

## Ocena funkcji płytek krwi u chorych zażywających kwas acetylosalicylowy w prewencji wtórnej udaru mózgu

Evaluation of platelet functions in patients taking  
acetylsalicylic acid as a secondary stroke prevention

Beata Łabuz-Roszak, Krystyna Pierzchała, Agnieszka Machowska-Majchrzak,  
Aleksandra Porosińska, Maciej Wawrzyńczyk

### STRESZCZENIE

Katedra i Klinika Neurologii SUM w Zabrze  
Kierownik Kliniki:  
Prof. dr hab. n. med. Krystyna Pierzchała

#### CEL PRACY

U części osób regularnie zażywających kwas acetylosalicylowy (ASA) nie uzyskuje się stanu antyagregacyjnego. Zjawisko to nazwano „opornością na aspirynę”. Aktualnie brak jednoznacznych danych dotyczących częstości tego zjawiska oraz jego przyczyn u chorych zażywających ASA w prewencji wtórnej udaru mózgu. Celem przeprowadzonych badań była ocena funkcji płytek krwi z uwzględnieniem zjawiska oporności na aspirynę u chorych z rozpoznaniem przejściowym niedokrwieniem mózgu (TIA) lub udarem niedokrwinnym mózgu w fazie ostrej, u których zastosowano ASA.

#### MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 70 chorych hospitalizowanych w Klinice Neurologii w Zabrze z powodu TIA lub udaru niedokrwinnego w średnim wieku  $68,7 \pm 11$  lat zażywających ASA w dawce 75–150 mg na dobę. Badanie funkcji płytek krwi przeprowadzono przy pomocy wielokanałowego analizatora czynności płytek krwi wykorzystującego metodę agregometrii impedancyjnej we krwi pełnej.

#### WYNIKI

Oporność na ASA stwierdzono u 6 chorych (8,6%). Nie wykazano związku między parametrami agregacji a dawką, wiekiem, płcią, czasem przeprowadzenia badania, typem udaru, stopniem sprawności, nadciśnieniem tętniczym, chorobą wieńcową, migotaniem przedsionków, paleniem papierosów, przebyciem zawałem mięśnia sercowego. Zaobserwowano natomiast korelację pomiędzy parametrami agregacji a poziomem cholesterolu LDL, BMI oraz równoczesnym zażywaniem statyn. Nie odnotowano korelacji z poziomem pozostałych parametrów biochemicznych ani innymi zażywanymi lekami.

#### ADRES

#### DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Beata Łabuz-Roszak  
Klinika Neurologii  
Śląski Uniwersytet Medyczny  
ul. 3 Maja 13/15  
41-800 Zabrze  
tel. +48 32 370 45 84  
e-mail: beatamaria.pl@hoga.pl

Ann.Acad.Med.Siles. 2010, 64, 5-6, 54-63  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach  
ISSN 0208-5607

**WNIOSKI**

Zastosowana metoda pozwoliła na wykrycie zjawiska oporności na aspirynę u części chorych z udarem niedokrwiennym, u których w okresie ostrym zastosowano ASA. Wykazano związek między efektem stosowania aspiryny a niektórymi czynnikami ryzyka chorób naczyniowych oraz zażywaniem statyn. Zastosowanie wielokanałowego analizatora czynności płytek krwi w celu monitorowania efektu przeciwplateletowego ASA w prewencji wtórnej udaru wymaga dalszych badań.

**SŁOWA KLUCZOWE**

oporność na kwas acetylosalicylowy, przejściowe niedokrwienie mózgu, udar mózgu niedokrwienny, agregometria impedancyjna, wielokanałowy analizator czynności płytek krwi

**ABSTRACT****BACKGROUND**

In some patients taking acetylsalicylic acid (ASA) regularly no anti-aggregative effect is achieved. This phenomenon is called “aspirin resistance”. Until now, there are no unequivocal data concerning frequency and causes of aspirin resistance in patients taking ASA as secondary stroke prevention. The purpose of the study was to examine platelet functions in patients with diagnosed transient ischemic attack (TIA) or ischemic stroke in the acute phase whom ASA was applied.

**MATERIAL AND METHODS**

We examined 70 patients with TIA or stroke treated in the Department of Neurology in Zabrze taking 75–150 mg ASA daily (mean age  $68.7 \pm 11$  years). The assessment of platelet function was performed by multiple platelet function analyzer using the method of impedance aggregometry in the whole blood.

**RESULTS**

Aspirin resistance was observed in 6 patients (8.6%). We found no correlation between platelet aggregation and dose, age, sex, time of examination, degree of motor incapability, hypertension, coronary disease, atrial fibrillation, old myocardial infarction. However, we observed correlation between presence of aspirin resistance and high LDL-cholesterol, high BMI and statin intake. No correlation was noted with other biochemical parameters and other drugs.

**CONCLUSIONS**

The applied method allowed to detect phenomenon of aspirin resistance in some patients with stroke, who were taking ASA in the acute phase. The correlation between antiplatelet effect of ASA and either some stroke risk factors (high LDL-level and high BMI) or statin therapy was observed. The usage of multiple platelet function analyzer to monitor antiplatelet effect of ASA should be further examined.

**KEY WORDS**

resistance to aspirin, stroke, transient ischemic attack, impedance aggregometry, multiple platelet function analyzer

**WPROWADZENIE**

Kwas acetylosalicylowy (ASA) jest powszechnie stosowanym lekiem w profilaktyce pierw-

wotnej i wtórnej chorób sercowo-naczyniowych. U osób regularnie zażywających ASA stwierdzono redukcję o jedną czwartą częstości występowania zawałów serca i udarów mózgu [1, 2]. Pomimo udowodnionych ko-

rzyści ok. 10–20% pacjentów przyjmujących ASA jest narażonych na wystąpienie ponownego zdarzenia sercowo-naczyniowego, mimo jego przyjmowania w ciągu kolejnych 5 lat od ostatniego incydentu [3, 4]. Powyższą sytuację nazwano opornością na ASA. Obecnie często używa się terminu oporności prawdziwej i pozornej. Prawdziwa oporność na ASA jest opornością farmakodynamiczną, wynikającą ze zmiany w obrębie docelowego miejsca działania leku. Może być spowodowana zmianą konformacji przestrzennej COX-1 na skutek polimorfizmu genetycznego lub przejściowym zablokowaniem miejsca aktywnego enzymu przez inny lek [5, 6]. Przyczyną oporności pozornej (czyli odwracalnej) może być brak współpracy z pacjentem (zaprzeszanie przyjmowania leku), zbyt mała dawka lub niewłaściwa postać ASA, interakcje z innymi lekami i substancjami.

Oporność na ASA rozpoznaje się wówczas, gdy u osoby regularnie zażywającej aspirynę wystąpi nowy epizod sercowo-naczyniowy (tzw. oporność kliniczna) lub też na podstawie wyników badań laboratoryjnych (tzw. oporność laboratoryjna) [5].

Istnieje wiele metod laboratoryjnych pozwalających ocenić efektywność terapii przeciwplatekowej. Najczęściej stosowane są: agregacja płytek krwi metodą impedancyjną lub fotometryczną, Platelet Function Analyzer (PFA – 100), Verify-Now Aspirin Assay, cytometria przepływowa oraz oznaczanie stężenia metabolitu kwasu arachidonowego, 11-dehidrotromboksanu B2 w surowicy krwi i w moczu.

Mimo licznych prowadzonych badań, do tej pory brak jednoznacznych danych dotyczących częstości zjawiska oporności na ASA oraz jego przyczyn u chorych zażywających ASA w okresie ostrym udaru mózgu.

W związku z powyższym, podjęto badanie dotyczące oceny funkcji płytek krwi z uwzględnieniem zjawiska oporności laboratoryjnej na ASA u chorych z rozpoznanym przejściowym niedokrwieniem mózgu (TIA – ang. *transient ischemic attack*) lub udarem niedokrwinnym mózgu w fazie ostrej, u których zastosowano ASA. Przeprowadzono ponadto analizę zależności pomiędzy zjawiskiem oporności na ASA a dawką leku, wiekiem, płcią, typem udaru, czasem badania, stanem klinicznym i funkcjonalnym chorych, obecnością czynników ryzyka, stosowaniem innych leków oraz parametrami biochemicznymi.

Badania prowadzono wśród chorych hospitalizowanych w Klinice Neurologii w Zabrze w okresie od 1 lutego do 30 czerwca 2010 roku, u których rozpoznano TIA lub udar niedokrwienno-mózgu. U wszystkich badanych od pierwszej doby hospitalizacji stosowano ASA w dawce 75–150 mg/dobę. Przed obecnym zachorowaniem badani nie zażywali ASA.

Kryteria włączenia do badania były następujące: pierwszy w życiu epizod ostrego niedokrwienia mózgu (TIA lub udar niedokrwienno-mózgu), stosowanie ASA w dawce 75–150 mg/dobę, niestosowanie innych leków przeciwplatekowych, świadoma zgoda chorego na udział w badaniu.

Kryteria wyłączenia: przebyty udar krwotoczny, stosowanie innych leków przeciwplatekowych (tiklopidyny, klopidogrelu, dipirydamolu itd.), stosowanie heparyny lub heparyn drobnocząsteczkowych, liczba płytek krwi poniżej  $150 \times 10^3/uL$  lub powyżej  $450 \times 10^3/uL$ , występowanie krwawienia w wywiadzie, stężenie hemoglobiny poniżej 10 mg/dl, brak zgody na udział w badaniu.

Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach.

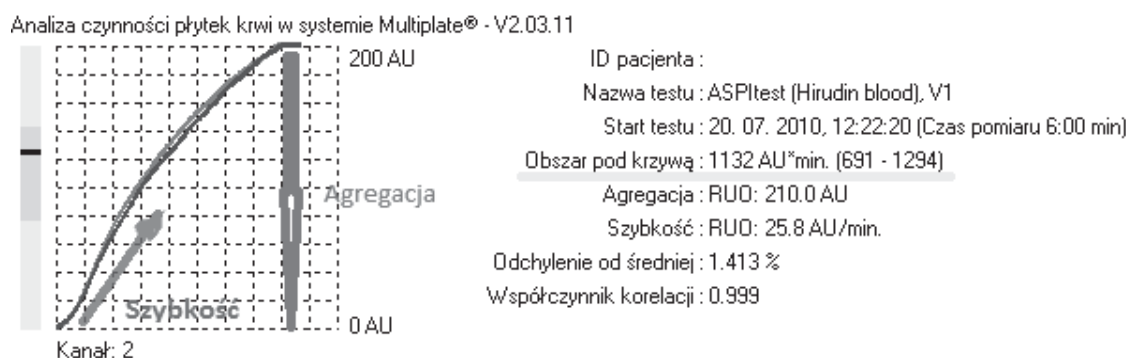
U wszystkich chorych przeprowadzono badanie internistyczne i neurologiczne, następnie pobrano łącznie 10 ml krwi celem przeprowadzenia badania funkcji płytek oraz wykonania dodatkowych oznaczeń (morfologia, glukoza, cholesterol całkowity, LDL, HDL i trójglicerydy, HbA<sub>1c</sub>, CRP, kreatynina, transaminazy, bilirubina).

Badanie funkcji płytek krwi przeprowadzono przy pomocy wielokanałowego analizatora czynności płytek krwi (ang. *multiple platelet function analyzer, Multiplate*) firmy Dynabyte. System Multiplate bazuje na metodzie agregometrii impedancyjnej we krwi pełnej. Wykorzystuje tzw. wielokrotną agregację elektrodową, tj. podczas każdego pomiaru wykonywane jest podwójne oznaczenie. Dwie elektrody są zanurzone w próbce krwi z mieszałem. Podczas agregacji płytki gromadzą się na elektrodach, co powoduje zmianę oporu elektrycznego (impedancji) pomiędzy nimi. Aparat ten umożliwia wykonanie pięciu testów z zastosowaniem różnych aktywatorów agregacji płytek krwi: ASPItest (agregacja zależna od cyklooksygenazy wykorzystująca kwas arachido-

nowy), ADPtest (aktywacja płytek krwi przez ADP), COLtest (globalna diagnostyka płytek krwi z wykorzystaniem kolagenu), TRAPtest (agregacja płytek krwi poprzez receptor trombiny z wykorzystaniem białka aktywującego receptor trombiny – TRAP-6), RISTOtest (agregacja zależna od czynnika von Willebrandta, z wykorzystaniem ristocetyny jako aktywatora) [7–11].

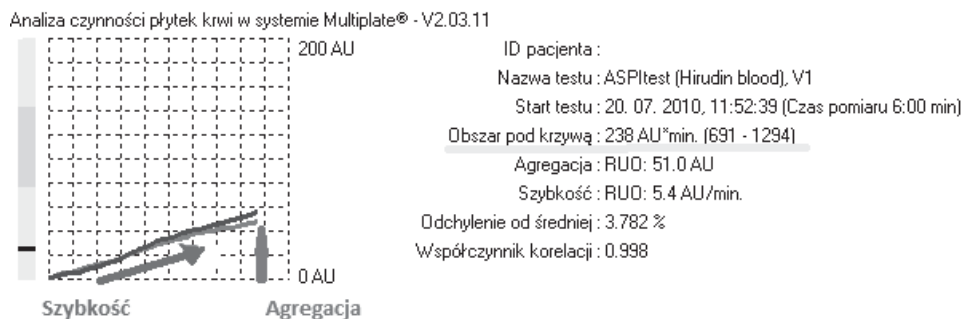
W celu określenia funkcji płytek krwi u badanych chorych przeprowadzono cztery testy: ASPItest, ADPtest, COLtest oraz TRAPtest. Badanie wykonywano zgodnie z następującym protokołem: U każdego chorego pobrano 2,6 ml krwi do probówki typu Sarstedt r-hirudin. Po pobraniu krew stała co najmniej 30 min, lecz nie więcej niż 2 h. Następnie przeprowadzono oznaczenie przy pomocy aparatu Multiplate, zgodnie z instrukcjami pojawiającymi się na ekranie. Początkowo umieszczono po 300 ul chlorku sodu ogrzanego do temperatury 37° C oraz po 300 ul krwi pełnej w specjalnych komorach testowych jednorazowego

użytku firmy Dynabyte z miesządem magnetycznym, uprzednio umieszczonych w 4 kolejnych stanowiskach pomiarowych i podłączonych do urządzenia. Następnie, po 3 min inkubacji, dodawano po 20 ul odpowiedniego odczynnika – ADP (do pierwszej komory), kwasu arachidonowego (do drugiej komory), kolagenu (do trzeciej komory) oraz TRAP-6 (do czwartej komory). Wyniki agregacji uzyskano po kolejnych 6 min, dla każdego testu jako średnia dwóch pomiarów w postaci krzywej, na podstawie której wyznaczono następujące parametry: agregacja (ang. *aggregation*, A) – czyli wzrost impedancji w czasie analizy; szybkość (ang. *velocity*, V) – czyli maksymalne nachylenie krzywej agregacji; obszar pod krzywą (ang. *area under curve*, AUC). Parametr AUC zależy zarówno od całkowitego zwiększenia impedancji, jak i od kinetyki procesu agregacji, dlatego też najlepiej charakteryzuje proces agregacji w urządzeniu Multiplate i jest podawany jako ostateczny wynik oznaczenia (ryc. 1 oraz ryc. 2).



**Ryc. 1.** Przykładowy zapis badania funkcji płytek krwi (ASPI test) przy pomocy wielokanałowego analizatora czynności płytek krwi (Multiplate). U badanej osoby stwierdzono oporność na ASA.

**Fig. 1.** An example of platelet function analysis (ASPI test) with usage of multiple platelet function analyzer (Multiplate). Aspirin resistance was recognized in examined patient.



**Ryc. 2.** Przykładowy zapis badania funkcji płytek krwi (ASPI test) przy pomocy wielokanałowego analizatora czynności płytek krwi (Multiplate). U badanej osoby stwierdzono właściwą odpowiedź na ASA.

**Fig. 2.** An example of platelet function analysis (ASPI test) with usage of multiple platelet function analyzer (Multiplate). Proper aspirin response was recognized in examined patient.

Zgodnie z zaleceniami producenta, wartości referencyjne AUC dla poszczególnych testów wynoszą odpowiednio: ASPItest – 691-1294, ADPtest – 475-1076, COLtest – 459-1166 oraz TRAPtest – 834-1294 [AU\*min]. Wartości te uzyskano w laboratorium Kliniki Hemostazy i Transfuzjologii Uniwersytetu w Monachium, dokonując pomiaru funkcji płytek krwi przy pomocy aparatu Multiplate u 66 zdrowych ochotników, nie zażywających żadnych leków [10, 11].

W celach porównawczych, w badaniu dokonano również pomiaru funkcji płytek krwi u 18 zdrowych ochotników, nie zażywających żadnych leków.

Zjawisko oporności na ASA oceniono na podstawie wyniku testu z zastosowaniem kwasu arachidonowego (ASPItest). Zgodnie z danymi literaturowymi uznano, iż u osób zażywających ASA wartość AUC < 300 świadczy o pełnej wrażliwości na aspirynę, wartość AUC mieszcząca się w przedziale 300-690 – o niepełnej wrażliwości na aspirynę, zaś u osób, u których AUC wynosiło powyżej 690 – rozpoznano oporność na aspirynę [10].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy programu komputerowego Statistica v.6 oraz Microsoft Office Excel 2007. Wynik badania uznano za istotny statystycznie, jeżeli uzyskany poziom istotności *p* był mniejszy lub równy 0,05. W opisie wielkości liczbowych podano standardowe parametry statystyczne: liczebność, średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe. Zastosowano następujące testy: test Shapiro-Wilka normalności rozkładu, test U Mann-Whitneya, test Kruskala-Wallis, test CH<sup>2</sup>, test T-Studenta, test Spearmana korelacji rangowej.

## WYNIKI

Badaniami objęto 70 chorych (30 kobiet, 40 mężczyzn) hospitalizowanych w Klinice Neurologii z powodu TIA (8 osób) lub udaru niedokrwiennego mózgu (62 osoby) w wieku od 45 do 95 lat, średnio 68,7±11 lat. U 6 chorych stosowano 75 mg ASA, u 64 chorych – 150 mg ASA na dobę. Badania przeprowadzono w czasie od 2 do 14 dnia od przyjęcia chorego, średnio 5,4±4,5 dnia.

Na podstawie klasyfikacji TOAST, u 26 chorych stwierdzono udar spowodowany zmianami w dużych tętnicach (ang. *large-artery athero-*

*rosclerosis*, LAA), u 27 chorych – udar spowodowany zmianami w małych tętnicach (ang. *small-artery occlusion*, SAO), u 9 osób – udar o nieustalonej etiologii (ang. *stroke of undetermined cause*, UND). Wg Oxfordshire Classification u 30 chorych rozpoznano częściowy zawał mózgu z zakresu przedniego unaczynienia (ang. *partial anterior circulation infarct*, PACI), u 11 chorych – całkowity zawał mózgu z zakresu przedniego unaczynienia (ang. *total anterior circulation infarct*, TACI), u 12 chorych – zawał zatokowy (ang. *lacunar infarct*, LACI), a u 9 chorych – zawał mózgu z zakresu tylnego

Tab. I. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie badanej.

Tab. I. Laboratory results in the examined group

Parametr badany Examined parameter	Wartość średnia, X Mean, X	Odchylenie standar- dowe, SD Standard deviation, SD
Erytrocyty, 10 <sup>6</sup> /ul Erythrocytes, 10 <sup>6</sup> /uL	4,49	0,56
Hematokryt, % Haematocrit, %	39,7	4,11
Hemoglobina, g/dl Hemoglobin, g/dl	13,8	1,52
Leukocyty, 10 <sup>3</sup> /ul Leukocytes, 10 <sup>3</sup> /ul	9,5	11
Płytki krwi, 10 <sup>3</sup> /ul Platelets, 10 <sup>3</sup> /ul	235	79,9
APTT, sec	29,1	3,37
INR	1,1	0,2
Cholesterol całkowity, mmol/l Total cholesterol, mmol/l	5,3	1,35
Cholesterol LDL, mmol/l	3,2	1,1
Cholesterol HDL, mmol/l	1,5	0,5
Trójglicerydy, mmol/l Triglycerides, mmol/l	1,58	1,45
Glukoza na czczo, mg/dl Fasting glucose, mg/dl	125	53,4
HbA <sub>1c</sub> , %	6,02	1,02
CRP, mg/l	13,7	18,8
AlAT, U/l	29	35
AspAT, U/l	31	25,7
Bilirubina, mg/l Bilirubin, mg/l	13,7	6,55
Kreatynina, mg/l Creatinine, mg/l	88,6	33



unaczynienia (ang. *posterior circulation infarct*, POCI). U 29 chorych stwierdzono niedowład połowiczny lewostronny, u 24 osób – niedowład połowiczny prawostronny, u 6 osób – zespół mózdkowy, zaś u 1 osoby – niedowidzenie połowiczne. U 2 osób z rozpoznaniem udarem mózgu oraz u wszystkich osób z TIA nie stwierdzono odchyień w badaniu neurologicznym (badanie to przeprowadzono w dniu oceny funkcji płytek krwi). Stan neurologiczny chorych został oceniony na podstawie skali NIHSS (*National Institutes of Health Stroke Scale*) i wynosił od 0 do 27 pkt (średnia:  $7,2 \pm 1,7$ ). Sprawność chorych oceniona za pomocą skali Barthel wynosiła od 0 do 100 pkt (średnia:  $60 \pm 40$  pkt), na podstawie zmodyfikowanej skali Rankin – od 0 do 5 pkt (średnia:  $2,5 \pm 1,4$ ).

W badanej grupie stwierdzono występowanie następujących czynników ryzyka chorób naczyniowych mózgu: cukrzyca (18 osób), choroba wieńcowa (18 osób), przebyty zawał mięśnia sercowego (8 osób), nadciśnienie tętnicze (57 osób), hipercholesterolemia (29 osób), hipertrójglicydemia (7 osób), migotanie przedsionków (14 osoby), nikotynizm (20 osób). BMI (*Body Mass Index*) w badanej grupie chorych wynosił średnio  $27,5 \pm 5,8$  kg/m<sup>2</sup>. U 18 osób stwierdzono nadwagę, zaś u 15 – otyłość. Wyniki badań laboratoryjnych przedstawiono w tabeli I.

Poza ASA chorzy przyjmowali następujące leki: hipotensyjne – 57 chorych (diuretyki – 25 osób, ACE inhibitory – 39 osób, antagoniści receptora angiotensyny – 4 osoby, blokery kanałów wapniowych – 19 osób, beta-blokery – 27 osób, nitraty – 11 osób), statyny (40 osób), inhibitory pompy protonowej (omeprazol, pantoprazol) (11 osób), leki antydepresyjne (5 osób), winpocetynę (10 osób), piracetam (14 osób), niesterydowe leki przeciwzapalne – NLPZ (5 osób).

Wyniki badań funkcji płytek krwi przedstawiono w tabeli II.

Wszystkie wykonane testy wykazały obniżoną reaktywność płytek krwi u chorych zażywających ASA w odniesieniu do grupy kontrolnej. Oporność na ASA (ASPItest:  $AUC > 690$ ) stwierdzono u 6 osób (8,6%), obniżoną wrażliwość na ASA (ASPItest:  $AUC \geq 300$  i  $\leq 690$ ) u 19 osób (27,1%), u pozostałych 45 chorych (64,3%) – wrażliwość na ASA była właściwa (ASPItest:  $AUC < 300$ ).

Oporność na ASA występowała jedynie u chorych z udarem mózgu. U żadnego z badanych chorych po epizodzie przejściowego niedokrwienia mózgu nie stwierdzono oporności na ASA, u 1 osoby występowała obniżona wrażliwość na ASA.

Następnie przeprowadzono analizę zależności pomiędzy zjawiskiem oporności na ASA a dawką stosowanego kwasu acetylosalicylowego (75 mg vs 150 mg), czasem przeprowadzenia badania, wiekiem i płcią chorych, stanem klinicznym (typ udaru, NIHSS, BI, Rankin, BMI), obecnością czynników ryzyka (nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, choroba wieńcowa, nikotynizm, migotanie przedsionków, przebyty zawał mięśnia sercowego), stosowaniem innych leków oraz parametrami biochemicznymi (cholesterol, HDL, LDL, glukoza, trójglicerydy, HBA<sub>1C</sub>, CRP, kreatynina, AspAT, AlAT, bilirubina).

Nie stwierdzono związku między dawką leku a zjawiskiem oporności na ASA. Nie wykazano również korelacji pomiędzy reaktywnością płytek a wiekiem chorych, płcią, czasem przeprowadzenia badania, typem udaru określonym na podstawie klasyfikacji TOAST oraz Oxfordshire, wynikiem w skali NIHSS, BI oraz Rankin. Nie stwierdzono również związku między zjawiskiem oporności na ASA u badanych chorych a nadciśnieniem tętniczym, chorobą wieńcową, migotaniem przedsionków, paleniem papierosów, przebyłym zawałem mięśnia sercowego. Zaobserwowano natomiast korelację pomiędzy agregacją płytek

Tab. II. Wyniki badań funkcji płytek krwi w grupie badanej i kontrolnej.

Tab. II. Results of platelet function tests in the examined and control group.

Test	AUC [AU*min]		
	Grupa badana, X±SD Examined group, X±SD	Grupa kontrolna, X±SD Control group, X±SD	P
ASPI test	348,1 ± 265,2	1105,6 ± 174	<0,000001
ADP test	761,4 ± 278,6	1019,6 ± 222,6	<0,001
Col test	591,1 ± 263,9	1090,5 ± 146,1	<0,000001
TRAP test	1090 ± 323,8	1388,6 ± 142,5	<0,000001

krwi indukowaną kwasem arachidonowym (ASPItest) a BMI. Chorzy, u których stwierdzono oporność na ASA, mieli znamienne wyższą wagę ( $84,2 \pm 4,6$  kg) ( $p=0,008$ ) oraz BMI ( $30,6 \pm 4,6$  kg/m<sup>2</sup>) ( $p=0,03$ ) w odniesieniu do osób „aspirynowrażliwych” (odpowiednio:  $74,8 \pm 16,8$  kg;  $26,9 \pm 5,9$  kg/m<sup>2</sup>). Zaobserwowano również wpływ cukrzycy na wyniki badań funkcji płytek krwi. U chorych na cukrzycę wartość AUC w ASPI-teście była wyższa ( $374 \pm 354$  AU\*min), choć nie znamienne, w porównaniu z osobami nie chorującymi na cukrzycę ( $339 \pm 229$  AU\*min). Ponadto u osób „opornych na ASA” stwierdziliśmy nieznamienne wyższą wartość glukozy na czczo ( $133 \pm 30$  mg/l) w odniesieniu do osób „wrażliwych na ASA” ( $123 \pm 43$  mg/l). Zaobserwowano również znamienne korelację pomiędzy wynikiem agregacji w COL-teście a wartością glikemii na czczo ( $p=0,04$ ). Nie odnotowano natomiast korelacji pomiędzy wynikami agregacji a wartością HbA<sub>1c</sub>. Wykazano również związek między poziomem cholesterolu LDL a wynikami agregacji w testach z zastosowaniem ADP oraz kolagenu, osoby „oporne na ASA” miały znamienne wyższy poziom LDL ( $3,96 \pm 1,1$  mmol/l) w odniesieniu do osób „wrażliwych na ASA” ( $3,18 \pm 1,1$  mmol/l) ( $p=0,03$ ). Nie odnotowano natomiast związku pomiędzy parametrami agregacji a cholesterolem całkowitym, HDL, poziomem trójglicerydów, a także pozostałymi parametrami biochemicznymi (CRP, kreatynina, AspAT, AlAT, bilirubina).

Przeprowadzona analiza zależności pomiędzy wynikami agregacji a zażywaniem innych leków przez osoby badane wykazała jedynie związek pomiędzy zjawiskiem oporności na ASA a stosowaniem statyn. Wśród 6 chorych, u których stwierdzono laboratoryjną oporność na ASA, 5 osób zażywało simwastatynę (wszyscy chorzy w dawce 20 mg/dobę). Nie stwierdzono zależności pomiędzy stosowaniem innych leków a wynikami agregacji.

#### DYSKUSJA

Częstość występowania oporności na ASA nie została jak do tej pory jednoznacznie określona. W zależności od zastosowanej metody laboratoryjnej, zjawisko oporności na działanie aspiryny opisywano u chorych po udarze mózgu (do 60% badanych), w miażdżycy kończyn

dolnych (do 60%), w stabilnej chorobie wieńcowej (do 70%) oraz u chorych bezpośrednio po zawale mięśnia sercowego (do 80%) [12–15]. W przeprowadzonym przez nas badaniu funkcji płytek krwi przy pomocy wielokanałowego analizatora wykorzystującego metodę agregometrii impedancyjnej, stwierdziliśmy występowanie oporności na ASA u 6 osób (8,6%) w okresie ostrym udaru mózgu. Wynik ten jest porównywalny do danych prezentowanych przez Berrouschot i wsp. [16] oraz Seok i wsp. [17], zaś niższy niż w doniesieniach kilku innych badaczy [15, 18–20], aczkolwiek stosowali oni odmienne metody laboratoryjnej oceny funkcji płytek krwi (agregometrię optyczną wg Borna, PFA-100, Rapid Function Assay-Aspirin: RPFA-ASA, poziom tromboksanu B2 w moczu). Jak do tej pory, brak doniesień dotyczących częstości występowania oporności na ASA u chorych po udarze mózgu lub TIA, określonych przy pomocy metody i aparatury zastosowanej w niniejszej pracy. Jest to związane z tym, iż została ona stosunkowo niedawno opracowana przez badaczy z Monachium, a następnie wprowadzona do użytku laboratoryjnego, głównie w oddziałach kardiologicznych i kardiochirurgicznych [7]. Liczne przeprowadzone badania potwierdzają wysoką zgodność wyników agregacji płytek krwi uzyskanych metodą tradycyjną (agregometria optyczna wg Borna) oraz przy pomocy aparatu Multilplate [8, 9, 21], jednakże ta ostatnia jest znacznie szybsza, mniej pracochłonna, nie wymaga specjalnego przygotowania próbki krwi, tym samym zmniejsza ryzyko błędów laboratoryjnego, dlatego też została wybrana do oceny funkcji płytek krwi w niniejszym badaniu.

W przeprowadzonym przez nas badaniu nie stwierdziliśmy korelacji pomiędzy reaktywnością płytek krwi a dawką ASA, wszyscy chorzy zażywali jednakże niskie dawki ASA (75 mg lub 150 mg). Dane literaturowe dotyczące związku oporności na ASA z dawką leku są niejednoznaczne. W dużych randomizowanych próbach nie znaleziono przekonujących dowodów na istnienie takiej korelacji [4, 22]. Niektórzy badacze jednakże odnotowali częstsze występowanie oporności na ASA u osób zażywających niższe dawki leku ( $\leq 150$  mg) [23–25].

Podobnie jak Berrouschot i wsp. [16] oraz Żyt-kiewicz i wsp. [18], nie odnotowaliśmy korelacji pomiędzy reaktywnością płytek krwi a wiekiem oraz płcią badanych. Wg niektórych ba-

daczy pacjenci starsi częściej wykazują brak odpowiedzi na aspirynę i wymagają stosowania większych dawek dla jej efektywnego działania [17, 26, 27]. W nielicznych doniesieniach oporność na ASA częściej odnotowywana była u kobiet [26, 28].

Nie wykazaliśmy również związku między opornością na ASA a rodzajem udaru oraz stanem funkcjonalnym chorych. Podobną obserwację poczynili również inni badacze [16].

Ponadto nie stwierdziliśmy związku między reaktywnością płytek krwi a niektórymi występującymi u badanych pacjentów czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa, migotanie przedsionków, palenie papierosów, przebyty zawał mięśnia sercowego). Jak do tej pory, żaden z autorów nie odnotował wpływu nadciśnienia tętniczego na zjawisko oporności na ASA [16, 18]. Nie opisano też, aby współistniejąca przewlekła choroba wieńcowa czy zawał mięśnia sercowego w wywiadzie u chorych po przebytych incydencie naczyniowym mózgu wpływały na funkcję płytek krwi poddanych działaniu ASA [16, 18]. W kilku badaniach natomiast zaobserwowano zwiększoną agregację płytkową u osób palących papierosy pomimo stosowania preparatów ASA [29, 30]. U palaczy papierosów występuje zjawisko stresu oksydacyjnego, obserwuje się zwiększony poziom 8-izo-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , prostaglandyny syntetyzowanej z kwasu arachidonowego w nieenzymatycznym procesie katalizowanym przez wolne rodniki. Jej działanie to wzmocnienie odpowiedzi płytkowej na działanie agonistów stosowanych w testach „in vitro” [31, 32].

Zaobserwowaliśmy natomiast korelację pomiędzy wyższą wartością cholesterolu frakcji LDL a występowaniem zjawiska oporności na ASA, co znajduje potwierdzenie w dostępnym piśmiennictwie. W badaniu Friend i wsp. u 69% pacjentów z hiperlipidemią stwierdzono zmniejszoną odpowiedź płytkową na ASA znajdując korelację pomiędzy stężeniem cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL [33]. Według Jastrzębskiej i wsp. stan ten może być tłumaczony aktywacją płytek przez oksydowany LDL [34]. Karepov i wsp. stwierdzili związek między występowaniem oporności na ASA a trójglicydemią, tej zależności jednakże nie potwierdziliśmy naszym badaniem [20]. Także inne badania oceniające korelację pomiędzy podwyższonymi parametrami lipidowymi a zwiększoną agregacją płytkową dostar-

czają dowodów na istnienie takiego związku [35, 36].

W przeciwieństwie do Żytkiewicza i wsp. [18], zaobserwowaliśmy korelację pomiędzy agregacją płytek krwi indukowaną kwasem arachidonowym a BMI. Chorzy, u których stwierdzono oporność na ASA, mieli znamienne wyższą wagę oraz BMI w odniesieniu do osób „aspirynowrażliwych”. U wielu osób otyłych dochodzi bowiem do zniesienia przeciwpłytkowego działania insuliny, która w warunkach fizjologicznych hamuje agregację płytek krwi [37, 38]. Być może zastosowana dawka ASA u chorych tych była niewystarczająca. Obserwacja ta wymaga dalszych badań.

Odnotowaliśmy również – wprawdzie nieznamienne - wpływ cukrzycy oraz poziomu glikemii na wyniki badań funkcji płytek krwi. Dane literaturowe potwierdzają naszą obserwację [17, 18, 39].

Przeprowadzona analiza zależności pomiędzy wynikami agregacji a równoczesnym zażywaniem innych leków wykazała jedynie związek pomiędzy zjawiskiem oporności na ASA a stosowaniem statyn. Jednakże wszyscy chorzy „oporni na ASA” zażywający statynę mieli równocześnie wysoki BMI. W związku z powyższym obserwacja ta wymaga dalszych badań.

Nie odnotowaliśmy natomiast istotnego wpływu na aktywność płytek krwi żadnego z innych dodatkowo zażywanych leków. W dostępnym piśmiennictwie istnieją doniesienia na temat interakcji lekowych pomiędzy ASA a innymi NLPZ. Podawanie równocześnie z aspiryną innych NLPZ, a zwłaszcza ibuprofenu, miałyby zmniejszać jej działanie przeciwpłytkowe. Taki efekt daje stosowanie NLPZ niebędących wybiórczymi inhibitorami COX2 [5, 40, 41]. Niektórzy badacze zaobserwowali również związek między zażywaniem inhibitorów pompy protonowej oraz blokerów kanałów wapniowych a efektem terapii przeciwpłytkowej [42–44]. Istnieje również doniesienie o wpływie równoczesnego zażywania aspiryny oraz ACE inhibitorów i/lub beta-blokerów na występowanie zjawiska oporności na ASA [17].

Jak wynika z danych literaturowych, istotnym czynnikiem ograniczającym efekt ASA jest brak współpracy z pacjentem [5]. Czynnikiem ten został wyeliminowany w niniejszym badaniu, gdyż wszyscy pacjenci zażywali ASA podczas pobytu w szpitalu pod kontrolą pielęgniarki.



W literaturze opisywano także zmiany oporności na ASA w zależności od czasu stosowania leku. W pracy Berrouschot i wsp. badano funkcję płytek krwi u 291 chorych po udarze mózgu, zażywających ASA w dawce 300 mg. Stwierdzono pierwotną oporność na ASA u 7,2% chorych (początkowa niewystarczająca inhibicja płytek), zaś 4,1% uznano za wtórnie opornych (niewystarczająca inhibicja płytek, która pojawiła się w czasie rocznej obserwacji) [16]. W niniejszej pracy dokonano oceny częstości występowania zjawiska oporności na ASA u chorych w okresie ostrym udaru mózgu, stąd badano jedynie pierwotną oporność na lek.

Do tej pory nie opracowano jednoznacznych wytycznych dotyczących laboratoryjnego monitorowania efektu terapii przeciwplatekowej, jak również postępowania w przypadku stwierdzenia oporności laboratoryjnej na lek. Najczęściej poleca się wówczas zwiększenie dawki lub zmianę na inny lek przeciwplatekowy. U wszystkich chorych poddanych niniejszemu badaniu, u których stwierdzono laboratoryjną oporność na ASA, dokonano zmiany ASA na klopidoogrel.

Wyniki większości badań oraz metaanaliz wskazują na związek między opornością laboratoryjną a kliniczną, czyli częstszym występowaniem zdarzeń sercowo-naczyniowych u osób ze stwierdzoną opornością na ASA w testach laboratoryjnych. Gum i wsp. dokonali prospektywnej oceny 326 chorych ze stabilną chorobą wieńcową. Stwierdzili, iż w gru-

pie chorych opornych na ASA występowała wyższa śmiertelność oraz częstsze epizody zawału serca i udaru mózgu [28]. Krasopoulos i wsp. dokonali metaanalizy 20 badań (2930 chorych zażywających aspirynę 75-325 dziennie) i stwierdzili, że pacjenci oporni na ASA mają większe ryzyko śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych niż „aspirynowrażliwi” [45]. Podobne wnioski wyciągnęli również inni badacze [46].

#### PODSUMOWANIE

Zastosowana metoda pozwoliła na wykrycie zjawiska oporności na aspirynę u części chorych z udarem niedokrwiennym mózgu, u których w okresie ostrym zastosowano ASA. Wykazano związek między efektem stosowania aspiryny a niektórymi czynnikami ryzyka udaru oraz zażywaniem statyn. Zastosowanie wielokanałowego analizatora czynności płytek krwi wykorzystującego metodę agregometrii impedancyjnej we krwi pełnej w celu monitorowania efektu przeciwplatekowego ASA w prewencji wtórnej udaru mózgu wymaga dalszych badań.

Badanie było finansowane ze środków przyznanych na cele statutowe w ramach projektu KNW-1-052/09.

#### PIŚMIENNICTWO:

1. Jack D.B. One hundred years of aspirin. *Lancet* 1997; 350: 437-439.
2. Antiplatelet Trialist` Collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy. I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994; 308: 81-106.
3. Postuła M., Kapłon A. Oporność na kwas acetylosalicylowy i jego kliniczne znaczenie. *Kardiologia w praktyce*. 2007; 3(3): 144-152.
4. Antithrombotic Trialist` Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.
5. Kamińska M., Musiał W.J., Osada J., Dąbrowska M. Problem „oporności” na leki przeciwplatekowe. *Terapia Kardiologia 2009; 4: 28-33.*
6. Cabe D.J.H., Harrison P., Mackie I.J. i wsp. Assessment of the antiplatelet effects of low to medium dose aspirin in the early and late phases after ischaemic stroke and TIA. *Platelets* 2005; 16(5): 269-280.
7. Toth O., Calatzis A., Penz S. i wsp. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb. Haemost.* 2006; 96: 781-788.
8. Sibbing D., Braun S., Jawansky S. i wsp. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiplate electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb. Haemost.* 2008; 99: 121-126.
9. Paniccia R., Antonucci E., Maggini N. i wsp. Assessment of platelet function on whole blood by multiplate electrode platelet aggregometry in high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009; 131: 834-842.
10. Calatzis A., Spannagl M., Loreth R. Multiplate platelet function analysis – application and interpretation. V2.0/07.2007. Dynabyte medical, Monachium 2007.
11. Instrukcja obsługi Multiplate. V060 403PL. Dynabyte medical, Monachium 2007.
12. Bernstein P.L., Jacobson B.F., Connor M.D., Becker P.J. Aspirin resistance in south African Caucasian patients with

- thrombotic cerebrovascular events. *J. Neurol. Sci.* 2009; 277(1-2): 80–82.
13. Bennet D., Yan B., Macgregor L. i wsp. A pilot study of resistance to aspirin in stroke patients. *J. Clin. Neurosci.* 2008; 15(11): 1204–1209.
  14. Zimmermann N., Hohlfeld T. Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb. Haemost.* 2008; 100(3): 379–390.
  15. Dharmasaroja P. Aspirin non-responders in Thai ischaemic stroke/TIA patients. *J. Med. Assoc. Thai.* 2008; 91(6): 818–821.
  16. Berrouschot J., Schwetlick B., von Twickel G. i wsp. Aspirin resistance in secondary stroke prevention. *Acta Neurol. Scand.* 2006; 113: 31–35.
  17. Seok J.L., Joo I.S., Yoon J.H. i wsp. Can aspirin resistance be clinically predicted in stroke patients? *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2008; 110(2): 110–116.
  18. Żytkiewicz M., Gielwanowska L., Wojtasińska E. i wsp. Resistance to acetylsalicylic acid in patients after ischaemic stroke. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2008; 118(12): 727–732.
  19. Postuła M., Tarchalska-Kryńska B., Filipiak K.J. i wsp. Factors responsible for aspirin resistance – can we identify them? *Kardiol. Pol.* 2010; 68(4): 412–413.
  20. Karepov V., Tolpina G., Kuliczowski W., Serebruany V. Plasma triglycerides as predictors of platelet responsiveness to aspirin in patients after first ischaemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* 2008; 26(3): 272–276.
  21. Velik-Salchner C., Maier S., Innerhofer P. i wsp. Poin-of-care whole blood impedance aggregometry versus classical light transmission aggregometry for detecting aspirin and clopidogrel: the results of a pilot study. *Anesth. Analg.* 2008; 107(6): 1798–1806.
  22. Dutch TIA Trial Study Group. A comparison of two doses of aspirin (30mg vs 283mg a day) in patients after a transient ischemic attack of minor ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325: 1261–1266.
  23. Awtry E.H., Loscalza J. Aspirin. *Circulation* 2000; 101: 1026–1218.
  24. Schror K. Aspirin and Platelets: The antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin. Thromb. Hemost.* 1997; 23: 349–356.
  25. Łabuz-Rozsak B., Pierzchała K., Porosińska A. i wsp. Oporność na kwas acetylosalicylowy stosowany w prewencji wtórnej udaru mózgu. Badanie pilotażowe. *Wiad. Lek.* 2010; 3: 171–179.
  26. Macchi L., Christaens L., Brizard A. i wsp. Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate. *Thromb. Res.* 2002; 107: 5–49.
  27. Alberts M.J., Bergman D.L., Molner E. i wsp. Antiplatelet effect of aspirin in patients with cerebrovascular disease. *Stroke* 2004; 35: 175–178.
  28. Gum P.A., Kottke-Marchand K., Poggio E.D. i wsp. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 2001; 88: 230–235.
  29. Hung J., Lam J.Y.T., Lacoste L. i wsp. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 1995; 92: 2432–2436.
  30. Davis J.W., Hartman C.R., Lewis H.D. i wsp. Cigarette smoking induced enhancement of platelet function: lack of prevention by aspirin in men with coronary artery disease. *J. Lab. Clin. Med.* 1985; 105: 479–483.
  31. Cipollone F., Ciabattoni G., Patrono C. i wsp. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane synthesis in severe unstable angina. *Circulation* 2000; 102: 1007–1013.
  32. Porosińska A., Pierzchała K. Koncepcje oporności na aspirynę. *Neurol. Neurochirur. Pol.* 2006; 40 (4): 313–319.
  33. Friend M., Vucenik I., Miller M. Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidemia. *BMJ* 2003; 326: 82–83.
  34. Jastrzębska M., Torbus-Lisiecka B., Pieczul-Mróz J. i wsp. Ocena funkcji płytek krwi i aktywności inhibitora aktywatora plazminogenu w chorobie niedokrwiennej serca w zależności od współistniejącej hiperlipoproteinemii i leczenia aspiryną. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1997; 98: 510–519.
  35. O'Donnell C.J., Larson M.G., Tofler G.H. i wsp. Genetic and environmental contributions to platelet aggregation. *The Framingham Heart Study. Circulation* 2001; 103: 3051–3056.
  36. Opper C., Clement C., Wesemann W. i wsp. Increased number of high sensitive platelets in hypercholesterolemia, cardiovascular diseases, and after incubation with cholesterol. *Atherosclerosis* 1995; 113(2): 211–217.
  37. Karam J.H., Grodsky G.M., Forsham P.H. Excessive insulin response to glucose in obese subjects as measured by immunochemical assays. *Diabetes* 1963; 12: 197–204.
  38. Trovati M., Anfossi G. Influence of insulin and of insulin resistance on platelet and vascular smooth muscle cell function. *J. Diabetes Complications* 2002; 16: 35–40.
  39. Kamińska M., Osada J., Dąbrowska M. i wsp. Ocena przeciwpłytkowego działania aspiryny wśród pacjentów po zawale serca leczonych PCI w obserwacji półroczonej – wyniki wstępne. *Pol. Przegl. Kardiol.* 2007; 5: 335–341.
  40. Catella-Lawson F., Reilly M.P., Kapoor S.C. i wsp. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 1809–1817.
  41. Kurth T., Glynn R.J., Walker A.M. i wsp. Inhibition of clinical benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Circulation* 2003; 108: 1191–1195.
  42. Sibbing D., Morath T., Stegheer J. i wsp. Impact of proton pump inhibitors on the antiplatelet effects of clopidogrel. *Thromb. Haemost.* 2009; 101(4): 714–719.
  43. Siller-Matula J.M., Spiel A.O., Lang I.M., Kreiner G., Christ G., Jilma B. Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am. Heart J.* 2009; 157(1): 148–153.
  44. Siller-Matula J.M., Lang I.M., Christ G., Jilma B. Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52(19): 1557–1563.
  45. Krasopoulos G., Brister S.J., Beattie W.S., Buchanan M.R. Aspirin resistance and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008; 336 (7637): 195–198.
  46. Buchanan M., Verma S. Biological basis and clinical implications of acetylsalicylic acid resistance. *Can. J. Cardiol.* 2006; 22(2): 149–151.