

Rola heparyn drobnocząsteczkowych w indukowaniu powikłań krwotoczno-zakrzepowych u chorych z objawami krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych, poddawanych leczeniu rekonstrukcyjnemu z użyciem pomostów z tworzyw sztucznych

The role of the low molecular weight heparin in thrombotic and bleeding complication occurrence in patients with critical limb ischaemia, qualified to revascularization by the means of an artificial prosthesis

Grzegorz Biolik, Damian Ziaja, Tomasz Urbanek, Krzysztof Ziaja

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

Streszczenie

Podwójna terapia przeciwplateletowa, w połączeniu z podawaniem heparyn drobnocząsteczkowych (LWMH), zwiększa ryzyko powikłań krwotocznych. Przeprowadzone analizy agregometryczna i tromboelastometryczna wykazały brak wpływu LMWH na zaburzenia agregacji płytek krwi oraz nieistotny statystycznie wpływ na właściwości skrzepu krwi badane w tromboelastometrze u chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych.

Chirurgia Polska 2013, 15, 1, 25–32

Słowa kluczowe: agregometria impedancyjna, tromboelastometria, nadreaktywność płytek krwi, krytyczne niedokrwienie kończyn dolnych, pomostowanie omijające, leczenie endowaskularne, ASA, klopidogrel, heparyna drobnocząsteczkowa

Abstract

Double antiplatelet therapy and low molecular weight heparin (LMWH) treatment increases the risk of adverse bleeding events. The performed aggregometric analysis did not reveal any influence of LMWH on platelet aggregation and had a statistically insignificant influence on the clot properties analyzed by the means of the thromboelastometry in patients with critical limb ischaemia.

Chirurgia Polska 2013, 15, 1, 25–32

Key words: impedance aggregometry, thromboelastometry, platelet hyperreactivity, critical limb ischaemia, bypass procedure, endovascular treatment, ASA, clopidogrel, low molecular weight heparin

Wstęp

Krytyczne niedokrwienie kończyn dolnych (CLI, *critical limb ischemia*) dotyczy 1–3% chorych z miażdżycą tętnic obwodowych (POAD). W przypadku braku właściwego leczenia, blisko 20–30% przypadków prowadzi do utraty kończyny lub zgonu w ciągu roku [1, 2]. Zasadniczym, a w większości przypadków jedynym skutecznym

Introduction

From 1% to 3% of patients with peripheral occlusive arterial disease (POAD) suffer from critical limb ischaemia (CLI). About 20–30% of this group will lose an extremity or die within one year if not treated properly [1, 2]. If possible, surgical or endovascular revascularization, which has recently become more common, is the standard method

sposobem postępowania pozostaje rewaskularyzacja. Leczenie farmakologiczne przy braku rewaskularyzacji, zwykle nie jest skuteczne [1, 3]. W wielu przypadkach pacjentów poddawanych rekonstrukcji naczyniowej z powodu krytycznego niedokrwienia kończyn, w szczególności pacjentów po leczeniu wewnątrznaczyniowym, zalecaną formą terapii jest podawanie podwójnej terapii przeciwplatekowej oraz statyn o prawdopodobnym korzystnym działaniu w tej grupie chorych. Najczęściej łączy się podawanie kwasu acetylosalicylowego w dawce 75–325 mg/24 godz. z kłopidogrelem w dawce 75 mg/24 godz. Dawka statyny dobierana jest indywidualnie i modyfikowana na podstawie zmian profilu lipidowego [1].

Większość chorych z objawami CLI należy do grupy średniego lub wysokiego ryzyka żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej (ŻCHZZ) i wymaga zastosowania odpowiedniej profilaktyki. Ponieważ metody fizykalne — kompresjoterapia, jak i masaże pneumatyczne są przeciwwskazane w tej grupie pacjentów, zaś szybkie uruchomienie z powodu troficznych zmian niedokrwienych i niewygojonych ran — często niemożliwe, postępowaniem z wyboru w profilaktyce ŻCHZZ jest podawanie heparyn drobnocząsteczkowych (LMWH, *low molecular weight heparin*) [3, 4]. Dawki LMWH stosowane w tym celu zostały precyzyjnie określone i odpowiadają zwykle aktualnym wytycznym profilaktyki ŻCHZZ. Ponieważ zarówno leki przeciwplatekowe, jak i LMWH w istotny sposób zaburzają krzepnięcie krwi, leczenie to może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem powikłań krwotocznych [1, 3–5].

Celem przeprowadzonego badania była ocena wpływu heparyn drobnocząsteczkowych podawanych profilaktycznie względem ŻCHZZ, na zaburzenia agregacji płytek krwi oraz właściwości skrzepu krwi, u chorych z krytycznym niedokrwieniem kończyn dolnych poddanych leczeniu rewaskularyzacyjnemu.

Material i metody

Badanie przeprowadzono na grupie 29 pacjentów: 26 mężczyzn (89,6%) oraz 3 kobiet (10,4%) w wieku $65 \pm 1,1$ roku, z objawami krytycznego niedokrwienia i zmianami troficznymi kończyn dolnych (Grupa — LMWH). Chorzy zostali zakwalifikowani do pomostowania omijającego w odcinku aortalno-udowym lub udowo-podkolanowym. Chorzy ci od 3. doby po operacji otrzymywali dwa leki przeciwplatekowe (kwas acetylosalicylowy (ASA, *acetylsalicylic acid*) w dawce 1×150 mg/24 godz., kłopidogrel w dawce 1×75 mg/24 godz.), statynę (rosuwastatyna w dawce 10 mg/24 godz.) oraz LMWH (enoksaparyna w dawce 2×40 mg na dobę). Terapia była kontynuowana przez co najmniej 30 dni.

Grupę kontrolną (CLI-K) stanowiło 18 chorych: 15 mężczyzn (83,33%) i 3 kobiety (16,67%) w wieku $61 \pm 7,7$ roku z troficznymi zmianami niedokrwienymi kończyn dolnych, leczonych śródnaczyniowo (PTA lub PTA + stent). Chorzy z grupy kontrolnej byli leczeni dwoma lekami przeciwplatekowymi (kwas acetylosalicylowy w dawce 1×150 mg/24 godz., kłopidogrel w dawce 1×75 mg/24 godz.) oraz statyną (rosuwastatyna w dawce

of care in this patient group. Pharmacological treatment is usually not effective and does not result in proper blood circulation restoration [1–3]. In patients undergoing revascularization procedures, especially those treated endovascularly, double antiplatelet therapy together with the intake of statin is a widely accepted method of treatment and is probably beneficial for this patient group. The oral administration of acetylsalicylic acid (75–325 mg daily) and clopidogrel (75 mg daily) are often the most preferred type of double antiplatelet treatment. Statin dosage is individually modified on the basis of a lipid profile assessment [1].

Due to the presence of various deep vein thrombosis risk factors, the majority of CLI patients are deemed to be at a moderate or high risk of VTE (venous thrombo-embolism) occurrence requiring adequate prophylaxis. Indeed, a possible method of choice for VTE prophylaxis remains the implementation of LMWH prophylaxis. This is because of contraindications for the physical methods of VTE prophylaxis, such as compression stockings or intermittent pneumatic compression, as well as trophic changes and unhealed wounds due to the lack of the possibility of early mobilization. The dosages of LMWH are precisely defined and are continuously modified on the basis of the current consensus regarding VTE prophylaxis. As both double antiplatelet drugs and LMWH seriously influence the blood coagulation system, this type of treatment can be potentially associated with an increased risk of bleeding complications [1, 3–5].

The aim of this study was an assessment of LMWH influence on platelet aggregation and clot properties in patients with CLI undergoing revascularization procedures and VTE prophylaxis by means of low molecular weight heparin.

Material and methods

The study was performed on a group of 29 patients including 26 men (89.6%) and 3 women (10.4%), aged 65 ± 1.1 years, with critical limb ischaemia and trophic changes (group-LMWH). All these patients were qualified to undergo bypass procedures in the aorto-femoral or femoro-popliteal position. All patients received double antiplatelet therapy (acetylsalicylic acid 150 mg daily and clopidogrel 75 mg daily), statin (rosuvastatin 10 mg daily) and LMWH (enoxaparine 0.04 s.c. twice daily) beginning from third postoperative day. Pharmacological treatment was continued at least 30 days after the vascular procedure.

The control group (CLI-K) consisted of 18 patients: 15 men (83.33%) and 3 women (16.67%), aged 61 ± 7.7 years, who were treated endovascularly (PTA or PTA with stent implantation) because of CLI of the lower extremities. Patients from this group received double antiplatelet therapy and statin in the same dosages (acetylsalicylic acid 150 mg daily, clopidogrel 75 mg daily and rosuvastatin 10 mg daily) for 72 hours before the endovascular procedure. This treatment was continued for the next 30 days.

10 mg/24 godz.) przez co najmniej 72 godziny poprzedzające zabieg. Podwójne leczenie przeciwplatekowe było kontynuowane w tej grupie chorych, przez co najmniej 30 dni po zabiegu endowaskularnym.

Badanie reaktywności płytek oraz analiza właściwości skrzepu krwi były przeprowadzone dwukrotnie:

1. w grupie CLI-LMWH: w 5. dobie po operacji, tj. po upływie 48 godzin od rozpoczęcia podwójnego leczenia przeciwplatekowego, oraz po upływie 30 dni od zabiegu rewaskularyzacyjnego;
2. w grupie CLI-K: po upływie 48 godzin od zabiegu endowaskularnego oraz po upływie 30 dni.

Dodatkowo oceniano zmiany stężenia CRP oraz profilu lipidowego w krwi obwodowej. Analizę reaktywności płytek krwi przeprowadzono za pomocą agregometru impedancyjnego Multiplate (Dynabyte Informationssysteme, Monachium, Niemcy) wykorzystującego do badania pełną krew żylną (WBA, *whole blood aggregometry*). Metoda oparta jest na ciągłym pomiarze zmian oporu pomiędzy dwiema elektrodami pomiarowymi, którego wartość jest proporcjonalna do liczby agregujących na elektrodach płytek krwi, pobudzonych swoistym agonistą. Algorytm badania obejmował zmieszanie 300 μ l 0,9% NaCl z 300 μ l pełnej krwi żyłnej, ogrzanych do temperatury 37°C, inkubację przez 180 s, następnie dodanie swoistego agonisty zawartego w 20 μ l roztworu zbuforowanego do pH 7,4. Następnie przez 6 minut oceniano agregację płytek krwi wyrażoną jako pole powierzchni pod krzywą AUC (AUC, *area under the curve*).

Badano zmiany agregacji płytek w odpowiedzi na pobudzenie za pomocą ADP i kwasu arachidonowego, wykorzystując fabrycznie przygotowane testy — ADP-test oraz ASPI-test. Zakresy normy agregacji dla poszczególnych szlaków aktywacji płytki krwi przedstawiono w tabeli I.

Właściwości skrzepu krwi analizowano za pomocą tromboelastometru. Metoda oparta jest na analizie zmian ruchu rotacyjnego sondy wprowadzonej do komory pomiarowej w zakresie 4,75° na skutek zmian oporu stawianego przez tworzący się skrzep krwi. Zmiany te są rejestrowane przez układ optyczny aparatu, a następnie przetwarzane komputerowo i przedstawiane w formie krzywej krzepnięcia krwi. Algorytm badania obejmował wprowadzenie do kuwety pomiarowej 20 μ l odczynnika star-TEM w celu neutralizacji cytrynianu sodowego zawartego w badanej próbce krwi, dodanie 20 μ l odpowiedniego aktywatora układu krzepnięcia (kwasu algilowego) oraz 300 μ l pełnej krwi żyłnej pobranej na 0,109M cytrynian sodowy. Po zmieszaniu kuwetę umieszczano w systemie pomiarowym aparatu i rozpoczynano 20-minutowy

Platelet reactivity and a clot properties analysis was assessed twice in each group:

1. in the CLI-LMWH group — on the fifth day after the operation, meaning 48 hrs after the beginning of the double antiplatelet therapy and 30 days after the procedure
2. in the CLI-K group — 48 hours after the endovascular procedure and 30 days after this treatment

Additionally, the analysis of hs-CRP concentration and lipid profile in the whole venous blood was also performed.

A whole blood aggregometry (WBA) was performed to assess platelet reactivity. In this evaluation, a multi-channel impedance aggregometer multiplate (Dynabyte Informationssysteme, Munich, Germany) was used. The principle method is based on the continuous measurement of changes in resistance recorded by two measuring electrodes which strictly correlate with the number of adhering platelets stimulated by a specific agonist. The measurement procedure was, as follows — a mixture of 300 μ l of 0.9% NaCl with 300 μ l whole vein blood preheated to 37°C, incubation for 180 seconds, followed by the addition of 20 μ l of a specific agonist solution buffered to a pH of 7.4. The aggregation measurement was carried out for 6 minutes, and finally was manifested as the area under the curve (AUC).

For the platelet aggregation analysis, factory-prepared reagents were used: an ASPI-test which contains arachidonic acid and a ADP-test which contains ADP. The normal range of platelet aggregation for a specific agonist stimulation are presented in Table I.

Clot properties were analyzed by using a Roteg tromboelastometry (Rothem® delta Pentapharm GmbH, Germany). The principles of this method are based on analysis of changes in probe rotation movement (range 4.75°) after placing the probe inside the measuring chamber. Changes in clot properties are recorded by an optical system and, after further data processing, are presented graphically as a clot formation curve. The procedure is, as follows: the introduction of 20 μ l of star-TEM into the measuring chamber for neutralization of sodium citrate from a blood sample, followed by the introduction of 20 μ l of specific coagulation activator, and finally the introduction of 300 μ l of whole vein blood. After mixing, the prepared chamber was placed into the measurement system and began 20 minutes of testing. In order to eliminate the influence of heparine on the result obtained in the in-TEM test, 20 μ l of heparinase was additionally added — test hep-TEM.

Tabela I. Zakresy agregacji płytek krwi po stymulacji agonistą
Table I. Ranges of platelet aggregation after agonist stimulation

| Rodzaj aktywatora <i>Activator</i> | Wartości prawidłowej odpowiedzi <i>Proper values of platelet aggregation</i> | Nadreaktywność płytek krwi <i>Platelet hyperreactivity</i> |
|--|---|---|
| ADP | 0–540 | > 541 |
| Kwas arachidonowy/ <i>Arachidonic acid</i> | 0–790 | > 790 |

Legenda: ADP (*adenosine diphosphate*) — difosforan adenozyliny

pomiar. W celu zniesienia wpływu heparyny na wartość wyniku testu in-TEM dodatkowo do kuwety pomiarowej wprowadzano 20 µl heparyny — test hep-TEM. Do badania użyto fabrycznie przygotowane testy:

1. in-TEM — zawierający kwas alligilowy dla oceny układu wewnątrzpochodnego, tj. czynników XII, XI, IX, VIII, X, V, II, I oraz płytek krwi;
2. hep-TEM — dla weryfikacji wyniku testu in-TEM, po wyeliminowaniu wpływu heparyny za pomocą heparyny. W przypadku braku heparyny CT (*clotting time*), jak i MCF (*maximal clot firmness*) przyjmują wartości identyczne, jak w teście in-TEM.

W badaniu oceniano czas tworzenia się skrzepu (CT) oraz maksymalną spójność skrzepu w 20. minucie badania (MCF). Zakresy norm dla testu in-TEM przedstawiono w tabeli II.

Kryterium włączenia dla grupy badanej (CLI-LMWH) oraz grupy kontrolnej (CLI-K) były:

1. bóle spoczynkowe > 2 tygodni;
2. obecność zmian troficznych — suchej martwicy w obrębie stopy;
3. brak kwalifikacji do pierwotnej amputacji kończyny;
4. ABI < 0,2.

Kryteria wykluczenia obejmowały: cukrzycę, przewlekłą chorobę nerek z eGRF < 60 ml/min/1,73 m² powierzchni ciała, zgorzel wilgotną w obrębie kończyny, ciężką niewydolność krążenia NYHA III/NYHA IV (*New York Heart Association*), wątpliwe warunki do rekonstrukcji, niedrożność pomostu naczyniowego w ciągu pierwszych 24 godzin od zakończenia operacji, pomostowanie obwodowe jedynie w celu obniżenia poziomu amputacji, zabiegi hybrydowe, anemię, małopłytkowość lub nadpłytkowość (<100 × 10³/mm³ lub >350 × 10³/mm³), konieczność przetoczenia krwi i preparatów krwiopochodnych.

Metody pobierania krwi do badań

Krew użyta do badań była pobierana w godzinach porannych, z żyły łokciowej, w pozycji siedzącej pacjenta. Krew była pobierana w systemie zamkniętym, do próbek próżniowych DB Vacutainer® (*Becton, Dickinson and Company, USA*) w objętości:

- 2 ml do próbek zawierających heparynę litową w stężeniu 17 j. UFH/1 ml pobranej krwi do badania agregometrycznego;
- 2 ml do próbek zawierających heparynę litową w stężeniu 17 j. UFH/1 ml pobranej krwi do oznaczenia CRP oraz profilu lipidowego;
- 2 ml do próbek zawierających cytrynian sodowy w stężeniu 0,109 M do badania tromboelastometrycznego;
- 2 ml do próbek zawierających K2 EDTA w celu oceny morfologii krwi obwodowej, poziomu leukocytów, poziomu płytek krwi, hemoglobina (Hb), hematokryt (Ht).

Zarówno pomiary agregometryczne, jak i tromboelastometryczne były wykonywane bezpośrednio po pobraniu próbek krwi.

Tabela II. Zakresy dla CT oraz MCF w teście in-TEM
Table II. Ranges for CT and MCF for in-TEM test

| Rodzaj testu/Type of test | CT (s)/CT (s) | MCF [mm]/MCF [mm] |
|---------------------------|---------------|-------------------|
| in-TEM | 100–240 | 50–72 |

For testing, the following commercially-available reagents were used:

1. in-TEM — containing ellagic acid, for the assessment of internal clotting cascade activity, e.g. factors XII, XI, IX, VIII, X, V, II, I and platelets.
2. Hep-TEM — for the verification of in-TEM, following the elimination of the influence of heparin on the obtained results.

In the case of heparin absence in an tested blood sample, the results of Ct and MCF in both tests are similar. For all patients the clotting time (CT) and maximal clot firmness (MCF) after 20 minutes of measurement were assessed. The normal ranges for the in-TEM test are presented in Table II.

The inclusion criteria in both study groups were:

1. rest pain > 2 weeks;
2. presence of trophic changes in lower extremities — e.g. dry gangrene;
3. patient not qualified to undergo primary amputation;
4. ABPI < 0.2.

The exclusion criteria were, as follows: diabetes mellitus, chronic kidney disease with eGRF range of < 60 ml/min/1.73m² of body area, moist gangrene, serious heart failure — NYHA III, NYCHA IV, limited possibilities for performing reconstructive procedures, bypass occlusion during the first 24 hours after surgery, vascular reconstruction performed to lower an amputation level, anaemia, thrombopenia or thrombocytosis (<100 × 10³ /mm³ or > 350 × 10³/mm³), the necessity of blood transfusion or the transfusion of blood-related agents.

Methods for sample blood collection

The blood was collected from the cubital vein, in the morning while the patient was in a sitting position. The samples were collected into closed system, vacuum test tubes — DB Vacutainer® (*Becton, Dickinson and Company, USA*) in the following amounts:

- 2 ml into test tubes containing lithium heparin in a concentration of 17 U/ml of collected blood for aggregometry;
- 2 ml into test tubes containing lithium heparin in a concentration of 17 U/ml of collected blood for assessment of lipid profile and hs-CRP concentration;
- 2 ml into test tubes containing 0.109M sodium citrate for thromboelastometric testing;
- 2 ml into test tubes containing K2 EDTA — for blood count, leucocyte count, platelet count, Hb, Ht.

Both aggregometric and thromboelastometric measurements were performed immediately after blood sample collection.

Tabela III. Dane demograficzne
Table III. Demographic data

| | Grupa CLI-LMWH/Group CLI-LMWH | Grupa CLI-K/Group CLI-K | Wartość p |
|---|---|---|-----------|
| | Średnia ± SD lub No. (%) / Mean ± SD or No. (%) | Średnia ± SD lub No. (%) / Mean ± SD or No. (%) | |
| Liczba pacjentów/ Number of patients | 29 | 18 | |
| Mężczyźni/kobiety/ Men/Women | 26 (89,6%) / 3 (10,4%) | 15 (83,33%) / 3 (16,67%) | NS |
| Wiek (lata)/ Age (years) | 65 ± 1,1 | 61 ± 7,7 | NS |
| BMI [kg/m ²]/ BMI [kg/m ²] | 27,1 ± 3,1 | 26,8 ± 4,8 | NS |
| Nadciśnienie tętnicze /Arterial hypertension | 6 (20,68%) | 9 (50%) | NS |
| Cholesterol całkowity [mg/dl]/Cholesterol [mg/dl] | 192,2 ± 36,29 | 189 ± 22,1 | NS |
| Cholesterol HDL [mg/dl]/HDL Cholesterol [mg/dl] | 45 ± 12,45 | 48,1 ± 16,2 | NS |
| Cholesterol LDL [mg/dl]/LDL cholesterol [mg/dl] | 129,35 ± 31,11 | 121 ± 29,1 | NS |
| Trójglicerydy [mg/dl]/Triglycerides [mg/dl] | 152,66 ± 62,1 | 148 ± 24,2 | NS |
| Leukocyty (×10 ⁶ /ul)/White blood cells ×10 ⁶ /ul | 9,92 ± 1,1 | 10,1 ± 2,2 | NS |
| Erytrocyty (×10 ⁶ /ul)/Red blood cells ×10 ⁶ /ul | 4,89 ± 0,39 | 4,78 ± 0,89 | NS |
| Hemoglobina g/l/Hemoglobin [g/l] | 13,99 ± 0,51 | 14,2 ± 1,22 | NS |
| Hematokryt %/Hematocrit [%] | 44,19 ± 1,9 | 45,12 ± 2,31 | NS |

Analiza statystyczna

Do analizy danych wyjściowych w obu grupach badanych wykorzystano test t-Studenta — w przypadku rozkładu normalnego. W przypadku rozkładu nieprawidłowego posłużono się testem U Manna-Whitneya oraz analizą wariancji Kruskala-Wallis. Dla porównania zależności pomiędzy zmiennymi z pomiaru wyjściowego oraz w 30. dobie po zabiegu naprawczym wykorzystano test Pearsona oraz Kruskala-Wallis. Dla wszystkich testów wartość $p < 0,05$ przyjęto za poziom istotny statystycznie. Do opracowania statystycznego wykorzystano program Statistica 9,0 (StatSoft Inc. USA).

Wyniki

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy obu badanymi grupami w zakresie danych demograficznych, współistniejących chorób, wyników badań laboratoryjnych, jak i farmakoterapii (tab. III). Analiza morfologii i funkcji płytek krwi w pierwszym pomiarze po zabiegu nie wykazała istotnych statystycznie różnic w obu badanych grupach.

W obu badanych grupach nie stwierdzono również nadreaktywności płytek krwi w odpowiedzi na pobudzenie kwasem arachidonowym. Równocześnie w obu grupach, u 23 chorych (79,3%) z grupy badanej oraz 13 (72,2%) z grupy kontrolnej, stwierdzono nadreaktywność płytek krwi w odpowiedzi na pobudzenie ADP. Wartości te nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy obu badanymi grupami. Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic w odniesieniu do CRP oraz profilu lipidowego w obu badanych grupach.

W trakcie pomiarów wykonanych po 30 dniach od zabiegu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w odniesieniu do liczby leukocytów, erytrocytów, stężenia hemoglobiny i hematokrytu w obu badanych grupach. Podobnie jak przy pierwszym pomiarze — nie stwierdzono nadreaktywności płytek krwi w odpowiedzi na

Statistical analysis

In both groups the t-student test was used for normal data distribution as a baseline data analysis. The U-Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used for abnormal data distribution. To compare the relationships between the variables from baseline data and variables carried out on the 30th day after the reconstructive procedure, the Pearson and Kruskal-Wallis tests were used. The value $p < 0.05$ was recognized as significantly significant for all the statistical tests used. In order to carry out a statistical analysis, Statistica 9.0 software (StatSoft Inc. USA) was used.

Results

There were no statistically significant differences between the study groups regarding the demographic data, comorbidities, laboratory test results and pharmacotherapy (Table III). Moreover, the analysis of platelet count and platelet function in the first post-procedure measurement did not reveal statistically significant differences between both investigated groups.

In addition, there was no platelet hyperreactivity measured after arachidonic acid stimulation in both investigated groups. On the other hand, while platelet hyperreactivity related to ADP stimulation was observed in 23 cases (79.3%) from the CLI-LMWH group and 13 patients (72.2%) from the CLI-K group, the values did not differ significantly between the groups. There were also no significant differences in relation to hs-CRP concentration and lipid profile.

In the assessment performed 30 days after the procedure we did not observe any statistically important differences related to leucocyte and erythrocyte numbers, as well as Hb and Ht in both investigated groups. Similarly to the first postoperative measurement, there was also no pathological platelet hyperreactivity after arachidonic acid stimulation. In both groups patholo-

Tabela IV. Agregacja płytek krwi
Table IV. Platelet aggregation

| Agregacja płytek Platelet aggregation | Grupa CLI-LMWH/Group CLI-LMWH | | | Grupa CLI-K/Group CLI-K | | |
|--|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| | D0 średnia ± SD D0 Mean ± SD | D30 średnia ± SD D30 Mean ± SD | Wartość p P value | D0 średnia ± SD D0 Mean ± SD | D30 średnia ± SD D30 Mean ± SD | Wartość p P value |
| ADP > 540 (AUC) ADP > 540 (AUC) | 832,23 ± 199,21 | 837,59 ± 166,02 | NS | 819,11 ± 214,23 | 822,89 ± 254,01 | NS |
| ASPI > 790 (AUC) ASPI > 790 (AUC) | 578,21 ± 378,32 | 553,22 ± 391,12 | NS | 554,8889 ± 435,17 | 542,23 ± 459,11 | NS |

Tabela V. Dane tromboelastometryczne
Table V. Thromboelastometric data

| CT | Grupa CLI-LMWH/Group CLI-LMWH | | | Grupa CLI-K/Group CLI-K | | |
|----------|---|---|----------------------|---|---|----------------------|
| | in-TEM średnia ± SD in-TEM Mean ± SD | hep-TEM średnia ± SD hep-TEM Mean ± SD | Wartość p P value | in-TEM średnia ± SD in-TEM Mean ± SD | hep-TEM średnia ± SD hep-TEM Mean ± SD | Wartość p P value |
| D0 [mm] | 234 ± 14 | 232 ± 16 | NS | 238 ± 11 | 231 ± 17 | NS |
| D30 [mm] | 224 ± 12 | 221 ± 13 | NS | 211 ± 16 | 209 ± 13 | NS |

| MCF | Grupa CLI-LMWH/Group CLI-LMWH | | | Grupa CLI-K/Group CLI-K | | |
|----------|---|---|----------------------|---|---|----------------------|
| | in-TEM średnia ± SD in-TEM Mean ± SD | hep-TEM średnia ± SD hep-TEM Mean ± SD | Wartość p P value | in-TEM średnia ± SD in-TEM Mean ± SD | hep-TEM średnia ± SD hep-TEM Mean ± SD | Wartość p P value |
| D0 [mm] | 64 ± 19 | 64 ± 11 | NS | 67 ± 10 | 65 ± 12 | NS |
| D30 [mm] | 61 ± 17 | 60 ± 19 | NS | 64 ± 16 | 62 ± 18 | NS |

pobudzenie kwasem arachidonowym w obu badanych grupach. W obu badanych grupach utrzymywała się nadal patologiczna reaktywność płytek krwi w odpowiedzi na pobudzenie ADP (tab. IV).

Wartości CT, jak i MCF dla testu in-TEM w obu badanych grupach przyjmowały wartości mieszczące się w przedziale normy dla osób zdrowych (w obu pomiarach). Modyfikacja tego testu za pomocą heparinazy (test hep-TEM) nie zmieniła w istotny statystycznie sposób otrzymanych wyników (tab. V).

W dalszej analizie stwierdzono występowanie słabej korelacji pomiędzy nadreaktywnością płytek krwi w odpowiedzi na pobudzenie ADP, a wartościami CT oraz MCF w teście in-TEM.

Nie stwierdzono występowania korelacji pomiędzy agregacją płytek krwi w odpowiedzi na pobudzenie kwasem arachidonowym a wartościami CT, jak i MCF testu in-TEM.

Dyskusja

Leczenie przeciwplateletowe w istotny sposób zmniejszyło śmiertelność w przebiegu ostrych incydentów wieńcowych i mózgowych [1]. Niestety nie jest do końca leczeniem skutecznym ani bezpiecznym [1, 4, 6]. Podwójna terapia przeciwplateletowa, mimo wielu korzyści, niesie ze sobą ryzyko powikłań krwotocznych na poziomie 1–3% [1, 8]. Dołączenie do terapii kolejnego leku hamującego krzepnięcie krwi, w istotny sposób będzie zwiększać ryzyko wystąpienia powikłań krwotocznych. Dotychczas przeprowadzone analizy tzw. terapii potrójnej (dwa leki przeciwplateletowe + doustny antykoagulant) jednoznacznie wskazują wzrost ryzyka krwawienia i konieczność unikania długotrwałej terapii tego typu. Jak dotąd brak

gical platelet hyperactivity after ADP stimulation was still observed (Table IV).

The CT and MCF values for the in-TEM test were similar in both measurements that is, in the beginning of the procedure and after 30 days thereafter, and were located in the range typical for healthy people. Modification of this test by the addition of heparinase (hep-TEM test) did not have a statistically significant effect on the obtained data (Table V).

A poor correlation between platelet hyperreactivity after ADP stimulation and CT, MCF values in in-TEM test was observed.

Moreover, there was no correlation between platelet aggregation after archidonic acid stimulation and CT, MCF values measured in the in-TEM test.

Discussion

Antiplatelet therapy has significantly reduced mortality after acute heart and brain incidents.¹ However, there are still some doubts concerning the safety of double antiplatelet therapy in clinical settings [1,4, 6]. Despite a large number of benefits, the risk of bleeding related to double antiplatelet therapy remains relatively high (at about 1–3%) [1, 8]. In this situation the implementation of an additional drug blocking the coagulation system can potentially increase the risk of bleeding. Up to now, studies of triple anticoagulation therapy (double antiplatelet therapy and oral anticoagulants — vitamin K antagonist) have clearly shown an increase in the risk of bleeding in this patient group. On the other hand, there are limited data about potential bleeding complications of dual antiplatelet therapy provided together with LMWH.

jest doniesień na temat powikłań podwójnej terapii przeciwplateletowej w skojarzeniu przewlekłym z podawaniem heparyn drobnocząsteczkowych.

Związek pomiędzy negatywnym oddziaływaniem heparyn drobnocząsteczkowych, a płytkami krwi wyraża się w powstawaniu swoistych przeciwciał w klasach IgG oraz IgM skierowanych przeciwko receptorom PF4 na powierzchni płytki krwi [7, 8]. W wyniku reakcji immunologicznej dochodzi do niszczenia płytek krwi, co przekłada się bezpośrednio na ich poziom w krwi obwodowej [7, 8]. O ile przeciwciała w klasie IgM można stwierdzić blisko u 1/2 leczonych za pomocą LMWH, o tyle występowanie przeciwciał w klasie IgG jest wielokrotnie rzadsze, tj. na poziomie 0,2–1% leczonych, i nie zawsze prowadzi do niszczenia płytek krwi [7, 8]. Poza opisanym i wspomnianym powyżej zjawiskiem trombocytopenii indukowanej podawaniem heparyny, w dostępnym piśmiennictwie brak jest jednak nadal danych dotyczących ewentualnego związku pomiędzy nadreaktywnością płytek krwi a potencjalnym innym negatywnym oddziaływaniem LMWH na płytkę krwi. Przeprowadzona analiza wykazała występowanie patologicznie wysokiej agregacji płytek krwi pod wpływem stymulacji ADP u ponad 70% chorych w obu grupach badanych. Trudno oszacować, czy jest to wynik samej choroby — niedokrwienia obwodowego, czy też wpływ innych czynników, na przykład przewlekłego stanu zapalnego. Przeprowadzona analiza nie wykazała korelacji pomiędzy poziomem hs-CRP, a nadreaktywnością płytek krwi w odpowiedzi na pobudzenie za pomocą ADP.

W przeprowadzonym doświadczeniu wykazano również słabą korelację pomiędzy nadreaktywnością płytek krwi w odpowiedzi na ADP a testem in-TEM. Być może jest to wynik oddziaływania innych niż ADP aktywatorów w teście in-TEM na płytkę krwi, a w związku z tym z odmiennym nasileniem agregacji i aktywacji płytki krwi.

Bardzo ciekawym zjawiskiem jest dobra odpowiedź na leczenie kwasem acetylosalicylowym w obu badanych grupach — u żadnego z chorych nie stwierdzono patologicznej agregacji płytek krwi pod wpływem kwasu arachidonowego zarówno w pierwszym pomiarze po zabiegu, jak i po 30 dobach leczenia. Potwierdza to skuteczność ASA w blokowaniu płytki krwi [4, 5, 7]. Niestety zablokowanie tylko jednego z kilku możliwych szlaków aktywacji płytki krwi jest niewystarczające, o czym świadczy duża liczba przypadków nadreaktywności płytek krwi w odpowiedzi na pobudzenie ADP w obu badanych grupach.

Od kilku lat poruszany jest problem nadreaktywności płytek krwi w czasie leczenia tienopyrydynami, jak i nasilenie tego zjawiska w ciągu pierwszych 30 dni po zakończeniu leczenia tymi lekami [5, 6]. Z pewnością mają na to wpływ czynniki konstytucyjne oraz uwarunkowana predyspozycja genetyczna [6, 8]. Nie opracowano — jak dotąd — standardów postępowania dla leczenia tego typu powikłań.

Wykazany w badaniu brak istotnych różnic pomiędzy obu badanymi grupami, w zakresie agregometrii i w wynikach testów in-TEM oraz hep-TEM wskazują, że LMWH nie wywierają bezpośredniego wpływu na funkcje płytek krwi, nawet w przypadku występowania nadreaktywności płytek krwi.

The negative interactions between platelets and LMWH are manifested by the production of specific antibodies against PF4 (platelet factor 4) receptors located on the platelet surface. [7, 8]. In this situation, due to immunological interaction, platelet activation and damage can be observed, leading to a decrease in the total platelet number [7, 8]. Moreover, although IgM antibodies are observed in a quarter of cases of LMWH treated patients, they are rarely presented (from 0.2 to 1% of treated patients) and their presence is not always related to immunological platelet damage [7, 8]. Except regarding the above-mentioned heparin induced thrombocytopenia, there are still no data available concerning platelet hyperreactivity and any other potential negative influence of LMWH on platelets. The performed analysis revealed pathological high platelet aggregation in near 70% of treated patients after ADP stimulation, as well as in the LMWH-taking group. It is difficult to confirm whether this process is related to poor peripheral blood supply or whether it is related to other factors such as chronic inflammatory reaction. The performed analysis did not reveal any correlation between hs-CRP concentration and platelet hyperreactivity after ADP stimulation. There was also a poor correlation between platelet hyperreactivity after ADP stimulation and in-TEM test values. This observation can be related to the potential activity of clotting activators other than ADP in the in-TEM test, as well as different activation and aggregation of platelets. An important observation concerning the patients included in the study, is the confirmation of good platelet response to acetylsalicylic acid treatment in both investigated groups. No cases of pathologically high platelet aggregation relating to arachidonic acid were found postoperatively, as well as 30 days after procedure, in either group. These findings confirm the evidence of the efficacy of acetylsalicylic acid in platelet blockage [4, 5, 7]. Unfortunately, the blockage of the single platelet activation way can turn out to be ineffective, which was documented by the high platelet hyperreactivity after ADP stimulation in the same group of investigated patients. In the recent years, the problem of platelet hyperreactivity during thienopyridine treatment, as well as their hyperreactivity during the first 30 days after their administration has been discontinued, has been widely discussed [5, 6]. Indeed, this could be at least partially related to the presence of some constitutional factors and one's genetic predisposition [6, 8]. Up to now, no standards concerning this clinically very risky situation has been described. Moreover, the absence of the statistically significant differences in aggregometric results and in the in-TEM, as well as in hep-TEM tests, clearly suggest that LMWH administration (in the proposed doses) do not influence platelet function, even when platelet hyperreactivity is observed.

Conclusion

The addition of LMWH to standard double platelet therapy does not influence platelet aggregation function.

Wniosek

Różnoczasowe podawanie LMWH z dwoma lekami przeciwplatetkowymi nie wywiera wpływu na zaburzenia agregacji płytek krwi.

Piśmiennictwo (References)

1. Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G on behalf of American College of Chest Physicians. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th ed.). Chest 2008; 133 (suppl. 6): 199S–233S.
2. Kuliczkowski W, Witkowski A, Polonski L *et al.* Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on Antiplatelet Drugs Resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. Eur Heart J. 2009; 30: 426–35.
3. 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 inter-vention: Is the current antiplatelet therapy adequate? J Am Coll Cardiol. 2007; 49: 657–666.
4. Angiolillo DJ, Costa MA, Shoemaker SB *et al.* Functional effects of high clopidogrel maintenance dosing in patients with inadequate platelet inhibition on standard dose treatment. Am J Cardiol. 2008; 101: 440–445.
5. Hobson AR, Qureshi Z, Banks P, Curzen N.P. Effects of clopidogrel on „aspirin specific” pathways of platelet inhibition. Platelets 2009; 20: 386–390.
6. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. J Clin Invest. 2005; 115: 3355–3362.
7. Jackson SP, Schoenwaelder SM. Antiplatelet therapy: in search of the magic bullet. Nat Rev Drug Discov. 2003; 2: 775–789.
8. Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum. Nat Rev Immunol. 2011; 11: 264–274.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

Dr n. med. Grzegorz Biolik
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Ziolowa 45/47, 40–635 Katowice

Praca wpłynęła do Redakcji: 20.04.2013 r.