

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Dr. Homoródi Nóra

Aspirin hatás vizsgálata koronária betegekben

Debreceni Egyetem

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2019

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

ASPIRIN HATÁS VIZSGÁLATA KORONÁRIA BETEGEKBEN

Dr. Homoródi Nóra

Témavezető:

Prof. dr. Muszbek László

akadémikus



**DEBRECENI
EGYETEM**

Debreceni Egyetem

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:	1
1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS:.....	4
1.1. Az Aspirin története	4
1.2. Az Aspirin hatása	5
1.3. Az Aspirin kardiovaszkuláris hatása és jelentősége	7
1.4. Az Aspirin rezisztencia fogalma	7
1.5. Az Aspirin rezisztencia „probléma”	8
1.6. A clopidogrel és hatása	11
1.7. A clopidogrel rezisztencia	14
2. CÉLKITŰZÉSEK:.....	16
3. ANYAG ÉS MÓDSZER:	17
3.1. Vizsgált populáció, beválasztási és kizárási kritériumok:.....	17
3.1. a. Az Aspirin hatás vizsgálatába bevont koronária betegek és egészséges kontrollok.....	17
3.1. b. Az Aspirin és a clopidogrel monoterápián lévő betegek kiválasztása	19
3.2. Mintagyűjtési protokoll:.....	22
3.3. Aspirin hatás vizsgálatára használt módszerek:.....	22
3.4. COX-1 és COX-2 mRNS mérése	24
3.5. A clopidogrel hatást vizsgáló módszerek	25
3.6. A statisztikai analízis:.....	27
4. EREDMÉNYEK:	28
4.1. A COX-1 acetilációja az Aspirin által koszorúsérbetegeken.....	28
4.2. Az Aspirin hatása az arachidonsav indukálta TXB ₂ képződésre	29
4.3. Az Aspirin arachidonsav indukálta trombocita aggregációra kifejtett hatása	30
4.4. Az Aspirin trombocita COX-2 mRNS expresszióra gyakorolt hatása	32
4.5. A clopidogrel terápia hatása az Aspirin hatást detektáló módszerekre	33
4.6. Aspirin terápia hatása a clopidogrel hatást vizsgáló módszerekre	36
5. MEGBESZÉLÉS:.....	39
ÖSSZEFOGLALÁS.....	44
SUMMARY.....	46
IRODALOMJEGYZÉK:.....	48
TÁRGYSZAVAK:.....	57
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:.....	58
FÜGGELÉK:	59

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

AA: arachidonsav

AC: adenil-cikláz

acCOX-1: acetilált ciklooxygenáz 1

ADP: adenzil-difoszfát

AMI: akut miokardiális infarktus

ASA: acetilszalicilsav

ATP: adenzil-trifoszfát

ARU: Aspirin reaktivitási egység

BMI: Body Mass Index, testtömeg index

Ca: kalcium

Ca²⁺: kalcium ion

CAD: koronária betegség (coronary artery disease)

cAMP: ciklikus adenzin monofoszfát

cGMP: ciklikus guanozin monofoszfát

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute

COX-1: ciklooxygenáz-1

COX-2: ciklooxygenáz-2

CRP: C reaktív protein

CYP: citokróm P rendszer

DAG: diacil glicerol

GFR: glomeruláris filtrációs ráta

GPIIb/IIIa: glikoprotein IIb/IIIa

HDL-C: HDL-koleszterin

IP3: inozitol trifoszfát

LDL-C: LDL-koleszterin

MLCK-P: miozin könnyű lánc kináz

nacCOX-1: nem acetilált ciklooxygenáz-1

PDP: trombocita szegény plazma

PGE1: prosztaglandin E1

PGI2: prosztaciklin

PI3K: foszfatidil inozitol trifoszfát kináz

PIP2: foszfatidil inozitol difoszfát

PKB/Akt=szerin treonin protein kináz,

PKC: protein kináz C

PLA2: foszfolipáz A2

PLC β : foszfolipáz C

PPI: proton pumpa gátló

PRI: trombocita reaktivitási index

PRP: trombocita dús plazma

PRU: trombocita reaktivitási egység

P2X₁: P2X₁ receptor

P2Y₁: P2Y₁ ADP receptor

P2Y₁₂: P2Y₁₂ ADP receptor

Rap1b: Rap1b fehérje

TIA: tranzitórikus iszkémiás attack

TXA₂: tromboxán A₂

TXB₂: tromboxán B₂

VASP: vazodilatátor stimulálta foszfoprotein

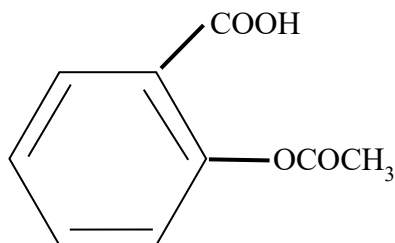
VASP-P: vazodilatátor stimulálta foszfoprotein foszforiláció

VN: Verify Now

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS:

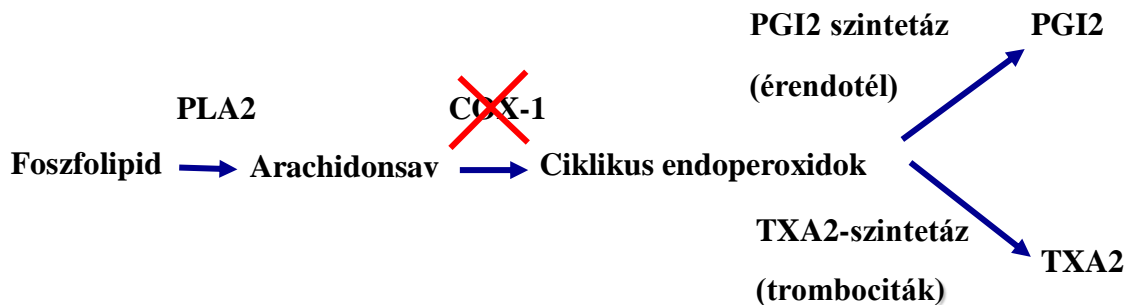
1.1. Az Aspirin története

Az Aspirin a legszélesebb körben használt egyik legrégebbi gyógyszerünk. Az Aspirin történetét egy kitűnő közleményben Desborough és Keeling foglalták össze (1). A szalicilsavat tartalmazó fűzfakéreg használata, mint tradicionális gyógyszeré, több mint 3500 éves múltra tekint vissza, hiszen a fűzfakivonat analgetikus és lázcsillapító hatású szerként történő használatáról az i.e. 1500-ra datálható antik dokumentumokban, az Ebers Papyrusban is tesznek említést. Hyppocrates 2000 évvel ezelőtt fájdalomcsillapítóként használta a fűzfabarka kivonatát, azonban a XVIII. századig nem volt ismert, hogy mi az aktív vegyület (2) (1. ábra). Az aktív vegyületet 1828-ban Felix Buchner izolálta, amit Salicin-nek nevezett el, később a technikát Leroux 1829-ban tovább finomította, majd 1838-ban Piria tiszta formában nyerte ki a szalicilsavat. Az acetilszalicilsavat (ASA) acetyl klorid és Na szalicilát összekapcsolásával 1853-ban először Charles Frederic Gerhardt szintetizálta. Az Aspirin néven gyógyszerként is alkalmazható ASA-t 1897-ben a Bayer cég laboratóriumában Felix Hoffman, Arthur Eichengrün és Heinrich Dresser állították elő. (3). Kezdetben „csodaszerként” számon tartva minden problémára alkalmazták, majd gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatása a XX. század folyamán vált ismertté.



1. ábra: Az acetilszalicilsav szerkezeti képlete

1971-ben a később Nobel díjat kapott Sir John Vane fedezte fel az Aspirin tromboocita gátló tulajdonságát, mely háttérében a ciklooxygenáz-1 (COX-1) enzim blokkolásán keresztül a tromboociták tromboxán A₂ (TXA₂) szintézist gátló hatása áll (3) (2. ábra).



2. ábra: Aspirin COX-1 enzimre kifejtett hatásának mechanizmusa (PLA₂=foszfolipáz A₂, PGI₂=prosztaglandin)

1.2. Az Aspirin hatása

Az Aspirin fő farmakológiai hatása a COX-1 enzim Ser529 oldalláncának kovalens kötéssel történő acetilálása, ami az aktív helyhez vezető üreg oldal falában akadályozza az arachidonsav (AA) bekötődését (4-6). Tromboocita agonisták hatására intracellulárisan Ca²⁺ szabadul fel, ami foszfolipáz, mindenekelőtt foszfolipáz A₂ (PLA₂) aktivációt eredményez. A membrán foszfolipidekből PLA₂ hatására felszabaduló AA-ból a COX-1 hatására ciklikus endoperoxidok, prosztaglandin G₂ és H₂ keletkeznek. A továbbiakban tromboxán A₂ szintetáz hatására a prosztaglandin H₂-ből TXA₂ keletkezik, mely igen erős tromboocita aktivációs hatással bír. A COX-1 konstitutív enzim, a szövetekben folyamatosan expresszálódik (4), és a keletkezett

prostaglandin H₂-ből prostaglandin szintetáz vagy prosztaciklin szintetáz hatására más aktív metabolitok képződnek, melyek számos fiziológiai folyamatban szerepet játszanak. Az enzim másik izoenzime, a ciklooxygenáz-2 (COX-2) indukálható enzim, mely patológiás folyamatok esetén (pl. gyulladásos folyamatok) expresszáldik, a fájdalom és láz kialakításában szerepet játszó prostaglandin típusok képződését elősegítve (7). A COX izoenzimek aminosav szekvenciája kb. 60%-ban megegyezik (4), ugyanakkor az Aspirin affinitása a COX-1 iránt sokkal erősebb, a COX-2 Ser516 oldalláncának hasonló mértékű acetilációjához 10-100x-s ASA koncentráció szükséges. Ez a magyarázata annak, hogy 75-100 mg Aspirin csaknem teljesen gátolja a trombocitákban a COX-1 enzimet, míg a COX-2 gátláshoz, azaz láz-és fájdalomcsillapító hatásához lényegesen nagyobb dózisok szükségesek. Ennek valószínű oka az, hogy a COX-2 nagyobb katalitikus üregében a Ser516 és az ASA relatív orientációja kevésbé segíti elő az acetilációt (6,8). Az Aspirin félélet ideje a szervezetben mindössze 15-20 perc, de a trombocitákra kifejtett hatása azok egész élettartama alatt, azaz 7-10 napon át tart (2). Ennek magyarázata, hogy a trombociták nem rendelkeznek DNS genommal, csak megakariocita eredetű mRNS-el és a fehérje szintézishez szükséges translációs apparátussal, ami csak limitált mértékű fehérje szintézist tesz lehetővé, ezért nem képes újraszintetizálni az ASA által irreverzibilisen (kovalensen) módosított COX-1-t (9).

Az ASA gyorsan felszívódik a gyomor és a vékonybél felső szakaszának nyálkahártyáján keresztül. A bevonatmentes Aspirin a plazmában már 20 perccel a bevételt követően detektálható, csúcskoncentrációját pedig 30-40 perc múlva éri el, míg az enteroszolvens bevonatos készítmények esetében a csúcskoncentráció 3-4 órával a bevételt követően várható (10,11). A hagyományos Aspirin szisztémás biológiai hozzáférhetősége körülbelül 40-50%-os, melytől független a COX-1 gátlás határfoka, ugyanis az ASA már a portális keringésben találkozhat a vérlemezkékkel, ahol a trombociták a szisztémás keringésre jellemző

koncentrációnál lényegesen magasabb gyógyszer szintnek vannak kitéve (11). A trombocita TXA₂ képzés és a trombocita aggregáció gátlás szempontjából, az enteroszolvens bevonatos, illetve a hagyományos készítmények hatékonyságában krónikus Aspirin terápia esetén nincs különbség (12).

1.3. Az Aspirin kardiovaszkuláris hatása és jelentősége

A szer kardioprotektív hatása a múlt század közepén került először leírásra. Ettől a felismeréstől kezdve a kis dózisú ASA-t eredményesen használták az akut aterotrombotikus események, mint a miokardiális infarktus és aterotrombotikus iszkémiás stroke megelőzésében (13-17). A vaszkuláris halálozást és a nem fatális miokardiális infarktust 15-30%-al csökkenti (5,13-15). A nagy betegszámmal végzett klinikai tanulmányok eredményei alapján az alacsony dózisú (75-100 mg/nap) Aspirin terápia a „Gold standard” a kardio-és cerebrovasculáris események szekunder prevenciójában. A gyulladáscsökkentő, antipiretikus és fájdalom csökkentő hatás eléréséhez ennél lényegesen magasabb dózissra (500 mg) van szükség.

1.4. Az Aspirin rezisztencia fogalma

A kardiovaszkuláris betegek egy részében azonban az alacsony dózisú Aspirin terápia nem védi ki az (ismételt) akut aterotrombotikus eseményeket, mely észrevétel vezetett az Aspirin rezisztencia fogalmának bevezetéséhez. Az Aspirin rezisztencia azonban nem egységes fogalom, nem létezik rá pontos, egységes definíció, valószínű ez is a magyarázata annak, hogy bár korábbiakban számos tanulmányban különböző módszerekkel vizsgálták az Aspirin

rezisztencia előfordulásának gyakoriságát, a kapott eredmények széles tartományban, 5-66%-ig szórtak(18-20).

Az „Aspirin rezisztencia” fogalmát négyféleképpen is meghatározhatjuk:

- 1.) Kémiai (valós) Aspirin rezisztencia: a trombocitákban lévő COX-1 enzim 529-es szerin-je nem acetilálható Aspirinnel (21,22).
- 2.) Laboratóriumi „Aspirin rezisztencia”: az Aspirinre adott csökkent válasz egy adott laboratóriumi teszttel mérve (21,22).
- 3.) Bizonyos fokozott trombocita turnover eredményező állapotokban a fiatal és még nem acetilált trombociták képződésének és keringésbe való felszabadulásának folyamata felgyorsul, és ezekben az újonnan képződött és keringésbe került trombocitákban a TXA2 képződés nem gátolt (23-25). Ezekben az esetekben nem beszélhetünk Aspirin rezisztenciáról, hiszen az Aspirin kifejti hatását és napi kétszeri Aspirin bevételével a probléma elvileg kiküszöbölhető (26).
- 4.) Klinikai "Aspirin rezisztencia" (klinikai hatástalanság): az Aspirin nem védte meg a beteget egy bekövetkezett akut vaszkuláris eseménytől (21,22).

1.5. Az Aspirin rezisztencia „probléma”

Ad 1/ A legutóbbi időkig nem volt olyan referencia módszer, mely direkt módon mérné a COX-1 Aspirin által történő acetilációját, azaz diagnosztizálhatná a valódi Aspirin rezisztenciát. Munkacsoportunk a humán COX-1 525-533 aminosav szekvenciájának megfelelő acetilált és nem acetilált nonapeptidek ellen olyan monoklonális anti-humán COX-1 ellenes antitesteket állított elő, melyek csak az acetilált (inaktivált) COX-1-el vagy csak az aktív (nem acetilált) COX-1-el reagálnak. Western blotting technikával az antitestek egyértelműen

elkülönítették az acetilált- és nem acetilált enzimet a trombocita lizátumban. Ez az első olyan módszer, mely közvetlen módon detektálja a COX-1 Ser529 acetilációját és alkalmas a valódi (kémiai) Aspirin rezisztencia megállapítására (21).

A direkt módszer mellett kifejlesztettünk egy másik módszert, mely AA indukciót követően a trombociták által képzett TXA2 inaktív, stabil metabolitjának, a tromboxán B2-nek (TXB2) a mennyiségét méri trombocita dús plazmában (platelet rich plasma; PRP). Ez a módszer a trombociták TXB2 képző kapacitását határozza meg és közvetetten jelzi a COX-1 Aspirin által előidézett gátlását, azaz indirekt módon méri a COX-1 acetiláció trombocita aktivációra kifejtett gátló hatását. E két módszer az Aspirin hatás mérésére referencia módszernek tekinthető (21). A laboratóriumi diagnosztikában a referencia módszer általában olyan relatíve bonyolult eljárás, amely nagy biztonsággal ad választ egy adott kérdés eldöntésére. A referencia módszer bonyolultsága, nehézsége miatt általában nem alkalmazható a rutin laboratóriumi diagnosztikában, azonban kiválóan alkalmas a rutin diagnosztikai módszerek evaluálására, megbízhatóságuk tesztelésére. Az új, általunk kidolgozott referencia módszerekkel kapott eredmények azt bizonyították, hogy 108, egy hétig Aspirin szedő egészséges önkéntes esetében a COX-1 teljes mértékben acetilálódott, azaz egészséges egyének között a kémiai ("valós") Aspirin rezisztencia, ha egyáltalán létezik, extrém ritkaságnak számít (22). Ez azonban nem jelenti feltétlenül azt, hogy ezek az eredmények akut aterotrombotikus komplikációt elszenvedett betegekre, pl. koszorúér betegekre is általánosíthatók.

Ad 2/ Az Aspirin hatását vizsgáló rutin laboratóriumi módszerek jelentős inter- és intraindividuális variabilitást mutatnak, az egyes módszerek között gyenge a korreláció. Az Aspirin hatás határértékeiben sincs konszenzus. Sokáig nem állt rendelkezésre e módszerek hatékonyságát vizsgáló elfogadott referencia módszer. A fent ismertetett két referencia

módszer segítségével Aspirint szedő egészséges önkénteseken megállapítottuk, hogy a rutin módszerek közül csak az AA indukálta trombocita aktiváció detektálása (AA indukálta trombocita aggregáció és ATP felszabadulás, ill. a szintén AA agonistát használó VerifyNow Aspirin Assay) ad valós eredményeket.

Ad 3/ A fokozott trombocita turnover, bár klinikai jelentőséggel bírhat, nem tekinthető Aspirin rezisztenciának. Fokozott trombocita turnover-t számos tényező, kórkép eredményezhet, melyek abnormis megakariocyták képződésével (esszenciális trombocitémia), vagy fokozott perifériás felhasználással (pl. egyes gyulladós állapotok) járnak. Ezekben az esetekben a COX-1 acetylációja éppen úgy megtörténik, mint normál trombocita turnover-nél, az újonnan képződött trombocitákban lévő COX-1 többszöri dózírozással gátolható. Esszenciális trombocitémiában pl. a napi 2x alkalmazott 100 mg Aspirin hatékonyabbnak bizonyult a napi 1x 100 vagy akár 1x200 mg dózishoz (27,28).

Ad 4/ A trombocita aktiváció egy komplex folyamat, melynek csak egy részmechanizmusa a TXA₂ képződés. A nagy dózisú kollagén vagy a trombin által indukált trombocita aktivációt az Aspirin nem gátolja. Utóbbi mechanizmusok lényeges szerepet játszanak az aterotrombotikus betegségek akut komplikációinak a kialakulásában, ezért az Aspirin 100%-os hatékonysága elvileg sem képzelhető el, amit a klinikai hatékonyság vizsgálatok is világosan mutatnak. Az Aspirin profilaxis alatt bekövetkező akut eseményeket tehát nem szabadna Aspirin rezisztenciának tulajdonítani, az ilyen esetekre klinikai hatástalanság a korrekt megnevezés.

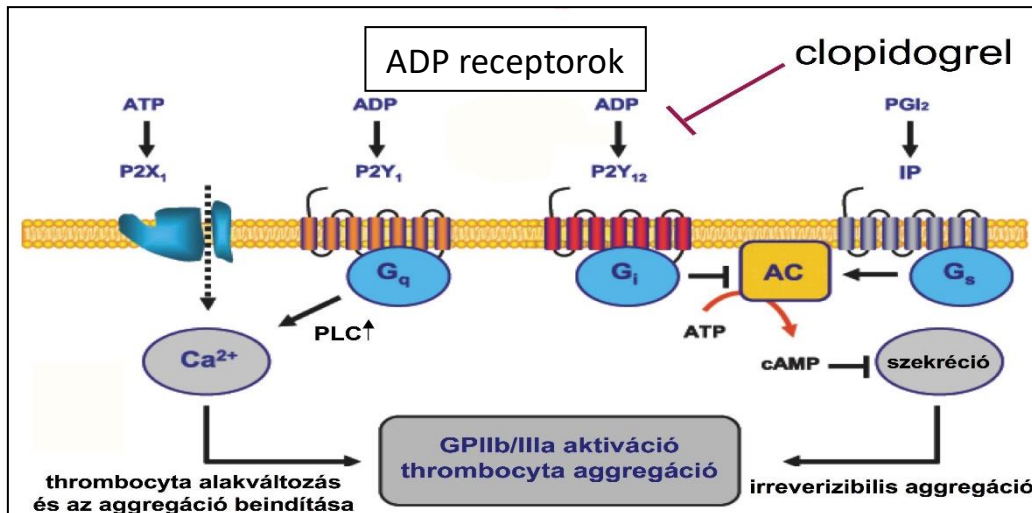
Az egészséges önkénteseken a kapott eredmények különbözhetnek a koronária betegek (CAD) esetében észleltektől, hiszen e betegcsoportban számos tényező módosíthatja az Aspirin hatását. Ahogy korábban említésre került, a fokozott trombocita turnover, a COX-2

fokozott expressziója/up regulációja pl. diabeteses betegekben és gyulladáso s kórképek esetén elvileg hozzájárulhatnak a csökkent Aspirin hatáshoz (24,28-31)

Kérdés azonban, hogy ezekben az állapotokban kialakul-e valódi Aspirin rezisztencia?

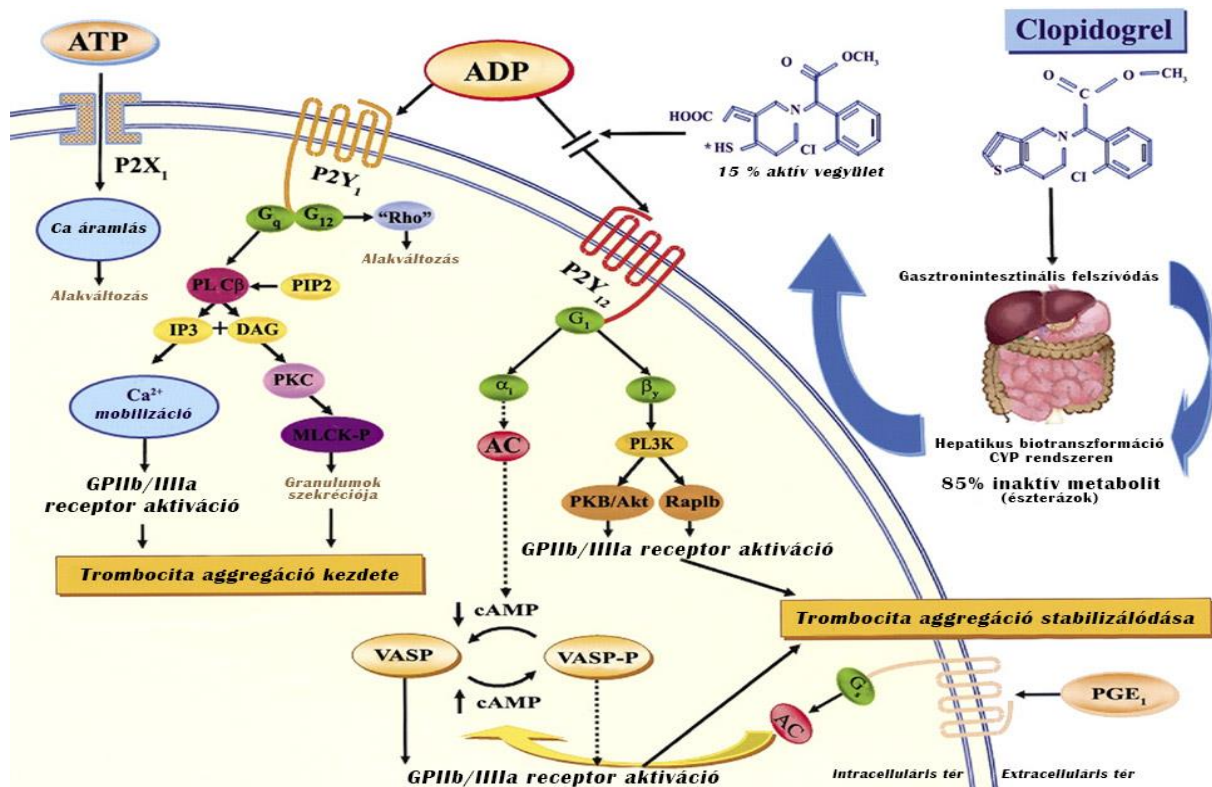
1.6. A clopidogrel és hatása

Az antitrombocita kezelés másik sarokköve Magyarországon az Aspirin mellett a clopidogrel. A clopidogrel a tienopiridinek közé tartozó vegyület, ami irreverzibilisen gátolja a trombociták adenoszil-difoszfát (ADP) P2Y₁₂ receptorát. A trombociták felszínén két ADP receptort különböztetünk meg. A P2Y₁ és a P2Y₁₂ különböző intracelluláris G proteinekhez kapcsolódnak, melyek eltérő további reakciókat mediálnak. Az ADP a P2Y₁₂ receptoron keresztül a Gi₂ proteinhez kapcsolódva akadályozva a ciklikus adozin monofoszfát (cAMP) termelődését és a foszfatidil inozitol trifosztát kináz (PI3K) útvonalat. A Gq proteinhez kapcsolódó P2Y₁ receptoron keresztül pedig a foszfolipáz C (PLCβ) útvonalat aktiválja (3. ábra)(32).



3.ábra: ADP receptorok típusai (módosítva Gachet C, Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2006;46:277-300. után (32), ATP=adenozin-trifoszfát, P2X₁=P2X₁ receptor, ADP=adenozin-difoszfát, P2Y₁=P2Y₁ típusú ADP receptor, P2Y₁₂=P2Y₁₂ típusú ADP receptor, PGI₂=prosztagclin, IP=inozitol-trifoszfát, G_s=G_s fehérje, G_i=G_i fehérje, G_q=G_q fehérje, AC=adenil-cikláz, cAMP=ciklikus adenozin monofoszfát, PLC=foszfolipáz C, Ca²⁺=kalcium ion, GPIIb/IIIa=glikoprotein IIb/IIIa

A clopidogrel második generációs készítmény, un. prodrug, mely több lépcsőn keresztül a májban alakul át aktív metabolittá (4. ábra) (33). Végeredményben a clopidogrelnek csak mintegy 15%-a jelenik meg aktív formában a keringésben. Az aktív metabolit szabad SH csoportot tartalmaz és diszulfid hídon keresztül kovalensen kötődik a P2Y₁₂ receptorhoz, ezzel gátolja az ADP receptorhoz való kötődését és az ezáltal indukált trombocita aktivációt. A clopidogrel monoterápiában, illetve Aspirinnel kombinálva széles körben használt vegyület a visszatérő aterotrombotikus iszkémiás események megelőzésében (34). Az antitrombocita hatás azonban a a clopidogrel vonatkozásában az esetek 10-50%-ában nem alakul ki, melynek hátterében elsősorban a változó mértékű aktív metabolit képződés állhat, pl. a metabolizmusban résztvevő CYP izoenzimek genetikai polimorfizmusának következtében (35-37).



4.ábra: A clopidogrel prodrug átalakulása aktív vegyületté és az ADP receptorok aktiváció mechanizmusa (módosítva Angiolillo et Ferreiro, Rev Esp Cardiol. 2010;63:60-76 után (33), ATP=adenozin-trifoszfát, P2X₁=P2X₁ receptor, ADP=adenozin-difoszfát, P2Y₁=P2Y₁ típusú ADP receptor, P2Y₁₂=P2Y₁₂ típusú ADP receptor, IP₃=inozitol-trifoszfát, DAG=diacil glicerol, PKC=protein kináz C, MLCK-P=miozin könnyű lánc kináz, PIP₂=foszfatidil inozitol difoszfát, PLCβ=foszfolipáz C, G₁₂=G₁₂ fehérje, Gi=Gi fehérje, Gq=Gq fehérje, AC=adenil-cikláz, cAMP=ciklikus adenzin monofoszfát, PLC=foszfolipáz C, Ca²⁺=kalcium ion, Ca=kalcium, GPIIb/IIIa=glikoprotein IIb/IIIa, PI3K=foszfatidil inozitol trifoszfát kináz, PKB/Akt=szerin treonin protein kináz, Rap1b=Rap1b fehérje, VASP=vazodilatátor stimulálta foszoprotein, VASP-P= vazodilatátor stimulálta foszoprotein foszforiláció, CYP=citokróm P rendszer, PGE₁: prosztaglandin E1

A clopidogrel rezisztens betegek relatíve magas száma vezetett új generációs, jobb metabolikus tulajdonságokkal rendelkező orális P2Y₁₂ gátlók, a prasugrel és a ticagrelor kifejlesztéséhez (38,39).

1.7. A clopidogrel rezisztencia

A clopidogrel esetében is probléma, hogy nem tisztázott melyik az a laboratóriumi módszer, ami igazolja a rezisztenciát. Az elérhető nagy számú laboratóriumi módszer közül a legszélesebb körben elterjedt és egyben „gold-standard”-ként használt ADP indukálta aggregáció vizsgálat (36,40,41). A módszer hátránya azonban, hogy nem P2Y₁₂ receptor specifikus, ezért nem optimális módszer a clopidogrel hatás monitorozására (40-43). A módosított prosztaglandin E 1 (PGE₁) jelenlétében ADP indukálta aggregáció vizsgálata ezt a problémát kiküszöböli. A P2Y₁₂ receptor specifikus egyéb módszerek, a vazodilatátor stimulálta foszfoprotein (VASP) foszforiláció áramlási citometriás mérése és a Verify Now (VN) Assay költségesek és eszközigényesek (42). A VASP egy a trombocitákban nagy mennyiségben jelen lévő aktin és profilin kötő fehérje, mely lényeges szerepet játszik ezen sejtek szekréciójának és adhéziójának negatív regulációjában (44). A VASP fontos szubsztrátja a cAMP és ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) regulálta protein kinázoknak, melyek a VASP Ser157, Ser239 and Thr278 aminosavak oldalláncait foszforilálják (44). Normál körülmények között a VASP nem foszforilált, a PGE₁ a cAMP képződését fokozva a cAMP függő kinázt aktiválva foszforilálja a VASP-t, amit az ADP a P2Y₁₂ receptor mediálta útvonalon gátol (4. ábra) (33). PGE₁ és/vagy ADP jelenlétében a VASP foszforiláció mértéke a P2Y₁₂ aktivitással korrelál (45), amit a trombocita reaktivitási indexszel fejeznek ki (platelet reactivity index, PRI).

A Verify Now P2Y₁₂ Assay egy teljes vért felhasználó „point of care” teszt, mely a trombociták és fibrinogénnel fedett gyöngyök ADP indukált együttes agglutinációját méri. Az agglutináció fokozott fényáteresztést eredményez, az eredményt trombocita reaktivitási egységben Platelet Reaction Unit-ben (PRU) fejezzük ki (42).

Az Aspirin és a clopidogrel hatásának más a támadáspontja, ugyanakkor az átfedések a blokkolt intracelluláris mechanizmusokban arra engednek következtetni, hogy az egyidejűleg szedett Aspirin befolyásolhatja a clopidogrel hatást mérő tesztek eredményét, valamint ugyanez fordítva is feltételezhető.

2. CÉLKITŰZÉSEK:

1. Célunk volt a korábban az Aspirin hatás kimutatására kidolgozott referenciamódszert, mint „gold standard”-et alkalmazva a kémiai, és a laboratóriumi Aspirin rezisztencia vizsgálata igazolt koronária betegeken, akik hosszú távú Aspirin monoterápián voltak. Valamennyi beteg esetében vizsgáltuk a COX-1 acetilációját, a COX-1 függő Aspirin hatásának mérésére használt laboratóriumi módszereket, valamint elvégeztük a trombocitákban történő COX-2 expresszió vizsgálatát.
2. Tekintettel arra, hogy az Aspirint és a clopidogrelt az esetek egy részében kombinált terápia formájában alkalmazzák, célunk volt annak a clopidogrel hatást vizsgáló módszernek, vagy módszereknek az azonosítása, melyet befolyásol az Aspirin hatása, illetve annak vizsgálata, hogy a clopidogrel hatása mennyire befolyásolja az Aspirin hatást vizsgáló módszerek eredményeit.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER:

3.1. Vizsgált populáció, bevásztási és kizárási kritériumok:

3.1. a. Az Aspirin hatás vizsgálatába bevont koronária betegek és egészséges kontrollok.

Aspirin hatását érintő vizsgálatunkba a Debreceni Egyetem, Kardiológia Intézet, kardiológiai szakrendelésén megjelent koronária intervención, illetve koszorúsér bypass műtéten átesett betegek vontunk be, akik legalább 1 hónapja napi 100 mg ASA monoterápiában részesültek. Kizárási kritériumok között szerepelt az akut miokardiális infarktus (AMI), vagy egyéb akut koronária szindróma, malignus megbetegedések, a vizsgálatot megelőző 3 hónapban lezajlott fertőzés, hipertireosis, autoimmun betegség, illetve krónikus veseelégtelenség. További kizárási kritériumok voltak: Aspirinen kívüli egyéb trombocita gátló szerek szedése a vizsgálatba történő bevonás előtti 2 hetes periódusban, ismert vérzésem megbetegedés, anaemia (hemoglobin <100 g/L), trombocitopenia (trombocita szám <100 G/L). Összesen 144 beteget vontunk be a vizsgálatba, 1,5 éves időperiódus alatt. A Brown által leírt Jeffrey módszert alkalmaztuk a vizsgált minta elemszám meghatározásához (46). Koronaria betegek közül senki nem került kizárásra, az Aspirin hatást nem mutató néhány beteg esetében ismételt vizsgálatot végeztünk (lásd később). A vizsgált betegek adatait az 1. táblázat tartalmazza. Korábbi publikációnkban már ismertettük a kontroll csoport jellemzőit (21).

1. táblázat: Aspirin hatás vizsgálatába bevont koronária betegek adatai

Kor (évek)	64 ±10 (42-85)
Férfiak aránya	67%
BMI (kg/m ²)	30 (26-33; 17-51)
Jelenleg dohányzik	10%
Valaha dohányzott	61%
Diabetes mellitus	24%
Triglycerid (mmol/L)	1,54 (1,1-2,1; 0,6-6,5)
Össz koleszterin (mmol/L)	4,6 (3,8-5,4; 2,2-8,8)
HDL-C (mmol/L)	1,2 (1,1-1,5; 0,7-2,5)
LDL-C (mmol/L)	2,5 (2,0-3,3; 1,0-6,1)
Trombocita szám (G/L)	237 ± 58 (100-432)
Fibrinogén (g/L)	3,7 (3,3-4,2; 2,0-7,1)
CRP (mg/L)	2,1 (0,9-4,3; 0,5-20,5)
Szérum kreatinin (µmol/L)	79 (68-90; 49-179)
GFR (mL/min /1,73 m ²)	86 (70-91; 23-91)

A normál eloszlást mutató paraméterek esetében az átlag ± SD-t adtuk meg és zárójelben a szélső értékeket tüntettük fel. Nem normál eloszlás esetében a medián értékeket adtuk meg, zárójelben pedig az interquartilis tartományt és a szélső értékeket tüntettük fel. BMI = testtömeg index; HDL-C = HDL koleszterin; LDL-C = LDL koleszterin; CRP = C reaktív protein ; GFR = glomeruláris filtrációs ráta.

A kontroll csoportba egészséges, 18 éves életkort betöltött egészséges önkénteseket választottunk be, akik között rokoni kapcsolat nem állt fenn. Egészségi állapotukat fizikális

vizsgálattal és kérdőíves felméréssel ellenőriztük. Az alábbi kizárási kritériumokat alkalmaztuk: krónikus betegségek, ismert vérlemezke defektusok és a megelőző két hétben bármilyen gyógyszeres terápia alkalmazása (az orális antikonceptívok kivételével). A 121 toborzott önkéntesből a kizárások után 108 egészséges önkéntesből álló csoporton értékeltük az eredményeket.

3.1. b. Az Aspirin és a clopidogrel monoterápián lévő betegek kiválasztása

A betegbeválasztás során célunk volt olyan effektív clopidogrel terápián lévő betegek kiválasztása, akiknél a clopidogrel hatásos. Eredetileg 101 beteg került beválogatásra, akik nem kardiogén iszkémiás cerebrovaszkuláris betegségen estek át, és legalább 1 hónapja napi 75 mg clopidogrel terápiában részesültek (clopidogrel csoport). 48 beteget kizártunk a csoportból, mert esetükben a vizsgált P2Y₁₂ receptor specifikus módszerrel nem lehetett clopidogrel hatást igazolni. A P2Y₁₂ receptor specifikus tesztekkel clopidogrel hatást mutató betegek mintáit az Aspirin hatás követésére használt módszerekkel vizsgáltuk. A vizsgálat másik ágán 55 koszorúérbeteget választottunk be, akik legalább egy hónapja napi 100 mg Aspirin monoterápián voltak (Aspirin csoport). 52 beteg esetében a COX-1 specifikus tesztekkel Aspirin hatásosságot mutattunk ki (AA által indukált aggregáció, ATP szekréció, VN Aspirin assay és TXB₂ képződés teljes blokkolása). Ezen betegek mintáit a clopidogrel hatást követő hagyományos módszerekkel vizsgáltuk. 3 beteg került kizárásra non-compliance miatt. Összehasonlításképp 140 egészséges önkéntest válogatunk be a vizsgálatba, akik semmilyen trombocita funkciót befolyásoló szert nem szedtek (kontroll csoport), az ő mintáikat valamennyi a betegcsoportok esetében alkalmazott módszerrel vizsgáltuk. A 3 csoport adatait a 2. táblázat tartalmazza.

A vizsgálatba bevont valamennyi egyén esetében a kizárási kritériumok a következők voltak: nonszteroid gyulladáscsökkentő kezelés, krónikus májbetegség, anaemia (hemoglobin <80 g/L), trombocitopenia (trombocita szám <150 G/L), trombocitózis (trombocita szám >500 G/L), trombocita funkció zavar, vérzéses diatézis, akut fertőzés/antibiotikum kezelés, a beválasztást megelőző 1 hónapos időtartamban nagyobb sebészeti beavatkozás, illetve iszkémiás esemény.

2. táblázat: Az Aspirin és clopidogrel monoterápiában részesülő betegcsoportok és a kontroll csoport adatai

	Clopidogrel csoport	Aspirin csoport	Kontroll csoport	p-érték (clopidogrel vs. kontroll)	p-érték (Aspirin vs. kontroll)
betegszám	53	52	140	-	-
férfi nem	26 (49,0%)	39 (75,0%)	68 (48,5%)	0,95	0,06
Kor (évek)	61,0±13,3	62,3±10,2	43,7±18	<0,001	<0,001
BMI (kg/m ²)	26,15±5,0	30,07±5,4	24,03±3,8	0,015	<0,001
Diabetes mellitus	4 (7,5%)	17 (32,7%)	-	-	-
Hypertonia	44 (83,0%)	47 (90,3%)	10 (7,1%)	<0,001	<0,001
Dyslipidemia	38 (71,7%)	20 (38,4%)	2 (1,4%)	<0,001	<0,001
Dohányzik	12 (22,6%)	10 (19,2%)	34 (24,2%)	0,85	0,56
Korábbi AMI	12 (22,6%)	46 (88,4%)	-	-	-
stroke/TIA	53 (100%)	-	-	-	-
PPI-t szedők	5 (9,4%)	4 (7,7%)	-	-	-
Statint szedők	22 (41,5%)	38 (73,1%)	-	-	-

A normál eloszlást mutató paraméterek esetében (Kor és BMI) az átlag ± SD-t adtuk meg és zárójelben a szélső értékeket tüntettük fel, a statisztikai analízishez a Student's tesztet használtuk. A kategórikus változókat gyakorisági számokkal és a teljes kategória százalékával jellemeztük, a csoportok összehasonlításánál, ahol ez

indokolt volt, a χ^2 vagy a Fisher exakt tesztet használtuk. BMI=test tömeg index; AMI=akut miokardiális infarktus; TIA: tranzitórius iszkémiás attack; PPI=proton pumpa gátló.

A kutatás a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történt. A vizsgálat teljes mértékben megfelel a Helsinki Deklaráció Etikai elveinek, minden önkéntes résztvevő írásos és szóbeli tájékoztatást követően írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez.

3.2. Mintagyűjtési protokoll:

A vérvétel éhgyomorra történt a könyökhajlati vénából 0,109 M-os trinátrium-citrát tartalmú csőbe (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Az alvadásgátolt vérmintát a VN Aspirin Assay-hez (Accumetrics, San Diego, CA) és a VASP áramlásos citometriás analíziséhez (Biocytex, Marseille, France) használtuk fel. PRP-t 120 g-n, 37°C-on, 15 perc centrifugálással nyertünk. Trombocita szegény plazmát (platelet depleted plasma; PDP) két egymást követő centrifugálás segítségével állítottunk elő (mindkettő 1500 g, 25°C, 20 perc).

3.3. Aspirin hatás vizsgálatára használt módszerek:

Korábbi vizsgálataink során új, direkt és indirekt technikákat dolgoztunk ki a COX-1 Aspirin által történt acetilációjának detektálására (21). A direkt módszer a humán COX-1 525-533 reziduumok aminosav szekvenciájának megfelelő nem acetilált (H-Gly-Ala-Pro-Phe-Ser-Leu-Lys-Gly-Leu-OH) és acetilált (H-Gly-Ala-Pro-Phe-Ser(Ac)-Leu-Lys-Gly-Leu-OH) nonapeptid ellenes antitestek használatán alapul. A tisztított antitestek segítségével Western blotting technikával a trombocita lizátumban könnyen elkülöníthető az acetilált és nem acetilált COX-1.

Az indirekt technika (21) a 0.25 mg/ml AA indukálta TXB₂ képződést méri PRP minták PDP-vel történő hígítását követően, mellyel a trombocita számot $30 \times 10^9/L$ -re állítottuk be. 37°C-on történő 5 perces inkubációt követően a reakciót 250 µL aktivált hígított PRP-hez adott 12,5 µL 2 M HCl-lel állítottuk le. A mintát 15 percig 4°C-on hűtöttük, majd 12000 g-n centrifugáltuk (4°C, 10 perc). A keletkezett TXB₂-t az AA-tól és egyéb interferáló anyagoktól szekvenciális szilárd fázisú extrakciós módszerrel választottuk el (21). A TXB₂ koncentrációt kompetitív immunoassay-vel (Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA) határoztuk meg. A mintákban található TXB₂-koncentrációk meghatározására a mért optikai denzitást használtuk. A kötődést jelző sárga szín intenzitása fordítottan arányos a mintákban, ill. a standardokban található TXB₂-koncentrációkkal. A trombociták által képzett TXB₂-t pg TXB₂/10⁶ trombocita egységben fejeztük ki.

Mivel a mindennapi gyakorlatban az Aspirin hatás mérésére használt, rutin laboratóriumi módszerek közül az AA indukálta trombocita aggregáció és ATP szekréció, valamint a VN Aspirin Assay bizonyult megbízhatónak (22), ezért ezeket a módszereket is alkalmaztuk koronária betegek esetében a szekunder prevencióként szedett Aspirin hatásának követésére. A VN Aspirin Assay-t a gyártó előírásai szerint alkalmaztuk. Ez az úgy mellett is használható (point of care) trombocita funkciós teszt citráttal alvadésgátolt vérmintát használ. A teszt alkalmazása során a vérben lévő trombociták AA agonista hatására aktiválódnak. A képződött TXA₂ hatására elinduló biokémiai jelátvivő útvonalak végül a trombocita membránban lévő glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) komplexet fibrinogént kötő receptorrá alakítják. Az aktivált trombociták az egyszer használatos patronok keverőkamrájában található fibrinogénnel fedett gyöngyökhöz kötődnek és agglutinálják azokat. A létrejött agglutináció fokozott fényáteresztést (transzmissziót) eredményez. Amennyiben az Aspirin gátolja a TXA₂ képződést nem alakul ki trombocita aktiváció és a fény transzmisszió sem növekszik. Az

eredményeket Aspirin reaktivitási egység-ben (ARU) fejezzük ki, a gyártói előírás szerint az 550 ARU cut-off érték alatti értékek mutatnak megfelelő Aspirin hatást.

A trombocita aggregációt és szekréciónak trombotocita dús plazmában 500 µg/ml AA (Helena, Gateshead, UK) hozzáadásával indukáltuk, a reakció monitorozása 8 percen keresztül Chrono-Log 700 lumiaggregometer-rel (Chrono-Log, Havertown, PA) történt. A vizsgálatot megelőzően a trombocita számot $260 \times 10^9/L$ -re állítottuk be. A fény transzmisszió változást a maximális transzmisszió százalékában fejeztük ki. Az ATP szekréció meghatározása biolumineszcens módszerrel luciferin-luciferáz reagens (Biothema AB, Handen, Sweden) segítségével történt. A maximális ATP szekréciónak $\mu\text{mol ATP}/10^{11}$ trombocita egységben fejeztük ki.

3.4. COX-1 és COX-2 mRNS mérése

COX-1 és COX-2 mRNS expressziót 56 random módon szelektált koronária beteg trombocitájából határoztunk meg. Az RNS-t leukocita mentesített trombocitákból Zsóri és munkatársai által leírt módszer szerint izoláltuk (47). Az RNS intakt voltát a GAPDH 3':5' jel arány meghatározásával bizonyítottuk (48). A fehérvérsejtekből eredő RNS kontaminációt CD15 és HLA-DQ β mRNS meghatározással zártuk ki (49). A reverz transzkripciónak First Strand cDNA Synthesis Kittel (Roche, Mannheim, Germany)) végeztük. A reakciónak elegyet 42 °C-on 60 percig, majd 94 °C-on 5 percig inkubáltuk. A templát és reverz transzkriptáz nélküli kontrollok negatív eredményt adtak. A kontamináló DNS jelenlétét olvadási görbe analízissel is kizártuk. Az RT-qPCR reakciónak Roche Light Cycler 480 készüléken SYBR Green I Master felhasználásával végeztük. Minden esetben párhuzamos reakciónak indítottunk. A PCR-ek 20 µL végtérfogatban történtek, mely 10 µL 2X-es koncentrációjú Master Mix-et 5 µL a reverz transzkripciónak származó cDNS templátot és 300 nM COX-1 primert, vagy 400 nM COX-2 primert tartalmazott.

A COX-1 primerek szekvenciája a következő volt: tccatgttgggtggactatgg (forward), ill. gtgggtgtccatgttctctg (reverz). A COX-2 primerek cttcacgcatcagttttcaag (forward), tcaccgtaaatatgattaagtccac (reverz) voltak. ACTB, GNAS és HDGF bizonyultak a legstabilabb referencia géneknek a trombocita mRNS expresszió normalizálására koronária betegek esetében (47); mindhármát amplifikáltuk és használtuk a számításoknál. Az amplifikációs program a következő volt: 95 °C-on történő melegítés, után 40 ciklus következett, egy ciklusban 10 s 95 °C-on, 30 s 60 °C-on és 1 s 72 °C-on követték egymást. Az olvadáspont görbe analízise 66 és 95 °C között történt, 0,11 °C-os emelkedésekkel °C-onként 5 akvizícióval. Meghatároztuk a C_T értékeket, melyek annak a ciklusszámnak felelnek meg, amelynél a fluoreszcens intenzitás meghaladta a küszöb értéket. Ezeket használtuk a relatív gén mennyiség meghatározására Livak és Schmittgen módszere segítségével (50). A $\Delta C_{T,COX1}$ és $\Delta C_{T,COX2}$ értékeket mindhárom referencia génhez viszonyítva meghatároztuk és az átlagos $\Delta\Delta C_{T,COX1,COX2}$ értékeket használtuk a COX-1 mRNS:COX-2 mRNS arány kiszámításához.

3.5. A clopidogrel hatást vizsgáló módszerek

Az Aspirinnel kezelt csoport mintáin a clopidogrel hatást tesztelő következő módszereket vizsgáltuk: VASP foszforiláció áramlási citometriás mérése, ADP indukált trombocita aggregáció és az újonnan kifejlesztett P2Y12 receptor specifikus aggregációs technika, ami során az ADP indukált aggregációt PGE1-el kezelt trombocitákon mértük (ADP(PGE1) teszt) (42). A VASP foszforiláció tesztet a gyártó előírásai szerint végeztük el a minta gyűjtést követő 24 órán belül. A teszt azon alapul, hogy PGE1 fokozza a VASP foszforilációt, az ADP pedig felfüggeszti a PGE1 hatását és a VASP nem foszforilált állapotba kerül. A clopidogrel az ADP hatásának felfüggesztésével visszaállítja a PGE1 hatását, azaz ADP jelenlétében is fokozódik a VASP foszforiláció mértéke. Az ADP jelenlétében mért VASP

foszforiláció tehát a trombociták clopidogrel által kiváltott gátlásával arányos (45). A VASP foszforiláció mértékét, a foszforilált VASP-ra specifikus fluoreszcensen jelölt antitest segítségével fixált és permeabilizált sejteken áramlási citometriás módszerrel mérjük. Az eredményt trombocita reaktivitási index formájában fejeztük ki (Platelet reactivity Index, PRI). A PRI-t az alábbi egyenlet adja: $[MFIc(PGE1) - MFIc(PGE1+ADP) / MFIc(PGE1)] \times 100$. (MFIc(PGE1): a PGE1 jelenlétében mért, izotipusú antitestre korrigált átlagos fluoreszcens intenzitás, az MFIc(PGE1+ADP): a PGE1+ADP jelenlétében mért, izotipusú antitestre korrigált átlagos fluoreszcens intenzitás.)

PRP-ben ADP kiváltott trombocita aggregációt és szekréciót Chrono-Log 700 lumiaggregometerrel követtük. A trombocita számot $250 \times 10^9/L$ -re állítottuk be, valamennyi aggregációs vizsgálatot a mintavételt követő 4 órán belül végeztük el. Az aggregációt 5 és 20 μM ADP (Helena Laboratorium, Beaumont, TX) hozzáadását követően 6 percen keresztül monitoroztuk. Minden mintához luciferin-luciferáz reganest adtunk a trombocita delta granulumokból felszabaduló ATP méréséhez. A fényáteresztés változás maximumát (Δ transzmisszió%) és az ATP felszabadulást (μmol ATP/ 10^{11} trombocita) mértük minden mintában. Az ADP(PGE1) trombocita aggregációs tesztet a korábban leírtak szerint végeztük el (42). Ebben a módszerben a hagyományos ADP indukálta trombocita aggregációt módosítottuk annak érdekében, hogy a P2Y12 receptor specifikus aggregációt mérjük. A módszer lényege, hogy csökkentjük a nem kívánatos P2Y12 receptor interakciókat a trombocita dús plazmát (PRP) $0.31 \mu M$ PGE1-gyel (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) 3 percen át $37^\circ C$ -n inkubáltuk az ADP hozzáadása előtt. Az eredményeket a fényáteresztés változás mértékében fejeztük ki (Δ transzmisszió%). Az Aspirin hatás vizsgálatához e vizsgálat sorozatban használt módszereket, az AA indukálta trombocita aggregációt és szekréciót, az AA indukálta TXB2 képződést és a Verify Now Aspirin Assay-t az előzőekben ismertettük.

Valamennyi módszer esetében a referencia intervallumokat (99% centrális intervallum) a Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI; Wane, PA) C28-A3 irányelve alapján határoztuk meg a kontroll csoport mintáit használva (140 egészséges kontroll egyén). A referencia intervallum legalacsonyabb értékét alapul véve határoztuk meg, hogy kik kerültek kizárásra a clopidogrel csoportból. Azon clopidogrel monoterápián lévő betegek (48 fő), akik esetében a VASP foszforiláció és az ADP(PGE1) teszt eredménye a referencia intervallum alsó értéke alá esett (72% PRI és 9.1% Δ transzmisszó%) kizárásra kerültek a vizsgálatból. Az Aspirin csoport esetében a 3 “non-compliance” esetet leszámítva valamennyi beteg esetében jó Aspirin hatást detektáltunk.

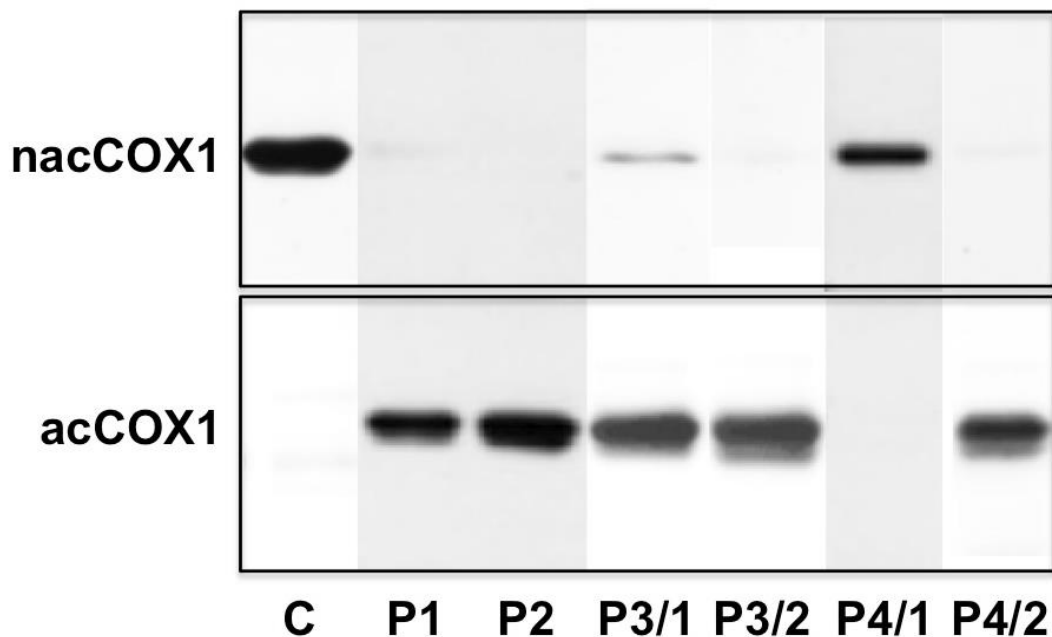
3.6. A statisztikai analízis:

Az adatokat átlaggal és szórással vagy mediánnal és kvartilissel és minimum-maximum értékkel fejeztük ki az eloszlástól függően. Az eloszlás vizsgálata Kolmogorov-Smirnov teszttel történt. Az összefüggéseket Spearman's féle rank-korrelációval néztük meg. A csoportok közötti különbséget ANOVA, illetve Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltuk, az eloszlástól függően. Két csoport összehasonlítása esetén Student-féle t tesztet, illetve Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak a különbséget vagy összefüggést. A statisztikai analízist GraphPad Prism programmal készítettük el (La Jolla, CA).

4. EREDMÉNYEK:

4.1. A COX-1 acetilációja az Aspirin által koszorúsérbetegeken

138 beteg trombocita lizátumában csak acetilált COX-1 (acCOX-1) volt detektálható a Western blottal. Ezeket a betegeket az 5. ábrán a P1, P2 minták reprezentálják. Korábban kimutattuk, hogy ez a módszer igen érzékeny, és akár 2.5 % nem-acetilált COX-1 (nacCOX-1) jelenlétének kimutatására is alkalmas, azaz a hosszú távú Aspirin kezelés eredményeképpen a trombociták COX-1 enzimjének minimum 97.5%-a acetilált (21). Külön hangsúlyozzuk, hogy ezen kezelt betegek trombocitáiban nem volt jelen kimutatható nacCOX-1, ami szemben áll azzal a korábbi véleménnyel, hogy az aktív dimer enzimnek csak az egyik monomerjét acetilálja az Aspirin (51). Hat beteg esetében különböző mennyiségű nacCOX-1 maradt a trombocita lizátumban. A P3/1 és P4/1 jelű sávok mutatják a két szélsőséges esetet; a P3/1 mintában csak kis mennyiségű COX-1 maradt acetiláció nélkül, míg a P4/1 jelű mintában nem volt detektálható acetiláció. Mivel non-compliance-t feltételeztünk felvettük a kapcsolatot az érintett betegekkel és felhívtuk figyelmüket a gyógyszer elhagyásának, illetve a rendszertelen gyógyszeresedésnek a veszélyeire. Két héttel később a vizsgálatot megismételtük, ami során teljes Aspirin hatékonyságot észleltünk a trombocita lizátumokban észlelt nacCOX-1 hiány és acetilált COX-1 jelenléte alapján (5. ábra P3/2 és P4/2 sáv). Az esetszám kalkulációja alapján, a 144 beteg esetében igazolt Aspirin rezisztencia hiányára alapozva kimondhatjuk, hogy az Aspirin a stabil koszorúér betegek több, mint 98%-ban hatásos (konfidencia intervallum 95%). Külön említést érdemel az a tény, hogy az Aspirin teljes mértékben hatásos volt mind a diabeteses, mind a dohányzó betegek esetében.

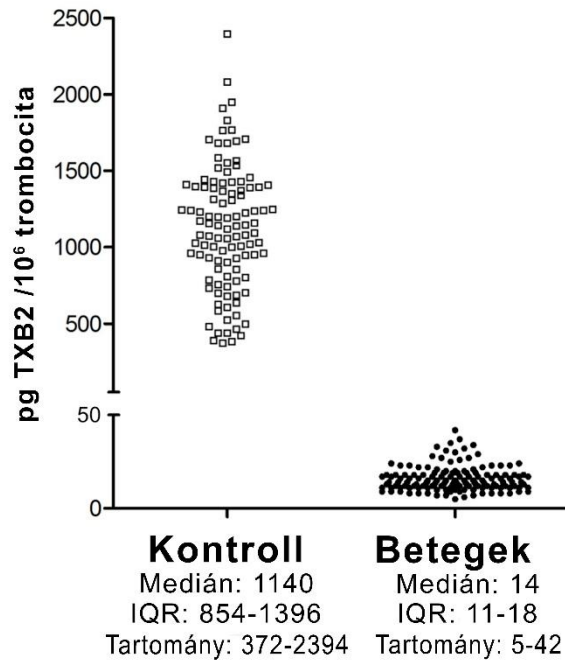


5.ábra: Az acetilált COX-1 (acCOX-1, alsó panel) és a nem acetilált COX-1 (nacCOX-1, felső panel) detektálása nem kezelt kontroll egyének (C, 108 fő) és Aspirinnel kezelt beteget (P1-P4, 144 fő) trombocita lizátumban. Acetilált és nem acetilált COX-1 ellenes specifikus antitesteket használtunk Western blott során. A P3 és P4 jelű betegek esetében non-compliance-t feltételeztünk, a tesztet két hetes compliance periódust követően ismételtük (P3/2, P4/2). A acetilált COX-1-nek megfelelő vonal alatt egy alacsony intenzitású sáv is látható. Nagyon valószínű, hogy ez a COX-1 37 aminosavval rövidebb 2-es izoformájának felel meg.

4.2. Az Aspirin hatása az arachidonsav indukálta TXB2 képződésre

A 6. ábra mutatja a trombociták AA indukálta TXB2 termelését a kontrollcsoportban és a hosszú távú Aspirin kezelésen lévő koszorúér betegek esetén. Az Aspirin drasztikusan csökkenti a TXB2 képződést, a TXB2 termelődés medián-ja mindössze 1.2 %-a volt a kontroll csoportban mért értékeknek. Az ábrán az Y tengelyen megtöretés látható, az alacsonyabb értéktartományokban a skála beosztása eltér a magasabb tartományban talált beosztástól. 6 beteg esetében itt is magasabb TXB2 értékeket mértünk, azonban az ismételt vizsgálatok

során az értékek a 138 beteg esetében mért tartományokba estek. Az ábrán ezek a betegek csak a második mért értékkel kerültek feltüntetésre.

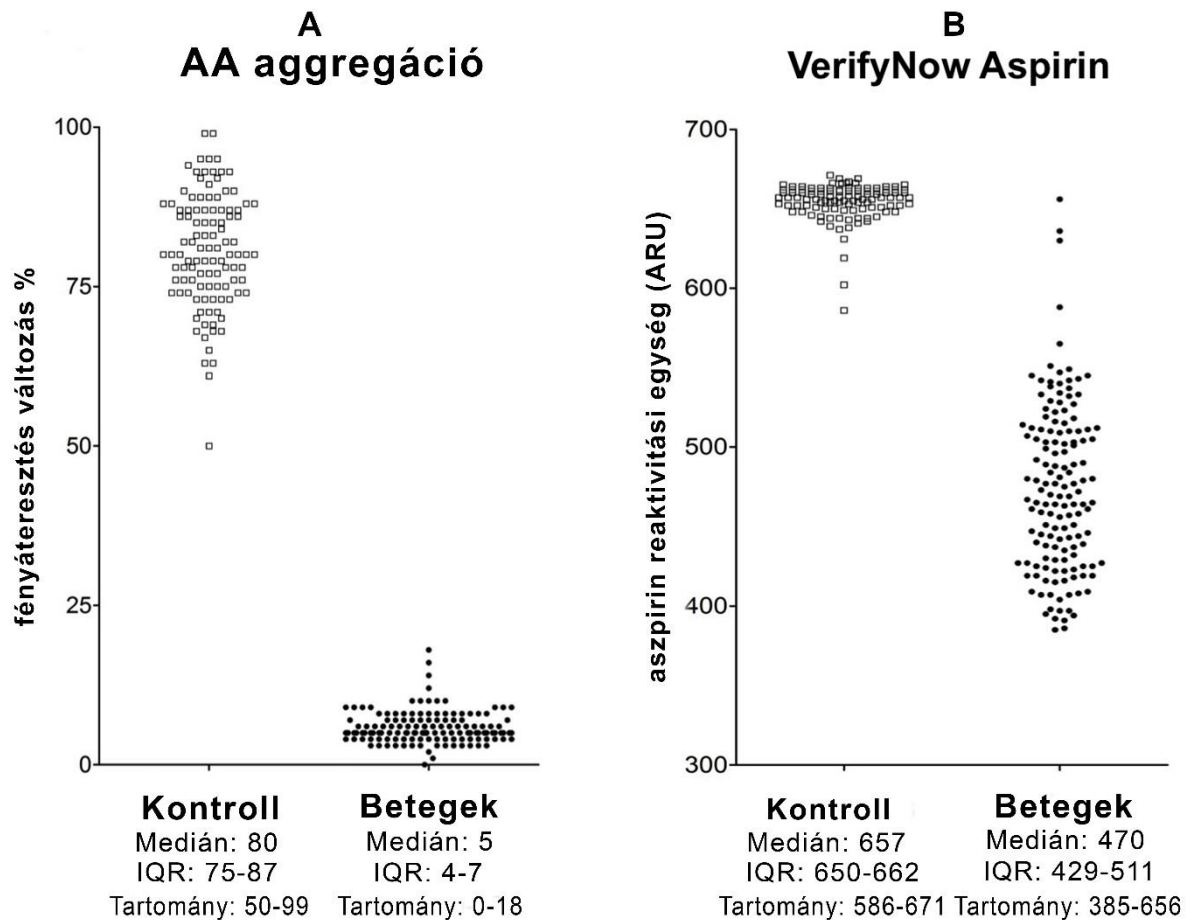


6.ábra: Arachidonsav indukálta TXB2 képződés a kontroll csoport trombocitáiban (üres négyzet, 108 fő) és a hosszú távú Aspirin terápián lévő koszorúér betegek trombocitáiban (kitöltött kör, 144 fő), IQR: interquartilis tartomány

4.3. Az Aspirin arachidonsav indukálta trombocita aggregációra kifejtett hatása

A jelentős mértékben csökkent TXB2 képzésnek megfelelően az AA indukálta trombocita aggregáció mértéke az Aspirin kezelt betegek esetében egységesen alacsony volt, és nem észleltünk átfedést a kontroll csoport és az Aspirint szedő betegek értékei között (7/A ábra). A kontroll csoport esetében az AA indukálta ATP felszabadulás középértéke PRP-ben 1.1 $\mu\text{mol ATP}/10^{11}$ trombocita (IQR: 0.9-1.4) volt, míg az Aspirint szedő betegek esetén a PRP-ben az ATP felszabadulás mértéke minden esetben a detektálási tartomány alatti volt. A VN Aspirin

Assay vizsgálatok során 4 Aspirint szedő beteg esetében (2.8%) az ARU érték átfedést mutatott a kontroll csoport ARU értékeivel (7/B ábra).



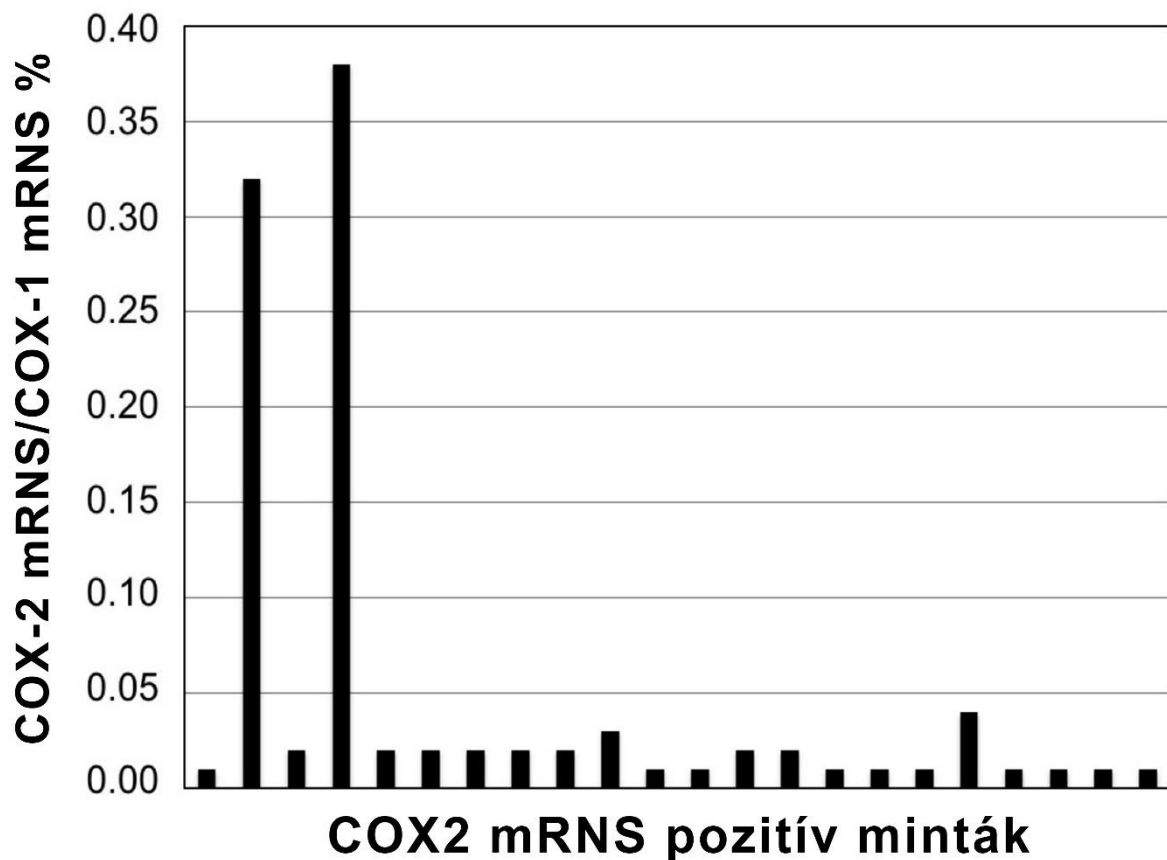
7.ábra: Arachidonsav indukálta trombocita aggregáció és a VerifyNow Assay eredményei a kontroll csoportban (üres négyzet, 108 fő) és koszorúérbetegség miatt hosszú távú Aspirin terápián lévő betegek esetén (kitöltött kör, 144 fő). IQR: Interquartilis tartomány

A gyártó által megadott cut-off érték 550 ARU, ugyanakkor eredményeinket figyelembe véve ennél valamivel magasabb, 585-s ARU érték tűnik elfogadhatónak. A VN Aspirin assay és egyéb, szintén AA –t agonistaként használó módszerek közötti különbség oka nem tisztázott. Lehetséges, hogy a VN Aspirin Assay esetében alkalmazott detektálási technika a magyarázata a betegcsoportban észlelt néhány eltérő értéknek.

A vizsgált betegcsoport 24%-a volt diabetese, a betegek 21%-ban a CRP érték 5 mg/L felett volt, és egészségi állapotuk ellenére 10%-uk még mindig aktívan dohányzott. Egyik beteg esetében sem észleltünk csökkent Aspirin hatást egyik vizsgáló módszerrel sem.

4.4. Az Aspirin trombocita COX-2 mRNS expresszióra gyakorolt hatása

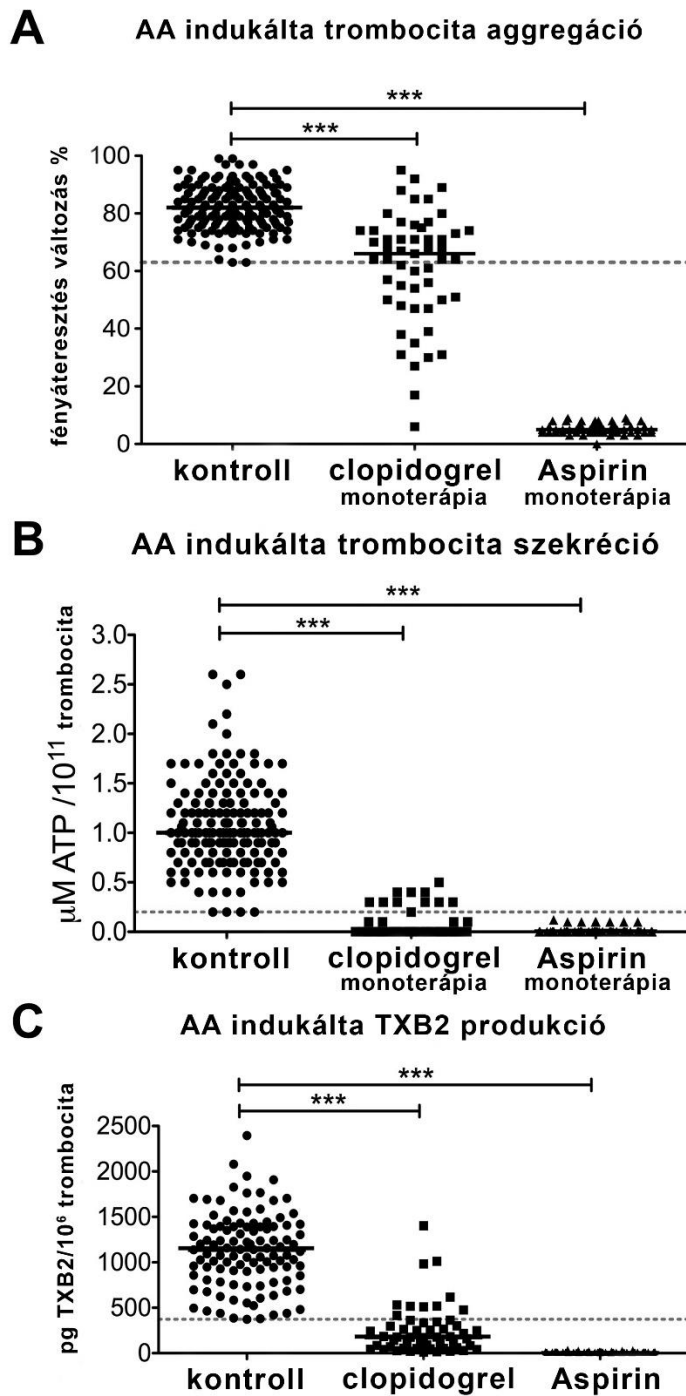
A COX-2 mRNS expresszióját 56 random módon kiválasztott beteg esetében vizsgáltuk. A vizsgált minták közül 22 esetben volt csak a COX-2 mRNS értéke a detektálási küszöb felett. Még ezekben az esetekben is a COX-2 mRNS relatív aránya a COX-1 mRNS mennyiségéhez képest kevesebb, mint 0.4% volt, 3 eset kivételével pedig kevesebb, mint 0.05%. A COX-2 mRNS-t expresszáló betegek között egy esetben sem tudtunk Aspirin rezisztenciát igazolni (8. ábra).



8.ábra: COX-2/COX-1 arány detektálható mennyiségű COX-2 mRNS-el rendelkező betegek(56 fő) trombocitáiban

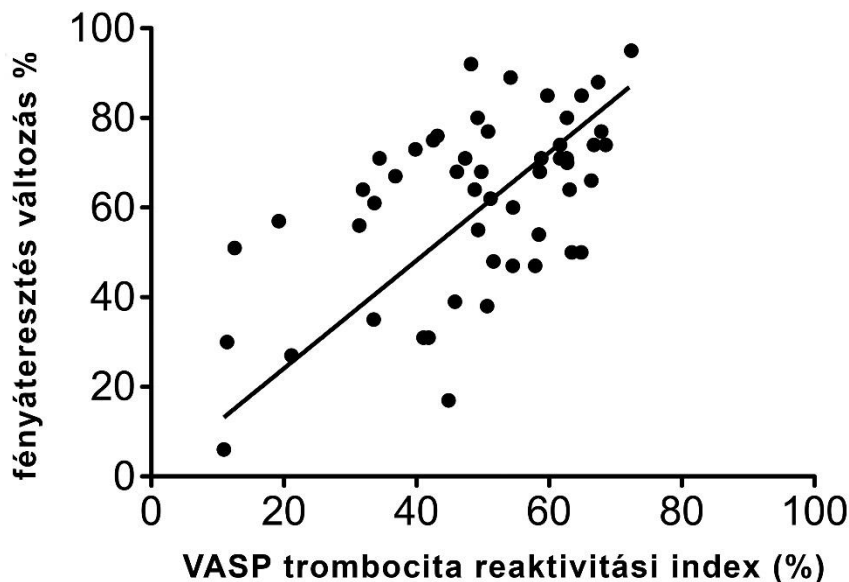
4.5. A clopidogrel terápia hatása az Aspirin hatást detektáló módszerekre

Az Aspirin hatást detektáló módszerek közül a clopidogrel monoterápia szignifikánsan gátolta (<0.001) az AA indukálta tromboocita aggregációt és szekrúciót (9/A, 9/B ábra). A kontroll csoporthoz viszonyítva a clopidogrel kezelés a betegek 41.5%-ban csökkentette az AA indukálta tromboocita aggregációt. Az AA indukálta tromboocita szekrúció még kifejezettebben csökkenést mutatott, a betegek 79.2%-ában a szekrúció mértéke a referencia tartomány alsó határa alá esett. Hasonló eredmények születtek a clopidogrellel kezelt betegek esetében a PRP-ből mért AA indukálta TXB2 termelődést vizsgálva (9/C ábra).

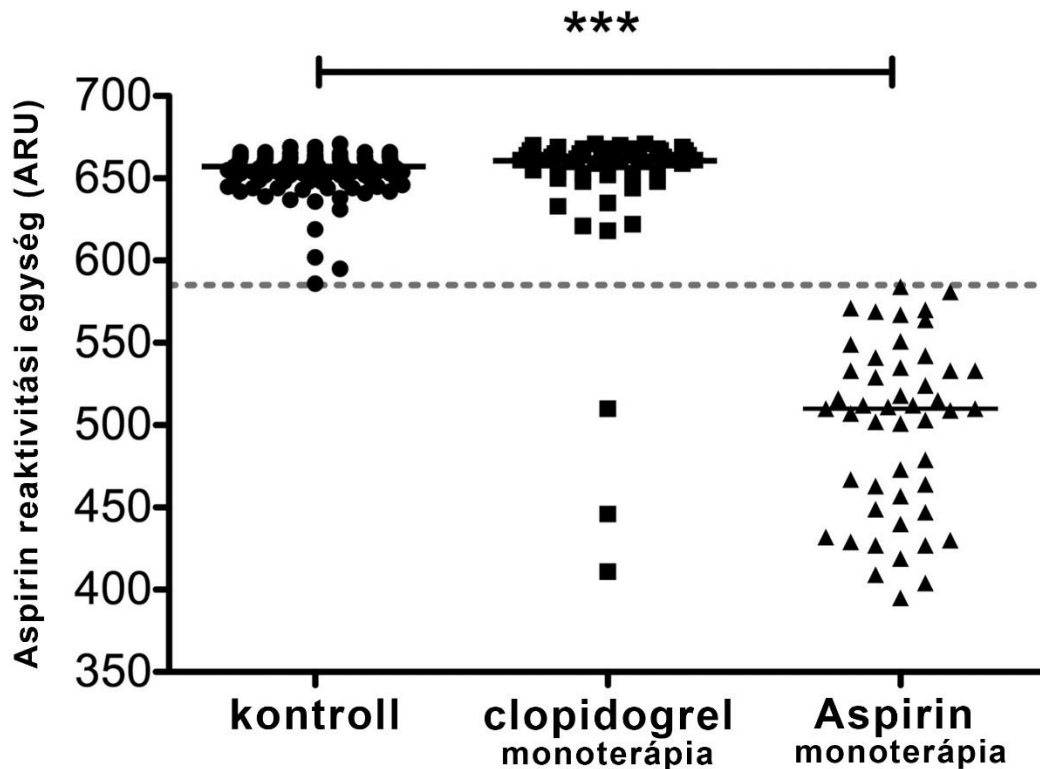


9. ábra. A clopidogrel monoterápia befolyásolja az AA indukálta trombocita funkciós tesztek. Az AA indukálta trombocita aggregációt (A), trombocita szekréciót (B), és az AA indukálta TXB2 képződést (C) kontroll (kör140 fő), clopidogrel monoterápián lévő (négyzet, 53 fő) és Aspirin monoterápián lévő (háromszög, 52 fő) betegek PRP-iben vizsgáltuk. A vízszintes vonalak a medián értékeket mutatják, míg a szaggatott hosszú vonal a referencia tartomány alsó határát jelzi.***; $p < 0.001$

Clopidogrel monoterápián lévő betegek 81.1%-a mutatott jelentősen csökkent AA indukálta TXB2 képződést a trombocitákban. A VASP foszforilációs assay eredménye (azaz a clopidogrel kiváltotta P2Y12 receptor blokkolás mértéke) és az AA indukálta trombocita aggregáció jó korrelációt mutatott a clopidogrelt szedő betegek esetében (Spearman $r=0.49$, 95% CI 0.23-0.67; $p<0.001$) (10.ábra). Ezek az eredmények is azt támasztják alá, hogy az AA indukálta trombocita aggregációs útvonalat befolyásolja a clopidogrel. Annak ellenére, hogy a clopidogrel egyértelműen gátolja az AA indukálta trombocita aggregációt és szekréciót, a VN teszt (ami szintén AA reakcióra épül) eredményeit gyakorlatilag nem befolyásolta a clopidogrel (11.ábra). Ezen az AA indukálta agglutinációra épülő teszt esetén a kontroll (átlag: 657 ARU, IQR: 650-661 ARU) és a clopidogrel terápián levő egyének eredményei (átlag: 661 ARU, IQR: 652-666 ARU) hasonlóak voltak. A clopidogrel monoterápián lévő betegek közül csak 3 esetben mértünk 550 ARU alatti értéket, ami az effektív Aspirin hatást jelző szélső érték.



10.ábra Az AA indukálta trombocita aggregáció és a VASP foszforilációs assay korrelációja clopidogrel monoterápia esetén. Az 500 $\mu\text{g/ml}$ AA kiváltotta trombocita aggregáció mértéke korrelál a VASP foszforilációs assay PRI értékével. Spearman $r=0.49$, 95% CI 0.23-0.67, $p<0.001$

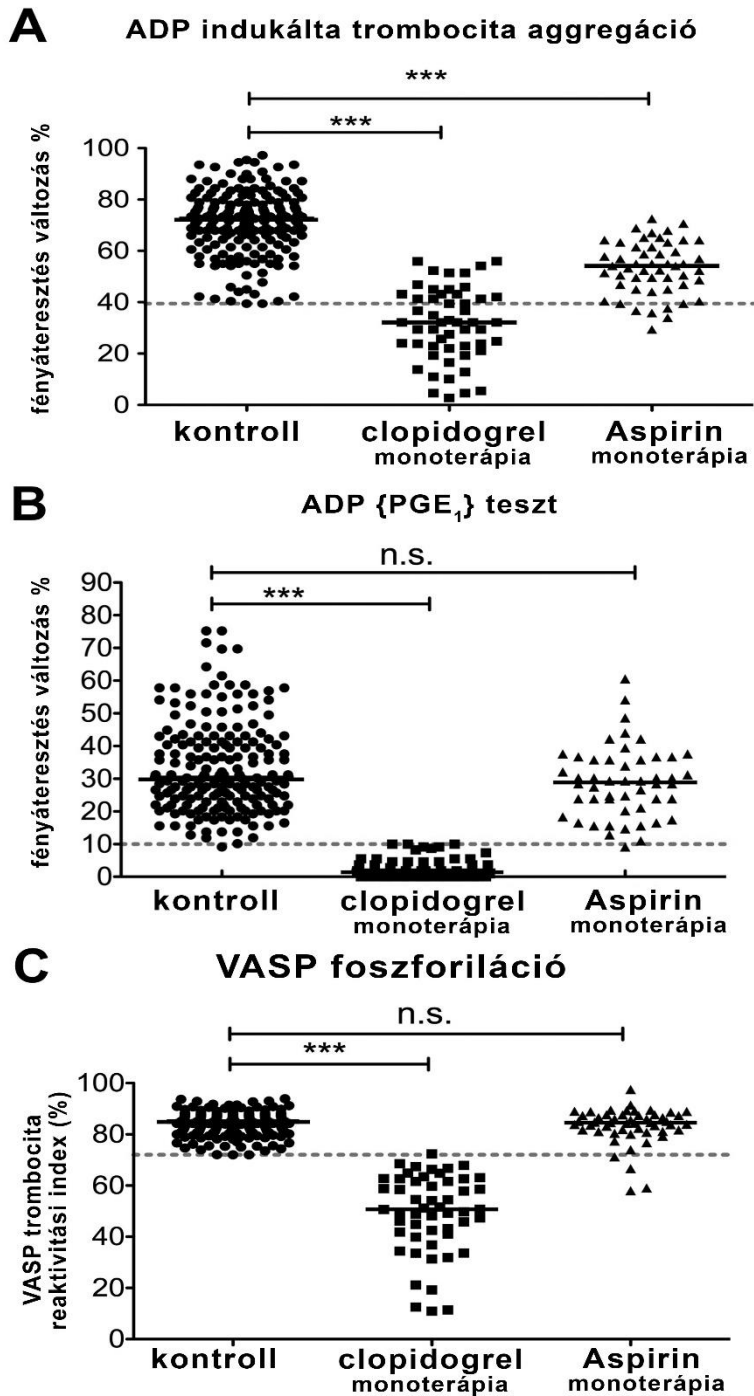


11. ábra: Clopidogrel monoterápiának nincs szignifikáns hatása a VN Aspirin teszt eredményére. A VN Aspirin Assay tesztet elvégeztük a kontroll egyének (kör, 140 fő), a clopidogrel monoterápián lévő (négyzet, 53 fő), és Aspirin monoterápián lévő betegek (háromszög, 52 fő) mintáin. Vízszintes vonalak jelzik a medián értéket; a szaggatott szürke vonal a referencia tartomány alsó határát.*** ; $p < 0.001$ ARU: Aspirin reaktivitási egység

4.6. Aspirin terápia hatása a clopidogrel hatást vizsgáló módszerekre

Ahogy várható volt, a clopidogrel hatást vizsgáló módszerek közül az Aspirin monoterápia szignifikánsan gátolta az ADP indukálta trombocita aggregációt és szekréción mindkét alkalmazott ADP koncentráció esetében (12/A ábra). Annak ellenére, hogy a clopidogrel monoterápia esetén a gátlás mértéke lényegesen nagyobb volt, mint Aspirin monoterápia esetén, az eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy az Aspirin terápia hatással lehet az ADP indukálta aggregációra és kettős trombocita gátló terápia esetén befolyásolja a clopidogrel hatásának megítélését. Az Aspirin monoterápia nem volt hatással a

PGE1-el előkezelt trombocitákon végzett ADP(PGE1) trombocita aggregációs teszt eredményeire (12/B ábra). Bár ez a módszer is ADP indukálta trombocita aggregáción alapul, a legfontosabb különbség a két módszer között az, hogy az ADP(PGE1) teszt a clopidogrel által gátolt P2Y12 receptor specifikus. A másik P2Y12 receptor specifikus módszert, a VASP foszforilációs teszt eredményeit szintén nem befolyásolta az Aspirin monoterápia (12/C ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a clopidogrel hatást vizsgáló módszerek közül a P2Y12 receptor specifikus tesztek nem befolyásolja az Aspirin hatása.



12. ábra: Az Aspirin monoterápia nem befolyásolja a P2Y₁₂ specifikus trombotocita funkciós tesztek eredményét. Az 5 μ M ADP kiváltotta trombotocita aggregáció vizsgálatát (A), a P2Y₁₂ specifikus trombotocita aggregációs tesztet (ADP {PGE₁}) (B), és a VASP foszforilációs assay-t (C) elvégeztük a kontroll egyének (kör, 104 fő), a clopidogrel monoterápián lévő (négyzet, 53 fő) és Aspirin monoterápián lévő egyének (háromszög, 52 fő) mintáin. A vízszintes vonalak mutatják a medián értékeket, a szaggatott szürke vonal a referencia tartomány alsó határát jelzik. *** ; $p < 0.001$, n.s :nem szignifikáns.

5. MEGBESZÉLÉS:

Eddig két közlemény jelent meg, melyben a COX-1 acetiláció direkt mérése történt napi 100 mg Aspirint szedő egészséges önkénteseken. Saját korábbi vizsgálatunkban specifikus monoklonális antitesteket használva Western blot technikával mértünk a nacCOX-1 és az acCOX-1 mennyiségét (21). Egy másik vizsgálatban a trombocita fehérjék nuPAGE segítségével szeparálták, majd gélben történt enzimatikus emésztést követően a Ser529 reziduumot tartalmazó COX-1 peptidet tömeg spektrometriával határozták meg (52). Előbbi közleményben 108, utóbbiba 24 egyént vontak be a vizsgálatba, és egyik esetben sem sikerült valódi Aspirin rezisztenciát kimutatni. AA indukálta trombocita aggregációt és szerum TXB2 szintet mérve Grosser és munkatársai 400 egészséges önkéntes között szintén nem tudott Aspirin rezisztenciát kimutatni (53). Koronária betegeken az általunk eredetileg alap kutatási módszerként kifejlesztett direkt módszerrel még nem történt vizsgálat, azaz a valódi Aspirin rezisztencia előfordulását még nem vizsgálták. Ezért 144 koronária betegen elvégeztük a vizsgálatot. Ha kiküszöböltük a non-compliance-t, egyetlen esetben sem észleltünk csökkent trombocita COX-1 acetilációt. Ennek megfelelően az Aspirin valamennyi betegben teljes mértékben gátolta a TXB2 képződést, az AA indukálta trombocita aggregációt és ATP felszabadulást. Sem diabetes mellitus, sem a dohányzás, sem a magas CRP jelezte gyulladásos állapot nem befolyásolta az Aspirin hatékonyságát. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy koszorúérbetegek között, akár csak egészséges egyének esetében, az Aspirin rezisztencia, ha egyáltalán létezik, extrém ritka.

Számos tényezőről feltételezték, hogy patológiás körülmények között befolyásolja az Aspirin hatását. Fokozott trombocita turnover esetében feltételezhető, hogy nacCOX1-t tartalmazó újonnan képződött trombociták kerülnek a keringésbe elegendő TXA2-t képezve a trombociták aktiválásához (24,26,29,54). Ez különösen fontos lehet napi egyszer alkalmazott

intesztinoszolvens Aspirin terápia esetében. Ugyanakkor az Aspirin gátló hatás jelentős része már a preszisztémás keringésben érvényesül (11,31). Azonkívül az Aspirin által acCOX-1-t tartalmazó megakariocitákból képződő trombociták szintén acCOX-1-t tartalmaznak (55). Mindezekon túl az a tény, hogy 7 napos kezelési periódus alatt napi egyszeri 100 mg-s intesztinoszolvens Aspirin terápia mellett az acCOX-1 szintje gyakorlatilag állandó volt, egyértelműen bizonyítja, hogy ez alatt az időintervallum alatt acetilált COX-1-gyel rendelkező trombociták kerültek a keringésbe (52). Jelen eredményeink szerint, a hosszú távú Aspirin terápián levő betegekben a COX-1 több mint 97,5%-ban acetilált formában volt jelen. Ez szintén a trombocita COX-1 gátlás kumulatív jellegét bizonyítja. A hat napos Aspirin kezelést követően 24 órával, az egyszeri Aspirin dózist követően 24 órával mért szinthez képest emelkedett acetilált COX-1 szint ugyancsak a trombocita COX-1 acetiláció kumulatív jellegét támasztja alá (21,52).

Az Aspirin gátló hatását, a COX-2-re, a COX-1 izoenzimére is kifejti (6,8), de a profilaktikus alacsony dózisú Aspirin terápiát jóval meghaladó, nagy dózisok szükségesek a szerin oldallánc acetilálásához (ebben az esetben a Ser516) (30). Ez az enzim jelen van a megakariocitákban, expresszálódik a fiatal trombocitákban is, és ismert up-regulációja gyulladáshoz, valamint diabetes mellitus esetén (31,56,57). Ismert az a feltételezés, hogy az Aspirin csökkent hatásáért a trombociták COX-2 expressziója felelős. Ugyanakkor Riondino és munkatársai (58) 100 krónikus Aspirin terápián lévő beteg esetében immunoblott analízissel azt mutatták ki, hogy a COX-2 a betegek csupán 46%-ban volt kimutatható. A COX-2 gátló CAY10404-t és Aspirint használva kimutatták, hogy a COX-2 dependens TXA2 produkció kevesebb, mint 2%, mely utóbbi megfigyeléssel eredményeink összhangban állnak. Trombocita COX-2 mRNS stabil koszorúér betegekben csak 39%-ban volt kimutatható mennyiségben és ezekben az esetekben is mennyisége összehasonlíthatatlanul

kevesebb volt, mint a COX-1 mRNS. Azon betegek trombocitái, ahol a COX-2 mRNS mérhető volt éppen olyan kevés TXB₂-t produkáltak, mint a többi Aspirinnel kezelt beteg. Ezek az eredmények nem támasztják alá a trombocita COX-2 szerepét az alacsony dózisú Aspirin terápia csökkent hatásában.

Mindezek fényében felmerül a kérdés, hogy az Aspirin terápiát kell-e egyáltalán monitorozni. Elméletileg a COX-1 gén mutációi eredményezhetnek olyan helyzetet, amiben az Aspirin nem tudja acetilálni az enzimet, de ilyen eset még nem került közlésre. A közölt eredmények azt sugallják, hogy koszorúérbetegek esetén az Aspirin terápiát nem szükséges monitorozni, hacsak non-compliance, vagy gyógyszer interakció nem feltételezhető. A laboratóriumi módszerekkel igazolt Aspirin hatástalanságának fő oka a non-compliance (59-61), ezért az Aspirin hatás ellenőrzése információval szolgálhat a betegek compliance-éről. Non-szteroid gyulladáscsökkentők interferálhatnak az Aspirin hatásával (62-64), így az adekvát laboratóriumi teszttel észlelt elégtelen Aspirin hatás ilyen gyógyszerinterakcióra irányíthatja a figyelmet. Fontos azonban hangsúlyoznunk, hogy csak COX1 specifikus módszerek alkalmazhatók erre a célra, a rutinszerűen használt módszerek közül az AA indukálta trombocita aggregáció és szekréció, a VN Aspirin Assay, valamint a szérum TXB₂ szint mérése (65). Ez a megállapítás Aspirin monoterápiára igaz, P2Y₁₂ receptor inhibitorral történő kombinációja (kettős trombocita gátló kezelés) - mint azt az értekezés második részében kimutattuk - befolyásolhatja a tesztek eredményeit.

A P2Y₁₂ receptor gátló gyógyszerek legelterjedtebb képviselője Magyarországon a tienopiridinek közé tartozó clopidogrel. A clopidogrel második generációs készítmény ún. prodrug, mely több lépcsős mechanizmuson keresztül a májban alakul aktív metabolittá. Az aktív vegyület szabad SH csoportja révén diszulfid híd alkotta kovalens kötéssel kötődik a P2Y₁₂ receptorhoz. A változó mértékű aktív metabolit képződés, a CYP izoenzimek genetikai

polimorfizmusa lehet a fő oka a clopidogrel esetenként észlelhető csökkent antitrombocita hatásának (35). A clopidogrel rezisztencia ténye eredményezte az új generációs P2Y12 gátló készítmények (ticagrelor, prasugrel) kifejlesztését (38,39). Az Aspirinhez hasonlóan a clopidogrel esetében is problémát jelent a rezisztenciát igazoló, specifikus módszer hiánya. Annak ellenére, hogy a legszélesebb körben elterjedt és standard-ként használt az ADP indukálta aggregáció vizsgálata (36,40,41), a módszer hátránya, hogy nem P2Y12 receptor specifikus (a P2Y1-re is hat), és az Aspirin hatása befolyásolja az eredményt (42).

Utóbbi ténynek a gyakorlati jelentősége azért is nagy, mert számos olyan klinikai körülmény van, ami kettős trombocita gátló kezelést tesz szükségessé. Ezekben az esetekben a megfelelő, specifikus laboratóriumi módszer kiválasztása az egyes antitrombocita szerek hatásának követésére különösen fontos, mivel átfedések vannak a gyógyszerek által gátolt intracelluláris mechanizmusokban, másrészt az antitrombocita monoterápia esetén alkalmazott módszerek nem feltétlenül használhatók kettős trombocita gátló kezelés során. Valójában számos, clopidogrel rezisztenciát vizsgáló kutatás kettős trombocita gátláson (Aspirin + clopidogrel) lévő betegeket vont be, és néhányuk az Aspirin által befolyásolt laboratóriumi technikát alkalmazott. Fontos hangsúlyozni azt, hogy bár az ADP indukálta trombocita aggregációt gyakran „gold standard”-nak tartjuk a clopidogrel hatás monitorozására, az Aspirin hatás befolyásolja ezt a tesztet, és kettős trombocita gátló kezelés esetén nehéz meghatározni, milyen mértékben gátolta a trombocitákat az Aspirin illetve a clopidogrel (vagy más P2Y12 receptor blokkoló). Vizsgáltunkban csak azokat a technikákat mutattuk be, amelyeket P2Y12 receptor specifikusak és nem befolyásolja az Aspirin hatás őket, ezzel kettős trombocita gátló kezelésben részesülő betegeknél a clopidogrel hatás monitorozására javasoltak.

Annak ellenére, hogy az AA indukálta trombocita funkciós tesztek általában Aspirin specifikusnak tartjuk, vizsgálatunk során bizonyítottuk, hogy a clopidogrel monoterápia gátolja az AA indukálta trombocita aggregációt. A clopidogrel által kifejtett AA indukálta trombocita szekréció és AA indukálta TXB2 képződés gátlása kifejezettebb volt, mint a trombocita aggregáció gátlás mértéke. Ezek az eredmények magyarázhatóak azokkal az in vitro kísérletekkel, amelyek igazolták, hogy a TXA2 képződést fokozzák a P2Y12 receptor mediálta útvonalak (66,67). A potencírozó hatás clopidogrel általi blokkolása eredményezheti a vizsgálatunk során észlelt csökkent TXB2 képződést és a károsodott trombocita szekréciót. Meglepő módon a clopidogrel monoterápia nem befolyásolta a VN Aspirin tesztet. A teszt a felszíni fibrinogén receptorok elérhetőségétől függ, és nem függ a trombocita szekréciótól és aggregációtól. Elképzelhető, hogy a clopidogrellel kezelt betegekben a csökkent TXA2 képződés a fibrinogén receptor szignalizációjához még elegendő, de a trombocita szekrécióhoz és aggregációhoz már nem. Nyilvánvaló, hogy ezt a feltételezést kísérletekkel kell igazolni.

Összefoglalva, vizsgálatunk eredménye az, hogy a clopidogrel nem befolyásolja szignifikánsan a VN Aspirin tesztet, ami azt jelenti, hogy kettős trombocita gátló kezelés esetén az Aspirin hatását mutatja. Clopidogrel hatásvizsgálatához kettős trombocita gátló kezelésben részesülő betegek esetén a P2Y12 receptor specifikus tesztek nem befolyásolja az Aspirin hatása, ezért ezen tesztek alkalmazása javasolt.

Vizsgálatunk korlátjának tartjuk a betegpopulációt, akik stabil koszorúérbetegből tevődtek össze, érdemes lenne az eredményeket akut koronária szindrómában szenvedő betegeken ellenőrizni.

ÖSSZEFOGLALÁS

A több mint 3500 éves múltra tekintő szalicilsav származékok az egyik legrégebben használt gyógyszer család, azonban trombocita aggregáció gátló hatásuk csak a XX. század második felében vált ismertté. Nagy betegszámmal végzett tanulmányok eredményei bizonyítják, hogy a kis dózisú Aspirin eredményesen csökkenti az aterotrombotikus megbetegedések szövődményeit. Ugyanakkor nem minden esetben védi ki az (ismételt) akut aterotrombotikus eseményeket, mely megfigyelés vezetett az Aspirin rezisztencia fogalmának megszületéséhez. Az antitrombocita kezelés másik sarokkövét a tienopiridin származékok jelentik, melyek irreverzibilisen gátolják a trombociták felszínén lévő P2Y₁₂ ADP receptorokat. A leggyakrabban alkalmazott képviselőjük a clopidogrel.

Célunk volt a krónikus Aspirin monoterápián lévő, igazolt koronária betegekben a korábban kidolgozott referencia módszereket alkalmazva az Aspirin kémiai és a laboratóriumi módszerekkel kimutatható hatékonyságának a vizsgálata. Célunk volt továbbá kettős trombocita gátlás esetén, annak a clopidogrel hatást vizsgáló módszernek a meghatározása, amit nem befolyásol Aspirin hatás, illetve annak a vizsgálata, hogy a clopidogrel mennyire befolyásolja az Aspirin hatást vizsgáló módszereket.

Hosszú távú Aspirin kezelés esetén a COX-1 enzim acetilációja valamennyi betegen megtörtént és drasztikusan csökkent a tromboxán B₂ (TXB₂) szintézis, valamint az arachidonsav indukálta trombocita aggregáció egységesen alacsony volt. A betegek egy része alacsony koncentrációban expresszált COX-2 mRNS-t, de ezen betegek között sem tudtunk Aspirin rezisztenciát kimutatni. A clopidogrel monoterápia szignifikánsan gátolta az arachidonsav indukálta trombocita aggregációt és szekréciót, valamint jelentősen csökkent TXB₂ képződést észleltünk. A vazodilatátor stimulálta foszfoprotein (VASP) foszforilációs assay

és az arachidonsav indukálta trombocita aggregáció eredményei jó korrelációt mutatnak, míg a clopidogrel monoterápia nem befolyásolta a VerifyNow Aspirin teszt eredményeit. Az Aspirin monoterápia szignifikánsan gátolta az ADP indukálta trombocita aggregációt és szekréción, viszont nem volt hatással a prosztaglandin E1 (PGE1)-gyel előkezelt trombocitákon végzett ADP aggregációs teszt és a VASP foszforilációs assay eredményeire.

Eredményeink szerint az Aspirin rezisztencia, ha létezik egyáltalán, extrém ritka. Igazoltuk, hogy az Aspirin specifikusnak tartott arachidonsav indukálta tesztek eredményét a clopidogrel hatása befolyásolja, ugyanakkor nem befolyásolta a VerifyNow Assay eredményeit, tehát kettős antitrombocita kezelés esetén az Aspirin hatását mutatja. A clopidogrel hatás vizsgálatához kettős trombocita gátló terápia esetén a P2Y12 specifikus tesztek (pl. VASP foszforiláció, PGE1 jelenlétében végzett ADP aggregáció) alkalmazása javasolt, mert ezeket nem befolyásolja az Aspirin hatása.

SUMMARY

Salicylic acid derivatives have been known for more than 3 500 years, and belong to the oldest medicines, but their effectiveness in inhibiting platelet aggregation inhibition became evident 50 years ago. Clinical trials involving high number of patients prove that small dose Aspirin effectively decreases the acute complications of atherosclerotic diseases. At the same time it also became evident that Aspirin is not always protective against such events, which led to the concept of Aspirin resistance. The thienopyridine group represents the other cornerstone for antithrombotic treatment by irreversibly inhibiting the P2Y₁₂ ADP receptors on the surface of the platelets. Clopidogrel is the most frequently used drug for such a purpose.

Our aim was to investigate the chemical and laboratory effectiveness of Aspirin using the previously defined reference methods on cardiovascular patients being on long-term prophylactic Aspirin monotherapy. Another aim was to determine which methods, used for testing the effect of clopidogrel, are influenced by Aspirin and which methods used for the detection of Aspirin's effect are affected by clopidogrel in patients with double antiplatelet therapy.

Platelet COX-1 became fully acetylated by Aspirin, along with drastic decrease of TXB₂ synthesis. Consequently, arachidonic acid induced platelet aggregation was uniformly low. Part of the patients expressed COX-2 mRNS, but no Aspirin resistance could be proven in this patient group, either. Clopidogrel monotherapy significantly inhibited arachidonic acid induced platelet aggregation and secretion, along with significant decrease in TXB₂ production. The vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation assay and the arachidonic acid induced platelet aggregation showed good correlation, whereas clopidogrel

monotherapy had no effect on the result of the VerifyNow test. Aspirin monotherapy significantly inhibited the ADP induced platelet aggregation and secretion, but had no effect on the VASP phosphorylation assay results and on the ADP aggregation tests of prostaglandin E pretreated platelets.

Our results clearly suggest that Aspirin resistance if it exist at all, is extreme rare. It was observed that arachidonic acid induced platelet aggregation and secretion tests, that specifically demonstrate the effect of Aspirin monotherapy, were influenced by the effect of clopidogrel. Clopidogrel therapy did not influence the results of VerifyNow Assay, i.e. it shows the effect of Aspirin even in the case of dual antiplatelet therapy. P2Y12 specific tests (e.g. VASP phosphorylation or ADP aggregation in the presence of PGE1) are recommended for testing the effect of clopidogrel in patients on dual antiplatelet therapy, since the results of these tests are not influenced by Aspirin.

IRODALOMJEGYZÉK:

1. Desborough MJR, Keeling DM. The aspirin story - from willow to wonder drug. *Br J Haematol.* 2017;177(5):674-683.
2. Cai G, Zhou W, Lu Y, Chen P, Lu Z, Fu Y. Aspirin resistance and other aspirin-related concerns. *Neurol Sci.* 2016;37(2):181-189.
3. Tantry US, Mahla E, Gurbel PA. Aspirin resistance. *Prog Cardiovasc Dis.* 2009;52(2):141-152.
4. Kulmacz RJ, van der Donk WA, Tsai AL. Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2. *Prog Lipid Res.* 2003;42(5):377-404.
5. Patrono C, Garcia Rodriguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2005;353(22):2373-2383.
6. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004;56(3):387-437.
7. Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest.* 2006;116(1):4-15.
8. Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem.* 2007;50(7):1425-1441.
9. Healy AM, Pickard MD, Pradhan AD, Wang Y, Chen Z, Croce K, Sakuma M, Shi C, Zago AC, Garasic J, Damokosh AI, Dowie TL, Poisson L, Lillie J, Libby P, Ridker PM, Simon DI. Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. *Circulation.* 2006;113(19):2278-2284.

10. Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3 Suppl):234S-264S.
11. Pedersen AK, FitzGerald GA. Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N Engl J Med*. 1984;311(19):1206-1211.
12. Bode-Boger SM, Boger RH, Schubert M, Frolich JC. Effects of very low dose and enteric-coated acetylsalicylic acid on prostacyclin and thromboxane formation and on bleeding time in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1998;54(9-10):707-714.
13. Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI. Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(2 Suppl):e89S-e119S.
14. Patrono C, Rocca B. Aspirin, 110 years later. *J Thromb Haemost*. 2009;7(Suppl 1):258-261.
15. 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.
16. Antithrombotic Trialists 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):1849-1860.
17. Vandvik PO, Lincoff AM, Gore JM, Gutterman DD, Sonnenberg FA, Alonso-Coello P, Akl EA, Lansberg MG, Guyatt GH, Spencer FA. Primary and secondary prevention of cardiovascular disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed:

- American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(2 Suppl):e637S-e668S.
18. Akay OM, Canturk Z, Akin E, Bal C, Gulbas Z. Aspirin-resistance frequency: a prospective study in 280 healthy Turkish volunteers. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2009;15(1):98-102.
 19. Santilli F, Rocca B, De Cristofaro R, Lattanzio S, Pietrangelo L, Habib A, Pettinella C, Recchiuti A, Ferrante E, Ciabattoni G, Davi G, Patrono C. Platelet cyclooxygenase inhibition by low-dose aspirin is not reflected consistently by platelet function assays: implications for aspirin "resistance". *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(8):667-677.
 20. Frelinger AL, Li Y, Linden MD, Tarnow I, Barnard MR, Fox ML, Michelson AD. Aspirin 'resistance': role of pre-existent platelet reactivity and correlation between tests. *J Thromb Haemost*. 2008;6(12):2035-2044.
 21. Kovacs EG, Katona E, Bereczky Z, Homorodi N, Balogh L, Toth E, Peterfy H, Kiss RG, Edes I, Muszbek L. New direct and indirect methods for the detection of cyclooxygenase 1 acetylation by aspirin; the lack of aspirin resistance among healthy individuals. *Thromb Res*. 2013;131(4):320-324.
 22. Kovacs EG, Katona E, Bereczky Z, Homorodi N, Balogh L, Toth E, Peterfy H, Kiss RG, Edes I, Muszbek L. Evaluation of laboratory methods routinely used to detect the effect of aspirin against new reference methods. *Thromb Res*. 2014;133(5):811-816.
 23. Arazi HC, Doiny DG, Torcivia RS, Grancelli H, Waldman SV, Nojek C, Fornari MC, Badimon JJ. Impaired anti-platelet effect of aspirin, inflammation and platelet turnover in cardiac surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2010;10(6):863-867.
 24. Grove EL, Hvas AM, Kristensen SD. Immature platelets in patients with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost*. 2009;101(1):151-156.

25. Henry P, Vermillet A, Boval B, Guyetand C, Petroni T, Dillinger JG, Sideris G, Bal dit Sollier C, Drouet L. 24-hour time-dependent aspirin efficacy in patients with stable coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2011;105(2):336-344.
26. Rocca B, Santilli F, Pitocco D, Mucci L, Petrucci G, Vitacolonna E, Lattanzio S, Mattoscio D, Zaccardi F, Liani R, Vazzana N, Del Ponte A, Ferrante E, Martini F, Cardillo C, Morosetti R, Mirabella M, Ghirlanda G, Davi G, Patrono C. The recovery of platelet cyclooxygenase activity explains interindividual variability in responsiveness to low-dose aspirin in patients with and without diabetes. *J Thromb Haemost.* 2012;10(7):1220-1230.
27. Floyd CN, Ferro A. Mechanisms of aspirin resistance. *Pharmacol Ther.* 2014;141(1):69-78.
28. Pettersen AA, Arnesen H, Seljeflot I. A brief review on high on-aspirin residual platelet reactivity. *Vascul Pharmacol.* 2015;67-69:6-9.
29. Guthikonda S, Lev EI, Patel R, DeLao T, Bergeron AL, Dong JF, Kleiman NS. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost.* 2007;5(3):490-496.
30. Rocca B, Secchiero P, Ciabattoni G, Ranelletti FO, Catani L, Guidotti L, Melloni E, Maggiano N, Zauli G, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(11):7634-7639.
31. Capodanno D, Patel A, Dharmashankar K, Ferreiro JL, Ueno M, Kodali M, Tomasello SD, Capranzano P, Seecheran N, Darlington A, Tello-Montoliu A, Desai B, Bass TA, Angiolillo DJ. Pharmacodynamic effects of different aspirin dosing regimens in type 2 diabetes

- mellitus patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011;4(2):180-187.
32. Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:277-300.
 33. Angiolillo DJ, Ferreiro JL. Platelet adenosine diphosphate P2Y12 receptor antagonism: benefits and limitations of current treatment strategies and future directions. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63(1):60-76.
 34. Damman P, Woudstra P, Kuijt WJ, de Winter RJ, James SK. P2Y12 platelet inhibition in clinical practice. *J Thromb Thrombolysis.* 2012;33(2):143-153.
 35. Mallouk N, Labruyere C, Reny JL, Chapelle C, Piot M, Fontana P, Gris JC, Delavenne X, Mismetti P, Laporte S. Prevalence of poor biological response to clopidogrel: a systematic review. *Thromb Haemost.* 2012;107(3):494-506.
 36. Ait-Mokhtar O, Bonello L, Benamara S, Paganelli F. High on treatment platelet reactivity. *Heart Lung Circ.* 2012;21(1):12-21.
 37. Gremmel T, Panzer S. Clinical, genetic and confounding factors determine the dynamics of the in vitro response/non response to clopidogrel. *Thromb Haemost.* 2011;106(2):211-218.
 38. Sibbing D, Orban M, Massberg S. Potent P2Y12 receptor inhibitors in patients with acute coronary syndrome. Agents, indications, issues to consider in clinical practice. *Hamostaseologie.* 2013;33(1):9-15.
 39. Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel response variability and the advent of personalised antiplatelet therapy. A bench to bedside journey. *Thromb Haemost.* 2011;106(2):265-271.

40. Smock KJ, Saunders PJ, Rodgers GM, Johari V. Laboratory evaluation of clopidogrel responsiveness by platelet function and genetic methods. *Am J Hematol.* 2011;86(12):1032-1034.
41. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, Bhatt DL, Cattaneo M, Collet JP, Cuisset T, Gachet C, Montalescot G, Jennings LK, Kereiakes D, Sibbing D, Trenk D, Van Werkum JW, Paganelli F, Price MJ, Waksman R, Gurbel PA, Working Group on High On-Treatment Platelet R. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(12):919-933.
42. Bagoly Z, Sarkady F, Magyar T, Kappelmayer J, Pongracz E, Csiba L, Muszbek L. Comparison of a new P2Y₁₂ receptor specific platelet aggregation test with other laboratory methods in stroke patients on clopidogrel monotherapy. *PLoS One.* 2013;8(7):e69417.
43. Cattaneo M. The clinical relevance of response variability to antiplatelet therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:70-75.
44. Wentworth JK, Pula G, Poole AW. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem J.* 2006;393(Pt 2):555-564.
45. 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.
46. Brown LD, Cai TT, DasGupta A. Interval Estimation for a Binomial Proportion. *Statistical Science.* 2001;16(2):101-117.

47. Zsori KS, Muszbek L, Csiki Z, Shemirani AH. Validation of reference genes for the determination of platelet transcript level in healthy individuals and in patients with the history of myocardial infarction. *Int J Mol Sci.* 2013;14(2):3456-3466.
48. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1559-1582.
49. Birschmann I, Mietner S, Dittrich M, Pfrang J, Dandekar T, Walter U. Use of functional highly purified human platelets for the identification of new proteins of the IPP signaling pathway. *Thromb Res.* 2008;122(1):59-68.
50. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
51. Zou H, Yuan C, Dong L, Sidhu RS, Hong YH, Kuklev DV, Smith WL. Human cyclooxygenase-1 activity and its responses to COX inhibitors are allosterically regulated by nonsubstrate fatty acids. *J Lipid Res.* 2012;53(7):1336-1347.
52. Patrignani P, Tacconelli S, Piazzuelo E, Di Francesco L, Dovizio M, Sostres C, Marcantoni E, Guillem-Llobat P, Del Boccio P, Zucchelli M, Patrono C, Lanas A. Reappraisal of the clinical pharmacology of low-dose aspirin by comparing novel direct and traditional indirect biomarkers of drug action. *J Thromb Haemost.* 2014;12(8):1320-1330.
53. Grosser T, Fries S, Lawson JA, Kapoor SC, Grant GR, FitzGerald GA. Drug resistance and pseudoresistance: an unintended consequence of enteric coating aspirin. *Circulation.* 2013;127(3):377-385.
54. Pascale S, Petrucci G, Dragani A, Habib A, Zaccardi F, Pagliaccia F, Pocaterra D, Ragazzoni E, Rolandi G, Rocca B, Patrono C. Aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia is explained by accelerated renewal of the drug target. *Blood.* 2012;119(15):3595-3603.

55. van Pampus EC, Huijgens PC, Zevenbergen A, Twaalfhoven H, van Kamp GJ, Langenhuijsen MM. Influence of aspirin on human megakaryocyte prostaglandin synthesis. *Eur J Haematol*. 1993;50(5):264-268.
56. Halushka MK, Halushka PV. Why are some individuals resistant to the cardioprotective effects of aspirin? Could it be thromboxane A2? *Circulation*. 2002;105(14):1620-1622.
57. 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.
58. Riondino S, Trifiro E, Principessa L, Mascioletti S, Di Renzo L, Gaudio C, Biasucci LM, Crea F, Pulcinelli FM. Lack of biological relevance of platelet cyclooxygenase-2 dependent thromboxane A2 production. *Thromb Res*. 2008;122(3):359-365.
59. Schwartz KA, Schwartz DE, Barber K, Reeves M, De Franco AC. Non-compliance is the predominant cause of aspirin resistance in chronic coronary arterial disease patients. *J Transl Med*. 2008;6:46.
60. Schwartz KA, Schwartz DE, Ghosheh K, Reeves MJ, Barber K, DeFranco A. Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2005;95(8):973-975.
61. Meen O, Brosstad F, Khiabani H, Gjertsen E, Lauritsen ME, Pedersen TM, Bjornsen S, Schjelderup NM, Ameln W, Ng EC, Wettergreen M, Siddique SP, Erikssen G. No case of COX-1-related aspirin resistance found in 289 patients with symptoms of stable CHD remitted for coronary angiography. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(3):185-191.
62. Huber K, Schror K. High on-treatment platelet reactivity--why should we be concerned? *Thromb Haemost*. 2013;109(5):789-791.
63. Fitzgerald R, Pirmohamed M. Aspirin resistance: effect of clinical, biochemical and genetic factors. *Pharmacol Ther*. 2011;130(2):213-225.

64. Ho PM, Spertus JA, Masoudi FA, Reid KJ, Peterson ED, Magid DJ, Krumholz HM, Rumsfeld JS. Impact of medication therapy discontinuation on mortality after myocardial infarction. *Arch Intern Med.* 2006;166(17):1842-1847.
65. Antithrombotic Trialists C, 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. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet.* 2009;373(9678):1849-1860.
66. Jin J, Quinton TM, Zhang J, Rittenhouse SE, Kunapuli SP. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A(2) generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin alpha(IIb)beta(3) and ADP receptors. *Blood.* 2002;99(1):193-198.
67. Shankar H, Garcia A, Prabhakar J, Kim S, Kunapuli SP. P2Y12 receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A2 generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation. *J Thromb Haemost.* 2006;4(3):638-647.

TÁRGYSZAVAK:

ADP

Aspirin

Aspirin rezisztencia

ciklooxygenáz-1

clopidogrel

P2Y12 receptor

trombocita

trombocita aggregáció

KEYWORDS

ADP

Aspirin

aspirin resistance

cyclooxygenase-1

clopidogrel

P2Y12 receptor

platelet

platelet aggregation

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

Hálával tartozom Prof. Muszbek László akadémikusnak, témavezetőmnek, aki a Klinikai Kutató Központ korábbi igazgatójaként a kutató munka útjára terelt, a személyi és tárgyi feltételek biztosítása mellett munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, szakmai tanácsokkal ellátva segítette, pozitív hozzáállásával mindvégig biztatott és kutatói gondolkodásra nevelt.

Köszönettel tartozom Dr. Bereczky Zsuzsannának, a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék igazgatójának, Dr. Bagoly Zsuzsának, Dr. Katona Évának és Haramura Gizellának, akik szakmai tanácsaikkal, ötleteikkel segítették munkámat, valamint Dr. Amir Shemiraminak a COX-1 és COX-2 mRNS meghatározás során végzett precíz munkájáért.

Köszönöm kolléganőm, Dr. Kovács Emese Gyöngyvér pótolhatatlan munkáját, kitartó segítségét és támogatását.

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani dr. Édes István és dr. Csanádi Zoltán Professzor Úrnak, a Kardiológia Intézet korábbi és jelenlegi igazgatóinak, hogy a színvonalas klinikai munka mellett lehetőséget biztosítottak kutató munka végzéséhez.

Hálával tartozom a Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék és a Kardiológiai Intézet valamennyi dolgozójának a vérvételek és a laboratóriumi diagnosztika során végzett áldozatkész munkájukért, és ezúton szeretném megköszönni valamennyi társszerzőm közreműködését.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm szüleimnek, testvéremnek és lányomnak, hogy támogatásukkal, biztatásukkal segítettek és átlendítettek a nehézségeken, valamint barátaimnak, akik végig bátorítottak és mellettem álltak.

FÜGGELÉK:



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/6/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

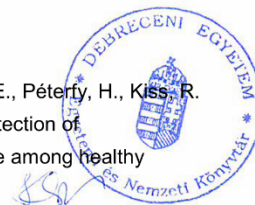
Jelölt: Homoródi Nóra
Neptun kód: B6XE6H
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bagoly, Z., **Homoródi, N.**, Kovács, E. G., Sarkady, F., Csiba, L., Édes, I., Muszbek, L.: How to test the effect of aspirin and clopidogrel in patients on dual antiplatelet therapy?
Platelets. 27 (1), 59-65, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2015.1031098>
IF: 2.465
2. **Homoródi, N.**, Kovács, E. G., Leé, S., Katona, É., Shemirani, A. H., Haramura, G., Balogh, L., Bereczky, Z., Szőke, G., Péterfy, H., Kiss, R. G., Édes, I., Muszbek, L.: The lack of aspirin resistance in patients with coronary artery disease.
J. Transl. Med. 14 (1), 74, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-016-0827-7>
IF: 3.786

További közlemények

3. Kovács, E. G., Katona, É., Bereczky, Z., **Homoródi, N.**, Balogh, L., Tóth, E., Péterfy, H., Kiss, R. G., Édes, I., Muszbek, L.: Evaluation of laboratory methods routinely used to detect the effect of aspirin against new reference methods.
Thromb. Res. 133 (5), 811-816, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2013.10.008>
IF: 2.447
4. Kovács, E. G., Katona, É., Bereczky, Z., **Homoródi, N.**, Balogh, L., Tóth, E., Péterfy, H., Kiss, R. G., Édes, I., Muszbek, L.: New direct and indirect methods for the detection of cyclooxygenase 1 acetylation by aspirin; the lack of aspirin resistance among healthy individuals.
Thromb. Res. 131 (4), 320-324, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2013.01.033>
IF: 2.427





5. Domokos, É., Kardos, L., Bednárszky, I., Bene, O., Bódi, A., Daragó, A., Fülöp, T., **Homoródi, N.**, Péter, A., Rácz, I., Hegedűs, I., Kertész, A. B.: Az interventrikuláris szeptum mérése echokardiográfiával: mérési különbségek és klinikai következményeik.
Cardiol. Hung. 41, 15-20, 2011.
6. Szűk, T., Gyöngyösi, M., **Homoródi, N.**, Kristóf, É., Király, C., Édes, I. F., Facskó, A., Pavo, N., Sodeck, G., Strehblow, C., Farhan, S., Maurer, G., Glogar, D., Domanovits, H., Huber, K., Édes, I.: Effect of timing of clopidogrel administration on 30-day clinical outcomes: 300-mg loading dose immediately after coronary stenting versus pretreatment 6 to 24 hours before stenting in a large unselected patient cohort.
Am. Heart. J. 153 (2), 289-295, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ahj.2006.10.030>
IF: 3.649
7. Kőszegi, Z., **Homoródi, N.**, Bódi, A., Vaszily, M., Vajda, G., Kollár, J., Édes, I.: Giant Pulmonary Aneurysm Associated With Pulmonary Valve Agenesis.
Circulation. 112 (15), e263-e264, 2005.
IF: 11.632

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 26,406

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,251

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.01.08.



NYILATKOZAT:

Biokémiai jellegű kísérletekben társszerzőim lényeges segítséget nyújtottak. A Western-blot mérésekben Dr. Katona Éva, Eilsa mérésekben Haramura Gizella, a COX mRNS meghatározásban Amir H. Shemirani nyújtottak érdemi segítséget. A kettős trombocita gátló terápia statisztikai elemzésénél Dr. Bagoly Zsuzsa nyújtott segítséget.