

Derleme-Review

Kardiyovasküler hastalıklarda trombosit fonksiyon testleri: patofizyolojiden klinik yaklaşıma

Platelet function tests on cardiovascular diseases: from pathophysiology to clinical approach

Şermin Tetik, Koray Ak

Biyokimya Anabilim Dalı (Yrd. Doç. Dr. Ş. Tetik) Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi TR-34668 İstanbul, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı (Uzm. Dr. K. Ak) Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi TR- 34662 İstanbul

Özet

Trombositler, tromboz, hemostaz ve inflamasyonda büyük önemi olan hücrelerdir. Antitrombotik tedavi kardiyovasküler hastalıklara bağlı mortalite ve morbiditenin azaltılmasında önemlidir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, aspirin ve clopidogrel gibi antitrombotik ilaçlara karşı direnç üzerinde sıklıkla durulmaktadır. Bu nedenle kardiyovasküler hastalıklarda, antitrombotik ilaçların etkisini test etmek için trombosit fonksiyon testleri kullanması gerekmektedir. Ancak in vivo trombosit fonksiyonları ve ex vivo trombosit fonksiyon testlerinin sonuçları arasındaki ilişki net olarak ortaya konulamamıştır. Bu derlemede, kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan trombosit fonksiyon testleri, bu testlerin avantaj ve dezavantajları, antitrombotik tedaviye hastaların verdiği cevaplardaki çeşitliliğin incelenmesi ve direnç kanıtlarının tartışılması amaçlanmıştır.

Anahtar sözcükler: Trombosit fonksiyon testleri, antitrombotik tedavi, antitrombotik tedaviye direnç

Abstract

Platelets have significant functions in thrombosis, hemostasis and inflammation. Antithrombotic therapy has been proven to be important in reduction of mortality and morbidity related to cardiovascular diseases. Recently, many studies have been focused on antithrombotic drug resistance. With this regard, platelet function tests have been gaining more popularity to test the effectiveness of antithrombotic drugs. However, correlation between in vivo and ex vivo platelet functions has not been documented clearly. In this review, we aimed to discuss platelet function tests used in the diagnosis of cardiovascular diseases, advantages and disadvantages of these tests, altered responses to antithrombotic therapy and resistance to antithrombotic therapy.

Key words: Platelet function tests, antiplatelet treatment, resistance to antiplatelet treatment

Geliş tarihi/Received: 02 Kasım 2009; **Kabul tarihi/Accepted:** 15 Mart 2010

İletişim adresi:

Dr. Şermin Tetik, Biyokimya Anabilim Dalı, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, TR-34668 İstanbul. E-posta: stetik@marmara.edu.tr

Giriş

Normal fizyolojik koşullar altında damar hasarı görüldüğünde, dolaşımdaki trombositlerin görevi kan kaybını engellemektir. Bu süreç trombositlerin subendotele hızlı bir şekilde adezyonu (von Willebrand Faktörün ve kollajenin yardımı) ile başlar, trombosit-trombosit kümelerinin oluşması ile sürer. Trombosit granüllerinden salınan

maddeler agregasyonu bir sonraki boyuta taşır ve nihayet zarar gören damar duvarı üzerinde geçici bir trombosit pıhtısı yaratır (primer hemostaz). Aynı anda trombositler pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonunu içeren bir dizi adımla koagülasyon kaskadını desteklerler. Bu da fibrin oluşumunu sağlayan sekonder hemostazdır [1]. Sekonder hemostazda ilk olarak daha gevşek bir yapıya sahip fibrin oluşumu söz konusudur. Çapraz bağlı fibrin yapılarının meydana gelmesi ile pıhtı daha dayanıklı hale gelir ve yara iyileşinceye kadar bu yapılanma sürer. Pıhtıya ihtiyaç kalmadığı noktada diğer faktörler devreye girerek fibrinolizisi başlatır ve pıhtıyı uzaklaştırırlar. Arterial tromboz, ateroskleroz gibi patolojik koşullarda ise trombositler bu hastalıkların başlamasına katkıda bulunurlar. Trombositler vasküler inflamasyona neden olan kemokin ve sitokinleri granüllerinden salıverirler, vasküler duvar hücrelerinden ise trombositleri aktive eden maddeler salınır. Dokulara giden kan desteği sınırlandığından, bu bölgelerde lokal iskemi görülebilir veya trombositler aterosklerotik lezyon gelişimine katkıda bulunuyor olabilir [2]. Kardiyovasküler hastalık tanısı konmuş bireylerde trombosit fonksiyon takibi üzerine yapılan çalışmalar, antitrombotik tedaviye cevap vermeyen olguların klinik önemlerine rağmen tartışmalı bilgilere dayanmaktadır [3, 4]. Hastaların antitrombotik tedaviye cevaplarındaki farklılık 1000’li yılların ortalarında gündeme taşınmıştır [5]. Bu tarihten itibaren hastaların klinik takiplerinde direnç çalışmaları hız kazanmış ve uluslararası kardiyovasküler toplantılarında bu konu tartışılmaya başlanmıştır [6, 7]. Son yıllarda ise, antitrombotik tedavi sonrası tespit edilen artmış trombosit aktivasyonu, perkütan revaskülarizasyon yapılan hastalardaki clopidogrel direnci ve artmış iskemik komplikasyonlar (stent trombozu gibi) arasındaki ilişkiler incelenmeye başlanmıştır [7, 8]. Clopidogrel tedavisine alınan hasta cevabındaki farklılıklar, farmakodinamik yaklaşımlarla yeni dönem P2Y12 reseptör inhibitörlerinin gelişmesine neden olmuştur [9]. Aynı şekilde aspirin tedavisine alınmayan yanıtlara bağlı olarak, hastalardaki kötüçül klinik sonuçların izlenmesi önemli tartışmalar yaratmıştır [4, 10, 11]. Buradaki en büyük sıkıntı, *ex vivo* testlerle, *in vivo* trombosit fonksiyon testlerinin örtüşmemesidir [12]. Bu derlemede kardiyovasküler hastalıklarda trombosit fonksiyon ve aktivasyonunu ölçmek için kullanılan yöntemler arasındaki farklılıklar tartışılmış, antitrombotik cevaplardaki farklılıklar özetlenmiş ve *ex vivo* testlerle antitrombotik tedaviye cevap alınamayan hastalardaki oranların verildiği araştırmalar incelenmiştir.

Trombosit fonksiyonunun ölçülmesinde geçerli klinik testler

Trombositler, kendilerini uyaran veya baskılayan çeşitli faktörlere bağlı olarak fonksiyonlarında değişiklikler gösterirler. Artmış trombosit aktivasyonu akut (akut koroner sendromlar gibi) veya kronik iskemik kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda rol oynar. Kardiyovasküler hastalık patogenezinde rol oynayan trombositlerin, antitrombotik tedavi ile kontrol edilmesi ve klinik gelişmelerin takibi trombosit fonksiyon testleri ile mümkündür. Bu durumda yapılan testin amacına göre ”doğru test” kavramı karşımıza çıkar. Geliştirilen ilk fonksiyon testleri olarak kanamalı hastaların tanımını yapmak ve teşhis etmek için kullanılan testler olmuştur. Yakın tarihlere geldiğimizde klinikte ve araştırmalarda antitrombotik tedavileri ve pre-hemostatik etkileri takip amacıyla kullanılan trombosit fonksiyon testleri görülmektedir. Son olarak da, transfüzyon tıp biliminde kullanılan trombosit fonksiyon testleri kullanılmaya başlanmıştır. Koroner arter hastalığı olan vakalar içinse, trombosit fonksiyon testleri tahmini klinik sonuçları tespit etmek ve antitrombotik tedaviyi değerlendirmek amacı ile kullanılmaktadır. Örneğin trombotik riski yüksek olan hastalarda aspirin ile tedavi, riskte %25 azalmaya neden olurken, uzun dönemli tedavi ile diğer trombotik patolojilerin oluşma riski de %10-20 dolaylarında olmaktadır [13]. Muhtemelen bu hastalar clopidogrel veya doğrudan trombositleri hedef alan farklı ajanlarla uygulanan tedavilere ihtiyaç duyacaklardır. Bu durumda aspirin veya clopidogrelin trombosit cevabına karşı klinik “dirençini” test edecek standart bir laboratuvar yöntemi olması önem kazanacaktır.

Klinik değerlendirmelerde trombosit fonksiyonlarının kullanımı

Trombosit fonksiyon testlerinin altın standardı ‘‘Light Transmittance Aggregometry’’ (turbidimetrik, LTA)’dir. Prensibi, çeşitli agonistler varlığında uyarılan trombositin zengin plazmada trombosit-trombosit agregasyonunu takip etmektir. Agonist olarak kullanılan ajanların özelliğine bağlı olarak trombosit agregasyonunun şiddeti değişmektedir. LTA, aspirin, clopidogrel, diğer P2Y12 inhibitörleri, trombosit glikoprotein IIb/IIIa (GpIIb/IIIa) inhibitörleri gibi antitrombosit ajanların etkisini takip etmek için yaygın olarak kullanılan bir cihazdır [14]. Bu yöntemle trombosit GpIIb/IIIa’nın agregasyonu başarı ile ölçülmesine rağmen, potansiyel dezavantajları arasında, örnek çalışma süresinin sınırlı olması, tekrarlanabilirlik oranında farklılık, büyük örnek hacimlerine gereksinim duyulması, yöntemin oluşan mikro-agregatlara hassas olmayışı, uzun işlem süreci, agregometrenin pahalı olması ve uzman bir kişiye ihtiyaç duyulması sayılabilir. Impedance agregometri ise LTA’ya benzer, ancak LTA’da materyal trombosit zengin plazma (platelet rich plasma, PRP) veya yıkanmış trombositler iken, impedans agregometride kullanılan materyal tam kandır ve ışık geçirgenliği yerine dirence bağlı olarak (impedance) ölçüm yapılmaktadır. Trombositler, bir agonistle uyarıldıklarında, elektrotların çevresinde agregat olurlar ve elektrik direnci artar. Impedans agregometri, organik nitratların disagregatör kapasitesi de dahil olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır.

Trombosit aktivasyon indikatörleri

Trombosit aktivasyonuna bağlı olarak, trombositlerde şekil değişikliği, agregasyon ve trombosit spesifik ürünlerin granül depolarından salıverilmesi gerçekleşir. Örneğin, trombosit faktör-4 (PAF-4) [15] ve β -tromboglobulin [16] ELISA veya radyoaktif etiketleme ile yapılan immunolojik testlerle kolaylıkla kantite edilebilir. Serum tromboksan B2 ve idrar II-dehidrotromboksan B2 aspirine cevabın tayini için ölçülen trombosit aktivasyon göstergeleridir [17].

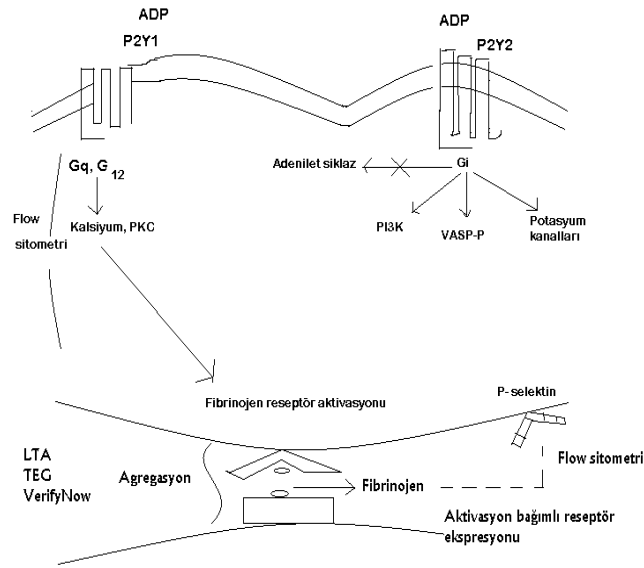
Reseptör ekspresyonu

Aktivasyon bağımlı reseptörlerin trombositlerin istirahatteki (resting) tespiti veya uyarılmış durumdaki ekspresyonu monoklonal antikolar kullanılarak akım sitometre ile kantitatif olarak tayin edilebilir. Bu teknik, özellikle farmakolojik etkilerin tayini için uygulanabilir. Bu konuda en çok çalışma trombosit P-selektin ve GpIIb/IIIa reseptör ekspresyonunu içerir [18, 19]. Trombosit-lökosit agregatlarının ve trombosit aktivasyon bağımlı indikatörlerin akım sitometre ile takibi trombosit aktivasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemle daha çok akut koroner sendrom takibinde P-selektin karşılaştırması yer alır [20, 21]. Artmış trombosit P-selektin, atrial fibrilasyonlu hastalarda sessiz serebral infarkt için bir risk faktörüdür [22]. Ancak dolaşımdaki monosit-trombosit agregatları stabil seyirli koroner arter hastalıklarının, perkütan koroner girişimler sonrası ve akut miyokard enfarktüsün klinik değerlendirmesinde, in vivo trombosit aktivasyonunda yüzey P-selektin değerlerini ölçmekten daha hassas bir yöntemdir [23]. Hatta dolaşımdaki monosit-trombosit agregatları, akut miyokard enfarktüsün erken belirteci olarak kabul edilebilir [24]. Kararsız angina pektorisli hastalarda iskemik semptomların başlamasından sonraki ilk 12 saat içinde plazma CD40L ölçülmesi, abciximab tedavisinden büyük yarar sağlayan bir hasta grubu oluşmasına yardımcı olmuştur [25]. Akım sitometre ile GpIIb/IIIa reseptörünün aktivasyonuna bağlı değişiklikler araştırılırken [18, 26], diğer yandan trombositlerden salınan proteinler (trombospondin) [27] ve fosfotidil serine bağlanan faktör Va, VIIIa ve annexin V’in analizleri yapılmaktadır [28, 29]. Reseptör ekspresyonu ve klinik sonuçlar arasındaki ilişki konusunda daha az bilgimiz vardır. Bu konudaki en büyük sıkıntı, kullanılan tekniğin kompleks oluşu, uzman laboratuvar çalışanına ihtiyaç duyulması ve pahalı bir yöntem olmasıdır.

Hücre içi sinyal ileti

Trombosit yüzeyindeki P2Y12 reseptörünün, inhibitörler kullanılarak kapatılması ve

reseptör aktivitesinin ölçülmesi için kullanılan yöntemlerden biri vasodilatör uyumlu fosfoprotein (VASP) testidir (Şekil 1) [30].



Şekil 1. Clopidogrele trombositlerden alınan cevabın laboratuvarında tayini.

Trombosit yüzeyindeki adenosin difosfat (ADP) uyarımlı iki ayrı reseptör (P2Y1 ve P2Y12) spesifik sinyal yolunu etkiler. Ölçülebilir cevaplar:

- Reseptör reaktivitesi: P2Y12 reseptöründen hücre içi sinyal akışı akım sitometre ile ölçülür. Vasodilatör uyarımlı fosfoprotein (VASP) fosforilasyonu monoklonal antikorlarla ölçülür. PKC: protein kinaz C, PI3K: inositol 1, 4, 5-trifosfat
- Aktivasyon bağımlı reseptör ekspresyonu: Aktif GpIIb/IIIa ve P-selektin akım sitometre’de monoklonal antikorlarla ölçülür.

Agregasyon, türbidimetrik agregometre (LTA) ile tayin edilir. Fibrinojen kaplı boncuklarla trombosit agregasyonu, “VerifyNow” veya tromboelastografi (TEG) ile trombosit-fibrin pıhtı dayanıklılığının trombosit agregasyonuna katkısı olarak değerlendirilebilir.

Akım sitometresi ve trombosit membran geçirgenliği yöntemleri sayesinde bloke olmayan P2Y12 reseptörünü belirlemek kadar, monoklonal antikorlarla fosforillenmiş VASP’nin miktarlarını ölçmek de mümkündür [30]. P2Y12’nin sinyal yolundaki özgüllüğü ve agregometrik tayine göre yöntemin tekrarlanabilir olması avantajlar arasında sayılabilir [26].

Yatan hasta için uygulanan trombosit fonksiyon testleri (point-of-care)

Bu testlerin amacı endotel hasarından sonra dolaşımda meydana gelebilecek trombosit zengin pıhtı oluşumunu ölçmektir. “VerifyNow” yöntemi (Accumetrics), aspirine, P2Y12 veya GpIIb/IIIa inhibitörlerine trombositlerde oluşan cevabın izlenmesi için trombin-reseptör aktive edici peptid-(TRAP), adenosin difosfat (ADP) ve araşidonik asit (AA) gibi ajanların kullanıldığı bir yöntemdir [31]. Bu teknikte fibrinojen kaplı boncuklar kullanılarak trombosit agregasyonu ölçülür ve genellikle perkütan koroner girişim (PCI) uygulaması yapılacak hastalarda sonuçların önceden değerlendirilebilmesi için tercih edilir. “VerifyNow” yönteminin kullanım kolaylığı olması bir avantajdır, ayrıca sonuçların türbidimetrik agregometre ile korelasyonu sağlanmaktadır. Tromboelastografi (TEG) ile trombosit fonksiyonlarını haritalama tekniği sayesinde, trombosit-fibrin

pihtısının dayanıklılığına ADP veya AA ile uyarılmış trombosit agregasyonunun katkısı ölçülebilir ve türbidimetrik agregometre ile sonuçların paralelliği kurulabilir [32] TEG'de örneklerin hazırlanması "VerfyNow" dan daha karmaşıktır, ancak TEG ile koagülasyon ölçümü sağlanabilmektedir. Trombosit-fibrin ilişkisi, trombin oluşumunun kinetiği, trombosit-fibrin pıhtı oluşum başlangıç zamanı veya trombosit-fibrin pıhtı dayanıklılığının ölçümleri iskemik vakaların tahmininde çok değerlidir. Son yıllarda TEG ölçümleri ve PCI sonrası iskemik vakaların takibinin yapıldığı LTA yöntemlerinin karşılaştırılması yapılmaktadır [33]. Klasik agregometrik yöntemlerle in vivo oluşan fizyolojik olayların tümünü (trombosit adezyonu gibi) takip etmek mümkün değildir. Bu nedenle trombosit fonksiyonlarını ölçebilecek sistemler geliştirilmektedir. "Impact cone-and plate(let)" analizi ile akış şartları altında ekstrasellüler matrikse trombositlerin adezyonunu izlemek mümkün olmaktadır. Analizör, "cone" ve trombosit (platelet) bölümlerinden oluşmaktadır. İki dakikalık süreç içinde tam kan kullanılarak arteriyel akış şartları yaratılarak, hücre dışı matrikste trombosit adezyon ve agregatlarının oluşumu bir görüntüleme ünitesi ile tespit edilmektedir [34]. Kararlı angina pektorisli hastalarda, platelet function analyzer-100 (PFA-100) ile koroner anjiyografideki koroner arter darlığının varlığında ve yokluğunda kanama zamanı öngörülebilir, böylece potansiyel hatalardan sakınılmış olunur. PFA-100 ile akut miyokard enfarktüsünde pıhtılaşma zamanı ölçülerek miyokard hasarının şiddeti tahmin edilebilir [35]. PFA-100 şiddetli trombosit defekti veya vWF hastalığı olanları belirlemede de kullanılmaktadır [36]. Ayrıca bu yöntem ile trombosit fonksiyonuna sistemik inflamasyonun katkısı [37] ve koroner girişim sırasında GpIIb/IIIa farmakoterapisinin etkileri izlenmektedir [38]. Hızlı trombosit fonksiyon testi (rapid platelet function assay, RPFA), basit ve hızlı diğer bir testtir. Tam kanda trombosit GpIIb/IIIa reseptör sayısına bağlı olarak fibrinojen kaplı boncuklarla aglütinasyon takip edilir [39]. Trombosit agregasyon ve aktivasyon yorumları ile GpIIb/IIIa'ya fibrinojen bağlanması değerlendirilmeleri yapılabilmektedir.

Kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan trombosit fonksiyon testlerinin hiçbiri standart klinik bakımın bir parçası olmak için önerilecek konumda değildir, çünkü tedavinin parçası olabilmek için gerekli yeterli sayıda büyük klinik vakalarda çalışılmalar bildirilmemiştir.

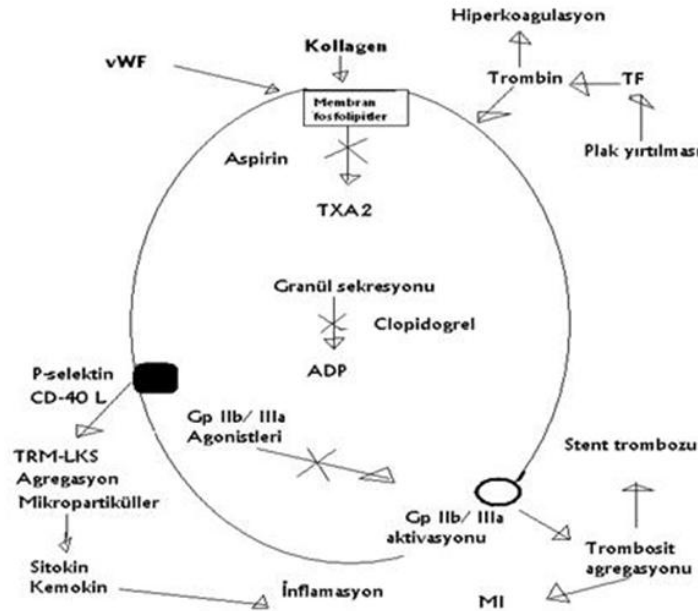
Trombositlerin antitrombotik tedaviye cevabındaki farklılıklarının izlenmesi

Sinyal mekanizmalarının pek çoğu trombositlerin aktivasyonuna neden olur ve bu şekilde trombotik olaylar meydana gelir. Bütün bu olumsuz sonuçları önlemek için tek bir tedavi stratejisi olmadığı bilinmektedir [9]. Çünkü tromboza yol açan sinyal mekanizmaları çoklu parametrelere dayanmaktadır. Tedavideki başarısızlık, ilaç direnci kavramı ile açıklanmaya çalışılsa da tek başına yeterli değildir. "Direnc" veya "antitrombotik ilaçlara cevapsızlık" kavramı antitrombotik ajanın spesifik hedefine bağlı olarak direnc aktivitesi ile açıklanabilir [40]. Aspirin yüksek arteriyel tromboz riski altındaki hastalarda ciddi arteriyel tromboz olasılığını %25 kadar düşürmektedir [41]. Ancak aspirin tedavisi altındaki arteriyel trombozlu hastaların %10-20 kadarında uzun dönemde yenileyen tromboz belirlenmiştir [41]. Aspirinin arteriyel trombozu önlemedeki başarısızlığı "aspirin direnci" olarak isimlendirilir. Aynı şekilde clopidogrelin arterial trombozu önlemedeki başarısızlığı ise "clopidogrel direnci" olarak bilinmektedir. Clopidogrelin aktif metaboliti, kovalent disülfid bağ oluşturarak trombositlerdeki P2Y12 reseptörünü geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Bu nedenle tedaviye cevap alınamayan hastalarda, ilaca dirençten söz etmek mümkün olur. Aspirin için "direnc" tanımlaması ise, siklooksijenaz-1 (COX-1) enziminin aktivitesinin ölçüldüğü laboratuvar tayinleri ile mümkündür. Bunlara ilave olarak "GpIIb/IIIa antagonist direnci" kavramı da yaygınlaşmaya başlamıştır. [3, 4, 9]. Çünkü arteriyel tromboz çok sayıda farklı nedenlere bağlı olarak gelişir ve bir hastadaki kötüye giden arteriyel tromboz sonucu, genellikle antitrombotik ilaca dirençten çok tedavinin başarısızlığından söz edilir. Üstelik hastanın, doktoru tarafından önerilen aspirin veya clopidogrel tedavisine uyup-uyumadığı zor tespit edilen bir problemdir. Hastalar ve gönüllü sağlıklılar arasındaki antitrombotik ilaca alınan cevapların benzerlik veya farklılıklarının laboratuvar testleri ile iyi değerlendirilmiş

olması gerekir. Yapılan testlerle cevap farklılığı netleştiginde “antitrombotik ilaca direnç” ten söz etmek mümkün olacaktır. Bu noktada önemli bir sorunun yanıtı aranmalıdır. Laboratuvarlarımızda bu ilaç tedavilerine verilen hasta cevapları test edilmekte midir? Aspirin, clopidogrel ve GpIIb/IIIa antagonist direncinin klinik olarak anlamlı bir tarifini yapmak, ancak hastadaki ilaca bağımlı laboratuvar testleriyle ilişkili klinik sonuçların alındığı verilerle mümkündür. Bu bağlantılar açıkça kurulduğunda, antitrombotik ilaç direncinden söz etmek doğru olacaktır.

Aspirin

Aspirin kullanımı, siklooksijenaz-1 (COX-1) enziminin serin artığını (moiety) asetilleyerek geri dönüşümsüz inhibisyona neden olur [21]. Böylece endotel hücrelerden prostasiklin ve trombositlerden tromboksan A2 (TXA2) salınımının inhibisyonu gerçekleşir. Trombositler bu yolla yaşamları süresince COX-1 enzimi üretmezler. Oysa endotel hücreleri yeni COX-1 oluşturma kapasitesini korurlar ve aspirine maruz kaldıktan kısa bir süre sonra normal fonksiyonlarına geri dönerler. Aspirin tedavisine trombosit cevabının tayini, COX-1 'e spesifik ve COX-1'e spesifik olmayan yöntemlerin kullanıldığı laboratuvar yöntemleri ile belirlenir (Şekil 2).



Şekil 2. Kardiyovasküler hastalıklarda trombosit aktivasyonu ve inhibisyon yolları (TF: tissue factor, vWF: von Willebrant Factor, MI: Myocard infarction, TRM-LKS: trombosit-lökosit agregatları.).

Trombosit agregasyonunun araşidonik asit (AA) ile uyarılması doğrudan siklooksijenaz-1 (COX-1) aktivitesine bağlıdır. Tromboksan A2'nin (TXA2) *in vivo* üretimi immunolojik tayinlerle (ELISA) ölçülebilir. ADP ve kollajen uyarımlı agregasyon COX-1'e spesifik olmayan yöntemlerdir. GpIIb/IIIa ve p-selektin reseptör aktivasyonu ve agregasyonu COX-1'den bağımsız meydana gelir. COX-1'e özgü yöntemler, araşidonik asit (AA) indüklü trombosit agregasyonunu kapsar ve geleneksel agregometrik yöntemle (LTA) ölçülür. En eski yöntemlerden olan trombosit haritalama tekniği (TEG), VerifyNow ve serum veya idrardaki TXA2 metabolitlerinin ELISA ile ölçüldüğü teknikler de kullanılmaktadır. COX-1'e spesifik olmayan agregasyon yöntemleri arasında ise agonist olarak ADP veya kollajenin kullanıldığı platelet function analyzer (PFA-100) yöntemi gösterilebilir. Yüksek vasküler riske sahip hastalar ve aspirin tedavisi uygulanan hastalar arasında artmış trombosit reaktivitesi gösterilmiştir [42]. HOPE (Hearth Outcome Prevention Evaluation) çalışmalarına dahil edilen hastalarda trombosit tromboksan A2

oluşu ve idrarda artmış TXB2 düzeyleri arasındaki ilişki gösterilerek bu hastalarda yüksek iskemik risk bildirilmiştir [10]. Ultegra Rapid Platelets Function Assay (RPFA) (Accumetrics) ile yapılan çalışmada artmış trombosit reaktivitesi tespit edilen hastalar ve PCI yapılan hastalarda işleme bağlı miyonekroz ile ilişkisi gösterilmiştir [11]. LTA ile yapılan bir çalışmada ise 325 mg aspirin verilen 326 kararlı anjina pektorisli hastada 1.8 yıl boyunca yapılan takip sonucunda felç, MI ve ölümlerle sonuçlanan olguların aspirin direnci ile ilişkisi gösterilmiştir [15]. Hastaların %5.2'sinde aspirin direnci saptanmış, 0.5 mmol/L AA'le inhibisyon sonrası \geq %20 agregasyon ve 10 μ mol/L ADP'ye cevapta \geq %70 ortalama agregasyon tespit edilmiştir. Bu süre içinde aspirin direnci tespit edilen hastaların %24'ü, direnç göstermeyen hastalara karşı (%10) incelenmiş ancak aspirin direnci ve klinik bulgular gösteren hastalar arasında anlamlı bir istatistik sonuç varılmamıştır. Birçok risk faktörünün değerlendirilmesinden sonra aspirin direnci uzun dönemli olumsuz etkilerde bağımsız gösterge olmuştur [40]. Elektif PCI yapılan hastalarda aspirin direnci oranları düşük bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, hastalar 325 mg günlük dozla tedavi edilmişler ve LTA ile AA indüklü trombosit agregasyonu takipleri yapılmıştır [40]. Son dönemde, 81-325 mg aspirin dozu uygulanan koroner arter hastalığı olan hastalarda çift kör çalışması yapılmış, her bir dozda COX-1 spesifik yöntemlerle aspirin direnci %0-%6 arasında, COX-1 spesifik olmayan yöntemlerle %1-%27 oranında direnç bulunmuştur [41]. Aspirinin farklı dozlarını alan hastalarda aspirin cevapsızlığının ölçülmesinde kullanılan tayin yöntemleri arasında bir standardizasyon yoktur. Bu nedenle aspirin direnci, yüksek oranda kullanılan yöntemle ilişkili bulunmaktadır. Özellikle de COX-1 aktivitesini doğrudan hedef alan yöntemler kullanıldığında bu durum görülmektedir [42]. Ayrıca hastaların tedavi önerilerine sadık kalmamaları da "aspirin direnci" tanımını etkileyebilmektedir [43]. PFA-100 analizi ile aspirin-aracılı trombosit inhibisyonu ölçülür. Aspirin direnci, clopidogrel direnci ile birlikte görülebilmektedir [44]. Aspirin ve clopidogrel direnci olan hastalar ADP ve AA uyarısına ilave olarak kollajene karşı da yüksek reaktivite gösterebilir [41]. Aspirin direnci üzerine yayınlanmış çalışmaların en önemli sıkıntısı, seri trombosit fonksiyon ölçümlerinin, özellikle aspirin direncinin derecesine bağlı olarak aspirin dozununun değiştirildiği ölçümlerin eksikliğidir [42].

Clopidogrel

Son yıllarda yapılan çalışmalar, PCI'na giden hastalardaki iskemik olayların gelişimine ve ADP'ye verilen trombosit cevabına odaklanmıştır ve bu çalışmalarda trombosit fonksiyonları LTA ile ölçülmüştür [7, 26]. Clopidogrel ile uyarılmış trombosit inhibisyonu ile tedavi sonrası trombosit reaktivitesi, PCI bağlı miyonekroz, stent trombozu ve tekrarlayan iskemik olaylar arasındaki ilişkiler küçük gruplarda rapor edilmiştir. Clopidogrelle hasta cevabının araştırılması, agonist olarak ADP'nin kullanıldığı LTA çalışmalarıyla yapılmaktadır [5, 7]. ADP uyarısından sonra aktivasyon bağımlı reseptör ekspresyonunun akım sitometre ile ölçümü, point-of-care tayinleri veya P2Y12 seçiciliğine dayanan vasodilatör-uyarımlı fosfoprotein (VASP) fosforilasyonunun takibi kullanılan yöntemler arasındadır [5, 7, 8]. Koroner stent uygulanan hastalarda aspirin ve clopidogrelin antitrombotik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, 5 μ mol/L ADP indüklü agregasyon cevabında farklılıklar gözlenmiştir [44]. Agregasyondaki mutlak değişiklik olarak ($\Delta A \leq$ %10) direnç tanımı yapılmıştır. Müller ve arkadaşları agregasyondaki <%10 nisbi değişikliği ilaca cevapsızlık olarak tanımlamışlardır [6]. Clopidogrel direncinin rapor edildiği farklı çalışmalarda, PCI'na giden hastalarda clopidogrelin 300 mg yükleme dozu kullanılarak, trombosit fonksiyonları stent sonrası takip edilmiştir. Bu hastalarda clopidogrelle direncin %5'den %44'e değiştiği bildirilmiştir [5, 45]. Çalışmaların değerlendirilmesinde, dirençle ilgili oransal farklılıkların, uygulama dozundaki farklılık, tanımlamadaki farklılık (agregasyondaki mutlak değişikliğe karşı agregasyondaki nisbi değişikliğin ölçülmesi gibi), kullanılan laboratuvar yöntemlerindeki çeşitlilik veya maksimum etkinin görülme zamanı beklenmeden kan örneğinin alınması gibi faktörlerden etkilenmesi mümkündür. Trombosit reaktivitesi ve stent trombozunun ilişkisi pek çok çalışmada araştırılmış ve tedavi sonrası trombotik aktivite çeşitli yöntemlerle

belirlenmiştir [8, 45]. Daha sonra yapılan çalışmalarda da koroner stent uygulaması sonrası iskemi gelişen vakaların oluşu ve ADP'ye verilen trombosit reaktivitesindeki yüksek cevap ilişkilendirilmiştir. Sekiz yüz dört hastada yapılan diğer bir çalışmada stent trombozunun, ADP ile \geq %70 trombosit agregasyonu oluşturan hastalarda geliştiği tespit edilmiştir [45].

GpIIb/IIIa antagonist direnci

GpIIb/IIIa antagonistleri abciximab (ReoPro, EliLilly, Centocor), eptifibatide (integrilin, Millenium Pharmaceuticals) ve tirofiban (Aggrastat, Merck) fibrinojenin trombosit yüzeyindeki reseptörü GpIIb/IIIa'ya (integrin α 1b/ β 3) bağlanmasını inhibe eder. GpIIb/IIIa antagonistlerine karşı "direnc" sözcüğü henüz kullanılmamasına rağmen, GpIIb/IIIa antagonistleri tarafından trombosit fonksiyonunun inhibisyonu hastadan hastaya değişmektedir. Ayrıca abciximab' a *in vitro* direnc kanıtlanmıştır [46]. Bazı klinisyenler, trombosit fonksiyon testlerinin sonuçlarına göre tedaviyi değiştirmektedirler. Aspirin tedavisi sürerken veya ara verilmişken thienopyridine tedavisi eklenebilir [47]. Ancak artmış antitrombosit tedavisi, kullanılan ajana bağlı olarak bazı yan etkileri veya kanama riskini artırabilmektedir [48]. Daha da önemlisi, aspirin, clopidogrel ve GpIIb/IIIa antagonistlerine direncin tespit edildiği durumlarda uygulanan alternatif tedavilere alınan klinik sonuçların bildirildiği araştırmalar henüz yayımlanmamıştır. Bu nedenle de klinik sonuçların iyiye gidip gitmediği bilinmemektedir. Kısaca, hastalardaki direncin ölçülmesi için uluslararası kabulü olan bir test henüz yoktur. Temel bakış açısı, test sonuçları için alt ve üst sınırların kesinliğini veya değişebilirliğini saptamak olmalı ve uluslararası normal değerlere pratikte ulaşılmaya çalışılmasını gerektirmektedir (örneğin, warfarin tedavisinde standardize edilmiş "International Normalized Ratio, INR uygulaması gibi).

Sonuç

Farmakolojik agonistlere trombositlerin cevabının ölçülmesi, kardiyak risk taşıyan hastaların belirlenmesi veya antitrombotik tedaviye cevapta hastalardaki farklılığın trombosit fonksiyon testleri ile izlenmesi doğal olarak kompleks bir olgudur. Rehber tedavi için klinik sonuçlarla, laboratuvar sonuçlarını eşleştirmek zordur ve birçok metodolojik faktöre bağlıdır. Trombosit fonksiyon testlerinin klinik karar verici olması için, kazanılmış bilgilerin değerlendirilerek, klinik alana yansıtılması, yalanlanmış hipotezler veya yeterli ölçekte destek sunan çalışmaların toplanması ve karşılanmamış klinik ihtiyaçların bir bütünlük içinde değerlendirilmesi trombosit fonksiyon testlerinin kullanımında karşılaşılan en büyük sorunun çözülebilmeye katkıda bulunacaktır.

Teşekkür

Derlemenin içinde yer alan şekillerin çizilmesindeki katkılarından dolayı Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Özlem Bingöl Özakpınar'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Yardımcı KT, Göker B, Şener A, Tetik Ş, Oba R, Ulutin ON: Trombositlerde Transport Sistemleri. 4. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi, 26-28 Eylül 2003, Edirne, 33-43.
2. Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost* 2008; 99: 480-6.
3. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1980-7.
4. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006;27: 647-54.
5. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL, Brace LD. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 2331-6.

6. Müller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schonig A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003; 89: 783-7.
7. Bliden KP, DiChiara J, Tantry US, Bassi AK, Chaganti SK, Gurbel PA. Increased risk in patients with high platelet aggregation receiving chronic clopidogrel therapy undergoing percutaneous coronary intervention: is the current antiplatelet therapy adequate? *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 657-66.
8. Ajzenberg N, Aubry P, Huisse MG, Cachier A, El Amara W, Feldman LJ, Himbert D, Baruch D, Guillin MC, Steg PG. Enhanced shear-induced platelet aggregation in patients who experience subacute stent thrombosis: a case-control study. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1753-6.
9. Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel resistance? *Thromb Res* 2007; 120: 311-21.
10. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105: 1650-5.
11. Chen WH, Lee PY, Ng W, Tse HF, Lau CP. Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1122-6.
12. Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation*. 2004; 110: 489-93.
13. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br Med J* 2002; 324: 71-86.
14. Tetik S, Eksioglu-Demiralp E, Yardimci KT: Effect of imatinib mesylate on platelet aggregation and fibrinogen binding. to isolated platelets. *Adv Mol Med*. 2005; 1: 165-170.
15. S.M. Jafri, T. Ozawa, E. Mammen, T.B. Levine, C. Johnson, S. Goldstein. Platelet function, thrombin and fibrinolytic activity in patients with heart failure. *Eur Heart J* 1993; 14: 205-12.
16. Rossi E, Casali B, Regolisti G, Davoli S, Perazzoli F, Negro A, Sani C, Tumiati B, Nicoli D. Increased plasma levels of platelet-derived growth factor (PDGF-BB+PDGF-AB) in patients with never-treated mild essential hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 1239-43.
17. Nidorf S.M., Sturm M., Strophair J., Kendrew P.J., Taylor R.R. Whole blood aggregation, thromboxane release and the lyso derivative of platelet activating factor in myocardial infarction and unstable angina. *Cardiovasc Res* 1989; 23: 273-8.
18. Tetik S, Uras F, Ekşioğlu-Demiralp E, Turay Yardimci K. Low-density lipoprotein specifically binds glycoprotein IIb/IIIa: a flow cytometric method for ligand-receptor interaction. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008; 14: 210-9.
19. Özsavcı D, Yardımcı KT, Yanıkaya-Demirel G, Uras F, Hekim N, Ulutin ON. Apo A-1 binding to platelets detected by flow cytometry. *Thromb Res* 2001; 103: 117-22.
20. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 104: 1533-7.
21. Tetik S. "Dedection of Platelet Function with Cytometric Bead Array. VII. National Thrombosis, Hemosasis and Anjiology Congress, 4-6 May 2007, Cukurova University , School of Medicine-Eds. Orhan N. Ulutin, Adana (ISBN: 978-9944-5184-1-3), pp. 425
22. Minamino T, Kitakaze M, Sanada S, Asanuama H, Kurotobi T, Koretsune Y, Fukunami M, Kuzuya T, Hoki N, Hori M. Increased expression of P-selectin on platelets is a risk factor for silent cerebral infarction in patients with atrial fibrillation: role of nitric oxide. *Circulation* 1998; 98: 1721-7.
23. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet

- aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 352-8.
24. Furman MI, Barnard MR, Krueger LA, Fox ML, Shilale EA, Lessard DM, Marchese P, Frelinger AL 3rd, Goldberg RJ, Michelson AD. Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1002-6.
 25. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML; CAPTURE Study Investigators. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003; 348: 1104-11.
 26. Tetik S, Uras F, Yardimci KT. Purification and characterization of human platelet fibrinogen receptor the GpIIb/IIIa complex. *Turkish Journal of Pharmaceutical Science*. 2005; 2:155-62.
 27. M. Griesshammer, H. Beneke, B. Nussbaumer, M. Grunewald, M. Bangerter, L. Bergmann. Increased platelet surface expression of P-selectin and thrombospondin as markers of platelet activation in essential thrombocythaemia. *Thromb Res* 1999;96:191-6.
 28. Furman MI, Krueger LA, Frelinger AL 3rd, Barnard MR, Mascelli MA, Nakada MT, Michelson AD. GPIIb-IIIa antagonist-induced reduction in platelet surface factor V/Va binding and phosphatidylserine expression in whole blood. *Thromb Haemost* 2000;84: 492-8.
 29. Poley S, Mempel W. Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: advantages of a functional flow cytometric test in comparison to the heparin-induced platelet-activation test. *Eur J Haematol* 2001; 66: 253-62.
 30. Geiger J, Brich J, Hönig-Liedl P, Eigenthaler M, Schanzenbächer P, Herbert JM, Walter U. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19: 2007-11.
 31. Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, Collier BS. Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation* 1999; 99: 620-5.
 32. Ak K, Isbir CS, Tetik S, Atalan N, Tekeli A, Aljodi M, Civelek A, Arsan S. Thromboelastography-based transfusion algorithm reduces blood product use after elective CABG: a prospective randomized study. *Journal of cardiac surgery* 2009;24:404-10.
 33. Ak K, Atalan N, Tekeli A, İşbir S, Civelek A, Emekli N, Arsan S. Tromboelastografi ve kalp cerrahisinde kullanımı. *Anadolu Kardiyol Derg* 2008; 8: 154-62.
 34. Willoughby S, Holmes A, Loscalzo. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs*. 2002;1: 273-88.
 35. Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, Hsieh K, Vlcek M, Losert H, Domanovits H, Schreiber W, Laggner AN, Jilma B. Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 110: 1392-7
 36. E.J. Favalaro, G. Kershaw, M. Bukuya, M. Hertzberg, J. Koutts. Laboratory diagnosis of von Willebrand disorder (vWD) and monitoring of DDAVP therapy: efficacy of the PFA-100(R) and vWF:CBA as combined diagnostic strategies. *Haemophilia* 2001;7:180-9.
 37. M. Homoncik, A.D. Blann, U. Hollenstein, T. Pernerstorfer, H.G. Eichler, B. Jilma. Systemic inflammation increases shear stress-induced platelet plug formation measured by the PFA-100. *Br J Haematol* 2000;111: 1250-2.
 38. M. Madan, S.D. Berkowitz, D.J. Christie. Rapid assessment of glycoprotein IIb/IIIa blockade with the platelet function analyzer (PFA-100) during percutaneous coronary intervention. *Am Heart J* 2001; 141: 226-233.
 39. Frelinger AL 3rd, Hillman RS. Novel methods for assessing platelet function. *Am Heart J* 1998;135: S184-6.
 40. Sanioglu S, Tetik S, Sokullu O, Deniz H, Aydemir N, Yilmaz M, Arslan IY, Bilgen F. Aspirin resistance after CABG. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;57: 281-5.
 41. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Bañuelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C. Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery

- disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes* 2005; 54: 2430-5.
42. Mueller MR, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, Koppensteiner R, Ergun E, Mittlboeck M, Schreiner W, Losert U, Wolner E. Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1003-7.
 43. 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: 973-5.
 44. Tetik S, Ak K, Isbir S, Eksioglu-Demiralp, E, Arsan S, Iqbal I, Yardimci T. Clopidogrel Provides Significantly Greater Inhibition of Platelet Activity Than Aspirin When Combined With Atorvastatin After Coronary Artery Bypass Grafting: A Prospective Randomized Study. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010; 162: 189-98.
 45. Gurbel PA, Bliden KP, Tantry US. Effect of clopidogrel with and without eptifibatide on tumor necrosis factor-alpha and C-reactive protein release after elective stenting: results from the CLEAR PLATELETS 1b study. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2186-91.
 46. Cuisset T, Frere C, Quilici J, Barbou F, Morange PE, Hovasse T, Bonnet JL, Alessi MC. High post-treatment platelet reactivity identified low-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 542-9.
 47. Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, Macaluso G, Commeau P, Comet B, Lafont A, Camoin L, Walter U, Eigenthaler M. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003; 59: 295-302.
 48. Ronner E, Dykun Y, van den Brand MJ, van der Wieken LR, Simoons ML. Platelet glycoprotein IIB/IIIa receptor antagonists. An asset for treatment of unstable coronary syndromes and coronary intervention. *Eur Heart J* 1998; 19: 1608-16.