

# **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 tézisek

**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. Gellér László PhD egyetemi adjunktus**

**Semmelweis Egyetem Budapest, 2011**

## 1. Bevezető

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 trombocita aggregáció állnak. Az atherotrombólzis megelőzésében és kezelésében központi szerepet kapnak ezért a trombocita gátlószerek, és a háttérben álló érfali gyulladáshos modulátorai.

A trombocita gátló kezelés hatástalansága bizonyítottan az atherotrombólzis egyik rizikófaktora, ezért a háttérben álló okok megismerése alapvető jelentőségű, különösen a koronária intervención átesett betegek esetében. A jelenlegi ajánlások szerint az aszpirin és a thienopyridinek kombinációja szükséges perkután koronária intervención átesett stabil koronária betegeknek a rekuráló adverz események megelőzésére, a kardiovaszkuláris kockázat és halálozáshos csökkentésére. A terápia melletti magas trombocita aktivitást gyakran nevezik gátlószert rezisztenciának. A rezisztencia kifejezés egyszerűbb, azonban nem korrekt megjelölése ennek az állapotnak, hiszen nem feltétlenül farmakológiai értelemben vett rezisztenciáról van szó, hanem egy olyan pathológiás állapotról, mely időben változó, sok szerzett és veleszületett faktor befolyásolhatja. A rezisztencia diagnózhos sokféle nem standardizált labor metodikán alapszik, és prevalenciája is nagyrészt a választott metodikától függ. A terápia melletti magas trombocita aktivitás és a major kardiovaszkuláris események (koronária stent trombólzis) azonban bizonyosan összefüggnek. A kombinált trombocita gátló terápia mellett előforduló stent trombólzis ritka esemény, azonban bizonyítottan gyakrabban fordul elő az aszpirin és/vagy a clopidogrel csökkent hatékonysága mellett.

Jelen értekezés foglalkozik a gátlószert hatás variabilitás biológiai hátterének feltárásával, mérésének lehetőségeivel, nagy atherotrombotikus rizikójú betegek tanulmányozásával, rezisztens betegek kiszűrésével, gátlószert rezisztencia esetén a klinikumban is használható terápiahs algoritmus kidolgozásával, valamint a trombocita adrenerg receptor aktivitásának thienopyridin rezisztenciával való összefüggésével.

## 2. Célok

1. Meghatározni egy aszpirinszedő stabil koronária beteg populáció clopidogrel rezisztenciájának prevalenciáját, definiálni azokat a paramétereket, amelyek alapján az egyént rezisztensnek nyilvánítjuk. Összefüggést találni a trombocita aggregáció, és a vaszkuláris gyulladás markerei között.

2. Meghatározni egy koronária stent trombólison átesett betegcsoport trombocita aggregációs értékeit és a rezisztencia mértékét, majd összehasonlítani egy stabil koronária beteg csoportéval. Kidolgozni egy klinikailag használható algoritmust a rezisztencia kezelésére-áttörésére a bizonyítottan clopidogrel rezisztens stent trombólison átesett betegcsoportban, hiszen ilyen esetben az antitrombocita terápia módosítását a hivatalos irányelvek is megengedik.

3. Esettanulmányban bizonyítani a non-szteroid gyulladásgátló kezelés okozta szerzett trombocita gátlószer rezisztencia szerepét egy nagyon késői gyógyszerkibocsájtó stent trombólisban.

4. Tisztázni a keringő noradrenalin, az  $\alpha$ -2<sub>A</sub> adrenerg receptor aktivitás és a thienopyridin rezisztencia közötti összefüggést kettős trombocita gátlás mellett stabil koronária betegekben. Tanulmányunkban megkíséreltük meghatározni az adrenerg receptor aktivitásának a kettős trombocita gátlás melletti maradék trombocita reaktiváshoz való hozzájárulásának mértékét is. Célunk annak felderítése volt továbbá, hogy a trombocita adrenerg rendszerének aktivitása összefügg-e egyes trombocita aktiválódási markerekkel, valamint az érfali gyulladás markereivel.

### **3. Módszerek**

#### **Betegek**

1. Az első betegcsoport 65 aszpirin monoterápián lévő elektív koronarográfiára érkező betegből állt. A vérvétel a koronarográfia előtt, majd 4 órával a telítő dózisu (300mg) clopidogrel bevétele után történt.

2. A második betegcsoport 10 prospektíven kiválasztott betegből állt, akiknél a kettős trombocita gátlás mellett a koronária intervenció utáni 1 hónapon belül szubakut stent trombózis (n=8) vagy szubtotális reokklúzió (n=2) fordult elő. A vérvétel az ismételt koronária intervenció során adott GPIIb/IIIa blokkoló terápia leállítását után 24 órával történt.

3. Esettanulmány készült egy nagyon késői (834 napos) gyógyszerkibocsájtó stent trombózisos betegről, aki a stent trombózist megelőzően közel egy hétig kombinált non-szteroid gyulladásgátló kezelést kapott. A vérvétel és az aggregációs vizsgálatok itt is az ismételt koronária intervenció során kapott GPIIb/IIIa gátló leállítását után 24 órával történt, majd a kombinált non-szteroid gyulladásgátló terápia leállítását után egy héttel.

4. A trombocita  $\alpha$ -2<sub>A</sub> receptor aktivitás, a keringő noradrenalin és a thienopyridin rezisztencia összefüggéseiről készült tanulmányba pedig 121 legalább egy korábbi angiográfiával bizonyítottan koronária beteg egyént vontunk be, akik kivétel nélkül kettős trombocita gátló terápiaát kaptak. Vérvétel az ismételt elektív koronarográfia előtt történt.

#### **Trombocita aggregációs vizsgálatok**

Az első betegcsoportban (n=65) és a stent trombózison átesett (n=10) betegekben ADP és kollagén indukálta trombocita aggregációt mértünk Born-aggregometriával. Az ADP indukálta aggregációt emelkedő koncentrációjú ADP-vel végeztük (0.32 - 0.64 - 1.25 - 2.5 - 5 - 10  $\mu$ M), majd kiszámítottuk az ADP-re vonatkoztatott EC<sub>50</sub> értéket.

Az adrenerg receptor aktivitás és a thienopyridin rezisztencia összefüggéséről készült tanulmányba bevont 121 betegnél ADP- kollagén és adrenalin indukálta aggregációkat,

ADP indukálta „shape change”-et, átlagos trombocita térfogatot, valamint az alábbi három pontban részletezett speciális aggregációs vizsgálatokat végeztünk:

1. Közel fiziológiás koncentrációjú (10ng/ml) adrenalin szimultán hozzáadásával megpróbáltuk fokozni a betegek ADP és kollagén indukálta aggregációit, majd az ADP indukálta aggregáció fokozhatóságát egy index segítségével fejeztük ki:  $(AGGR_{ADP+ADRENALIN}/AGGR_{ADP}) * 100$ ; ahol a számláló a közel fiziológiás koncentrációjú adrenalinval potencírozott ADP indukálta aggregáció értékét, a nevező az ADP indukálta aggregáció értékét jelenti. Így az index arról informatív, hogy a közel fiziológiás koncentrációjú adrenalin mennyire képes fokozni az ADP indukálta aggregációt az aszpirin és clopidogrel terápia mellett. Az index értéke alapján a betegeket kvartilisekbe osztottuk.

2. A trombocitadús plazmát 2 percig  $2\mu\text{M}$  végkoncentrációjú  $\alpha\text{-}2_A$  receptor antagonistá 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:  $((AGGR_{ADP} - AGGR_{ADP+ATIPAMEZOL}) / AGGR_{ADP}) * 100$ ; ahol 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  $\alpha\text{-}2_A$  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. A trombocitadús plazmát 2 percig  $1\mu\text{M}$  végkoncentrációjú  $\text{P}2\text{Y}_{12}$  receptor antagonistá cangrelorral preinkubáltuk, majd ezután  $5\mu\text{M}$  ADP-vel indukáltuk az aggregációt. Az ADP indukálta aggregáció értékéből kivonva a cangrelor preinkubáció után mért aggregációs értéket megkapjuk a clopidogrel rezisztencia mérését  $(AGGR_{ADP} - AGGR_{ADP+CANGRELOR})$ .

### **Áramlási citometria**

Az adrenerg receptor vizsgálatába bevont betegek közül 24 esetben áramlási citometriás méréseket végeztünk, amivel meghatároztuk a P-szelektin pozitív aktivált trombociták

arányát. A P-szelektin pozitív aktivált trombociták aránya, az adrenerg receptor aktivitása, valamint a keringő noradrenalin szintje között kerestünk összefüggéseket.

### **ELISA vizsgálatok**

A clopidogrel rezisztencia felmérésére bevont 65 beteg esetében arra voltunk kíváncsiak, hogy valamelyik ADP koncentráció vagy az EC<sub>50</sub> érték 10%-nál kisebb változása alapján rezisztensnek nyilvánított betegcsoport gyulladási marker szintjei különböznek-e szignifikánsan a rezponderékétől. A gyulladási markerek közül a hsCRP, a szolubilis CD40L és a von Willebrand faktor kerültek meghatározásra. Az adrenerg receptor aktivitás vizsgálatánál a hsCRP és a szolubilis CD40L szintek mellett a plazma noradrenalin szintet is meghatároztuk ELISA módszerrel.

### **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

A 65 aszpirinszedő stabil koronária beteg ADP indukálta trombocita aggregációs értékei rendre szignifikánsan csökkentek a 300mg clopidogrel hatására:  $M_{1.25\mu M \text{ ADP}}$ :49% (IQR:37–60%) versus  $M_{1.25\mu M \text{ ADP}}$ :16% (IQR:9–26%);  $M_{2.5\mu M \text{ ADP}}$ :61% (IQR:50–71%) versus  $M_{2.5\mu M \text{ ADP}}$ :30% (IQR:20–42%);  $M_{5\mu M \text{ ADP}}$ :64.5% (IQR:55–75%) versus  $M_{5\mu M \text{ ADP}}$ :41% (IQR:31–52%);  $M_{10\mu M \text{ ADP}}$ :79% (IQR:72–83%) versus  $M_{10\mu M \text{ ADP}}$ :57.5% (IQR:46.5–69%)  $p < 0.001$ . 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.

A gyulladáshoz köthető plazma markerek tekintetében egyik rezisztencia kritérium alapján szétválasztott betegcsoportok között sem volt szignifikáns különbség, azonban az  $EC_{50}$  érték 10%-nál kisebb változása alapján meghatározott rezisztens csoportban a gyulladáshoz köthető marker szintek magasabbak voltak (hsCRP:3.74 g/l (IQR:3.49-4.6) versus 2.36 g/l (IQR:1.26-4.2); sCD40L:230.1 pg/ml (IQR:175-317.8) versus 179.83 pg/ml (IQR:148.75-249.55); von Willebrand faktor:212.28% (IQR:145.24-237.99) versus 150.4% (IQR:111.78-198.24;  $p > 0.05$ ).

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

A 10 stent trombólízison átesett beteg ADP-re vonatkoztatott  $EC_{50}$  értéke átlagosan  $1.045 \pm 0.27\mu M$  volt,  $5\mu M$  ADP-re adott aggregációs válaszuk pedig  $69 \pm 11\%$ . Ha a clopidogrel telítő dózis utáni 65 stabil koronária beteg és a 10 stent trombólízison átesett clopidogrelszedő beteg ADP-re vonatkoztatott  $EC_{50}$  értékeit hasonlítjuk össze,

szignifikánsan alacsonyabb  $EC_{50}$  értékeket lehetett mérni az utóbbiaknál ( $1.045\mu\text{M}$  versus  $2.22\mu\text{M}$   $p < 0.001$ ). A stent trombózison átesett betegeknél értelemszerűen nem volt kiindulási  $EC_{50}$  érték, mivel ezek a betegek folyamatosan clopidogrelt szedtek. A kombinált terápia melletti  $EC_{50}$  értékeket azonban össze lehetett hasonlítani a többi stabil koronária betegével. Emlékeztetőül a 65 aszpirinszedő stabil anginás beteg  $EC_{50}$  értéke clopidogrel bevétele előtt  $1.375\mu\text{M}$  (IQR:  $0.998-1.68\mu\text{M}$ ),  $5\mu\text{M}$  ADP indukálta aggregációjuk  $64.5\%$  (IQR:  $55-75\%$ ) volt. Algoritmust dolgoztunk ki a stent trombózison átesett, és a csökkent  $EC_{50}$  érték alapján bizonyítottan clopidogrel rezisztens betegek kezelésére. Minden terápia módosítást aggregációs vizsgálat követett. A clopidogrel terápia hatásosságát az  $5\mu\text{M}$  ADP indukálta aggregáció  $55\%$  alá csökkenése jelezte. Ezen határértéket használtuk, mivel az aszpirinszedő betegek  $300\text{mg}$  clopidogrel bevétele utáni  $5\mu\text{M}$  ADP indukálta aggregációjának felső kvartilise  $52\%$  felett volt. A 10 bizonyítottan clopidogrel rezisztens betegnél napi  $150\text{ mg}$  clopidogrel terápiát állítottunk be, ennek hatására 5 beteg aggregációs értékei a kívánt tartományba kerültek (ADP  $5\mu\text{M}$ :  $45\pm 6\%$ ), további 2 betegben részleges hatás mutatkozott (ADP  $5\mu\text{M}$ :  $55.5\pm 6.5\%$ ). Ezen 7 betegnél nem módosítottunk tovább a kezelésem. A fennmaradó 3 rezisztens beteg kezelését napi  $2 \times 250\text{ mg}$  ticlopidinre módosítottuk, mivel ennek metabolizmusa eltér a clopidogrelétől (CYP3A4 helyett CYP2C19). Ez 2 betegnél volt effektív (ADP  $5\mu\text{M}$ :  $39\pm 3\%$ ), egyetlen olyan beteget jelezve aki mind clopidogrelre, mind ticlopidinre rezisztens (ADP  $5\mu\text{M}$ :  $64\%$ ). Az ő esetében napi  $2 \times 200\text{ mg}$  dipyridamol+ $25\text{ mg}$  aszpirin és  $2 \times 250\text{ mg}$  ticlopidin kombinációját állítottuk be és így végül effektív trombocita gátlás alakult ki (ADP  $5\mu\text{M}$ :  $32\%$ ).

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

A non-szteroid gyulladásgátló terápia mellett fellépő nagyon késői gyógyszerkibocsájtó stent trombózison átesett betegnél az elvégzett aggregációs mérések eredményei - egy átlagos clopidogrel- és aszpirinszedő populációhoz képest - emelkedett ADP-, kollagén és adrenalin indukálta aggregációkat mutattak. Tehát a non-szteroid gyulladásgátló terápia mellett igazoltuk a trombocita hiperaktivitást. Az aggregációs görbék alapján a



dezaggregáció hiányát is megállapítottuk. A betegnél elhagyva a non-szteroid gyulladásgátló gyógyszereket, de meghagyva az aszpirin és clopidogrel terápiát, 7 nap múlva ismételt aggregometriát végeztünk, mely a trombocita aggregáció hatásos gátlását mutatta és kifejezett dezaggregációt. Az 5 $\mu$ M ADP indukálta aggregáció 60%-ról 38%-ra csökkent, a 2 $\mu$ g/ml adrenalin indukálta aggregáció 37%-ról 16%-ra csökkent. Az 1 $\mu$ g/ml kollagén indukálta aggregáció csúcértéke nem változott (54%), de a görbe alapján az első mérésnél hiányzó dezaggregáció itt is megjelent.

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

Az aggregometriás mérések során sikeresen bizonyítottuk, hogy a kettős trombocitagátló terápia ellenére a közel fiziológiás koncentrációjú adrenalin *in vitro* szignifikáns mértékben fokozta az ADP- és a kollagén indukálta trombocita aggregációkat ebben a 121 főből álló stabil anginás betegpopulációban ( $M_{1.25\mu\text{M ADP}}$ : 26.5% [IQR:15–42.5%] versus  $M_{1.25\mu\text{M ADP+adrenalin}}$ : 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%]  $p < 0.001$ )

A szelektív  $\alpha$ -2<sub>A</sub> 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%]  $p < 0.001$ ). Ezek az előzetes eredmények azt mutatják, hogy az  $\alpha$ -2<sub>A</sub> receptor aktivációja hozzájárul a más agonisták - ADP és kollagén – által kiváltott aggregációkhoz.

A szelektív P2Y<sub>12</sub> receptor antagonistá cangrelort a trombocita gátló terápia ellenére is funkcionáló P2Y<sub>12</sub> 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%]  $p<0.001$ ).

A betegeket a „Módszerek” fejezetben részletezett indexek alapján kvartilisekbe osztottuk. Az indexeket az alapján képeztük, hogy a közel fiziológiás koncentrációjú adrenalin mennyire képes fokozni, illetve az atipamezol mennyire képes gátolni az  $5\mu\text{M ADP}$  indukálta trombocita aggregációjukat. Az index alapján kvartilisekbe osztott betegcsoportok között hasonlítottuk össze a kiindulási trombocita aggregációkat, a clopidogrel terápia mellett is funkcionáló  $\text{P2Y}_{12}$  receptor készletet, a plazma noradrenalin, a szérum C-reaktív protein, a plazma szolubilis CD40L szinteket, és az átlagos trombocita térfogatot. A különböző klinikai paramétereket és anamnesztikus adatokat összehasonlítva a különböző kvartilisek között nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést. A közel fiziológiás koncentrációjú adrenalin ADP indukálta trombocita aggregáció fokozó hatása alapján a betegeket kvartilisekbe osztottuk. A legalsó kvartilisbe tartozó ( $n=24$ ) betegeknek szignifikánsan magasabb kiinduló 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%]  $p=0.003$ ). Az adrenalin indukálta aggregáció és az ADP indukálta trombocita „shape change” a legalsó kvartilisben magasabbak voltak, de nem különböztek szignifikánsan a legfelső kvartilishez képest. Fontos eredményünk, hogy a cangrelorral mérhető gátlás ebben a legalsó kvartilisben szignifikánsan magasabb volt, vagyis itt több clopidogrel terápia mellett is működő  $\text{P2Y}_{12}$  receptor található ( $M_{\text{alsó}}$ : 43.5% [IQR:33.5–53%] versus  $M_{\text{felső}}$ : 26% [IQR:19–34%]  $p<0.001$ ). Azon betegekben tehát, ahol az adrenalin a legkevésbé fokozza az ADP indukálta trombocita aggregációt több gátolatlan  $\text{P2Y}_{12}$  receptor található, mely alacsonyabb clopidogrel hatásra vagyis rezisztenciára utal. Összehasonlítottuk a kvartiliseket a szelektív  $\alpha\text{-}2_{\text{A}}$  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:  $-29.5-11.3\%$ ]  $p < 0.001$ ). Eredményeink azt mutatják, hogy a közel fiziológias koncentrációjú adrenalinnal 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.

Szerettünk volna teljes képet kapni a trombocita adrenerg receptor szerepéről a trombocita hiperaktivításban, ezért a „Módszerek” részben leírt index segítségével újra kvartilisekbe osztottuk a betegeket, de ezúttal az atipamezollal az  $5\mu\text{M}$  ADP indukálta trombocita aggregációra kifejtett gátló hatása alapján. A várakozásoknak megfelelően a legfelső kvartilisbe tartozó ( $n=29$ ) betegeknél szignifikánsan magasabb  $5\mu\text{M}$  ADP- és kollagén indukálta kiindulási trombocita 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:  $0-20\%$ ]  $p=0.03$ ). Hasonlóképpen a felső kvartilisben szignifikánsan magasabb cangrelorral mérhető gátlást írtunk le ( $M_{\text{felső}}$ :  $41\%$  [IQR:  $33-45\%$ ] versus  $M_{\text{alsó}}$ :  $30\%$  [IQR:  $20-41\%$ ]  $p=0.004$ ). Az eredmények alapján azon betegeknél, ahol az atipamezollal az  $5\mu\text{M}$  ADP indukálta trombocita aggregáció erősebb gátlása érhető el, trombocita hiperaktivitást és több működőképes  $P2Y_{12}$  receptort mértünk. Magas atipamezollal mérhető gátlás esetén alacsony az adrenalinnal kiváltható stimuláció, ami a trombocita adrenerg rendszerének már aktivált állapotára utal.

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

A betegek medián plazma noradrenalin szintje  $515.7$  pg/ml (IQR:  $424.3-857.2$  pg/ml) volt.

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). 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%]  $p=0.01$ ).

Érdekes részeredmény, hogy azon betegek, akiknek anamnézisükben 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]  $p=0.047$ ).

## 5. 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 eltűnését 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 közel fiziológiás koncentrációjú adrenalinál 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.

## 6. 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:3.056)**

**Béres Bernát János**, Kiss Róbert Gábor. Atherothrombosis. *Orvostudium*. 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:1.357)**

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:3.777)**

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.évf.2.szám

## 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; LXXXI évf. 1. szám: 34. o.

**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 koronáriabetegeknél. *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, Sopron2006

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, Sopron2006

**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 terápiaiban 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