

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Aspirin hatás vizsgálata koronária betegekben

Dr. Homoródi Nóra

Témavezető: Prof. Muszbek László, akadémikus



DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Aspirin hatás vizsgálata koronária betegekben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Klinikai Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Homoródi Nóra általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem, Laki Kálmán doktori iskolája (Trombózis Hemosztázis és Vaszkuláris Biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Rudas László, MTA doktora

Dr. Oláh Zsolt, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2019.06.27. 11 óra.

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet, C épület
Könyvtár

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, MTA doktora

bírálok: Dr. Nagy Ágnes PhD

Dr. Lőrincz István PhD

tagok: Prof. Dr. Rudas László, MTA doktora

Dr. Oláh Zsolt, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2019.06.27. 13 óra

Debreceni Egyetem ÁOK, Augusztia Épület Nagyelőadó

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. 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. 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. Kezdetben „csodaszerként” számon tartva minden problémára alkalmazták, majd gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatása a XX. század folyamán vált ismertté. 1971-ben a később Nobel díjat kapott Sir John Vane fedezte fel az Aspirin trombo-cita gátló tulajdonságát, mely háttérében a ciklooxigenáz-1 (COX-1) enzim blokkolásán keresztül a trombo-citák tromboxán A₂ (TXA₂) szintézist gátló hatása áll.

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 oldalfalában akadályozza az arachidonsav (AA) bekötődését. Trombo-cita 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 tromboxánA₂ szintetáz hatására a prosztaglandin H₂-ből TXA₂ keletkezik, mely igen erős trombocita aktivációs hatással bír. A COX-1 konstitutív enzim, a szövetekben folyamatosan expresszálódik, és a keletkezett prosztaglandin H₂-ből prosztaglandin 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) expresszálódik, a fájdalom és láz kialakításában szerepet játszó prosztaglandin típusok képződését elősegítve. A COX izoenzimek aminosav szekvenciája kb. 60%-ban megegyezik, 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. 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. 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.

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. A hagyományos Aspirin szisztémás biológiai hozzáférhetősége körülbelül 40-50%-os, melytől független a COX-1 gátlás határfoka, ugyanis az ASA már a portális keringésben találkozik a vérlemezkékkel, ahol a trombociták a szisztémás keringésre jellemző koncentrációnál lényegesen magasabb gyógyszer szintnek vannak kitéve. A trombocita TXA₂ képzés és a trombocita aggregáció gátlás szempontjából, az enteroszolvens bevonatos, illetve a hagyományos készítmények hatékonyságában krónikus Aspirin terápia esetén nincs különbség.

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. A vaszkuláris halálozást és a nem fatális miokardiális infarktust 15-30%-al csökkenti. A nagy betegszámmal végzett klinikai tanulmányok eredményei alapján az alacsony dózisú (75-100 mg/nap) Aspirin terápia a „Gold standard” a kardio-és cerebrovaszkuláris események szekunder prevenciójában. A gyulladáscsökkentő, antipiretikus és fájdalomcsökkentő hatás eléréséhez ennél lényegesen magasabb dózissal (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.

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.
- 2.) Laboratóriumi „Aspirin rezisztencia”: az Aspirinre adott csökkent válasz egy adott laboratóriumi teszttel mérve.
- 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. Ezekben az esetekben nem beszélhetünk Aspirin rezisztenciáról, hiszen az Aspirin kifejti hatását és napi kétszeri Aspirin bevételével a probléma elvileg kiküszöbölhető.
- 4.) Klinikai "Aspirin rezisztencia" (klinikai hatástalanság): az Aspirin nem védte meg a beteget egy bekövetkezett akut vaszkuláris eseménytől.

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.

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. 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. 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 acetilációja 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 dózissal.

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 gyulladásoos kórképek esetén elvileg hozzájárulhatnak a csökkent Aspirin hatásához.

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 tromboticiták adenoszil-difoszfát (ADP) P2Y₁₂ receptorát. A tromboticiták 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 kapcsolódoa akadályozva a ciklikus adozin monofoszfát (cAMP) termelődését és a foszfátidil inozitol trifoszfát kináz (PI3K) útvonalat. A Gq proteinhez kapcsolódoó P2Y₁ receptoron keresztül pedig a foszfolipáz C (PLC β) útvonalat aktiválja.

A clopidogrel másodík generációs készítmény, un. prodrug, mely több lépcsőn keresztül a májban alakul át aktív metabolittá. 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 trombotocita aktivációt. A clopidogrel monoterápiában, illetve Aspirinnel kombinálva széles körben használt vegyület a visszatérő aterotrombotikus iszkémias események megelőzésében. Az antitrombotocita 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.

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

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. A módszer hátránya azonban, hogy nem P2Y₁₂ receptor specifikus, ezért nem optimális módszer a clopidogrel hatás monitorozására. A módosított prosztaglandin E1 (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. 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. A VASP fontos szubsztrátja a cAMP és ciklikus guanozin monofoszfát (cGMP) regulálta protein kinázoknak, melyek a VASP Ser157, Ser239 and Thr278 aminosavak oldalláncait foszforilálják. 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. PGE₁ és/vagy ADP jelenlétében a VASP foszforiláció mértéke a P2Y₁₂ aktivitással korrelál, 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.

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. Koronaria betegek közül senki nem került kizárásra, az Aspirin hatást nem mutató néhány beteg esetében ismételt vizsgálatot végeztünk (lásd később).

A kontroll csoportba egészséges, 18 éves életkort betöltött egészséges önkénteseket választottunk be, akik között rokon 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 antikonceptívumok 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 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 megbetegedés, akut fertőzés/antibiotikum kezelés, a beválasztást megelőző 1 hónapos időtartamban nagyobb sebészeti beavatkozás, illetve iszkémiás esemény.

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 éhgyomorral 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. 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 μ L aktivált hígított PRP-hez adott 12,5 μ L 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. 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, 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 funkciók teszt citráttal alvadást gátló 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 receptorra 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 szekréciót trombocita 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 x 10⁹/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 szekréciót $\mu\text{mol ATP}/10^{11}$ 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. Az RNS intakt voltát a GAPDH 3':5' jel arány meghatározásával bizonyítottuk. A fehérvérsejtekből eredő RNS kontaminációt CD15 és HLA-DQ β mRNS meghatározással zártuk ki. A reverz transzkripciót First Strand cDNA Synthesis Kittel (Roche, Mannheim, Germany)) végeztük. A reakció 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 reakciót Roche Light Cycler 480 készüléken SYBR Green I Master felhasználásával végeztük. Minden esetben párhuzamos reakciókat indítottunk. A PCR-ek 20 μL végtérfogatban történtek, mely 10 μL 2X-es koncentrációjú Master Mix-et 5 μL a reverz transzkripcióból származó cDNS templátot és 300 nM COX-1 primert, vagy 400 nM COX-2 primert tartalmazott. A COX-1 primerek szekvenciája a következő volt: tccatgttggtggactatgg (forward), ill. gtggtggtccatggttctg (reverz). A COX-2 primerek cttcacgcatcagttttcaag (forward), tcaccgtaaataatgatttaagtccac (reverz) voltak. ACTB, GNAS és HDGF bizonyultak a legstabilabb referencia géneknek a trombocita mRNS expresszió normalizálására koronária betegek esetében; 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. 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). 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. 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 szekréciónál 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 transmisszió%) és az ATP felszabadulást (μmol ATP/ 10^{11} trombocita) mértük minden mintában. Az ADP(PGE1) trombocita aggregációs tesztet a korábban leírtak szerint végeztük el. 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 szekréciónál, 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 transzmisszió%) 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. 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. 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. Hat beteg esetében különböző mennyiségű nacCOX-1 maradt a trombocita lizátumban. 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 . 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.

4.2. Az Aspirin hatása az arachidonsav indukálta TXB2 képződésre

A hosszú távú Aspirin kezelésen lévő betegek esetében az Aspirin drasztikusan csökkentette a TXB2 képződést, a TXB2 termelődés medián-ja mindössze 1.2 %-a volt a kontroll csoportban mért értékeknek. 6 beteg esetében itt is magasabb TXB2 értékeket mértünk, azonban az ismételt vizsgálatok során az értékek a 138 beteg esetében mért tartományokba estek.

4.3. Az Aspirin arachidosav 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. 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.

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 diabeteses, 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.

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; $p<0.001$). 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. 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.

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. 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. 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. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a clopidogrel hatást vizsgáló módszerek közül a P2Y₁₂ receptor specifikus tesztek nem befolyásolja az Aspirin hatása.

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. Egy másik vizsgálatban a trombocita fehérjék nuPAGE segítségével szeparálták, majd gélben történt enzimátikus emésztést követően a Ser529 reziduumot tartalmazó COX-1 peptidet tömeg spektrometriával határozták meg. 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. Koronária betegeken az általunk eredetileg alapkutatói 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 acCOX-1-t tartalmazó újonnan képződött trombociták kerülnek a keringésbe elegendő TXA2-t képezve a trombociták aktiválásához. Ez különösen fontos lehet napi egyszer alkalmazott intesztinoszolvens Aspirin terápia esetében. Ugyanakkor az Aspirin gátló hatás jelentős része már a preszisztémás keringésben érvényesül. Azonkívül az Aspirin által acCOX-1-t tartalmazó megakariocitákból képződő trombociták szintén acCOX-1-t tartalmaznak. Mindezeket 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. Jelen eredményeink szerint, a hosszú távú Aspirin terápián levő betegeken 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.

Az Aspirin gátló hatását, a COX-2-re, a COX-1 izoenzimére is kifejti, de a profilaktikus alacsony dóziséű Aspirin terápiát jóval meghaladó, nagy dózisek szükségesek a szerin oldallánc acetilálásához (ebben az esetben a Ser516). Ez az enzim jelen van a megakariocitákban, expresszálódik a fiatal trombocitákban is, és ismert up-regulációja gyulladásoos körülmények között, valamint diabetes mellitus esetén. Ismert az a feltételezés, hogy az Aspirin csökkent hatásáért a trombociták COX-2 expressziója felelős. Ugyanakkor Riondino és munkatársai 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 betegeink 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 dóziséű 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, ezért az Aspirin hatás ellenőrzése információval szolgálhat a betegek compliance-éről. Non-szteroid

gyulladáscsökkentők interferálhatnak az Aspirin hatásával, 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. 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 un. 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. A clopidogrel rezisztencia ténye eredményezte az új generációs P2Y12 gátló készítmények (ticagrelor, prasugrel) kifejlesztését. 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, a módszer hátránya, hogy nem P2Y12 receptor specifikus (a P2Y1-re is hat), és az Aspirin hatása befolyásolja az eredményt.

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 betegekből a clopidogrel hatás monitorozására javasoltak.

Annak ellenére, hogy az AA indukálta trombocita funkciós teszteket 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. A potencírozó hatás clopidogrel általi blokkolása eredményezheti a vizsgáltunk 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 betegekből a csökkent TXA₂ képződés a fibrinogén receptor szignalizációjához még elegendő, de a trombocita

szekréciónak és aggregációnak 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 trombotikus gátló kezelés esetén az Aspirin hatását mutatja. Clopidogrel hatásvizsgálatához kettős trombotikus gátló kezelésben részesülő betegek esetén a P2Y₁₂ receptor specifikus tesztek nem befolyásolják az Aspirin hatását, 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 szekréción, 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.

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.



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

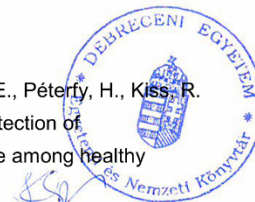
Jelölt: Homoródi Nóra
Neptun kód: B6XE6H
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

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 alapján 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.

