A CD40-CD40L kapcsolat mátrix-degradáló enzimek, az MMP-k képződését is kiváltja. Az MMP-k a szöveti destrukcióban, érfali remodelingben, és az aneurizma-képződésben játszanak fő szerepet, az MMP-2 a trombociták aggregációjakor is szekretálódik (Fernandez-Patron et al. 1999). Az aktivált trombociták adhéziója elősegíti az extracelluláris mátrix degradációját azáltal, hogy fokozza az endothel sejtek MMP-9 szekrécióját. Az MMP-9 szekréciója GPIIb/IIIa fibrinogén receptor- és CD40L-függő, hiszen bármelyik gátlása csökkenti az endothel mátrix degradációs aktivitását. A GPIIb/IIIa receptor aktiválódása CD40L felszabaduláshoz

vezet akár egyéb trombocita agonista hiányában is. A CD40L tehát olyan trombocita eredetű gyulladáskeltő mediátor, melynek felszabadulása függ a GPIIb/IIIa receptor közvetítette adhéziótól. Ez utóbbi fontos pathofiziológiai mechanizmusa a szoros trombocita-endothel adhézió helyén létrejövő trombocita-mediálta lokális gyulladásnak. Emelkedett szolubilis CD40L szintet figyeltek meg instabil anginás betegekben. Mind a szolubilis, mind a membránhoz kötött CD40L emelkedett szintje anginás betegekben arra enged következtetni, hogy a CD40-CD40L interakciónak pathológiás szerepe van az atherosclerotikus folyamatokban és az akut koronária szindrómák létrejöttében (Aukrust et al. 1999). A trombociták és az atherosclerosis progressziójának kapcsolatát bizonyítja, hogy koronária vagy carotis betegség valamint a szívtranszplantáció után megfigyelhető érbetegség eseteiben emelkedett szisztémás trombocita aktivitás tapasztalható, illetve hogy ez az aktivitás az arteria carotis falvastagságával korrelál (Willoughby et al. 2002; Fateh-Moghadam et al. 2000; Koyama et al. 2003).

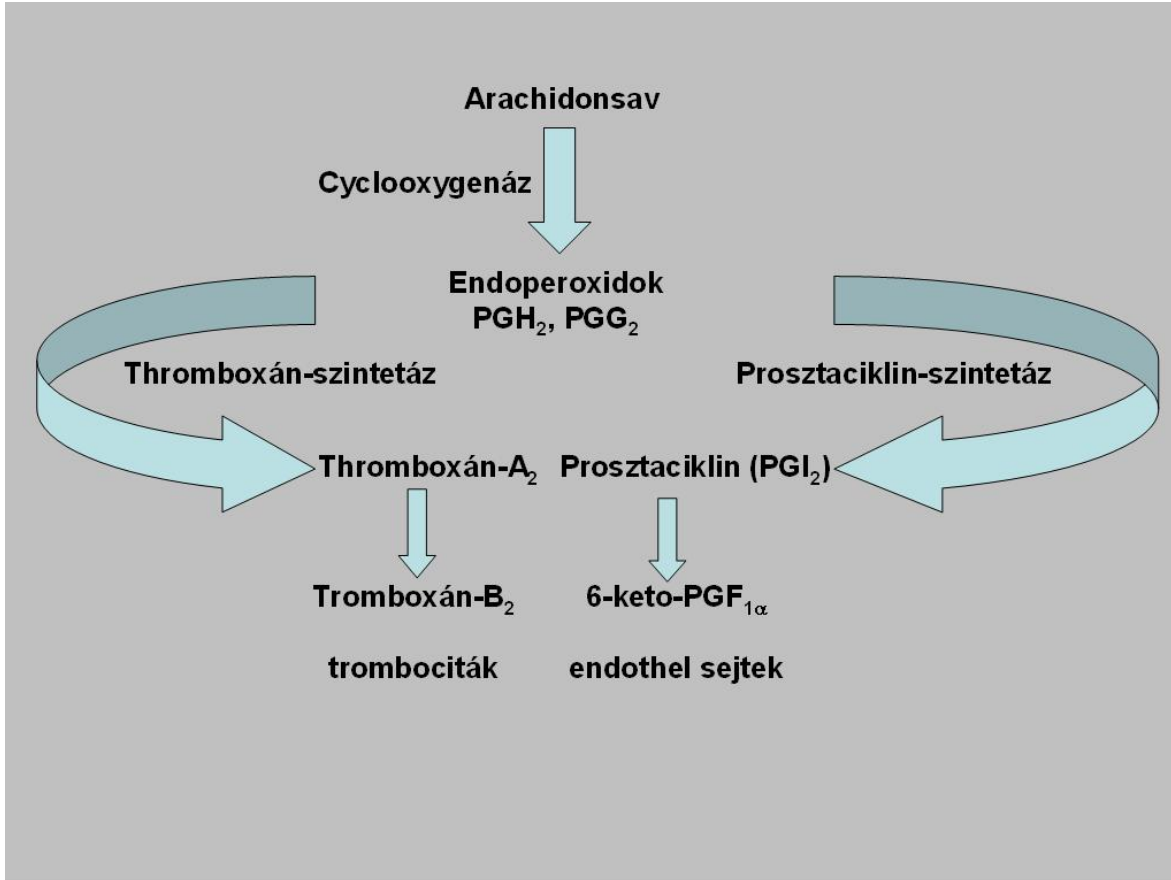
### **1.3 Trombocita gátlók**

Az atherotrombózis okozta kórképek és szövődményeik követelik a legtöbb áldozatot világszerte. A folyamat hátterében a trombocitadús vérrög kialakulása áll. A trombociták fő feladatai a hemosztázis létrejöttének a biztosítása és a sebgyógyulásban való részvétel. Kóros körülmények között azonban, mint láttuk kulcsszerepük van az atherosclerosis és a plakk vulnerabilitás kialakulásában valamint az atherotrombózisban. A hatásos trombocita gátlás ezért mind az atherosclerosis prevenciójában, mind az atherotrombózis terápiájában is kiemelt jelentőségű (Baigent et al 2009).

#### **A cyclooxygenase-1 enzim és gátlása**

A COX-1 és a COX-2 enzimek membránhoz kötött homodimereket alkotnak, arachidonsavból PGG<sub>2</sub>-n keresztül PGH<sub>2</sub>-t szintetizálnak. A PGH<sub>2</sub>-t trombocitákban található tromboxán-szintáz TXA<sub>2</sub>-vé, az endothel sejtekben található prosztaciklin-szintáz PGI<sub>2</sub>-vé (prosztaciklin) alakítja (lásd 1.ábra). A TXA<sub>2</sub> erős vazokonstriktor és a trombocita TP receptorán keresztül potens agonista, mely aggregációt vált ki, ugyanakkor a prosztaciklin az endotelium egyik legfőbb antitrombotikus hatású és aggregációgátló

vegyülete. Az egyensúly megbomlása és eltolódása a TXA<sub>2</sub> irányába az endothel diszfunkció egyik oka, mely által az endothel protrombotikus fenotípusa alakul ki.



1. ábra Az ábrán az arachidonsav eltérő metabolizmusa látszik trombocitában és endothelsejtben. Rövidítések: PGH<sub>2</sub>:prostaglandin H<sub>2</sub>; PGG<sub>2</sub>:prostaglandin G<sub>2</sub>

A COX-1 konstitutív módon jelen van számos sejtben, többek között a hemosztázist, a gyomornyálkahártya integritását és a vese véráramlását szabályozza. A COX-2 nincs jelen a sejtekben normál körülmények között, azonban gyulladásos ingerekre indukálódik. Az atherosclerotikus plakkokban emelkedett makrofág COX-2 aktivitást bizonyítottak (Schonbeck et al. 1999).

### Acetil-szalicilsav (aszpirin)

Az aszpirint Hoffmann szintetizálta 1898-ban. Az 1960-as évek végén fedezték fel vérzési időt megnyújtó és trombocita aggregációt gátló hatását (Weiss és Aledort 1967; Weiss 2003). Az aszpirin gyorsan szívódik fel a gyomorból és a vékonybélből, 50%-os biohasznosulása van, plazma csúcskoncentrációját 30-40 perc alatt éri el. Ezután a bél és a máj gyorsan metabolizálja, majd túnyomórészt a vizelettel ürül. A COX-gátló antitrombocita hatás már a portális keringésben kialakul, mielőtt az aszpirin belépne a szisztémás keringésbe. Így működik a kontrollált felszabadulású aszpirin formula, mely érintetlenül hagyja a szisztémás prosztaciklin szintézist (Clarke et al. 1991). Az aszpirin kovalensen kötődik a COX-1 és COX-2 enzimekhez, az előbbihez 50-100-szor nagyobb affinitással. Az enzim hidrofób zsebének keskeny csatornájában lévő 529. szerin aminosav hidroxil csoportját acetilálja, mely miatt az arachidonsav nem tud az enzim katalitikus aktív részéhez jutni (Loll et al. 1995). Az aszpirin a COX-2 enzimet az 516. szerin aminosavát hidroxilálva gátolja (Undas et al. 2007). Mivel a trombocitában fehérjeszintézis csak minimális mértékben történik, az arachidonsavból történő TXA<sub>2</sub>-szintézis így irreverzibilisen gátolt a trombocita élettartamára (8-10 nap). Az aszpirin féléletideje 15-20 perc, azonban a trombocita készletnek naponta csupán 10-20%-a képződik újra, így a folyamatos alacsony dózisú aszpirin terápia mellett konstans gátlás érhető el, amihez egészséges emberben napi 30mg elegendő (Patrignani et al. 1982). Világos, hogy az aszpirin ezen hatása nem lineárisan dózisfüggő, ellentétben a gasztrointesztinális toxicitással, amely viszont igen.

Az aszpirin klinikai előnyei nem magyarázhatók pusztán a COX-1 és a tromboxán bioszintézis gátlásával. Az aszpirin COX-dependens aggregáció gátló hatásán kívül van több COX-független hatása is: az egyik a trombin-képződés gátlása. A protrombináz komplex felelős a trombin képződéséért. A trombocita aktiváció gátlása egyrészt az aktivált trombocita membrán-komponens hiányán keresztül vezet a trombin képződés másodlagos gátlásához, azonban a szöveti faktor expresszió gátlása és csökkent szöveti faktor-aktivált VII-es faktor komplex aktivitás és emelkedett TFPI aktivitás is mérhető az aszpirin kezelés során, mely így a koagulációs kaszkád iniciális lépését gátolja (Osnes et al. 1996). A másik COX-független hatás a fibrinogén acetilációja, mely fokozza a trombus permeabilitását és gyorsabb fibrinolízishez vezet, valamint az aszpirin hatására az endothel fokozott

mértékben termel szöveti típusú plazminogén aktivátort (tPA), mely úgyszintén a fokozott fibrinolízis irányába hat (Undas et al. 2007).

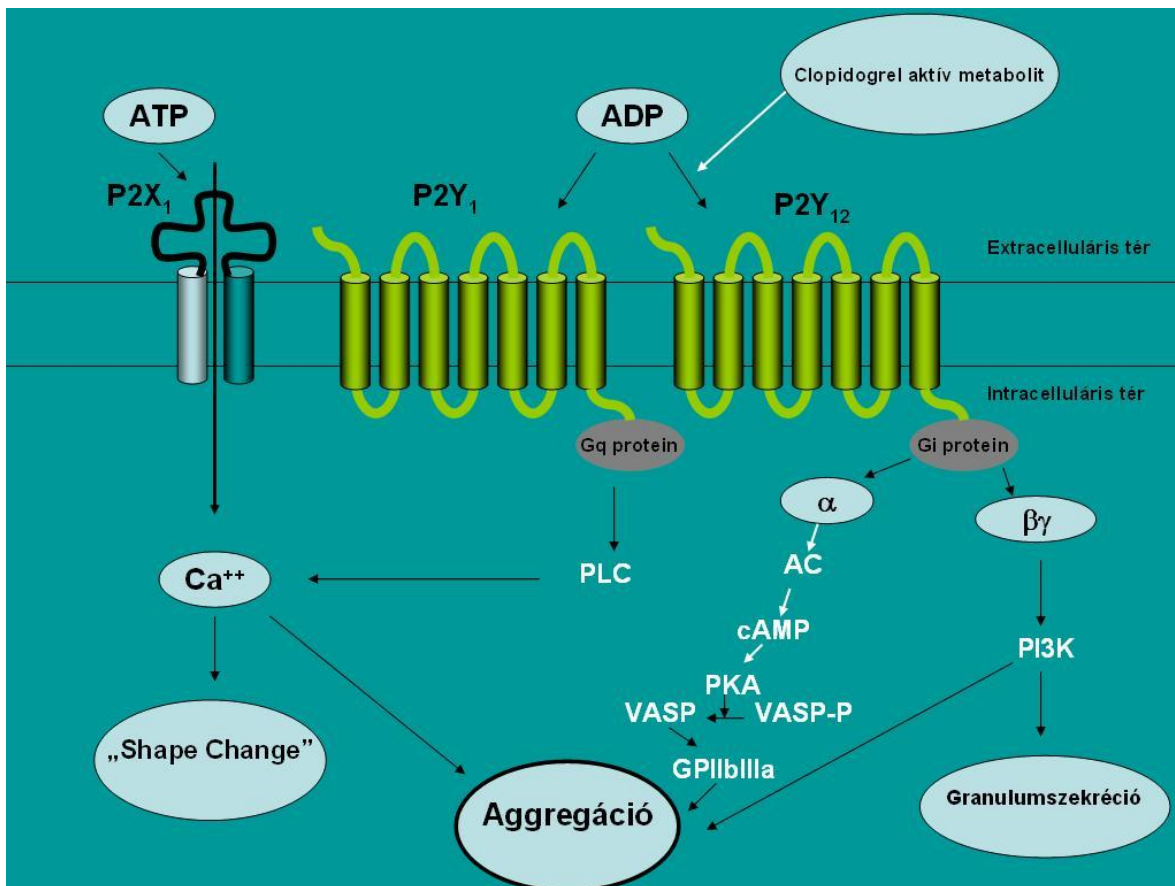
Az aszpirin gátolja a trombocitákból történő CD40L felszabadulást is (Nannizzi-Alaimo et al. 2003; Santilli et al. 2006). Az aszpirin a COX-1 peroxidáz funkcióját is gátolja, a peroxid szabadgyökök így nem inaktíválják az antitrombotikus hatású nitrogén-monoxidot (Husain et al. 1998). Az aszpirin csökkenti a trombociták és vörösvértestek membrán fluiditását, mely további változásokat idéz elő a lipid membránba ágyazott receptorok konformációiban hozzájárulva ezzel az aszpirin kedvező hatásaihoz (Winocour et al. 1992).

### **A thienopyridinek**

A trombocita purinerg P2Y<sub>12</sub> ADP-receptorának hatékony gátlása központi kérdés, hiszen az ADP a trombocita aggregáció felerősödését (amplifikáció) hozza létre, így a receptor működésképtelensége esetén nem jön létre stabil artériás trombus (Dorsam és Kunapuli 2004). A thienopyridinek a P2Y<sub>12</sub> receptor szelektív irreverzibilis gátlószerei. A bevezetésük újabb áttörés volt az atherotrombotikus kórképek kezelésében. A thienopyridin gyógyszer csoport a ticlopidint, clopidogrelt és a prasugrelt foglalja magába. A P2Y<sub>12</sub> receptor a trombocita lipid raftjaiban oligomer komplexeket képez. A thienopyridinek aktív metabolitjai a receptor rafton kívüli részéhez kapcsolódnak irreverzibilisen tönkre téve az oligomereket és a receptor jelátvitelét a trombocita élettartamára (Savi et al. 2006). A rövid életű aktív metabolitok reaktív thiol-csoportja diszulfid hídon keresztül kapcsolódik a P2Y<sub>12</sub> receptor extracelluláris domain-jéin található két cisztein reziduumhoz (cys17 és cys270). Így az ADP kötődése a P2Y<sub>12</sub> receptorhoz végérvényesen lehetetlenné válik (Gurbel és Tantry 2007; Ding et al. 2003).

Az eredményes P2Y<sub>12</sub> gátlás közvetve a CRP szintet is csökkenti a revaszkularizáció során (Vivekananthan et al. 2004). A receptor gátlása clopidogrellel úgyszintén csökkenti a trombocita-fehérvérsejt aggregátumok képződését akut koronária szindrómás betegeken (Xiao et al. 2004). A P2Y<sub>12</sub> ADP receptor effektív gátlása túl azon hogy az aggregáció stabilitását lehetetlenné teszi, dezaggregációt is okoz (Cosemans et al. 2006). A P2Y<sub>12</sub> receptor a fentiekén kívül a koagulációs kaszkád kezdő lépését is befolyásolva aktiválja a szöveti faktort (Leon et al. 2004). Valószínűleg az aktivált trombociták CD40L termelése

vezet a szöveti faktor aktivációhoz, ami a koaguláció kezdeti lépésének az aktiválását jelenti (Slupsky et al. 1998). A clopidogrel kezelés csökkenti a plazma CD40L szintet (Hermann et al. 2001; Nannizzi-Alaimo et al. 2003). A trombocita aggregáció gátlásán túl a thienopyridinek csökkentik az atherotrombotikus gyulladást és gátolják a koagulációs kaszkádot. Ez az oka ezen gyógyszercsoport átütő terápiás sikerének. Látjuk, hogy az aszpirinhez hasonlóan a thienopyridinek által létrehozott trombocita gátlás is sokrétű és kedvező folyamatokat indít el az atherotrombózis prevenciója szempontjából.



2. ábra A fenti ábrán a trombocita három purinerg receptorának intracelluláris jelátviteli útvonalai láthatóak. A teljes ADP indukálta aggregációhoz több jelátviteli út egyidejű aktivációja szükséges. A P2X<sub>1</sub> receptor egy ATP-szenzitív nem-szelektív kation csatorna, mely a trombocita „shape change”-hez járul hozzá. A P2Y<sub>1</sub> és P2Y<sub>12</sub> receptorok ADP-szenzitív G-fehérje kapcsolt 7 transzmembrán domainnel rendelkező receptorok, melyek párhuzamosan aktiválják a Gq és a Gi fehérjék által mediált jelátviteli utakat. A P2Y<sub>12</sub> receptor gátlásával a denz granulum szekréció során felszabaduló ADP aggregációt amplifikáló hatását szüntetjük meg, így nem jön létre stabil aggregátum és trombocitadús trombus. A fekete nyilak aktivációt, míg a fehér nyilak gátlást jelentenek. Rövidítések: ATP:adenozin-trifoszfát; ADP:adenozin-difoszfát;

PLC:foszfolipáz-C; AC:adenilát-cikláz; cAMP:ciklikus adenzin monofoszfát; PKA:protein kináz A; VASP:”vasodilator associated phosphoprotein”; VASP-P:foszforilált VASP; PI3K: foszfátidil-inozitol-3-kináz; GPIIbIIIa:glikoprotein IIbIIIa

### **Ticlopidin**

A ticlopidint a 70-es években fedezték fel új típusú gyulladásgátló vegyületek után kutatva. Hamar rájöttek, hogy gyulladásgátló hatása nincs, azonban erős trombocita gátló (Thebault et al. 1975). A thienopyridinek közé tartozó prodrug, melyet a hepatikus CYP2C19 enzim oxidál aktív metabolittá, ami a P2Y<sub>12</sub> receptor szelektív irreverzibilis antagonistája. A ticlopidin gátolja a hepatikus CYP2B6 enzimet. A ticlopidin szokásos dózisa napi 2x250mg. A ticlopidin szedők 2%-ában jelenik meg neutropenia, mely fatális lehet. Szintén gyakori mellékhatás a bőrkiütések megjelenése (Quinn és Fitzgerald 1999). A ticlopidinnel folytatott tanulmányok hasonló előnyt mutattak ki az aszpirinnel szemben, mint az aszpirinnel folytatott tanulmányok placeboval szemben. Balsano és mtsai instabil anginás betegekben 46.8%-os relatív rizikócsökkenést tapasztaltak 6 hónap után a ticlopidin ágon (Balsano et al. 1990). A koronária intervenció és stent beültetés során pedig a stent trombózis megelőzésében a ticlopidinnel folytatott kettős trombocita gátlás óriási előnyt hozott (Hall et al. 1996).

### **Clopidogrel**

A clopidogrel hatása megegyezik a ticlopidinével, azonban jobb mellékhatásprofilal rendelkező biztonságosabb szer. Első említése Féliste és mtsai munkája, melyben a ticlopidinnel együtt vizsgálják ADP antagonistá hatásait (Féliste et al. 1987). A clopidogrel szintén thienopyridin prodrug, 85%-a észterázok által inaktív metabolitokká alakul és csak 15%-a alakul a májban a CYP3A4 és CYP3A5 enzimek segítségével előbb 2-oxo vegyületté, majd a CYP2C19 enzim segítségével aktív metabolittá (carboxylált származék, SR-26334). Az aktív metabolit féléletideje 8 óra és ez kötődik irreverzibilisen thiol csoportjával a P2Y<sub>12</sub> receptorhoz.

Általánosságban elmondható, hogy a clopidogrel és a thienopyridin alapú kettős trombocita gátlás megjelenése tette lehetővé az invazív kardiológia diadalmenetét, mivel nagyrészt

kiküszöbölte az angioplasztika és a stentek által létrehozott extrém trombotikus terhelés káros következményeit.

### **Cangrelor (AR-C69931MX)**

A cangrelor egy ATP analóg vegyület, mely a ma ismert legerősebb és legszelektívebb gátlószere a P2Y<sub>12</sub> receptornak. Felezési ideje *in vivo* percekben mérhető, a kiindulási trombocita funkció egy órán belül teljesen helyreáll. A cangrelor a thienopyridinek által nem gátolt reziduális P2Y<sub>12</sub> receptorok gátlásával több kutatócsoport szerint is használható a thienopyridin rezisztencia pontos felmérésére (Aleil et al. 2005; Béres et al. 2008). A CHAMPION-PCI tanulmány során a cangrelort a GPIIb/IIIa gátló abciximabbal hasonlították össze a 7 napon belüli adverz események szempontjából pozitív eredményekkel (Fugate et al. 2006; Greenbaum et al. 2006). A cangrelor helye a terápiában még nem alakult ki, de azonnali hatásbeállása és extrém rövid felezési ideje miatt valószínűleg az akut koronária szindróma intervenciós kezelése során, valamint az akutan sebészi revaszkularizációs terápiára kerülő betegek esetében lehet rendkívül hasznos.

#### **1.4 A trombocita gátlószer „rezisztencia”**

A trombocita gátló terápia melletti „magas trombocita reaktivitás” fogalmát a rezisztencia jelenségének könnyebb megértése miatt érdemes bevezetni. Adódik a kérdés, hogy az említett jelenség egy pathológiás állapot vagy egy laboratóriumi metodikától függően mért paraméter. További kérdés, hogy mi köze van a trombocita funkciós hatás-rezisztencia méréseknek az adverz kardiovaszkuláris klinikai eseményekhez. Az alábbiakban néhány fogalmat említünk a gátlószer rezisztenciával kapcsolatban.

A farmakokinetikai rezisztencia azt jelenti, hogy a beadott gyógyszer valamilyen oknál fogva nem éri el a hatáshoz szükséges koncentrációt a célpontja (COX-1 enzim vagy P2Y<sub>12</sub> receptor) közelében.

A farmakodinamikai rezisztencia azt jelenti, hogy az elérni kívánt hatás a megfelelő helyen kialakuló megfelelő gyógyszer koncentráció ellenére valamilyen okból nem jön létre és ezt egy a célpontra specifikus teszttel mérni tudjuk.



A terápiás kudarc („treatment failure”) azt jelenti, hogy egy adott gyógyszer valamilyen oknál fogva nem éri el a kívánt klinikai hatást. A terápiás kudarc ebben az esetben a rekurráló atherotrombotikus eseményeket, például a koronária stent trombózist jelentheti. Az atherotrombózis egy multifaktoriális betegség, így számos egyéb faktor játszhat szerepet, például a stent trombózisnak gyakran mechanikai oka van. A rezisztencia továbbá egy időben változó jelenség, melynek számos oka lehet, a korábban effektív antitrombocita szer hatás ellenére kialakulhat.

Számos többé-kevésbé specifikus metodikával mérhetjük az antitrombocita szerek hatását illetve a rezisztencia mértékét, mégis jelen pillanatban a fényáteresztésen alapuló Born-féle trombocita aggregometria a széleskörben elfogadott és használatos „gold standard” (Lordkipanidzé et al. 2007). A hivatalosan elfogadott irányelvek szerint a koronária stent trombózison átesett betegek esetében elfogadott a clopidogrel hatás monitorozása aggregometriával és hatástalanság esetén a terápia módosítása is, más esetben azonban nem lehet az aggregometria klinikai döntéshozatal alapja (Smith et al. 2006).

### **Az „aszpirin rezisztencia” klinikai jelentősége**

Eikelboom és mtsai tanulmányában a magasabb vizelet 11-dehidro-tromboxán- $B_2$  szintű betegek kvartilisében 1.8-szoros rizikó volt miokardiális infarktusra, stroke-ra, vagy kardiovaszkuláris halálra. Gum és mtsai randomizált prospektív vizsgálatban bizonyították 326 aszpirinszedő betegen, hogy az optikai aggregometriával rezisztensnek bizonyuló – a populáció mindössze 5%-át kitevő - betegeknek közel háromszoros esélyük volt az utánkövetés alatt a halálra, miokardiális infarktusra, vagy stroke-ra (Gum et al. 2003). Chen és mtsai az „aszpirin rezisztencia” és az elektív perkután koronária intervenció után kialakuló szívműködés mértékének összefüggését bizonyították 151 betegen. A betegek 300mg clopidogrelt kaptak 12 órával a beavatkozás előtt és a beavatkozás reggelén 75mg-ot. A betegek 19.2%-a bizonyult „aszpirin rezisztensnek” és a troponinemelkedéssel mért szívműködés esélye ebben a csoportban szignifikánsan magasabb volt (51.7% versus 24.6%) (Chen et al. 2004). A jelenség pontatlan definíciója, valamint a mérésére használt számtalan metodika miatt az „aszpirin rezisztencia” prevalenciája a szakirodalom szerint 5-45% (Wang et al 2006). A jelenleg érvényes irányelvek nem ajánlják az aszpirin

hatás vagy rezisztencia mérését, még kevésbé, hogy klinikai döntéshozatal szülessen aggregometriás eredmény alapján (Smith et al. 2006).

### **Aszpirin rezisztencia mechanizmusok - farmakokinetikai okok**

#### **„Non-compliance”**

Egy vizsgálatban kérdőívvel és szérumban TXB<sub>2</sub> mérésekkel alátámasztottan a betegek 16%-ában volt rossz „compliance”, mely négyszeres halálozási, re-infarktus és re-hospitalizációs rizikót jelentett 1 éves utánkövetés alatt (Cotter et al. 2004). Egy másik vizsgálatban az aszpirin megvonása összefüggést mutatott a bármilyen akut koronária szindróma miatti hospitalizációval és a késői stent trombozissal (Ferrari et al. 2005).

#### **Elégtelen dózis**

Az aszpirin trombocita gátló hatása nem lineárisan dóziszfüggő, atherosclerosisban és atherotrombozissal az egészséges állapotban hatásos napi 30mg nem feltétlenül biztosít megfelelő tromboxán-produkció gátlást (Maree et al. 2005). A szekunder prevenció ajánlásokban szereplő napi 81-162mg-nál magasabb dózisok azonban nem hoztak további klinikai előnyt, viszont a gasztrointesztinális mellékhatások megjelenésével jártak (Antithrombotic Trialists' Collaboration 2002).

#### **Nem megfelelő aszpirin formula**

A hagyományos aszpirin egy gyenge sav ezért a gyomorban nem deacetilálódik, lipid oldékony marad és gyorsan felszívódik. Az aszpirin endotheliumra kifejtett káros prosztaciklin-szintézis-gátló hatásától a hepatikus észterázok védik a szervezetet (Pedersen és FitzGerald 1984). A kontrollált felszabadulású formulát azért fejlesztették ki, hogy az aszpirin csak a portális keringésben hasson, így érintetlenül hagyva a szisztémás keringésben a PGI<sub>2</sub> termelést (Clarke et al. 1991). Az „enteric-coated” formula csak 2-4 óra múlva éri el csúcspozmá koncentrációját, a bél neutrális pH-ján kisebb biohasznosulása és lassabb felszívódása van (Maree et al. 2005; Cox et al. 2006). Evidens módon az akut szituációkban ezért nem használható.

### **Gyógyszerinterakciók**

Olyan nem-szteroid gyulladásgátló COX-inhibitorok, melyek reverzibilis módon gátolják a COX-1 enzimet, elfoglalják az enzim aszpirin kötőhelyét. Ilyen gyógyszer például az ibuprofen vagy a naproxen (Catella-Lawson et al. 2001). A 2004-es ACC/AHA STEMI ajánlásba is bekerült, hogy STEMI-n átesett betegek nem célszerű ibuprofent adni, mert az blokkolhatja az aszpirin trombocita gátló hatását (Antman et al. 2004); Gislason és mtsai tanulmánya szerint az ilyen betegekben a szelektív COX-2 inhibitorok bármilyen dózisban, a nem-szelektív COX-inhibitorok magas dózisban fokozzák a reinfarktusz előfordulásának az esélyét és a mortalitást (Gislason et al. 2006).

### **Aszpirin rezisztencia mechanizmusok - farmakodinamikai okok**

#### **Hipercholesterolaemia**

Korábban említettük az aszpirin szerepét a trombin képződés gátlásában. Szczeplik és mtsai mutatták ki, hogy az aszpirin ezen hatása az emelkedett koleszterinszint hatására eltűnik (Szczeplik et al. 1996). Így a magas koleszterin szint az „aszpirin rezisztencia” egyik oka lehet. A sztatinok és az alacsony dózisú aszpirin kombinációja szinergisztikusan gátolja az *in vivo* trombin-képződést, akkor is ha csak kismértékben emelkedett a koleszterin szint (Musial et al. 2001).

#### **Diabétesz**

Cohen és mtsai mutatták ki a diabéteszes anyagcsere állapot az elhízás és az „aszpirin rezisztencia” közötti kapcsolatot. A PFA-100-zal mért „aszpirin rezisztencia” a HbA1c-vel és a testtömegindexszel korrelált (Cohen et al. 2008).

#### **Oxidatív stressz**

Az oxidatív stressz során képződő arachidonsav metabolitok (8-epi-PGF<sub>2α</sub>) nem enzimatis, tehát COX-független úton termelődnek és aktiválják a trombocita TP-receptorokat (Catella et al. 1995; Davi et al. 2002; Csiszár et al. 2002).

### **Aszpirin-inszenzitív TXA<sub>2</sub> képződés, COX-1 regeneráció, COX-2 indukció, emelkedett trombocita „turnover”**

Az atherosclerotikus léziókban gyulladásosejtek vannak, melyek COX-2-t expresszálnak. Leírták a frissen képződő és keringésbe kerülő trombociták (fokozott „turnover”) COX-2 aktivitását is, mint az aszpirin rezisztencia egy lehetséges mechanizmusát (Weber et al. 1999). A leukocytá-trombocita aggregátumokban, melyek jellemző elemei az atherotrombotikus gyulladásosejteknek, transzcelluláris úton képződő arachidonsav metabolitok aktiválhatják a trombocitákat (Schonbeck et al. 1999). Koronária bypass műtétet követően Zimmermann és mtsai írtak le az aszpirin terápia ellenére fokozottan képződő tromboxán metabolitokat (Zimmermann et al. 2003). Denis és mtsai bizonyították, hogy az anukleáris trombociták a korábbi elképzelésekkel ellentétben képesek *de novo* COX-1 szintézisre is, és ezáltal bizonyos mértékben az effektív aszpirin gátlás után, regenerációra is (Denis et al. 2005). A korábban Fitzgerald és mtsai által leírt tézist, miszerint a krónikus aszpirin kezelés során a rezisztencia az idő elteltével párhuzamosan kifejlődhet, ez a fenti mechanizmus alátámaszthatja (FitzGerald et al. 1983). A COX-1 gátlás ellenére - transzcelluláris úton - képződő TXA<sub>2</sub> a diszfunkcionális, gyulladt vaszkuláris endothel illetve a trombocita-leukocita aggregátumokban jöhet létre. Így az atherotrombotikus kórképekben, az antitrombocita terápia ellenére - áthidalva a trombocita működésképtelen COX-1 enzimét -, képződik TXA<sub>2</sub> és így a TP-receptoron keresztül képesek aktiválódni a trombociták (Cipollone et al. 2000). Koronária betegekben az aszpirin gátlás ellenére termelődő tromboxán metabolitok szérumban és vizeletben mérhető szintjei korrelálnak a kardiovaszkuláris halálozás rizikójával, ezt Eikelboom és mtsai bizonyították (Eikelboom et al. 2002). Egy TP-receptor antagonistá vegyülettel (S18886) sikerült stent trombólízis állatmodellben olyan gyors trombocita gátlást elérni, mely egyenértékű volt az aszpirin+clopidogrel terápiával, azonban míg az utóbbi szignifikánsan megnyújtotta a vérzési időt az új vegyület nem (Vilahrut et al. 2007).

### **A COX-1 polimorfizmusai**

Szerepet játszhatnak az aszpirin hatásának variabilitásában, melynek mechanizmusa nem tisztázott (Maree et al. 2005). Egy tanulmányban a COX-1 és a GPVI kollagén receptorok

polimorfizmusai koronária betegek arachidonsav indukálta trombocita aggregációival illetve a PFA-100 módszerrel mért „aszpirin rezisztenciával” összefüggést mutattak (Lepántalo et al. 2006).

### **A GPIIb/IIIa receptor polimorfizmusa**

A PIA2 allélt hordozók kevésbé érzékenyek az aszpirin antitrombotikus hatására. A polimorfizmus a fehérek 20%-ában van jelen. Weiss és mtsai közölték, hogy a polimorfizmus akut koronária szindrómás betegekben szignifikánsan gyakoribb (2.1-szeres prevalencia). A konklúzió szerint a polimorfizmust hordozóknak 2.8-szoros rizikójuk van koronária trombózist kapni, míg ha 60 év alattiak akkor ez a rizikó 6.2-szeres (Weiss et al. 1996). A GPIIb/IIIa polimorfizmusa és az „aszpirin rezisztencia” közötti kapcsolatot Papp és mtsai közölték; a tanulmány arra enged következtetni, hogy a thienopyridin terápiának nagy előnye lehet ezen polimorfizmust hordozó betegekben. Tanulmányukban, ahol 158 akut koronária szindrómás és 199 egészséges kontroll egyént hasonlítottak össze, az összes PIA2 allélre homozigóta egyénben alacsony aszpirin hatás volt mérhető (Papp et al. 2005).

### **A XIII-as faktor polimorfizmusa**

A XIII-as faktor „Val34Leu” polimorfizmusa esetében csökkent kardiovaszkuláris rizikót írtak le. A polimorfizmus esetében, mely a populáció 25%-ában van jelen, a miokardiális infarktusra való esély kisebb, annak ellenére, hogy ez a XIII-as faktor gyorsabb trombin általi aktivációjával jár (Ariens et al. 2000; Ariens et al. 2002). Korábban említésre került, hogy az aszpirin acetilálja a fibrinogént, melyre ezáltal jobban hatnak a fibrinolízis enzimei, így befolyásolva a fibrin keresztkötéseket. A XIII-as faktor polimorfizmusát hordozók esetében a trombin-képződés aszpirin általi gátlása nem különbözött a nem hordozókéétól, de az aszpirin a XIII-as faktor aktivációját viszont erősebben gátolta. Valószínűleg a polimorfizmust hordozók esetében az aszpirin antitrombotikus hatása a fentiek miatt kifejezettebb és a kisebb kardiovaszkuláris morbiditás is ennek köszönhető (Undas et al. 2003).

### **Tromboxán-receptor polimorfizmusok**

A gátlószerekre mutatott hatás-variabilitás okai lehetnek a TXA<sub>2</sub> receptor polimorfizmusai is. Fontana és mtsai 100 egészséges önkéntesen végzett trombocita aggregációs és áramlási citometriás vizsgálatokat, valamint TP-receptor genetikai analízist. 5 mutációt találtak, melyek közül 3 összefüggésben volt a trombocita funkciók tesztekkel (P-szelektin expresszió és TP-agonista által kiváltott szekréció/aggregáció) (Fontana et al. 2006).

### **Katecholaminok**

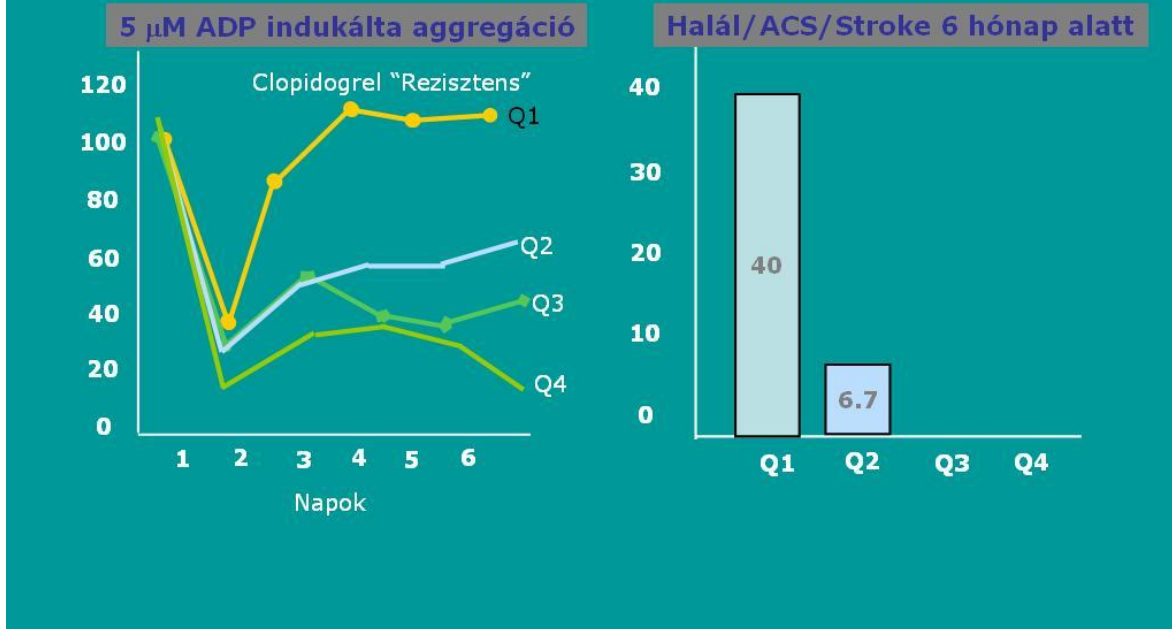
Li és mtsai 15 egészséges egyénen igazolták a fizikai megterhelés protrombotikus hatását valamint, hogy az 1 hétig tartó napi 500mg aszpirin előkezelés ezt nem befolyásolta érdemben (Li et al. 1999). Christiaens és mtsai 50 aszpirint szedő stabil koronária beteget vizsgáltak PFA-100 metodikával. A betegek 20%-át találták rezisztensnek. Ha a betegeket fizikai aktivitásnak tették ki, a korábban rezponder betegek 22%-a vált „aszpirin rezisztenssé”. A fizikai terhelés mértéke nem függött össze a rezisztenciával. A jelenség oka lehet a megnövekedett „shear stress” vagy az emelkedett szerotonin és katecholamin szintek által indukált trombocita aktiváció (Christiaens et al. 2002).

### **A thienopyridin „rezisztencia” klinikai jelentősége**

A különböző tanulmányok 4-30%-os prevalenciát írnak le a vizsgáló metodikától függően (Nguyen et al. 2005). A clopidogrellel folytatott tanulmányok során korán rájöttek, hogy hatásának - az aszpirinéhez hasonlóan - nagy a betegek közötti variabilitása. Túl azon azonban, hogy a clopidogrel csökkent hatékonysága mérhető különböző funkcionális laboratóriumi módszerekkel (gyógyszer rezisztencia), korán megfigyelték, hogy a rekurráló atherotrombotikus események összefüggésbe hozhatóak a csökkent terápiás válasszal (terápiás kudarc). A gyógyszer rezisztencia és a terápiás kudarc összefüggéséről készült egyik tanulmány Matetzky és mtsaié (Matetzky et al. 2004) (lásd 3.ábra).

# Clopidogrel “rezisztencia” ?

N = 60 STEMI beteg primer PCI



3.ábra Az ábrán látható tanulmányban Matetzky és mtsai 60 STEMI-n majd primer PCI-n átesett beteget osztottak kvartilisekbe az ADP indukálta trombocita aggregáció alapján; a legmagasabb kvartilist clopidogrel rezisztensnek nyilvánították. Ebben a betegcsoportban az ábrán látható kemény kardiovaszkuláris végpontok fél év alatt 40%-ban fordultak elő szemben a harmadik kvartilis 6.7%-ával és a két alacsonyabb kvartilis 0%-ával (Matetzky et al. 2004). Rövidítések: PCI:perkután koronária intervenció; STEMI: ST-elevációs miokardiális infarktus; ACS: akut koronária szindróma

A tanulmányok többsége pozitív korrelációt ír le a thienopyridin rezisztencia és a major adverz kardiovaszkuláris végpontok között (lásd 1.táblázat), kivétel Mobley és mtsai tanulmánya ahol nem találtak szignifikáns összefüggést (Mobley et al. 2004). Wenaweser és mtsai 82 betegen bizonyították a stent trombozisz és az aspirin rezisztencia kapcsolatát. Érdekes, hogy ebben a tanulmányban a clopidogrel rezisztencia prevalenciája nem különbözött a stent trombozisos és a kontroll csoport között, bár a clopidogrel szedése szignifikánsan alacsonyabb aggregációs értékekkel járt (Wenaweser et al. 2005). Gurbel és mtsai leírják, hogy a trombelasztográffal mérhető „clot strength” - ami a trombus szilárdságára utal – prediktív értéke a PCI-n átesett betegek rekurráló iszkémiás epizódjait

tekintve nagyobb az ADP indukálta trombocita aggregációénál. Ebben a tanulmányban 192 PCI-n átesett aszpirin és clopidogrel szedő esetében fél év utánkövetési idő alatt 38 major esemény fordult elő. Az ADP indukálta trombocita aggregáció felső kvartilisében 32%-os eseményrátaival szemben a trombelasztográffal mért trombus szilárdság felső kvartilisében ez 58% volt (Gurbel et al. 2005). Ajzenberg és mtsai írják le, hogy a stent trombózis az aszpirin és clopidogrel szedők hozzávetőlegesen 1%-ában fordul elő (Ajzenberg et al. 2005). A stent trombózis halálozása 45% körüli. Cuisset és mtsai közölték le, hogy a terápia melletti magas trombocita aktivitás esetén nem-ST-elevációs akut koronária szindrómás betegek intervenciója után gyakrabban fordul elő periprocedurális miokardiális infarktus és emelkedett nekroenzim szint (Cuisset et al. 2007). Frere és mtsai pedig szintén nem-ST-elevációs akut koronária szindrómás betegeken igazolták az ADP indukálta trombocita aggregáció és az áramlási citometriával mért VASP-foszforiláció jó prediktív értékét a visszatérő atherotrombotikus major események tekintetében (Frere et al. 2007).

1. táblázat. Az alábbi táblázat a clopidogrel rezisztencia és az atherotrombotikus események összefüggéséről szóló főbb tanulmányokat foglalja össze

Tanulmány-év	Beteganyag	Clopidogrel dózis	Labormetodika a rezisztencia detektálására	Klinikai kimenetel a clopidogrel rezisztenciával összefüggésben
Barragan et al. 2003	16 stent trombózisos beteg versus 30 stentelt beteg Nő:26% Átlagéletkor:67év	Napi 2x75mg vagy napi 2x250mg ticlopidin	Áramlási citometria VASP-foszforiláció („platelet reactivity index”) Nem határozott meg rezisztencia-kritériumot	„Platelet reactivity index” stent trombózis versus nincs stent trombózis (63.28%±9.56% vs 39.8±10.9%; p<0.0001)
Mobley et al. 2004	PCI-n átesett betegek N=50 Nő:20% Átlagéletkor:58év Utánkövetési idő:6 hónap	Napi 75mg fenntartó 300mg telítő dózis a kezelőorvos döntése alapján	Aggregometria 1µM ADP-vel, trombelasztográf és PlateletWorks. Rezisztencia: kisebb mint 10% csökkenés a kiindulási értékhez képest. A betegek 30%-a non-reszponder	Nem talált összefüggést a rezisztencia és a major adverz események közt.
Matetzky et al. 2004	STEMI miatt primer	300mg telítő dózis	Aggregometria 5µM	Atherotrombotikus



Tanulmány-év	Beteganyag	Clopidogrel dózis	Labormetodika a rezisztencia detektálására	Klinikai kimenetel a clopidogrel rezisztenciával összefüggésben
	PCI-n átesett betegek N=60 Nő:20% Átlagéletkor:58év Utánkövetési idő:6 hónap	poszt-PCI és 3 hónapig napi 75mg fenntartó	ADP-vel, legmagasabb kvartilis rezisztens, a másik három reszponder	események 40% versus 6.7% p=0.007
Gurbel et al. 2005	PCI-n átesett betegek N=192 Nő:44% Átlagéletkor:61év Utánkövetési idő:6 hónap	300 mg vagy 600 mg telítő dózis majd napi 75 mg fenntartó	Aggregometria 5 és 20 $\mu$ M ADP-vel Trombelasztográf Legmagasabb kvartilis rezisztens, a többi reszponder	Ischémiás események ADP indukálta aggregáció (63 $\pm$ 12% versus 56 $\pm$ 15%; p=0.02) Trombus szilárdság (74 $\pm$ 5 mm versus 65 $\pm$ 4 mm, p<0.001) Fibrinképződésig eltelt idő (4.3 $\pm$ 1.3 perc versus 5.9 $\pm$ 1.5 perc; p<0.001)
Ajzenberg et al. 2005	Stent trombózis versus stent trombózis hiánya N=32 (10 stent trombózis) Nő:85% Átlagéletkor:58év	Napi 75mg négy napig a PCI előtt vagy 300 mg telítő dózis a PCI napján, majd napi 75 mg fenntartó legalább 1 hónapig	ADP indukálta trombocita aggregáció (rezisztencia a 45%-nál nagyobb aggregáció) „Shear” indukálta trombocita aggregáció mérése speciális eszközzel	Shear 200 S <sup>-1</sup> (40.9 $\pm$ 12.2% vs 18.2 $\pm$ 18%; p=0.013) Shear 4000 S <sup>-1</sup> (57.4 $\pm$ 16.4% vs 23.4 $\pm$ 21.2%; p=0.009)
Gurbel et al. 2005	Stent trombózis versus stent trombózis hiánya N=120 (20 stent trombózis) Nő:43% Átlagéletkor:63év	Napi 75 mg $\pm$ 300 mg telítő dózis	Aggregometria 5 és 20 $\mu$ M ADP-vel; P2Y <sub>12</sub> reaktivitás index (%) VASP foszforilációval; Aktivált GPIIb/IIIa expresszió áramlási citometriával A stent trombózis nélküli csoport ADP indukálta aggregációjának legmagasabb kvartilise a rezisztencia-kritérium .	Aggregáció 5 $\mu$ M ADP-vel (49 $\pm$ 4% versus 33 $\pm$ 2%; p<0.05) és 20 $\mu$ M ADP-vel (65 $\pm$ 3% versus 51 $\pm$ 2%; p<0.001) P2Y <sub>12</sub> reaktivitás index (69 $\pm$ 5% versus 46 $\pm$ 9%; p=0.03) Átlagos fluoreszcencia intenzitás aktivált GPIIb/IIIa expresszióra (138 $\pm$ 19 versus 42 $\pm$ 4; p<0.001)

### **Thienopyridin „rezisztencia” mechanizmusok - farmakokinetikai okok**

#### **„Non-compliance”**

Különösen a gyógyszerkibocsájtó stentek (DES) korában a thienopyridin alapú kettős trombocitagátlás korai megszakítása például nem megfelelő felvilágosítás, rossz anyagi helyzet vagy egyéb pszichoszociális okok miatt életveszélyes. A „non-compliance” követése kérdőívvel, trombocita funkciós teszttel vagy a clopidogrel aktív metabolit plazmaszint mérésével történhet. A PREMIER tanulmány 19 centrum 500 DES-beültetésen átesett posztinfarktusos betegén vizsgálta a thienopyridin „non-compliance” prevalenciáját kérdőív segítségével. 30 nappal az elbocsájtás után a betegek 13.6%-a nem szedte a clopidogrelt vagy ticlopidint (n=68). Ez a betegcsoport idősebb, iskolai végzettségét tekintve kevésbé képzett, ritkábban házas, gyakrabban kerül az egészségügyi ellátást a felmerülő költségek miatt, és gyakrabban volt már meglévő kardiovaszkuláris megbetegedése vagy anaemiája az index esemény előtt. A betegek kevesebb felvilágosítást kaptak elbocsájtásuk előtt és ritkábban vettek részt rehabilitáción. Az ezt követő 11 hónap során ezen betegcsoport halálozása szignifikánsan magasabb volt 7.5% versus 0.7% és hospitalizációs igénye pedig 23% versus 14% volt (Spertus et al. 2006).

#### **Elégtelen vagy nem megfelelő clopidogrel dózis**

A clopidogrel dóziszfüggően befolyásolja az ADP indukálta trombocita aggregációt, a trombocita-leukocita aggregátumok képződését, a trombocita P-szelektin expressziót, a VASP-foszforilációt, a CD40L felszabadulást, mely által másodlagosan csökkenti az atherotrombotikus gyulladásos folyamatokat. Az elérni kívánt cél a trombocitadús trombus képződés és az atherotrombózis prevenciója. A clopidogrel dózis emelésével a hatás beállása is gyorsabb, a szer kinetikája dóziszfüggő. Sürgősségi szituációban, amilyen az atherotrombózis, ez nagyon fontos lehet. Három tanulmányban is igazolták a 600mg-os telítő dózisu clopidogrel előnyét a 300mg-mal szemben percután koronária intervenció esetén.

Az ARMYDA-2 volt az első, ahol 255 beteg percután koronária intervenciója előtt 4-8 órával adott telítő dózisu clopidogrel - 300mg versus 600mg – esetében igazolták a 600mg-

os ág előnyét és biztonságosságát, és mintegy 50%-os relatív rizikó csökkenést értek el miokardiális infarktus tekintetében. Ugyanebben a tanulmányban azoknál a 600mg-os ágba randomizált betegeknél, akik sztatint készítményt is kaptak a relatív rizikó csökkenés mintegy 80%-os volt (Patti et al. 2005).

Az ALBION-tanulmányban 103 nem-ST-elevációs akut koronária szindrómás betegen vizsgálták a clopidogrel 300mg-os, 600mg-os és 900mg-os telítő dózisainak hatásait. Minden beteg aszpirin terápiát és terápiás dózisú LMWH-t kapott. A 300mg csoportban a maximális aggregáció gátlás 6 órával a telítő dózis beadása után volt mérhető; magasabb telítő dózisok esetén minden vizsgált időpontban szignifikánsan nagyobb aggregáció gátlás volt mérhető. A clopidogrel trombotagató hatása tehát dózis és időfüggő. Érdekes, hogy a magasabb dózisok erőteljesebb gátló hatása 24 óránál is megfigyelhető volt. A 900mg-os telítő dózis 2 óra alatt olyan mértékű aggregáció gátlást hoz létre, mint a 300mg-os dózis csúcshatása. A 600mg-os telítődózis hatása a beadás után 4 óránál válik el statisztikailag szignifikánsan a 300mg-os dóziséétől. Ugyanakkor, bár eltérő mértékű, de a csúcshatás minden telítő dózis esetében 5-6 óránál a beadás után jelentkezett. Ha a betegek troponin-szintjét vizsgálták, trend mutatkozott a magasabb telítő dózisok előnyére a miokardiális nekrosis megelőzésében, de ez statisztikailag nem bizonyult szignifikánsnak (Montalescot et al. 2006).

Az ISAR-CHOICE vizsgálat célja volt megvizsgálni, van-e további előnye a 900mg-os telítő dózisú clopidogrelnek a 300 illetve 600mg-hoz képest. Ebben a vizsgálatban a tromboticita aggregáció gátláson túl vizsgálták a clopidogrelnek és aktív metabolitjának plazmaszintjeit is. Azt tapasztalták, hogy a 600mg-os telítő dózis hasonlóképpen az ALBION tanulmányban közltekhez szignifikánsan erősebb aggregáció gátlást hozott létre, valamint az aktív metabolit plazmaszintje magasabb volt. 900mg-os dózis beadása viszont nem járt további szignifikáns aggregáció gátlással, és ami a legfontosabb, sem az aktív metabolit sem a clopidogrel plazmaszintje nem volt szignifikánsan magasabb. A konklúzió tehát, hogy a 600mg feletti egyszeri telítő dózisú clopidogrel az intesztinális abszorpció telítődése miatt nem jár további előnyökkel (von Beckerath et al. 2005).

A jelenlegi ajánlások szerint nem engedhető meg a clopidogrel dózisának módosítása tromboticita aggregometriás eredmény alapján. A 2005-ben kiadott ACC/AHA ajánlás

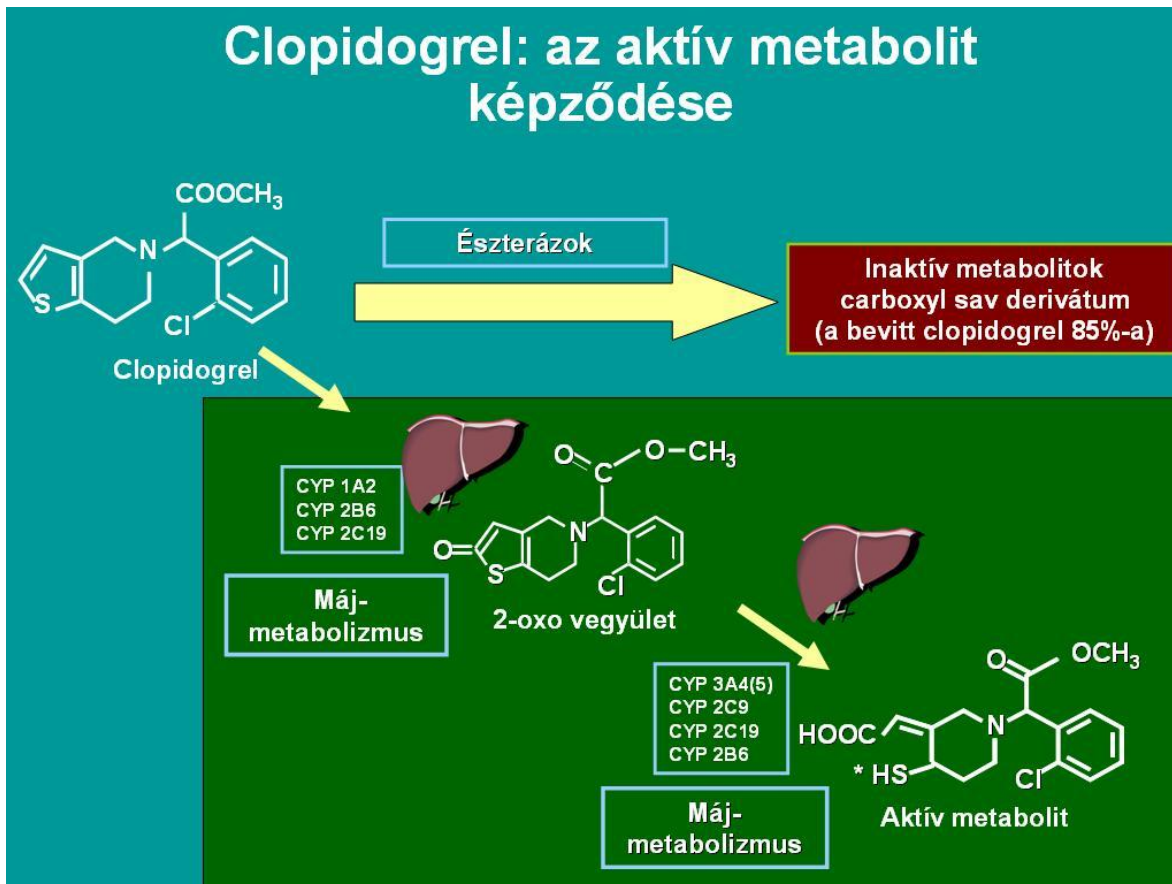
azonban stent trombózis esetén II/B ajánlással C evidenciaszinttel javasolja a thienopyridin terápia módosítását, ha a stent trombózison átesett beteg aggregometria alapján rezisztensnek bizonyul (Smith et al. 2006).

### **P-glikoprotein efflux pumpa**

A bélhámsejteken található P-glikoprotein az orálisan adagolt clopidogrel felszívódásában szerepet játszik. Ez a fehérje a multidrog transzporterek családjába tartozik, az MDR1 gén kódolja, feladata, hogy különböző vegyületeket pumpál ki a sejtekből, így a szervezet egyik természetes védő mechanizmusa. Az MDR1 3435T/T homozigótáknak szignifikánsan alacsonyabb clopidogrel aktív metabolit szintjük volt a 300mg-os és 600mg-os dózis után az MDR1 3435C/T heterozigótákhoz és az MDR1 3435C/C homozigótákhoz képest. 900mg-os telítés után nem volt szignifikáns különbség (Taubert et al. 2006).

### **Gyógyszerinterakciók**

A thienopyridinek pro-drugok, melyeknek aktív többlépéses májmetabolizáción kell átesni ahhoz, hogy kialakuljon a P2Y<sub>12</sub> receptor gátló aktív metabolit. A ticlopidin aktív metabolitja a CYP2C19 enzim, a clopidogrelé a CYP3A4 enzim segítségével jön létre.



4. ábra A fenti ábrán a pro-drug clopidogrel *in vivo* metabolizmusa látszik, az ebben résztvevő enzimek, valamint a thiolcsoportot hordozó aktív metabolit képződése. A metabolizáció első lépése a vérben történik nem-specifikus észterázok segítségével, ezt követően a májban folytatódik.

Mivel az aktív metabolit képződéséhez a CYP3A enzimek szükségesek (lásd 4.ábra), melyek sokféle gyógyszer metabolizmusában vesznek részt, felmerül a gyógyszerinterakció szerepe a clopidogrel rezisztencia kialakulásában. Az egyik ilyen gyógyszercsoport a sztatin készítmények. A clopidogrel oxidációban legfontosabb szerepe a CYP3A4 és 3A5 enzimeknek van, az atorvasztatin szintén a CYP3A4 enzim segítségével bomlik. Korai tanulmányok igazolták, hogy *in vitro* génmódosított humán CYP3A4 és 3A5 enzimeket tartalmazó patkány máj mikroszóma preparátumon az atorvasztatin jelentősen blokkolja a clopidogrel oxidációját és az aktív metabolit képződését (Clarke és Waskell 2003). Lau és mtsai klinikai tanulmányban igazolták 44 koronária stent implantáción átesett betegen, hogy az atorvasztatin csökkentette a clopidogrel trombocita aggregáció gátló hatását. Ugyanezen tanulmányban 27 önkéntessel szedettek clopidogrelt és vagy

eritromycint/troleandomycint (CYP3A4 inhibitorok) vagy rifampicint (CYP3A4 induktor). Az inhibitor csoportban csökkent, míg az induktor csoportban fokozott aggregáció gátlást találtak (Lau et al. 2003). Hasonlóképpen ez a munkacsoport igazolta koronária betegeken és egészségeseken, hogy clopidogrel hatás-variabilitás szerint csoportokba osztva az embereket, a hatás variabilitása függött a CYP3A4 enzim aktivitásától. A CYP3A4 enzimnek tehát fontos szerepe lehet a clopidogrel rezisztencia kialakulásában (Lau et al. 2004). Neubauer és mtsai 47 koronária betegen igazolták hogy az atorvasztatin és a simvasztatin csökkenti a clopidogrel trombocita gátló hatását. Ez a munkacsoport már megemlíti, hogy az interakciónak legnagyobb szerepe a telítődózis beadásakor van és a fenntartó fázisban a clopidogrel hatásának 80%-a a sztatin szedés ellenére megmarad (Neubauer et al. 2003). Hogy ennek a laboratóriumilag mérhető gyógyszerinterakciónak bármilyen hatása lenne a klinikai kimenetelre és végpontokra, azt nagy beteganyagban a CREDO tanulmány *post hoc* analízise cáfolta meg. A sztatin szedőket a CYP3A4 enzimen metabolizálódó csoportba (atorva-, simva-, lova-, cerivasztatin szedők) és - nem dominánsan ezt az enzimet használó - (prava-, fluvasztatin) csoportokba osztotta. 2116 betegből 1001 az előbbi, 158 az utóbbi, a maradék a kontroll csoportba tartozott. A vizsgálat elsődleges végpontjai a kétféle sztatin csoport és a kontroll csoportok között nem különbözött. A vérzéses eseményeket tekintve sem volt különbség a csoportok közt (Saw et al. 2003). Ezután tanulmányok sora cáfolt rá az interakció klinikai jelentőségére, 600mg telítő dózisú clopidogrel esetében (Müller et al. 2003; Gorchakova et al. 2004), 5 hétig tartó együttes szedés során vizsgálva (Mitsios et al. 2004). Mukherjee és mtsai 1651 akut koronária szindrómás beteget vizsgálva azt találták, hogy a sztatin-clopidogrel kombinációja alacsonyabb mortalitást eredményezett fél év alatt, - tekintet nélkül arra, hogy CYP3A4 sztatin vagy nem-CYP3A4 sztatint használtak -, a csak clopidogrel szedőkéhez képest (Mukherjee et al. 2005).

### **A CYP2C19 polimorfizmusa**

Más citokróm enzimek szerepe is felmerült a clopidogrel hatás variabilitás okaként. Hulot és mtsai a CYP2C19 enzim génjének olyan polimorfizmusát írták le, mely funkcióvesztéssel jár, és egészséges önkénteseken végzett tanulmány során a clopidogrel

jelentősen csökkent hatékonyságát okozta aggregometriával és VASP-foszforilációs mérésekkel is alátámasztva (Hulot et al. 2006).

### **Protonpumpa gátlók**

A CYP2C19 enzimén keresztül metabolizálódnak a protonpumpa gátló gyógyszerek is. Gilard és mtsai az omeprazol és a clopidogrel közti interakcióról számolnak be egy 105 betegen végzett vizsgálat alapján, ahol VASP-foszforilációs mérések alapján az omeprazol szedőkben a clopidogrel szignifikánsan alacsonyabb aggregáció gátlást hozott létre (Gilard et al. 2006). Fentiek miatt készült a kettős-vak placebo kontrollált OCLA tanulmány. Az eredmények az interakció fontosságára hívták fel a figyelmet (Gilard et al. 2008). Sibbing és mtsai egy nagyon friss tanulmányban 1000 fős beteganyagon tisztázták, hogy ez az interakció csak az omeprazol esetében áll fenn, a többi protonpumpa gátló ugyanis más citokróm enzimén keresztül metabolizálódik, így azok nem csökkentik a clopidogrel trombocita gátló hatását (Sibbing et al. 2009).

### **Thienopyridin „rezisztencia” mechanizmusok - farmakodinamikai okok**

#### **A P2Y<sub>12</sub> receptor polimorfizmusai**

Fontana és mtsai 98 egészséges önkéntesen vizsgálták a P2Y<sub>12</sub> receptort kódoló gént. H1 és H2 haplotípusokat különítettek el és azt találták, hogy a H2 allélek száma összefüggésben van az ADP indukálta trombocita aggregációs eredményekkel. Az allélek gyakorisága H1 esetében 0.86, H2 esetében 0.14 volt. Felvetették, hogy mivel a H2 allélt hordozókban ADP hatásra erősebb cAMP csökkenés tapasztalható, így ezen csoportban fokozott atherotrombotikus rizikóval kell számolni (Fontana et al. 2003). Erre az elképzelésre, két munkacsoport is rácsáfolt. Angiolillo és mtsai 119 beteget vizsgáltak mind a telítő dózis mind a fenntartó dózis tekintetében, és sem aggregációval, sem áramlási citometriával mérhető trombocita aktivációban nem volt különbség a különböző P2Y<sub>12</sub> genotípusok között (Angiolillo et al. 2005). Von Beckerath és mtsai pedig 416 koronária stent beültetésen átesett beteg esetében igazolta, hogy a H2 allél jelenléte nem befolyásolja a 600mg telítő dóziséű clopidogrel trombocita gátló hatását (von Beckerath et al. 2005).

### **Katecholaminok**

Régóta ismert tény, hogy az atherotrombotikus kórképek lefolyása során emelkedett plazma katecholamin szinteket lehet mérni, hiszen a szívizom iszkémia okozta fájdalom kiváltja a stresszhormonok felszabadulását (Christensen és Videbaek 1974). Ismert továbbá, hogy az emelkedett katecholamin szintek magasabb mortalitással járnak szívelégtelen betegekben. Több kutatócsoport bizonyította egészségeseken és koronária betegekben is, hogy mind mentális, mind fizikai stressz/terhelés trombocita aktivációt okoz és hogy ez sem aszpirinnel, sem clopidogrellel nem védhető ki teljesen (Li et al. 1999; Christiaens et al. 2002; Perneby et al. 2004; Perneby et al. 2007; Wallén et al. 1997). Tofler és mtsai az akut atherotrombotikus események és a nagy fizikai megerőltetés, szexuális aktivitás, harag, szorongás, megöszvegyülés, munkahelyi stressz, földrengések, háborús események, légúti fertőzés, nagymennyiségű étel fogyasztása, havazás, kokainfogyasztás közötti egyértelmű összefüggésekről számolnak be összefoglalójukban. A felsoroltak mind fizikai vagy emocionális stresszorok és a keringő katecholaminok szintjének emelkedését okozzák (Tofler és Muller 2006). A stressz persze nemcsak a katecholaminok emelkedett szintjével teremt protrombotikus állapotot, hanem a növekvő perctérfogat és vérnyomás növeli a „shear stress”-t is, mely szintén ismert trombocita aktivátor (Kestin et al. 1993; Kroll et al. 1996). A katecholaminok és főleg a noradrenalin szerepe bizonyított a stressz okozta trombocita aktivációban és prokoaguláns állapot létrehozásában (Ikarugi et al. 1999). Perneby és mtsai 15 egészséges egyénen vizsgálták a clopidogrel hatását a stressz indukálta protrombotikus válaszreakciókra. Filtragemetriával, tromboxán metabolit szint mérésekkel és áramlási citometriával mért trombocita P-szelektin pozitivitással detektálták a trombocita aktivációt. Eredményeik szerint a clopidogrel nem befolyásolta szignifikánsan a fizikai megterhelés által kiváltott trombocita aktivációt és következményes protrombotikus állapotot. A konklúzió szerint az ADP-nek alárendelt szerepe van a stressz indukálta trombocita aggregációban (Perneby et al. 2004). Ugyanez a kutatócsoport 31 stabil koronária betegen igazolta, hogy az aszpirin terápia clopidogrellel való kiegészítése sem befolyásolja érdemben a fizikai megterhelés protrombotikus hatásait (Perneby et al. 2007). A fizikai terhelés az emelkedett „shear stress”, szerotonin és katecholamin szinteken keresztül befolyásolhatja a trombocitákat.



### 1.5 A trombocita alpha-2<sub>A</sub> adrenerg receptora

Az alpha-2<sub>A</sub> receptor az agytörzsben a vérnyomás és az éberség szabályozásában vesz részt. Makaritsis és mtsai génmódosított egér modellen mutatták be az alpha-2<sub>A</sub> receptor inhibítoros funkcióját a szimpatikus idegrendszer szabályozásában. A receptor hiánya magas vérnyomást és hiperadrenerg állapotot okozott kétszeres keringő katecholamin szinttel (Bylund et al. 1994; Makaritsis et al. 1999; Bylund 2005).

Az emberi érrendszerben az artériás oldalon az alpha-2<sub>A</sub> és az alpha-2<sub>B</sub> receptorok vazokonstriktiót váltanak ki, a vénás oldalon a predomináns receptor az alpha-2<sub>B</sub>. Az endothelium-mediált vazodilatáció (NO-felszabadulás) egy alpha-2 receptorok által is szabályozott vérnyomáscsökkentő mechanizmus.

A központi szimpatikus idegrendszer gátlása elsősorban alpha-2<sub>A</sub> receptor által mediált folyamat, de az alpha-2<sub>C</sub> receptor is részt vesz benne (Hein et al. 1999).

A szívben a preszinaptikus alpha-2<sub>A</sub> és alpha-2<sub>C</sub> receptorok a növekedést szabályozzák, hiányuk vagy hibás működésük szívizom hipertrófiához vezet (Kanagy 2005; Brodde et al. 2006). Igazolták, hogy a preszinaptikus alpha-2 receptorok szerepet játszanak a szívben a noradrenalin felszabadulás szabályozásában szívelégtelenségben, és normál körülmények közt is (Rump és Bohmann et al. 1995; Rump és Riera-Knorrenschild et al. 1995; Minatoguchi et al. 1995; Parker et al. 1995).

A trombociták felszínén G-protein kapcsolt alpha-2<sub>A</sub> típusú adrenerg receptor található és ez mediálja az aktivációt. A receptor kis sűrűségben található (220/trombocita), 64kDa nagyságú hét transzmembrán domainnel rendelkező glikoprotein (Newman et al. 1978; Regan et al. 1986).

Elsőként O'Brien fedezte fel 1963-ban, hogy adrenalin jelenlétében trombocita aggregáció történik, azt megelőző „shape change” nélkül (O'Brien 1963). Az adrenalin indukálta trombocita aggregáció több okból is ellentmondásos jelenség. Fiziológiás kalcium koncentráció jelenlétében *in vitro* adrenalin hatására nem következik be aggregáció (Lanza et al. 1988). Citráttal antikoagulált plazmában (alacsony kalcium koncentráció) az adrenalin indukálta trombocita aggregáció létrejön. A másik jelentős tény, hogy *in vivo* nem fordul elő olyan magas adrenalin koncentráció, mely *in vitro* aggregációt képes kiváltani.

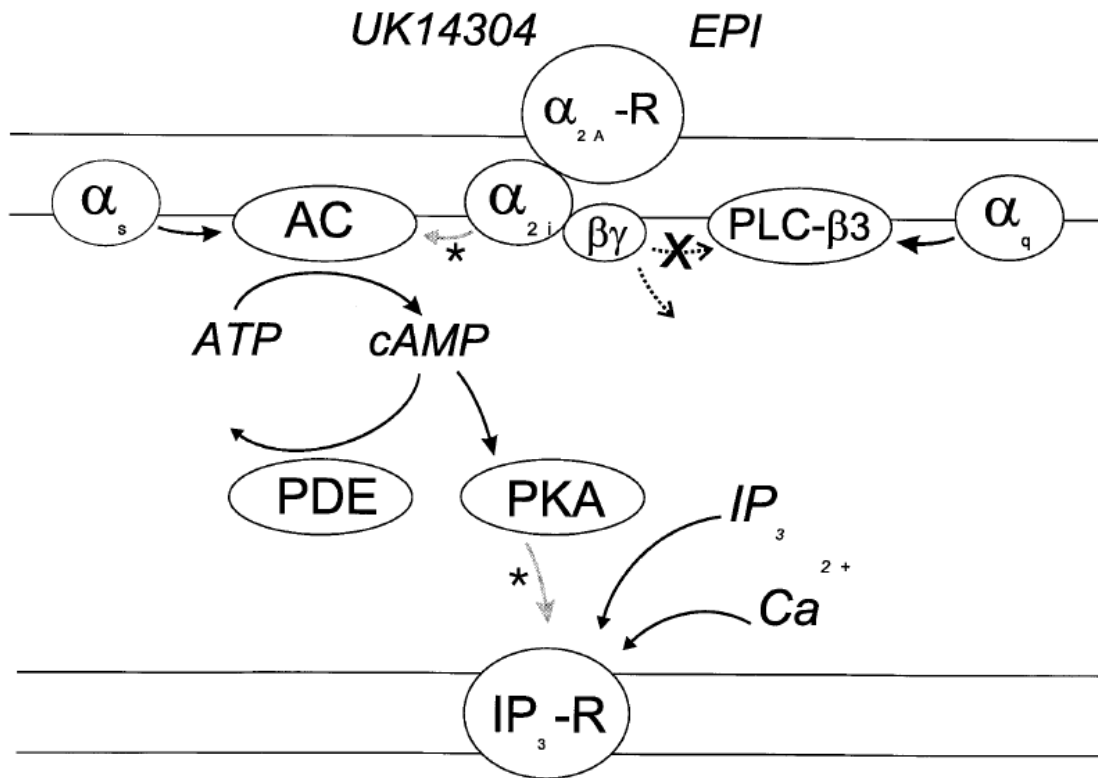
Rao és mtsai leírtak olyan enyhe familiáris vérzékenységet, mely háttérében a trombocita  $\alpha$ - $2_A$  receptorainak csökkent sűrűsége volt kimutatható (Rao et al. 1988).

### **Az $\alpha$ - $2_A$ receptorhoz köthető jelátviteli utak trombocitában**

Mindenek előtt le kell szögezni, hogy a trombocitában az  $\alpha$ - $2_A$  receptorhoz kapcsolt jelátvitel másképpen működik, mint más sejtekben. Ebben a részben csak a trombocitákban leírt jelátviteli útvonalokról lesz szó. Az intracelluláris jelátviteli kapcsolatokról világosan levezethető a más agonisták receptoraival történő „cross-talk”, melynek a rezisztenciában szerepe lehet.

Az  $\alpha$ - $2_A$  receptor a heterotrimer G-fehérjékhez kapcsolt receptorokhoz tartozik. Trombocitában ilyen receptorok az ADP receptorok ( $P2Y_1$ ,  $P2Y_{12}$ ), a  $TXA_2$  receptorai ( $TP-\alpha$ ,  $TP-\beta$ ) (Nakahata 2008), és a trombin receptorai ( $PAR-1$ ,  $PAR-4$ ). A G-fehérjék közül trombocitában a  $G_{\alpha i2}$ ,  $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha 12/13}$ , és  $G_{\alpha z}$  fordulnak elő. A  $G_{\alpha i2}$  és a  $G_{\alpha z}$  az adenilát cikláz enzim gátlásával a cAMP-szint csökkenését hozzák létre, ezt a jelátviteli utat aktiválják a  $P2Y_{12}$ , és az  $\alpha$ - $2_A$  receptorok. A  $G_{\alpha s}$  fehérje az adenilát cikláz enzimet aktiválja, így növeli a cAMP szintet a trombocitában a prosztaciklin ( $PGI_2$ ), megvalósítva ezzel az egyik fő antitrombotikus-antiaggregáns mechanizmust. Az  $\alpha$ - $2_A$  receptor az adenilát-ciklázra inhibitorosan ható  $G_{\alpha z}$  fehérjét aktiválja, így a cAMP szintet csökkenti. Az  $\alpha$ - $2_A$  receptor így eltérő G-fehérjéhez kapcsolódik, mint a  $P2Y_{12}$  receptor – előbbi  $G_{\alpha z}$ , utóbbi  $G_{\alpha i2}$  - ennek a különbségnek a jelentősége kevésbé ismert (Yang et al. 2000). A  $G_{\alpha 12/13}$  fehérjét, - mely a Rho-A fehérje foszforilációjához és a PLC aktivációjához vezet - a  $TXA_2$  és a trombin aktiválják (Dorsam et al. 2002). Ismert, hogy a trombocita aggregációhoz önmagában sem az inhibitoros  $G_{i\alpha 2}/G_{\alpha z}$  út, sem pedig a kalcium beáramlást növelő  $G_{\alpha q}$  út nem elegendő. A GPIIb/IIIa receptor aktiválódásához például a  $G_{\alpha 12/13}$  és a  $G_{\alpha i}$  fehérjék, míg az ADP indukálta trombocita aggregációhoz a  $G_{\alpha i}$  és  $G_{\alpha q}$  jelátviteli utak együttes aktivációja szükséges (Jin és Kunapuli 1998; Dorsam et al. 2002). A  $P2Y_{12}$  receptorok lipid raftokban találhatóak, melyek szükségesek normális receptor funkcióhoz, míg a  $P2Y_1$  valamint az  $\alpha$ - $2_A$  receptorok lipid raftoktól függetlenek (Quinton et al. 2005).

Az  $\alpha$ - $2_A$  adrenerg receptor által mediált cAMP szint csökkenés számos további folyamatot indít el. A trombocitában a kalcium szintet a cAMP alapvetően befolyásolja valószínűleg az  $IP_3$ -receptorok és a „Ca-induced Ca-release” (CICR) befolyásolásával. Az  $\alpha$ - $2_A$  receptor normál sejtekben való aktivációjakor a  $G_{\beta\gamma}$  fehérje által aktiválja a PLC $\beta$  enzimet, ami  $IP_3$  és DAG felszabaduláshoz és kalcium szint emelkedéshez vezet. Említettük, hogy trombocitában a jelátviteli mechanizmusok eltérnek a normális sejtektől, itt az  $\alpha$ - $2_A$  receptor a kalcium szintet más mechanizmussal befolyásolja. Bizonyított, hogy sem az adrenalin, sem a specifikus  $\alpha$ -2 receptor aktivátor UK14304 direkt módon nem emeli a trombocita  $IP_3$  vagy kalcium szintjét. Ugyanakkor az  $\alpha$ - $2_A$  receptor aktivációja elősegíti a PLC $\beta$  enzimen vagy a CICR indukcióján alapuló más agonisták kalcium szint emelő hatását. Ha kísérletesen gátolták a cAMP-dependens protein kinázt, az olyan állapotot hozott létre, mintha  $\alpha$ - $2_A$  receptor aktiváció lenne. Az emelkedett cAMP-szint gátló hatással van az  $IP_3$ -dependens CICR folyamatára. Az  $\alpha$ - $2_A$  receptor aktivációja a cAMP-szint csökkentésével ez alól a gátlás alól oldja fel a kalcium felszabadulásért felelős CICR rendszert. Összefoglalva a trombocita  $\alpha$ - $2_A$  receptor aktivációja indirekt módon, a cAMP szint csökkenésével és a cAMP-dependens protein kináz szekunder szupressziójával, és nem a PLC $\beta$  enzimre való hatással befolyásolja a trombocita kalcium felszabadulását (Keularts et al. 2000) (lásd 5.ábra).



5. ábra Az ábrán a trombocita adrenerg receptor aktivációja által kiváltott adenilát-cikláz gátlás és következményes cAMP szint csökkenés és a „Calcium-induced calcium release” folyamatát gátló cAMP-dependens protein kináz (PKA) gátlása következik be. A trombocita alpha-2<sub>A</sub> receptor aktivációja tehát indirekt módon, a cAMP szint csökkenésével és a cAMP-dependens protein kináz szekunder szupressziójával, és nem a foszfolipáz-C $\beta$  enzimre való hatással fokozza a trombocita Ca-felszabadulását. Az adrenerg receptor  $\beta\gamma$  alegysége trombocitában nem funkcionál. \* = gátlás Az UK14304 egy specifikus alpha-2<sub>A</sub> receptor agonista. Rövidítések: EPI:adrenalin; AC:adenilát-cikláz; PLC:foszfolipáz-C; ATP:adenozin-trifoszfát; cAMP:ciklikus adenozin-monofoszfát; PDE:foszfodiészteráz; PKA:protein kináz A; IP<sub>3</sub>:inozitol-trifoszfát

Az alpha-2<sub>A</sub> adrenerg receptor továbbá PI3K-dependens úton aktiválja a Rap1B fehérjét, mellyel hozzájárul a trombocita aktiváció kezdeti lépéseéhez és részben a GPIIb/IIIa receptor aktivációjához is (Woulfe et al. 2002).

A p38-MAPK stresszfehérje trombocitán belüli aktivációja is többek között az alpha-2<sub>A</sub> receptorhoz köthető (Crouch et al. 1989). Mustonen és mtsai írták le, hogy az adrenalin a p38-MAPK aktiválásán keresztül az aszpirin trombocita adhéziót gátló hatását szünteti meg. A p38-MAPK aktiválja a cPLA<sub>2</sub> enzimet és fokozza az arachidonsav szintézisét. Az atipamezol az alpha-2<sub>A</sub> receptor szelektív gátlószere kiküszöbölte a fent említett adrenalin

hatást (Mustonen et al. 2001). A p38-MAPK fehérjét az adrenerg receptoron kívül a P2Y<sub>1</sub> receptor is képes aktiválni, azonban a P2Y<sub>12</sub>, és a P2X<sub>1</sub> receptorok nem (Dangelmaier et al. 2000).

### **Az alpha-2<sub>A</sub> receptor agonistái - a katecholaminok**

Emberben a keringő katecholaminok hozzávetőlegesen 80%-a noradrenalin és 20%-a adrenalin. Az adrenalin szinte kizárólag a mellékvese velőállományából származik. A noradrenalinnak kisebb része származik a mellékveséből, túlnyomó többsége a szimpatikus idegvégződések preszinaptikus membránjaiból szabadul fel és kerül a keringésbe részben a perifériás, részben a központi idegrendszerből (Kanagy 2005). Egészséges emberekben vizsgálva a stressz okozta fokozott trombocita reaktivitásban a noradrenalin szerepét bizonyították (Ikarugi et al. 1999). *In vitro* a noradrenalin és az adrenalin egyformán potens agonistái az alpha-2<sub>A</sub> receptornak (Birk et al. 2003).

### **Specifikus alpha-2<sub>A</sub> receptor gátlók**

#### **Yohimbin**

A yohimbin a *Pausinystalia yohimbe* fa kérgéből származó triptamin alkaloid. Tradicionálisan afrodisziákumként használják, manapság az SSRI típusú antidepresszánsok által okozott szexuális diszfunkció kezelésére alkalmazzák. A yohimbin a plazma noradrenalin szintet emeli. A yohimbin kevésbé szelektív az alpha-2<sub>A</sub> antagonistá, hiszen számos más receptorra (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> és 5-HT<sub>1D</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>) is hat.

#### **Atipamezol**

A yohimbinhez képest kisebb koncentrációban gátolja az alpha-2<sub>A</sub> receptort: IC<sub>50</sub>: 0.37 ± 0.07 μM versus 0.98 ± 0.12 μM. Az atipamezolnak a legmagasabb az alpha-2/alpha-1 specificitása, további előnye, hogy nem hat a béta-, hisztamin-, szerotonin-, dopamin-, GABA-, opioid-, és a benzodiazepin receptorokon sem. Állatokon az atipamezol beadása után a keringő noradrenalin szint kétszeresére emelkedett, ezzel magyarázható a vérnyomás emelő hatás. Hasonlóképpen a yohimbinhez, az atipamezol állatgyógyászatban használatos olyan anesztetikumok hatásának felfüggesztésére, melyek az alpha-2<sub>A</sub> receptor

stimulálásával hoznak létre szedációt. Ilyenek szedatívumok a xylazin, a medetomidin és a dexmedetomidin. Emberben nagyobb dózisban motoros nyugtalanságot és vérnyomás emelkedést okozott. Előzetes adatok alapján a Parkinson-szindróma elleni dopaminerg szerek hatását fokozza. (Mustonen et al. 2000; Pertovaara et al. 2005).

## 2. Célkitűzések

A bevezetőben ismertettük, hogy a trombocita P2Y<sub>12</sub> ADP receptorának, mely az aggregáció amplifikációjáért felelős, központi szerepe van a trombocitadús trombus stabilitásának kialakításában, mely az atherotrombózis pathológiai alapjául szolgál. A hatásos thienopyridin alapú kettős trombocita gátlás ezért a koronária intervención átesett stabil koronária betegek kezelésének alapja, hiszen megelőzi a stent trombózist, a következményes miokardiális infarktust, csökkenti a halálozást, így a kemény kardiovaszkuláris végpontokat. A jelenleg széles körben használatos aszpirinnek és clopidogrelnek azonban óriási inter-individuális hatékonyságbeli különbsége van. Ezért fontos ismernünk minden olyan faktort, amely a trombocita gátló terápia hatástalanságához vezethet. A trombocita gátlószer „rezisztencia” nem egyértelműen definiált fogalom. A különböző tanulmányokban a leírt clopidogrel rezisztencia prevalenciája 4 és 30% között változik. Ilyen széles tartomány a különböző kutatócsoportok által használt metodikai faktorok eltérése vagy az inhomogén beteganyag miatt lehetséges.

1. Meghatározni egy aszpirinszedő stabil koronária beteg populáció clopidogrel rezisztenciájának prevalenciáját, definiálni azokat a paramétereket, amelyek alapján az egyént rezisztensnek nyilvánítjuk. Megmérni egy elektív koronária angiográfiára kerülő már hosszabb ideje standard dózisu aszpirin monoterápián lévő betegcsoport trombocita aggregációs értékeit. A standard telítő dózisu clopidogrel bevétele után 4 órával ismét meghatározni az aggregációs értékeket, így a clopidogrel hatás-rezisztencia spektrumát aggregometriával felmérni. Az aggregometriához használt agonista koncentrációja befolyásolhatja a rezisztencia prevalenciáját. Hogy ezt a faktort kiküszöböljük, a metodikai részben részletezett módon meghatároztuk az ADP-re vonatkoztatott EC<sub>50</sub> értéket ebben a beteg populációban, hiszen ez az érték független az aggregációhoz használt agonista koncentrációtól. Összefüggést kerestünk az ADP indukálta trombocita aggregációs értékek, az EC<sub>50</sub> érték és a vaszkuláris gyulladás markerei között, mint amilyenek a szérum C-reaktív protein, a plazma szolubilis CD40L vagy a von Willebrand faktor.

2. A koronária stent trombózis a koronária intervenció olyan súlyos szövődménye, mely összefüggésben lehet a gátlószer rezisztenciával. Célunk volt meghatározni egy koronária stent trombózison átesett betegcsoport ADP-re vonatkoztatott  $EC_{50}$  értékeit és összehasonlítani a fenti stabil koronária beteg csoportéval. Továbbá szükséges egy klinikailag használható algoritmus kidolgozása a clopidogrel rezisztencia kezelésére-áttörésére ezen betegcsoportban, hiszen ilyen esetben az antitrombocita terápia módosítását a hivatalos irányelvek is megengedik (II/B ajánlás; C evidenciaszint) (Smith et al. 2006). A stent trombózison átesett clopidogrel rezisztens betegek esetében minden trombocita gátló terápia módosítást ismételt aggregometriás méréssel követtünk.

3. A gyógyszerkibocsájtó stentek prolongált trombogenicitása fontos kérdés napjainkban, hiszen egyre szélesebb indikációs körrel kerülnek alkalmazásra. Ezen betegek esetében az irányelvek is hosszabb ideig tartó kombinált trombocita gátló terápiát írnak elő, hiszen a késői stent trombózis esélye szignifikánsan magasabb, mint hagyományos stentek esetében (Kushner et al. 2009). Ráadásul ezen késői stent trombózisos esetek gyakran összefüggésbe hozhatóak az antitrombocita terápia hatástalanságával (Wang et al. 2009). Nagyon fontos ezért a késői atherotrombotikus komplikációk hátterének pontos feltárása.

4. A trombocita aktivitását illetve a gátlószer hatékonyságát befolyásolhatják a keringő catecholaminok és célmolekulájuk, az  $\alpha$ - $2_A$  adrenerg receptor aktivitása is. Ezért tisztázni szeretnénk volna ezen receptor aktivitása és a thienopyridin rezisztencia közötti összefüggést. Különösen azért kézenfekvő a feltételezés az összefüggésről, mert a  $P2Y_{12}$  receptor és a trombocita  $\alpha$ - $2_A$  adrenerg receptora más G-fehérjén keresztül, de ugyanazt az adenilát-cikláz enzimet gátolva és a cAMP szintet csökkentve okoznak trombocita aktivációt. A szakirodalomban viszonylag kevés adat található erről az igen nehezen vizsgálható összefüggésről és ezek az adatok is egészséges vagy aszpirinszedő stabil koronária betegek vizsgálataiból származnak. Ezért vizsgáltuk az  $\alpha$ - $2_A$  receptor aktivitásának kapcsolatát a thienopyridin „rezisztenciával” aszpirin és clopidogrel szedő stabil koronária betegekben. A gátlószer rezisztenciával foglalkozó összefoglaló cikkek többsége megemlíti a keringő catecholaminok szerepét, de kevés konkrét tanulmány áll

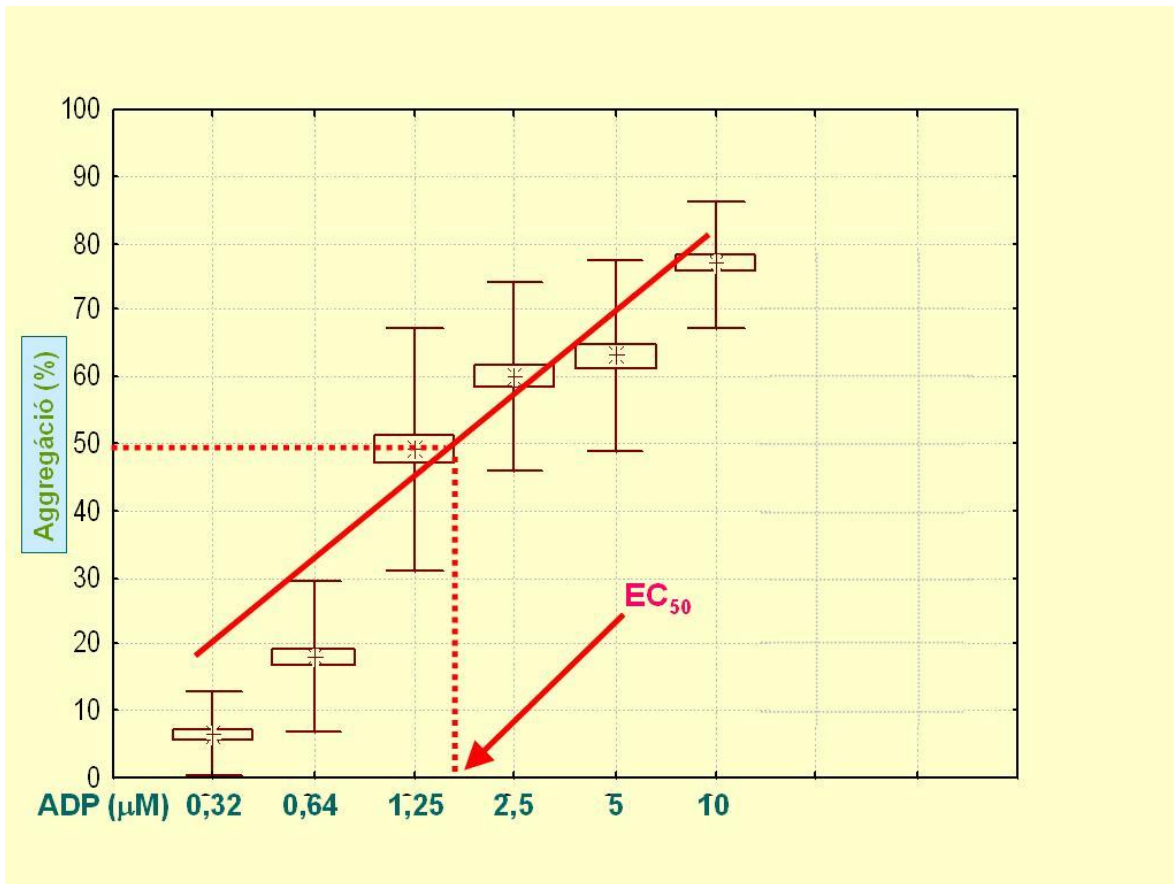


rendelkezésünkre. Mivel a noradrenalin adja az emberben keringő katecholaminok mintegy 80%-át, megvizsgáltuk az  $\alpha$ -2<sub>A</sub> receptor aktivitás, a clopidogrel „rezisztencia” és a keringő noradrenalin szint közötti lehetséges kapcsolatot is. Tanulmányunkban megkíséreltük tisztázni az adrenerg receptor aktivitásának a kettős trombocita gátlás melletti maradék trombocita reaktivitáshoz való hozzájárulásának mértékét is. Célunk annak felderítése volt továbbá, hogy a trombocita adrenerg rendszerének aktivitása hogyan függ össze egyes trombocita aktiválódási markerekkel (P-szelektin, trombocita térfogat), valamint az érfali gyulladás egyes markereivel (hsCRP, sCD40L).

### 3. Módszerek

#### 3.1 Betegek

3.1.1 Kiválasztottunk 65 elektív koronária angiográfiára kerülő beteget. Minden beteg legalább 4 hete napi 100mg aszpirint szedett, az angiográfia előtt pedig 300mg clopidogrelt kaptak. Az aggregometriás méréseket az angiográfia előtt, majd 4 órával utána végeztük el emelkedő koncentrációjú ADP jelenlétében az alábbiakban részletezettek szerint. A koncentrációsorra azért volt szükség, mert célunk volt meghatározni az ADP-re vonatkoztatott  $EC_{50}$  értékeket a clopidogrel bevétele előtt és után (lásd 6.ábra).



6. ábra A fenti ábrán az ADP-re vonatkoztatott  $EC_{50}$  értékek kiszámítási módja látható. Ehhez szükséges a fenti agonista koncentráció-sorozattal elvégezni az aggregációkat. Az  $EC_{50}$  az a teoretikus ADP koncentráció, mellyel a maximális aggregációs érték felét értjük el. Ez az érték informatív a receptor és a hozzá tartozó jelátviteli útvonalak aktiválhatóságáról

3.1.2 Prospektíven identifikáltunk 10 nagy atherotrombotikus rizikójú koronária beteget. 8 betegnél akut koronária stent trombózis, 2 betegnél akut koronária szindrómával járó szubtotális reokklúzió jelentkezett a stent beültetést követő 1 hónapon belül. A betegek folyamatos napi 100mg aszpirin és 75mg clopidogrel terápia ellenére kaptak stent trombózist. A vérvétel az ismételt koronária intervenció során adott GPIIb/IIIa blokkoló terápia leállítását után 24 órával történt. A 10 klinikailag bizonyítottan nagy atherotrombotikus rizikójú beteg P2Y<sub>12</sub> ADP receptorára vonatkoztatott EC<sub>50</sub> értéket is meghatároztuk, majd összehasonlítottuk a 65 stabil koronária beteg értékeivel. További célunk volt egy klinikai kezelési algoritmus kidolgozása abban az esetben, ha ezen betegeknél bizonyítható a clopidogrel hatástalansága. Ezt követően minden terápia módosítást ismételt aggregációs vizsgálattal követtünk.

3.1.3 Egy esetben demonstrálni tudtuk a szerzett gátlószer „rezisztencia” szerepét egy nagyon késői gyógyszerkibocsájtó stent trombózisban. Esettanulmány: 39 éves diabetes mellitusos hipertóniás férfi inferior STEMI miatt 2,5 órás időablakon belül primer koronária intervención esett át. A jobb artéria koronária proximális totális okklúzióját két átfedő sirolimus-kibocsájtó stenttel oldották meg. A nyolc hónappal későbbi kontroll angiográfián nem volt detektálható in-stent restenosis. 834 nappal az atherotrombotikus eseményt követően újból felvételre került típusos mellkasi fájdalom miatt. Az EKG inferior STEMI-re volt jellemző, az elvégzett angiográfia a jobb artéria koronáriába helyezett stentek proximális részén teljes trombotikus okklúziót talált. A kettős trombocitagátló terápia (100mg aszpirin és 75mg clopidogrel) mindvégig folyamatos volt. Azonban 6 nappal ezen második atherotrombotikus esemény előtt a beteg napi 2x75mg diclofenacot és napi 2x15mg meloxicamot kezdett szedni lumbális discushernia okozta fájdalmak miatt. A betegnél trombocita aggregációs méréseket végeztünk ADP-vel, kollagénnel és adrenalinral a non-szteroid gyulladásgátló terápia alatt, majd annak abbahagyása után.

3.1.4 A trombocita adrenerg receptor aktivitása és a clopidogrel „rezisztencia” összefüggésével foglalkozó tanulmányunkba pedig 121 krónikusan (legalább 4 hete) kettős trombocita gátló terápiára (napi 100mg aszpirin és 75mg clopidogrel) állított stabil angina

pectoris koronária beteget vontunk be. A koronária betegség legalább egy bevonást megelőző koronária angiográfiával bizonyított volt minden esetben. Minden beteg stabil klinikai állapotban volt, a bevonást megelőzően legalább 1 hónapja nem szenvedett el semmilyen atherotrombotikus eseményt vagy PCI-t. Kizárási kritériumok voltak: típusos mellkasi fájdalom vagy nyugalmi légzési nehezítettség, újkeletű ST/T eltérés az EKG-n, aktív vérzés, aspirin vagy clopidogrel „non-compliance” kikérdezés alapján, veseelégtelenség, onko-hematológiai vagy endokrin betegség. A betegek elektív koronária angiográfiára érkeztek centrumunkba. A vérvétel az angiográfia előtt történt, hogy elkerüljük az esetleges koronária intervenció trombocita aktiváló hatását.

A tudományos etikai bizottság engedélyezte a tanulmányt és minden beteg tájékoztatás után írásos beleegyező nyilatkozatot írt alá.

### **3.2 Trombocita aggregációs vizsgálatok**

#### **Vérvétel és preparáció**

A betegektől vénás vért vettünk aggregációs vizsgálatra. Ehhez 15 perc fektetés után 18G-s tűvel könyökhajlati vénából citrátos csövekbe vettünk vért. A vérvételt követően maximum 10 percen belül 900/perc fordulatszámon 15 percig citrátos trombocitadús plazmát szeparáltunk. Óvatosan eltávolítottuk a felülúszót egy külön natív csöbe. Szem ellenőrzése mellett a „buffy coat”-ot az eredeti csöben hagytuk. A levett citrátos trombocitadús plazmából ezután Advia 60 Hematology System (Bayer Health Care AG, Leverkusen, Németország) automatával meghatároztuk a trombocitaszámot, és az átlagos trombocita térfogatot (MPV). Az automata segítségével győződünk meg arról, hogy mintánkban a „buffy coat”-ból származó fehérvérsejtszám illetve a vörösvértestszám közelít e a nullához. Amennyiben a trombocitadús plazma vörösvértesttel szennyezett volt azt a továbbiakban aggregációs vizsgálatokhoz nem használtuk fel, ugyanis a vörösvértestekből esetleg felszabaduló ATP és ADP meghamisítaná eredményeinket. Miután a trombocitadús felülúszót eltávolítottuk, a citrátos csövekben maradt vért tovább centrifugáltuk 3000/perc fordulatszámon 10 percig. Az így kapott citrátos plazmát, mely nem tartalmaz sejtes elemeket, részben az aggregációhoz, részben azonnal lefagyasztva -80°C-ra későbbi plazma

marker analízisekre használtuk fel. Az aggregációhoz felhasznált sejtes elemeket nem tartalmazó citrátos plazmát más néven trombocitaszegény plazmának nevezzük. A Born-féle fényáteresztésen alapuló aggregometriában ez adja az aggregáció 100%-át, mint viszonyítási alapot. A Born-aggregometria során Carat TX4 típusú aggregométert használtunk (Carat Diagnostics, Magyarország). Az aggregométerben a mérések során konstans 37°C-os hőmérséklet uralkodik, és a mintát a fényáteresztő küvettában egy keverőmágnes 1000/perc fordulatszámon tartja. Az aggregometriás méréseket a trombocitadús plazma szeparációját követően maximum 15 percen belül elkezdtük.

### **Agonisták és aggregációs mérések**

A aggregációk során az ADP-t (Sigma-Aldrich, Magyarország) 1.25 $\mu$ M és 5 $\mu$ M végkoncentrációkban használtuk. Az EC<sub>50</sub> meghatározásokhoz ezeken kívül még 0.32 $\mu$ M; 0.64 $\mu$ M; 2.5 $\mu$ M; és 10 $\mu$ M végkoncentrációkat is használtunk. Az ADP törzsoldatát -20°C-on fagyasztva pelletekben tároltuk és minden aggregáció sorhoz szigorúan csak egyszer olvastottuk fel. Maradék ADP oldatot soha nem fagyasztottunk vissza későbbi használatra. Kollagén indukálta trombocita aggregációkhoz +4°C-on tárolt kollagént oldottunk fel saját pufferében (Nycomed, Ausztria) 1 $\mu$ g/ml végkoncentrációban. A kollagén indukálta aggregáció az aszpirinhatásra utaló, kevésbé specifikus paraméter.

Adrenalin indukálta aggregációkhoz az adrenalin 2 $\mu$ g/ml végkoncentrációját használtuk (Tonogen<sup>®</sup>, Richter-Gedeon, Magyarország). Irodalmi adatok alapján az adrenalin és a noradrenalin egyformán potens agonistái a trombocita alpha-2<sub>A</sub> receptorának (Birk et al. 2003).

A trombocita adrenerg aktivitásának egyik aspektusaként kíváncsiak voltunk, hogy nagyon alacsony koncentrációjú adrenalin hozzáadása potenciózza-e, és ha igen, milyen mértékben az ADP és a kollagén indukálta aggregációkat a küvettában. Az ADP és a kollagén indukálta aggregációk potenciózásához az adrenalint 1:100000 hígításban (10ng/ml végkoncentráció) használtuk, mely közel esik az *in vivo* előforduló catecholamin szintekhez (Ikarugi et al. 1999). A potenciózás vizsgálatokor az adrenalint és az ADP-t vagy kollagént egyszerre adtuk a küvettába. A kapott értékekből egy indexet számoltunk:

$$\frac{\text{AGGR}_{\text{ADP+ADRENALIN}}}{\text{AGGR}_{\text{ADP}}} \times 100$$

A számláló a nagyon alacsony koncentrációjú adrenalinral potencírozott ADP indukálta aggregáció értékét, a nevező az ADP indukálta aggregáció értékét jelenti. Így az index arról informatív, hogy a nagyon alacsony koncentrációjú adrenalin mennyire képes fokozni az ADP indukálta aggregációt az aszpirin és clopidogrel terápia mellett. Az index értéke alapján a betegeket kvartilisekbe osztottuk.

„Shape change” mérésére a trombocitadús plazmát 2 percig 4 µg/ml végkoncentrációjú GPIIb/IIIa blokkoló eptifibatiddal preinkubáltuk (Integrilin<sup>®</sup>, Millenium Pharmaceuticals, Schering-Plough), majd 5 µM ADP-vel stimuláltuk. A „shape change” során a trombocita pszeudopodiumokat növeszt, és ezt az aggregométerben a negatív irányba történő elmozdulásként lehet észlelni és mérni. Az így mért „shape change” leginkább a P2Y<sub>1</sub> receptor funkciójára utal.

Szelektív P2Y<sub>12</sub> blokkoló cangrelor (The Medicines Company, NJ, USA) használatával a lehető legpontosabban mérhető meg a clopidogrel rezisztencia mértéke, hiszen ez a clopidogrel terápia ellenére még működő P2Y<sub>12</sub> receptorokat blokkolja. Ez egy korábban Aleil és mtsai által leírt lehetőség (Aleil et al. 2005). Fenti eredmények alapján végeztük a clopidogrel hatás-rezisztencia felmérését egyszerű aggregációs vizsgálattal a 121 aszpirin és clopidogrel szedő betegünkben. Előméréseink alapján a trombocitadús plazmát 2 percig 1 µM végkoncentrációjú cangrelorral preinkubáltuk, majd ezután 5 µM ADP-vel indukáltuk az aggregációt. Az ADP indukálta aggregáció értékéből kivonva a cangrelor preinkubáció után mért aggregációs értéket megkaptuk a clopidogrel rezisztencia mérését (AGGR<sub>ADP</sub>-AGGR<sub>ADP+CANGRELOR</sub>).

Az adrenerg aktivitás mérésének másik aspektusaként a ma ismert legszelektívebb és legerősebb alpha-2<sub>A</sub> receptor antagonistá atipamezollal (Antisedan<sup>®</sup> Pfizer Animal Health, Exton, PA, USA) végzett aggregációs eredmények szolgáltak (Mustonen et al. 2000). A trombocitadús plazmát 2 percig 2 µM végkoncentrációjú atipamezollal preinkubáltuk, majd

ADP-vel, kollagénnel és adrenalinval indukáltunk aggregációt. Az ADP indukálta trombocita aggregáció szelektív adrenerg receptor blokkolóval való gátolhatóságának mértékét index segítségével fejeztük ki:

$$\frac{\text{AGGR}_{\text{ADP}} - \text{AGGR}_{\text{ADP+ATIPAMEZOL}}}{\text{AGGR}_{\text{ADP}}} \times 100$$

A számláló az ADP indukálta aggregáció és az atipamezollal való preinkubáció utáni aggregációs érték különbségét, a nevező pedig az ADP indukálta aggregációs értéket jelenti. Az index arról informatív, hogy a szelektív  $\alpha$ -2<sub>A</sub> receptor antagonistá mennyire képes gátolni az ADP indukálta trombocita aggregációt az aszpirin és clopidogrel terápia mellett. Ez utóbbi index alapján is kvartilisekbe osztottuk a betegeinket.

### 3.3 Áramlási citometria

24 beteg esetében 100 $\mu$ l trombocitadús plazmából áramlási citometriás vizsgálatokat végeztünk. A plazmát azonnal fixáló oldatba tettük (ThromboFix<sup>®</sup> Solution, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) és 10 percig fixáltuk. A vérvétel és a fixálás közti idő minimalizálására a 15 perces centrifugálással együtt maximum 20 perc telhetett el. A centrifugálásnak természetesen lehet trombocita aktiváló hatása, azonban ez a kondíció a vizsgálati alanyok között nem különbözött. A fixált mintákat 30 percig sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk anti-humán CD61-PerCP antitesttel, anti-humán CD62P-PE antitesttel, valamint negatív izotípus kontroll antitestekkel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Az inkubáció alatt az antitestek 1:20 hígításban voltak oldatban. A CD61 a GPIIb/IIIa receptor IIIa része, tehát minden trombocitán jelen van, ezt használtuk a trombociták jelölésére. A CD62P a P-szelektin a trombocita aktivációkor, a degranuláció során az  $\alpha$ -granulumokból felszínre kerülő antigén, mely csak az aktivált trombocitán fordul elő. A trombociták a „forward scatter” és „side scatter” tengelyek logaritmikus ábrázolásakor voltak detektálhatók, mivel mérettartományuk az átlagos sejtekhez képest rendkívül széles. Az aktivált trombocita a megfelelő mérettartományban észlelt CD61-

PerCP és CD62P-PE kettős pozitív esemény. A kettős pozitív eseményeket százalékos arányban fejeztük ki az összes detektált trombocitához képest. A használt citométer Beckton Dickinson FACSCalibur típusú egylézeres gép (488nm-es argon lézer). Szoftverként a FACS Station csomag CellQuest programját használtuk (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

### **3.4 ELISA vizsgálatok**

#### **Noradrenalin**

A plazma noradrenalin koncentráció méréséhez a betegektől az aggregációs vizsgálatokkal egyidőben levett EDTA antikoagulált vérmintát használtuk fel. 10 percig 3000/perc fordulatszámon centrifugálva kaptunk EDTA antikoagulált plazmát. Ezt azonnal -80°C-ra hűtöttük. A noradrenalin méréshez 300 $\mu$ l EDTA antikoagulált plazmát használtunk fel betegenként. Az alábbiakban a kompetitív noradrenalin ELISA (Labor Diagnostica Nord, Nordhorn, Németország) rövid leírása található. Az első plate-en cisz-diolspecifikus gél található, ehhez kötődik a plazmában található noradrenalin. A gélben a noradrenalinból N-acil-noradrenalin keletkezik. Az első plate-ről sósavval (0.025M HCl) történő lemosás során távolítottuk el a gélhez kötődött N-acil-noradrenalint. A második plate-en a katechol-O-metiltranszferáz enzim segítségével a mintából származó N-acil-noradrenalinból N-acil-normetanefrin képződik. Az N-acil-normetanefrin és a plate szolid fázisához kötött noradrenalin versengenek a hozzáadott nyúl anti-noradrenalin antiszérum fix számú kötőhelyeiért. Értelemszerűen minél több noradrenalin volt a mintánkban, annál kevesebb nyúl anti-noradrenalin antiszérum kötődik a plate szolid fázisához, így a reakció intenzitása és az eredeti plazma koncentráció közt fordított arányosság áll fenn. Mosás után peroxidázzal konjugált anti-nyúl IgG-t adtunk a plate-hez. Újabb inkubálás és mosás után TMB szubsztrátot adtunk a plate-hez, majd 20-30 perc inkubáció után 100 $\mu$ l 0.25M kénsavval leállítottuk a reakciót. ELISA olvasóval 450nm-en mértük az extinkciót és a kalibrációs görbe felállítása után kiszámoltuk az eredeti plazma noradrenalin koncentrációt.

#### **Szolubilis CD40L**



A CD40L a trombocita degranulációjakor kerül a keringésbe és az atherotrombózis illetve a gyulladás helyén lokálisan fejti ki proinflammatorikus-protrombotikus hatásait. A szolubilis CD40L szint méréséhez azért használtunk trombocita mentes EDTA-antikoagulált plazmát, hogy se a trombociták CD40L tartalma, se az alvadék képződésekor degranulálódó trombocitákból képződő és szérumba kerülő CD40L ne zavarja méréseinket.

Az általunk használt ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) a kvantitatív szendvics enzim immunoassay technikán alapszik. A mikroplate egy CD40L specifikus poliklonális antitesttel előre bevont felület. A standard-sorban és a plazma mintákban levő CD40L-ot az immobilizált antitest a 2 órás inkubáció során megköti. Miután négyszeri mosással eltávolítottunk minden nem megkötött anyagot, tormaperoxidázzal konjugált CD40L specifikus poliklonális antitestet adtunk a rendszerhez, és újabb 2 órán keresztül inkubáltuk. Ismét négyszeri mosás során eltávolítottuk a nem kötődött konjugált antitestet, majd a 1:1 arányban hidrogén-peroxid:tetrametilbenzidin tartalmú szubsztrát oldat hozzáadása következett és újabb 30 perces inkubáció sötétben. A lyukakban képződő szín intenzitása az eredeti CD40L koncentrációval arányos. Ezután a reakciót 2N kénsav hozzáadásával állítottuk le és a leolvasóban 450nm-en vizsgáltuk a színintenzitást.

### **Von Willebrand faktor**

A von Willebrand faktor szinteket citrátos csövekbe levett vénás vérből centrifugálás (3000/perc 10 percig) után készült citrátos trombocitaszegény plazmából határoztuk meg. A mintákat azonnal -80°C-ra hűtöttük a mérésig. A méréseket ELISA módszerrel végeztük az alábbiak szerint. Polisztrén mikroplate-et (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) vontunk be 31 µg/ml koncentrációjú nyúl anti-humán von Willebrand faktor elsődleges antitesttel (DAKO, Glostrup, Dánia) és 4°C-on egy éjszakára állni hagytuk. A citrátos plazma mintákat 1:40 és 1:120 hígításokban szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltuk a mikroplate-en. Ezt követően három mosás következett 0.2%-os Tween 20-at tartalmazó PBS-sel. Ezután 100µl 1:200 hígítású torna-peroxidázzal konjugált nyúl anti-humán von Willebrand faktor másodlagos antitestet (DAKO, Glostrup, Dánia) adtunk a mikroplate-hez, és inkubáltuk szobahőmérsékleten 2 óráig. Öt újabb mosást követően adtuk a szubsztrátot a rendszerhez (20ml citrát-foszfát puffer, 8mg OPD (Sigma-Aldrich,

Magyarország), 10 µl 3%-os hidrogén-peroxid) és inkubáltuk 10 percig sötétben. A reakciót végül 2M kénsavval állítottuk meg. A fényáteresztést végül 492nm-en olvastuk le.

Mindhárom ELISA vizsgálatot Anthos AR2010 (Central European Biosystems, Budaörs, Magyarország) típusú leolvasóval értékeltük.

### **hsCRP**

A szérum hs-C-reaktív protein méréseket Tina-quant<sup>®</sup> C-reactive Protein (latex) high-sensitivity assay-vel (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) az Országos Gyógyintézeti Központ Klinikai és Kísérletes Laboratóriumának segítségével végeztük el.

### **3.5 Statisztikai analízis**

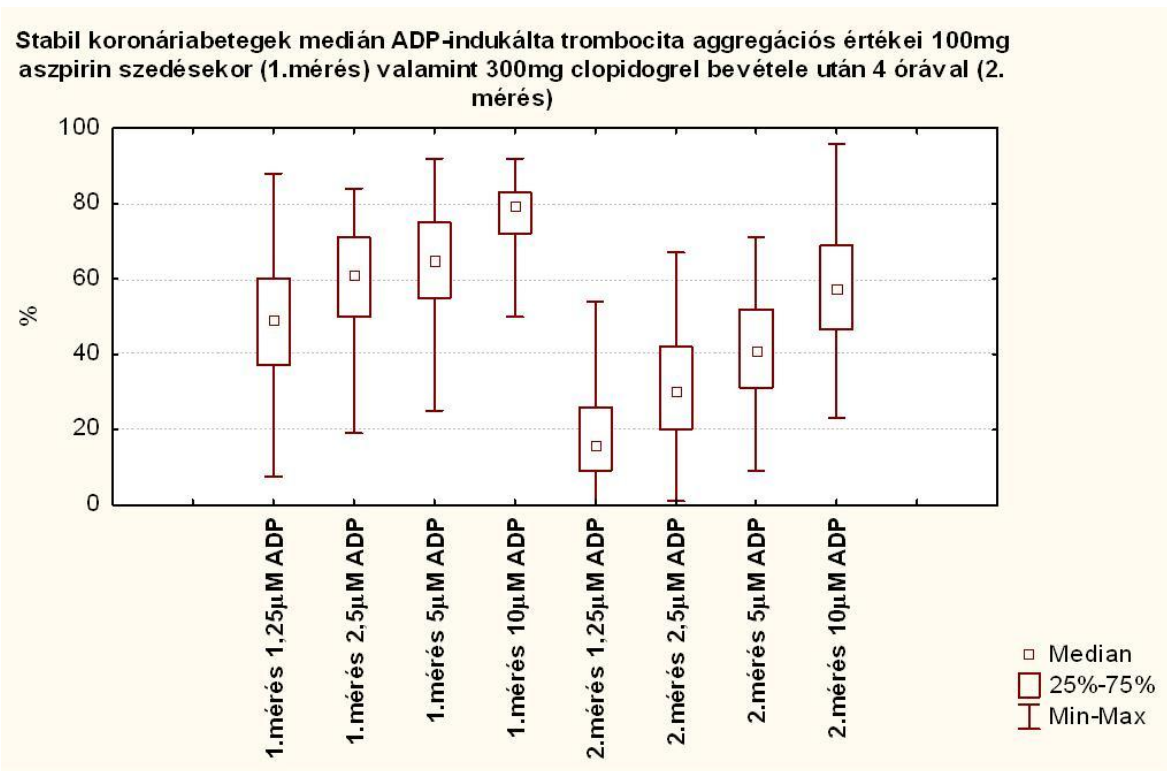
A normál eloszlású adatok prezentációja: átlag ± standard deviáció (SD), a nem normál eloszlású adatoké: medián (M) és interkvartilis „range” (IQR). A normál eloszlású adatok összehasonlításához T-tesztet használtunk; a többi változót ANOVA, Mann-Whitney-U és Wilcoxon’s Matched Pairs tesztek segítségével hasonlítottuk össze. A korrelációkat a Spearman’s Rank Order Correlation teszttel számoltuk ki. A társbetegségek és anamnesztikus adatok prevalenciáinak összehasonlítását a kvartilisek közt Fischer’s exact teszttel végeztük. A számításokat a Statistica<sup>®</sup> 7.1 software (Statsoft Inc., Tulsa, USA) segítségével végeztük. Szignifikánsnak az eredményt akkor tekintettük, ha  $p < 0.05$  volt.

## 4. Eredmények

### 4.1 A thienopyridin rezisztencia felmérése

65 aszpirinszedő stabil koronária betegen megmértük a különböző koncentrációjú ADP indukálta trombocita aggregációkat és az ADP-re vonatkoztatott EC<sub>50</sub> értéket 300mg clopidogrel bevétele előtt (1.mérés) és után 4 órával (2.mérés). Eredményeinkkel tisztázni szeretnénk volna, hogy melyik aggregációs paraméter alapján nevezhetünk egy egyént thienopyridin rezisztensnek. Ha az egyes általunk meghatározott rezisztencia kritériumok (aggregációs vagy EC<sub>50</sub> értékek 10%-nál kisebb változásai) és az atherotrombotikus gyulladáshoz kapcsolódó markerek között korrelációt találunk, akkor alapfeltevésünk szerint annak biológiai jelentősége van.

A betegek ADP indukálta trombocita aggregációs értékei rendre szignifikánsan csökkentek a 300mg clopidogrel hatására: M<sub>1.25μM ADP</sub>:49% (IQR:37–60%) versus M<sub>1.25μM ADP</sub>:16% (IQR:9–26%); M<sub>2.5μM ADP</sub>:61% (IQR:50–71%) versus M<sub>2.5μM ADP</sub>:30% (IQR:20–42%); M<sub>5μM ADP</sub>:64.5% (IQR:55–75%) versus M<sub>5μM ADP</sub>:41% (IQR:31–52%); M<sub>10μM ADP</sub>:79% (IQR:72–83%) versus M<sub>10μM ADP</sub>:57.5% (IQR:46.5–69%) p<0.001 (lásd 7.ábra).



7. ábra A stabil koronária betegek emelkedő koncentrációjú ADP indukálta trombocita aggregációs értékei 100mg aszpirin szedése mellett (1.mérés), majd 4 órával 300mg telítő dózisu clopidogrel bevétele után (2.mérés).

A fenti ADP koncentrációkat használva a Born aggregometriával meghatározott medián ADP-re vonatkoztatott  $EC_{50}$  érték  $1.375\mu M$  (IQR:  $0.998-1.68\mu M$ ) volt a clopidogrel bevétele előtt. 300mg clopidogrel beadása után 4 órával az  $EC_{50}$  érték mediánja  $2.22\mu M$  (IQR:  $1.8-2.55$ ) lett. A különbség erősen szignifikánsnak bizonyult ( $p < 0.001$ ).

Ha a  $10\mu M$  ADP-re adott aggregációs válasz 10%-nál kisebb változását tekintettük rezisztencia-kritériumnak, a rezisztens egyének száma ekkor volt a legmagasabb (15%) és jelentős mértékben csökkent alacsonyabb ADP koncentrációk esetén ( $5\mu M$ : 13.56%,  $2.5\mu M$ : 12.12%,  $1.25\mu M$ : 6.15%;  $p < 0.05$  Fisher exakt teszt). Ha az  $EC_{50}$  érték 10%-nál kisebb növekedését választottuk rezisztencia-kritériumnak, a betegek 7.94%-a bizonyult rezisztensnek.

2. táblázat A 65 stabil anginás betegtől a kiinduláskor vett vérből az alábbi táblázatban látható CRP, sCD40L és vWF szinteket mértünk ( $p > 0.05$  az összes összehasonlításban). Látható, hogy sem a különböző koncentrációjú ADP indukálta aggregációk, sem az  $EC_{50}$  érték 10%-nál kisebb változása nem jár szignifikáns különbséggel a CRP, sCD40L és a vWF szintek tekintetében. A rezisztens csoportokban nem-szignifikánsan magasabb gyulladási marker értékeket mértünk.

Rezisztencia-kritérium	1.25 $\mu$ M ADP-re adott aggregáció 10%-nál kisebb csökkenése	2.5 $\mu$ M ADP-re adott aggregáció 10%-nál kisebb csökkenése	5 $\mu$ M ADP-re adott aggregáció 10%-nál kisebb csökkenése	10 $\mu$ M ADP-re adott aggregáció 10%-nál kisebb csökkenése	ADP-re vonatkoztatott $EC_{50}$ érték 10%-nál kisebb növekedése
Prevalencia	<b>6.15%</b>	<b>12.12%</b>	<b>13.56%</b>	<b>15%</b>	<b>7.94%</b>
Szérum CRP mediánja g/l (IQR) rezisztens versus rezponder	<b>3.23</b> (1.88-12.32) vs. <b>2.53</b> (1.3-4.35)	<b>4.05</b> (3.42-4.93) vs. <b>2.36</b> (1.27-4.2)	<b>3.23</b> (1.26-5.52) vs. <b>2.5</b> (1.3-4.2)	<b>3.74</b> (3.05-4.7) vs. <b>2.26</b> (1.22-4.2)	<b>3.74</b> (3.49-4.6) vs. <b>2.36</b> (1.26-4.2)
Plazma sCD40L mediánja pg/ml (IQR) rezisztens versus rezponder	<b>274.68</b> (189.73-347.65) vs. <b>188.28</b> (155.9-267.05)	<b>220.1</b> (129.9-299.8) vs. <b>188.28</b> (154.25-269.73)	<b>199.4</b> (156.4-361) vs. <b>186.38</b> (148.75-267.05)	<b>196.73</b> (152.6-299.8) vs. <b>186.38</b> (148.75-249.55)	<b>230.1</b> (175-317.8) vs. <b>179.83</b> (148.75-249.55)
Plazma von Willebrand faktor mediánja % (IQR) rezisztens versus rezponder	<b>212.25</b> (186.5-237.99) vs. <b>150.51</b> (113.97-202.89)	<b>154.64</b> (137.31-212.28) vs. <b>151.39</b> (112.53-202.67)	<b>139.51</b> (112.53-199.42) vs. <b>156.63</b> (116.9-202.67)	<b>181.22</b> (133.88-201.05) vs. <b>150.4</b> (112.53-203.1)	<b>212.28</b> (145.24-237.99) vs. <b>150.4</b> (111.78-198.24)

A 2. táblázatból látszik, hogy a használt agonista koncentrációja pozitívan korrelál a rezisztencia prevalenciával, ami arra enged következtetni, hogy a clopidogrel hatás mérésének szenzitivitása emelkedő ADP induktor koncentrációknál csökken (lásd 2.táblázat 1-2 sor 2-5 oszlop). A molekuláris biológiai módszerekkel meghatározott  $P2Y_{12}$  receptor  $EC_{50}$  érték is 5 $\mu$ M-nál lényegesen alacsonyabb tartományban van (Bodor et al. 2003). A magasabb, 5 $\mu$ M-nál nagyobb ADP koncentrációval való indukció során előtérbe kerülnek a másodlagos amplifikációs körök, emelkedik a rezisztens egyének aránya, azonban ezek az aggregációk kevésbé informatívak a  $P2Y_{12}$  receptor gátlásáról. A gyulladási plazma markerek tekintetében egyik rezisztencia kritérium alapján szétválasztott betegcsoportok között sem volt szignifikáns különbség, azonban a gyulladási marker szintek a rezisztens csoportokban mindig magasabbak voltak.

A populáció egyes anamnesztikus és biometriai paramétereit láthatjuk az alábbi táblázatban (lásd 3.táblázat).

3. táblázat Az alábbi táblázatban a 65 aszpirin monoterápián lévő stabil koronária beteg kiindulási paramétereit láthatjuk, akik a koronária angiográfia előtt 300mg telítő dózisú clopidogrelt kaptak. A rezisztencia kritériumunk az ADP-re vonatkoztatott EC<sub>50</sub> érték 10%-nál kisebb változása volt, melyet a betegek 7.69%-a teljesített (n=5). A táblázatból látszik, hogy semmilyen vizsgált paraméter esetében sem sikerült szignifikáns különbséget mérnünk. Gyakoribb volt a rezisztensek esetében a férfi nem és a hipertónia betegség megléte, azonban a kis esetszám miatt szignifikanciáról nem beszélhetünk.

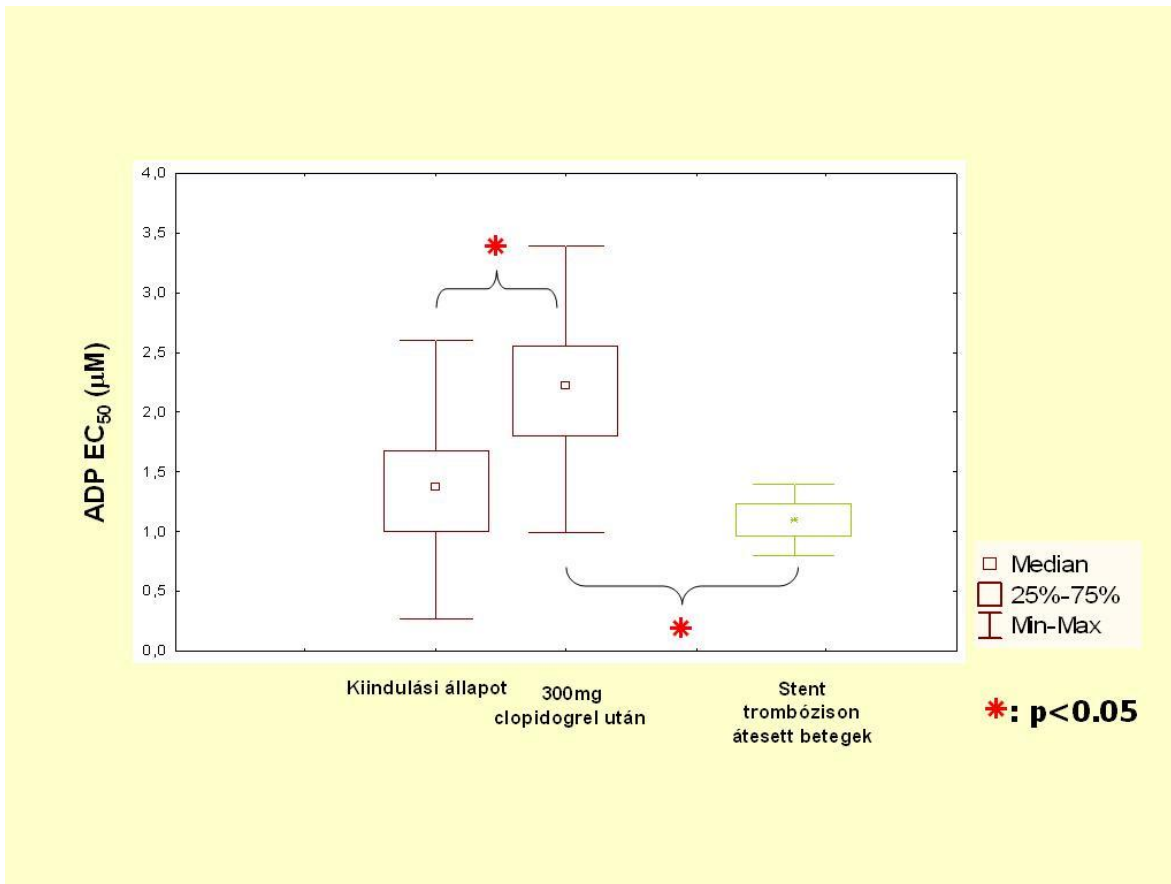
	<b>Teljes populáció (n=65)</b>	<b>Thienopyridin rezisztens (az EC<sub>50</sub> érték 10%-nál kisebb változása esetén) (n=5)</b>	<b>Thienopyridin reszponder (n=60)</b>	
<b>Kor</b> (év átlaga±SD)	<b>62.13±10.99</b>	<b>66.86±9.25</b>	<b>61.6±11.2</b>	<b>P=0.2</b>
<b>Férfi</b> n (%)	<b>44(67.69)</b>	<b>4(80)</b>	<b>40(66.67)</b>	<b>P=0.058</b>
<b>BMI</b> (átlag±SD)	<b>28.63±4.21</b>	<b>29.7±4.68</b>	<b>28.5±3.96</b>	<b>P=0.52</b>
<b>Hipertónia</b> n (%)	<b>41(63.08)</b>	<b>5(100)</b>	<b>36(60)</b>	<b>P=0.09</b>
<b>Diabetes mellitus</b> n (%)	<b>12(18.46)</b>	<b>1(20)</b>	<b>11(18.33)</b>	<b>P=0.65</b>
<b>Dohányzás</b> n (%)	<b>11(16.92)</b>	<b>1(20)</b>	<b>10(16.67)</b>	<b>P=0.62</b>
<b>ACE-inhibitor</b> n (%)	<b>41(63.08)</b>	<b>5(100)</b>	<b>36(60)</b>	<b>P=0.09</b>
<b>Béta-blokkoló</b> n (%)	<b>53(81.54)</b>	<b>5(100)</b>	<b>48(80)</b>	<b>P=0.35</b>
<b>Sztatin</b> n (%)	<b>43(66.15)</b>	<b>5(100)</b>	<b>38(63.33)</b>	<b>P=0.12</b>
<b>CABG az anamnézisben</b> n (%)	<b>4(6.15)</b>	<b>0(0)</b>	<b>4(6.67)</b>	<b>P=0.72</b>
<b>PCI az anamnézisben</b> n (%)	<b>11(16.92)</b>	<b>0(0)</b>	<b>11(18.33)</b>	<b>P=0.38</b>
<b>Miokardiális infarktus az anamnézisben</b> n (%)	<b>24(36.92)</b>	<b>3(60)</b>	<b>21(35)</b>	<b>P=0.26</b>

#### 4.2 Algoritmus a stent trombózison átesett clopidogrel rezisztens betegek kezelésére

Prospektíven identifikáltunk 10 olyan beteget, akiknél a napi 100mg aszpirin és 75mg clopidogrel terápia mellett akut/szubakut stent trombózis (n=8) vagy szubtotális reokklúzió (n=2) miatt ismételt PCI-ra került sor. Ezen betegek ADP-re vonatkoztatott EC<sub>50</sub> értéke átlagosan 1.045±0.27µM volt, 5µM ADP-re adott aggregációs válaszuk pedig 69±11%.

Emlékeztetőül a 65 aszpirinszedő stabil anginás beteg ugyanezen értékei clopidogrel bevétele előtt  $1.375\mu\text{M}$  és  $64.5\%$  voltak.

Az alábbi ábrán a clopidogrel telítő dózis utáni stabil koronária betegek és a 10 stent trombólison átesett clopidogrelszedő beteg ADP-re vonatkoztatott  $\text{EC}_{50}$  értékeit hasonlítjuk össze. A stent trombólison átesett betegeknél értelemszerűen nem volt kiindulási  $\text{EC}_{50}$  érték, mivel ezek a betegek folyamatosan clopidogrelt szedtek. A kombinált terápia melletti  $\text{EC}_{50}$  értékeket azonban össze lehetett hasonlítani a többi stabil koronária betegével. Szignifikánsan alacsonyabb  $\text{EC}_{50}$  értékeket lehetett mérni a stent trombólison átesett betegeknél a stabil betegekéhez képest ( $1.045\mu\text{M}$  versus  $2.22\mu\text{M}$   $p < 0.001$ ) (lásd 8. ábra).



8. ábra A fenti ábra bal oldalán egy aszpirinszedő, majd clopidogrel telítésen átesett stabil koronária beteg populáció ( $n=65$ ) ADP  $\text{EC}_{50}$  értékének szignifikáns növekedése látszik. Az ábra jobb oldalán 10 stent trombólison vagy szubtotális reokklúzió átesett, egyébként aszpirin- és clopidogrelszedő beteg átlagos ADP  $\text{EC}_{50}$  értéke látszik. A különbség erősen szignifikánsnak bizonyult, mely bizonyítja a clopidogrel hatástalanságát.

Algoritmust dolgoztunk ki a stent trombózison átesett, fenti módszerrel bizonyítottan clopidogrel rezisztens betegek kezelésére. Minden terápia módosítást aggregációs vizsgálat követett. A clopidogrel terápia hatásosságát az 5 $\mu$ M ADP indukálta aggregáció 55% alá csökkenése jelezte. Ezen határértéket használtuk, mivel az aszpirinszedő betegek 300mg clopidogrel bevétele utáni 5 $\mu$ M ADP indukálta aggregációjának felső kvartilise 52% volt. A 10 bizonyítottan clopidogrel rezisztens betegnél napi 150 mg clopidogrel terápiát állítottunk be, ennek hatására 5 beteg aggregációs értékei a kívánt tartományba kerültek (ADP 5 $\mu$ M: 45 $\pm$ 6%), további 2 betegben részleges hatás mutatkozott (ADP 5 $\mu$ M:55.5 $\pm$ 6.5%). Ezen 7 betegnél nem módosítottunk tovább a kezelésem. A fennmaradó 3 rezisztens beteg kezelését napi 2x250 mg ticlopidinre módosítottuk, mivel ennek metabolizmusa eltér a clopidogrelétől (CYP3A4 helyett CYP2C19). Ez 2 betegnél volt effektív (ADP 5 $\mu$ M:39 $\pm$ 3%), egyetlen olyan beteget jelezve, aki mind clopidogrelre, mind ticlopidinre rezisztens (ADP 5 $\mu$ M:64%). Az ő esetében napi 2x200 mg dipyridamol és 25 mg aszpirin valamint 2x250 mg ticlopidin kombinációját állítottuk be és így végül effektív trombocita gátlás alakult ki (ADP 5 $\mu$ M: 32%) (Tóth-Zsámboki et al. 2006; Tóth-Zsámboki és mtsai 2006).

#### **4.3 Esettanulmány: gyógyszerinterakció okozta nagyon késői DES-trombózis és szerzett thienopyridin rezisztencia**

Esettanulmányunkban, ahol a thienopyridin rezisztencia egy nagyon késői gyógyszerkibocsájtó stent trombózishoz járult hozzá, az okok tisztázása miatt trombocita aggregációs méréseket végeztünk. Az első elvégzett trombocita aggregációs vizsgálat a stent trombózis miatt történő koronária intervenció után 48 órával készült, 24 órával a GPIIb/IIIa gátló terápia leállítását után. Az aggregometria emelkedett ADP-, kollagén- és adrenalin indukálta aggregációkat mutatott. A non-szteroid gyulladásgátló terápia mellett tehát trombocita hiperaktivitást igazolt, valamint a dezaggregáció hiányát. A betegnél elhagyva a non-szteroid gyulladásgátló gyógyszereket, valamint az aszpirin és clopidogrel terápiáját meghagyva 7 nap múlva ismételt aggregometriát végeztünk, mely a trombocita



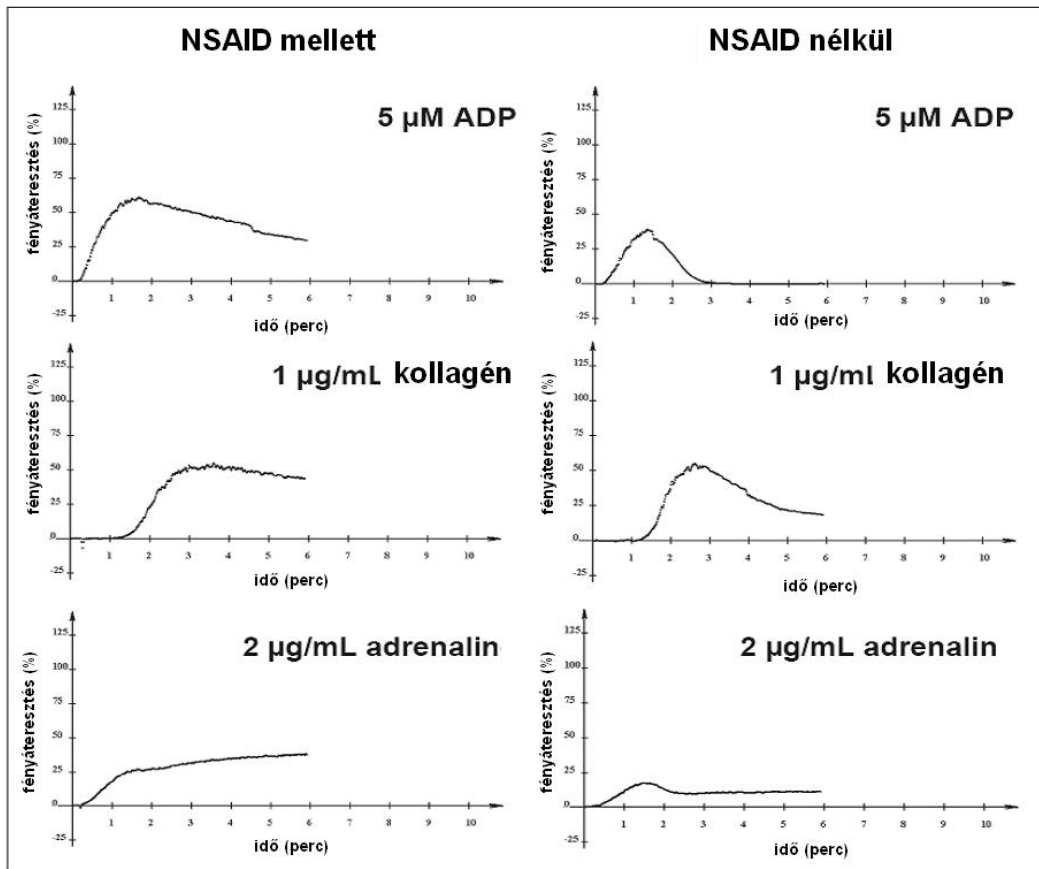
aggregáció hatásos gátlását mutatta és a második fázisban kifejezettebb dezaggregációt. A pontos eredményeket az alábbi táblázatban foglaltuk össze (lásd 4.táblázat).

4. táblázat. A táblázatban a nagyon késői stent trombózison átesett betegünk aggregometriás értékeit láthatjuk non-szteroid típusú gyulladásgátló szer szedése közben, majd anélkül. A különbségből következtethetünk a gyógyszerinterakció szerepére a megfelelő dózisban szedett kombinált aggregáció gátlószer szedése ellenére jelenlévő fokozott trombocita aggregábilisban. A gyulladásgátló szer szedése mellett az aggregáció második fázisában csökkent dezaggregáció figyelhető meg, mely az ilyenkor képződő trombocitadús trombus fokozott stabilitására enged következtetni (Merkely et al. 2009).

### **Trombocita aggregációs eredmények:**

	<b>Csúcs aggregáció (%)</b>		<b>Dezaggregáció* (%)</b>	
	<b>NSAID mellett</b>	<b>NSAID nélkül</b>	<b>NSAID mellett</b>	<b>NSAID nélkül</b>
ADP 5 $\mu$ M	60	38	29	0
Kollagén 1 $\mu$ g/ml	54	54	43	17
Adrenalin 2 $\mu$ g/ml	37	16	37	10

\*: ez a trombocita aggregáció értéke (%) 6 perccel az agonista adása után



9. ábra Az ábrán bal oldalon a non-szteroid gyulladásgátló (NSAID) terápia alatt, jobb oldalon annak megvonása után készült aggregometriás méréseket tüntettük fel. Jól látszik a bal oldalon fokozott aggregáció és a dezaggregáció hiánya (Merkely et al. 2009).

Bár a non-szteroid gyulladásgátló terápia szüneteltetése esetén megfelelő trombocita gátlás volt mérhető, a stent trombólízison átesett és clopidogrel rezisztens betegekhez hasonlóan ebben az esetben is terápiamódosítást végeztünk és emelt dózisú (napi 300mg aszpirin és 150mg clopidogrel) gyógyszerekkel bocsájtottuk el. Egy hónappal később a beteg panaszmentes volt, vérzéses szövődményt nem észleltünk.

#### 4.4 A trombocita adrenerg receptor szerepe a thienopyridin rezisztenciában

A thienopyridin hatás variabilitásának kialakulásában a bevezetőben is említett módon szerepe lehet a trombocita adrenerg receptorának illetve a keringő catecholaminoknak. Az alábbi eredmények 121 krónikusan kettős trombocita gátló terápián lévő stabil koronária beteg részvételével születtek egy olyan tanulmányban, mely prospektív módon vizsgálta a

trombocita adrenerg receptor aktivitásának valamint a plazma keringő noradrenalin szintjének az összefüggéseit a trombocita aktivitással illetve a thienopyridin terápia hatástalanságával.

5. táblázat Az alábbi táblázatban foglaltuk össze a 121 folyamatosan kettős trombocita gátló terápiában részesülő stabil anginás beteg néhány a vizsgálat szempontjából fontos klinikai paramétereit. Az alábbi beteg kvartiliseket a Módszerek fejezet 2. részében részletesen leírt indexek alapján képeztük (Béres et al. 2008).

	Minden beteg n=121	Az ADP indukálta trombocita aggregáció nagyon alacsony koncentrációjú adrenalinvaló fokozhatósága alapján		Az ADP indukálta aggregáció atipamezollal való gátlhatósága alapján		
		Alacsony kvartilis n=24	Magas kvartilis n=29	Alacsony kvartilis n=30	Magas kvartilis n=29	
<b>Kor, átlag ± SD</b>	61.63 ± 9.9	60.3 ± 8.37	61.55 ± 9.7	61.67 ± 11.2	61.24 ± 7.74	<b>NS</b>
<b>Férfi, n (%)</b>	89 (73.6)	18 (75)	23 (79.3)	21 (70)	25 (86.2)	<b>NS</b>
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup> ± SD</b>	28.12 ± 4.7	28.51 ± 4.44	26.3 ± 3.56	26.87 ± 4.9	28.14 ± 4.68	<b>NS</b>
<b>Dohányzás, n (%)</b>	43 (35.5)	9 (37.5)	11 (37.9)	11 (36.7)	11 (37.9)	<b>NS</b>
<b>Magas vérnyomás, n (%)</b>	107 (88.4)	21 (87.5)	27 (93.1)	25 (83.3)	28 (96.5)	<b>NS</b>
<b>Diabetes mellitus, n (%)</b>	44 (36.4)	10 (41.7)	10 (34.5)	8 (26.7)	13 (44.8)	<b>NS</b>
<b>Carotis szűkület, n (%)</b>	24 (19.8)	5 (20.8)	5 (17.2)	6 (20)	8 (27.6)	<b>NS</b>
<b>ACE-inhibitor, n (%)</b>	110 (90.9)	22 (91.7)	27 (93.1)	29 (96.7)	26 (89.6)	<b>NS</b>
<b>Béta-blokkoló, n (%)</b>	112 (92.6)	22 (91.7)	28 (96.6)	28 (93.3)	26 (89.6)	<b>NS</b>
<b>Sztatin, n (%)</b>	117 (96.7)	23 (95.8)	29 (100)	30 (100)	29 (100)	<b>NS</b>

	Minden beteg	Az ADP indukálta trombocita aggregáció nagyon alacsony koncentrációjú adrenalinvaló fokozhatósága alapján		Az ADP indukálta aggregáció atipamezollal való gátolhatósága alapján		
		Alacsony kvartilis n=24	Magas kvartilis n=29	Alacsony kvartilis n=30	Magas kvartilis n=29	
	n=121					
<b>CABG az anamnézisben, n (%)</b>	18 (14.9)	3 (12.5)	4 (13.8)	4 (13.3)	5 (17.2)	<b>NS</b>
<b>PCI az anamnézisben</b>	72 (59.5)	14 (58.3)	16 (55.2)	18 (60)	16 (55.2)	<b>NS</b>
<b>BMS</b>	59 (48.8)	11 (45.8)	16 (55.2)	21 (70)	14 (48.3)	<b>NS</b>
<b>DES</b>	11 (9.1)	3 (12.5)	2 (6.9)	1 (3.3)	3 (10.3)	<b>NS</b>
<b>POBA</b>	2 (1.6)	1 (4.2)	1 (3.5)	0 (0)	1 (3.5)	<b>NS</b>
<b>In-stent restenosis az anamnézisben, n (%)</b>	33 (27.3)	6 (25)	8 (27.6)	9 (30)	9 (31.0)	<b>NS</b>
<b>STEMI az anamnézisben, n (%)</b>	52 (43)	8 (33.3)	13 (44.8)	14 (46.7)	11 (37.9)	<b>NS</b>
<b>NSTEMI az anamnézisben, n (%)</b>	33 (27.3)	7 (29.2)	7 (24.1)	7 (23.3)	9 (31.0)	<b>NS</b>

Kiemelendő, hogy stabil anginás betegeink 70.3%-a szenvedett már el valamilyen akut atherotrombotikus eseményt és 74.4%-a esett át korábban katéteres vagy sebészi revaszkularizáción (lásd 5.táblázat).

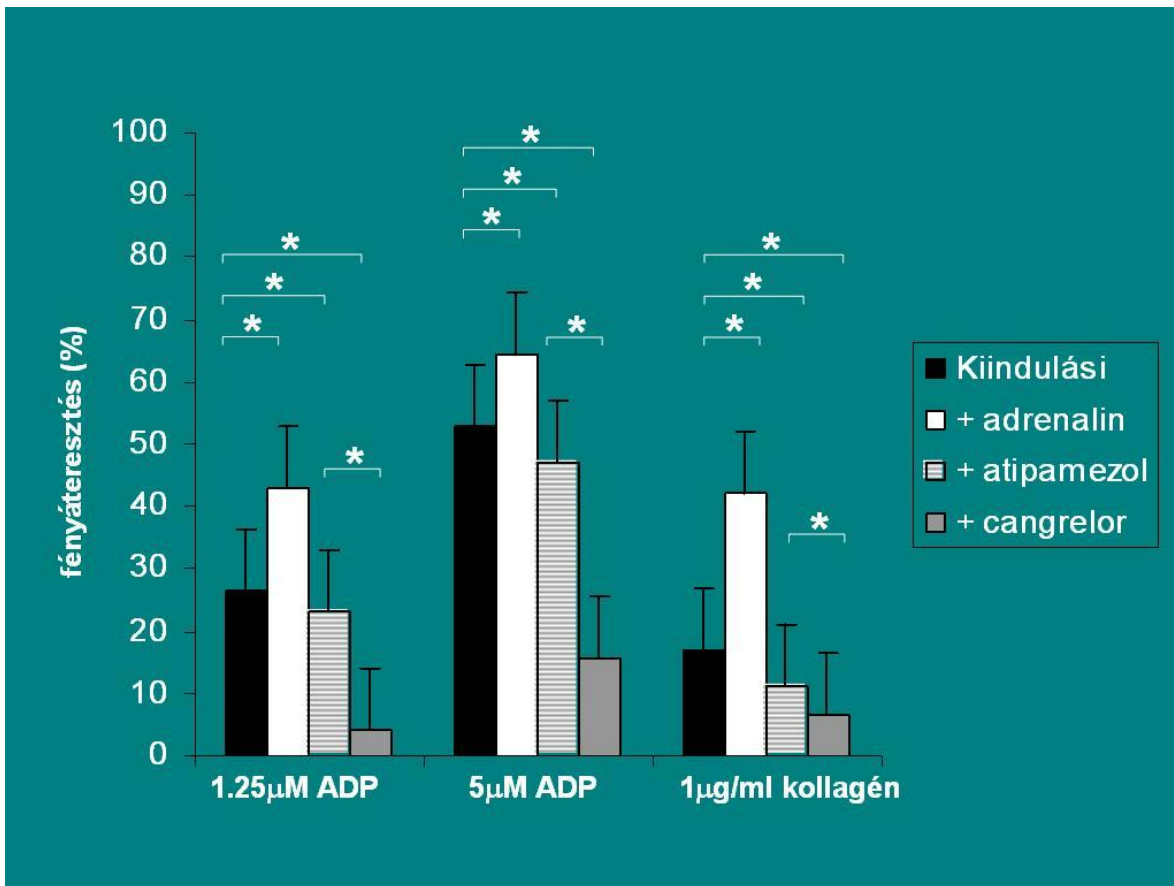
Az aggregometriás mérések során sikeresen bizonyítottuk, hogy a kettős trombocitagátló terápia ellenére a nagyon alacsony koncentrációjú adrenalin *in vitro* szignifikáns mértékben fokozta az ADP- és a kollagén indukálta trombocita aggregációkat ebben a 121 főből álló stabil anginás betegpopulációban ( $M_{1.25\mu M \text{ ADP}}:26.5\%$  [IQR:15–42.5%] versus  $M_{1.25\mu M}$

ADP+adrenalin: 43% [IQR:27–61%]  $p<0.001$ ;  $M_{5\mu\text{M ADP}}$ : 53% [IQR:38–65%] versus  $M_{5\mu\text{M ADP+adrenalin}}$ : 64.5% [IQR:50–75%]  $p<0.001$ ;  $M_{\text{kollagén}}$ : 17% [IQR:6–32%] versus  $M_{\text{kollagén+adrenalin}}$ : 42% [IQR:23–57%]  $p<0.001$  (lásd 10.ábra).

A szelektív  $\alpha\text{-}2_{\text{A}}$  adrenerg receptor antagonistá atipamezol az adrenalin indukálta trombocita aggregációt erőteljesen blokkolta:  $M_{\text{adrenalin}}$ : 27.5% (IQR:17–37%) versus  $M_{\text{adrenalin+atipamezol}}$ : 7% (IQR:3–13%)  $p<0.0001$ .

Az atipamezolnak szignifikáns ADP- és kollagén indukálta trombocita aggregáció gátló hatása is van a kettős trombocita gátlás mellett ( $M_{1.25\mu\text{M ADP}}$ : 26.5% [IQR:15–42.5%] versus  $M_{1.25\mu\text{M ADP+atipamezol}}$ : 23% [IQR:12–35%]  $p<0.001$ ;  $M_{5\mu\text{M ADP}}$ : 53% [IQR:38–65%] versus  $M_{5\mu\text{M ADP+atipamezol}}$ : 47% [IQR:34–58%]  $p<0.001$ ;  $M_{\text{kollagén}}$ : 17% [IQR:6–32%] versus  $M_{\text{kollagén+atipamezol}}$ : 11% [IQR:3–20%]  $p<0.001$ ) (lásd 10.ábra). Ezek az előzetes eredmények azt mutatják, hogy az  $\alpha\text{-}2_{\text{A}}$  receptor aktivációja hozzájárul a más agonisták - ADP és kollagén – által kiváltott aggregációkhoz.

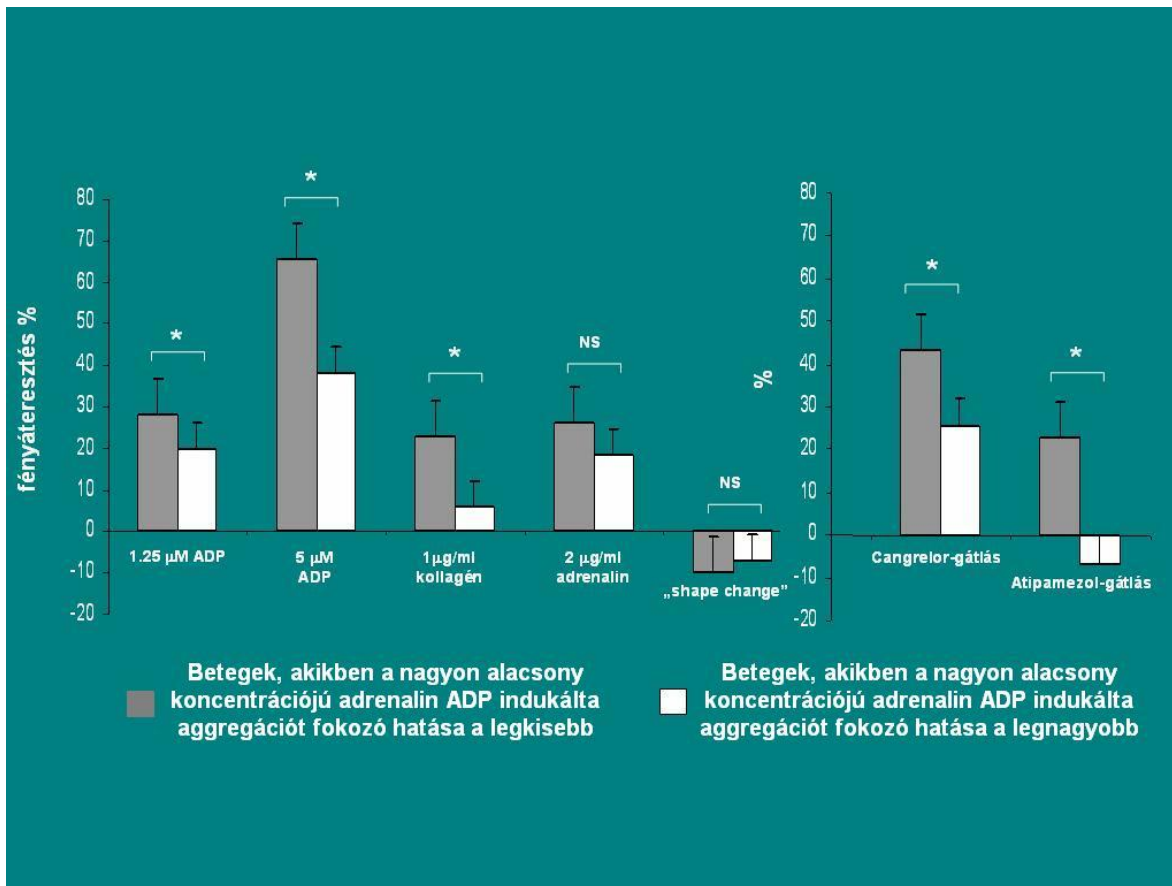
A szelektív  $\text{P}2\text{Y}_{12}$  receptor antagonistá cangrelor a trombocita gátló terápia ellenére is funkcionáló  $\text{P}2\text{Y}_{12}$  receptor készlet *in vitro* meghatározására használtuk, így képet kapva a clopidogrel terápia hatásosságáról. A cangrelor szignifikánsan és erőteljesen gátolta az ADP- és kollagén indukálta trombocita aggregációkat ( $M_{1.25\mu\text{M ADP}}$ : 26.5% [IQR:15–42.5%] versus  $M_{1.25\mu\text{M ADP+cangrelor}}$ : 4% [IQR:1–9%]  $p<0.001$ ;  $M_{5\mu\text{M ADP}}$ : 53% [IQR:38–65%] versus  $M_{5\mu\text{M ADP+cangrelor}}$ : 15.5% [IQR:9.5–22%]  $p<0.001$ ;  $M_{\text{kollagén}}$ : 17% [IQR:6–32%] versus  $M_{\text{kollagén+cangrelor}}$ : 6.5% [IQR:1–14%]  $p<0.001$ ) (lásd 10.ábra).



10. ábra A fenti ábrán a tanulmányunkban vizsgált betegpopuláció ADP- és kollagén indukálta trombocita aggregációs értékei vannak feltüntetve, valamint a nagyon alacsony koncentrációjú adrenalin aggregációt felerősítő, az atipamezol és a cangrelor szignifikáns aggregáció gátló hatása (Béres et al. 2008). \* =  $p < 0.05$

A betegeket a metodikai részben részletesen leírt indexek alapján kvartilisekbe osztottuk. Az indexeket az alapján képeztük, hogy a nagyon alacsony koncentrációjú adrenalin mennyire képes fokozni, illetve az atipamezol mennyire képes gátolni az 5µM ADP indukálta trombocita aggregációjukat. Az index alapján kvartilisekbe osztott betegcsoportok között hasonlítottuk össze a kiindulási trombocita aggregációkat, a clopidogrel terápia mellett is funkcionáló P2Y<sub>12</sub> receptor készletet, a plazma noradrenalin, a szérum C-reaktív protein, a plazma szolubilis CD40L szinteket, és az átlagos trombocita térfogatot. Az 5. táblázatban található klinikai paramétereket és anamnesztikus adatokat összehasonlítva a különböző kvartilisek között nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést. A nagyon alacsony koncentrációjú adrenalin ADP indukálta trombocita aggregációt fokozó hatása alapján a betegeket kvartilisekbe osztottuk. A legalsó kvartilisbe

tartozó (n=24) betegeknek szignifikánsan magasabb kiindulási ADP- és kollagén indukálta trombocita aggregációik voltak, mint a legfelső kvartilisbe (n=29) tartozóknak ( $M_{1.25\mu\text{M ADP alsó}}$ : 28% [IQR:20–40.5%] versus  $M_{1.25\mu\text{M ADP felső}}$ : 20% [IQR:13–28%]  $p=0.01$ ;  $M_{5\mu\text{M ADP alsó}}$ : 65% [IQR:51–73%] versus  $M_{5\mu\text{M ADP felső}}$ : 38% [IQR:30–47%]  $p<0.001$ ;  $M_{\text{kollagén alsó}}$ : 23% [IQR:12–32%] versus  $M_{\text{kollagén felső}}$ : 6% [IQR:2–16%]  $p=0.003$ ) (lásd 11.ábra). Az adrenalin indukálta aggregációik és az ADP indukálta trombocita „shape change” a legalsó kvartilisben trend szintjén magasabbak voltak, de nem különböztek szignifikánsan. Fontos eredményünk, hogy a cangrelorral mérhető gátlás ebben a legalsó kvartilisben szignifikánsan magasabb volt, vagyis itt több clopidogrel terápia mellett is működő  $P2Y_{12}$  receptor található ( $M_{\text{alsó}}$ : 43.5% [IQR:33.5–53%] versus  $M_{\text{felső}}$ : 26% [IQR:19–34%]  $p<0.001$ ) (lásd 11.ábra). Azon betegekben tehát, ahol az adrenalin a legkevésbé fokozza az ADP indukálta trombocita aggregációt több gátolatlan  $P2Y_{12}$  receptor található, mely alacsonyabb clopidogrel hatásra vagyis rezisztenciára utal. Összehasonlítottuk a kvartiliseket a szelektív  $\alpha\text{-}2_A$  adrenerg receptor antagonistá atipamezol  $5\mu\text{M}$  ADP indukálta aggregációra kifejtett gátlása szempontjából is. Inverz korrelációt találtunk, vagyis azon betegcsoportban, ahol az adrenalin a legkevésbé volt fokozható az ADP indukálta aggregáció, találtuk az atipamezolnak a legerősebb gátló hatását az ADP indukálta trombocita aggregációra ( $M_{\text{alsó}}$ : 22.9% [IQR:11.6–36.35%] versus  $M_{\text{felső}}$ : –6.45% [IQR:-29.5–11.3%]  $p<0.001$ ) (lásd 11.ábra). Eredményeink azt mutatják, hogy a nagyon alacsony koncentrációjú adrenalin a legkevésbé stimulálható betegeknél trombocita hiperaktivitás, csökkent clopidogrel hatás és a trombocita adrenerg receptorának fokozott aktivitása figyelhető meg. A szérum C-reaktív protein, a plazma szolubilis CD40L, a plazma noradrenalin szintek és az átlagos trombocita térfogat nem különböztek szignifikánsan a kvartilisek között.

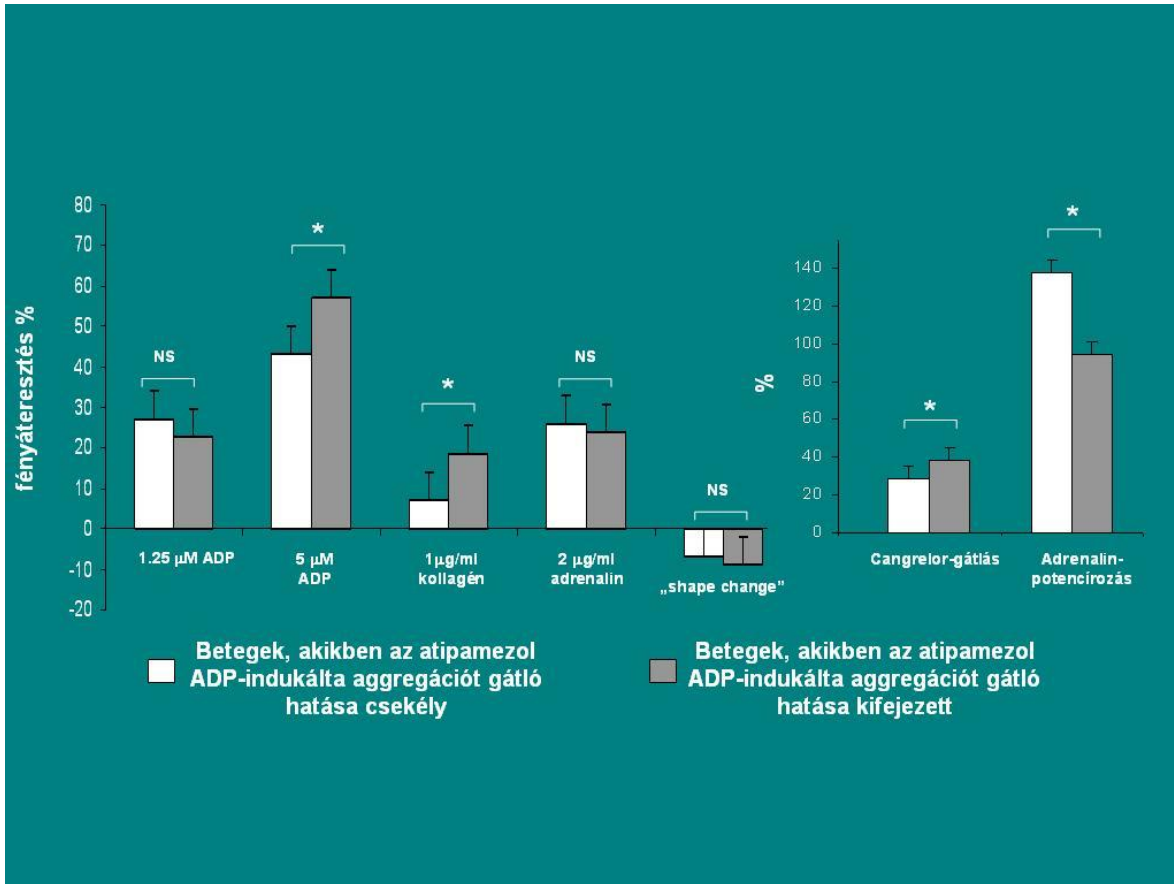


11. ábra A fenti ábrán látható, hogy azon betegekben, ahol a nagyon alacsony koncentrációjú adrenalin legkevésbé fokozza az ADP indukálta aggregációt, szignifikánsan magasabb ADP- és kollagén indukálta trombotocita aggregáció, több gátolatlan P2Y<sub>12</sub> receptor található. Ezen betegek ADP indukálta aggregációját az atipamezol szignifikánsan jobban gátolja, vagyis náluk magasabb az alpha-2<sub>A</sub> adrenerg receptor aktivitás (Béres et al. 2008).

Szerettünk volna teljes képet kapni a trombotocita adrenerg receptor szerepéről a trombotocita hiperaktivitásban, ezért a metodikai részben leírt index segítségével újra kvartilisekbe osztottuk a betegeket, de ezúttal az atipamezolnak az 5µM ADP indukálta trombotocita aggregációra kifejtett gátló hatása alapján. A várakozásoknak megfelelően a legfelső kvartilisbe tartozó (n=29) betegeknél szignifikánsan magasabb 5µM ADP- és kollagén indukálta kiindulási trombotocita aggregációkat mértünk, mint a legalsó kvartilisbe tartozó (n=30) betegeknél ( $M_{5\mu\text{M ADP felső}}$ : 57% [IQR:41.5–67%] versus  $M_{5\mu\text{M ADP alsó}}$ : 43% [IQR:33–55%]  $p=0.01$ ;  $M_{\text{kollagén felső}}$ : 18.5% [IQR:10.5–32.5%] versus  $M_{\text{kollagén alsó}}$ : 7% [IQR:0–20%]  $p=0.03$ ) (lásd 12.ábra). Hasonlóképpen a felső kvartilisben szignifikánsan magasabb cangrelorral mérhető gátlást írtunk le ( $M_{\text{felső}}$ : 41% [IQR:33–45%] versus  $M_{\text{alsó}}$ : 30%



[IQR:20–41%]  $p=0.004$ ) (lásd 12.ábra). Az eredmények alapján azon betegekben, ahol az atipamezollal a legerősebb gátlás érhető el az 5 $\mu$ M ADP indukálta trombocita aggregációra, trombocita hiperaktivitást és több működőképes P2Y<sub>12</sub> receptort mértünk. Magas atipamezollal mérhető gátlás esetén alacsony az adrenalinral kiváltható stimuláció, ami a trombocita adrenerg rendszerének már aktivált állapotára utal.



12. ábra A fenti ábrán látható, hogy azon betegeknek, akiknek ADP indukálta trombocita aggregációja az  $\alpha$ -2<sub>A</sub> receptor antagonistá atipamezollal jobban gátlható, szignifikánsan magasabb ADP- és kollagén indukálta trombocita aggregációs értékeik vannak, gátolatlan P2Y<sub>12</sub> receptoraik aránya szignifikánsan magasabb, és adrenalinral kevésbé fokozható ADP indukálta aggregációjuk (Béres et al. 2008).

A plazma noradrenalin szint és az ADP indukálta „shape change” az atipamezollal gátlás alapján legfelső kvartilisben nem-szignifikánsan magasabb volt. A szérumban C-reaktív protein, a plazma szolubilis CD40L, az átlagos trombocita térfogat és a demográfiai illetve anamnesztikus adatok nem különböztek szignifikánsan a kvartilisek között (lásd 6.táblázat).

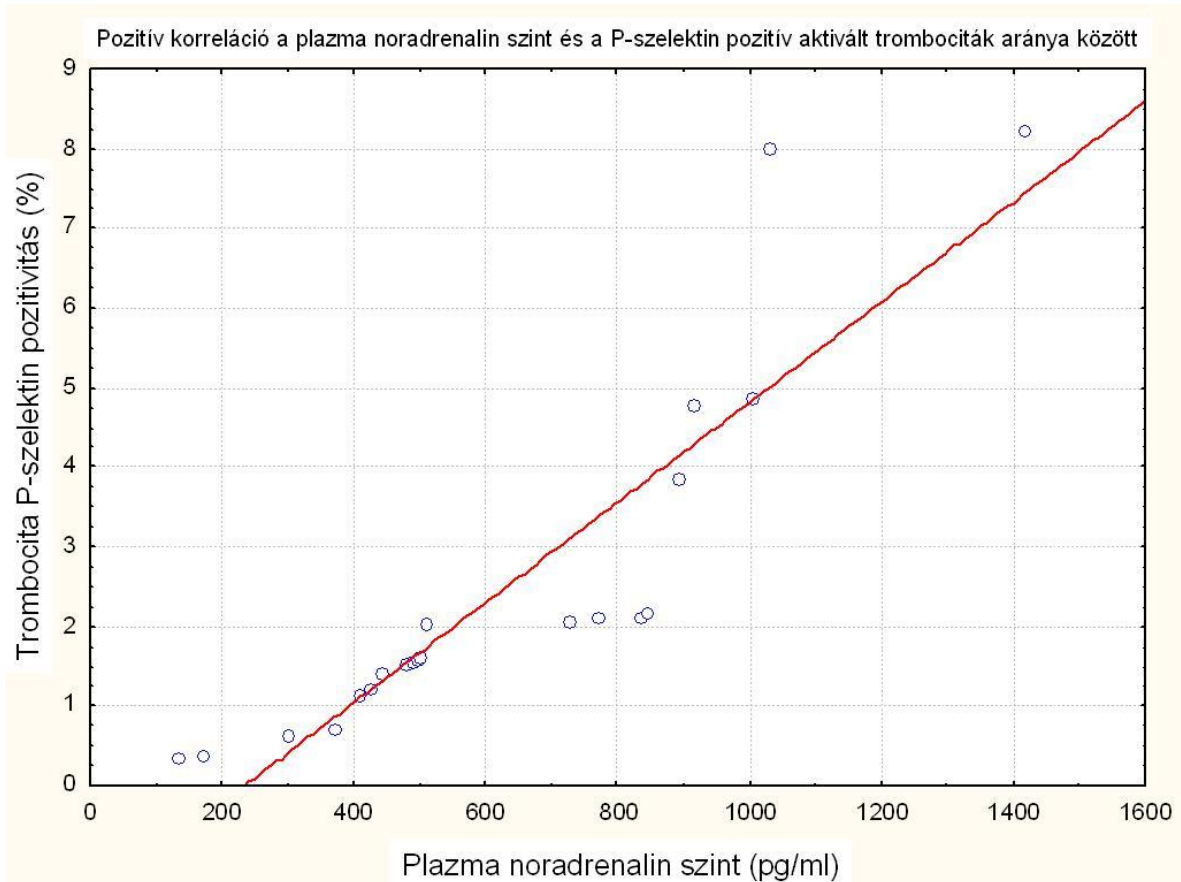
6. táblázat Az alábbi táblázatban a bal oldali oszlopban a 121 aszprin és clopidogrel szedő stabil koronária beteg átlagos trombocita térfogata, plazmában keringő noradrenalin, C-reaktív protein és CD40L szintjei vannak feltüntetve. A betegeket a metodikai részben részletezett módon az ADP indukálta aggregációjuk adrenalinval való fokozhatósága valamint a szelektív adrenerg receptor antagonistával való gátolhatósága alapján kvartilisekbe osztottuk. Az itt vizsgált trombocita aktivációs, szérum gyulladáshoz és a keringő noradrenalin szintekben nem észleltünk szignifikáns különbséget a kvartilisek között (Béres et al. 2008).

	Minden beteg	Az ADP indukálta trombocita aggregáció nagyon alacsony koncentrációjú adrenalinval való fokozhatósága alapján		Az ADP indukálta aggregáció atipamezollal való gátolhatósága alapján		
		Alacsony kvartilis n=24	Magas kvartilis n=29	Alacsony kvartilis n=30	Magas kvartilis n=29	
	n=121					
Átlagos trombocita térfogat (fl), $\pm$ SD ¶	7.7 $\pm$ 0.8	7.5 $\pm$ 0.6	7.4 $\pm$ 0.5	7.7 $\pm$ 0.9	7.5 $\pm$ 0.6	* p=0.5 **p=0.4
Plazma noradrenalin (pg/ml), medián (IQR)	515.7 (424.3–857.2)	456.3 (356.6–740.3)	498.6 (424.3–894)	512.5 (425.8–845.5)	669.8 (443.5–1065)	* p=0.39 ** p=0.35
hsCRP (g/l), medián (IQR)	2.5 (1.3–4.9)	2.2 (1.1–6.3)	2.8 (1.3–4.9)	3.1 (1.3–4.8)	2.5 (1.2–3.7)	* p=0.8 ** p=0.7
Szolubilis CD40L (pg/ml), medián (IQR)	114.5 (90.8–159.2)	102.5 (83.3–170.9)	105.6 (86.9–145.6)	126.6 (94.2–155.1)	105.8 (86.7–173.3)	* p=0.9 ** p=0.5

Az összes beteg medián plazma noradrenalin szintje 515.7 pg/ml (IQR: 424.3–857.2 pg/ml) volt (lásd 6.táblázat).

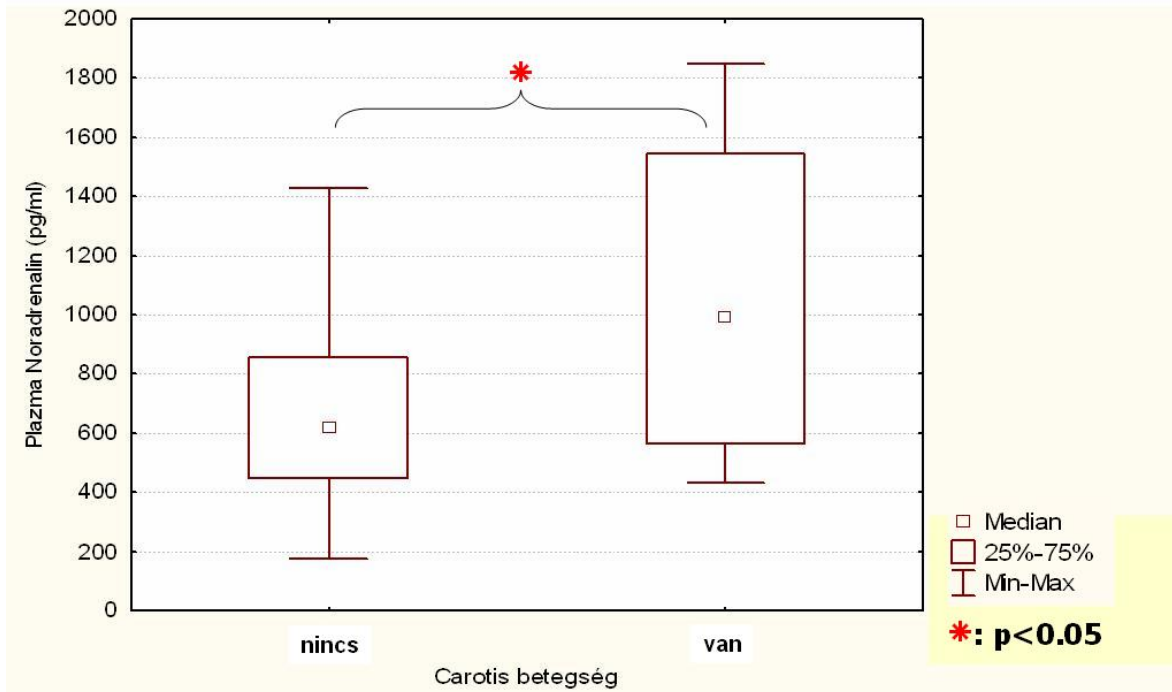
A betegek viszonylag kis hányadát vizsgáltuk áramlási citometriával (n=24), azonban érdekes eredményeket kaptunk. Szignifikáns, de gyenge pozitív korrelációt mértünk a plazma noradrenalin szint és a P-szelektin pozitív aktivált trombociták aránya között (r=0.53; Spearman Rank Order Correlation Test; lásd 13.ábra). A P-szelektin pozitivitás mediánja 1.82% (IQR:1.18–2.88%) volt. A plazma noradrenalin szint legalsó kvartilisébe

eső betegek P-szelektin pozitivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a legfelső kvartilisbe esőkéhez képest (M:0.7% [IQR:0.37–1.22%] versus M:2.08% [IQR:2.03–4.77%]  $p=0.01$ ; lásd 13.ábra) (Béres et al. 2007).



13. ábra A fenti ábrán a keringő noradrenalin szint és a trombocita P-szelektin pozitívítás közötti pozitív korreláció látható kettős trombocita gátló terápián lévő stabil koronária betegekben (Béres et al. 2007).

Érdekes részeredmény, hogy azon betegek, akiknek anamnézisében perkután carotis angioplasztika, everziós endarteriectomia vagy ultrahanggal diagnosztizált szignifikáns szűkület volt, szignifikánsan magasabb noradrenalin szinttel bírtak a többi beteggel összehasonlítva (M:790.33pg/ml [IQR:515.67-1417.5] versus M:594.165pg/ml [IQR:419.28-875.58]  $p=0.047$ ; lásd 14.ábra).



14. ábra A fenti ábrán az arteria carotis szűkülettel rendelkező stabil koronária betegek szignifikánsan magasabb plazma noradrenalin szintje látható

## 5. Megbeszélés

A magyarországi halálozási statisztikákat az atherotrombosis okozta kórképek és azok szövődményei vezetik. Ide tartoznak többek között az akut koronária szindróma és a szívizom infarktus különböző formái, az iszkémiás stroke, a perifériás artériás érelzáródások, és a perkután koronária angioplasztika egyik legsúlyosabb szövődményeként ismert koronária stent trombólzis. Ezen betegségek közös pathológiás háttere az atherotrombólzis, melynek hátterében a vaszkuláris gyulladáshos folyamatok okozta endothel diszfunkció, és a kórosan fokozott trombólcita aggregáció állnak. Az atherotrombólzis megelőzésében és kezelésében központi szerepet kapnak ezért a trombólcita gátlósherek (aszpirin, thienopyridinek, dipyridamol, GPIIb/IIIa receptor gátlók) és a háttérben álló érfali gyulladáshos modulátorai (sztatinok, ACE-gátlók/ARB-k, aszpirin).

A trombólcita gátló kezelés hatástalansága bizonyítottan az atherotrombólzis egyik rizikófaktorá, ezért megismerése és kezelése alapvető jelentőségű, különösen a koronária intervención átesett betegek esetében (Ferrari et al. 2005; Wenaweser et al. 2005; Ajzenberg et al. 2005; Cuisset et al. 2007; Barragan et al. 2003; Gurbel és Bliden et al. 2005; Wang et al. 2009). A jelenlegi ajánlások szerint a COX-1 inhibitor aszpirin és a P2Y<sub>12</sub> receptor antagonistá thienopyridinek kombinációja szükséges perkután koronária intervención átesett stabil koronária betegeknek a rekurráló adverz események megelőzésére és a kardiovaszkuláris kockázat és halálozáshos csökkentésére (Mehta et al. 2001; Steinhubl et al. 2002; Smith et al. 2006; Silber et al. 2005; Zeymer et al. 2008; Kushner et al. 2009). A terápia melletti magas trombólcita aktivitást gyakran nevezik gátlóshos rezisztenciának. A rezisztencia kifejezés egyszerűbb, azonban nem korrekt megjelölése ennek az állapotnak, hiszen ahogyan már korábban tárgyaltuk nem feltétlenül farmakológiai értelemben vett rezisztenciáról van szó, hanem egy olyan pathológiás állapotról, mely időben változékony, sok szerzett és veleszületett faktor befolyásolhatja. A diagnóshos, - mint a clopidogrel rezisztencia és a klinikai kimenetel kapcsolatával foglalkozó tanulmányoknál láttuk - sokféle nem standardizált labor metodikán alapszik, és prevalenciája is nagyrészt a választott metodikától függ. A tanulmányok túlnyomó többsége

ezért inkább a terápia ellenére magas trombocita aktivitás és következményes terápiás kudarc valamint a major kardiovaszkuláris események (koronária stent trombózis) összefüggéséről beszélnek (Gum et al. 2003; Gurbel et al. 2006; Matetzky et al. 2004; Cuisset et al. 2007; Marcucci et al. 2007). A kombinált trombocita gátló terápia mellett előforduló stent trombózis ritka esemény, kevesebb, mint 1%-ban fordul elő (Ajzenberg et al. 2005). Wang és mtsai tanulmányában a gyógyszerkibocsájtó stentek egy éven belüli trombózisa a clopidogrel rezponderekben az esetek 2.5%, míg a rezisztensek 9.2%-ában fordult elő (Wang et al. 2009). Buonamici és mtsai tanulmánya szerint a gyógyszerkibocsájtó stent trombózis háromszoros eséllyel fordul elő a clopidogrel csökkent hatékonysága mellett, de összefüggést találtak a stent hosszával, a bal kamrai ejekciós frakcióval is (Buonamici et al. 2007).

Jelen értekezés foglalkozik a gátlószer hatás variabilitás biológiai hátterének feltárásával, mérésének lehetőségeivel, nagy atherotrombotikus rizikójú betegek tanulmányozásával, rezisztens betegek kiszűrésével, terápiás algoritmus kidolgozásával, valamint a trombocita adrenerg receptor aktivitásának thienopyridin rezisztenciával való összefüggésével.

### **5.1 A thienopyridin rezisztencia felmérése**

A clopidogrel májban képződő aktív metabolitja trombocita gátló hatását a P2Y<sub>12</sub> ADP receptor irreverzibilis blokkolásával fejt ki. Ennek a trombocita receptornak központi szerepe van az aggregáció felerősödésében és a stabil okkluzív trombocitadús vérrög kialakulásában. A thienopyridinek klinikumban elért átütő terápiás sikere, mely lehetővé tette a perkután koronária intervenció során beültetett fémstentek tartós nyitvamaradását a receptor atherotrombózisban játszott központi szerepének köszönhető. A trombocita gátló hatás azonban nagy egyéni variabilitást mutat, monitorizálása, melyre bizonyos válogatott esetekben klinikai igény van részben megoldatlan. Molekuláris biológiai módszerekkel tisztázták, hogy a P2Y<sub>12</sub> receptor EC<sub>50</sub> értéke alacsony (jóval 5µM alatti) tartományban van (Bodor et al. 2003), míg a legtöbb humán trombocita vizsgálatnál magas, akár 20µM koncentrációjú ADP-t használnak (Gurbel et al. 2005). Ráadásul a különböző tanulmányok 4-30%-os clopidogrel rezisztencia prevalenciát adnak meg, melynek egyik oka az eltérő ADP koncentráció is lehet (Nguyen et al. 2005).

A 65 aszpirin szedő, majd clopidogrel telítésen áteső stabil koronária beteg, valamint a stent trombólzison átesett 10 beteg aggregációs eredményei egybehangzóan alátámasztják a fenti irodalmi adatokat, vagyis, hogy stabil koronária betegekben is alacsony mikromoláris tartományban van az ADP EC<sub>50</sub> értéke. Magas ADP koncentrációk használatával az aggregometria során túlbecsüljük a rezisztens egyének arányát, ugyanis a rezisztencia prevalenciája a használt ADP koncentrációjával pozitívan korrelál (lásd 2.táblázat 2.sor). A thienopyridinek hatékonyságának vizsgálatakor azért ajánljuk a betegek ADP EC<sub>50</sub> értékének meghatározását is, mert ezzel kiküszöbölhető az eredmény aggregometriához használt ADP koncentrációtól való függése. Az EC<sub>50</sub> érték alapján azonosított clopidogrel rezisztens egyének nem szignifikánsan, de magasabb szérumszintű hs-C-reaktív protein, plazmaszolubilis CD40L és von Willebrand faktor szintekkel rendelkeznek, melyek mind az atherotrombotikus gyulladásos folyamatok markerei és mediátorai is egyben (Shebuski és Kilgore 2002; Henn et al. 1998). Ez a megfigyelésünk is alátámasztja az EC<sub>50</sub> érték használhatóságát a rezisztens egyének kiszűrésében. A thienopyridinek hatékonyságát csökkenti a háttérben zajló gyulladásos folyamat is, mivel ez trombocita hiperaktivitást és következményes protrombotikus állapotot hoz létre. A különböző tanulmányok által leírt extrém széles prevalencia tartomány (4-30%) egyik okát tudjuk tehát kiküszöbölni a rezisztens egyének kiszűrése során az EC<sub>50</sub> érték használatával.

## **5.2 Algoritmus a stent trombólzison átesett clopidogrel rezisztens betegek kezelésére**

A trombocita gátló kezelés hatékonyságának mérésére klinikai igény van, továbbá nagy rizikójú és stent trombólzison átesett koronária betegek terápia konzekvenciával is járhat. Bizonyítottuk, hogy a stent trombólzison átesett betegek ADP EC<sub>50</sub> értéke még folyamatos clopidogrel terápia mellett is szignifikánsan alacsonyabb a clopidogrel telítés utáni stabil koronária betegekénél, de még ugyanezen betegek clopidogrel telítés előtti értékeinél is. A 10 kiválasztott stent trombólzison átesett beteg tehát bizonyítottan terápia rezisztens volt, mivel EC<sub>50</sub> értékük szignifikánsan eltért az ilyen eseményen át nem eső stabil koronária betegektől. Az általunk kidolgozott és az Eredmények fejezetben részletezett kezelési algoritmus segítségével minden beteget rezponderré tettünk. Láttuk, hogy legtöbb esetben az irányelvekből (Smith et al. 2006) ismert clopidogrel dózis emelésével is áttörhető a

rezisztencia. A többi esetben saját magunk dolgoztuk ki a terápia módosítás lépéseit és követtük aggregometriás vizsgálattal. Hazánkban ez újdonságnak számított a vizsgálat idején. A rezisztens betegek tehát egy személyre szabott trombocita gátló kezelés beállításával reszponderré tehetőek. További kérdés, hogy a fenti algoritmus alkalmazásával a kardiovaszkuláris halálozás és az adverz események mérsékelhetők e az ilyen nagy atherotrombotikus rizikójú betegek esetében, illetve, hogy ez nagyobb beteganyagban vizsgálva milyen vérzéses rizikóval jár.

### **5.3 Esettanulmány: gyógyszerinterakció okozta nagyon késői DES-trombózis és szerzett thienopyridin rezisztencia**

A nagyon késői stent trombózis, mely a stent beültetést követő egy éven túl jelentkezik, egy nagyon ritka klinikai entitás, csak esettanulmányokból ismert (Henderson et al. 2006). Az ilyen betegeknél rendszerint bizonyítható a kettős trombocita gátló kezelés hiánya vagy hatástalansága (Eisenstein et al. 2007). A re-endothelizáció hiánya miatt ismerten prolongált trombogénitást okozó gyógyszerkibocsájtó stent beültetés utáni kettős trombocita gátlás ideje a jelen ajánlások szerint legalább 12 hónap (I/B szintű evidencia) (Smith et al. 2006), de a thienopyridin terápia 15 hónapon túl megengedhető (IIb/C szintű evidencia) (Kushner et al. 2009). A mi esettanulmányunkban leírt, a DES beültetést követő 834. napon bekövetkező stent trombózisnak három oka lehetett. Non-szteroid gyulladásgátló kezelés során kialakulhat aszpirin rezisztencia, mert az aszpirin COX-1 kötőhelyét a gyógyszer elfedi. Az aszpirin rezisztencia pedig bizonyítottan összefüggésbe hozható atherotrombotikus eseményekkel (Eikelboom et al. 2002). Ezért tér ki az irányelv az ibuprofen mellőzésére STEMI-n átesett betegeknél (Antman et al. 2004). Az aggregációs mérések alapján láthattuk, hogy a non-szteroid gyulladásgátló kezelés mellett szignifikáns trombocita hiperaktivitás a kezelés megvonása után 7 nappal már nem volt jelen (lásd 9.ábra). Ugyanakkor nem zárható ki teljes biztonsággal, hogy az első mérésnél maga a stent trombózis és a koronária intervenció kiváltotta atherotrombotikus „terhelés” okozott trombocita hiperaktivitást, mivel a stent trombózist megelőző aggregációs eredmény értelemszerűen nem áll rendelkezésünkre.



Második okként felmerül a szelektív COX-2 inhibitor szedés kapcsán a prosztaciklin/TXA<sub>2</sub> egyensúly eltolódása a fokozott TXA<sub>2</sub> termelés és a pro-trombotikus endotheliális fenotípus irányába (Gislason et al. 2006). Harmadik ok lehetett a lumbális discushernia okozta fájdalom szimpatikus tónus fokozódást és emelkedett catecholamin szinteket okozó hatása is. A gyulladás és az emelkedett catecholamin szintek is elősegítik az atherotrombózist, mivel trombocita hiperaktivitást okozhatnak a kettős trombocita gátlás mellett is (Wallén et al. 1997; Li et al. 1999; Perneby et al. 2004; Perneby et al. 2007).

Esetünkben aggregációs vizsgálatokkal bizonyítottuk a trombocita hiperaktivitás jelenlétét a DES-trombózist követően 48 óra múlva. A prolongált atherotrombotikus rizikó, mely gyógyszerkibocsájtó stentek esetében a re-endothelizáció hiányából fakad, esszenciálissá teszi az ilyen stentek viselőinél a hatásos kettős trombocitagátlás fenntartását, mivel az aszpirin önmagában nem védi ki a stent trombózist. Esettanulmányunkkal és aggregációs vizsgálatainkkal hozzájárultunk annak a mélyebb és pontosabb megértéséhez, hogy miért fontos az ilyen betegekben a kombinált trombocita gátló kezelés fenntartása valamint, hogy milyen jelentős lehet a gyógyszerinterakciók szerepe az ilyen fokozott atherotrombotikus rizikójú esetekben.

#### **5.4 A trombocita adrenerg receptor szerepe a thienopyridin rezisztenciában**

Az emberi szervezetben a catecholaminok a stresszhez való alkalmazkodásban játszanak szerepet. A keringő catecholamin szintek gyorsan változnak, szórásuk akár egy nagyságrend is lehet (lásd 14.ábra). A catecholaminok a keringés centralizálásával a vitális szervek perfúzióját fogják növelni, fenntartani, és ezt a célt a különböző receptoraik szervrendszerenkénti megoszlása biztosítja. A trombociták aktivációját az alpha-2<sub>A</sub> adrenoceptor biztosítja, mely protrombotikus irányba tolja el a primer hemosztázist, így a fizikai stressz vagy a fájdalom okozta szimpatikus túlsúly fokozza a vér alvadékonyságát, a vérelemek aktiválódását hiszen a természetben a szervezetnek ilyenkor fel kell készülnie a sérülés okozta vérvesztés megelőzésére. Kóros állapotban azonban – például az atherotrombózissal járó betegségekben - az iszkémia miatt létrejövő erős fájdalom nagymennyiségű catecholamint szabadíthat fel, és ez önrontó körként az atherotrombózis progresszióját válthatja ki. A keringő catecholaminok önmagukban a trombocitára csak

gyenge hatást fejtenek ki, azonban a trombocitát egyfajta készülségi állapotra hangolják. Kutatásaink középpontjában a keringő catecholaminok trombocita aktivációra/aggregációra illetve a trombocita gátló szer rezisztenciára kifejtett hatásai állnak. Koronária stent beültetésén átesett egyének szervezetében az endothel sebe nagyon erős jel a trombocitáknak a vérrögképződés (trombózis) megindítására, hiszen a szervezet igyekszik azt begyógyítani. Ilyen betegekben a hatásos trombocita gátló terápia létfontosságú. A terápia laboratóriumi monitorozása az esetleges rezisztencia felderítésére fontos, hiszen a mechanikus tényezők (például nem megfelelően expandált stent) mellett rendszerint a gyógyszeres terápia elégtelensége vezet stent trombózishoz (Buonamici et al. 2007).

*In vivo* a keringő catecholaminok nem találhatók meg olyan koncentrációban, mellyel önmagukban aggregációt lennének képesek kiváltani. A bevezetőben említettük, hogy emberben a noradrenalin szintje jóval meghaladja az adrenalinét, ezért döntöttünk a plazma noradrenalin szint meghatározása mellett. Mivel irodalmi adatok alapján *in vitro* aggregometria során egyformán potens agonista az adrenalin és a noradrenalin is, ezért az aggregációkhoz adrenalint használtunk (Birk et al. 2003). Tisztázandó kérdés, hogy elegendő-e a keringő noradrenalin szintjét vizsgálni, hiszen az  $\alpha$ - $2_A$  receptor közelében eltérő lehet a lokális catecholamin koncentráció. A trombocita rendelkezik aktív amin „uptake” rendszerekkel, mellyel szerotonint képes tárolni. A szerotoninnal ellentétben az adrenalin, noradrenalin és a dopamin felvétele egy transzcelluláris koncentráció grádiensnek megfelelő passzív diffúziós folyamat. A trombocita tartalmaz továbbá monoamin-oxidáz-B enzimet, mely képes bontani a catecholaminokat, de nem tartalmaz catechol-O-metiltransferázt (Lahovaara et al. 1968). Mivel tehát a trombocita nem tárol sem adrenalint sem noradrenalint, úgy tűnik a trombocita  $\alpha$ - $2_A$  receptor aktiválásában döntően a keringő catecholaminoknak van jelentőségük.

A catecholaminok szerepe valószínűleg egy rásegítő mechanizmus, mely a trombociták egyéb agonisták hatására (ADP,  $\text{TXA}_2$ ) adott válaszreakcióját potenciálja, felerősíti. A klinikumban a trombocita gátló terápia ellenére fokozott trombocita reaktivitás következményes terápiás kudarcot jelenthet, melyhez a trombocita adrenerg receptora hozzájárulhat.

Említettük, hogy az aggregációs értékekben nem ismert olyan határ, melynek valós és egyértelmű biológiai jelentése lenne az atherotrombotikus betegségek lefolyása szempontjából. Az adrenerg receptor aktivitás vizsgálatánál a betegeket nem rezisztens és rezponder kategóriákba osztottuk, hanem egy folyamatos spektrum mentén vizsgáltuk őket. Ennek alapjául szolgálhatna az  $EC_{50}$  érték is, de mivel a lehető legpontosabb képet akartunk kapni a terápia ellenére még gátolatlan  $P2Y_{12}$  receptorok arányáról, ezért a metodikai részben említett szelektív gátlószer - a cangrelor - segítségével kapott rezisztencia indexet használtuk. A cangrelor segítségével pontos farmakodinamikai rezisztenciát mérünk a  $P2Y_{12}$  receptor szintjén. Megjegyzendő, hogy az adrenerg receptor aktivitás clopidogrel rezisztenciával való összefüggésének vizsgálatokor szándékosan az ADP  $EC_{50}$  értékhez közel eső -  $1.25\mu M$  és  $5\mu M$  - végkoncentrációit használtuk az aggregációs mérésekhez.

Tanulmányunkban tehát a trombocita  $\alpha_2A$  adrenoceptor szerepét vizsgáltuk a terápia ellenére magas trombocita reaktivitásban. A keringő catecholaminok és az adrenerg receptor szerepét minden aszpirin és thienopyridin rezisztenciával foglalkozó összefoglaló megemlíti. Nagyon kevés tanulmány foglalkozott konkrétan ezzel a nehezen vizsgálható problémakörrel. Christiaens és mtsai írták le, hogy a fizikai terhelés laboratóriumi módszerekkel mérhető aszpirin rezisztenciát indukál azt megelőzően aszpirin rezponder stabil koronária betegekben (Christiaens et al. 2002). Ugyanakkor Li és mtsai valamint Perneby és mtsai bizonyították be, hogy a fizikai terhelés olyan protrombotikus állapotot idéz elő, mely sem aszpirinnel sem clopidogrellel nem befolyásolható érdemben (Li et al. 1999; Perneby et al. 2004; Perneby et al. 2007). Ikarugi és mtsai pedig korábban arról számoltak be, hogy a fizikai terhelést követő fokozott trombocita és koagulációs aktivitásban a noradrenalinak fontos szerepe lehet (Ikarugi et al. 1999). Felmerülhet a kérdés, hogy miért bizonyítottan előnyös a rendszeres aerob testmozgás a kardiovaszkuláris betegek prevenciójában, ha a fizikai terhelés fokozza a trombocita reaktivitást. A válasz, hogy a rendszeres testmozgás pontosan az alternáló „shear stress” trombocita aktiváló hatását szünteti meg valószínűleg azáltal, hogy csökkenti a von Willebrand faktor kötődését a trombocitához és a P-szelektin expressziót (Wang et al. 2005). Nem volt tisztázott azonban, hogy a trombocita  $\alpha_2A$  adrenerg receptora fokozza-e a trombocita aktivitást

olyan körülmények között is, amikor az aszpirin terápia clopidogrellel van kiegészítve. Ismert azonban, hogy mind az  $\alpha$ - $2_A$  adrenoceptor, mind a P2Y<sub>12</sub> receptor képes a trombocita cAMP szintjét csökkenteni a Gi-fehérje aktiválásán keresztül (Lev et al. 2006; Yang et al. 2002). Korábban említettük, hogy a cAMP szint csökkenése központi lépés a stabil trombocita aggregáció kialakulásában, mivel a defoszforilálódó VASP fehérje a GPIIb/IIIa receptort magas fibrinogén affinitású konformációs állapotában tartja („inside-out signaling”).

Eredményeink alapján az irodalomban elsőként közöltük le, hogy a kettős trombocita gátlás ellenére *in vitro* nagyon alacsony koncentrációjú (10ng/ml) adrenalin szignifikánsan fokozza, míg a szelektív  $\alpha$ - $2_A$  adrenoceptor antagonistá atipamezol szignifikánsan gátolja az ADP- és kollagén indukálta trombocita aggregációkat (lásd 10.ábra). Ezek az eredmények az  $\alpha$ - $2_A$  adrenerg receptor aktivitásának hozzájárulását bizonyítják a trombocita aggregációhoz stabil koronária betegekben, a kettős trombocita gátlás mellett.

A betegeket aszerint osztottuk fel, hogy az alacsony koncentrációjú adrenalin mennyire fokozza, az atipamezol pedig mennyire gátolja az ADP indukálta trombocita aggregációjukat. Azon betegek, akiknek ADP indukálta aggregációját az atipamezol erőteljesebben gátolta, az ADP- és kollagén indukálta aggregációik szignifikánsan magasabbak voltak (lásd 12.ábra). Ezek a betegek szignifikánsan kevésbé voltak érzékenyek az alacsony dózisu adrenalinvaló stimulációra (lásd 12.ábra). Azok a betegekben pedig, akikben az alacsony koncentrációjú adrenalin kisebb ADP indukálta aggregáció fokozódást váltott ki, szignifikánsan magasabb ADP- és kollagén indukálta aggregációk voltak mérhetőek (lásd 11.ábra). Ezen betegek ADP indukálta aggregációit szignifikánsan kevésbé gátolta az atipamezol (lásd 11.ábra). Fordított korreláció áll fenn tehát az ADP indukálta aggregáció alacsony koncentrációjú adrenalinvaló fokozhatósága és az atipamezollal való gátolhatósága között. Lehetséges magyarázata volna az általunk leírt jelenségnek, hogy az *in vivo* keringő catecholaminok elősegítik a trombocita aktivációt az  $\alpha$ - $2_A$  adrenerg receptoron keresztül, majd ezután a trombociták egy deszenzitizációs mechanizmus miatt válnak kevésbé érzékennyé az *in vitro* hozzáadott adrenalinra úgy, hogy az antagonistá atipamezolt változatlan mértékben képesek kötni. Ezt a deszenzitizációs hipotézist nem erősíti, de nem is cáfolja, hogy a plazma noradrenalin

szint nem tért el szignifikánsan a betegcsoportok között (lásd 6.táblázat). Korábban Motulsky és mtsai mutatták be kísérletes körülmények között, hogy a trombocita  $\alpha$ - $2_A$  receptora deszenzitizálódik az adrenalinvaló preinkubáció után anélkül, hogy megváltozna a ligand-kötő kapacitása. És ami még fontosabb, a receptor adenilát-cikláshoz való kapcsolódása is változatlan marad (Motulsky et al. 1986).

Következő fontos eredményünk, hogy azokban a betegekben, ahol az atipamezol erőteljesebben gátolta, az alacsony koncentrációjú adrenalin pedig kevésbé fokozta az ADP indukálta aggregációt, a  $P2Y_{12}$  receptor antagonistá cangrelorral mért funkcionáló  $P2Y_{12}$  receptor készlet szignifikánsan nagyobb volt (lásd 12. és 13.ábrák). Az ADP indukálta trombocita aggregáció cangrelorral való *in vitro* gátlása során kapott adatok több kutatócsoport szerint is korreláltak az áramlási citometriával mért intracelluláris VASP-foszforiláció mértékével, ezért széles körben elfogadott egyszerű módszere a thienopyridin hatás mérésének (Aleil et al. 2005; Pampuch et al. 2006). Eredményeink azt mutatják, hogy a clopidogrel és aszpirin kezelt betegekben az  $\alpha$ - $2_A$  adrenerg receptor hozzájárul a terápia ellenére fennálló magas trombocita reaktivitáshoz, a megtartott  $P2Y_{12}$  receptor funkcióhoz és a következményes clopidogrel rezisztenciához. A pathomechanizmust tekintve, mind a  $P2Y_{12}$ -, mind a katecholamin-aktivált  $\alpha$ - $2_A$  adrenoceptor képes a trombocita cAMP szintjének csökkentésére az összes erre jellemző következményes jelátviteli út aktivációjával. Korábban Figures és mtsai írták le, hogy kísérletes körülmények között az adrenalinvaló aktivált trombociták ADP-kötése erősebb (Figures et al. 1986). Lahiri és mtsai kutatócsoportja pedig a clopidogrel aktív metabolitjának  $P2Y_{12}$  receptorhoz való gyengébb kötődéséről számolnak be az  $\alpha$ - $2_A$  adrenerg receptor aktivációja miatt neurológiai beteganyagon (Lahiri et al. 2005). További kutatásaink fogják tisztázni az  $\alpha$ - $2_A$  és a  $P2Y_{12}$  receptorok expressziós szintjeit a trombocita membránban Western-blot vizsgálatokkal, ugyanezen a betegpopuláción.

Tanulmányunk további kiemelkedő fontosságú üzenete, hogy a magas reziduális trombocita aktivitás *in vitro* hatásosan gátolható cangrelorral. A thienopyridinek és az ATP analóg cangrelor eltérő módon kötődnek a receptorhoz, de az intracelluláris hatásaik ( $G_i$ -fehérje aktiváció és adenilát-cikláz gátlás) ugyanazok és még additívek is (Ding et al. 2003; Aleil et al. 2005). Ez a megfigyelésünk megerősíti a cangrelor jövőbeli jelentőségét különböző

klinikai szituációkban, mint az akut koronária szindróma és a perkután koronária intervenció (Fugate és Cudd 2006).

Az adrenalin indukálta trombocita aggregáció nem különbözött szignifikánsan az adrenerg receptor aktivitás alapján képzett betegcsoportok között. Ennek oka egyrészt, hogy az adrenalin indukálta aggregáció trombocitadús plazmában egy ellentmondásos és kevésbé tisztázott jelenség. Az adrenalin önmagában nem váltja ki a trombociták aggregációját, ehhez a citrátos trombocitadús plazmában jelen lévő csökkent extracelluláris kalcium koncentrációra van szükség (Figures et al. 1986; Lanza et al. 1988). Másrészt azok az adrenalin koncentrációk, melyeket az aggregációhoz használunk a mikromoláris tartományban vannak, míg az a koncentráció, amit az ADP- és kollagén indukálta aggregációk potencírozásához használtunk, négy nagyságrenddel alacsonyabb. Mikromoláris koncentrációjú adrenalin a szervezetben nem fordul elő (Ikarugi et al. 1999), így kérdés, hogy az adrenalin indukálta trombocita aggregációnak van e bármilyen üzenete számukra a thienopyridin rezisztencia szempontjából. Aszpirin hatás és rezisztencia tekintetében azonban valószínűleg informatív az adrenalin indukálta aggregáció, hiszen Kiss és mtsai 2568 aszpirinszedő beteg 3.5 éves utánkövetése során leírták, hogy az adrenalin indukálta aggregáció alapján aszpirin rezisztensnek ítélt betegeknek 1.33-szoros relatív rizikójuk van a halálozás szempontjából (Kiss et al. 2006; Kiss és mtsai 2006).

A P-szelektin érzékeny markere a trombocita aktiválódásnak, az alpha-granulumok degranulációjakor kerül a trombocita felszínére. A degranuláció ADP-vel való stimulációkor vagy a Gi-fehérje-cAMP-PKA rendszer aktiválódásakor következik be. A P-szelektin nem található meg a nyugvó trombociták felszínén. A P-szelektin egy része szekrécióra is kerül és fokozza a trombociták által létrehozott gyulladást az atherotrombózis helyén. Továbbá az aktivált trombociták nemcsak mediátorokat bocsájtanak a trombozisz helyére, de maguk is könnyen letapadnak illetve aggregálnak (Johnston et al. 1989; Shebuski és Kilgore 2002; Vandendries et al. 2004; Blann et al. 2003). Fontos megemlíteni és a munka egyik korlátját is jelenti, hogy a P-szelektin pozitív aktivált trombocitákat detektáló áramlási citometriás méréseink a betegeknek csak egy kis hányadán történtek. Mégis a leírt gyenge, de szignifikáns pozitív korreláció a plazma noradrenalin szint és a P-szelektin pozitivitás között felhívja a figyelmet a keringő katecholaminok és a trombocita

aktivitás közötti lehetséges összefüggésre (Béres et al. 2007). Nagyon fontos lenne ezt az összefüggést nagyobb beteganyagon tisztázni.

A plazma noradrenalin szint nem különbözött szignifikánsan az adrenerg receptor aktivitás alapján képzett beteg kvartilisek között (lásd 6.táblázat). Ez egyrészt azt jelentheti, hogy az adrenerg receptor aktivitásának jelentősége nagyobb a keringő noradrenalinénál a thienopyridin rezisztencia létrejöttében. Másrészt elképzelhető, hogy a keringő noradrenalin szint jelentős szórása miatt nem találtunk szignifikáns összefüggést. Elképzelhető, hogy nagyobb beteganyagon vizsgálva korrelációt lehetne találni a keringő noradrenalin szint és a thienopyridin rezisztencia között.

Az atherosclerotikus koronária betegség lefolyása során az atherotrombózis aktivitása hullámzó. Hasonlóképpen a magas reziduális trombocita reaktivitás és a következményes gátlószer rezisztencia sem egy stabil, folyamatos jelenség, hanem számos tényező (például az érrendszeri gyulladás vagy az atherotrombotikus „terhelés” mértéke, gyógyszerinterakciók) által befolyásolva megjelenhet és eltűnhet (Poulsen et al. 2007; Helgason et al. 1994; Schäfer et al. 2007; Merkely et al. 2009). A nagyon késői gyógyszerkibocsájtó stent trombotikus esettanulmányunk szép példája ennek a megjelenő, majd eltűnő gyógyszer rezisztenciának. Ebben az esetben persze megfigyeléseinket magyarázhatja a gyógyszerinterakción túl a szisztémás gyulladás és fájdalom által kiváltott szimpatikus tónusfokozódás melyben nagyon nehezen bizonyítható szerepe lehet a felszabaduló catecholaminoknak is. Fontos megérteni, hogy az általunk leírt adrenerg komponens, mely befolyásolja a stabil anginás betegek trombocita aktivációját viszonylag gyenge és *in vitro* mérhető. Nem tudjuk azonban, hogy az általunk leírt jelenségeknek milyen szerepük van *in vivo*, illetve milyen befolyásuk van a betegek klinikai kimenetelére vagy kardiovaszkuláris kemény végpontjaira, hiszen vizsgálataink erre nem terjedtek ki. A trombocita alpha-2<sub>A</sub> receptor valószínűleg egy finomhangoló rendszer, mely követve a szervezet szimpatikus aktivációját, képes befolyásolni a trombocita reaktivitását. A fájdalom, a miokardiális iszkémia, a szívelégtelenség mind szisztémás szimpatikus aktivációval járnak és jelentősen emelhetik a trombocita reaktivitást, önrontó köröket indítva be. A szimpatikus aktiváció és a következményes catecholamin kiáramlás hozzájárulhat a trombocita aktivált állapotba juttatásához és elképzelhető, hogy a korábban

megfelelő és hatásos trombocita gátlás ellenére akut atherotrombotikus eseményhez vezethet vagy járulhat hozzá.

Jelenleg pusztán a szimpatikus tónus csökkentése például opiát analgetikum adásával akut koronária szindrómában nagyon ellentmondásos kérdés. Meine és mtsai 57039 nem-ST-elevációs akut koronária szindrómás beteg nem-randomizált, retrospektív vizsgálata során írták le, hogy a morfin adása magasabb mortalitással járt (Meine et al. 2005). A béta-blokkolók alkalmazása nagyon erős evidenciákon alapszik, és a jelenlegi ajánlások szerint is kontraindikáció hiányában minden akut koronária szindrómán vagy koronária intervención átesett betegnek adni kell (I/A szintű evidencia) (López-Sendón et al. 2004). Közismert azonban, hogy a humán trombocitán nem található működő béta adrenerg receptorok.

Schwencke és mtsai érdekes tanulmányról számoltak be, melyben 8 egészséges önkéntessel 8 napig 2x100mg metoprolol-tartarátot szedettek, majd adrenalin indukálta aggregációt, alpha-2<sub>A</sub> receptor denzitást, adenilát-cikláz aktivitást és Gi-fehérje expressziót mérték. A béta-blokkoló szedés során létrejövő transzregulációról számoltak be, mely a trombocita alpha-2<sub>A</sub> adrenerg receptor jelátviteli útját modifikálva csökkenti a trombocita aggregabilitását. Így közvetve elképzelhető, hogy a béta-blokkolókkal képesek vagyunk befolyásolni a trombocita adrenerg rendszerét és csökkenteni az aggregabilitást (Schwencke et al. 2005).

Sajnos a direkt alpha-2<sub>A</sub> adrenerg receptor inhibitorok sok nemkívánatos szisztémás mellékhatással bírnak, mivel emelik a vérnyomást és kognitív zavarokat (szedáció) okoznak. Így emberben jelenleg nincs elérhető lehetőség a trombocita adrenerg rendszerének direkt gátlására különösképpen kardiovaszkuláris megbetegedés esetén nem (Pertovaara et al. 2005).

Általánosságban elmondható az akut koronária szindrómák antitrombotikus kezelésével kapcsolatban, hogy a trombogén tényezők (például katecholaminok) blokkolása sokkal biztonságosabb volna a vérzésre adott fiziológias válaszreakciók elnyomása helyett, pontosan a vérzéses események prevalenciájának csökkentése miatt. Olyan biztonságos gyógyszer kifejlesztése, mely alpha-2<sub>A</sub> receptor gátló hatással bír, előrelépés lenne a keringő katecholaminok trombocitákon érvényesülő káros hatásainak kivédésében.



Végkövetkeztetésként elmondható, hogy a trombocita  $\alpha$ -2<sub>A</sub> adrenerg receptora a thienopyridin alapú kettős trombotagátlás ellenére direkt módon fokozza a trombociták aktivációját és aggregábilisát, *in vitro*. A magas trombocita adrenerg receptor aktivitást mutató stabil anginás betegekben a clopidogrel hatékonysága kisebb. Az  $\alpha$ -2<sub>A</sub> adrenerg receptor aktivitás – melyet *in vivo* a keringő catecholaminok befolyásolnak – dinamikusan triggereli a trombocita reaktivitását ezzel hozzájárulva a kettős trombotagátlás ellenére visszatérő adverz kardiovaszkuláris eseményekhez.

Munkánk jelentősége egyrészt a trombocita működés további tisztázásában áll olyan patológias körülmények között, mikor kettős trombocita gátlás áll fenn, tehát alapvető kóreltani jelentősége van. A heveny atherotrombotikus kórképek terápiaja során lehetőségünk van a trombocita aggregáció gátlására, a vaszkuláris gyulladás csökkentésére valamint a catecholaminok káros hatásainak kivédésére a béta-receptor blokkolókkal. A catecholaminok azonban közvetlenül hatnak a trombocitákra fokozva reaktivitásukat és a gátlószer rezisztenciát és ennek kivédésére jelen pillanatban nincsen terápia lehetőségünk. Ezért a trombocita adrenerg rendszerének megismerése és az aktiválódási folyamatok pontos molekuláris biológiai szintű tisztázása az esetleges terápia lehetőségek felfedezéséhez járulhatnak hozzá, melyek a jövőben klinikai jelentőséggel bírhatnak.

## 6. Következtetések és új eredmények

1. A thienopyridin rezisztencia trombocita aggregációs vizsgálatokor célszerű meghatározni az ADP-re vonatkoztatott EC<sub>50</sub> értéket is, így a rezisztencia prevalenciája nem függ az aggregációhoz használt ADP koncentrációjától.
2. A stent trombólison átesett betegek EC<sub>50</sub> értéke szignifikánsan alacsonyabb a stabil anginás populációéhoz képest, mely bizonyítja a thienopyridin rezisztenciát. A trombocita gátló terápia modifikálásával a stent trombólison átesett thienopyridin rezisztens betegeket reszponderré lehet tenni.
3. Trombocita aggregációs vizsgálattal bizonyítottuk egy kombinált non-szteroid gyulladásgátló kezelés mellett kialakuló nagyon késői gyógyszerkibocsájtó stent trombólis esetén a trombocita gátló terápia melletti magas trombocita aktivitás jelenlétét, majd elűnését a kezelés elhagyását követően.
4. Hazánkban elsőként vizsgáltuk a clopidogrel rezisztencia mértékét egyszerű aggregációs metodikával, a szelektív P2Y<sub>12</sub> receptor blokkoló cangrelor segítségével.
5. Új eredményünk, hogy kettős trombocita aggregáció gátlás mellett nagyon alacsony koncentrációjú adrenalinnal szignifikánsan fokozható a stabil koronária betegek ADP- és kollagén indukálta aggregációja *in vitro*.
6. Új eredményünk, hogy kettős trombocita aggregáció gátlás mellett a szelektív alpha-2<sub>A</sub> adrenoceptor antagonistá atipamezol szignifikánsan gátolja a stabil koronária betegek ADP- és kollagén indukálta aggregációját *in vitro*. Ezzel bizonyítottuk a trombocita adrenerg receptorának hozzájárulását a kettős trombocita gátló terápia melletti reziduális aktivitáshoz.

7. Elsőként írtuk le a trombocita alpha-2<sub>A</sub> adrenerg receptor aktivitásának összefüggését a kettős trombocita gátló kezelést kapó stabil koronária betegek thienopyridin rezisztenciájával.
  
8. Gyenge pozitív korrelációt találtunk az aszpirin és clopidogrel szedő stabil koronária betegek plazma noradrenalin szintje és a P-szelektin pozitív aktivált trombociták aránya között.

## 7. Összefoglalás

**Bevezetés.** A trombocita gátló terápia melletti magas trombocita aktivitás, - másnéven gátlószer rezisztencia - bizonyítottan összefüggésbe hozható atherotrombotikus eseményekkel, különösen perkután koronária intervención átesett betegeknél, ahol a jelenség akut vagy késői koronária stent trombólissal fenyeget. A rezisztencia felmérése, kezelése és a háttérben álló okok tisztázása fontosak a koronária betegség kezelésében. Felmerül a keringő catecholaminoknak és trombocita alpha-2<sub>A</sub> adrenerg receptor aktivitásának hozzájárulása a thienopyridin rezisztenciához a kettős trombocita gátlás ellenére is.

**Célok.** Célunk volt olyan aggregációs paramétert találni, mellyel elkülöníthetők a rezisztens betegek. Terápiás algoritmust szerettünk volna kidolgozni a stent trombólison átesett clopidogrel rezisztens betegek számára. Tisztázni szerettük volna a szerzett thienopyridin rezisztencia okát egy nagyon késői DES-trombólisos esetben. Tisztázni szerettük volna a keringő noradrenalin és a trombocita alpha-2<sub>A</sub> adrenerg receptor aktivitásának a szerepét a thienopyridin rezisztencia kialakulásában.

**Eredmények.** Az ADP EC<sub>50</sub> érték segítségével az aggregációhoz használt ADP koncentrációtól függetlenül határoztuk meg a rezisztens betegek arányát. A stent trombólison átesett betegek ADP EC<sub>50</sub> értéke szignifikánsan alacsonyabb volt a többi betegénél. Az érvényes irányelvek alapján módosítottuk a stent trombólison átesett clopidogrel rezisztens betegek kezelését, így minden beteget reszponderré tettünk és ezt aggregometriás mérésekkel is alátámasztottuk. Bizonyítottuk, hogy kettős trombocita gátlás mellett alacsony koncentrációjú adrenalinral fokozható, szelektív adrenerg receptor antagonistával pedig gátolhatóak az ADP- és kollagén indukálta aggregációk. Bizonyítottuk, hogy azon betegeknél, ahol a trombocita alpha-2<sub>A</sub> adrenerg receptor aktivitása nagyobb, több funkcionáló P2Y<sub>12</sub> receptor található, és hogy ezen betegek magasabb kiindulási ADP- és kollagén indukálta aggregációs értékekkel bírnak.

**Megbeszélés.** Eredményeinkkel hozzájárultunk a thienopyridin rezisztencia, valamint a trombocita alpha-2<sub>A</sub> receptor működésének pontosabb megértéséhez kóros körülmények között.

## 8. Summary

**Introduction.** High on-treatment platelet reactivity – or so called antiplatelet drug resistance - is proven to be linked to atherothrombotic events, especially in patients underwent percutaneous coronary intervention, where failure of antiplatelet therapy can result in acute or late coronary stent thrombosis. Investigation and therapy of every possible factor related to drug resistance have impact on the management of coronary artery disease. Circulating catecholamines and platelet alpha-2<sub>A</sub> adrenergic receptor activity might contribute to thienopyridin resistance despite dual antiplatelet therapy.

**Aims.** Definition of antiplatelet drug resistance is still confusing. Our aim was to find a platelet aggregation parameter by which we can separate non-responders. Clopidogrel resistant patients suffering stent thrombosis need modification of antiplatelet therapy. In a very late DES-thrombosis case our aim was to find the reason of acquired high on-treatment platelet reactivity. Finally, the main goal of our study was to find correlation between alpha-2<sub>A</sub> adrenergic receptor activity and high on-treatment platelet reactivity in stable coronary disease patients on dual antiplatelet therapy.

**Results.** By calculating the ADP EC<sub>50</sub> value based on aggregometry results, we defined non-responders independently of the used ADP concentration. Patients with stent thrombosis have significantly lower ADP EC<sub>50</sub> value compared with coronary artery disease patients. Based on current guidelines we modified antiplatelet therapy of these patients and all of them became thienopyridin responders based on aggregometry results. We showed that despite dual antiplatelet therapy, epinephrine at very low concentration potentiates, while selective adrenergic receptor blocker inhibits ADP- and collagen induced platelet aggregations. In patients with greater alpha-2<sub>A</sub> adrenergic receptor activity, we found greater uninhibited P2Y<sub>12</sub> receptor pool and higher ADP- and collagen induced aggregations despite dual antiplatelet therapy.

**Conclusion.** With all these results we contributed to the more precise understanding of the background of thienopyridine resistance, and the role of platelet alpha-2<sub>A</sub> adrenergic receptor function under pathological conditions.

## 9. Irodalomjegyzék

Ajzenberg N, Aubry P, Huisse MG, Cachier A, El Amara W, Feldman LJ, Himbert D, Baruch D, Guillin MC, Steg PG. Enhanced shear-induced platelet aggregation in patients who experience subacute stent thrombosis: a case-control study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(11):1753–1756.

Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost*. 2005;3(1):85–92.

Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Cavallari U, Trabetti E, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Bañuelos C, Costa MA, Bass TA, Pignatti PF, Macaya C. Lack of association between the P2Y<sub>12</sub> receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2005;116(6):491-497.

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(7329):71–86.

Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M, Hochman JS, Krumholz HM, Kushner FG, Lamas GA, Mullany CJ, Ornato JP, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC Jr; American College of Cardiology; American Heart Association; Canadian Cardiovascular Society. ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction—Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(3):671–719.

Ariens RA, Philipou H, Nagaswani C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of FXIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood*. 2000;96:988-936.

Ariens RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood*. 2002;100:743-54.

Aukrust P, Müller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brusvig A, Solum NO, Forfang K, Frøland SS, Gullestad L. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1999;100(6):614-20.

Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A - Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2009;373(9678):1821

Balsano F, Rizzon P, Violi F, Scrutinio D, Cimminiello C, Aguglia F, Pasotti C, Rudelli G. Antiplatelet treatment with ticlopidine in unstable angina. A controlled multicenter clinical trial. The Studio della Ticlopidina nell'Angina Instabile Group. *Circulation*. 1990;82:17–26.

Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, Macaluso G, Commeau P, Comet B, Lafont A, Camoin L, Walter U, Eigenthaler M. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003;59(3):295–302.

Béres BJ, Tóth-Zsámboki E, Vargová K, Kiss N, Kovács A, Husvéth A, László A, Masszi T, Préda I, Kiss RG: High Norepinephrine Level Is Associated With Significant Platelet

Hyperreactivity Demonstrated By Increased Platelet P-selectin Positivity, Adenosin Diphosphate And Collagen Induced Aggregations In Stable Coronary Heart Disease Patients On Dual Antiplatelet Therapy. *J Thromb Haemost.* 2007;5 Supplement 2:P-T-333.

Béres BJ, Tóth-Zsámboki E, Vargová K, László Á, Masszi T, Kerecsen G, Préda I, Kiss RG. Analysis of platelet  $\alpha_2$ -adrenergic receptor activity in stable coronary artery disease patients on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost.* 2008;100(5):829-38.

Birk AV, Leno E, Robertson HD, Bolotina VM, Szeto HH. Interaction between ATP and catecholamines in stimulation of platelet aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(2):H619-25

Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2003;24:2166–2179.31–34.

Bodor ET, Waldo GL, Hooks SB, Corbitt J, Boyer JL, Harden TK. Purification and functional reconstitution of the human P2Y<sub>12</sub> receptor. *Mol Pharmacol.* 2003;64(5):1210-6.

Brodde OE, Bruck H, Leineweber K. Cardiac Adrenoceptors: Physiological and Pathophysiological Relevance. *J Pharmacol Sci.* 2006;100:323–337.

Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, Gensini GF, Santini A, Paniccia R, Moschi G, Gori AM, Abbate R, Antoniucci D. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(24):2312-7.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Trendelenburg AU. IV. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994;46:121–136.



Bylund DB. Alpha-2 adrenoceptor subtypes: are more better? *Br J Pharmacol.* 2005;144(2):159–160.

Catella F, Reilly MP, Delanty N, Lawson JA, Moran N, Meagher E, FitzGerald GA. Physiological formation of 8-epi-PGF<sub>2</sub> alpha in vivo is not affected by cyclooxygenase inhibition. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1995;23:233-6.

Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerald GA. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med.* 2001;345:1809–1817.

Chen WH, Lee PY, Ng W, Tse HF, Lau CP. Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1122–1126.

Christensen NJ, Videbaek J. Plasma Catecholamines and Carbohydrate Metabolism in Patients with Acute Myocardial Infarction. *J Clin Invest.* 1974;54:278-286.

Christiaens L, Macchi L, Herpin D, Coisne D, Duplantier C, Allal J, Mauco G, Brizard A. Resistance to aspirin in vitro at rest and during exercise in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Thromb Res.* 2002;108(2-3):115–9.

Cipollone F, Ciabattini G, Patrignani P, Pasquale M, Di Gregorio D, Bucciarelli T, Davi G, Cuccurullo F, Patrono C. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation.* 2000;102:1007–1013.

Clarke RJ, Mayo G, Price P, FitzGerald GA. Suppression of thromboxane A<sub>2</sub> but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N Engl J Med.* 1991;325:1137–1141.

Clarke TA, Waskell LA. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(1):53-9.

Cohen HW, Crandall JP, Hailpern SM, Billett HH. Aspirin resistance associated with HbA1c and obesity in diabetic patients. *J Diabetes Complications.* 2008;22(3):224-8.

Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ. Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke.* 2006;37:2153–2158.

Cosemans J, Munnix I, Wetzker R, Heller R, Jackson S, Heemskerk J. Continuous signaling via PI3K isoforms  $\beta$  and  $\gamma$  is required for platelet ADP receptor function in dynamic thrombus stabilization. *Blood.* 2006;108:3045–3052.

Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, Milo O, Vered Z, Krakover R, Kaluski E, Kornberg A. Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *Am Heart J.* 2004;147:293–300.

Crouch MF, Winegar DA, Lapetina EG. Epinephrine induces changes in the subcellular distribution of the inhibitory GTP-binding protein  $G_{i\alpha-2}$  and a 38-kDa phosphorylated protein in the human platelet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:1776-1780.

Csiszar A, Stef G, Pacher P, Ungvari Z. Oxidative stress-induced isoprostane formation may contribute to aspirin resistance in platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66:557–558.

Cuisset T, Frere C, Quilici J, Morange PE, Nait-Saidi L, Mielot C, Bali L, Lambert M, Alessi MC, Bonnet JL. High post-treatment platelet reactivity is associated with a high incidence of myonecrosis after stenting for non-ST elevation acute coronary syndromes. *Thromb Haemost.* 2007;97(2):282–287.

Dangelmaier C, Jin J, Daniel JL, Smith JB, Kunapuli SP. The P2Y<sub>1</sub> receptor mediates ADP-induced p38 kinase-activating factor generation in human platelets. *Eur J Biochem.* 2000;267:2283-2289.

Davi G, Guagnano MT, Ciabattoni G, Basili S, Falco A, Marinopicolli M, Nutini M, Sensi S, Patrono C. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA.* 2002;288:2008–2014.

Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell.* 2005;122:379–391.

Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Inactivation of the human P2Y<sub>12</sub> receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood.* 2003;101(10):3908–3914.

Dorsam RT, Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Coordinated signaling through both G<sub>12/13</sub> and G<sub>i</sub> pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets. *J Biol Chem.* 2002;277(49):47588–47595.

Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y<sub>12</sub> receptor in platelet activation. *J Clin Invest.* 2004;113:340–5.

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

Eisenstein EL, Anstrom KJ, Kong DF, Shaw LK, Tuttle RH, Mark DB, Kramer JM, Harrington RA, Matchar DB, Kandzari DE, Peterson ED, Schulman KA, Califf RM. Clopidogrel use and long-term clinical outcomes after drug-eluting stent implantation. *JAMA*. 2007;297(2):159-68.

Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Ruf A, Dickfeld T, Scharfl M, Pogátsa-Murray G, Hetzer R, Fleck E, Gawaz M. Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy. *Circulation*. 2000;102(8):890–897.

Féliste R, Delebassée D, Simon MF, Chap H, Defreyn G, Vallée E, Douste-Blazy L, Maffrand JP. Broad spectrum anti-platelet activity of ticlopidine and PCR 4099 involves the suppression of the effects of released ADP. *Thromb Res*. 1987;48(4):403-15.

Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E, Sawicki G, Wozniak M, Radomski MW, Davidge ST. Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2. *Thromb Haemost*. 1999;82(6):1730–1735.

Ferrari E, Benhamou M, Cerboni P, Marcel B. Coronary syndromes following aspirin withdrawal: a special risk for late stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:456–459.

Figures WR, Scearce LM, Wachtfogel Y, Chen J, Colman RF, Colman RW. Platelet ADP receptor and alpha 2-adrenoceptor interaction. Evidence for an ADP requirement for epinephrine-induced platelet activation and an influence of epinephrine on ADP binding. *J Biol Chem*. 1986;261(13):5981–5986.

FitzGerald GA, Oates JA, Hawiger J, Maas RL, Roberts LJ 2nd, Lawson JA, Brash AR. Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man. *J Clin Invest*. 1983;71:676–688.

Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y<sub>12</sub> gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*. 2003;108(8):989-995.

Fontana P, Gandrille S, Remones V, Dupont A, Reny JL, Aiach M, Gaussem P. Identification of functional polymorphisms of the thromboxane A<sub>2</sub> receptor gene in healthy volunteers. *Thromb Haemost*. 2006;96:356-60.

Frere C, Cuisset T, Quilici J, Camoin L, Carvajal J, Morange PE, Lambert M, Juhan-Vague I, Bonnet JL, Alessi MC. ADP-induced platelet aggregation and platelet reactivity index VASP are good predictive markers for clinical outcomes in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Thromb Haemost*. 2007;98:838-843.

Fugate SE, Cudd LA. Cangrelor for treatment of coronary thrombosis. *Ann Pharmacother*. 2006;40:925-930.

Gachet C. P<sub>2</sub> receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*. 2008;99(3):466-72.

Gilard M, Arnaud B, Le Gal G, Abgrall JF, Boschat J. Influence of omeprazol on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2508-9.

Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, Le Gal G, Lacut K, Le Calvez G, Mansourati J, Mottier D, Abgrall JF, Boschat J. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(3):256-60.

Gislason GH, Jacobsen S, Rasmussen JN, Rasmussen S, Buch P, Friberg J, Schramm TK, Abildstrom SZ, Kober L, Madsen M, Torp-Pedersen C. Risk of death or reinfarction associated with the use of selective cyclooxygenase-2 inhibitors and nonselective

nonsteroidal antiinflammatory drugs after acute myocardial infarction. *Circulation*. 2006;113:2906–2913.

Gorchakova O, von Beckerath N, Gawaz M, Mocz A, Joost A, Schömig A, Kastrati A. Antiplatelet effects of a 600 mg loading dose of clopidogrel are not attenuated in patients receiving atorvastatin or simvastatin for at least 4 weeks prior to coronary artery stenting. *Eur Heart J*. 2004;25:1898-1902.

Greenbaum AB, Grines CL, Bittl JA, Becker RC, Kereiakes DJ, Gilchrist IC, Clegg J, Stankowski JE, Grogan DR, Harrington RA, Emanuelsson H, Weaver WD. Initial experience with an intravenous P2Y<sub>12</sub> platelet receptor antagonist in patients undergoing percutaneous coronary intervention: results from a 2-part, phase II, multicenter, randomized, placebo- and active-controlled trial. *Am Heart J*. 2006;151(3):689.e1-689.e10.

Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. 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.

Gurbel PA, Bliden KP, Guyer K, Cho PW, Zaman KA, Kreutz RP, Bassi AK, Tantry US. Platelet reactivity in patients and recurrent events poststenting: results of the PREPARE POST-STENTING study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(10):1820–1826.

Gurbel PA, Bliden KP, Samara W, Yoho JA, Hayes K, Fissaha MZ, Tantry US. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1827–1832.

Gurbel PA, Lau WC, Bliden KP, Tantry US. Clopidogrel resistance: implications for coronary stenting. *Curr Pharm Des*. 2006;12(10):1261–1269.

Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel resistance? *Thromb Res*. 2007;120:311-321.

Hall P, Nakamura S, Maiello L, Itoh A, Blengino S, Martini G, Ferraro M, Colombo A. A randomized comparison of combined ticlopidine and aspirin therapy versus aspirin therapy alone after successful intravascular ultrasound-guided stent implantation. *Circulation*. 1996;93:215–222.

Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct  $\alpha_2$ -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*. 1999;402:181–184.

Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL, Brace LD. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke*. 1994;25(12):2331–2336.

Henderson D, Gunalingam B. Very late stent thrombosis of a sirolimus-eluting stent. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2006;68(3):406-8.

Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391(6667):591–594.

Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L)-subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets*. 2001;12(2):74–82.

Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood*. 2006;108:2244-2247.

Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 1998;97:716–720.

Ikarugi H, Taka T, Nakajima S, Noguchi T, Watanabe S, Sasaki Y, Haga S, Ueda T, Seki J, Yamamoto J. Norepinephrine, but not epinephrine, enhances platelet reactivity and coagulation after exercise in humans. *J Appl Physiol.* 1999;86(1):133–138.

Johnston GI, Cook RG, MacEver RP. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell.* 1989;56:1033–1044.

Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):8070-4.

Kanagy NL.  $\alpha_2$ -Adrenergic receptor signalling in hypertension. *Clinical Science.* 2005;109:431–437.

Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BA, Michelson AD. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation.* 1993;88(4 Pt 1):1502–1511.

Keularts IMLW, van Gorp RMA, Feijge MAH, Vuist WMJ, Heemskerk JWM.  $\alpha_{2A}$ -Adrenergic Receptor Stimulation Potentiates Calcium Release in Platelets by Modulating cAMP Levels. *J Biol Chem.* 2000;275(3):1763–1772.

Kiss RG, Stef G, Poór F, Seres E, Pongrácz E, Németh L, Béres BJ, Préda I (Budapest, Balatonfüred, Mosonmagyaróvár, Szeged, Zalaegerszeg) Aspirin resistance is associated with higher mortality. A 3.5-year follow up, five-center experience in 2568 cardiovascular patients. *World Congress of Cardiology 2006*; P4524.

Kiss RG, Stef G, Seres E, Németh L, Poór F, Pongrácz E, Béres BJ, Kerecsen G, Veres G, Préda I. Az aszpirinrezisztencia fokozza a halálozást – 2568 cardiovascularis beteg öt



centrum által, 3,5 éven át végzett utánkövetésének eredményei. *Cardiologia Hungarica Abstr Suppl.* 2006;36:A48.

Koyama H, Maeno T, Fukumoto S, Shoji T, Yamane T, Yokoyama H, Emoto M, Shoji T, Tahara H, Inaba M, Hino M, Shioi A, Miki T, Nishizawa Y. Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans. *Circulation.* 2003;108(5):524–529.

Kroll MH, Hellums JD, MacIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood.* 1996;88(5):1525–1541.

Kushner FG, Hand M, Smith SC Jr, King SB 3rd, Anderson JL, Antman EM, Bailey SR, Bates ER, Blankenship JC, Casey DE Jr, Green LA, Hochman JS, Jacobs AK, Krumholz HM, Morrison DA, Ornato JP, Pearle DL, Peterson ED, Sloan MA, Whitlow PL, Williams DO. 2009 focused updates: ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction (updating the 2004 guideline and 2007 focused update) and ACC/AHA/SCAI guidelines on percutaneous coronary intervention (updating the 2005 guideline and 2007 focused update) a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(23):2205-41.

Lahiri P, Chaudhuri U, Chattopadhyay A, Chakraborty P, Mandal D, Dasgupta AK. Structural insights in platelet receptor synergism – antiplatelet therapy in post-ischemic cerebrovascular events. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;34(3):248–256.

Lahovaara S, Paasonen MK, Airaksinen MM. Rate of metabolism of adrenaline and 5-hydroxytryptamine by blood platelets. *Ann Med Exp Biol Fenn.* 1968;46:453-456.

Lanza F, Beretz A, Stierlé A, Hanau D, Kubina M, Cazenave JP. Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. *Am J Physiol.* 1988;255(6 Pt 2):H1276–1288.

Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS, Tait AR, Carville DGM, Guyer KE, Bates ER. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation. A new drug–drug interaction. *Circulation.* 2003;107:32-37.

Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DGM, Guyer KE, Tait AR, Bates ER. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation.* 2004;109:166-171.

Leon C, Alex M, Klocke A, Morgenstern E, Moosbauer C, Eckly A, Spannagl M, Gachet C, Engelmann B. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood.* 2004;103:594–600.

Lepántalo A, Mikkelsson J, Reséndiz JC, Viiri L, Backman JT, Kankuri E, Karhunen PJ, Lassila R. Polymorphisms of COX-1 and GP VI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost.* 2006;95:253-9.

Lev EI, Patel RT, Maresh KJ, Guthikonda S, Granada J, DeLao T, Bray PF, Kleiman NS. Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the role of dual drug resistance. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(1):27–33.

Li N, Wallén NH, Hjemdahl P. Evidence for prothrombotic effects of exercise and limited protection by aspirin. *Circulation.* 1999;100:1374-1379.

Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol.* 1995;2:637-643.

López-Sendón J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, Tendera M, Waagstein F, Kjekshus J, Lechat P, Torp-Pedersen C. Task force on beta-blockers of the European Society of Cardiology. Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. *Eur Heart J*. 2004;25(15):1341–1362.

Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG. 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(14):1702–1708.

Makaritsis KP, Johns C, Gavras I, Altman JD, Handy DE, Bresnahan MR, Gavras H. Sympathoinhibitory Function of the  $\alpha_{2A}$ -Adrenergic Receptor Subtype. *Hypertension*. 1999;34:403-407.

Marcucci R, Panicia R, Antonucci E, Poli S, Gori AM, Valente S, Giglioli C, Lazzeri C, Prisco D, Abbate R, Gensini GF. Residual platelet reactivity is an independent predictor of myocardial injury in acute myocardial infarction patients on antiaggregant therapy. *Thromb Haemost*. 2007;98(4):844–851.

Maree AO, Curtin RJ, Dooley M, Conroy RM, Crean P, Cox D, Fitzgerald DJ. Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1258–1263.

Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, Crean P, Shields DC, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost*. 2005;3:2340–2345.

Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Bienart R, Goldenberg I, Novikov I, Pres H, Savion N, Varon D, Hod H. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of

recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109:3171–3175.

Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA; 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.

Meine TJ, Roe MT, Chen AY, Patel MR, Washam JB, Ohman EM, Peacock WF, Pollack CV Jr, Gibler WB, Peterson ED; CRUSADE Investigators. Association of intravenous morphine use and outcomes in acute coronary syndromes: results from the CRUSADE Quality Improvement Initiative. *Am Heart J*. 2005;149:1043–1049.

Merkely B, Tóth-Zsámboki E, Becker D, Béres BJ, Szabó G, Vargova K, Fülöp G, Kerecsen G, Préda I, Spaulding C, Kiss RG. Very late drug-eluting stent thrombosis after nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment despite dual antiplatelet therapy. *Can J Cardiol*. 2009;25(4):229-32.

Minatoguchi S, Ito H, Ishimura K, Watanabe H, Imai Y, Koshiji M, Asano K, Hirakawa S, Fujiwara H. Modulation of noradrenaline release through presynaptic alpha2 adrenoceptors in congestive heart failure. *Am Heart J*. 1995;130(3 Pt 1):516–521.

Mitsios JV, Papathanasiou AI, Rodis FI, Elisaf M, Goudevenos JA, Tselepis AD. Atorvastatin does not affect the antiplatelet potency of clopidogrel when it is administered concomitantly for 5 weeks in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2004;109:1335-1338.

Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carroll RC. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am J Cardiol.* 2004;93:456–458.

Montalescot G, Sideris G, Meuleman C, Bal-dit-Sollier C, Lellouche N, Steg G, Slama M, Milleron O, Collet JP, Henry P, Beygui F, Drouet L for the ALBION Trial Investigators. A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non–ST-segment elevation acute coronary syndromes. The ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:931–8.

Motulsky HJ, Shattil SJ, Ferry N, Rozansky D, Insel PA. Desensitization of epinephrine-initiated platelet aggregation does not alter binding to the alpha 2-adrenergic receptor or receptor coupling to adenylate cyclase. *Mol Pharmacol.* 1986;29(1):1–6.

Mukherjee D, Kline-Rogers E, Fang J, Munir K, Eagle KA. Lack of clopidogrel–CYP3A4 statin interaction in patients with acute coronary syndrome. *Heart.* 2005;91:23-26.

Musial J, Undas A, Undas R, Brozek J, Szczeklik A. Treatment with simvastatin and low-dose aspirin depresses thrombin generation in patients with coronary heart disease and borderline-high cholesterol levels. *Thromb Haemost.* 2001;85:221-225.

Mustonen P, Savola J, Lassila R. Atipamezole, an imidazoline-type alpha(2)-adrenoceptor inhibitor, binds to human platelets and inhibits their adrenaline induced aggregation more effectively than yohimbine. *Thromb Res.* 2000;99:231–237.

Mustonen P, van Willigen G, Lassila R. Epinephrine — via activation of p38-Mapk — abolishes the effect of aspirin on platelet deposition to collagen. *Thromb Res.* 2001;104:439–449.

Müller I, Besta F, Schulz C, Li Z, Massberg S, Gawaz M. Effects of statins on platelet inhibition by a high loading dose of clopidogrel. *Circulation*. 2003;108:2195-2197.

Nakahata N. Thromboxane A<sub>2</sub>: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther*. 2008;118(1):18-35.

Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR. Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation*. 2003;107:1123–8.

Neubauer H, Günesdogan B, Hanefeld C, Spiecker M, Mügge A. Lipophilic statins interfere with the inhibitory effects of clopidogrel on platelet function — a flow cytometry study. *Eur Heart J*. 2003;24:1744-1749.

Newman KD, Williams LT, Bishopric NH, Lefkowitz RJ. Identification of alpha-adrenergic receptors in human platelets by [<sup>3</sup>H]Dihydroergocryptine Binding. *J Clin Invest*. 1978;61(2):395-402.

Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1157–64.

O'Brien JR. Some effects of adrenaline and antiadrenaline compounds on platelets in vitro and in vivo. *Nature*. 1963;200:763-764.

Osnes LT, Foss KB, Joø GB, Okkenhaug C, Westvik AB, Ovstebø R, Kierulf P. Acetylsalicylic acid and sodium salicylate inhibit LPS-induced NF-κB/c-Rel nuclear translocation, and synthesis of tissue factor (TF) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in human monocytes. *Thromb Haemost*. 1996;76(6):970-976.

Pampuch A, Cerletti C, de Gaetano G. Comparison of VASP-phosphorylation assay to light-transmission aggregometry in assessing inhibition of the platelet ADP P2Y<sub>12</sub> receptor. *Thromb Haemost.* 2006;96:767–773.

Papp E, Havasi V, Bene J, Komlosi K, Czopf L, Magyar E, Feher C, Feher G, Horvath B, Marton Z, Alexy T, Habon T, Szabo L, Toth K, Melegh B. Glycoprotein IIIA gene (PIA) polymorphism and aspirin resistance: is there any correlation? *Ann Pharmacother.* 2005;39(6):1013-8.

Parker JD, Newton GE, Landzberg JS, Floras JS, Colucci WS. Functional significance of presynaptic  $\alpha$ -adrenergic receptors in failing and nonfailing human left ventricle. *Circulation.* 1995;92:1793–1800.

Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest.* 1982;69:1366–1372.

Patti G, Colonna G, Pasceri V, Pepe L, Montinaro A, Di Sciascio G. Randomized trial of high loading dose of clopidogrel for reduction of periprocedural myocardial infarction in patients undergoing coronary intervention. Results from the ARMYDA-2 (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty) Study. *Circulation.* 2005;111:2099–2106.

Pedersen AK, FitzGerald GA. Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N Engl J Med.* 1984;311:1206- 1211.

Perneby C, Wallén NH, Hu H, Li N, Hjemdahl P. Prothrombotic responses to exercise are little influenced by clopidogrel treatment. *Thromb Res.* 2004;114(4):235–243.

Perneby C, Wallén NH, Hofman-Bang C, Tornvall P, Ivert T, Li N, Hjemdahl P. Effect of clopidogrel treatment on stress-induced platelet activation and myocardial ischemia in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2007;98:1316–1322.

Pertovaara A, Haapalinna A, Sirviö J, Virtanen R. Pharmacological properties, central nervous system effects, and potential therapeutic applications of atipamezole, a selective alpha2-adrenoceptor antagonist. *CNS Drug Rev.* 2005;11(3):273–288.

Poulsen TS, Kristensen SR, Korsholm L, Haghfelt T, Jørgensen B, Licht PB, Mickley H. Variation and importance of aspirin resistance in patients with known cardiovascular disease. *Thromb Res.* 2007;120(4):477–484.

Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation.* 1999;100:1667–1672.

Quinton TM, Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Lipid rafts are required in G $\alpha$ i signaling downstream of the P2Y<sub>12</sub> receptor during ADP-mediated platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1036–41.

Rao AK, Willis J, Kowalska MA, Wachtfogel YT, Colman RW. Differential requirements for platelet aggregation and inhibition of adenylate cyclase by epinephrine. Studies of a familial platelet alpha 2-adrenergic receptor defect. *Blood.* 1988;71(2):494-501.

Regan JW, Nakata H, DeMarinis RM, Caron MG, Lefkowitz RJ. Purification and characterization of the human platelet  $\alpha$ 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 1986;261(8):3894-3900.

Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, López JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med.* 1999;190(6):803–814.



Rump LC, Bohmann C, Schaible U, Schöllhorn J, Limberger N.  $\alpha_{2C}$ -Adrenoceptor-modulated release of noradrenaline in human right atrium. *Br J Pharmacol.* 1995;116:2617–2624.

Rump LC, Riera-Knorrenschild G, Schwertfeger E, Bohmann C, Spillner G, Schollmeyer P. Dopaminergic and  $\alpha$ -adrenergic control of neurotransmission in human right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26:462–470.

Santilli F, Davi G, Consoli A, Cipollone F, Mezzetti A, Falco A, Taraborelli T, Devangelio E, Ciabattini G, Basili S, Patrono C. Thromboxane-dependent CD40 ligand release in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:391–397.

Savi P, Zacharyus JL, Delesque-Touchard N, Labouret C, Herve C, Uzabiaga MF, Pereillo JM, Culouscou JM, Bono F, Ferrara P, Herbert JM. The active metabolite of clopidogrel disrupts P2Y<sub>12</sub> receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:11069–11074.

Saw J, Steinhubl SR, Berger PB, Kereiakes DJ, Serebruany VL, Brennan D, Topol EJ for the Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation (CREDO) Investigators. Lack of adverse clopidogrel–atorvastatin clinical interaction from secondary analysis of a randomized, placebo-controlled clopidogrel trial. *Circulation.* 2003;108:921-924.

Schäfer A, Bonz AW, Eigenthaler M, Bauersachs J. Late thrombosis of a drug-eluting stent during combined anti-platelet therapy in a clopidogrel nonresponsive diabetic patient: Shall we routinely test platelet function? *Thromb Haemost.* 2007;97(5):862–865.

Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1999;155:1281-1291.

Schwencke C, Schmeisser A, Weinbrenner C, Braun-Dullaeus RC, Marquetant R, Strasser RH. Transregulation of the alpha-2 adrenergic signal transduction pathway by chronic beta-blockade: a novel mechanism for decreased platelet aggregation in patients. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45(3):253-259.

Shebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300:729–735.

Sibbing D, Morath T, Stegherr J, Braun S, Vogt W, Hadamitzky M, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N. Impact of proton pump inhibitors on the antiplatelet effects of clopidogrel. *Thromb Haemost.* 2009;101(4):714-9.

Silber S, Albertsson P, Avilés FF, Camici PG, Colombo A, Hamm C, Jørgensen E, Marco J, Nordrehaug JE, Ruzyllo W, Urban P, Stone GW, Wijns W; Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2005;26(8):804–847.

Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Kroczeck RA, Müller-Berghaus G. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost.* 1998;80(6):1008–1014.

Smith SC Jr, Feldman TE, Hirshfeld JW Jr, Jacobs AK, Kern MJ, King SB 3rd, Morrison DA, O'Neill WW, Schaff HV, Whitlow PL, Williams DO, Antman EM, Smith SC Jr, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention. ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary Intervention-Summary Article: A Report of the American College of Cardiology/American

Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(1):216–235.

Spertus JA, Kettelkamp R, Vance C, Decker C, Jones PG, Rumsfeld JS, Messenger JC, Khanal S, Peterson ED, Bach RG, Krumholz HM, Cohen DJ. Prevalence, predictors, and outcomes of premature discontinuation of thienopyridine therapy after drug-eluting stent placement results from the PREMIER registry. *Circulation*. 2006;113:2803-2809.

Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT III, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ; CREDO investigators. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288:2411–2420.

Storey RF, Sanderson HM, White AE, May JA, Cameron KE, Heptinstall S. The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *Br J Haematol*. 2000;110:925–934.

Szczeklik A, Musial J, Undas A, Swadzba J, Gora PF, Piwowarska W, Duplaga M. Inhibition of thrombin generation by aspirin is blunted in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(8):948-954.

Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, Kastrati A, Schömig A, Schömig E. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80(5):486-501.

Thebault JJ, Blatrix CE, Blanchard JF, Panak EA. Effects of ticlopidine, a new platelet aggregation inhibitor in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1975;18:485–490.

Tofler GH, Muller JE. Triggering of acute cardiovascular disease and potential preventive strategies. *Circulation*. 2006;114(17):1863–1872.

Tóth Zsámboki E, Béres BJ, Vargová K, Bencze J, Kerecsen G, Csóti E, Préda I, Kiss RG. Optimized individual antiplatelet therapy in high risk cardiovascular patients with coronary stent thrombosis and clopidogrel resistance. *World Congress of Cardiology* 2006;P4530

Tóth-Zsámboki E, Béres BJ, Vargová K, Gulácsi-Bárdos P, Bencze J, Kerecsen G, Csóti É, Préda I, Kiss RG. Klinikai kezelési javaslat clopidogrel rezisztencia és koronária stent trombózis esetére. *Cardiologia Hungarica Abstr Suppl.* 2006;36:A56.

Undas A, Sydor WJ, Brummel K, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Aspirin alters the cardioprotective effects of the factor XIII Val34Leu polymorphism. *Circulation.* 2003;107(1):17-20.

Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood.* 2007;109:2285-2292.

Vandendries ER, Furie BC, Furie B. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2004;92:459–466.

Vilahur G, Casaní L, Badimon L. A thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor antagonist (S18886) shows high antithrombotic efficacy in an experimental model of stent-induced thrombosis. *Thromb Haemost.* 2007;98(3):662-9.

Vivekananthan DP, Bhatt DL, Chew DP, Zidar FJ, Chan AW, Moliterno DJ, Ellis SG, Topol EJ. Effect of clopidogrel pretreatment on periprocedural rise in C-reactive protein after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2004;94(3):358–60.

von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G, Schömig E, Kastrati A, Schömig A. Absorption, Metabolization, 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.

von Beckerath N, von Beckerath O, Koch W, Eichinger M, Schömig A, Kastrati A. P2Y<sub>12</sub> gene H2 haplotype is not associated with increased adenosine diphosphate-induced platelet aggregation after initiation of clopidogrel therapy with a high loading dose. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16:199-204.

Wallén NH, Held C, Rehnqvist N, Hjemdahl P. Effects of mental and physical stress on platelet function in patients with stable angina pectoris and healthy controls. *Eur Heart J*. 1997;18:807–815.

Wang JS, Li Ys, Chen JC, Chen YW. Effect of exercise training and deconditioning on platelet aggregation induced by alternating shear stress in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):454-60.

Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J*. 2006;27:647-657.

Wang ZJ, Zhou YJ, Liu YY, Yu M, Shi DM, Zhao YX, Guo YH, Cheng WJ, Jia de A, Cao Z, Nie B, Ge HL, Yang SW, Yan ZX. Impact of clopidogrel resistance on thrombotic events after percutaneous coronary intervention with drug-eluting stent. *Thromb Res*. 2009;124(1):46-51.

Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schror K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet*. 1999;353(9156):900.

Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of platelet glycoprotein

receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med.* 1996;334(17):1090-1094.

Weiss HJ, Aledort LM. Impaired platelet-connective-tissue reaction in man after aspirin ingestion. *Lancet.* 1967;2:495–497.

Weiss HJ. Discovery of the antiplatelet effect of aspirin: a personal reminiscence. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1869-1875.

Wenaweser P, Dörrfler-Melly J, Imboden K, Windecker S, Togni M, Meier B, Haerberli A, Hess OM. Stent Thrombosis Is Associated With an Impaired Response to Antiplatelet Therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1748–52.

Willoughby S., Holmes A., Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs.* 2002;1:273–288.

Winocour PD, Watala C, Perry DW, Kinlough-Rathbone RL. Decreased platelet membrane fluidity due to glycation or acetylation of membrane proteins. *Thromb Haemost.* 1992;68:577–582.

Woulfe D, Jiang H, Mortensen R, Yang J, Brass LF. Activation of Rap1B by Gi Family Members in Platelets. *J Biol Chem.* 2002;277(26):23382–23390.

Xiao Z, Theroux P. Clopidogrel inhibits platelet–leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1982–8.

Yang J, Wu J, Kowalska MA. Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(18):9984-9.

Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem.* 2002;277(48):46035–46042.

Zeymer U, Gitt A, Jünger C, Bauer T, Heer T, Koeth O, Mark B, Zahn R, Senges J, Gottwik M. Clopidogrel in addition to aspirin reduces in-hospital major cardiac and cerebrovascular events in unselected patients with acute ST segment elevation myocardial. *Thromb Haemost.* 2008;99(1):155–160.

Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, Schror K, Hohlfeld T. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation.* 2003;108:542–547.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

**Béres BJ**, Tóth-Zsámboki E, Vargová K, László Á, Masszi T, Kerecsen G, Préda I, Kiss RG. Analysis of platelet alpha-2 adrenergic receptor activity in stable coronary artery disease patients on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost.* 2008;100(5):829-38. **(IF:3.803)**

**Béres Bernát János**, Kiss Róbert Gábor. Atherothrombosis. *Orvosképzés.* 2008;1:5-13.

Merkely B, Tóth-Zsámboki E, Becker D, **Béres BJ**, Szabó G, Vargová K, Fülöp G, Préda I, Spaulding C, Kiss RG. Very late drug-eluting stent thrombosis after non-steroidal anti-inflammatory drug treatment despite dual antiplatelet therapy. *Can J Cardiol.* 2009;25(4):229-32. **(IF:1.323)**

Kiss Róbert Gábor, **Béres Bernát János**: Coronaria atherothrombosis ma: egy korszak lezárult? *Orvostovábbképző Szemle, Kardiológiai különszám.* 2006 December 46-52.

Kiss Róbert Gábor, **Béres Bernát János**: Antithrombotikus kezelés percutan endovascularis coronaria intervenció után – Interdiszciplináris feladatok. *Kardiológus.* 2007;6(2):3-19.

Kiss Róbert Gábor, **Béres Bernát János**: Antithrombotikus kezelés perkután endovaszkuláris koronária-intervenció után – A háziorvos és más diszciplínák feladatai. *Háziorvos Továbbképző Szemle.* 2007;12(3):178-182.



Dr. Kiss Róbert Gábor, **Dr. Béres Bernát János**: Thrombusképződés, a thrombociták szerepe In: Császár Albert (szerk.): Atherosclerosis. Elmélet – klinikum. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2010:113-120.

#### Egyéb közlemények:

Vargová K, Toth-Zsamboki E, **Beres BJ**, Bencze J, Kerecsen G, Gulacsi-Bardos P, Kiss RG, Preda I. Circulating endothelial cell count, plasma vWF and soluble ICAM-1 levels following primary or elective percutaneous coronary intervention. Atherosclerosis. 2008;198(2):366-72. **(IF:4.601)**

Kiss Róbert Gábor, **Béres Bernát János**: A nitrogén-monoxid ellentétes hatásai: integritás és toxicitás. Összefoglaló közlemény. Lege Artis Medicinae. 2007;17(6-7):397-402.

Vakulya B, Tóth-Zsamboki E, Vargová K, **Béres BJ**, Kiss RG, Préda I. Az oxidatív stressz DNS-károsító hatása ateroszklerotikus kórképekben. Metabolizmus. 2010;8(2):103-107.

#### Idézhető absztraktok az értekezés témájában:

**Béres BJ**, Tóth-Zsamboki E, Vargová K, Kerecsen G, Gulácsi-Bárdos P, Bencze J, Vakulya B, Csóti É, Préda I, Kiss RG. A catecholaminok jelentősége aspirin és thienopyridin terápiában részesülő iszkémiás szívbetegek thrombocytá aggregációjában. Orvosképzés. 2006;81(1):34.

**Béres B**, Tóth-Zsamboki E, Vargova K, Kerecsen G, Gulácsi-Bárdos P, Bencze J, Vakulya B, Préda I, Kiss R. A catecholaminok jelentősége szalicilát és thienopyridin kombinációs terápiában részesülő koronáriabetegek thrombocytá aggregációjában. Cardiologia Hungarica Abstr Suppl. 2006;36:A44.

Kerecsen G, Tóth-Zsámboki E, **Béres B**, Bencze J, Csóti É, Fischer É, Kiss R, Préda I. A magas szenzitivitású CRP összefüggése a trombocita aggregációval aszpirin kezelt koronáriabetegekben. *Cardiologia Hungarica Abstr Suppl.* 2006;36:A48.

Kiss R, Stef G, Seres E, Németh L, Poór F, Pongrácz E, **Béres B**, Kerecsen G, Veres G, Préda I. Az aszpirinrezisztencia fokozza a halálozást – 2568 cardiovascularis beteg öt centrum által, 3,5 éven át végzett utánkövetésének eredményei. *Cardiologia Hungarica Abstr Suppl.* 2006;36:A48.

Tóth-Zsámboki E, **Béres B**, Vargova K, Gulácsi-Bárdos P, Bencze J, Kerecsen G, Csóti É, Préda I, Kiss R. Klinikai kezelési javaslat clopidogrel rezisztencia és koronária stent trombózis esetére. *Cardiologia Hungarica Abstr Suppl.* 2006;36:A56.

**Béres BJ**, Tóth-Zsámboki E, Vargová K, Kerecsen G, Bencze J, Vakulya B, Préda I, Kiss RG. Direct contribution of epinephrine to platelet aggregation induced by major agonists in ischemic coronary heart disease patients despite combined antiplatelet therapy. *Liječ Vjesn Supplement 2.* 2006;128:50-51.

Tóth-Zsámboki E, **Béres B**, Vargová K, Gulácsi-Bárdos P, Bencze J, Kerecsen G, Csóti É, Préda I, Kiss RG. Antiplatelet therapy in cardiovascular patients with coronary stent thrombosis: clinical impact of clopidogrel resistance. *Liječ Vjesn Supplement 2.* 2006;128:144.

Kiss RG, Stef GY, Poor F, Seres E, Pongracz E, Nemeth L, **Beres B**, Preda I. (Budapest - HU, Balatonfüred - HU, Mosonmagyaróvár - HU, Szeged - HU, Zalaegerszeg - HU) Aspirin resistance is associated with higher mortality. A 3.5-year follow up, five-center experience in 2568 cardiovascular patients. *World Congress of Cardiology 2006; P4524.*

Toth Zsamboki E, **Beres BJ**, Vargova K, Kerecsen G, Gulacsi-Bardos P, Bencze J, Preda I, Kiss RG (Budapest - HU) Identification of clopidogrel resistant cardiovascular patient

cohort is significantly influenced by the used ADP concentration during platelet aggregometry: the lower the better. World Congress of Cardiology 2006; P4526.

Toth Zsamboki E, **Beres BJ**, Vargova K, Bencze J, Kerecsen G, Csoti E, Preda I, Kiss RG (Budapest - HU) Optimized individual antiplatelet therapy in high risk cardiovascular patients with coronary stent thrombosis and clopidogrel resistance. World Congress of Cardiology 2006; P4530.

**Béres BJ**, Tóth-Zsámboki E, Vargová K, Kerecsen G, Gulácsi-Bárdos P, Bencze J, Vakulya B, Préda I, Kiss RG. A katecholaminok kombinált antithrombocytá terápia ellenére is fokozzák a koronária betegek thrombocytá aggregációját. Magyar Atherosclerosis Társaság XVI. Kongresszusa, Sopron, 2006.

Tóth-Zsámboki E, **Béres BJ**, Vargová K, Gulácsi-Bárdos P, Bencze J, Kerecsen G, Vakulya B, Csóti É, Préda I, Kiss RG. Koronária stent thrombózison átesett clopidogrel rezisztens betegek antithrombocytá kezelésének optimalizálása. Magyar Atherosclerosis Társaság XVI. Kongresszusa, Sopron, 2006.

**Béres B**, Tóth-Zsámboki E, Husvéth Á, László Á, Masszi T, Préda I, Kiss RG. Emelkedett plazma noradrenalin-szint és trombocita P-szelektin, CD40-ligand pozitivitás összefüggése kettős trombocitagátló terápiában részesülő stabil koronáriabetegekben. *Cardiologia Hungarica Abstr Suppl.* 2007;37:A43.

Kiss N, Tóth-Zsámboki E, **Béres BJ**, Vargova K, Kerecsen G, Préda I, Kiss RG. Az aszpirin in vivo és in vitro trombocitagátló hatásának vizsgálata: az aszpirinrezisztencia lehetséges mechanizmusai. *Cardiologia Hungarica Abstr Suppl.* 2007;37:A47.

Kiss RG, Tóth-Zsámboki E, **Béres B**, Vargova K, Kiss N, Kerecsen G, Préda I. Az ADP EC50-érték trombocita aggregometriával történő meghatározásának szerepe clopidogrel rezisztens betegek kiszűrésében. *Cardiologia Hungarica Abstr Suppl.* 2007;37:A48.

Tóth-Zsámboki E, **Béres B**, Vargova K, Kiss N, Kerecsen G, Préda I, Kiss RG. A trombocita P2Y1 ADP receptor funkciójának analízise clopidogrel kezelt kardiovaszkuláris betegekben. *Cardiologia Hungarica Abstr Suppl.* 2007;37:A52.

Kiss N, Tóth-Zsámboki E, **Béres BJ**, Vargova K, Kerecsen G, Préda I, Kiss RG. Study of in vivo and in vitro administered aspirin's antiplatelet effect: possible mechanisms of aspirin resistance. *XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2007:P-M-310.*

Vargova K, Tóth-Zsámboki E, Gulácsi-Bárdos P, **Béres BJ**, Kiss RG, Préda I. Clopidogrel treatment significantly decreases circulating endothelial cell count in patients with stable angina. *XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2007:P-M-366.*

**Béres BJ**, Tóth-Zsámboki E, Vargová K, Kiss N, Kovács A, Husvéth Á, László Á, Masszi T, Préda I, Kiss RG. High norepinephrine level is associated with significant platelet hyperreactivity demonstrated by increased platelet P-selectin positivity, adenosin diphosphate and collagen induced aggregations in stable coronary heart disease patients on dual antiplatelet therapy. *XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2007:P-T-333.*

Tóth-Zsámboki E, Kerecsen G, Kiss RG, **Béres BJ**, Vargova K, Kiss N, Préda I. Assessment of platelet P2Y1 function in clopidogrel-treated ischemic heart disease patients. *XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis 2007:P-W-278.*

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Köszönöm a rengeteg energiát, ötletet, szemléletet és türelmet, amit Dr. Tóth-Zsámboki Emesétől kaptam. Köszönöm Dr. Kiss Róbert Gábornak és Dr. Préda István professzor Úrnak, hogy lehetőséget biztosítottak számomra az MTA-SE Gyulladásbiológiai és Immungenomikai Kutatócsoportban a munkám elvégzéséhez. Köszönöm a közvetlen munkatársaimnak: Kovács Andreának, Dr. Katarína Vargovának, Csóti Évának, Bere Andreának a segítséget és türelmet a mindennapokban. Köszönöm az Országos Gyógyintézeti Központ Kardiológiai Osztály betegeinek, akik részt vettek kutatásaimban. Köszönettel tartozom Dr. Masszi Tamásnak, hogy lehetőséget biztosított az Országos Gyógyintézeti Központ Áramlási Citometriás laborjában a munkám végzéséhez, valamint László Ádámnak és Husvéth Ágotának, hogy rutin munkájukon felül időt és energiát szántak rám, és segítettek a kutatásomban. Köszönöm Dr. Simon Juditnak az Országos Gyógyintézeti Központ Központi Klinikai és Kísérletes Laboratórium vezetőjének a hsCRP méréseket. Köszönöm szüleimnek és feleségemnek, hogy végig mellettem álltak.