

Zmienność agregacji płytek krwi pod wpływem 6-miesięcznego podwójnego leczenia przeciwplatetkowego u chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych

Variability of platelet aggregation in patients with critical limb ischaemia during 6 months of dual anti-platelet therapy

Grzegorz Biolik, Damian Ziaja, Tomasz Urbanek, Waław Kuczmik, Teresa Twardela, Krzysztof Ziaja

Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (Department of General and Vascular Surgery Medical University of Silesia Katowice, Poland)

Streszczenie

W pracy przedstawiono analizę zmian aktywności płytek krwi pod wpływem leczenia dwoma lekami przeciwplatetkowymi — kwasem acetylosalicylowym oraz clopidogrelem — u chorych w IV stopniu niedokrwienia kończyn dolnych w obserwacji odległej. Praca ma charakter pionierski i wskazuje na postępujący słabnący charakter działania tych leków w odstępnie czasu, mimo blokowania ekspresji receptora IIb/IIIa na powierzchni płytki krwi oraz blokowania szlaku tromboksanowego.

Słowa kluczowe: krytyczne niedokrwienie kończyn dolnych, miażdżycza zarostowa tętnic kończyn dolnych, zmiany troficzne, agregometria impedancyjna, nadreaktywność płytek krwi, amputacja kończyn, podwójne leczenie przeciwplatetkowe, kwas acetylosalicylowy, clopidogrel, statyny, LMWH, leczenie rekonstrukcyjne, śmiertelność

Chirurgia Polska 2012, 14, 1–2, 30–35

Abstract

There was present an analysis of platelet variances in responsibility for dual-antiplatelet therapy — acetylsalicylic acid and clopidogrel — in patients with IV stage of limb ischaemia in long term follow-up. This is a pioneer paper and it is focused on the following weakened effect of antiplatelet drugs in long time period despite of the blockade of IIb/IIIa platelet receptor expression and blockage of thromboxane pathway.

Key words: critical limb ischaemia, peripheral arterial occlusive disease, trophic changes, impedance aggregometry, platelet hyper-reactivity, limb amputation, dual antiplatelet therapy, acetylsalicylic acid, clopidogrel, statins, LMWH, reconstructive procedures, mortality

Polish Surgery 2012, 14, 1–2, 30–35

Wstęp

Hemostaza krwi stanowi kompleks wzajemnie powiązanych interakcji między płytkami krwi, osocзовymi czynnikami krzepnięcia oraz ścianą naczynia [1, 2]. Leczenie przeciwplatetkowe w znaczący sposób zaburza tę równowagę, zarówno na poziomie płytek krwi, jak i ściany naczynia [1, 3, 4]. Dodatkowo wydaje się, że u chorych

Introduction

Blood hemostasis is a complex of mutually related reactions between platelet, blood coagulation proteins and vessel wall [1, 2]. An antiplatelet therapy significantly upset this equilibrium both in top of platelet and vessel wall level [1, 3, 4]. Additionally in patients who suffer from trophic changes in lower extremities (IIIth and IVth stage

z niedokrwiennymi zmianami troficznymi w obrębie kończyn dolnych (III oraz IV stopień wg klasyfikacji Fontaine'a) zaburzenia w obrębie ściany naczynia mają decydujący wpływ na hemostazę, a w konsekwencji na ryzyko utraty kończyny.

Celem opracowania jest przedstawienie zmian, do jakich dochodzi w obserwacji odległej w zakresie hamowania szlaku tromboksanowego oraz receptora dla ADP na powierzchni płytek krwi, ocenianych za pomocą agregometrii impedancyjnej.

Material i metody

Badanie przeprowadzono w grupie 33 chorych w IV stopniu niedokrwienia kończyn dolnych, poddanych leczeniu rewaskularyzacyjnemu, u których nie doszło do pełnego wygojenia owrzodzenia niedokrwienego w okresie do 3 miesięcy od zabiegu rewaskularyzacyjnego. Wszyscy chorzy otrzymywali rutynowo 2 leki przeciwplatetowe — kwas acetylosalicylowy w jednorazowej dawce dobowej — 150 mg oraz clopidogrel w jednorazowej dawce dobowej — 75 mg. Dodatkowo chorzy otrzymywali rosuvastatinę w dawce 10 mg na dobę. Ze względu na wysokie ryzyko żyłnej choroby zakrzepowatorowej, wszyscy leczeni pacjenci w okresie do 14. doby po zabiegu rewaskularyzacyjnym otrzymywali enoksaparynę w dawce profilaktycznej 40 mg raz na dobę. Z badania wyłączono chorych na cukrzycę, chorych z niewydolnością krążenia w III oraz IV stopniu NYHA oraz chorych z niewydolnością nerek.

Do oznaczania agregacji płytek krwi posłużono się agregometrem impedancyjnym Multiplate (Dynabate GmbH, Munich Germany) oraz fabrycznie przygotowanymi testami:

- ADP-test — (Dynabate GmbH, Munich, Niemcy) dla oceny odpowiedzi płytki krwi na pobudzenie receptora dla ADP;
- ASPI-test (Dynabate GmbH, Munich, Niemcy) dla oceny stopnia wyhamowania szlaku tromboksanowego płytek krwi.

Badanie obejmowało 4 pomiary agregometryczne:

- pomiar wyjściowy — bez leków przeciwplatetowych lub po okresie 10-dniowego ich odstawienia;
- 1 pomiar po zabiegu rewaskularyzacyjnym, tj. po upływie 48–72 godzin od włączenia dwóch leków przeciwplatetowych;
- 2 pomiar pozabiegowy między 25.–30. dobą po zabiegu rewaskularyzacyjnym;
- 3 pomiar pozabiegowy w okresie 3–6 miesięcy od zabiegu.

Próbki krwi do badań były pobierane do 4,5 ml próbek próżniowych zawierających 17 jednostek heparyny na każdy ml (Vacutainer®, Betcon Dickinson, Meyland, Francja).

Wszystkie próbki były poddane badaniom pomiarowym w okresie nie dłuższym niż 10–15 minut od pobrania oraz przy stałej temperaturze pomiaru — 37 stopni Celsjusza.

Charakterystykę kliniczną i demograficzną badanej grupy przedstawiono w tabeli I.

of Fonatine classification), the vessel wall disturbances have a significant influence on hemostasis, and in the end on the risk of limb lost.

The aim of this study is to show the changes of thromboxane pathway blockage and platelet ADP receptor blockage measured in impedance aggregometry, which are observed during long time dual-antiplatelet therapy.

Material and methods

The study was performed on the 33 patients group in IVth stage of limb ischaemia, who were gave up reconstructive procedures and who didn't present ulcers healing for 3 months after reconstructive procedure. All these patients received dual antiplatelet therapy — acetylsalicylic acid in 150 mg daily dosage and clopidogrel in 75 mg daily dosage. All these patients additionally received 10 mg rosuvastatinum daily. Despite on high risk of VTE all patients were treated with LMWH — enoxaparine 40 mg once daily for two weeks after reconstructive procedure. From the study were excluded diabetes patients, III and IVth stage of NYHA patients and all who present kidney failure.

For platelet activity measurement was used impedance aggregometer — Multiplate (Dynabate GmbH, Munich, Germany) and factory-made tests:

- ADP-test — (Dynabate GmbH, Munich, Germany) for evaluation of platelet answer for ADP receptor agonist;
- ASPI-test — (Dynabate GmbH, Munich, Germany) for evaluation of thromboxane pathway blockage.

The investigation contains 4 aggregometric surveys:

- basic measurement — without dual antiplatelet therapy or 10 day after stop of this type of therapy;
- 1st postrevascularization measurement — above 48 to 72 hours after beginning of dual antiplatelet therapy;
- 2nd postrevascularization measurement — between 25 and 30 day after the procedure;
- 3rd postrevascularization measurement — between 3 and 6 month after procedure.

Blood samples were collected in 4.5 ml volume vacuum tubes which contains 17 IU of unfractionated heparin for each milliliter of blood sample (Vacutainer®, Betcon Dickinson, Meyland, France).

All collected blood samples were gave-up measurement procedures in a no longer period than 10–15 minutes after collection. All was performed in standard temperature 37 degree of Celsius.

Demographic and clinical characteristic of investigated group was present in Table I.

For all aggregometric measurements of AUC (area under the curve) were referred to proper values of aggregation for healthy people.

Normal range of AUC:

- ADP-AUC (548–1167);
- ASPI-AUC (790–1410).

The value of AUC below the lower range for healthy patients was recognized as the proper answer for antiplatelet therapy it's mean:

- ADP-test: AUC < 548;
- ASPI-test: AUC < 790.

Tabela I. Charakterystyka grupy badanej
Table I. Characteristic of investigated group

	Grupa badana <i>Investigated group</i>
Liczba mężczyzn/ <i>Number of male</i>	24 (72,7%)
Wiek/ <i>Age</i>	67 (SD ± 5,27)
Obrzęk kończyny/ <i>Leg oedema</i>	16 (48,4%)
Zmiany troficzne/ <i>Trophic changes</i>	33(100%)
PTA/Stent/ <i>PTA/Stent placement</i>	13 (39,3%)
Pomost naczyniowy/ <i>Bypass procedure</i>	16 (48,4%)
Profundoplastyka/ <i>Profundoplasty</i>	7 (21,2%)

Dla wszystkich pomiarów agregometrycznych analizowano wielkość obszaru pod krzywą AUC w odniesieniu do wartości prawidłowych, czyli wartości agregacji płytek krwi obserwowane u osób zdrowych.

Normy:

- ADP — AUC (548–1167);
- ASPI — AUC (790–1410).

Za prawidłową odpowiedź na leczenie przeciwplateletowe przyjmowano wartości AUC mieszczące się poniżej dolnej granicy dla osób zdrowych w obu testach, to jest:

- ADP-test: AUC < 548;
- ASPI-test: AUC < 790.

Nadreaktywność płytek krwi w zakresie danego receptora rozpoznawano w przypadku, gdy wartości AUC mieściły się w przedziale wartości prawidłowych dla osób zdrowych, czyli nieleczonych lekami przeciwplateletowymi lub gdy wartość AUC była wyższa od górnej wartości normy dla osób zdrowych

Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano test normalności Kolmogorova-Smirnova oraz test zgodności chi-kwadrat. Ponieważ wyniki przeprowadzonej analizy wstępnej wskazywały na odchylenia od rozkładu normalnego, zastosowano nieparametryczną analizę wariancji — test Kruskala-Willisa. Do obliczeń statystycznych posłużono się pakietem Statistica 9.0 (StatSoft Inc., Stany Zjednoczone).

Wyniki

Agregometria

ADP-test

Najsilniejsze wyhamowanie szlaku pobudzenia płytki krwi na drodze receptora dla ADP uzyskano w pomiarze trzecim, to jest między 25. a 30. dobą od zabiegu naprawczego (tego rodzaju zmiany obserwowano u 28 z 33 chorych). Średnia wartość wyhamowania wahała się na poziomie 499,56 AUC. Co ciekawe, w czwartym pomiarze, czyli w okresie między 3. a 6. miesiącem leczenia, stwierdzono osłabienie stopnia wyhamowania agregacji — średnia wartość obszaru pod

Platelet hyperreactivity — according to examined receptor — was recognized in the case when the value of AUC was in ranges typical for healthy patients (i.m. don't treated antiplatelet drugs) or when the value of measured AUC was above the upper margin for healthy patients.

Statistical analysis

For statistical analysis the Kolmogorov-Smirnov normality test and chi-quarter test were used. Because of the results of performed analysis suggest differences to the normal distribution the non-parametric statistic of Kruskal-Willis was used too. We use Statistica 9.0 package software (StatSoft Inc. USA)

Results

Aggregometry

ADP-test

The strongest inhibition of platelet activity by the ADP receptor pathway was obtained in the third measurement i.m. between 25 and 30 days after revascularization procedure — in 28 of patients. The average value of AUC was 499.56. What is interesting — in the fourth measurement i.m. between 3 and 5 month of dual antiplatelet treatment — diminution of platelet aggregation blockage was observed. The average value of AUC was 506.93. What else is interesting — in all cases of treated patients the value of AUC measured in 2nd survey was not in therapeutic range (Fig. 1).

ASPI-test

Thromboxane pathway blockage was obtained in majority of analyzed patients (29 patients) The therapeutic values of platelet inhibition was observed during secondary measurement (first after revascularization procedure measurement).

The average value of AUC was 556.35 AU (normal value for non-treated patient is between 790–1410 AU).

Additionally during the next post-procedure measurements the further inhibition of platelet aggregation was observed — 168.62 AU in the 3rd measurement. Statistically diminution of aggregation blockage was observed in 4th measurement — similarly to the ADP receptor answer for aggregation blockage the average value was 290.86 AU. There were observed statistically significant differences — $p < 0,006$ (Fig 2).

In our observation we recognized lack of answer for dual antiplatelet therapy (acetylsalicylic acid and clopidogrel) in four cases (ADP/AUC > 548 and ASPI/AUC > 790) In one patients we recognized resistance for clopidogrel therapy and proper answer for acetylsalicylic acid. One patient from the resistance group died in 4th months after revascularization procedure as the result of cardio-vascular decease.

Discussion

An ischaemic trophic changes in lower extremities are observed in 10–12% of POAD patients [2, 5, 6, 7]. The

krzywą wynosiła 506,93 AU. Uwagę zwraca fakt, iż u wszystkich chorych w pomiarze drugim, to jest między 48. a 72. godziną podwójnej terapii przeciwplateletowej nie osiągnięto terapeutycznego wyhamowania agregacji płytek krwi (ryc. 1).

ASPI test

U większości analizowanych pacjentów (29 chorych) już w czasie pomiarów wyjściowych stwierdzono zadawalający stopień wyhamowania agregacji płytek krwi na drodze aktywacji szlaku tromboksanowego. Średnia wartość wynosiła 556,35 AU (Norma dla osób nieleczonych kwasem acetylosalicylowym: 790—1410 AU).

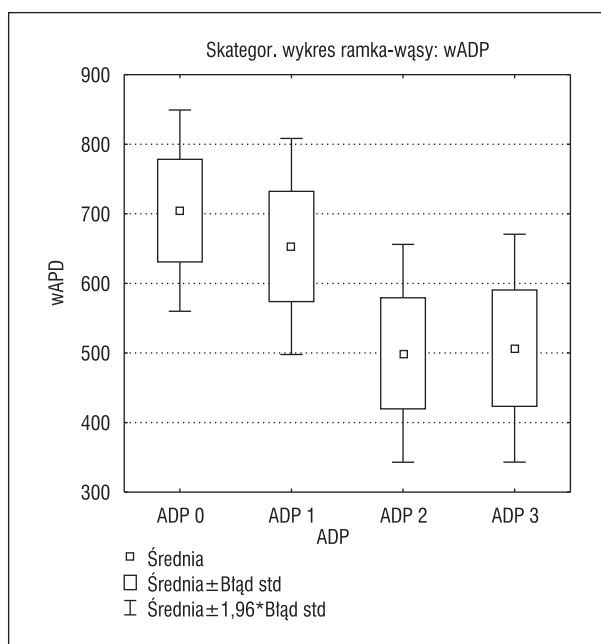
Dodatkowo w czasie kolejnych 2 pomiarów pozabiegowych stwierdzono dalsze pogłębienie się wyhamowania agregacji płytek do wartości 168,62 AU w trzecim pomiarze. Podobnie jak w przypadku receptora dla ADP w czwartym pomiarze stwierdzono istotnie statystycznie osłabienie stopnia wyhamowania agregacji płytek na drodze tego szlaku (290,86 AU) względem poprzednich pomiarów. Różnica ta była istotna statystycznie — $p < 0,006$ (ryc. 2).

W badaniu stwierdzono brak odpowiedzi na podawany clopidogrel, jak i kwas acetylosalicylowy u 4 chorych (ADP/AUC > 548 oraz ASPI/AUC > 790). U jednego pacjenta stwierdzono brak tej odpowiedzi w przedziale terapeutycznym w odniesieniu do clopidogrelu, przy zachowanej prawidłowej odpowiedzi na kwas acetylosalicylowy. Jeden z wyżej wymienionych chorych zmarł w 4 miesiącu leczenia w mechanizmie śmierci sercowo-naczyniowej.

Dyskusja

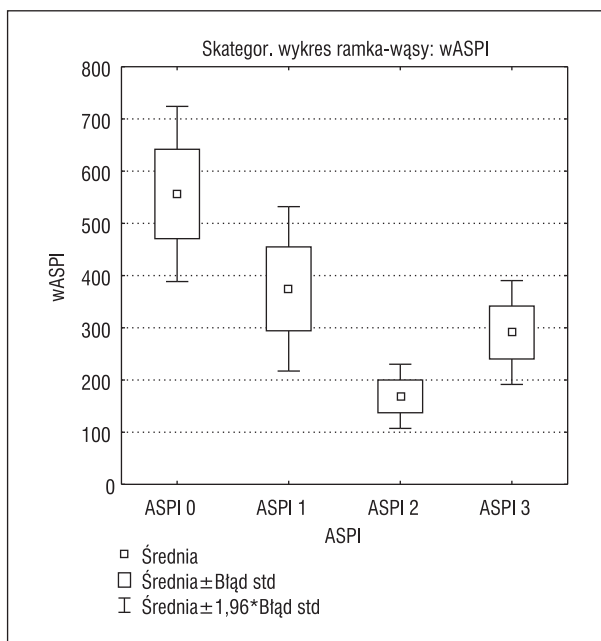
Niedokrwienne zmiany troficzne w przebiegu przewlekłego niedokrwienia dotyczą około 10–12% pacjentów z przewlekłym miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych [2, 5–7]. Standardowym leczeniem — poza amputacją pierwotną kończyny — jest rewaskularyzacja połączona z podawaniem dwóch leków przeciwplateletowych — kwasu acetylosalicylowego i leków blokujących receptor dla fibrynogenu (IIb/IIIa) wraz z leczeniem hipolipemizującym [8, 9]. Pozycja kwasu acetylosalicylowego jest ugruntowana w leczeniu miażdżycy i jak dotąd nie udało się stworzyć innego leku równie skutecznie blokującego syntezę tromboksanu w płytce krwi [10, 11]. Mimo wprowadzenia nowej generacji leków blokujących receptor IIb/IIIa (prasugrel, kangrelol), nie uzyskano znaczącej poprawy wyników leczenia w tej grupie chorych. Do nadal roczna śmiertelność u chorych z niedokrwieniami zmianami troficznymi w obrębie kończyn dolnych waha się na poziomie 25–30%, podobnie jak i odsetek tak zwanych dużych amputacji [12]. Powstaje zatem pytanie: jakie mechanizmy prowadzą do obniżenia skuteczności tego leczenia?

Od wielu lat porusza się kwestę nadreaktywności płytek krwi wywołanej przewlekłym stanem zapalnym [7–9]. Przeprowadzone badanie wydaje się potwierdzać to spostrzeżenie. Zarówno w zakresie blokowania szla-



Rycina 1. Stopień wyhamowania receptora dla ADP w kolejnych pomiarach

Figure. 1 Range of ADP receptor inhibition obtained in the further surveys.



Rycina 2. Stopień wyhamowania szlaku tromboksanowego płytek krwi w kolejnych pomiarach

Figure 2. Range of platelet thromboxane pathway inhibition observed during further measurements

standard procedure — except for the primary amputation — is any revascularization procedure together with dual antiplatelet therapy — acetylsalicylic acid and clopidogrel which causes blockage of receptor for fibrinogen (IIb/IIIa) — together with hypolipidemic treatment [8, 9]. The position of acetylsalicylic acid in the treatment of atheromatic changes is well established and up today

ku tromboksanowego, jak i szlaku związanego z ADP obserwuje się narastający hamujący wpływ wyżej wymienionych leków w okresie pierwszych 30 dni po zabiegu rewaskularyzacyjnym a następnie stopniowy spadek siły wyhamowania agregacji po upływie 3–6 miesięcy leczenia, mimo stosowania stałych dawek leków. Co ciekawe, w przypadku blokowania szlaku tromboksanowego po 3 miesiącach terapii wartości wyhamowania agregacji utrzymywały się poniżej dolnej wartości dla osób zdrowych. Trudno, zatem mówić o pojawianiu się oporności na długotrwałą terapię tym lekiem. W przypadku blokowania agregacji płytek krwi zależnej od ADP u większości z badanych chorych wartości AUC w ostatnim pomiarze oscyływały przy dolnej granicy normy dla osób zdrowych, czyli nieprzyjmujących leków blokujących receptor IIb/IIIa. Powstaje zatem pytanie o skuteczność długotrwałego leczenia clopidogrelem u chorych w IV stopniu niedokrwienia kończyn dolnych.

Przeprowadzone badanie wskazuje na słabnącą w czasie skuteczność terapii lekami blokującymi receptor IIb/IIIa u chorych w IV stopniu niedokrwienia, przy zachowanej skuteczności tego leczenia w odniesieniu do kwasu acetylosalicylowego. Czy obserwowane zjawisko jest wynikiem nasilenia się nadreaktywności płytek krwi czy też wynikiem postępu zmian niedokrwienych w obrębie kończyn prowadzących w efekcie końcowym do amputacji lub zgonu pacjenta — wymaga dalszych badań.

Wnioski

U chorych z miażdżycą zarostową tętnic w IV stopniu niedokrwienia kończyn dolnych, u których w okresie do 3 miesięcy od zabiegu rewaskularyzacyjnego nie dochodzi do wygojenia zmian troficznych obserwuje się zjawisko sukcesywnego obniżania się odpowiedzi na leczenie lekami przeciwplateletowymi — szczególnie w odniesieniu do clopidogrelu.

Piśmiennictwo (References)

1. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996; 88: 907–914.
2. Chakroun T, Gerotziafas GT, Seghatchian J, Samama MM, Hatmi M, Elalamy I. The influence of fibrin polymerization and platelet-mediated contractile forces on citrated whole blood thromboelastography profile. *Thromb Haemost.* 2006; 95: 822–828.
3. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109: 5087–5095.
4. Angiolillo DJ. Variability in responsiveness to oral antiplatelet therapy. *Am J Cardiol.* 2009; 103: 27A–34A.
5. Valles J, Santos MT, Aznar J *et al.* Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release, and recruitment. *Blood* 1991; 78: 154–162.
6. Meadows TA, Bhatt DL. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res.* 2007; 100: 1261–1275.
7. Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol.* 2009; 103: 4A–10A.
8. Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, van der Bom JG, Mertens BJ, Huisman MV. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J.* 2007; 153: 175–181.
9. Eikelboom JW, Hankey GJ, Thom J *et al.* Incomplete inhibition of thromboxane biosynthesis by acetylsalicylic acid: determinants and effect on cardiovascular risk. *Circulation* 2008; 118: 1705–1712.

there was not obtain any new drug similarly effectively blockage thromboxane synthesis in platelets [10, 11]. Despite introduce new drugs which effectively block IIb/IIIa receptor (prasugrel, cangrelol) the significant improvement of treatment result was not obtained in this group of patients. Up today the one year mortality in group of patients who suffer from ischaemic trophic changes in lower extremities is estimated on for 25–30% of cases, similarly to the major amputations [12]. So there is a question: which mechanisms lead to diminution of efficacy this type of treatment?

The chronic inflammatory processes are postulate as the main reason related to platelet hyper-reactivity [7–9]. Our investigations confirm this observation. Both to blockage of ADP receptor activity and thromboxane pathway blockage the magnification of aggregation blockage is observed during first 30 days after revascularization procedure. After then the slowly effect of blockage diminution is observed during next 3–6 month despite the using the same drugs in the same dosages. What is interesting — for acetylsalicylic acid the aggregation blockage was below the lower margin for healthy people. So there is not basis for assertion of platelet resistance improvement during long term ASA therapy. The platelet aggregation blockage related to inhibition of ADP receptor in majority of our patients the value of AUC after 3–6 month dual antiplatelet therapy was located near to the lower margin for healthy people — i.m. to the people who do not received IIb/IIIa receptor blockers. There is a question for the legitimacy of long term clopidogrel treatment for IVth stage ischaemic changes patients?

Our investigation show successive diminution of efficacy for IIb/IIIa blockers for patients in IV stage of limb ischaemia. The efficacy of acetylsalicylic acid in this group of patients was confirmed. There is difficult to answer if the observed phenomenon is related to platelet hyper-reactivity or it is related to progress of ischaemic changes in the end resulted limb amputation. The answer for these questions need further investigations.

Conclusion

In POAD patients with ischaemic changes who after 3–6 months after revascularization procedure present non-healed ulcer the successive diminution of answer for dual anti-platelet therapy is observed — for clopidogrel especially.

10. Savry C, Quinio PH, Bouche O *et al.* Manageability and potential for haemostasis monitoring by near-patient modified thromboelastometer (Rotem) in intensive care unit. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2005; 24: 607–616.
11. Cammerer U, Dietrich T, Rampf SL, Braun W, Richter JA. The predictive value of modified computerized thromboelastography and platelet function analysis for postoperative blood loss in routine cardiac surgery. *Anesth Analg.* 2003; 96: 51–57.
12. Lang T, Bauters A, Braun SL *et al.* Multicentre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16: 301–310.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

dr n. med. Grzegorz Biolik
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach SPSK Nr 7 GCM
ul. Ziołowa 45–47
40–635 Katowice
e-mail: grzegorz.biolik@onet.pl
tel.: 602–194–628

Praca wpłynęła do Redakcji: 17.10.2012 r.