



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Зоран Јовић

Агрегабилност тромбоцита и активност антикоагулантних протеина током стрес ехокардиографије са добутамином код асимптоматских пацијената четири месеца након перкутане коронарне интервенције

докторска дисертација

Ментор др сци. мед. проф. др Слободан Обрадовић, редовни професор

Крагујевац, 2017.

Скраћенице

AA	– арахидонска киселина (<i>Arachidonic Acid</i>)
ADP (АДП)	– <i>adenosine diphosphate</i> (receptor)
АКС	– акутни коронарни синдром
ASA	– ацетилсалицилна киселина
ARU	– јединица за реакцију аспирина (<i>Aspirin Reaction Unit</i>)
aPC	– активирани протеин Ц
АТР	– <i>Adenosine triphosphate</i>
АТ	– антитромбин
BMS	– обичан метални стент (<i>bare metal stent</i>)
EDTA	– етилен диамин тетра сирћетна киселина
cAMP	– циклични аденозин монофосфат
cGMP	– циклични гуанозин монофосфат
САД	– сједињене америчке државе
С	– колаген
CPA	– <i>Cone and Plate(Let) Analyzer</i>
СТ	– време коагулације (<i>Coagulation Time</i>)
COX	– циклооксигеназа (<i>Cyclooxygenase</i>)
CLASSICS	– студија - <i>Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study</i>
CREDO	– студија - <i>Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation</i>
CURE	– студија - <i>The Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events</i>
ЦП	– цитометријски проток
DAPT	– двојна антиагрегациона терапија (<i>Dual AntiPlatelet Therapy</i>)
DES	– стент са леком (<i>drug eluting stent</i>)
DSE (ДСЕ)	– добутамин стрес ехокардиографија
LVEF	– ејекциона фракција леве коморе (<i>Left Ventricular Ejection Fraction</i>)
ЕПИ (ЕПИ)	– епинефрин
ЕКГ	– електрокардиограм
EGF	– епидермални фактор раста (<i>Epidermal growth factor</i>)
GTT	– глобални тромбоцитни тест
ГП	– гликопротеин (<i>Glycoprotein</i>)
ИБС	– исхемијска болест срца
ИАП	– индивидуални анаеробни праг
ICAM	– Интрацелуларни адхезиони молекул (<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>)
ИМПАСТ	– (<i>Image Analysis Monitoring Platelet Adhesion Cone and Plate Technology</i>)
ИМ	– инфаркт миокарда
IQR	– интер-квартални опсег
IVUS	– интраваскуларни ултразвук

GP (ГП)	– гликопротеин
MACE	– нежељени срчани догађаји (<i>Major Adverse Cardiac Events</i>)
MEA	– агрегометрија мултиплих електрода (<i>Multiple Electrode Aggregometry</i>)
PSGL	– P-selectin гликопротеин лиганд
NO	– азот оксид
n	– број пацијената
PAR-1	– протеаза-активирани рецептор-1
PECAM	– Тромбоцитни молекул за адхезију ендотелних ћелија (<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
PCI (ПКИ)	– перкутана коронарна интервенција (<i>Percutaneous Coronary Intervention</i>)
POBA	– балон ангиопластика (<i>Plain Old Balloon Angioplasty</i>)
PPP	– плазма сиромашна тромбоцитима (<i>Platelet-Poor Plasma</i>)
PRP	– плазма богата тромбоцитима (<i>Platelet-Rich Plasma</i>)
PTCA	– перкутана транслуминална балон ангиопластика
PET	– позитронска емисиона томографија
PGI ₂	– простаглицин
PAR	– протеаза активирани рецептор (<i>Protease Activated Receptor</i>)
PRU	– P2Y ₁₂ јединица за реакцију (<i>P2Y₁₂ Reaction Unit</i>)
SIN-1	– linsidomine
SPSS	– <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SPECT	– <i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>
TXA ₂	– тромбоксан А ₂ (<i>Thromboxane A₂</i>)
TXB ₂	– тромбоксан В ₂ (<i>Thromboxane B₂</i>)
LTA	– <i>Light Transmission Platelet Aggregometry</i>
LAD	– предња десцендентна артерија (<i>Left Anterior Descending</i>)
PAU	– <i>Platelet Aggregation Unit</i>
PFA	– <i>Platelet Function Analyzer</i>
POCT	– <i>Point of Care Test</i>
PC	– протеин Ц
PGG ₂ (H ₂)	– простаглицин G ₂ (H ₂)
PLA ₂	– фосфолипаза А ₂
PLATO	– студија - <i>Platelet Inhibition and Patient Outcomes</i>
ROTEM	– тромбоеластометрија
ST	– сегмент у електрокардиограму
TEG	– тромбоеластографија
TRAP	– пептид активан тромбин рецептором (<i>Thrombin Receptor Activating Peptide</i>)
vWF	– <i>von Willebrand factor</i>
WMSI	– индекс покретљивости зиова леве срчане коморе (<i>Wall Motion Score Index</i>)
WBA	– агрегометрија отпором пуне крви (<i>Impedance Whole Blood Aggregometry</i>)

САДРЖАЈ

УВОД	6
1.1. Тромбоцити	6
1.1.1. Тромбоцитни рецептори	8
1.1.1.1. Интегрини	9
1.1.1.2. Леуцином богати рецептори	10
1.1.1.3. Селектини	10
1.1.1.4. Рецептори имуноглобулинског типа	10
1.1.1.5. Седам трансмембранских рецептора.....	10
1.1.2. Агрегабилност тромбоцита	11
1.1.3. Тестови функције тромбоцита	16
1.1.3.1. Тестови базирани на агрегацији тромбоцита	17
1.1.3.2. Тестови базирани на адхезији тромбоцита под дејством стреса на зид крвног суда.....	21
1.1.3.3. Методе функционисања тромбоцита са вискоеластичним тестом.....	22
1.1.3.4. Анализе тромбоцита базирани на цитометријском протоку	22
1.1.3.5. Испитивање метаболита тромбосана	23
1.2. Антикоагулантни протеини	24
1.2.1. Протеин С.....	24
1.2.2. Антитромбин.....	24
1.3. Патогенеза акутног исхемијског догађаја	25
1.4. Физичка активност и агрегабилност тромбоцита	28
1.4.1. Интензитет физичког вежбања и тестови оптерећења.....	32
1.4.1.1. Тестови физичког оптерећења	32
1.4.1.2. Фармаколошки стрес тестови	35
1.5. Перкутане коронарне интервенције и антитромбоцитна терапија.....	38
1.5.1. Коронарни стентови	43
1.4.2. Антитромбоцитна терапија	50
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ	55
2.1. Главни циљеви испитивања.....	55
2.2. Радне хипотезе испитивања	55
3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ	56

3.1. Општи дизајн студије: клиничка проспективна, дијагностичко фундаментална студија.....	56
3.1.1. Испитаници.....	56
3.1.2. Хемостатски параметри.....	56
3.1.3. Добутамин стрес ехокардиографија.....	57
3.1.4. Статистичка обрада података.....	58
4. РЕЗУЛТАТИ	58
5. ДИСКУСИЈА	68
6. ЗАКЉУЧАК	72
ЛИТЕРАТУРА	73
ПРИЛОГ 1	97

УВОД

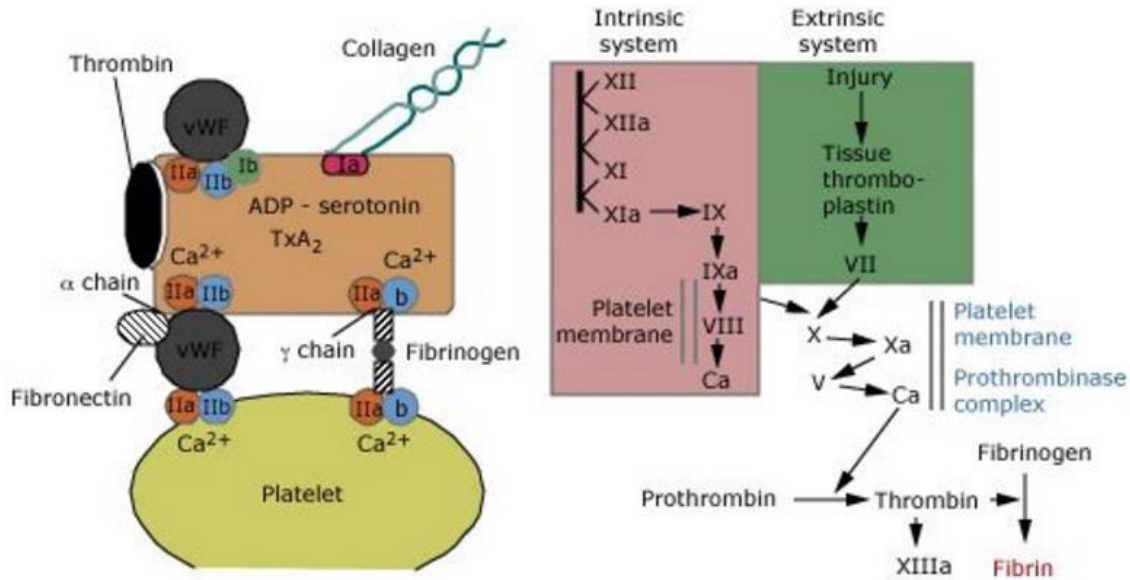
Последњих неколико деценија, исхемијска болест срца (ИБС) представља најчешћи узрок морбидитета и морталитета у развијеном свету. Иако је стопа морталитета од ИБС опала последњих четири деценија свуда у свету, она је и даље одговорна за трећину свих смрти код болесника старијих од 35 година.^{1,2} Битан фактор у настанку болести и компликација током перкутаних коронарних интервенција, представља агрегабилност тромбоцита, промене параметара хемостазе као и резистенција на антиагрегациону терапију.³⁻⁷ Агрегација тромбоцита и процес активације хемостазе током исхемије миокарда у склопу физичког или менталног стреса може бити важан фактор тромбозе стента након перкутане коронарне интервенције.⁴

1.1. Тромбоцити

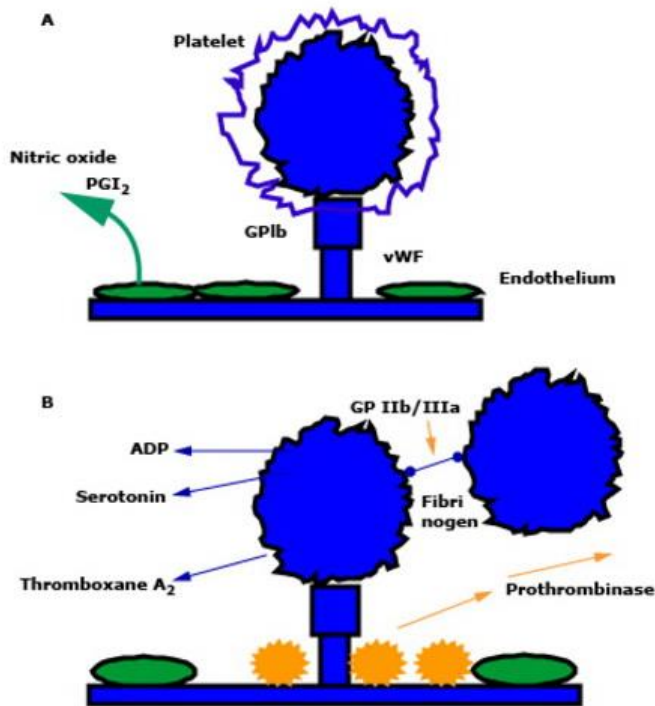
Тромбоцити играју важну улогу у кардиоваскуларним болестима, како и у патогенези атеросклерозе и развоју акутних тромботичких догађаја. Њихов значај у развоју коронарне болести индиректно потврђује корист употребе антиромботичких лекова (посебно аспирина, клопидогрела и инхибитори гликопротеинских рецептора П₂/У₁а) у овим поремећајима. Тромбоцити су не-нуклеарне ћелије, овалне или округле плочице пречника око 2 μм, који настају фрагментацијом мегакариоцита у коштаном сржи, јетри, слезини и плућима, одакле се отпуштају у крвоток где их има око 200.000 до 400.000 по микролитру крви. Најзначајнија физиолошка функција тромбоцита јесте активно учествовање у свим фазама хемостазе и то како физичко хемијским процесима, тако и ослобађањем и активношћу посебних тромбоцитних чинилаца. Поред тога, они имају улогу и у процесима одржавања интегритета ендотела, фагоцитозе, детоксикације организма и транспорту материја.^{5,8} Тромбоцити играју пресудну улогу у васкуларном одговору на повреду и активација тромбоцита је одавно призната као важан корак. Тромбоцити ослобађају густе грануле који садрже нуклеотид аденозин дифосфат (АДП), који активира друге тромбоците. Такође поседују алфа грануле, које садрже протеине и протеине медијаторе (нпр. тромбоцитни фактор раста, тромбоцитни фактор 4) који су укључени у инфлаторне процесе.⁹ Они играју и кључну улогу у патофизиологији тромбозе

после руптуре плака. Оба пута оштећења интима крвног суда, површни и дубоки, доводе до оштећења ендотела, који обично спречава агрегацију тромбоцита производњом средства против коагулације крви, азот монооксида и простаглицина. Оштећење ендотела такође открива колаген. Површина тромбоцита је превучена са стотинама хиљада рецептора за друге ћелије, укључујући активирание васкуларне ћелије ендотела и екстрацелуларне матричне протеине. Тромбоцити поседују афинитет за агрегабилност, посебно за повређени део крвног суда, где ослобађају садржај њихових гранула, а затим се слепљују. Ова својства промовишу учешће тромбоцита у многим васкуларним процесима, укључујући акутни коронарни синдром. Фактори који се ослобађају приликом ових процеса доводе до агрегације тромбоцита у субендотелиуму, како директно тако и преко von Willebrand-овог фактора, а потом и до активације тромбоцита (слика 1 и слика 2).^{9, 12}

Слика 1. ПUTEVI активације тромбоцита



Слика 2. Механизми активације тромбоцита са оштећењем крвног суда

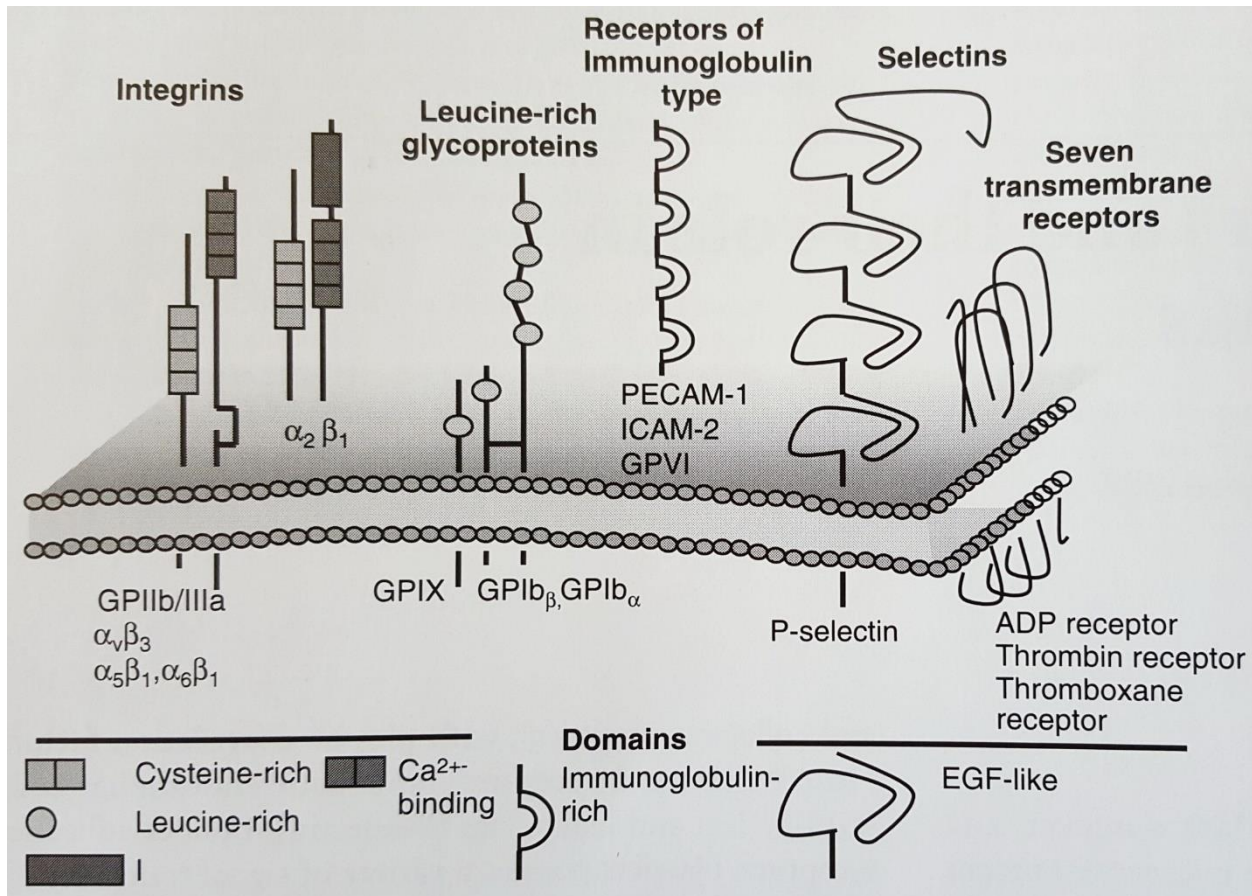


1.1.1. Тромбоцитни рецептори

Механизам хемостазе и тромбозе захтева узајамно дејство између тромбоцита, ендотела, плазма коагулационих фактора и структуре зида крвног суда (екстрацелуларни матрикс). Процес адхезије, који је регулисан од стране бројних специфичних адхезионих рецептора, игра главну улогу у овим механизмима. Тромбоцити врше експресију гликопротеина (GP) на њиховим мембранама што доводи до међусобне интеракције тромбоцита (GPIb/IIIa) као и интеракције са субендотелним матриксом (рецептори von Willebrand-овог фактора и колаген рецептори), плазма коагулационим факторима (von Willebrand рецептор), ендотелијалним ћелијама (GPIb/IIIa) и леукоцитима (P-selectin). Поред адхезије рецептора тромбоцити поседују различите рецепторе за пренос сигнала који првенствено реагују на солубилне агонисте као што је аденозин дифосфат (АДП) и тромбин, и имају велику улогу у процесу активације тромбоцита.¹⁰

Рецептори тромбоцитне адхезије су класификовани у четири групе у зависности од карактеристика њихових молекуларних структура: интегрини, леуцином богати гликопротеини, селектини и рецептори имуноглобулинског типа (слика 3).¹¹

Слика 3. Рецептори централне мембране тромбоцита укључени у процес тромбозе



1.1.1.1. Интегрини

Интегрини су адхезиони рецептори који повезују структуре цитоскелета са екстрацелуларним матриксом.¹² Они су нековалентни повезани хетеродимери који су састављени од α и β подјединица и који интерагују са великим бројем гликопротеина (нпр. колаген, фибронектин, фибриноген, ламинин, тромбоспондин, витронектин и vWF), учествују у процесу агрегације тромбоцита и доприносе диференцијацији и развоју ткива. Пет различитих интегрини је описано на тромбоцитима: три β₁ класе и два β₃ класе. β₁ и β₃

интегрини препознају аргинин-глицин-аспартат секвенцу аминокиселина, секвенцу која је пронађена у екстрацелуларном матриксу протеина, укључујући фибриноген.

1.1.1.2. Леуцином богати рецептори

Леуцин фамилија рецептора је представљена на тромбоцитима од стране GPIb/IX/V комплекса, другим најчешћим рецептором на тромбоцитима (након α IIb β 3 интегрин). Леуцин формира адхезиони комплекс са vWF и игра централну улогу у примарној хемостази. Упркос јаким ударним силама које постоје у артеријском протоку, способан је да успостави чврст контакт са vWF имобилизованог у фибрилима колагена. Његово одсуство или недостатак узрокује Bernard-Soulier синдром, други најчешћи поремећај крварења повезан са тромбоцитним рецептором.

1.1.1.3. Селектини

Селектини представљају значајну групу адхезионих рецептора који се налазе на тромбоцитима (P-selectin), ендотелу (E и P-selectin) и лимфоцитима (L-selectin). Пратећи активацију тромбоцита, P-selectin се брзо ослобађа и истиче на површини. Интегрини у више наврата посредују пролазне слабе интеракције са лигандима, тиме олакшавајући успостављање стабилних веза преко других рецептора који су укључени.

1.1.1.4. Рецептори имуноглобулинског типа

Улога фамилије рецептора имуноглобулинског типа је тренутно у фази интензивног испитивања. Поред интрацелуларне адхезионе молекуле 2 (ICAM-2) и тромбоцитне ендотелне адхезионе ћелијске молекуле 1 (PECAM-1), који су укључени у процес интеракције тромбоцита са леукоцитима, GPVI, један од два велика тромбоцитна колаген рецептора, је препознат да игра централну улогу у функцији тромбоцита и може бити потенцијални терапијски циљ за кардиоваскуларне болести.^{13,14}

1.1.1.5. Седам трансмембранских рецептора

Велику фамилију рецептора агониста представљају седам трансмембранских рецептора, укључујући рецепторе тромбина, фамилију простагландинских рецептора и АДП рецепторе. Везујући се за тромбин, тромбоцити могу бити активирани преко G-протеин-повезаног пута. Активација тромбоцита преко АДП рецептора игра кључну улогу у развоју и патогенези атеротромбозе, и због тога су ови механизми од посебног

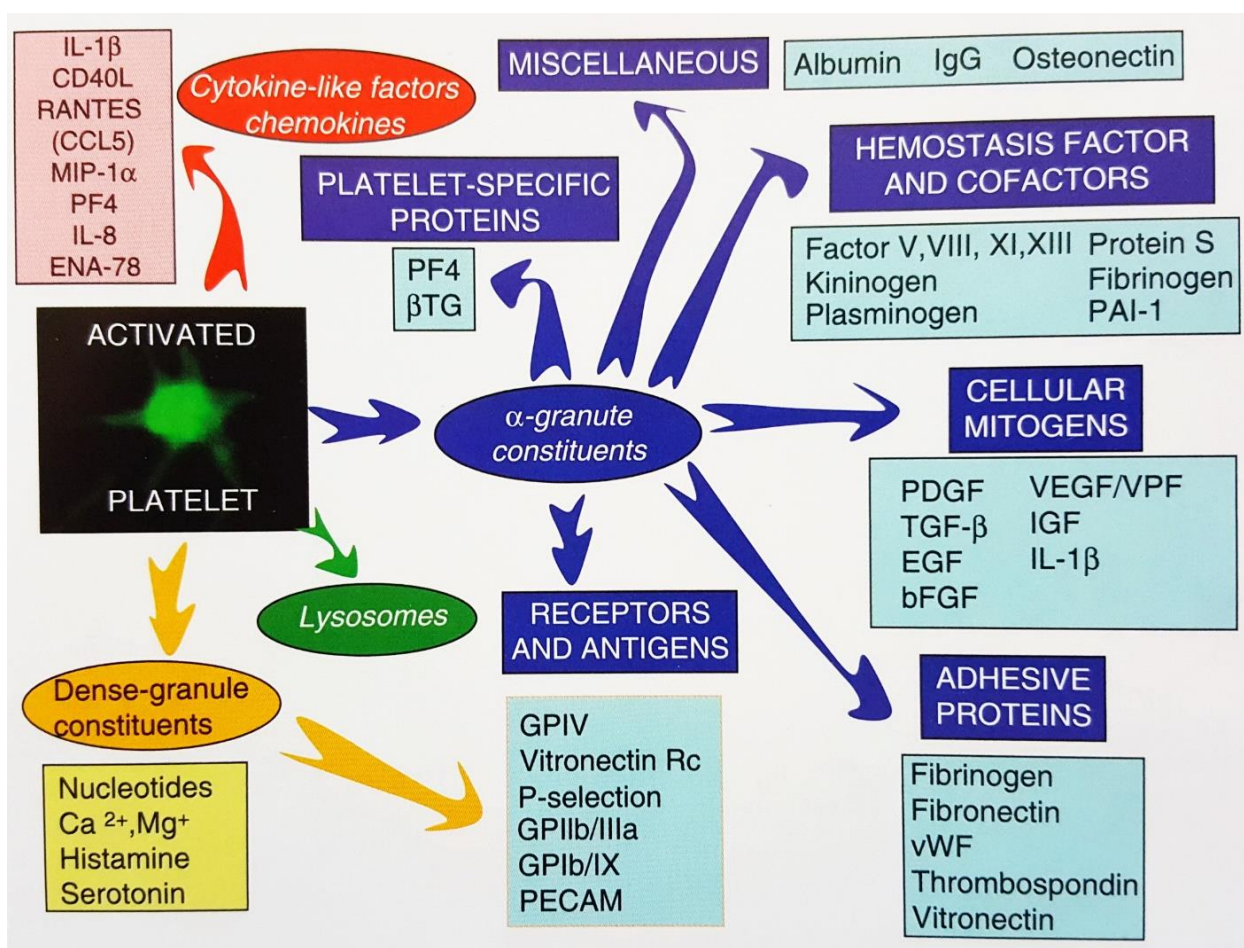
фармаколошког и медицинског значаја.¹⁵ Тромбоцити су тренутно једине ћелије познате по томе што могу да експримирају АДП специфичне пуриноцепторе, укључујући P2Y₁ и P2Y₁₂ рецепторе.

1.1.2. Агрегабилност тромбоцита

У последњих десетак и више година, учешће поремећене функције тромбоцита препознато је у патогенези клиничких компликација од атеросклерозе. Агрегација и активација тромбоцита играју кључну улогу у акутним болестима коронарне артерије, инфаркту миокарда, нестабилној ангини и možданом удару. Осим тога, абнормална агрегација и активација тромбоцита је основна за патогенезу хемостазе крви и артеријске тромбозе. Тромбоцити могу бити абнормални било квантитативно (превише или премало) или квалитативно (тачан број, али дисфункционалан). Артеријска тромбоза укључује три основна пута: активацију тромбоцита и агрегацију, коагулацију крви са формирањем фибрина и фибринолизом. Активација тромбоцита и коагулација крви су комплементарни, међусобно зависни процеси у хемостази и тромбози.¹⁶ Тромбоцити узајамно делују са неколико различитих фактора коагулације, док је производ коагулације тромбин, потентни агониста активације тромбоцита.^{11,16} Такође, упални процеси могу погоршати процес атеротромбозе. Ендотел крвног суда представља динамички аутокрини и паракрини орган који регулише контрактилну, секреторну и митогену активност у зиду крвног суда и хемостатске процесе у лумену крвног суда производећи неколико локалних активних супстанци. У физиолошким условима, ендотелне ћелије показују антитромботична својства као што су (а) излагање негативно наелектрисаних хепарину сличних гликозаминогликана и неутралних фосфолипида на спољашњој страни ћелијске мембране; (б) синтеза, излагање или секреција инхибитора тромбоцита (простациклин, азот оксид, и екто-АДПаза), инхибитора коагулације (тромбомодулин, протеин S, инхибитор ћелијског фактора и гликозаминогликана) и активатора фибринолизе (ћелијски тип плазминоген активатора и урокиназа тип плазминоген активатора).^{11,17} Адхезија тромбоцита је узрокована везивањем тромбоцитних рецептора за одређени број рецептора на зиду артерија, укључујући субендотелни колаген, von Willebrand-ов фактор и фибриноген. Под условима високе учесталости, циркулишући von Willebrand-ов фактор такође може узајамно деловати са изложеним колагеном, обезбеђујући даљу подлогу за адхезију

тромбоцита. Осим тромбоцитних рецептора, мембране тромбоцита, укључујући и фосфолипиде који играју кључну улогу у функцији тромбоцита јер делују као секундарни месенџери и као кофактори тромбоцитне прокоагулантне активности. Тромбоцитни цитосол је углавном изграђен од комплексног мембранског система, цитоскелетне структуре (микротубули и микрофиламенти) и гранула (густе грануле, α -грануле и лизозоми) од којих су све активно укључене у процес формирања тромба.

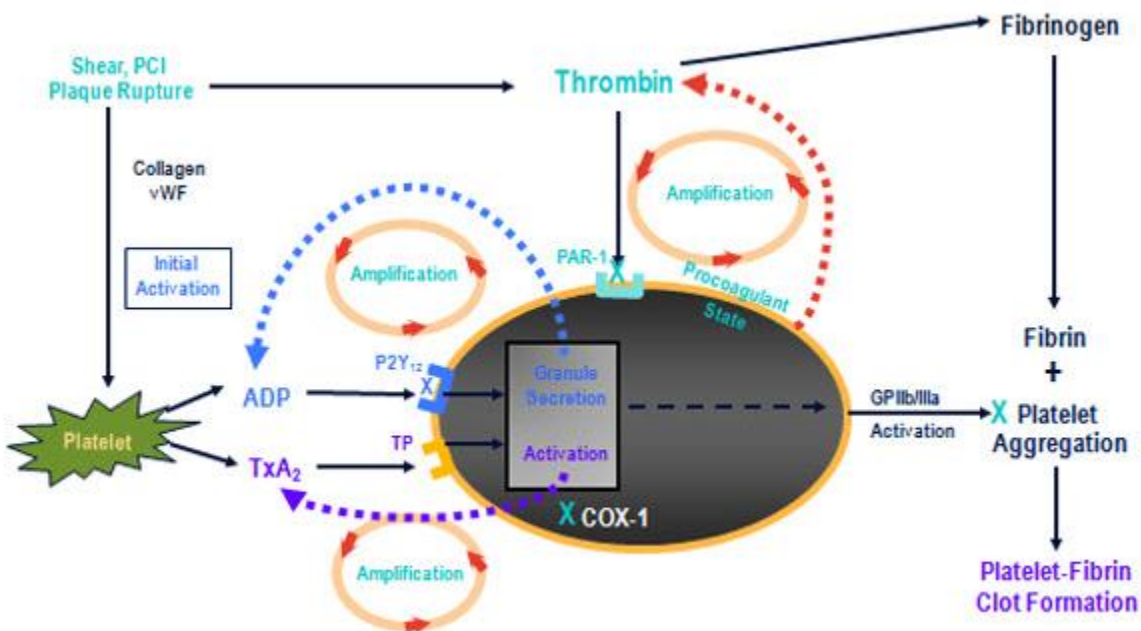
Слика 4. Улога тромбоцита у процесу формирања тромба



Цитоскелетне структуре су најзначајније у промени облика након активације, пошто грануле садрже активне компоненте које су ослобођене након активације тромбоцита, што поспешује формирање тромба, прогресију атеросклеротског плака (на пр. локално ослобађање фактора раста) и сам запаљенски процес (слика 4).¹¹

Тромбоцити постоје у неактивираним стању и пасивно су доведени у области васкуларне повреде. На почетку, они се придржавају протеина као што је von Willebrand-ов фактор, који представља велики екстрацелуларни матрични протеин који је произведен од стране ендотелних ћелија. Тромбоцитни гликопротеин Ib/IX/V се везује за von Willebrand-ов фактор, формирајући лабаву асоцијацију што доводи до тога да се тромбоцити гомилају на површини зида крвног суда. Као мултимер, von Willebrand-ов фактор постоји у једној подјединици која је димеризована и затим полимеризована, што га чини идеалним подлогом за тромбоците због више супстрата на које се тромбоцити могу држати.⁹ Везивање тромбоцита на ове структурне протеине, у садејству са солубилним, рецептором посредованим стимулансима, као што је тромбин, аденозин дифосфат (ADP) и тромбоксан А₂ (ТхА₂), изазива активацију тромбоцита који имају централну улогу у процесу стварања тромба (слика 5).¹⁹ Процес тромбозе подразумева мобилизацију

Слика 5. Процес активације тромбоцита.



калцијума из међућелијских складишта, активирање неколико интрацелуларних киназа, као и ослобађање арахидонске киселине из мембранских фосфолипида, што доводи до

стварања TxA_2 . Активација тромбоцита у условима *in vivo* је појачана циркулишућим катехоламинима. До агрегације тромбоцита долази након конверзије Пб/Ша рецептора у облик који може везати адхезивне протеине. Овај процес је обично супротан процесу секреције азот оксида и простациклина (PGI_2), који представљају други производ метаболизма арахидонске киселине, из васкуларног ендотела. Тромбоцити се онда ангажују кроз рецепторе за колаген (тј. гликопротеин Ia/IIa или интегрин $\alpha_2\beta_1$) и гликопротеин VI, што доводи до интрацелуларне сигнализације и активације тромбоцита. Активација тромбоцита је праћена јаком адхезијом захваљујући ангажовању другог интегрина, рецептора $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (гликопротеин Пб/Ша), на тромбоцитне површине за фибриноген. Гликопротеин Пб/Ша рецептор је укључен у хомотипску интеракцију тромбоцита и тромбоцита са рецептором $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ на другом тромбоцити, што привлачи даље друге тромбоците и доводи до тромбоцит-тромбоцит адхезије, звана агрегација тромбоцита. (слика 6).^{9-11, 17-22}

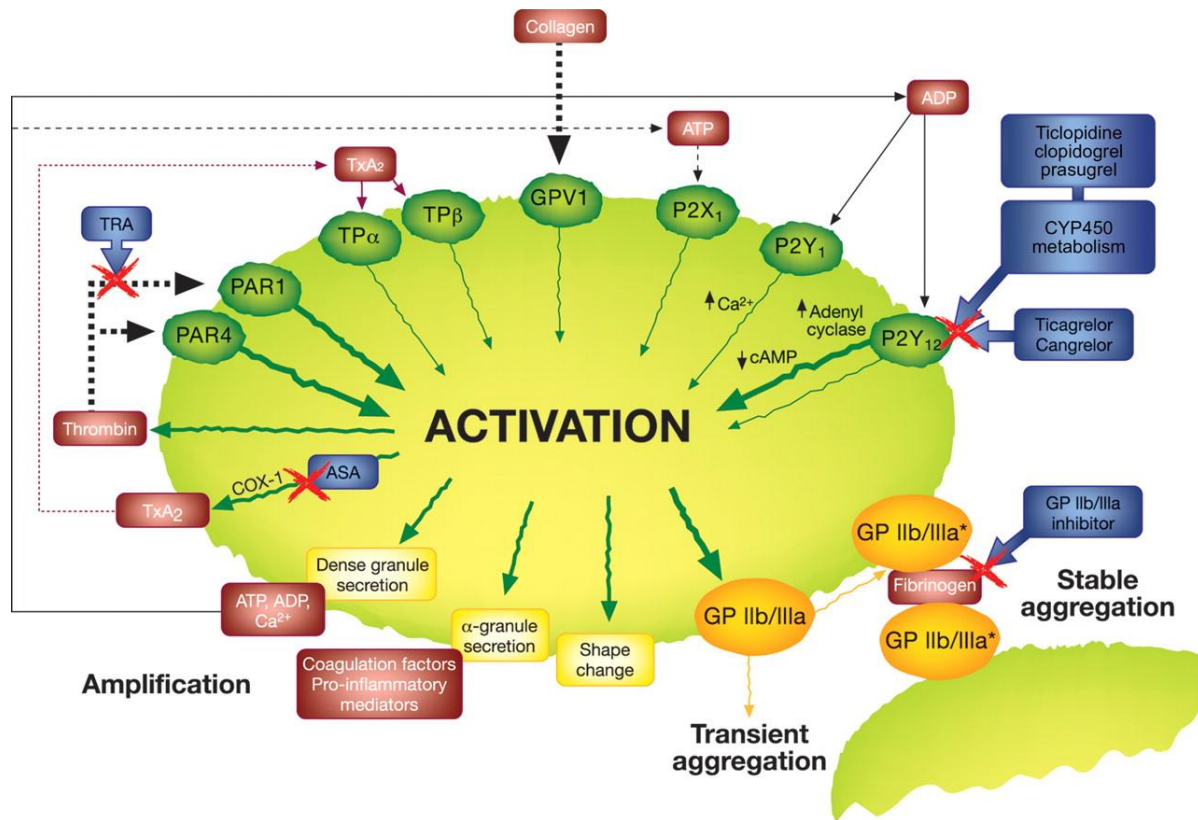
Табела 1. Рецептори и агонисти који су укључени у процес формирања тромба¹¹

Фаза формирања тромба	Агонист	Рецептор
Адхезија	vWF Колаген Фибриноген Фибронектин Ламинин	GPIIb/V/IX $\alpha_2\beta_1$, GPVI $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ $\alpha_5\beta_1$ $\alpha_6\beta_1$
Активација	α -тромбин АДП TXA_2	PAR-1, PAR-4, GPIIb/V/IX P2Y_1 , P2Y_{12} TP
Агрегација	Фибриноген, vWF P-selectin CD40L	$\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (активиран) PSGL-1, GPIIb/V/IX $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (активиран)

Агрегација тромбоцита је убрзани корак који унутар неколико минута води ка акумулацији тромбоцита у и формирању хемостатског тромба. Овај процес је посредован

од стране адхезивних супстрата који су везани за мембрану активираних тромбоцита. Након што тромбоцити успоставе контакт са тромбогеним супстратом, интеракција осталих тромбоцита из циркулације, који су већ спојени, тј. адхерирани, је посредована преко активираниог рецептора GPIIb/IIIa. Током иницијалне фазе (примарна агрегација), тромбоцити су повезаних једни са другима преко слабих фибриногенских мостова. За тренутак касније, ова веза је праћена иреверзибилном стабилизацијом фибриногенских мостова комплекса GPIIb/IIIa. У наставку, тромбоцити отпуштају микрочестице из ћелијске мембране који катализују формирање фибрина и стабилизацију тромба.

Слика 6. Активација и агрегација тромбоцита



Стабилност агрегата је значајна као и брзина његовог раста, одређујући да ли ће тромб оклудирати артерију или не. CD40L је још један тромбоцитни рецептор, који је изгледа од круцијалног значаја за стабилизацију агрегата тромбоцита. У табели 1 је приказан преглед

главних интеракција између рецептора и лиганда, који се одигравају током процеса формирања тромба, од иницијације адхезије до формирања тромба.

Током и након агрегације, тромбоцити ослобађају много супстанци које могу изазвати даљу акумулацију тромбоцита и активацију, вазоконстрикцију, тромбозу и митогенезу, укључујући АДП, серотонин, тромбоцитима ослобођен фактора раста, фактор раста фибробласт, серотонин, тромбоцитни фактор 4, и β -тхромбоглобулин.^{21,23} Тромбоцитима ослобођен серотонин нормално изазива вазодилатацију; међутим, може изазвати вазоконстрикцију у присуству оштећеног или абнормалног (дисфункционалног) ендотела.²⁴ Активирани тромбоцити такође ослобађају азот оксид.^{25,26} Овај одговор тромбоцита може спречити њихову претерану активацију спречавањем груписања тромбоцита и пораста тромба.²⁶ У зависности од екстензивности формираног тромба у коронарном крвном суду, овај процес детерминише тежину клиничке манифестације, од асимптоматске исхемијске болести срца до фаталног инфаркта миокарда.^{11,27}

1.1.3. Тестови функције тромбоцита

Људски тромбоцити су критички укључени у оба процеса, нормалну хемостазу и патолошко крварење и тромбозу. Ове ћелије значајно доприносе вазоконстрикцији и поправци крвних судова, одбрани домаћина и расту тумора/метастаза.²⁸ Поред тога, тромбоцити који делују заједно са другим ћелијама - белим, ендотелијалним или глатким мишићним ћелијама - играју улогу у процесу упале, у повезаним патологијама, и у промоцији атеросклерозе.²⁹⁻³¹ Без обзира на мноштво улога, расположиви тестови тромбоцитних функција истражују углавном промене које су директно повезане са хемостатским процесом.³² Повећан ризик од крварења може бити присутан када се број тромбоцита смањи и/или је једна од њихових функција поремећена. Насупрот томе, поремећена формација тромба може бити због повећања броја тромбоцита или реактивности. Конкретно, активирани тромбоцити адхерирају и сакупљају се унутар атеросклеротских лезија, формирајући оклудирајући артеријски тромб који може довести до тромбоемболијског догађаја као што је мождани удар или инфаркт миокарда, два главна узрока морбидитета и морталитета у целом свету.³¹ Ове различите функције тромбоцита могу бити поуздано детектоване широким спектром тестова. Наслеђене или

стечене тромбоцитне дисфункције морају бити у суштини дијагностиковане јер је брза идентификација пацијената са ризиком од крварења заиста потребна. Мониторинг антикоагулантне терапије постаје све важнији за идентификацију пацијената са хипо или хиперреспондерима који су у ризику од тромбозе или крварења.^{33,34} Последњих година процена функције или дисфункције тромбоцита постаје све неопходна у различитим клиничким поставкама: 1) за идентификацију пацијената са поремећајима крварења, 2) за праћење одговора антитромбоцитног лечења, 3) у процени периперативне хемостазе и 4) у трансфузионе медицини.²⁸

Данас постоје две групе функционалних тестова тромбоцита које обухватају лабораторијске методе за утврђивање функције тромбоцита и “point of care” тестове (РОСТ).

1.1.3.1. Тестови базирани на агрегацији тромбоцита

Агрегометрија тромбоцита трансмисијом светлости (Light transmission platelet aggregometry – LTA) је дизајнирана од стране Борна 1960-тих година, и обавља се коришћењем плазме богате тромбоцитима (PRP) као миљеа.³⁵ И даље се сматра тестом који представља златни стандард за процену различитих функција тромбоцита. Овај тест процењује *in vitro* формирање тромбозит до тромбозита формације, на гликопротеин (GP) П_б/П_а зависни начин, тј. агрегацију, најважнију функцију тромбоцита. Анализа се заснива на мерењу повећања преноса светлости кроз оптички густ узорак PRP након додавања егзогеног агониста тромбоцита. Током теста, PRP након додавања агониста постаје јаснија због преципитације агрегата тромбоцита. Уређај бележи брзину и максимални проценат овог повећања од 0% (максимална оптичка густина PRP) до 100% (без оптичке густине аутологне PRP) помоћу фотометра. Борнова агрегометрија тромбоцита је најчешће кориштена методологија за детекцију поремећаја тромбоцитне функције и праћење антитромбоцитне терапије. Заправо, сматра се први корак у дијаграму протока за проучавање хеморагичних пацијената са наслеђеним или стеченим тромбоцитним дисфункцијама.³⁶⁻⁴⁰ Праћење антитромбоцитне терапије (нпр. аспирин и тиенопирин) помоћу LTA дозволило је прогнозирање главних нежељених кардиоваскуларних догађаја (MACE) код кардиоваскуларних пацијената са високим

ризиком. Стопа резидуалне реактивности тромбоцита дефинисана ADP-LTA или арахидонском киселином (AA)-LTA или оба, је повезана са развојем исхемијских догађаја како код пацијената са акутним коронарним синдромом (АКС), тако и код оних са стабилном ИБС. Не само претходна процена степена инхибиције тромбоцита код пацијената са стабилном ИБС, већ и лабораторијским и клиничким истраживањем граничних вредности за ADP и/или AA-агрегације тромбоцита су били инструментални у идентификацији оних пацијента са ИБС који не одговарају на антиромбоцитну терапију и имају висок ризик за развој нежељених кардиолошких догађаја - МАСЕ.⁴¹⁻⁴⁴

Иако је LTA прихваћен као најважнији и потпуни тест који клиничке лабораторије могу изводити да би дијагностиковале поремећаје функције тромбоцита, овај тест има неке посебне проблеме. У ствари, на технику могу утицати различити преаналитички услови (тј. врста антикоагуланса, липидна плазма, хемолиза или низак број тромбоцита) и различити процедурални услови (тј. припрема PRP, употреба различитих концентрација агониста). Такође лабораторијско особље треба да има висок степен вештине, искуства и стручности у обављању и тумачењу функције тромбоцита. Стога, се ова метода константно проверава процесом стандардизације,^{45,46} и објављене су недавне специфичне смернице за LTA са циљем стабилизације/нормализације тачности процедуре.⁴⁷⁻⁵⁰

Агрегометрија отпором пуне крви (Impedance whole blood aggregometry - WBA) је тест који дозвољава процену функције тромбоцита користећи антикоагулисану пуну крв као средину без обраде узорка.⁵¹ Заснован је на принципу да се активирани тромбоцити држе преко њихових површинских рецептора на вештачке површине две електроде, унутар узорка пуне крви, постављене на одређено растојање између њих. Агрегација тромбоцита се процењује откривањем повећања електричног отпора генерисане агрегацијом других тромбоцита на оне фиксирани на електроде. Стога, смањујући тренутни интензитет, електрични отпор се повећава. Степен повећања отпора је забележен у Омима.²⁸ WBA има две важне предности: 1) коришћење мале количине пуне крви у којој су присутне све субпопулације тромбоцита и 2) без манипулације узорка без активације тромбоцита, што резултира брзом анализом функције тромбоцита. Сада је, **агрегометрија мултиплих електрода** (Multiple Electrode Aggregometry-MEA) нова методологија којом се агрегација тромбоцита из пуне крви може проценити коришћењем новог релевантног уређаја који дозвољава да се овај тест посматра као РОСТ.⁵² Недавно, је овај нови агрегометар

(вишеструки анализатор функције тромбоцита - Multiple Platelet Function Analyzer - Dynabyte – Roche Diagnostics, Манхајм, Немачка) постао доступан широм света. Уређај представља посебне карактеристике које га чине исправним алатом за брзу и потпуну процену функције тромбоцита. МЕА није само могао идентификовати кардиоваскуларне пацијенте који не реагују на антиромбоцитну терапију и који су у опасности од МАСЕ, већ се сматрао вештим тестом за разликовање пацијента са високом инхибицијом функције тромбоцита и ризиком за крварење.⁵³⁻⁵⁵ Недавно је пријављено да је низак степен агрегације тромбоцита, индукованих пептидом активираним тромбин рецептором (thrombin receptor activating peptide-TRAP) од стране МЕА, дефинисан као фактор који је независно повезан са интрамиокардном хеморагијом код пацијената са инфарктом миокарда.⁵⁶

Лумиагрегометрија омогућава истовремено мерење ослобађање аденинских нуклеотида из тромбоцитних гранула и агрегације тромбоцита.⁵⁷ Метода се заснива на процени аденозин трифосфата (АТФ) ослобођеног од активираних тромбоцита различитим агонистима коришћењем технике луминисценције у PRP, испраним тромбоцитима или пуној крви.^{58,59} Тест се заснива на конверзији ADP-а, ослобођеног из тромбоцитних густих гранула, у АТФ који реагује са луциферин-луцифераза реагенсом. Емитована светлост, пропорционална концентрацији АТФ-а, је квантификована луми-агрегометром. Као и код LTA, ова анализа би се могла користити као први тест скрининга код пацијената са клиничком сумњом на поремећај функције тромбоцита, као што су абнормалности у процесу секреције тромбоцитних гранула и/или садржаја, дефекта рецептора плазма мембране и процењивање тромбоцитних функција током тромбоцитопеније.^{39,60}

VerifyNow систем је тест агрегације тромбоцита, типа РОСТ, који садржи уређај који користи пуну крв у процесу мерења агрегације тромбоцита путем турбидиметрички засноване оптичке детекције употребом система кетрица који садрже фибриногеном обложене перле и агонисте тромбоцита.⁶¹ Метода се заснива на капацитету активираних тромбоцита који се везују за фибриноген: тромбоцити се агрегирају на фибриногенским перлама у оквиру кетрица за тестирање, пропорционално броју активираних GPIIb/IIIa рецептора. Употреба овог затвореног система не захтева манипулацију крвљу и руковање инструментима. У ствари, методологија се веома оповргнута и углавном се користи за праћење антиагрегационих терапија у оперативној сали за хитне случајеве без помоћи

специјализоване лабораторије.⁵⁵ Раније је метода коришћена за потврђивање инхибиторног ефекта тромбоцитних GPIIb/IIIa антагониста (абциксимаба или ептифибатида) код кардиоваскуларних пацијената који се планирају за перкутану коронарну интервенцију (ПКИ): у овом тесту (VerifyNow IIb/IIIa тест), TRAP је коришћен као агонист за максималну стимулацију агрегације тромбоцита.⁶² Уређај извештава о резултатима пацијента као јединице за агрегацију тромбоцита (Platelet Aggregation Unit-PAU) израчунате као ниво и степен агрегације. Сада су доступна још два теста који су осетљиви на циљане лекове: Аспирин тест са АА као агонистом (осетљив на терапију аспирином), чији су резултати изражени као јединице за реакцију аспирина (ARU) и PRUTest (осетљив на терапију тиенопиридином), чији су резултати изражени као P2Y₁₂ Reaction Units (PRU), користећи ADP као агонист и PGE₁ као супресор интрацелуларних нивоа слободног калцијума за смањење неспецифичног утицаја ADP-везивања на P2Y₁ рецепторе. Систем VerifyNow је показао је умерено слагање са другим тестовима функције тромбоцита. Разматрана је сензитивност и специфичност методе и дефиниција граничне вредности за класификацију пацијената са високим ризиком од MACE и нереспондере на ацетилсалицилну киселину (ASA) или тиенопидине, а разне лабораторије и клиничке студије су објавиле радове на тему клиничке вредности овог система.⁶³⁻⁷⁰

Plateletworks system је тест који користи пуну крв приликом анализе, РОС тест, заснован на мерењу броја тромбоцита пре и после агрегације. Овај систем састоји се од Plateletworks кита за агрегацију, који је формиран од EDTA епрувете и цитратне цеви у коју је додат агонист (ADP или АА) и Ichog бројач крви (Helena Laboratories, Beaumont, Тексас, САД).⁷¹ Овом брзом тесту није потребна манипулација узорка крви, а резултати су спремни за неколико минута. Недостатак теста је то што се то треба извести у року од неколико минута од узорковања крви. Односи између Plateletworks и LTA, VerifyNow система и тромбоеластографије су саопштени као тест валидације за праћење антиромбоцитне терапије.⁷²⁻⁷⁴ У условима акутне неге, Plateletworks показује клиничку вредност давања информација о броју тромбоцита и функцији.^{75,76}

1.1.3.2. Тестови базирани на адхезији тромбоцита под дејством стреса на зид крвног суда

Анализатор тромбоцитне функције PFA-100/Innovance PFA-200 (The Platelet Function Analyzer) је тест функције тромбоцита који користи уређај по имену PFA-100 или новији доступнији и зановљени Innovance PFA-200 (Сименс, Минхен, Немачка). Метода се заснива на својству тромбоцита да адхерирају, након стресног стања на зид крвног суда, и агрегирају последица присуства агониста у систему. Ова методологија се сматра РОСТ тестом који процењује функцију тромбоцита у пуној крви користећи одговарајуће кертрице у којима је примарна хемостаза симулирана.^{77,78} На располагању су два различита тест кертрица која садрже колаген (С) плус АДП - САДР кертриц - или колаген плус епинефрин (ЕПИ) - СЕРИ кертриц. Време које је потребно да тромбоцити затворе отвор и блокирају проток пуне крви дефинисано је као време затварања (СТ), мера укупне хемостазе повезане са тромбоцитом. СТ је толико дуготрајан колико тромбоцити могу деловати. Кратак СЕРИ СТ може открити високу резидуалну реактивност тромбоцита упркос терапији аспирином, чиме се предвиђа ризик од тромбоемболијских догађаја.⁷⁹ Доказано је да код болесника са АКС на терапији аспирином постоји велика подударност тестова између LTA и PFA-100 СЕРИ, дајући значајну негативну предиктивну вредност тесту PFA.⁶⁰ Поред тога, доказано је да уколико је снижена вредност PFA СЕРИ СТ, она представља значајан и независан предиктор МАСЕ код пацијената са акутним инфарктом миокарда који иду на примарну ПКИ.⁸⁰⁻⁸² У кардиохирургији, PFA методологија је показала високу предиктивну вредност функције тромбоцита за контролисање унутрашњих и постоперативних крварења.^{83,84}

ИМПАКТ: Cone and Plate(Let) Analyzer (Image Analysis Monitoring Platelet Adhesion Cone and Plate Technology) (CPA) (DiaMed, Cressier, Швајцарска) је нови и иновативни РОС тест који у потпуности приступа функцији тромбоцита користећи аутоматизован компјутерски систем који испитује *in vitro* примарну хемостазу.⁸⁵ Тест користи цитрирану пуну крв и заснива се на *in vitro* активацији и адхезији тромбоцита који леже на стандардизованој плочи прекривеној подлогом од полистирена. Стресна сила напрезања зида крвног суда делује на тромбоците спиновањем конуса на плочи. Након аутоматског бојења, измерен су проценат површине тромбоцита који је покривен агрегатом тромбоцита, који представља

адхезију тромбоцита; и просечну величину агрегата (по μm^2), која представља агрегацију тромбоцита.

Глобални тромбоцитни тест (GTT) (Montrose Diagnostics Ltd, Лондон, Велика Британија) је недавни тест који процењује функцију тромбоцита на начин близак физиолошким условима јер се ова техника изводи помоћу нативне неантикоагулисане пуне крви, без додавања агониста.⁸⁶ Принцип на којем се заснива је активација тромбоцита услед високог стреса на зид крвног суда, који је благовремено изазван и сличан оном код стенозе коронарне артерије. Овај брзи РОС тест даје резултате о тромботичком статусу пацијента и зато се користи и на одељењима интензивне неге као и у општим условима.^{87,88}

1.1.3.3. Методе функционисања тромбоцита са вискоеластичним тестом

Тромбоеластографија (ТЕГ) и тромбоеластометрија (ROTEM) представљају методе које се користе за глобалну процену хемостатског процеса. Ови тестови истражују целокупни развој формирања тромба и заснивају се на анализи модификација пуне крви у вискоеластичним силама током формирања тромба. Потенцијал ове методологије је повезан са проценом обима броја и функције тромбоцита, груписања и фибринолитичке активације.⁸⁹ На располагању су три главна система: Тромбоеластографија, изведена на "старим" обновљеним уређајима (ТЕГ, Haemoscope, IL, САД), тромбоеластометрија, раније названа Ротациона тромбоеластографија, изведена је на новом уређају (ROTEM; TEM Int, Минхен, Немачка), и Sonoclot анализа изведена на новом уређају (Sonoclot Signature; Sienco, CO, САД).⁹⁰ Принцип који је у основи рада ТЕГ и ROTEM се састоји у ротационом систему који укључује пин који је суспендован торзионом жицом у шољи. In vitro додавање специфичних реагенса и активатора у пуну крв проузрокује хемостатичку активацију праћену модификацијама хемијских вискоеластичних сила. Читав процес се одмах бележи током свих процеса формирања тромба и такође визуализује у типичној кривуљи.

1.1.3.4. Анализе тромбоцита базиране на цитометријском протоку

Цитометријски проток (ЦП) је техника брзог мерења специфичних карактеристика великог броја различитих ћелија као што су тромбоцити, мерење величине ћелије и

грануларности. ЦП анализа тромбоцита, може пружити информације о њиховом функционалном статусу *in vivo*, такође обухвата и вишеструке анализе са неколико циљева као што је процена стања активације (IgG повезани с тромбоцитном мембраном), процена тромбоемболије, дијагноза специфичних поремећаја и мониторинг антитромбоцитне терапије.^{91,92} Ова анализа се заснива на оптичкој и флуоресценцној процени физичких (као што су величина и унутрашња сложеност) и антигенских својства тромбоцита, тј. одређивање површинских рецептора укључујући конформационе промене везане за активацију рецептора, секрецију тромбоцитних гранула, присуство агрегата тромбоцита и агрегата леукоцит-тромбоцит.⁹³ ЦП дозвољава да се препозна прокоагулантни капацитет и стање активације тромбоцита (нпр. када се ради о АКС или кардиопулмоналном бајпасу), наглашавајући експресију фосфатидилсерина на активираним мембранама тромбоцита користећи означени анексин V. На крају, ЦП се користи за процену стања ускладиштених тромбоцита у крвним групама. На пример, могуће је проценити стање активације тромбоцита и идентификовати контаминацију тромбоцитних концентрата леукоцитима за процену ефикасности трансфузије тромбоцита.^{94,95}

1.1.3.5. Испитивање метаболита тромбоксана

У физиолошким условима, када се тромбоцити стимулишу од стране агониста, TXA_2 се брзо синтетише и ослобађа из тромбоцита на месту васкуларне повреде. TXA_2 појачава активацију тромбоцита, регрутује додатне тромбоците на место формирања тромба, и изазива вазоконстрикцију, убрзавајући процес хемостазе.⁹⁶ TXA_2 је главни производ тромбоцитног метаболизма АК. АК ослобођена из тромбоцитних мембранских фосфолипида путем фосфолипазе A_2 (PLA_2), претвара се у ендопероксиде, простагландин G_2 (PGG_2) и PGH_2 , преко циклооксигеназе-1 (COX-1) и коначно трансформише у TXA_2 помоћу тромбоксан синтазе. TXA_2 се брзо трансформише хидролизом у TXB_2 , биолошки неактиван и стабилни производ.⁹⁶ TXB_2 се излучује у непромењеном облику у урин. ASA ометајући активност COX-1 узрокује смањење концентрације серумског TXB_2 и уринарног 11-дехидро- TXB_2 . Мерење концентрације TXA_2 метаболита омогућава процену стања активације тромбоцита.^{33,34} Концентрације метаболита TXB_2 у серуму и урину су повезане са ентитетом биосинтезе TXA_2 , а њихова доза може бити корисна за процену функције тромбоцита код различитих болести, како би се открили недостаци производње тромбоксана и надгледала терапија аспирином.^{33,34,97}

1.2. Антикоагулантни протеини

Протеин С (РС) и антитромбин (АТ) представљају природне протеине плазме који играју битну улогу у процесу антикоагулације. Њихов недостатак доводи до развоја прокоагулантног стања, а једна од компликација може бити и тромбоза артерија.^{20,201-204}

1.2.1. Протеин С

Протеин С је значајан природни антикоагуланс плазме. Након активације тромбомодулин-везујућег тромбина, активирани протеин С, у присуству протеина S, разлаже фактор Va и VIIIa и на тај начин инхибира коагулацију. Наследни недостатак протеина С је утврђени фактор ризика за венски тромбоемболизам али такође може узроковати и тромбозу артерија.²⁰ Протеин С је витамин К зависни протеин синтетисан у јетри. Има молекулску тежину од око 62 килодалтона и састоји се од два ланца повезаних дисулфидним мостом. Ген за протеин С се налази на хромозому 2 (2к13-14) и чини се да је уско повезан са геном за фактор IX.^{98,99} Протеин С циркулише као зимоген и врши своју антикоагулантну функцију након активације од стране ензима серин протеазе, када постаје активирани протеин С (aPC)¹⁰⁰. Овај процес може бити посредован само са тромбином, али се дешава ефикасније када је тромбин везан за ендотелни тромбомодулин. Примарни ефекат aPC је да инактивира факторе коагулације Va и VIIIa, који су неопходни за ефикасно генерисање тромбина и активацију фактора X.¹⁰⁰ Инхибиторни ефекат aPC је значајно побољшан протеином S, другим протеином који зависи од витамина К. Међутим, aPC има други скуп функција осим коагулационог пута. У реакцијама које посредују ендотелни протеин С рецептор и ефекторски рецептор, протеаза-активирани рецептор-1 (PAR-1), aPC делује директно на ћелије и врши вишеструке цитопротективне ефекте, укључујући антиинфламаторне активности и заштиту ендотелне баријере.^{101,102}

1.2.2. Антитромбин

Антитромбин (АТ)(раније назван АТ III, познат и као хепарински кофактор I) је такође природни антикоагуланс плазме, витамин К независни гликопротеин који представља

главни инхибитор тромбина и других коагулационих серина плазме, укључујући факторе IXa и Xa.¹⁰³ Повећање његове инхибиторне активности помоћу хепарина представља основу за клиничку употребу хепарина. Антитромбин постоји у два облика у плазми, активном мономеру и неактивном "латентном" облику.¹⁰⁴ Један молекул латентног антитромбина може инактивирати један молекул активног мономера кроз формирање хетеродимера; код здравих, овај процес доприноси само нормалном промету протеина у плазми. Међутим, овај процес се може убрзати на физиолошком рН и температури и може објаснити појаву тромбозе код носача ретких нестабилних варијанти антитромбина током грознице и лошег здравља. АТ полако инактивира тромбин у одсуству хепарина што се зове прогресивна антитромбинска активност. У присуству хепарина, тромбин или фактор Ха се брзо инактивира помоћу АТ; ово се назива активност хепаринског кофактора АТ. АТ има два активна функционална места: реактивни центар, Арг393-Сер394, и место везивања хепарина који се налази близу атома терминала молекула.^{105,106} Тромбин раздваја реактивно место праћено формирањем неактивног комплекса који се брзо отклања из циркулације. Везивање хепарина, на место везивања хепарина на АТ, ствара конформационе промене у АТ-у које убрзавају процес инактивације 4000 пута.

1.3. Патогенеза акутног исхемијског догађаја

Ангиографски процењена тежина стенозе коронарне артерије не може адекватно указати на место будуће оклузије коронарне артерије.¹⁰⁷ Верује се да је руптура атероматозног плака и последично формирање тромба у коронарној артерији, одговорна за већину акутних исхемијских догађаја у миокарду као што су нестабилна ангина и акутних инфаркт миокарда.¹⁰⁸⁻¹¹¹ Међутим, системски ефекти, као што је упала, су распрострањени унутар коронарне циркулације и доводе до нестабилности више плакова. Руптура плака настаје спонтано код пацијената са акутним коронарним синдромом, или може бити јатрогено изазвана код пацијената који иду на перкутану коронарну интервенцију (ПКИ). Тромбоза коронарне артерије је последњи патогени механизам акутних исхемијских догађаја, укључујући и инфаркт миокарда и изненадну смрт.

Постоје сложене интеракције између атеросклеротичне артерије, повреде ендотела и дисфункције, вазоспазма и активације тромбоцита. Руптура плака открива тромбогене

субендотелне компоненте, што доводи до тромбоцитног депозита и активације. Формирање тромба унутар коронарног суда је акутни догађај код већине нестабилних исхемијских коронарних синдрома, што је документовано ангиографским и патолошким студијама.^{112,113} Међу пацијентима са изненадном смрћу услед коронарне тромбозе, тромби обично имају слојевит изглед који указује на серијски раст.¹¹³ Такав раст може довести до повремене фрагментација тромба, што има за резултат дисталну емболизацију крвног суда угрушком или агрегатом тромбоцита и последичну микроемболизацију.^{113,114} Слеспљени тромбоцити формирају језгро растуће тромботске масе (бели тромб) на месту руптурираног тромба. Удружено смањење протока крви убрзава проксимално и дистално ширење фибрина и црвених крвних зрнаца као и црвених тромбних маса богатих леукоцитима.^{115,116} И субендотелијални ткивни фактор и активирани тромбоцити сами служе као стимуланс за генерисање тромбина.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Тромбоцити обезбеђују површину мембране за везивање прокоагуланата, од којих су два (фактори V и VIII) ослобођена процесом активације.

Перзистентна тромбоцитна оклузија коронарног крвног суда доводи до акутног инфаркта миокарда. Код пацијената са акутним инфарктом миокарда и нестабилном ангином пекторис пронађена је повећана концентрација тромбоксана A₂ из тромбоцита и других протромботских простагландинских метаболита, што је омогућило биохемијску подршку за активацију тромбоцита као узрок ових догађаја.^{113,120} На пример, једна проспективна студија, утврдила је фазни пораст у излучивању метаболита тромбоксана A² у 84% епизода нестабилне ангине.¹²⁰ Пацијенти са нестабилном ангином пекторис имају повишене нивое P-selectin-a, интегралног протеина мембране укљученог у адхезију тромбоцита.^{121,122} Пулсни притисак на зид крвног суда, који се јавља код стенотичних коронарних артерија, може изазвати агрегацију тромбоцита преко повећане експресије P-selectin-a.¹²³ Иако се нивои P-selectin-a смањују током првог месеца након третмана, они остају виши од нормалног чак и код терапије инхибиторима гликопротеина IIb/IIIa, што указује на наставак активације тромбоцита.¹²⁴ Овај налаз је у складу са серијским ангиоскопским истраживањима који показују присуство комплексног жутог плака и тромба након успешне реперфузије у току једног месеца и касније.¹²⁵ Тромбоцити који се слепљују код пацијената са акутним коронарним синдромом производе мање азот оксида од оних код пацијената са стабилном ангином пекторис или без ангине.¹²⁶ Због чега може

доћи до овога није познато, али смањена производња азот оксида може повећати агрегацију тромбоцита и тромбозу. Упркос терапији инхибиторима тромбоцита, пацијенти са акутним кардиоваскуларним догађајима имају повећану реактивност тромбоцита чак и на почетку.¹²⁷ Ови налази су у складу са другим, тромбоцитом повезаним фактором, за који се верује да доприноси кардиоваскуларној тромбози, што је у ствари присуство већих, реактивних тромбоцита код пацијената са акутним исхемијским догађајима.¹²⁸ Повећање величине тромбоцита, које је у ствари компензација за константни пад броја тромбоцита, резултат је континуиране потрошње тромбоцита у нестабилној ангини, што се не види у акутном инфаркту миокарда.¹²⁹ Поред тога, тромбоцити код пацијената са нестабилном ангином, као што је утврђено проучавањем агрегабилности тромбоцита *ex vivo*, су хиперагрегабилни.¹³⁰ Ови ефекти подстичу раст тромба, ограничење крвотока и акутну исхемију. Реактивност тромбоцита је измењена од стране бројних фактора животне средине, као што су узраст, серумски холестерол, дијабетес, нивои катехоламина, пушење цигарета и конзумирање алкохола. Међутим, подаци из студије Framingham Heart Study сугеришу да ови фактори играју само мању улогу, што чини само 4 до 7 посто варијансе; насупротив томе, процене сугеришу да наследни фактори играју главну улогу, чинећи 20 до 30 процената укупне варијансе агрегације тромбоцита.¹³¹

Тромбоцити су такође укључени у инфламаторни одговор и производе проинфламаторне медијаторе као што су тромбоцитни фактор раста, фактор тромбоцита 4 и трансформишући фактора раста-бета, као и CD40 лиганд. Пацијенти са акутним коронарним синдромима имају повећану интеракцију између тромбоцита (хомотипних агрегата) и између тромбоцита и леукоцита/неутрофила (хетеротипни агрегати). Ови други агрегати се формирају када се активирају тромбоцити и адхерирају на циркулишућим леукоцитима или неутрофилима. Досадашње информације сугеришу да запаљење игра важну улогу током тромботичне фазе акутних коронарних синдрома. Леукоцити и неутрофили се везују за тромбоците преко P-selectin-а и бета-2-интегрин, процес који захтева тромбоцитну производњу фактора активације тромбоцита.^{132,133} Леукоцити, заузврат, могу побољшати агрегацију тромбоцита,¹³⁴ а однос између тромбозе зависне од тромбоцита и упале такође се регулише, делом од стране тромбоцитног рецептора са површине CD40 и његовог везујућег CD40 лиганда. Ове интеракције указују на механизам спајања тромбозе и упале током срчане исхемије.

1.4. Физичка активност и агрегабилност тромбоцита

Велики број научних доказа показују да акутно вежбање и уобичајена физичка активност утичу на функцију тромбоцита.^{135,154} Ово је од посебног интереса јер запаљенске и имуномодулаторне последице активације тромбоцита су све више препознате и због тога се чини да тромбоцити имају централну улогу не само у финалној фази кардиоваскуларне болести, већ и у развоју ових болести. Неколико студија је показало да акутно вежбање доводи до пролазног повећања броја тромбоцита.^{136,137} Ово повећање је узроковано хемоконцентрацијом и ослобађањем тромбоцита из јетре, плућа, и што је још важније, слезине,¹³⁵ јер је утврђено да су тромбоцити који су ускладиштени у слезини знатно већи од нормалних циркулирајућих тромбоцита. Са повећањем интензитета вежбања утврђено је да долази до знатног повећања концентрације епинефрина у крви са постојећих 400-800 рМ на преко 3500 рМ код најинтензивнијег вежбања.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Што се тиче гликопротеинских рецептора Ша/Шв, само мали ограничен број студија¹⁴¹ је показао повећање активности након вежбања, док је већина студија показала да до тога ипак не долази.¹⁴² Потенцијални ефекти вежбања на агрегацију тромбоцита испитивани су мноштвом студија коришћењем различитих техника. Велика већина ових истраживања је открила повећану агрегабилност тромбоцита након вежбања као одговор на различите агонисте, док је неколико студија није утврдило такав ефекат^{143,144} или је чак регистрована инхибиција агрегације тромбоцита вежбањем.^{145,146} Важно је, да на агрегацију тромбоцита утиче густина ћелија, стога, тумачење експерименталних резултата може бити тешко, јер повећање агонистима узроковане агрегације тромбоцита, није нужно повезано са тромбоцитном хиперреактивношћу када се број тромбоцита не коригује. Ипак, повећана агрегација тромбоцита у одговору на вежбање утврђена је тестом LTA^{141,147} без и након подешавања броја тромбоцита у плазми богатој тромбоцитима (PRP),^{148,149} али такође и другим тестовима укључујући агрегометрију електричног отпора,¹⁵⁰ филтрагометрију,¹⁵¹ рачунањем смањења појединачних тромбоцита након стимулације агонистом^{152,153} и агрегације тромбоцита након стреса зида крвног суда ротационим вискометром.^{154,155} Значајно је напоменути да ово посматрано повећање агрегације тромбоцита *in vitro* након акутног вежбања није у супротности са оним студијама које нису утврдиле ефекте вежбања на GPIIb/IIIa активацију, пошто агрегација тромбоцита прилично зависи од

осетљивости тромбоцита према агонистима него од стања активације гликопротеина Пв/Ша у базалним условима.

Још један тест који указује на формирање агрегата тромбоцита (након адхезије при јаком стресу зида крвног суда) обавља се тромбоцитним функционалним анализатором (Platelet Function Analyzer; PFA-100) где се тромбоцити у пуној крви активирају комбинованим дејством стреса на зид крвног суда и дејства агониста, што резултира затварањем отвора коагулумом. После вежбања пријављено је краће време за формирање коагулума.^{144,147} Међутим, и ти резултати морају се тумачити у светлу чињенице да на овај тест може утицати број тромбоцита,¹⁵⁶ који је повећан у две од ове три студије након вежбања док у трећој студији⁷⁷ нису наведени подаци о броју тромбоцита. Смањено време за стварање коагулума, као одговор на вежбање, такође је примећено хемостатометријом,¹⁵⁷ где се одређени притисак примењује за проток крви кроз цевчице и мери се време потребно за затварање цевчице због настанка тромбоцитног чепа од тренутка пункције исте. У литератури су коришћени различити тестови адхезије тромбоцита како би се тестирали ефекти вежбања на функцију тромбоцита. Ове студије дале су недоследне резултате. Док је једна студија показала смањену адхезију тромбоцита на фибриноген (изазван стресом притиска на зид крвног суда помоћу ротационог вискозиметра),¹⁵⁵ друге групе (користећи различите експерименталне технике) нису нашли никакав ефекат.^{158,159} Међутим, резултати једне студије¹⁶⁰ указују на улогу нивоа кортизола зависног интензитета у овом процесу. Ванг и сарадници су користили тест који је дизајниран да тестира отпор везаних тромбоцита против одвајања дефинисаним стресним напрезањем применом протока пуфера. Овом методом, аутори су пронашли више адхерираних тромбоцита након спроведених исцрпних вежби,^{135,153,161-163} што указује на јачу интеракцију тромбоцита као одговор на интензивно вежбање.

Утицај акутног вежбања на експресију P-selectin-a на тромбоцитима је разматран у неколико студија и добијени су контрадикторни резултати. Утврђено је да се базална експресија P-selectin-a повећава^{151,164,165} након акутног вежбања, иако то није било у свим студијама статистички значајно.^{148,150} Значајно је да неколико студија није утврдило никакав утицај вежбања на базални ниво експресије P-selectin-a.^{141,142,166,167} Агонист је (укључујући стрес зида крвног суда) индуковао експресију P-selectin-a након вежбања у већини студија,^{151,164,166,168,169} али опет тај ефекат није увек био значајан,¹⁷⁰ одсутан^{142,167,171}

или је било чак и смањење P-selectin-a.¹⁵⁵ Слично томе, показало се да је растворљив P-селектин повећан^{148,153} или непромењен^{155,168,172} након вежбања. Активација тромбоцита такође укључује ослобађање ефектора који су део позитивних повратних спрега за активацију тромбоцита ауто или паракриним начином. Поред ADP-а, молекул кључног значаја у овом контексту је тромбоксан А₂, који се синтетише након активације тромбоцита. Његов производ разградње тромбоксан Б₂ служи као маркер *in vivo* активације тромбоцита који се може лако измерити. Након вежбања откривена је повећана концентрација тромбоксана Б₂ у плазми,^{151,169} као и у урину,¹⁴¹ у складу са ефектом активације тромбоцита током акутног вежбања.

Азот оксид (NO), простациклин (PGI₂) и CD39/CD73 представљају физиолошке ефекторе три главна пута који су релевантни за инхибицију функције тромбоцита.^{135,173} Производња и ослобађање NO и простациклина је посредована повећаном концентрацијом цитосолног калцијума, што се може покренути помоћу стреса зида крвног суда (што је релевантно за вежбање) и мноштво других медијатора. Док је NO произведен од стране тромбоцита као и других ћелија укључујући ендотелне ћелије и еритроците, синтеза простациклина настаје у ендотелним ћелијама и глатким мишићним ћелијама, али је одсутна у тромбоцитима. Постоје извештаји о сувишности ова два система, где један систем преузима када је други компромитован, на пример, повећано је стварање NO када је производња простациклина поремећена.¹⁷⁴ И NO и PGI₂ инхибирају функцију тромбоцита путем повећања цикличних нуклеотида (NO углавном преко cGMP-а и простациклина путем cAMP-а), који накнадно активирају своје одговарајуће протеинске киназе (cGMP: протеин киназа G; cAMP: протеин киназа A), које заузврат фосфорилишу кључне протеине водећи на крају до инхибиције тромбоцита. Пошто је активација тромбоцита повезана са повећањем концентрације цитосолног калцијума, генерација NO унутар тромбоцита представља и рану последицу активације тромбоцита, чиме игра значајну ауторегулаторну улогу која ограничава прекомерни раст агрегације, адхезије и формирање тромба.^{26,135} Према томе, повећана количина цикличних нуклеотида у тромбоцитима може бити резултат (и индикативна за) инхибиције тромбоцита, на пример, ендотелом (ослобађањем NO и PGI₂) или као резултат активације тромбоцита. Доступне студије показују повећано генерисање простациклина у одговору на акутно вежбање^{153,169,175} и повећане нивое cAMP у тромбоцитима¹⁶⁹ показују да су тромбоцити заиста погођени.

Слично томе, повећани нивои разградних продуката NO у плазми, нитрити и нитрати, су примећени заједно са активацијом тромбоцита^{152,162} после акутног вежбања. Иако еритроцити представљају могући извор производње NO у одговору на вежбање,¹⁷⁶ функционална релевантност повећаних нивоа производа деградације NO, критички зависи од биолошке доступности NO. Како повећана генерација NO може бити уравнотежена његовом инактивацијом, посматрани нивои метаболита NO не указују увек на биолошки активне форме NO. Међутим, повећани нивои cGMP-а унутар тромбоцита^{162,169} (делом праћени повећаном агрегабилношћу тромбоцита у одговору на колаген¹⁷⁷) су откривени као одговор на вежбање, што снажно иде у прилог за повећану биорасположивост NO. На пример, једна студија је такође известила о непромењеном базалном, али смањеном нивоу cGMP-а у одговору на NO-донатор SIN-1¹⁷⁸ након вежбања, што би указивало на смањену осетљивост тромбоцита према NO.

CD39/CD73 представљају даљи пут интеракције са функцијом тромбоцита. CD39 се испољава на више васкуларних ћелија, укључујући ендотелне ћелије и тромбоците.¹⁷⁹ CD39 претвара ADP и АТР у АМР, због чега ограничава активацију тромбоцита преко P₂-рецептора. АМР се даље разграђује ендотелним CD73 на аденозин,¹⁸⁰ који инхибира тромбоците путем интеракције са њиховим А₂ рецепторима и накнадним повећањем cAMP. Након вежбања, забележено је да долази до смањивања експресије CD39 на тромбоцитима, како базално тако и код ADP-индуковане експресије, док је ADP-стимулација повећала CD39-експресију пре, као и након вежбања.¹⁴⁸ Ово је супротно другим аспектима функције тромбоцита (нпр. експресија P-selectin-a), где агонисти и вежбање мењају функцију тромбоцита на сличан начин. Према томе, посматрано смањење експресије CD39 треба да се тумачи тако да представља механизам који олакшава активацију тромбоцита, а не последица активације тромбоцита.

Генерално гледано, упркос неконзистентности и контрадикторних резултата, већина доступних студија указује на то да акутна вежба има значајан утицај на практично све аспекте активације тромбоцита. Иако различити протоколи делимично могу узети у обзир контрадикторне резултате који се налазе у литератури, резултати неколико истраживања указују на то да примењени интензитет вежбања може представљати критичну детерминанту за ефекте активације тромбоцита током акутног вежбања.

1.4.1. Интензитет физичког вежбања и тестови оптерећења

1.4.1.1. Тестови физичког оптерећења

Тест физичким оптерећењем је кардиоваскуларни тест који обухвата физичку активност (ходање или трчање) на покретној траци (treadmill) или бициклу (ергобицикл) са постепеним повећањем оптерећења, уз праћење ЕКГ-а и артеријског крвног притиска. Тест физичким оптерећењем је добро успостављена процедура која је широко распрострањена и у клиничкој употреби већ више деценија.^{181,182}

Велики број клинички студија које су се бавиле испитивањем функције тромбоцита у напору су користиле тест физичког оптерећења на ергобициклу или покретној траци. У последњих тридесет година, активација тромбоцита је повезивана са кардиоваскуларним компликацијама током исцрпног вежбања.^{183,184} Испитивање спроведено међу здравим људима, ради провере утицаја вежбања на агрегацију и активацију тромбоцита, је довело до конфликтних резултата. Већина студија које су испитивале дејство акутног вежбања на функцију тромбоцита дефинисале су интензитет вежбања као проценат максималне потрошње кисеоника. Ипак, добро је утврђено да одређени проценат максималне потрошње кисеоника може резултирати великим међуиндивидуалним разликама у метаболичком стресу, на пример, нивои катехоламина и рН у крви, који највероватније утичу на функцију тромбоцита током физичког вежбања.¹³⁵ Познато је да су студије о агрегацији и активацији тромбоцита компликоване јер на тромбоците утиче више фактора укључујући физичке и хемијске факторе, узимање узорка крви, руковање и процесирање истог. Такође постоје проблеми пре самог анализирања, као што је артифицијелна активација *in vivo*, која ограничава вредност наведених студија које се тичу вежбања, агрегације и функције тромбоцита. Неке студије су показале да енергично вежбање изазива повећању агрегабилност тромбоцита са агонистом какав је АДП, колаген и епинефрин. Међутим друге студије су демонстрирале да јако интензивно вежбање нема ефекта на агрегацију тромбоцита.^{136,185,186}

Према томе, поређење резултата добијених из различитих студија је угрожено овим ограничењима. Ипак, неколико студија директно је упоређивало различите интензитете

вежбања у односу на њихове ефекте на тромбоците. Ове студије пружају значајне доказе да интензитет вежбања заправо представља критичну детерминанту активације тромбоцита. Ванг и сарадници¹⁸⁷ су упоређивали постепено повећање интензитета вежби све до исцрпљивања са 30 минута непрекидног вежбања при потрошњи кисеоника од 50-55% максималне потрошње кисеоника ($VO_2 \max$). Када је 30-минутни субмаксимални тест резултирао смањеном адхезијом и агрегацијом тромбоцита (β -TG и PF4 су остали непромењени), сви ови параметри су били повећани након постепеног повећања напора све до исцрпљености. Ови резултати су у основи потврђени студијом са сличним дизајном,¹⁸⁸ где су мерени још и нивои цитосолног Ca^{2+} . Интратромбоцитна концентрација Ca^{2+} , у базалним условима као и након АДП стимулације, показало се да се повећава само након теста са постепеним повећавањем напора. Слично томе, Чичаро и сарадници¹⁸⁹ су објавили да је агрегација тромбоцита непромењена након ниског интензитета вежбања током 30 минута без повећања нивоа лактата у крви, док је трчање у истом трајању довело до средње концентрације лактата од 4,6mmol/L (у мировању: средња вредност 0,9 mmol/L) што резултирала значајним повећањем агрегације у одговору на АДП. Ови резултати су у складу са резултатима из друге групе која је открила повећану агрегабилност у одговору на АДП и колаген након постепеног повећања напора приликом вежбања (бицикл ергометар) до исцрпљености, док је агрегабилност углавном била непромењена након 30 минута бицикла са интензитетом од 60% $VO_2 \max$ и чак смањен у одговору на ниске концентрације агониста тромбоцита.¹⁴⁹

Новије студије такође су се бавиле експресијом P-selectin-a и формацијом тромбоцит-леукоцит. Хилберг и сарадници су анализирали експресију P-selectin-a, као и различите подгрупе агрегата тромбоцит-леукоцит, у једној студији у којој су упоређивали ефекте постепеног повећања вежбања до изнемоглости са онима од 45 минута на 90% од индивидуалног анаеробног прага (ИАП) (ИАП представља концепт прага узимајући у обзир стопу смањења концентрације лактата након завршетка постепеног теста вежби).¹⁶⁷ Док је количина агрегата тромбоцит-леукоцит у базалним условима и након активације тромбоцита од стране TRAP-6 (Thrombin Receptor Activator for Peptide 6) повећана након оба теста вежбања, експресија базалног P-selectin-a остаје непромењена. Међутим, тест са постепеним повећењем оптерећења резултирао је повећаном експресијом P-selectin-a стимулисаног агонистом. У следећој студији, исти аутори су представљали потенцијалне

ефекте различитих трајања вежби између група (као што је случај када се пореди, тј. тест са постепеним повећањем оптерећења током 10-15 минута и субмаксимални тест од 60 минута трајања) и примењени од 45-60 минута бицикла да би се упоредили интензитети од 80% и 100% од ИАП у односу на њихове ефекте на функцију тромбоцита. Они су такође пронашли повећану експресију агонистом стимулисаног P-selectin-a, иако није постојала разлика између интензитета вежбања, али такође повећано стварање агрегата тромбоцит-леукоцит, који је био знатно изражен у одговору на већи интензитет вежбања.¹³⁵ Експерименти изведени помоћу ергометра за горње екстремитете¹⁹⁰ указују на то да међусобна повезаност интензитета вежби и активације тромбоцита није специфична за трчање или бициклизам. Док је ТХВ₂ повећан након постепеног повећања интензитета вежбања до нивоа исцрпљености, али не и након 15 минута непрекидног тренинга до 75% максималне брзине срца, агрегација тромбоцита је повећана као одговор на оба протокола вежби, али је ово повећање било значајније у групи код постепеног повећања интензитета вежбања.

Осим интензитета вежби, такође, кардиореспираторни фитнес, односно адаптација на дуготрајну обуку током тренинга, може представљати критичну детерминанту за промену функције тромбоцита у одговору на акутно вежбање. Неке студије су директно упоређивале ефекте акутног, напорног вежбања на функцију тромбоцита између две групе, које су се разликовале у кардиореспираторној утренираности тј. фитнесу. Једну групу су чинили јако утренирани, а другу они који су имали уобичајену физичку активност. Углавном, резултати добијени из ових студија указују на то да ниска кардиореспираторна утренираност резултира већом активацијом тромбоцита након акутног вежбања. Кестин и сарадници¹⁷⁰ су упоређивали је ефекте постепеног повећања физичког напора на експресију неколико рецептора који се налазе на тромбоцитној површини између испитаника који воде седентарни начин живота и физички активних здравих волонтера. У појединцима који воде седентарни начин живота, површинска експресија GPIb је била мање изражена (као што је случај после стимулације са тромбином,^{191,192} док су CD36 (у складу са активацијом тромбоцита¹⁹³) и рецептор фибриногена GPIIb/IIIa били значајније активирани (као одговор на тромбин) након вежбања. За разлику од тога, ниједна од ових промена није могла бити примећена код добровољцима. У складу са тим резултатима, тромбоцити седентарних волонтера

показали су већу агрегабилност и адхезивност након интензивног теста вежби на бицикл ергометру у поређењу са тромбоцитима физички активних волонтера.

Ванг и сарадници¹⁶² су приметили повећану агрегабилност тромбоцита и адхезивност у одговору на постепено повећање интензитета вежби до исцрпљености и овај ефекат је смањен или одсутан након 8 недеља редовног вежбања. Следећа истраживања истих аутора потврдила су ове резултате и за активацију тромбоцита након стреса зида крвног суда¹⁶⁸ и оксидованим деловањем LDL холестерола.¹⁵² Значајно је, да су сви ови ефекти били реверзибилни после неколико недеља од престанка тренирања. Сагледане заједно, ове студије показују да редовна вежбања олакшавају активирање акутног ефекта напорног вежбања на функцију тромбоцита. Поред тога, бројне студије показују да дуготрајна обука вежбања утиче и на функцију тромбоцита у мировању.¹³⁵

1.4.1.2. Фармаколошки стрес тестови

С обзиром да се код великог броја пацијената, код којих постоји сумња на исхемијску болест срца, или се од ње лече, не може спровести тест физичког оптерећења на ергобициклу или покретној траци, од великог значаја су фармаколошки стрес тестови који се користе ради процене коронарне резерве. Фармаколошки стрес тестови, представљају дијагностички поступак у којима је кардиоваскуларни стрес индукован фармаколошким агенсима код пацијената са смањеним функционалним капацитетом или код пацијената који не могу да спроведу тест физичког оптерећења.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Фармаколошко стрес тестирање се врши у комбинацији са “imaging” техникама као што је нуклеарна магнетна резонанца и ехокардиографија.¹⁹⁶ Аденозин, дипиридамола (персантин) и добутамин су најчешће доступни фармаколошки агенси за стрес тестирање. Регаденозон, аналог аденозина, има дужи полуживот од аденозина, а самим тим и могућност да се даје као интравенски болус на супрот континуалној примени због кратког полуживота аденозина. Аденозин, дипиридамола и регаденозон су коронарни дилататори. Они дилатирају коронарне крвне судове, што узрокује повећану брзину и проток крви у нормалним крвним судовима док је проток кроз сужене коронарне артерије и даље мали. Ова разлика у одговору доводи до феномена краће протока, а дефекти перфузије се манифестују променама у скенираним нуклеарним сликама или у променама СТ сегмената на ЕКГ-у. Добутамин је агенс који на

срчани мишић делује позитивно инотропно и хронотропно. Реакција срчаног мишића на дејство добутамина је слична реакцији срца на физичку активност.

Аденозин је природна супстанца која се налази у целом телу у различитим ткивима. Ради на регулацији крвотока у многим васкуларним мрежама, укључујући и миокардну. Механизми помоћу којих се аденозин производи интрацелуларно су S-аденозил хомоцистеин и путеви аденозин трифосфата, који има своју улогу током исхемије. Након транспорта преко ћелијских мембрана, аденозин интерагује и активира ћелијске површне A₁ и A₂. У васкуларним глатким мишићима, аденозин првенствено делује активацијом A₂ рецептора, који стимулише аденилат циклазу, што доводи до повећања производње цикличног аденозин монофосфата (сАМР). Повећани нивои сАМР инхибирају преузимање калцијума сарколемом, изазивајући опуштање глатких мишића и вазодилатацију. Такође се јавља активација васкуларног A₁ рецептора, који стимулише гванилат циклазу, индукујући цикличну производњу гуанозин монофосфата, што доводи до вазодилатације. Ова директна коронарна артеријска вазодилатација индукована аденозином је ослабљена код оболелих коронарних артерија, који имају смањену резерву коронарног протокола и не могу даље да се дилатирају као одговор на аденозин. Ово није случај код здравих или мање оболелих коронарних артерија код истог пацијента, који производи релативну проточну хетерогеност при протоку кроз коронарне артерије, што резултира релативно вишем коронарном протоком крви код здравих или мање оболелих коронарних артерија у поређењу са болеснијим коронарним артеријама.¹⁹⁵ У већини случајева коронарни крвни проток у оболелим коронарним артеријама се не смањује. У случајевима озбиљне стенозе крвног суда или тоталне оклузије са развијеном компензаторном колатералном циркулацијом, може доћи до смањења коронарног протока кроз оболелу коронарну артерију, чиме се индукује исхемија преко феномена крађе ("steal" феномен). Ова регионална абнормалност протока такође индукује перфузијски дефект током снимања нуклеарном магнетном резонанцом.

Добутамин је синтетички катехоламин, који директно стимулише и бета-1 и бета-2 рецепторе. У зависности од дозе, добутамин изазива повећање брзине срчаног удара, крвног притиска и миокардних контракција, због чега се традиционално користи у јединицама интензивне неге или у терминалном стадијуму срчане слабости. Такође има благо дејство на α 1-адренергичке рецепторе, што узрокује вазоконстрикцију, али је овај

ефекат потиснут далеко потентнијом β 2-посредованом вазодилатацијом. Почетак деловања добутамина је 1-2 минута, а полу-живот у плазми је око 2 минута.¹⁹⁶ Као и код физичког напора, добутамин повећава регионални проток крви миокарда на основу физиолошких принципа резерви коронарног протокола. У зависности од дозе лека, долази до сразмерног повећања субепикардног и субендокардијалног протока крви кроз васкуларне мреже које се снабдевају преко значајно сужених коронарних артерија, при чему се највише повећава унутар субепикардијума, а не субендокардијума. Према томе, абнормалности перфузије су изазване развојем регионалне исхемије миокарда. Циљ ДСЕ је откривање исхемије миокарда рано у прогресији коронарне болести идентификовањем регионалних абнормалности кретања зида у условима фармаколошког стреса. У контексту стрес ехокардиографије, добутамин привремено повећава потрошњу кисеоника миокарда и на тај начин може изазвати исхемију. Лимитација коронарног протока на почетку изазива дијастолну дисфункцију, јер је лузитропија (брзина миокардне релаксације) енергетски интензиван процес. Дијастолна дисфункција често претходи другим манифестацијама исхемије, укључујући и визуализацију систолне дисфункције. Сензитивност ДСЕ за откривање исхемије миокарда може бити смањена због дугорочне употребе бета блокатора, калцијумских антагониста и нитрата.¹⁹⁷ Међутим, када пацијент хронично узима један од ових анти-исхемијских лекова, позитиван тест за исхемију је значајнији, мада негативни тест може бити мање корисан.

Стрес ехокардиографија има највишу специфичност (88%) међу исхемијским тестовима, укључујући и традиционалне ЕКГ тестове физичким оптерећењем, перфузиону сцинтиграфију са талијумом, компјутеризоване томографије са појединачном емисијом фотона - Single-Photon Emission Computed Tomography (SPECT) и позитронску емисиону томографију (PET).¹⁹⁸ Вишеструки фактори утичу на тачност кардиоваскуларних дијагностичких тестова (табела 2). Различите студије извештавају о осетљивости на укупну детекцију ИБС код ДСЕ у распону од 61% до 96% и специфичности у распону од 70% до 100%.¹⁹⁹ У поређењу са тим, велика мета-анализа ехокардиографског теста оптерећења је показала осетљивост од 85% и специфичност од 77% за откривање ИБС.²⁰⁰ Испитивање 62 студија од 1991. до 2006. године које су укључивале више од 6.800 пацијената открило је да је сензитивност ДСЕ повезана са укључивањем пацијената са

претходним инфарктом миокарда.¹⁹⁶ Специфичност је била мања код пацијената који су имали раније ехокардиографске абнормалности покрета на зиду.

Табела 2. Сензитивност и специфичност различитих тестова за процену коронарне резерве¹⁹⁸

	ЕКГ тест оптерећења n>24.000	Талијум гМРП n=510	SPECT n=628	Стрес ехо n=1174	PET scanning n=206
Сензитивност (%)	68	79	88	76	91
Специфичност (%)	77	73	77	88	82

Изузетно мали број студија је испитивао функцију тромбоцита и антикоагулантних протеина током фармаколошког стрес теста са аденозином – SPECT миокарда. Обрадовић и сарадници⁴ су испитивали везу између промена у хемостатским параметрима и миокардне исхемије узроковане стресом, која је квантификована помоћу перфузионе сцинтиграфије миокарда код стентираних коронарних пацијената. Утврдили су да основне активности природних антикоагулантних протеина АТ и РС повезане са величином дефекта миокардне перфузије током SPECT теста са аденозином. Такође су показали да су пацијенти са значајном исхемијом, изазвану стресом, имали су нижи ниво активности АТ након стреса.

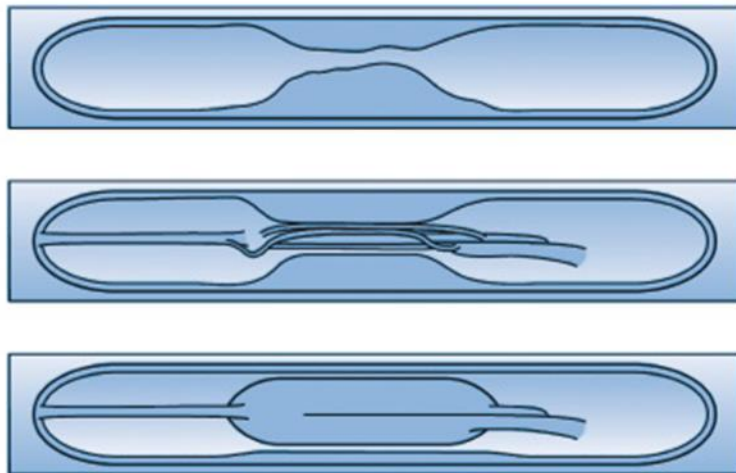
Анализирајући доступне научне податке, нисмо нашли радове који су се бавили испитивањем функције тромбоцита и антикоагулантних протеина код пацијената након перкутане коронарне интервенције који су тестирани методом ДСЕ.

1.5. Перкутане коронарне интервенције и антитромбоцитна терапија

Перкутане коронарне интервенције (PCI) представљају вид лечења ИБС, минимално инвазивним путем, који обухвата дилатацију коронарне артерије балоном и/или имплантацију стента у коронарни крвни суд, при чему долази до успостављање

адекватног протока кроз сужену или оклудирану коронарну артерију.²⁰⁵ Прву перкутану транслуминалну балон ангиопластику (РТСА) коронарних артерија урадио је Andreas Grüntzig 16. септембра 1977. године и тиме започео еру интервентног, нехируршког, лечења коронарне болести.²⁰⁶ Захваљујући постепеном увођењу других метода перкутане реваскуларизације, атеректомије, коронарних стентова и стентова обложених леком, побољшани су примарни и дугорочни успех и безбедност PCI те је данас број болесника који се лечи перкутаном интервенцијом троструко већи од броја хируршких реваскуларизованих болесника.²⁰⁵ Иако механизми РТСА нису у потпуности дефинисани, они укључују комплексну интеракцију балона (дилатација) и зида крвног суда (карактеристике плака и накнадни одговор зида на баротрауму). Дилатација артерије ангиопластиком подразумева изражену трауму зида коронарне артерије узроковану високим притиском у балону који се користи за дисрупцију атеросклеротског плака и стезање зида крвног суда (слика 7).

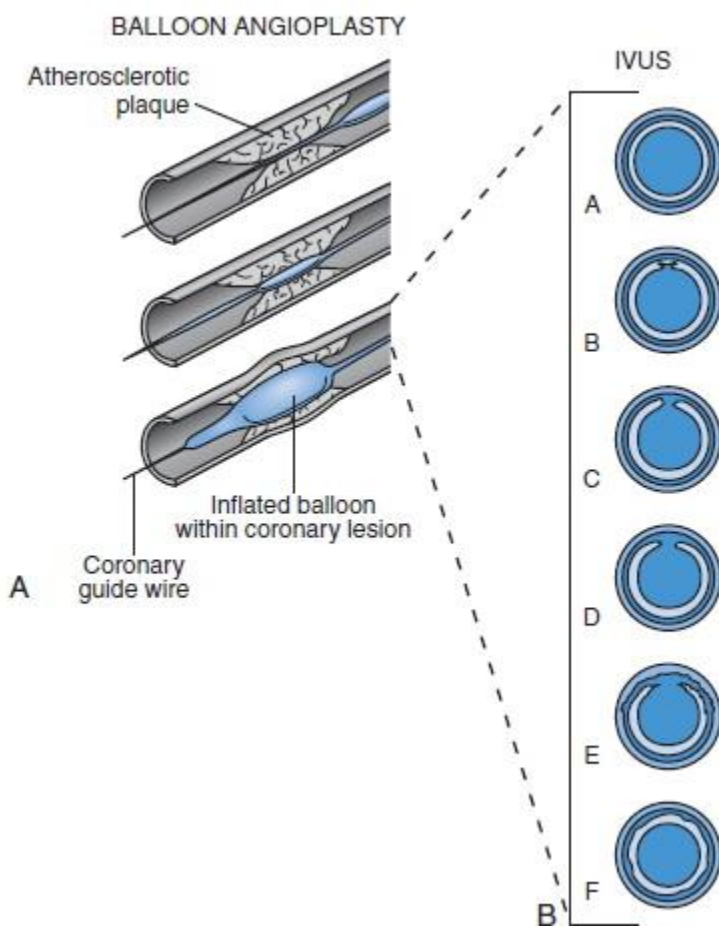
Слика 7. Дијаграмски приказ принципа РТСА



Фисура плака, истезање медије и адвентиције и сепарација атерома од медије одговорни су за отварање нових путева крвотоку и повећање лумена крвног суда.²⁰⁷ Непосредни нежељени ефекти ове баротрауме односе се на честу појаву еластичног сужавања артерије након успешне процедуре и присуство видљивих дисекција зида артерије са претећом

оклузијом. Студије интраваскуларним ултразвуком (IVUS) који омогућава сагледавање попречног пресека артерије изнутра, из њеног лумена, *in vivo* су потврдиле постојање ових морфолошких промена након РТСА. Најзначајније акутне компликације РТСА су управо дисекције и оклузије крвног суда. Повреда балон дилатацијом у људским коронарним артеријама доводи до морфолошких промена. Оне су у великој мери зависне од: атеросклеротског састава плака, ексцентричности третираног сегмента и балонских баротраума. Инфлација балона током РТСА доводи до повреде крвног суда путем шест

Слика 8. Механизам повреде крвног суда током РТСА и попречни пресек IVUS приказом

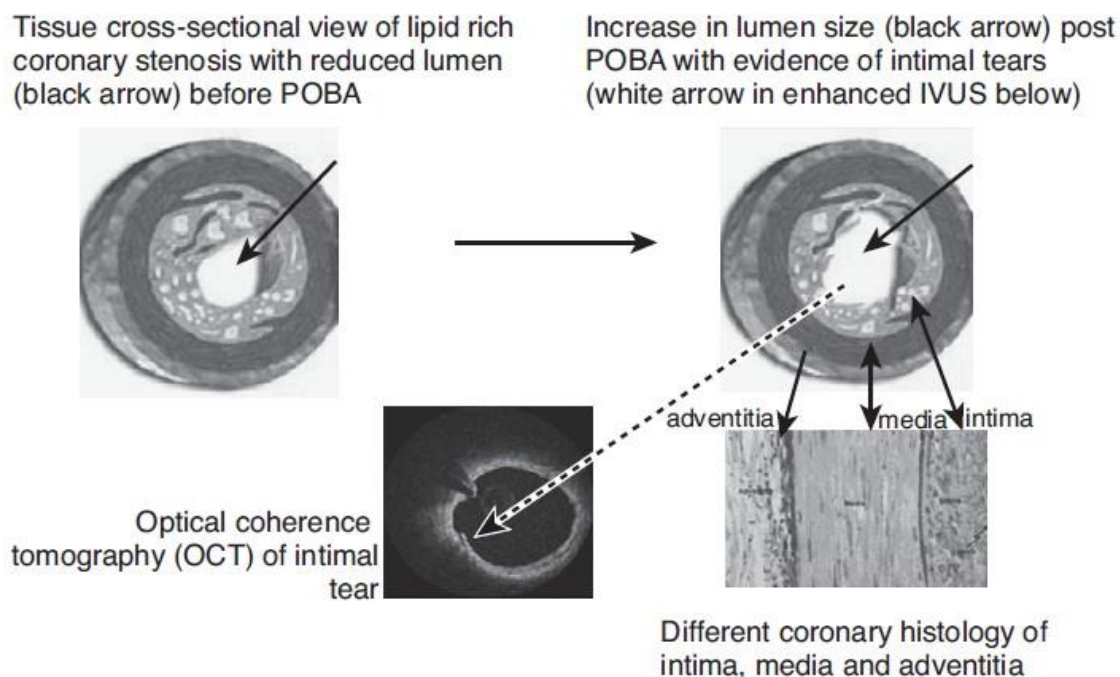


различитих механизма посматрано ангиографски и путем IVUS-а²⁰⁸ (слика 8): 1) компресија плака, 2) растезање крвних судова - виђено у ексцентричним лезијама, 3) површна расцеп, 4) дубоки расцеп или дисекција/субинтимално - достизање медије, 5) субмедијална дисекција и 6) обимна дубока дисекција. У контексту саме балон

ангиопластике, величина балона у односу на пречник крвног суда је важан фактор пре саме балон ангиопластике. Одабир мањег пречника балона од промера крвног суда (undersizing) резултира неадекватном дилатацијом и удружен је са већим ризиком за рестенозу док одабир балона већег пречника од крвног суда (oversizing) повећава ризик од акутних компликација као што су коронарне дисекције, перфорације и потреба за коронарном реваскуларизацијом путем бајпас хирургије. Одзив реактивног лечења на повреду балона доводи до интималне хиперплазије - главног механизма одговорног за рестенозу. Ангиографске студије су показале да се интималне дисекције спонтано залече након три до четири недеље од процедуре.²⁰⁹

Рестеноза након успешне ангиопластике јавља се обично у првих шест месеци и може се дефинисати ангиографски и клинички. Ангиографска рестеноза представља сужење веће од 50% дијаметра крвног суда на месту претходне интервенције а клиничка рестеноза представља поновну појаву ангинозних тегоба уз доказану исхемију у зони леченог крвног суда на неинвазивним тестовима. Патофизиолошки процес је сложен и подразумева ране, средње и касне промене (три месеца након РОВА). Хистолошке промене повезане са

Слика 9. Ефекти коронарне балон ангиопластике на нивоу ткива



процесом зарастања почињу са ћелијском инфилтрацијом моноцита (постају макрофаги) и лимфоцита, уз накнадну пролиферацију неоинтималних глатких мишића (слика 9). Ове ћелије временом производе екстрацелуларну матрицу која је главно ткиво за стварање рестенозе. У неким случајевима није пронађена интимална пролиферација већ само атеросклеротски плак (обично ексцентричне лезије) у коме се је повлачење зида крвног суда највероватније десило у време спровођења РОВА-е.²¹⁰

Могућност предикције рестенозе је значајна и откривени су бројни клинички, процедурални и ангиографски предиктори поновног јављања сужења али је, нажалост, њихова предиктивна моћ врло мала. Најзначајнији предиктори су дужина сужења, локализација сужења у проксималном сегменту крвног суда а нарочито уколико је сужење локализовано у предњој силазној грани леве коронарне артерије, бифуркациона лезија или хронична оклузија и мали финални дијаметар постигнут на процедури. Применом модерне опреме и савремених балона примарни ангиографски успех РТСА данас прелази 90% (ангиографски успех је дефинисан као визуелно процењен резидуални дијаметар сужења артерије мањи од 50%). У преосталих 10% болесника процедура је неуспешна због немогућности да се кроз сужење артерије пласира жица-водич или балон катетер, немогућности да се сужење прошири упркос избору адекватне величине балон катетера или због акутне оклузије крвног суда. Мада се балон ангиопластиком елиминишу ангинозне тегобе готово свих болесника, ризик ургентне bypass операције, процедуралног инфаркта без и са СТ елевацијом) или смрти је још увек око 5%, а учесталост рестенозе која захтева поновну процедуру или бајпас хирургију прелази 30%.²⁰⁵

Клинички параметри повезани са мањим процедуралним успехом су нестабилна ангина, старија животна доб и женски пол. Ангиографске карактеристике коронарне стенозе представљају најзначајнији параметар примарног успеха процедуре и ризика појаве компликација. Карактеристике сужења које нису погодне за РТСА су: дугачке стенозе, ексцентричне, ангулиране, калцификоване, лоциране на остијуму артерије или на месту бифуркације, као и лезије са видљивим присуством тромба. РТСА има, такође, значајно мањи примарни успех код хронично оклудираних артерија (до 70 %), код којих се и након успеле примарне реканализације рестеноза поново јавља у више од половине болесника а од једне трећине манифестује се поновном тоталном оклузијом. Популација болесника са сужењима на венским bypass графтовима је такође с високим ризиком за интервенцију

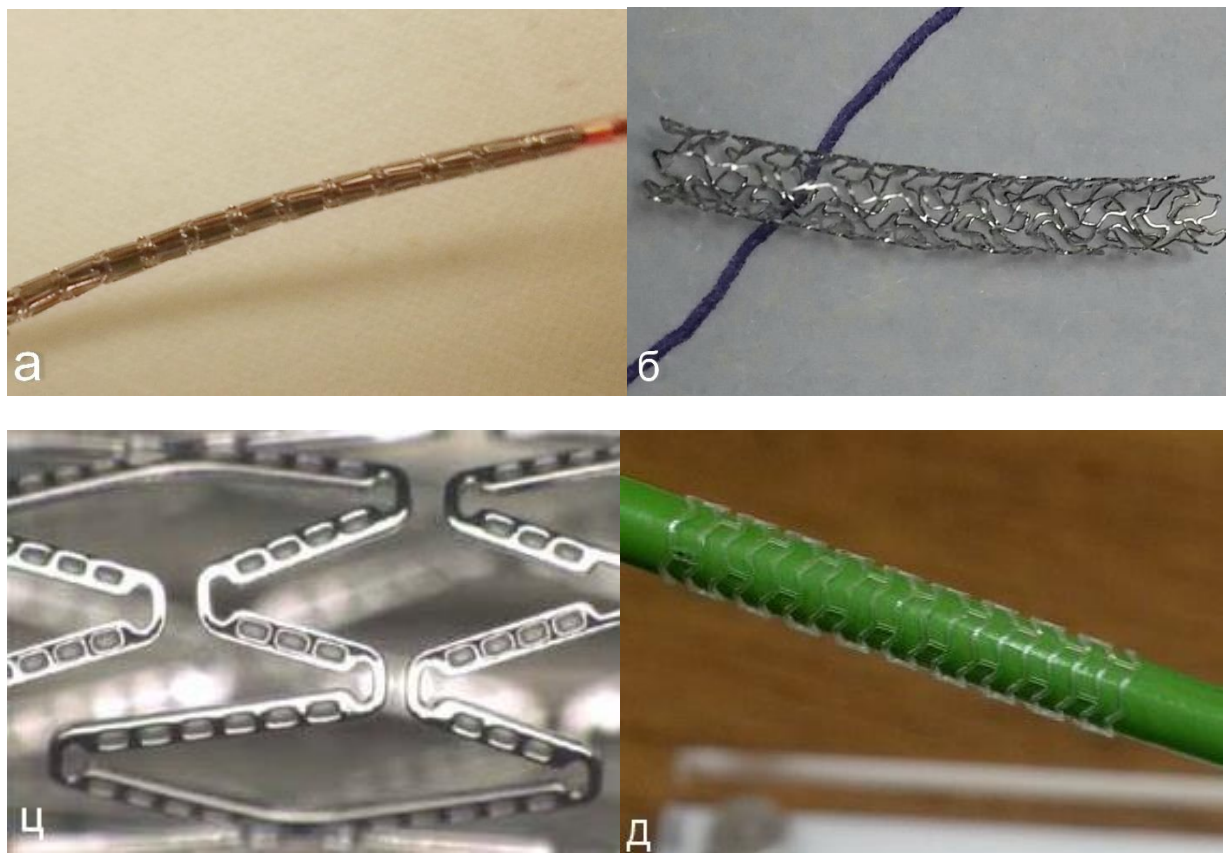
балон ангиопластиком због честих процедуралних компликација и високог процента рестенозе.

Балон ангиопластика представља интегрални део савремених перкутаних процедура пре свега, ради предилатације сужења пре имплантације стента или ради оптимизације резултата постдилатацијом уграђеног стента, али и као метода дефинитивног лечења у одређеним индикацијама. Иако је развој нових метода реваскуларизације значајно смањио примену изоловане балон ангиопластике као дефинитивне методе лечења, и даље има своју примену и има довољно доказа да успешна ангиопластика може имати добре дугорочне резултате. Често се поставља питање када треба применити балон ангиопластику као примарну опцију лечења коронарне болести. На основу нових сазнања о физичким и целуларним механизмима деловања балон ангиопластике и на основу резултата рандомизованих студија које су поредиле балон ангиопластику и стентове ова метода се може препоручити у следећим индикацијама: 1) код болесника код којих је продужена примена антиагрегационе терапије ризична или контраиндикована, 2) код болесника код којих постоји хиперсензитивност на метале од којих су израђени коронарни стентови, 3) лечење циљног сужења (culprit lesion) у акутном коронарном синдрому код болесника који су индиковани за хируршку реваскуларизацију миокарда због анатомије која није подесна за перкутану реваскуларизацију, 4) немогућност да се пласира коронарни стент, 5) лечење сужења на месту дисталне анастомозе bypass графта и 6) код лечења бочне гране бифуркационих сужења.^{205,211,212}

1.5.1. Коронарни стентови

Коронарни стент представља металну опругицу (федерчић) који се уводи у крвни суд на место сужења ношен балоном на који је намонтиран (слика 10) и затим се надувавањем балона под високим притиском утискује у зид крвног суда попут арматуре која треба да одржи суд отвореним (слика 11). На тај начин се уградњом стента елиминишу два основна проблема која карактеришу балон ангиопластику, еластично сужавање артерије као

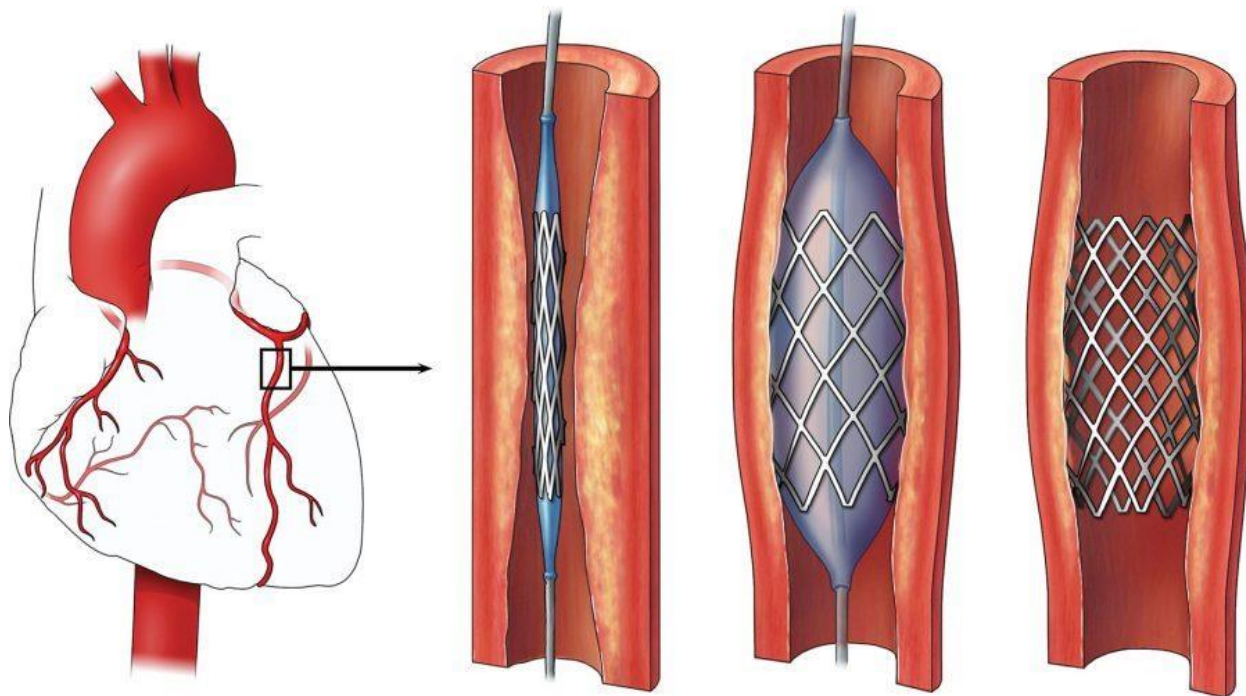
Слика 10. а) коронарни стент монтиран на балон; б) експандиран метални стент; ц) жичице стента са резервоарима за депоновање лека; д) биоресорбилни стент.



одговор на баротрауму и фиксирање дисекција насталих у зиду артерије. Први пут је стент уграђен у коронарну артерију 1986. године. Појава интракоронарних стентова значајно је смањила акутне исхемијске компликације балон ангиопластике, као и учесталост рестенозе, али је знатно повећала цену интервенције и отворила нови проблем рестенозе унутар стента, за који се и даље тражи оптимално решење. Док су самоослобађајући стентови изгубили на значају због високе учесталости тромбоза, стентови премонтирани на балон су у бројним рандомизованим студијама потврдили своју ефикасност и безбедност у широком дијапазону клиничких индикација. Унапређење технологије производње стентова, придружене фармакотерапије и искуства оператора резултирали су широком прихваћеношћу стентова као основног вида нехируршке терапије коронарне болести. Заједно са разним модалитетима атеректомије, процедуре у којима се

имплантира стент се данас третирају као перкутана коронарна интервенција (PCI), ради диференцирања од конвенционалне балон ангиопластике (PTCA).^{211,212}

Слика 11. Позиционирање и експанзија стента у коронарну артерију



Појава рестенозе након уградње стента је резултат превасходно неоинтималне пролиферације као одговор на трауму суда за разлику од балон ангиопластике код које је механизам настајање рестенозе претежно негативно ремоделовање крвног суда.²¹³ Смањење учесталости рестенозе за 30% након уградње стента у односу на конвенционалну PTCA, које су показале прве рандомизирани студије, није резултат мање неоинтималне пролиферације (која је чак већа од стентова), већ пре свега већег процедуралног дијаметра лумена суда и елиминисања акутног еластичног сужавања артерије. У табели 3 су приказани клинички, ангиографски и процедурални предиктори ин-стент рестенозе. Лечење уградњом коронарних стентова такође носи одређени процедурални ризик, као и путем балон дилатације, који је свакако мањи у центрима са великим бројем процедура и искусним операторима. Могуће компликације током процедуре су: смрт (0,2%), акутни инфаркт миокарда који захтева ургентну bypass

хирургију (до 1%), тампонада срца (0,5%), емболијски шлог (0,5%), системско крварење (0,5%).²¹⁴ Инфаркт миокарда са СТ елевацијом јавља се у 1–2% лечених болесника док је учесталост инфаркта без СТ елевације до 5%, зависно од класификације која се користи. Недавно публикована метаанализа свих рандомизованих студија рутинске имплантације стента у односу на оптималну балон ангиопластику указала је на неколико значајних чињеница: 1) рутинска уградња стентова не доводи до значајног смањења морталитета,

Табела 3. Фактори ризика за појаву ин-стент рестенозе

Клинички фактори:

1. дијабетес мелитус
2. претходна перкутана коронарна реваскуларизација

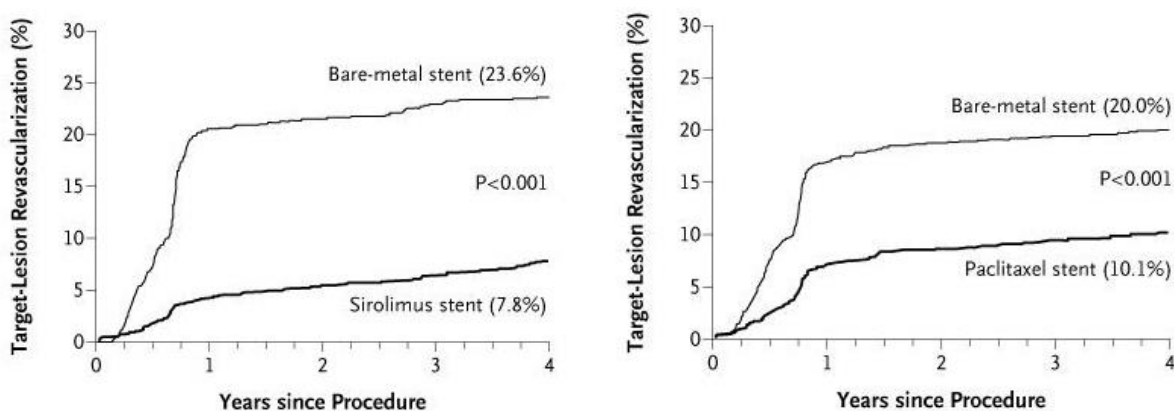
Ангиографски и процедурални фактори:

1. мали референтни дијаметар крвног суда (мањи од 2,5 mm),
2. дуже лезије (лезије дуже од 10 mm),
3. хроничне тоталне оклузије (трајање оклузије више од 3 месеца),
4. бифуркационе лезије,
5. остијалне лезије (лоциране унутар 3 mm од остијума),
6. лезија не предњој силазној грани леве коронарне артерије (LAD),
7. лезије у венским графтовима,
8. финални минимални дијаметар лумена ,
9. имплантација више од једног стента и
10. дизајн стента (отворени, затворени и интермедијарни).

акутног инфаркта миокарда и хируршке реваскуларизације у односу на балон ангиопластику са провизорном уградњом стента; 2) примена коронарних стентова доводи до значајног смањења учесталости ангиографске рестенозе и потребе за поновном перкутаном реваскуларизацијом, мада овај ефекат варира у зависности од дизајна студије.²¹⁵ Појава стентова обложених лековима представља сигурно најзначајнији корак напред ка елиминисању рестенозе. За облагање стента користе се различити цитотоксични, цитостатички, антиинфламаторни и антипролиферативни лекови, попут

сиролимуса и његових деривата еверолимуса, зотаролимуса, биолимуса, као и деривати таксола. Лек је утопљен у танак полимер на површини стента, одакле се полако отпушта у зид крвног суда неколико недеља након уградње стента. Тако лек достиже терапијску концентрацију локално, у ткиву крвног суда, и не детектује се системски те нема нежељених системских ефеката. Лекови су углавном имunosупресиви који заустављају пролиферацију ћелија и на тај начин процес који доводи до рестенозе у стенту. Сиролимус је природна имunosупресивна супстанца која зауставља пролиферацију ћелија у G1-фази ћелијског циклуса и његова примена на стенту показала је значајно смањење нежељених срчаних догађаја, смрти, инфаркта миокарда и потребе за поновном ревакуларизацијом у односу на идентичан али необложен стент (8,6% vs. 21,0%).²¹⁶ Други лек који се користи за облагање стентова је паклитаксел који преко инхибиције микротубула зауставља ћелијску деобу у M-фази и његова примена на стенту је такође значајно смањила учесталост ангиографске рестенозе у односу на необложен стент (7,9% vs. 26,6%).²¹⁷ Клиничко праћење болесника до 4 година након уградње ове две врсте стента показало је одрживост добрих резултата, са значајним смањењем потребе за поновном интервенцијом и без појаве касних сужења унутар стента (слика 12).²¹⁸

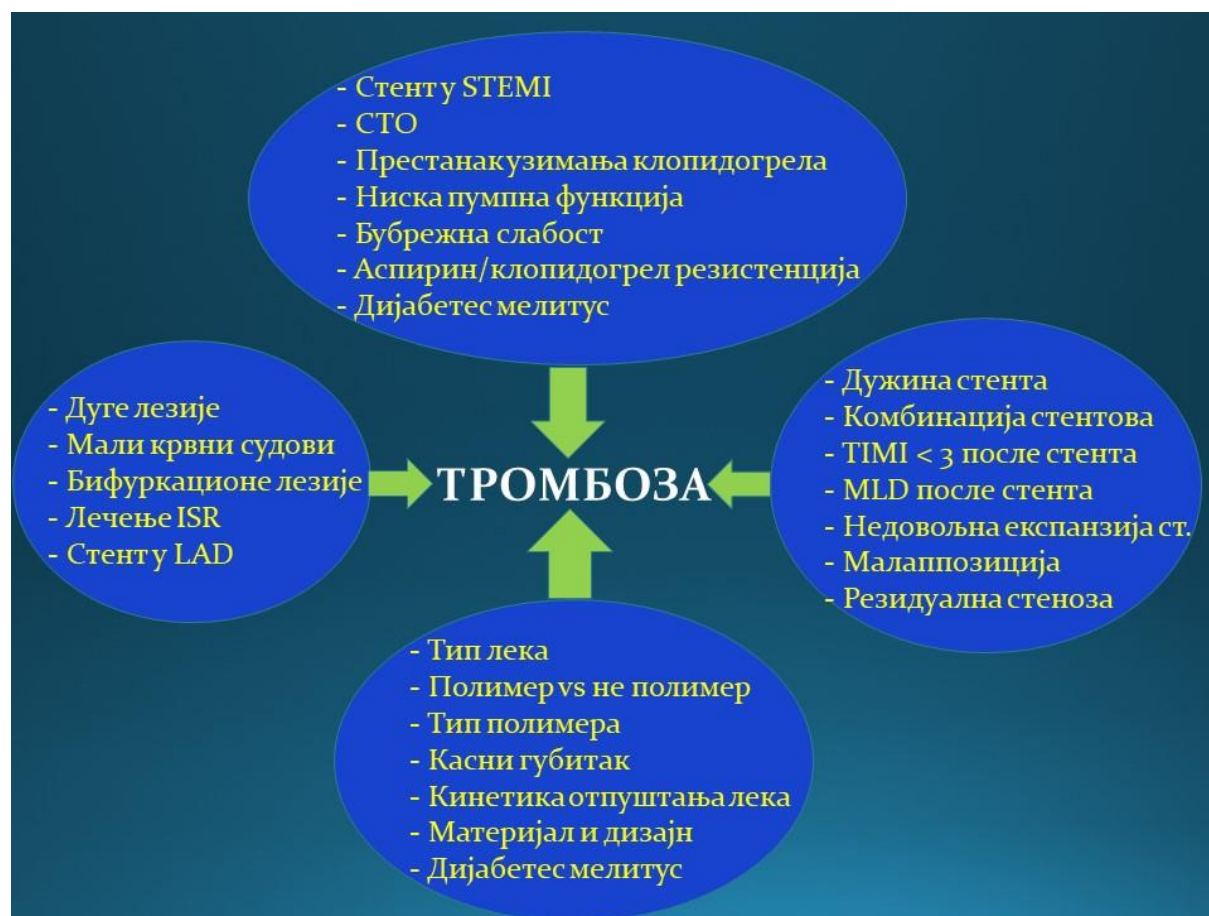
Слика 12. Поновна ревакуларизација током четири године клиничког праћења болесника лечених стентовима са леком и необложених стентова



Скорашња метаанализа 38 рандомизованих клиничких студија које су обухватиле више од 18 000 болесника и директно поредиле стентове обложене леком и обичне, необложене

стендове, показала је следеће: 1) у периоду праћења до четири године након реваскуларизације нема разлике у морталитету и учесталости инфаркта миокарда између две групе болесника, 2) нема разлике у укупној учесталости тромбозе стента између два типа стента, али је учесталост касних тромбоза стента (након 30 дана од процедуре) нешто виша код стентова са леком; 3) стентови са леком значајно смањују потребу за поновном реваскуларизацијом у односу на обичне стентове 30–70%, зависно од типа сужења), а тај ефекат је израженији код стентова обложених сиролимусом у односу на стентове обложене паклитакселом.²¹⁹ Поред предности које стентови са леком имају у односу на оне без лека, они доносе и неке недостатке. Имају мању ефикасност од оне која се очекује код изразито комплексних лезија, попут бифуркација, тоталних оклузија као и код пацијената са дијабетесом или вишесодувном коронарном болешћу.²²⁰

Слика 13. Мултифакторијална етиопатогенеза тромбозе стента



Врло значајно ограничење употребе свих коронарних стентова и једна од најзначајнијих компликација је тромбоза стента. Она може бити акутна (у прва 24h часа), субакутна (од другог до тридесетог дана након процедуре) и касна тромбоза (након тридесетог дана). Код две трећине болесника, тромбоза стента се манифестује акутним инфарктом миокарда или смртним исходом. Тромбоза стента је проблем у чијој основи је мултифакторијална етиологија и најзначајнији фактори који утичу на појаву тромбозе стента приказани су на слици 13. Разни процедурални параметри представљају главне предиспонирајуће факторе за појаву раних тромбоза стента, попут дијаметра стенозе крвног суда пре и након интервенције, број и дужина имплантираних стентова и незалечене дисекције крвног суда, док на појаву субакутних тромбоза утичу и поједини клинички фактори, попут ниске ејекционе фракције, бубрежне слабости, дијабетеса или старости. Иницијална истраживања су показала су да су предуслови елиминисања тромбозе стента оптимална експанзија стента уз потпуно покривање лезије и примена комбиноване, двојне, антиагрегационе терапије, са аспирином и тиклодипином (или клопидогрелом). Ове налазе је након тога потврдило више рандомизираних студија. Посебно забрињавајући проблем стентова обложених леком је врло касна тромбоза, она која се јавља више од годину дана након процедуре. Најзначајнији предиктор појаве тромбозе стента са леком у првих 12 месеци након уградње јесте прерани престанак узимања двојне антиагрегационе терапије, који је најчешће због потребе за несрчаном хирургијом. Оптимална медикаментна терапија за ове болеснике даље није прецизно дефинисана али се предлаже да се настави с узимањем Аспирина и за време операције јер је већину интервенција могуће безбедно урадити и под терапијом Аспирином. Врло касна тромбоза стента обложеног леком има учесталост од 0,4–0,6% годишње али то не резултира значајним повећањем морталитета или инфаркта код ових болесника у односу на болеснике лечене обичним стентом.²²¹ Осим превременог прекидања двоструке антиагрегационе терапије, значајан фактор за појаву тромбозе стента јесте и појава резистентности појединих болесника на аспирин или клопидогрел. Ризик тромбозе стента се значајно смањује након реендотелизације крвног суда па се интензивна антиагрегациона терапија након уградње обичног стента може обуставити након месец дана.^{211,212} Посебан проблем представља појава касних тромбоза стентова обложених леком па је једна од мера превентиве против ове компликације и продужено узимање двојне антиагрегационе терапије (аспирин и

клопидогрел) у периоду од најмање 12 месеци након процедуре а код болесника са мањим ризиком од крварења и дуже. Због тога је данашњи став да се болесницима код којих се очекује хируршка интервенција у блиској будућности не уграђују стентови обложени леком.

1.5.2. Антитромбоцитна терапија

Антиромбоцитна терапија је од пресудног значаја код пацијената који се припремају за PCI или којима је учињена PCI са имплантацијом стента. Значај антиромбоцитне терапије се огледа у томе што су стентови обично тромбогени, јер су углавном направљени од легура нерђајућег челика или кобалта хрома, од којих већина предиспонира тромбозу. Рана истраживања која користе старе технике постављања стента показала су да је акутна или субакутна тромбоза настала у приближно 18% случајева. Када се развија, тромбоза стента се јавља у првој седмици након ангажовања у више од 80% случајева са обичним металним стентовима и током првог месеца у преко 35 процената случајева са стентовима који отпуштају лек. Континуирано коришћење двојне антиромбоцитне терапије (DAPT) у трајању од годину дана или дуже код пацијената са стентовима са леком се сада препоручује ради смањења стопе тромбозе стента.²²²

Стентови коронарних артерија, посебно стентови који отпуштају лек (DES), користе се код већине пацијената који иду на перкутану коронарну интервенцију (PCI) ради побољшања симптома. Они функционишу двоструко; спречавају нагло затварања стентираних артерија убрзо након процедуре, и смањењу потребу за поновном реваскуларизацијом у поређењу са балон ангиопластиком. Тромбоза стента је неуобичајена али озбиљна компликација која се често завршава смртним исходом и готово увек је праћена инфарктом миокарда (ИМ), обично са елевацијом ST сегмента. Чини се да се кумулативна инциденца тромбозе стента јавља сличном фреквенцијом код пацијената са обичним металним стентом (BMS) или DES, све док се пацијенти лече двојном антиагрегационом терапијом за препоручено трајање за одређени стент. DAPT (аспирин плус блокатор P2Y₁₂ тромбоцитног рецептора) значајно смањује ризик од тромбозе стента. У одсуству DAPT-а, период високог ризика за тромбозу стента је дужи уколико је имплантиран DES него BMS због кашњења неоинтималне пролиферације.^{223,224}

Аспирин представља константну компоненту у DAPT. Он се даје свим пацијентима који иду на PCI са имплантацијом стента да би смањили вероватноћу раних компликација. Ова препорука заснива се првенствено на подацима из рандомизираних испитивања аспирина или аспирин плус дипидамола у односу на плацебо, код пацијената који иду на PTCA пре развоја стента.^{225,226} Изгледа да дуготрајна терапија аспирином смањује инциденцу касне тромбозе стента, с обзиром на то да је прекид аспирина повезан са овом компликацијом у оба случаја, и код имплантације BMS и DES. Не постоје добри подаци за препоручивање већих доза аспирина, а нарочито за пацијенте са повећаним ризиком од озбиљног крварења (на пример, они који примају хроничну антикоагулантну терапију са варфарином), мања доза може бити прикладнија.

P2Y₁₂ рецептор инхибитори, тиклодипин, клопидогрел, прасугрел, тикагрелор и кангрелор представљају групу лекова који чине другу компоненту у двојној антиагрегационој терапији и постижу свој антиромбоцитни ефекат блокирањем везивања ADP-а за специфични тромбоцитни рецептор P2Y₁₂ који активира протеин G₁, чиме се инхибира аденилил циклаза и агрегација тромбоцита.^{227,228} Терапијска примена P2Y₁₂ рецептор инхибитора приказана је на слици 14. Процењени број пацијената који захтевају двојну антиромбоцитну терапију, који се састоји од комбинације аспирина и оралне инхибитора рецептора тромбоцита P2Y₁₂ за ADP, је значајан и током времена је повећан у Европи. На основу процене становништва из 2015. године, у региону од 1400000 и 2200000 пацијената годишње може имати индикацију за DAPT након коронарне интервенције или инфаркта миокарда.²²⁹ Ове године, 2017, је 21. годишњица објављивања прво рандомизовано клиничко испитивање за утврђивање супериорности DAPT у односу на антикоагулантну терапију код пацијената који пролазе кроз перкутану коронарну интервенцију. На основу више од 35 рандомизованих клиничких испитивања, укључујући више од 225 000 пацијената, DAPT је међу најзанимљивијим истраживаним опције лечења у области кардиоваскуларне медицине.²²⁸ Клопидогрел и тиклопидин, који представљају, иреверзибилне инхибиторе ADP P2Y₁₂ рецептора, су у великој мери испитани, током и после процедуре, а затим и када се дају пре интервенције у фази припреме за процедуру и имплантацију стента. **Тикагрелор и прасугрел** се примарно користе код пацијената са акутним коронарним синдромом. Прасугрел није регистрован за примену у Србији, док се тикагрелор све чешће примењује због његове значајне предности у односу на

клопидогрел, када се упоређују пацијенти са АКС, што је показала студија PLATO.²³⁰ **Кангрелор** је лек за интравенску примену који је упоређиван са клопидогрелом у перипроцедуралном периоду и превасходно се користи за брз настанак дејства, као и могућност брзог престанка дејства код пацијената који ће бити кандидати за хируршку реваскуларизацију миокарда.

Слика 14. Препоруке за примену P2Y₁₂ инхибитора из 2017. године²²⁸

Recommendations on P2Y ₁₂ inhibitor selection and timing		
Recommendations	Class ^a	Level ^b
In patients with ACS, ticagrelor (180 mg loading dose, 90 mg twice daily) on top of aspirin ^c is recommended, regardless of initial treatment strategy, including patients pre-treated with clopidogrel (which should be discontinued when ticagrelor is commenced) unless there are contraindications. ²⁰	I	B
In patients with ACS undergoing PCI, prasugrel (60 mg loading dose, 10 mg daily dose) on top of aspirin is recommended for P2Y ₁₂ inhibitor-naïve patients with NSTEMI-ACS or initially conservatively managed STEMI if indication for PCI is established, or in STEMI patients undergoing immediate coronary catheterization ^c unless there is a high risk of life-threatening bleeding or other contraindications. ²³	I	B
Pre-treatment with a P2Y ₁₂ inhibitor is generally recommended in patients in whom coronary anatomy is known and the decision to proceed to PCI is made as well as in patients with STEMI. ^{20,23,38}	I	A
In patients with NSTEMI-ACS undergoing invasive management, ticagrelor administration (180 mg loading dose, 90 mg twice daily), or clopidogrel (600 mg loading dose, 75 mg daily dose) if ticagrelor is not an option, should be considered as soon as the diagnosis is established.	IIa	C
In patients with stable CAD, pre-treatment with clopidogrel may be considered if the probability of PCI is high.	IIb	C
Clopidogrel (600 mg loading dose, 75 mg daily dose) on top of aspirin is recommended in stable CAD patients undergoing coronary stent implantation and in ACS patients who cannot receive ticagrelor or prasugrel, including those with prior intracranial bleeding or indication for OAC. ^{20,23,39,40}	I	A
Clopidogrel (300 mg loading dose in patients aged ≤75, 75 mg daily dose) is recommended on top of aspirin in STEMI patients receiving thrombolysis. ^{31,32}	I	A
Ticagrelor or prasugrel on top of aspirin may be considered instead of clopidogrel in stable CAD patients undergoing PCI, taking into account the ischaemic (e.g. high SYNTAX score, prior stent thrombosis, location and number of implanted stents) and bleeding (e.g. according to PRECISE-DAPT score) risks.	IIb	C
In NSTEMI-ACS patients in whom coronary anatomy is not known, it is not recommended to administer prasugrel. ²⁵	III	B

Тиклопидин је прва генерација тиенопиридина који је широко коришћен за превенцију тромбозе стента, али због својих нежељених хематолошких компликација, пре свега неутропеније, и немогућности да доведе до брзе инхибиције тромбоцита, скоро се више не користи.²³¹

Клопидогрел је друга генерација тиенопиридина, који се је, у комбинацији са аспирином, показао као супериорнији у односу на оралне антикоагулансе у превенцији тромботичких компликација након стентирања коронарних артерија.³ Клопидогрел селективно и

преверзибилно инхибира P2Y₁₂ рецепторе³ и бољи је избор од тиклопидина јер је ефективнији, дозира се једном дневно и има мањи број нежељених ефеката, посебно далеко мање хематолошких компликација. Највећа предност клопидогрела над тиклопидином укључује бољи сигурносни профил²³¹ и могућност да доведе до бржег антитромбоцитног ефекта путем ординирања ударне (loading) дозе.²³² Чињеница да се клопидогрел добро толерише у високим дозама утиче на то да унутар пар сати може постићи антитромбоцитни ефекат.²³² Ово има значајну клиничку примену код пацијената са АКС и PCI, код којих тромбоцитна оклузија (нпр. реинфаркт и тромбоза стента) најчешће настаје унутар 24 до 48 сати. Као додатак бољој сигурности и фармакодинамском профилу, постоје и подаци да употреба тиенопиридина друге генерације води бољем клиничком исходу.²³³ У ствари, сакупљени подаци више од 10000 пацијената који су ишли на PCI, показали су нижи степен учесталости нежељених кардиолошких догађаја током 30 дана лечења са клопидогрелом него са тиклопидином.²³³ Свеукупно, сигурност, фармакодинамика и клиничка предност клопидогрела је учинила да дође до знатно шире употребе клопидогрела над тиклопидином као антитромбоцитног лека избора за пацијенте који иду на PCI.²³⁴

Сигурност и ефикасност клопидогрела је испитана у великом броју клиничких студија. Испитивања су спроведена код пацијената са различитим манифестацијама атеротромботских болести укључујући исхемијску болест срца, цереброваскуларну болест и периферну артеријску болест. У CLASSICS студији (Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study) испитивана је сигурност и толеранција клопидогрела у поређењу са тиклопидином.²³¹ Нежељени догађај (велике компликације периферних артерија или велика крварења, тромбоцитопенија, неутропенија или рано укидање лека због нежељеног догађаја) значајно је смањен код пацијената који су били лечени клопидогрелом (4,6% у односу на 9,1% са тиклопидином). Слични резултати су добијени и у другој студији.²³⁵ CURE студија (Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events) је испитивала исход код пацијента на терапији клопидогрелом плус аспирин у поређењу са аспирином самим код 12562 пацијента са нестабилном ангином или инфарктом миокарда без СТ елевације.²³⁶ Пацијенти су рандомизирани да примају клопидогрел (300 mg ударна доза и 75 mg у наставку) или плацебо са додатком аспирина током једне године. Пацијенти на клопидогрелу и аспирину су имали значајно смањење

примарног догађаја (укупна васкуларна смрт, инфаркт миокарда или шлог) за значајних 20% у поређењу са пацијентима који су били на терапији аспирином и плацебом ($p < 0,001$). Значајније више пацијената у групи са клопидогрелом и аспирином је имало велика крварења (3,7% vs 2,7%), али није било разлике у животно угрожавајућим крварењима. У PCI-CURE студији,²³⁷ која је испитивала је 2658 пацијената из CURE студије којима је учињена PCI, узимање клопидогрела пре интервенције и наставак терапије дугорочно након интервенције, се је показало као супериорније у односу на стратегију без узимања клопидогрела пре интервенције и краткотрајне терапије клопидогрелом током 4 недеље након PCI интервенције (31% смањење кардиоваскуларне смрти и инфаркта миокарда; $p = 0,002$). У CREDO (Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation) студији, рандоминизираној, двоструко слепој, плацебо контролисаној студији, испитивано је 2116 пацијената који су планирани за елективну PCI или је била велика вероватноћа да ће бити кандидати за PCI.²³⁸ Након годину дана, дуготрајна терапија клопидогрелом је удружена са релативним смањењем ризика од 26% у комбинованом ризику од смрти, инфаркта миокарда или шлога ($p = 0,02$). Припрема за PCI клопидогрелом (300 mg ударна доза) није значајно смањила комбиновани ризик од смрти, инфаркта миокарда или ургентне реваскуларизације циљног крвног суда током 28 дана од интервенције. Међутим у анализама предефинисане подгрупе, пацијенти који су примили клопидогрел најмање 6 сати пре интервенције имали су релативно смањење ризика за 38,6% у односу на групу где није било смањење ризика и где је клопидогрел ординирао у времену које је мање од 6 сати од интервенције. У анализама студије CREDO, разлика у исходу између плацебо групе и групе која је пре интервенције добијала клопидогрел није значајна осим уколико је припрема клопидогрелом ординирао 15 сати пре интервенције, када је смањење ризика 58,8% у примарном финалном исходу код пацијената којима је клопидогрел ординирао 15 и више сати пре интервенције.²³⁹ Ризик од великог крварења се повећава током годину дана али не значајно.

Клопидогрел је јек који је коришћен и у нашој студији заједно са аспирином ради испитивања удружености стресом узроковане исхемије, квантификоване добутамин стрес ехокардиографијом и промене у функцији тромбоцита и антикоагулантних протеина, код пацијената након PCI, која до сада још није испитана.

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

2.1. Главни циљеви испитивања

1. Одредити агрегабилност тромбоцита на ADP и епинефрин непосредно пре и након добутамина стрес ехокардиографског теста, 4 месеца од PCI код болесника на двојној антиагрегационој терапији.
2. Одредити активност антикоагулантног система протеина C и антитромбина непосредно пре и након добутамина стрес ехокардиографског теста, 4 месеца од PCI код болесника на двојној антиагрегационој терапији.
3. Регистровати и квантификовати регионални поремећај контрактилности миокарда - исхемију на максималној дози добутамина.
4. Утврдити хемостазне промене при максималној дози добутамина.
5. Утврдити везу између параметара хемостазе и стресом узроковане миокардне исхемије која је квантификована добутамина стрес ехокардиографијом
6. Утврдити везу између параметара хемостазе и систолне функције леве коморе пре и након добутамина стрес теста.

2.2. Радне хипотезе испитивања

1. Постоји позитивна корелација између исхемије и агрегабилности тромбоцита.
2. Постоји негативна корелација између активности антикоагулантних протеина и систолне функције леве коморе.

3. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ:

3.1. Општи дизајн студије: клиничка проспективна, дијагностичко фундаментална студија

3.1.1. Испитаници:

Студијом је обухваћен 121 пацијент са исхемијском болешћу срца коме је планирана перкутана коронарна интервенција (PCI). Најмање 5 дана пре интервенције, пацијенти су били на двојној антиагрегационој терапији (Аспирин 100 mg + Клопидогрел 75 mg). Свим пацијентима је учињена PCI четири месеца пре укључивања у студију и нису имали ангинозних тегоба. Испитаници су у тренутку спровођења PCI имали различите клиничке слике коронарне болести (графикон 2). Просечна старост пацијената укључених у студију је била 58 година и 35% укључених је било женског пола (графикон 1). Свим пацијентима је 2 сата пре теста и при максималном оптерећењу током добутамин стрес ехокардиографије (DSE)^{240,241} узета крв за анализу. Агрегабилност тромбоцита је одређивана методом Light Transmission Aggregometry (LTA)^{3,242} два сата пре теста и при максимуму оптерећења током DSE. Такође је одређена концентрација протеина С и антитромбина у свим узорцима плазме. Основне карактеристике пацијената су приказане у табели 2.

3.1.2. Хемостатски параметри:

Након учињене PCI, четири месеца касније, два узорка крви су узета из брахијалне вене у епрувете које садрже натријум цитрат 3,8%, под минималном стазом, 30 минута након мировања. Два сата након пласирања каниле у брахијалну вену, учињена је DSE. У пику оптерећења са добутамином, узета је венска крв путем претходно пласиране каниле у две епрувете које садрже 3,8% натријум цитрат. Центрифугирањем на 150 x g током 10 минута на собној температури, добијена је плазма богата тромбоцитима (PRP). Одговор агрегације тромбоцита на ADP (20 μ mol/l) снимљен је 5 минута после додатка агониста

користећи аутоматски коагулометар BCS-XP Siemens Healthcare Diagnostics (Marburg, Немачка). За одређивање активности протеина С и антитромбина узета је плазма сиромашна тромбоцитима (PPP), која је цитрирана и центрифугирана на 2000 x g током 15 минута на собној температури и замрзнута на -80 C° до завршног мерења.⁴ Активност протеина С и антитромбина је одређена аутоматским коагулометаром BCS-XP Siemens Healthcare Diagnostics (Marburg, Немачка). Тестови који су се користили за одређивање вредности антикоагулантних протеина су: 1) Berichrom АТШ, за квантитативно одређивање функционално активног АТШ методом хромогеног супстрата и 2) Протеин С за квантитативно одређивање функционално активног РС методом хромогеног супстрата. Све процедуре су спроведене по упутствима произвођача.

3.1.3. Добутамин стрес ехокардиографија:

Код свих болесника четири месеца након PCI учињена је високо-дозна добутамин стрес ехокардиографија. Добутаминска инфузија се отпочиње са 10 µg/kg/min телесне тежине да би се постепено повећавала свака три минута за 10 µg/kg, док се не постигне доза од 40 µg/kg/min. Током сваког степена са различитом дозом добутамина пратио се је крвни притисак и ЕКГ. Такође су праћена сва нежељена дејства током теста са добутамином. Регионалне абнормалности покретљивости зида леве коморе су анализирани у складу са усвојеним шеснаестосегментним моделом поделе леве коморе америчког ехокардиографског кардиолошког друштва. Регионална покретљивост сваког зида леве коморе оцењена је на следећи начин: 1=нормокинезија, 2=хипокинезија, 3=акинезија и 4=дискинезија. Сваки сегмент леве коморе је појединачно оцењен као вијабилан уколико је при ниским дозама добутамина дошло до поправљања његове регионалне контрактилности од почетне акинезије, хипокинезије или дискинезије ка хипокинезији или нормокинезији, док се прелазак дискинезије у акинезију неће бити разматран као маркер вијабилности. Уколико је дошло до погоршања у односу на почетну очуваност покретљивости након апликације добутамина, такви сегменти су оцењени као исхемијски одговори. На основу добијених вредности посматрана је глобална покретљивост леве коморе у базалним условима и након примене малих концентрација инотропног агенса добутамина. Глобална покретљивост је приказана преко индекса покретљивости – Wall

Motion Score Index (WMSI), који представља меру просечног одступања покретљивости сегмента од идеално очуване покретљивости тј. нормокинезије свих 16 посматраних сегмената.

$$WMSI = \frac{\text{бр.нормокинезија} \times 1 + \text{бр.хипокинезија} \times 2 + \text{бр. акинезија} \times 3 + \text{бр.дискинезија} \times 4}{16}$$

16

У физиолошким стањима WMSI износи 1, већа вредност WMSI указује на већи степен дисфункције леве коморе. WMSI је израчунаван у базалним условима и при високим дозама добутамина од 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. Налаз DSE се сматра позитивним када дође до смањења регионалне покретљивости зида леве коморе. Интерпретација стрес ехо теста са добутамином је учињена од стране експерта за ехокардиографију.

3.1.4. Статистичка обрада података:

За статистичку одраду података је коришћен Wilcoxon-ов тест за упоређивање два повезана узорка код популације без нормалне расподеле. Mann-Whitney U тест је коришћен за упоређивање два независна узорка популације која није имала нормалну расподелу. За обраду података коришћен је програм SPSS (Statistical Package for the Social Sciences 20.0 for PC, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Вредности $p < 0,05$ су сматране значајним, док су вредности $p < 0,01$ сматране високо статистички значајним.

4. РЕЗУЛТАТИ

Основне карактеристике пацијената су приказане у табели 4. Мушкарци су чинили 65% испитаника а жене 35% (графикон 1). Од укупног броја испитаника 43% је имало стабилну ангину пекторис, 25% нестабилну ангину пекторис, 17% инфаркт миокарда без ST елевације и 15% инфаркт миокарда са ST елевацијом (графикон 2). Од укупног броја пацијената, 21,6%, односно 26 укупно, је било дијабетичара док су 87 њих били активни пушачи, тј. 71,6%. Број пацијената који је узимао један или више лекова за лечење хипертензије чинило је 116 од укупног броја, односно 95,9%.

Позитиван DSE је регистрован код 26 (22%) пацијената од укупног броја. Испитивањем је утврђено да нема статистички значајне разлике у агрегабилности тромбоцита у оба LTA теста, на ADP (47,50% према 50,20%; $p = 0,970$) и EPI (59,30% према 60,30%; $p = 0,600$) пре и на крају стрес ехо теста, тј. у пику оптерећења. (табела 5).

Табела 4. Основне карактеристике пацијената укључених у студију

Основне карактеристике	n*=121
Године (средња вредност \pm SD)	58 \pm 9
Мушкарци n* (%)	79 (64,9)
Дијабетичари n* (%)	26 (21,6)
Пушачи n* (%)	87 (71,6)
Лечена хипертензија n* (%)	116 (95,9)
Хиперхолестеролемија n*(%)	57 (47,1)
BMI (kg/m ²) (средња вредност \pm SD)	27,05 \pm 3,92
Површина тела (средња вредност \pm SD)	1,97 \pm 0,22
STEMI пацијенти n* (%)	18 (14,9)
NSTEMI пацијенти n* (%)	21 (17,6)
UAP пацијенти n* (%)	30 (24,3)
SAP пацијенти n* (%)	52 (43,2)

*n – број

Графикон 1. Пол испитаника



Графикон 2. Тип коронарне болести



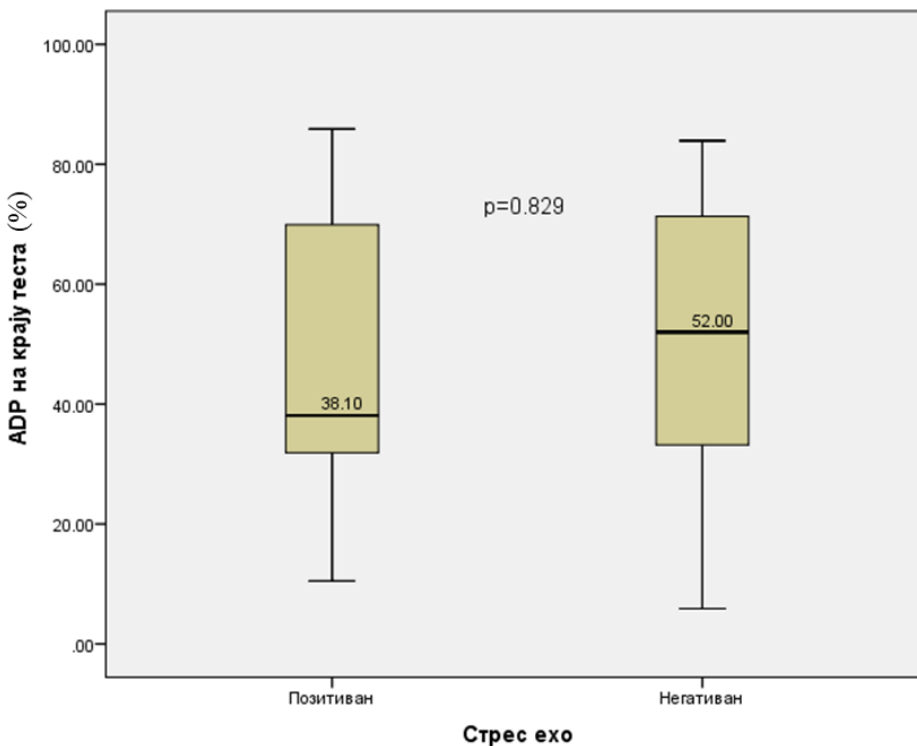
Статистички врло значајна разлика је утврђена у активности антикоагулантних протеина, антиромбина (84,85 IU/L према 74,75 IU/L; $p = 0,001$) и протеина С (77,75 IU/L према 67,60 IU/L; $p < 0,001$) (табела 5). На крају стрес ехо теста са добутамином, тј. у пику оптерећења, утврђен је статистички врло значајан пад концентрације антиромбина и протеина С (табела 5).

Табела 5. Разлике у агрегабилности тромбоцита и активности антикоагулантних протеина пре и на крају стрес ехо теста

Хемостатски параметри	Пре стрес теста медијана (IQR)	На крају теста медијана (IQR)	р вредност
Агрегабилност тромбоцита на ADP	47,50% (31,65-74,40)	50,20% (31,90-71,30)	0,970
Агрегабилност тромбоцита на EPI	59,30% (44,60-74,90)	60,30% (44,50-74,50)	0,600
Активност антиромбина	84,85 IU/L (63,10-98,40)	74,75 IU/L (45,43-92,25)	0,001
Активност протеина С	77,75 IU/L (39,88-105,00)	67,60 IU/L (32,30-97,25)	< 0,001

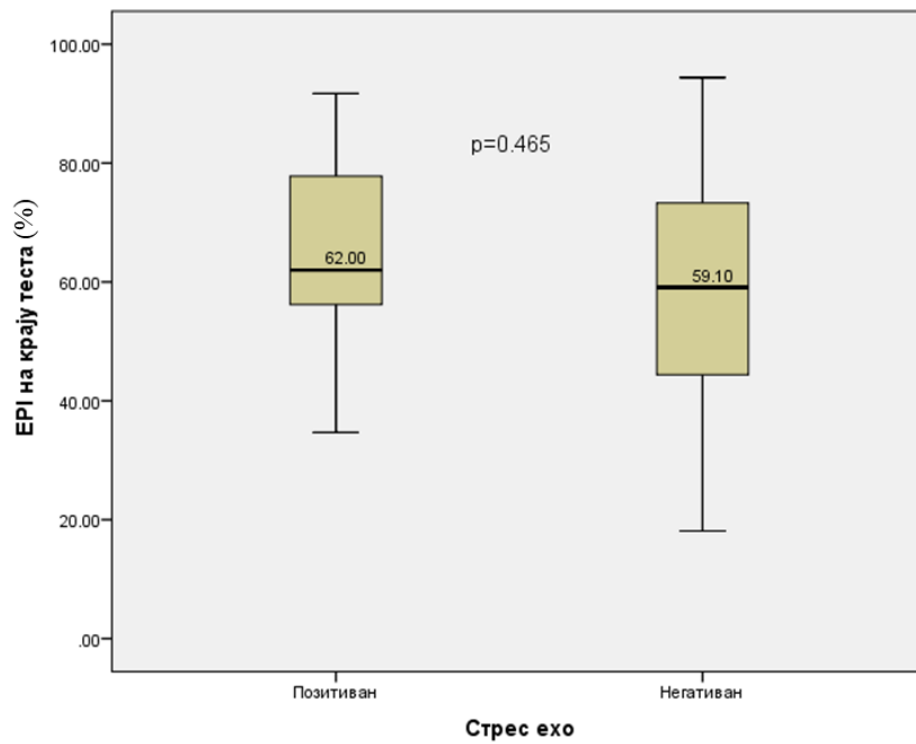
Није било значајне разлике у агрегабилности тромбоцита на ADP у групи пацијената са позитивним и негативним стрес ехо тестом ($p = 0,829$). Група пацијената са позитивним стрес ехо тестом је имала медијану 38,10% са IQR (интер-квартални опсег) од 30,05% до 72,80%, док је са негативним стрес ехо тестом на ADP медијана 52,00% са IQR од 32,65% до 71,35% (графикон 3).

Графикон 3. Медијана у групи пацијената са агрегабилношћу тромбоцита на ADP

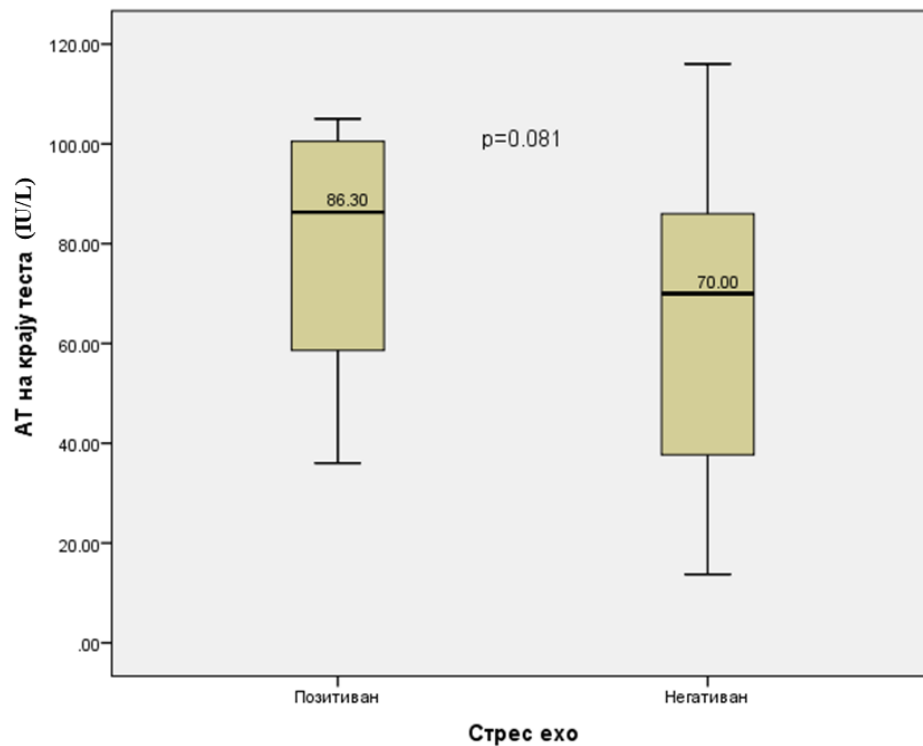


Није било значајне разлике у агрегабилности тромбоцита на EPI у групи пацијената са позитивним и негативним стрес ехо тестом ($p = 0,465$). Група са позитивним стрес ехо тестом је имала медијану 62,00% са IQR од 51,30% до 80,70%, док је са негативним тестом медијана била 59,00% са IQR од 43,83% до 73,60% (графикон 4). Није било статистички значајне разлике у групи пацијената са антитромбином ($p = 0,081$). Група са позитивним стрес ехо тестом је имала медијану 86,30 IU/L са IQR од 58,00 IU/L до 101,25 IU/L, док је са негативним стрес ехо тестом медијана била 70,00 IU/L са IQR од 36,35 IU/L до 87,50 IU/L (графикон 5).

Графикон 4. Медијана у групи пацијената са агрегабилношћу тромбоцита на ЕРІ

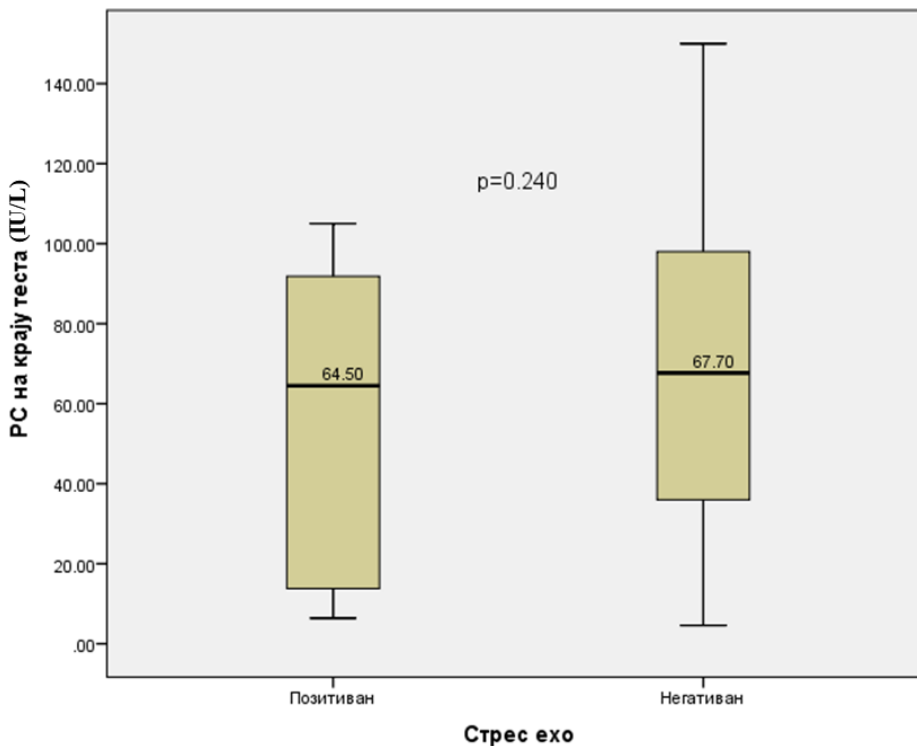


Графикон 5. Медијана у групи пацијената са активношћу АТ



Није било статистички значајне разлике у групи пацијената са протеином С ($p = 0,240$). Група са позитивним стрес ехо тестом је имала медијану 64,50 IU/L са IQR од 11,20 IU/L до 94,43 IU/L, док је група са негативним тестом имала медијану 67,70 IU/L са IQR од 35,10 IU/L до 99,00 IU/L (графикон 6).

Графикон 6. Медијана у групи пацијената са активношћу РС



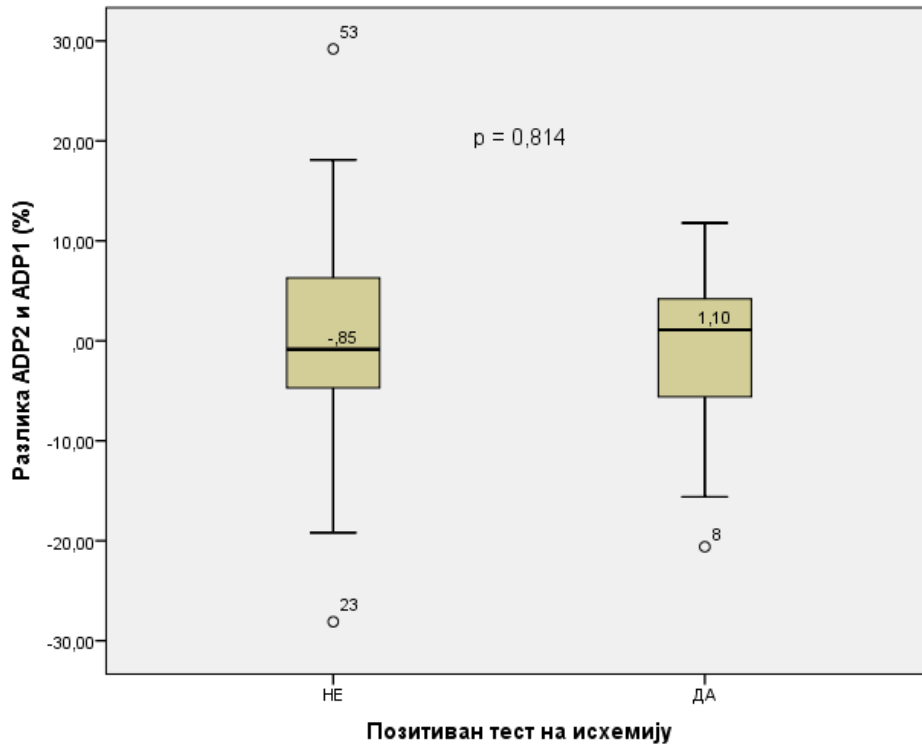
Анализа агрегабилности тромбоцита на ADP и EPI и активности антикоагулантних протеина, на крају стрес ехо теста, у групи пацијената са WMSI-ом једнаким 1,0 или већим од 1,0; показала је да постоји статистички значајна разлика између група у агрегабилности тромбоцита на EPI, док код других параметара, ADP, антитромбин и протеин С, није било статистички значајне разлике (табела 6).

Табела 6. Разлике у агрегабилности тромбоцита и активности антикоагулантних протеина у поређењу са WMSI-ом на крају стрес ехо теста

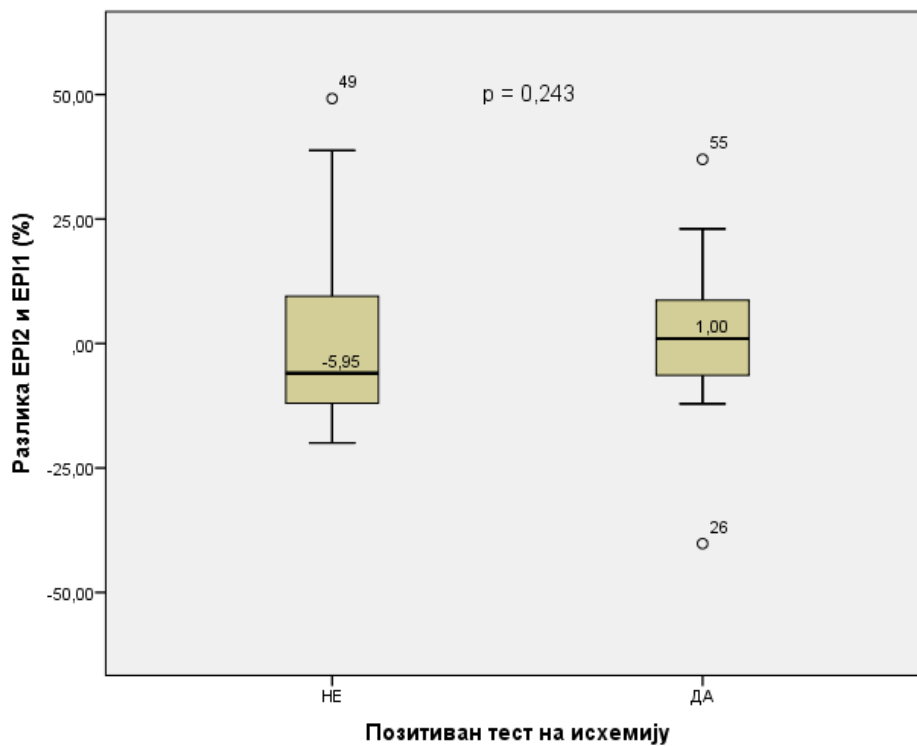
Хемостатски параметри	WMSI = 1 n=64	WMSI > 1 n=57	р вредност
Агрегабилност тромбоцита на ADP медијана (IQR)	49,70% (30,30-66,43)	65,20% (32,75-77,40)	0,275
Агрегабилност тромбоцита на EPI медијана (IQR)	54,70% (41,05-67,48)	68,60% (52,15-85,25)	0,017
Активност антитромбина медијана (IQR)	65,80 IU/L (33,50-82,15)	75,30 IU/L (56,15-98,65)	0,115
Активност протеина С медијана (IQR)	63,00 IU/L (26,35-99,00)	84,00 IU/L (33,40-91,75)	0,921

На основу учињених испитивања, добијени резултати показују да исхемија миокарда није утицала на то каква ће бити разлика за све четири варијабле. За ΔADP $p = 0,814$ (графикон 7), за ΔEPI $p = 0,243$ (графикон 8), за ΔPC $p = 0,834$ (графикон 9), и за ΔAT $p = 0,817$ (графикон 10). Упоредјујући агрегабилносот тромбоцита и активност антикоагулантних протеина по групама, са различитим факторима ризика за ИБС, пре и у пику оптерећења, такође није утврђена разлика у свим групама осим у групи пацијената који су били пушачи и то само на АТ. Регистрован је значајан пораст АТ у пику оптерећења код пушача. (за ΔAT $p = 0,044$) (графикон 11).

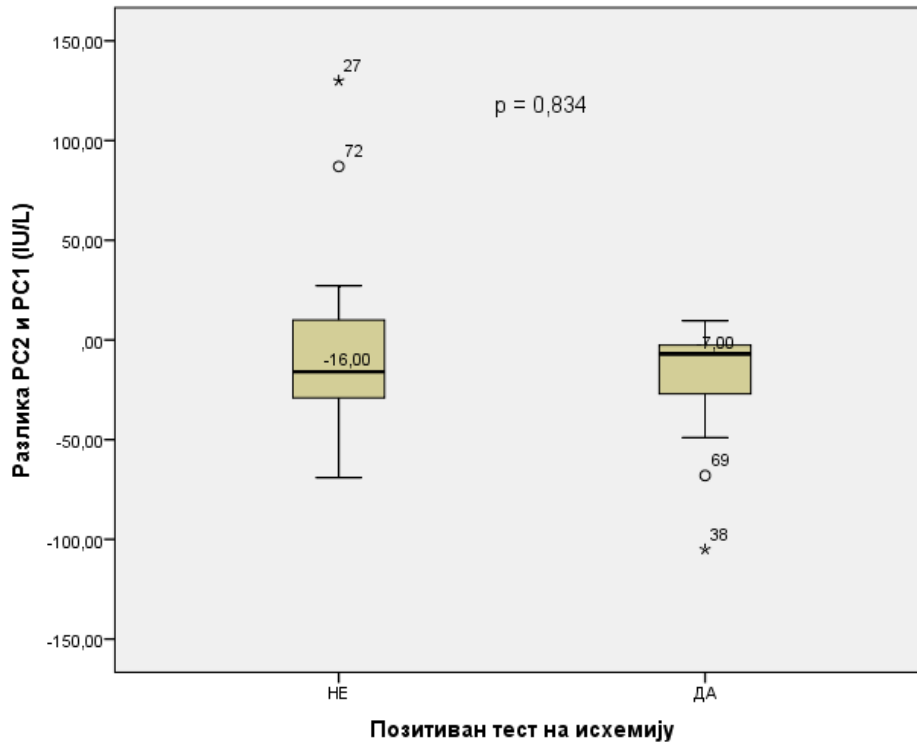
Графикон 7. Разлика у вредности ADP2 и ADP1 у односу на исхемију миокарда



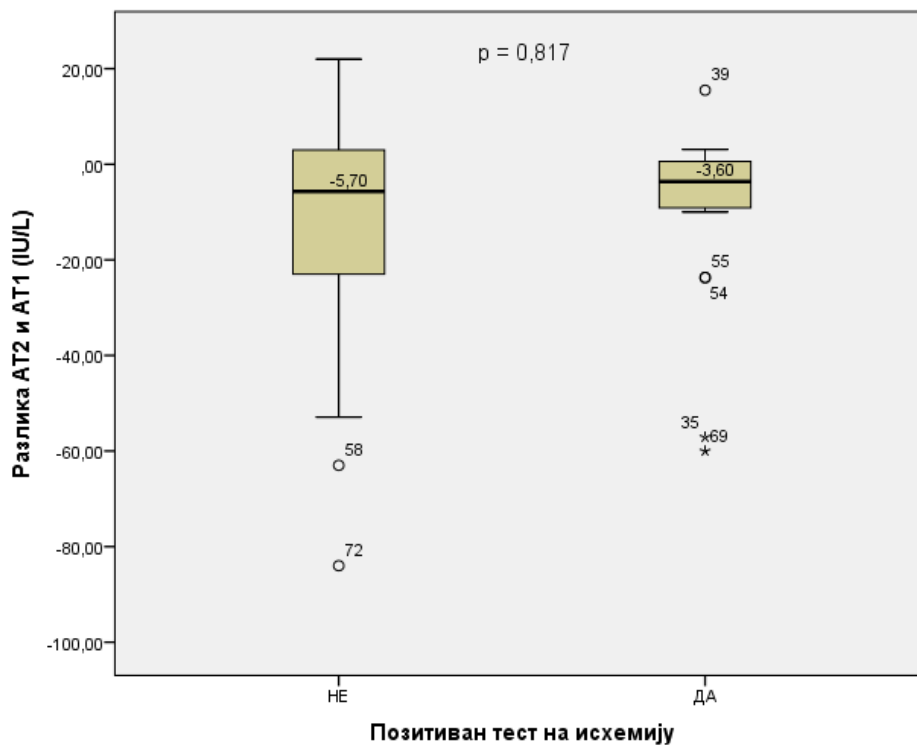
Графикон 8. Разлика у вредности EPI2 и EPI1 у односу на исхемију миокарда



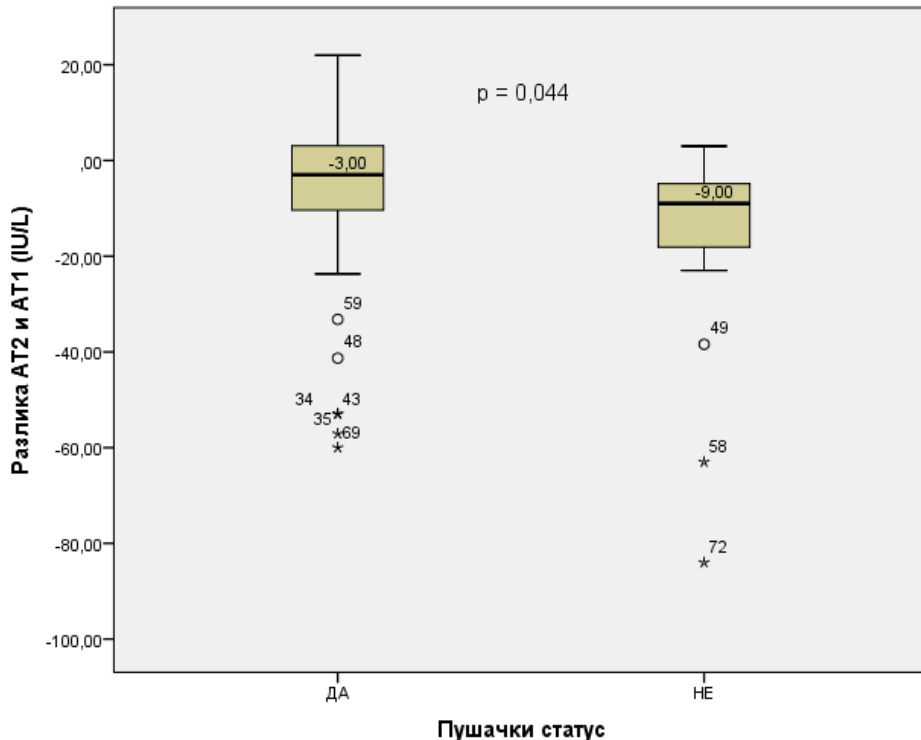
Графикон 9. Разлика у активности PC2 и PC1 у односу на исхемију миокарда



Графикон 10. Разлика у активности AT2 и AT1 у односу на исхемију миокарда



Графикон 11. Разлика у активности АТ2 и АТ1 код пушача



5. ДИСКУСИЈА

Агрегабилности тромбоцита је од великог значаја за пацијенте са исхемијском болешћу срца јер представља фактор који може бити пресудан у развоју коронарног догађаја (изненадну срчану смрт и инфаркт миокард). С обзиром на нестандардизованост тестова којима се испитује агрегабилност тромбоцита и на разноликост фактора који утичу на агрегацију тромбоцита,²⁴⁶⁻²⁴⁸ додатна информација и податак о понашању тромбоцита и антикоагулантних протеина, током доказане исхемије миокарда, може бити од великог значаја за даљи развој контроле коагулационог процеса и тестова агрегабилности. Хиперактивност тромбоцита је значајан елемент комплексног мултифакторијалног патофизиолошког процеса ИБС.²⁴⁹

Анализирајући доступне податке из литературе о утицају физичког и менталног стреса на агрегабилност тромбоцита код пацијената без присуства и са познатом исхемијском болешћу срца, долази се до различитих података. Ипак се на основу свега може извести извесан закључак да а) акутно, напорно вежбање може довести до активације тромбоцита, б) редовна физичка активност и/или вежбање спречавају активацију тромбоцита у одговору на акутно вежбање, барем до одређеног степена, и ц) иако је на ову тему обављено изузетно мали број студија у здравим популацијама, уобичајена физичка активност и/или физичка способност такође позитивно модулирају функцију тромбоцита током паузе од вежбања тј. одмору.¹³⁵ Према томе, навике физичке активности и кардиореспираторни фитнес изгледа да имају значајан утицај на тромбоцитну реактивност, али треба имати у виду да функција тромбоцита која је примећена код физички активних субјеката очигледно представља физиолошко стање, јер тренинг издржљивости, посебно трчање, игра кључну улогу у еволуција људске врсте.²⁵⁰ Стога, закључак да седентарни начин живота и ниски кардиореспираторни фитнес утичу на функцију тромбоцита на протромботички начин, вероватно има смисла, и ово гледиште је такође подржано од стране студија.¹³⁵ Очигледно је да физичка активност или неактивност, директно или индиректно утиче на активност тромбоцита. Акутно вежбање, тј. нагла физичка активност, доводи до повећања нивоа катехоламина, као и повећања оксидативног и стреса на зид крвног суда, за који је познато да активирају тромбоците. Ово је нарочито важно како се проток артеријске крви и ниво стреса на зид крвног суда повећавају паралелно са интензитетом вежбања²⁵¹ Генерално гледано, упркос неконзистентности и контрадикторних резултата, већина доступних студија указује на то да акутно вежбање, тј. нагла физичка активност, има значајан утицај на практично све аспекте активације тромбоцита. Иако различити протоколи могу делимично да узму у обзир контрадикторне резултате у литератури, резултати неколико истраживања указују на то да примењени интензитет вежбања може представљати критичну детерминанту за ефекте активације тромбоцита током нагле физичке активности.

Претходне студије су показале да акутне епизоде беса, тешки емоционални или ментални стрес могу покренути активацију тромбоцита и акутни инфаркт миокарда и друге облике АКС-а.^{252,253} Студија Jiang-а и сарадника²⁴⁸ је указала на постојање везе између хиперактивности тромбоцита узроковане менталним стресом и кардиоваскуларним

догађајима код пацијената са ИБС. Студија сугерише да динамичне промене у агрегацији тромбоцита, узроковане менталним стресом, могу бити основа за миокардну исхемију индуковану менталним стресом. Иста студија је такође показала значајну повезаност између агрегације тромбоцита, индуковане менталним стресом и променама у WMSI и ејекционој фракцији леве коморе (LVEF), нпр. што већа агрегабилност тромбоцита, израженије повећање WMSI и смањење LVEF узроковано тестирањем менталног стреса. Lanza и сарадници²⁵⁴ су утврдили да је међу пацијентима са стабилном ангином, одговор тромбоцитне реактивности на вежбање био предиктиван за нормалну или стенозирану коронарну артерију на коронарографији.

У односу на велики број студија који се ја бавио испитивањем активности тромбоцита при наглој физичкој активности на покретној траци или ергобициклу, изузетно мали број студија је испитивао активност тромбоцита и/или антикоагулантних протеина током фармаколошких стрес тестова. Студија Обрадовића и сарадника⁴ је једна од ретких која је испитивала промене у тромбоцитима и активност антикоагулантних протеина током аденозинског SPECT стрес теста код пацијената са ИБС, четири месеца након PCI са имплантацијом стента. Студија је показала да није било разлике у агрегацији тромбоцита и маркера активације тромбоцита између пацијената са и без исхемије у обе групе; групи са клопидогрелом и аспирином и у групи само са аспирином. У истој студији, у групи пацијената са индукованом исхемијом, утврђена је смањена активност антитромбина. Активност природног антикоагулантног система, нарочито антитромбина и протеина С, занемарена је у патофизиологији акутног инфаркта миокарда и исхемије, али они могу имати веома важну улогу у процесу настанка ерозије и руптуре плака који представљају почетне догађаје у развоју коронарне тромбозе. Pelkonen и сарадници²⁵⁵ су показали да нижа активност протеина С и антитромбина предвиђају исхемијске догађаје код пацијената са акутним коронарним синдромом без елевације СТ сегмента.

У новијој литератури нема података о испитивању активности тромбоцита и антикоагулантних протеина током фармаколошког стрес теста са добутамином. Постоји мали број студија које су испитивале дејство самог лека добутамина на активност тромбоцита. Једна од таквих студија је и студија Galloway-а и сарадника²⁵⁶ који у закључку наводе да се активација тромбоцита одвија *in vivo* код пацијената који иду на ДСЕ и да то може бити узроковано синергијским дејством добутамина са физиолошким

тромбоцитним агонистима. Такође се у закључку наводи да су резултати студије конзистентни са њиховим испитивањима *in vitro* где су показали да добутамин сам, није довео до повећања процента CD62⁺ тромбоцита.

Најзначајнији налаз нашег истраживања је да нико у групи асимптоматских пацијената са коронарном болешћу, четири месеца након PCI, нико није имао повећање вредности агрегабилности тромбоцита на EPI и ADP у пику оптерећења током DSE, али су имали значајно смањење активности и антитромбина и протеина C. У подгрупи испитиваних пацијената са детектованим регионалним поремећајем контрактилности миокарда у пику оптерећења током DSE, измерене су повишене вредности агрегабилности тромбоцита на EPI, него у подгрупи пацијената са нормалном контрактилном функцијом миокарда леве коморе. Ови налази указују на потенцијално хиперкоагулабилно стање, посебно током стреса у склопу инотропне и хронотропне стимулације срчаног мишића код пацијената са коронарном болешћу након PCI, нарочито у присуству поремећаја срчане контрактилности.

Тест физичком оптерећења на покретној траци, који је коришћен у већини студија хемостазе током физичке активности, има ниску, односно прилично ниску сензитивност у дијагностици миокардне исхемије у поређењу са добутамин стрес ехокардиографијом²⁴³⁻²⁴⁷ што ограничава његову могућност да покрене промене у хемостази током исхемије. DSE је коришћена у нашој студији због боље сензитивности за детекцију исхемије, како би могли очекивати да промене у хемостази буду јако удружене са миокардном исхемијом. Такође смо утврдили да је агрегабилност тромбоцита на EPI значајно већа код пацијената са регионалним поремећајем у контрактилности миокарда што повезује хронотропни и инотропни миокардни стрес са смањеним коронарним протоком и појачаном агрегабилности тромбоцита што може узроковати артеријску тромбозу, посебно на месту претходно имплантираног стента. У нашој претходној студији,⁴ која је укључила 37 асимптоматских пацијената са коронарном болешћу, 4 до 8 месеци након PCI, са још напреднијим тестом физичким оптерећењем са апликацијом аденозина (single photon emission computed tomography-SPECT), показали смо да постоји значајни пад у концентрацији активности АТ али не и РС, без промена у агрегабилности тромбоцита у пику оптерећења. Код теста са физичким оптерећењем са аденозином, SPECT миокарда,

расподела протока крви и тахикардија узрокују исхемију, док код DSE тахикардија и инотропна миокардна стимулација представљају главне узрочнике. Ова разлика у начину проузроковања исхемије може бити разлог због чега није дошло до повећања агрегабилности тромбоцита на EPI током физичког теста са аденозином а дошло је до повећања агрегабилности у пику стрес ехо теста са добутамином код пацијената са регионалним поремећајем контрактилности миокарда.

6. ЗАКЉУЧАК

На основу изнесених резултата могу се донети следећи закључци:

1. Нема промена у агрегабилност тромбоцита код пацијената након перкутане коронарне интервенције пре и после максималног оптерећења током добутамин стрес ехокардиографије.
2. Плазма активност антикоагулантних протеина се значајно смањује после максималног оптерећења током добутамин стрес ехокардиографије.
3. Агрегабилност тромбоцита на EPI се значајно повећава после максималног оптерећења током добутамин стрес ехокардиографије код болесника са израженим сегментним испадом контрактилности.
4. Исхемија миокарда током стрес ехокардиографије са добутамином не утиче на промену агрегабилности тромбоцита на ADP и EPI.
5. Исхемија миокарда током стрес ехокардиографије са добутамином такође не утиче на активност антитромбина и протеина C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics-2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008; 117: e25–e146.
2. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM et al. Executive summary: Heart disease and stroke statistics-2010 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2010; 121:948–954.
3. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo A. et al. Variability in Individual Responsiveness to Clopidogrel. Clinical Implications, Management, and Future Perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1505–16.
4. Obradovic S, Subota V, Baskot B, et al. Changes in platelets and anticoagulant protein activity during adenosine-exercise single-photon emission computed tomography stress test. *Srp Arh Celok Lek.* 2010; 138(Suppl 1):28–32.
5. Furie B, Furie, BC. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 2008; 359:938-949.
6. Volpi E, Giusti L, Ciregia F, et al. Platelet proteome and clopidogrel response in patients with stable angina undergoing percutaneous coronary intervention. *Clin Biochem.* 2012; 45(10-11):758-65.
7. Braunwald E, Angiolillo D, Bates E, et al. Investigating the mechanisms of hyporesponse to antiplatelet approaches. *Clin Cardiol* 2008 (Suppl.1); 31:3, I-21–I-27.
8. Pavlović P, Tavčiovski D i Stamenković E. Agregacija trombocita, disfunkcija endotela i akutni infarkt miokarda. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66:323–327.
9. Kandice Kottke-Marchant. Importance of platelets and platelet response in acute coronary syndromes. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2009; 76(1).
10. Giovanni D, and Carlo P. Platelet Activation and Atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357:2482-94.
11. Lina B, Antonio FO, and Gemma V. Fundamentals of the thrombosis cascade: interaction between platelets and the coagulation cascade. In: Dominick JA, Adnan K and Daniel IS,

-
- ed. Clinical Guide to Use of Antithrombotic Drugs in Coronary Artery Disease. Informa UK. 2008:3-10.
12. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.
 13. Massberg S, Gawaz M, Gruner S, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 2003; 197:41-9.
 14. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor? *Blood* 2003; 102:449-61.
 15. Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46:277-300.
 16. Obradović S, Jovičić A, Djordjević D, Gligić B, Dinčić D, Stamatović D. Hemostaza i ateroskleroza. *Vojnosanit Pregl.* 2000; 57(2):209-16.
 17. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 2002; 88:186-93.
 18. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12:261-73.
 19. Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, et al. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50:1822-1834.
 20. Folsom AR, Ohira T, Yamagishi K, et al. Low protein C and incidence of ischemic stroke and coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Thromb Haemost.* 2009; 7(11):1774.
 21. Ware JA, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry and function. In: Williams' Hematology, Beutler, E, Lichtman, MA, Collier, BS, Kipps, TJ (Eds), McGraw Hill, New York 1994. p.1161.
 22. Lauri D, Cerletti C, deGaetano G. Amplification of primary response of human platelets to platelet-activating factor. Aspirin-sensitive and aspirin-insensitive pathways. *J Lab Clin Med* 1985; 105:653.

-
23. Stein B, Fuster V, Israel DH, et al. Platelet inhibitor agents in cardiovascular disease: An update. *J Am Coll Cardiol* 1989; 14:813.
 24. McFadden E, Clarke J, Davies G, et al. Effect of intracoronary serotonin on coronary vessels in patients with stable angina and patients with variant angina. *N Engl J Med* 1991; 324:468.
 25. Chen LY, Mehta JL. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27:154.
 26. Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, et al. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100:350.
 27. Langer H, Gawaz M. The role of platelets for the pathophysiology of acute coronary syndromes. *Hamostaseologie* 2006; 26:114-18.
 28. Paniccia R, Priora R, Liotta AL, and Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vascular Health and Risk Management* 2015; 11:133–148.
 29. Katz JN, Kolappa KP, Becker RC. Beyond thrombosis: the versatile platelet in critical illness. *Chest*. 2011; 139:658–668.
 30. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*. 2012; 122:2661–2671.
 31. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014; 276(6):618–632.
 32. Harrison P. Assessment of platelet function in the laboratory. *Hamostaseologie*. 2009; 29:25–31.
 33. Pakala R, Waksman R. Currently available methods for platelet function analysis: advantages and disadvantages. *Cardiovasc Revasc Med*. 2011; 12:312–322.
 34. Kehrel BE, Brodde MF. State of the art in platelet function testing. *Transfus Med Hemother*. 2013; 40:73–86.
 35. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; 194:927–929.

-
36. Kottke-Marchant K, Corcoran G. The laboratory diagnosis of platelet disorders. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126:133–146.
 37. Hayward CP. Diagnostic approach to platelet function disorders. *Transfus Apher Sci.* 2008; 38:65–76.
 38. Hayward CP, Pai M, Liu Y, et al. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *J Thromb Haemost.* 2009;7: 676–684.
 39. Podda G, Femia EA, Pugliano M, Cattaneo M. Congenital defects of platelets function. *Platelets.* 2012; 23:552–563.
 40. Gadisseur A, Hermans C, Berneman Z, et al. Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease. *Acta Haematol.* 2009; 121:71–84.
 41. Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, et al. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation. *JAMA.* 2010; 303:754–762.
 42. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, et al. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49:2312–2317.
 43. Chen WH, Cheng X, Lee PY, et al. Aspirin resistance and adverse clinical events in patients with coronary artery disease. *Am J Med.* 2007; 120:631–635.
 44. Lev EI. Aspirin resistance transient laboratory finding or important clinical entity? *J Am Coll Cardiol.* 2009; 53:678–680.
 45. Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, et al. Light transmittance aggregometry induced by different concentrations of adenosine diphosphate to monitor clopidogrel therapy: a methodological study. *Ther Drug Monit.* 2011; 33:94–98.
 46. Femia EA, Pugliano M, Podda G, Cattaneo M. Comparison of different procedures to prepare platelet-rich plasma for studies of platelet aggregation by light transmission aggregometry. *Platelets.* 2012; 23:7–10.
 47. Christie DJ, Avari T, Carrington LR, et al. Platelet Function Testing by Aggregometry: Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008:1–45.

-
48. Hayward CP, Moffat KA, Raby A, et al. Development of North American consensus guidelines for medical laboratories that perform and interpret platelet function testing using light transmission aggregometry. *Am J Clin Pathol.* 2010; 134:955–963.
 49. Harrison P, Mackie I, Mumford A, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol.* 2011; 155:30–44.
 50. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013; 11:1183–1189.
 51. Mackie IJ, Jones R, Machin SJ. Platelet impedance aggregation in whole blood and its inhibition by antiplatelet drugs. *J Clin Pathol.* 1984;37: 874–878.
 52. Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost.* 2006;96(6):781–788.
 53. Sibbing D, Schulz S, Braun S, et al. Antiplatelet effects of clopidogrel and bleeding in patients undergoing coronary stent placement. *J Thromb Haemost.* 2010; 8:250–256.
 54. Solomon C, Hartmann J, Osthaus A, et al. Platelet concentrates transfusion in cardiac surgery in relation to preoperative point-of-care assessment of platelet adhesion and aggregation. *Platelets.* 2010; 21:221–228.
 55. Tantry US, Bonello L, Aradi D, et al. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62:2261–2273.
 56. Malek LA, Klopotoski M, Spiewak M, et al. Platelet reactivity and intramyocardial hemorrhage in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2013; 20:553–558.
 57. Fritsma GA. Platelet function testing: aggregometry and lumiaggregometry. *Clin Lab Sci.* 2007; 20:32–37.

-
58. Pai M, Wang G, Moffat KA, et al. Diagnostic usefulness of a lumiaggregometer adenosine triphosphate release assay for the assessment of platelet function disorders. *Am J Clin Pathol.* 2011; 136:350–358.
 59. McGlasson DL, Fritsma GA. Whole blood platelet aggregometry and platelet function testing. *Semin Thromb Hemost.* 2009; 35:168–180.
 60. Buyukasik Y, Goker H, Buyukasik NS, et al. Effect of platelet count on secretion capacity: formulization and use of the formulae for evaluation of platelet secretion in thrombocytopenic patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2008; 19:633–637.
 61. Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, et al. Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation.* 1999; 99:620–625.
 62. Steinhubl SR, Talley JD, Braden GA, et al. Point-of-care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event after percutaneous coronary intervention: results of the GOLD (AU-Assessing Ultegra) multicenter study. *Circulation.* 2001;103(21): 2572–2578.
 63. Harrison P, Segal H, Blasbery K, et al. Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. *Stroke.* 2005; 36:1001–1005.
 64. Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, et al. Comparison of different methods to evaluate the effect of aspirin on platelet function in highrisk patients with ischemic heart disease receiving dual antiplatelet treatment. *Am J Clin Pathol.* 2007; 128:143–149.
 65. Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, et al. Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients. *J Thromb Haemost.* 2007; 5:1839–1847.
 66. Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, et al. High on-treatment platelet reactivity to both aspirin and clopidogrel is associated with the highest risk of adverse events following percutaneous coronary intervention. *Heart.* 2011; 97:983–990.
 67. Marcucci R, Gori AM, Paniccia R, et al. Cardiovascular death and nonfatal myocardial infarction in acute coronary syndrome patients receiving coronary stenting are predicted by

-
- residual platelet reactivity to ADP detected by a point-of-care assay: a 12-month follow-up. *Circulation*. 2009; 119:237–242.
68. Price MJ, Endemann S, Gollapudi RR, et al. Prognostic significance of post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation. *Eur Heart J*. 2008; 29:992–1000.
 69. Jeong YH, Bliden KP, Antonino MJ, et al. Usefulness of the VerifyNow P2Y12 assay to evaluate the antiplatelet effects of ticagrelor and clopidogrel therapies. *Am Heart J*. 2012;164: 35–42.
 70. Angiolillo DJ, Curzen N, Gurbel P, et al. Pharmacodynamic evaluation of switching from ticagrelor to prasugrel in patients with stable coronary artery disease: results of the SWAP-2 Study (Switching Anti Platelet-2). *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63:1500–1509.
 71. Campbell J, Ridgway H, Carville D. Plateletworks: a novel point of care platelet function screen. *Mol Diagn Ther*. 2008; 12:253–258.
 72. Lennon MJ, Gibbs NM, Weightman WM, McGuire D, Michalopoulos N. A comparison of Plateletworks and platelet aggregometry for the assessment of aspirin-related platelet dysfunction in cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2004; 18:136–140.
 73. Craft RM, Chavez JJ, Snider CC, Muenchen RA, Carroll RC. Comparison of modified Thrombelastograph and Plateletworks whole blood assays to optical platelet aggregation for monitoring reversal of clopidogrel inhibition in elective surgery patients. *J Lab Clin Med*. 2005; 145:309–315.
 74. White MM, Krishnan R, Kueter TJ, Jacoski MV, Jennings LK. The use of the point of care Helena ICHOR/Plateletworks and the Accumetrics Ultegra RPPFA for assessment of platelet function with GPIIB-IIIa antagonists. *J Thromb Thrombolysis*. 2004; 18:163–169
 75. Dalén M, van der Linden J, Lindvall G, Ivert T. Correlation between point-of-care platelet unction testing and bleeding after coronary artery surgery. *Scand Cardiovasc J*. 2012; 46:32–38.
 76. van Werkum W, Kleibeuker M, Postma S, et al. A comparison between the PlateletworksTM-assay and light transmittance aggregometry for monitoring the inhibitory effects of clopidogrel. *Int J Cardiol*. 2010; 140:123–126.

-
77. Favaloro EJ. Clinical application of the PFA-100. *Curr Opin Hematol.* 2002; 9:407–415.
 78. Harrison P. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br J Haematol.* 2005; 130:3–10.
 79. 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.
 80. Marcucci R, Panicia R, Antonucci E, et al. Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol.* 2006; 98:1156–1159.
 81. Reny JL, De Moerloose P, Dauzat M, Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:444–450.
 82. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, et al. Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100. A systematic review. *Thromb Haemost.* 2008; 99:14–26.
 83. Sucker C, Litmathe J, Feindt P, Zotz R. Platelet function analyzer (PFA-100) as a useful tool for the prediction of transfusion requirements during aortic valve replacement. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2011; 59:233–236.
 84. Steinlechner B, Zeidler P, Base E, et al. Patients with severe aortic valve stenosis and impaired platelet function benefit from preoperative desmopressin infusion. *Ann Thorac Surg.* 2011; 91:1420–1426.
 85. Varon D, Dardik R, Shenkman B, et al. A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions. *Thromb Res.* 1997; 85:283–294.
 86. Yamamoto J, Inoue N, Otsui K, Ishii H, Gorog DA. Global thrombosis test (GTT) can detect major determinants of haemostasis including platelet reactivity, endogenous fibrinolytic and thrombin generating potential. *Thromb Res.* 2014; 133:919–926

-
87. Saraf S, Christopoulos C, Salha IB, Stott DJ, Gorog DA. Impaired endogenous thrombolysis in acute coronary syndrome patients predicts cardiovascular death and nonfatal myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 55:2107–2115.
 88. Gorog DA, Fuster V. Platelet function tests in clinical cardiology: unfulfilled expectations. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 61:2115–2129.
 89. Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clin Lab Haematol*. 2005; 27:81–90.
 90. Ganter MT, Hofer CK. Coagulation monitoring: current techniques and clinical use of viscoelastic point-of-care coagulation devices. *Anesth Analg*. 2008; 106:1366–1375.
 91. Pati HP, Jain S. Flow cytometry in hematological disorders. *Indian J Pediatr*. 2013; 80:772–778.
 92. Carubbi C, Masselli E, Gesi M, et al. Cytofluorimetric platelet analysis. *Semin Thromb Hemost*. 2014; 40:88–98.
 93. Harrison P, Keeling D. Clinical tests of platelet function. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. San Diego, CA: Elsevier/Academic Press; 2007:445–474.
 94. Linden MD, Furman MI, Frelinger AL, et al. Indices of platelet activation and the stability of coronary artery disease. *J Thromb Haemost*. 2007; 5:761–765.
 95. Middelburg RA, Roest M, Ham J, et al. Flow cytometric assessment of agonist-induced P-selectin expression as a measure of platelet quality in stored platelet concentrates. *Transfusion*. 2013; 53:1780–1787.
 96. Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Thromboxane generation. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. San Diego, CA: Elsevier/Academic Press; 2007:565–574.
 97. Fontana P, Zufferey A, Daali Y, Reny JL. Antiplatelet therapy: targeting the TxA₂ pathway. *J Cardiovasc Transl Res*. 2014; 7:29–38.
 98. Foster DC, Yoshitake S, Davie EW. The nucleotide sequence of the gene for human protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:4673.
 99. Plutzky J, Hoskins JA, Long GL, Crabtree GR. Evolution and organization of the human protein C gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:546.

-
100. Clouse LH, Comp PC. The regulation of hemostasis: the protein C system. *N Engl J Med* 1986; 314:1298.
 101. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007; 109:3161.
 102. Danese S, Vetrano S, Zhang L, et al. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 2010; 115:1121.
 103. Khor B, Van Cott EM. Laboratory tests for antithrombin deficiency. *Am J Hematol* 2010; 85:947.
 104. Zhou A, Huntington JA, Carrell RW. Formation of the antithrombin heterodimer in vivo and the onset of thrombosis. *Blood* 1999; 94:3388.
 105. Perry DJ. Antithrombin and its inherited deficiencies. *Blood Rev* 1994; 8:37.
 106. Hirsh J. Heparin. *N Engl J Med* 1991; 324:1565.
 107. Little WC, Constantinescu M, Applegate RJ, et al. Can coronary angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild to moderate coronary artery disease? *Circulation* 1988; 78:1157.
 108. Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med* 1984; 310:1137.
 109. Falk E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis: Characteristics of coronary atherosclerotic plaques with fatal occlusive thrombi. *Br Heart J* 1983; 50:127.
 110. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92:657.
 111. MacIsaac AI, Thomas JD, Topol EJ. Toward the quiescent coronary plaque. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:1228.
 112. DeWood MA, Spores J, Notske R, et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med* 1980; 303:897.

-
113. Falk E. Unstable angina with fatal outcome: Dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation* 1985; 71:699.
 114. Davies MJ, Thomas AC, Knapman PA, et al. Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation* 1986; 73:418.
 115. Ueda Y, Asakura M, Hirayama A, et al. Intracoronary morphology of culprit lesions after reperfusion in acute myocardial infarction: serial angiographic observations. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:606.
 116. Sherman CT, Litvack F, Grundfest W, et al. Coronary angiography in patients with unstable angina pectoris. *N Engl J Med* 1986; 315:913.
 117. Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, et al. Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina: Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 1996; 94:3090.
 118. Ardissino D, Merlini PA, Ariens R, et al. Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1997; 349:769.
 119. Santos MT, Valles J, Marcus AJ, et al. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. *J Clin Invest* 1991; 87:571.
 120. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 1986; 315:983.
 121. Ikeda H, Takajo Y, Ichiki K, et al. Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation* 1995; 92:1693.
 122. Shebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 300(3):729-35.
 123. Merten M, Chow T, Hellums JD, Thiagarajan, P. A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation. *Circulation* 2000; 102:2045.

-
124. Ault KA, Cannon CP, Mitchell J, et al. Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial: Thrombolysis in Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:634.
 125. Ueda Y, Asakura M, Yamaguchi O, et al. The healing process of infarct-related plaques. Insights from 18 months of serial angiographic follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:1916.
 126. Freedman JE, Ting B, Hankin B, et al. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* 1998; 98:1481.
 127. Frelinger AL, 3rd, Furman, MI, Linden, MD, et al. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1-and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation* 2006; 113:2888.
 128. Endler, G, Klimesch, A, Sunder-Plassmann, H, et al. Mean platelet volume is an independent risk factor for myocardial infarction but not for coronary artery disease. *Br J Haematol* 2002; 117:399.
 129. Mathur, A, Robinson, MS, Cotton, J, et al. Platelet reactivity in acute coronary syndromes: evidence for differences in platelet behaviour between unstable angina and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2001; 85:989.
 130. Grande P, Grauholz AM, Madsen JK. Unstable angina pectoris. Platelet behavior and prognosis in progressive angina and intermediate coronary syndrome. *Circulation* 1990; 81: I16.
 131. O'Donnell, CJ, Larson, MG, Feng, D, et al. Genetic and environmental contributions to platelet aggregation: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2001; 103:3051.
 132. Li N, Hu H, Lindqvist M, et al. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2702.
 133. Hu, H, Varon, D, Hjerdahl, P, et al. Platelet-leukocyte aggregation under shear stress: differential involvement of selectins and integrins. *Thromb Haemost* 2003; 90:679.

-
134. Faraday, N, Scharpf, RB, Dodd-o, JM, et al. Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology* 2001; 94:145.
 135. Heber S, Volf I. Effects of Physical (In)activity on Platelet Function. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:165078.
 136. El-Sayed MS, Sale S, Jones P, et al. Blood haemostasis in exercise and training. *Med Sci Sports Exer* 2000; 32: 918-25
 137. Chamberlain KG, Tong M, and Penington DG. Properties of the exchangeable splenic platelets released into the circulation during exercise-induced thrombocytosis, *American Journal of Hematology.* 1990; 34(3):161–168.
 138. Bird SR, Linden M, and Hawley JA. Acute changes to biomarkers as a consequence of prolonged strenuous running. *Annals of Clinical Biochemistry.* 2014; 51(2):137–150.
 139. Pires FO, Noakes TD, Lima-Silva AE, et al. Cardiopulmonary, blood metabolite and rating of perceived exertion responses to constant exercises performed at different intensities until exhaustion. *British Journal of Sports Medicine.* 2011; 45(14):1119–1125.
 140. Zouhal H, Jacob C, Delamarche P, and Gratas-Delamarche A. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Medicine* 2008; 38(5):401–423.
 141. Whittaker JP, Linden MD, and Coffey VG. Effect of aerobic interval training and caffeine on blood platelet function. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 2013; 45(2):342–350.
 142. Wang JS, Yen HL, and Yang CM. Warm-up exercise suppresses platelet-eosinophil/neutrophil aggregation and platelet-promoted release of eosinophil/neutrophil oxidant products enhanced by severe exercise in men. *Thrombosis and Haemostasis.* 2006; 95(3):490–498.
 143. Lamprecht M, Moussalli H, Ledinski G, et al. Effects of a single bout of walking exercise on blood coagulation parameters in obese women. *Journal of Applied Physiology.* 2013; 115(1):57–63.

-
144. Cadroy Y, Pillard F, Sakariassen KS, et al. Strenuous but not moderate exercise increases the thrombotic tendency in healthy sedentary male volunteers. *Journal of Applied Physiology*. 2002; 93(3):829–833.
 145. Aldemir H and Kilic N. The effect of time of day and exercise on platelet functions and platelet-neutrophil aggregates in healthy male subjects. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005; 280(1-2):119–124.
 146. El-Sayed MS. Effects of alcohol ingestion post-exercise on platelet aggregation. *Thrombosis Research*. 2002; 105(2):147–151.
 147. Madsen EH, Christiansen MK, Schmidt EB, et al. Effect of exercise on platelet activation during aspirin or clopidogrel intake in healthy men. *Platelets*. 2009; 20(3):177–182.
 148. Coppola A, Coppola L, dallaMora L, et al. Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression. *Journal of Applied Physiology*. 2005; 98(4):1414–1419.
 149. Tozzi-Ciancarelli MG, Penco M, and Di Massimo C. Influence of acute exercise on human platelet responsiveness: possible involvement of exercise-induced oxidative stress. *European Journal of Applied Physiology*. 2002; 86(3):266–272.
 150. Scheer FAJL, Michelson AD, Frelinger III AL, et al. The human endogenous circadian system causes greatest platelet activation during the biological morning independent of behaviors. *PLoS ONE*. 2011; 6(9): Article ID e24549.
 151. Perneby C, Wallen NH, Hua H, et al. Prothrombotic responses to exercise are little influenced by clopidogrel treatment. *Thrombosis Research* 2004; 114, 235-243.
 152. Wang JS, and Chow SE. Effects of exercise training and detraining on oxidized low-density lipoprotein-potentiated platelet function in men,” *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2004; 85(9):1531–1537.
 153. Wang JS, Yang CF, and Wong MK. Effect of strenuous arm crank exercise on platelet function in patients with spinal cord injury,” *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2002; 83(2):210–216.

-
154. Kitai T, Nishikawa M, Tanigawa T, et al. Inhibition by combined therapy with ticlopidine and aspirin of enhanced platelet aggregation during physical exercise in patients with coronary artery disease. *The American Heart Journal*. 2001; 142(2): article E1.
 155. Wang JS, and Liao CH. Moderate-intensity exercise suppresses platelet activation and polymorphonuclear leukocyte interaction with surface-adherent platelets under shear flow in men. *Thrombosis and Haemostasis*. 2004; 91(3):587–594.
 156. Harrison B, and Lordkipanidz'e M. Clinical tests of platelet function. In *Platelets*. Michelson AD, Ed. 2012.
 157. Ikarugi H, Shibata M, Shibata S, et al. High intensity exercise enhances platelet reactivity to shear stress and coagulation during and after exercise. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2003; 33(3):127–133.
 158. Lamprecht M, Moussalli H, Ledinski G, et al. Effects of a single bout of walking exercise on blood coagulation parameters in obese women. *Journal of Applied Physiology*. 2013; 115(1):57–63.
 159. Cuzzolin L, Lussignoli S, Crivellente F, et al. Influence of an acute exercise on neutrophil and platelet adhesion, nitric oxide plasma metabolites in inactive and active subjects. *International Journal of Sports Medicine*. 2000; 21(4):289–293.
 160. Bonifazi M, Aloisi AM, Ceccarelli I, et al. Platelet adhesion and aggregation on polyethylene: effect of exhaustive exercise. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2004; 68(1):53–58.
 161. Wang JS, Jen CJ, and Chen HI. Effects of exercise training and deconditioning on platelet function in men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1995; 15(10):1668–1674.
 162. Wang JS, Jen CJ, and Chen HI. Effects of chronic exercise and deconditioning on platelet function in women. *Journal of Applied Physiology*. 1997; 83(6):2080–2085.
 163. Wang JS, and Cheng LJ. Effect of strenuous, acute exercise on α 2-adrenergic agonist-potentiated platelet activation," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999; 19(6):1559–1565.

-
164. Peat EE, Dawson M, McKenzie A, and Hillis WA. The effects of acute dynamic exercise on haemostasis in first class Scottish football referees. *British Journal of Sports Medicine*. 2010; 44(8):573–578.
 165. Gkaliagkousi E, Gavriilaki E, Yiannaki E, et al. Platelet activation in essential hypertension during exercise: pre- and post-treatment changes with an angiotensin ii receptor blocker. *American Journal of Hypertension*. 2014; 27(4):571–578.
 166. Hilberg T, Menzel K, Gläser D, et al. Exercise intensity: platelet function and platelet-leukocyte conjugate formation in untrained subjects. *Thrombosis Research*. 2008; 122(1):77–84.
 167. Hilberg T, Hilberg T, Gläser D, et al. Platelet activity, reactivity and platelet-leukocyte conjugate formation before and after exhaustive or moderate exercise in patients with IDDM. *Platelets*. 2004; 15(2):101–108.
 168. Wang JS, Li YS, Chen JC, and Chen YW. Effects of exercise training and deconditioning on platelet aggregation induced by alternating shear stress in men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005; 25(2):454–460.
 169. Weber AA, Heim HK, Schumacher M, et al. Effects of selective cyclooxygenase isoform inhibition on systemic prostacyclin synthesis and on platelet function at rest and after exercise in healthy volunteers. *Platelets*. 2007; 18(5):379–385.
 170. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, et al. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation*. 1993; 88(4):1502–1511.
 171. Lindemann, B. Klingel, A. Fisch, J. Meyer, and H. Darius. Increased platelet sensitivity toward platelet inhibitors during physical exercise in patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research*. 1999; 93(2):51–59.
 172. Gibbs CR, Blann AD, Edmunds E, et al. Effects of acute exercise on hemorheological, endothelial, and platelet markers in patients with chronic heart failure in sinus rhythm. *Clinical Cardiology*. 2001; 24(11):724–729.
 173. Beaulieu LM, and Freedman J. Inhibition of platelet function by the endothelium In *Platelets*. Michelson AD, Ed. 2012.

-
174. Hellsten Y, Nyberg M, Jensen LG, and Mortensen SP. Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *The Journal of Physiology*. 2012; 590(24):6297–6305.
 175. Zoladz JA, Majerczak J, Duda K, and Chłopicki S. Endurance training increases exercise-induced prostacyclin release in young, healthymen - Relationship with VO_{2max} . *Pharmacological Reports*. 2010; 62(3):494–502.
 176. Suhr F, Brenig J, Müller R, et al. Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway. *PLoS ONE*. 2012; 7(9): Article ID e45982.
 177. Kasuya N, Kishi Y, Sakita SY, et al. Acute vigorous exercise primes enhanced NO release in human platelets. *Atherosclerosis*. 2002; 161(1):225–232.
 178. Sakita SY, Kishi Y, and Numano F. Acute vigorous exercise attenuates sensitivity of platelets to nitric oxide. *Thrombosis Research*. 1997; 87(5):461–471.
 179. Koziak K, Sévigny J, Robson SC, et al. Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thrombosis and Haemostasis*. 1999; 82(5):1538–1544.
 180. Zimmermann H, “5’-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochemical Journal*. 1992; 285(2):345–365.
 181. Marphy J, Lloyd M. *Mayo Clinic Cardiology, Concise Textbook*. Mayo Clinic Scientific Press and Informa Healthcare USA, Inc. 2007; 143–246.
 182. Gibbons RJ, Balady GJ, Bricker JT, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for exercise testing: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Update the 1997 Exercise Testing Guidelines). *J Am Coll Cardiol*. 2002 Oct 16; 40(8):1531-40.
 183. Mittleman MA, Maclure M, Tofler GH, et al. Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. *N Engl J Med* 1993; 329: 1677-83.
 184. Willich SN, Lewis M, Lowel H, et al. Physical exertion as a trigger of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 329:1684-90.

-
185. El-Sayed MS. Exercise and training effects on platelets in health and disease. *Platelets*. 2002; 13:261-6.
 186. El-Sayed MS, El-Sayed Ali Z, Ahmadizad S. Exercise and training effects on blood haemostasis in health and disease: an update. *Sports Med*. 2004; 34(3):181-200.
 187. Wang JS, Jen CJ, Kung HC, et al. Different effects of strenuous exercise and moderate exercise on platelet function in men. *Circulation*. 1994; 90(6):2877–2885.
 188. Wang JS, Jen CJ, Lee HL, and Chen HI. Effects of short-term exercise on female platelet function during different phases of the menstrual cycle. 1997. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997; 17(9):1682–1686.
 189. Chicharro JL, Sánchez O, Bandrés F, et al. Platelet aggregability in relation to the anaerobic threshold. *Thrombosis Research*. 1994; 75(3):251–257.
 190. Ersöz G, Zergeroğlu AM, Fıçıcılar H, et al. Effect of submaximal and incremental upper extremity exercise on platelet function and the role of blood shear stress. *Thrombosis Research*. 2002; 108(5-6):297–301.
 191. Michelson AD, Ellis PA, Barnard MR, et al. Downregulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, adenosine diphosphate, or an in vivo wound. *Blood*. 1991; 77(4):770–779.
 192. Hourdille P, Heilmann E, Combrie R, et al. Thrombin induces a rapid redistribution of glycoprotein Ib-IX complexes within the membrane systems of activated human platelets. *Blood*. 1990; 76(8):1503–1513.
 193. Michelson AD, Wencel-Drake JD, et al. Platelet activation results in a redistribution of glycoprotein IV (CD36). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994; 14(7):1193–1201.
 194. Pellikka PA, Nagueh SF, Elhendy AA, et al. American Society of Echocardiography recommendations for performance, interpretation, and application of stress echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2007; 20:1021–1041.
 195. Blankstein R, Cannon C, Udelson J. Update on pharmacological cardiac stress testing: efficacy, risk stratification and patient selection. *Am J Med*. 2014; 127(11): e16-7.

-
196. Gilstrap LG, Bhatia RS, Weiner RB, and Dudzinski DM. Dobutamine stress echocardiography: a review and update Research Reports in Clinical Cardiology. 2014; 5:69–81.
 197. Sicari R, Cortigiani L, Bigi R, et al; Echo-Dobutamine International Cooperative Study Group. Prognostic value of pharmacological stress echocardiography is affected by concomitant antiischemic therapy at the time of testing. *Circulation*. 2004; 109:2428–2431.
 198. Garber AM, Solomon NA. Cost-effectiveness of alternative test strategies for the diagnosis of coronary artery disease. *Ann Intern Med*. 1999; 130:719–728.
 199. Marwick TH. Stress echocardiography with non-exercise techniques: principles, protocols, interpretation, and clinical applications. In: Otto C, editor. *The Clinical Practice of Clinical Echocardiography*. Philadelphia, PA, USA: Saunders Elsevier; 2007.
 200. Fleischmann KE, Hunink MG, Kuntz KM, Douglas PS. Exercise echocardiography or exercise SPECT imaging? A meta-analysis of diagnostic test performance. *J Am Med Assoc*. 1998; 280:913–920.
 201. Bruley D.F. Anticoagulant blood factor deficiencies (protein C). *Adv Exp Med Biol*. 2007; 599:1–6
 202. Angela MS and Constantin P. Deficiencies of Proteins C, S and Antithrombin and Activated Protein C Resistance - Their Involvement in the Occurrence of Arterial Thromboses. *Journal of Medicine and Life*. 2010; 3(4):412-415.
 203. Syed M, Vishal R, Ashok S, et al. Protein-C deficiency presenting as pulmonary embolism and myocardial infarction in the same patient. *Thrombosis Journal* 2013; 11:19.
 204. Emanuele P, Paolo B, Serena M, et al. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus* 2011; 9:120-38.
 205. Stanković G, Babić R. Perkutane koronarne intervencije. U knjizi Ostojić M, Kanjuh V, Beleslin B, urednici. *Kardiologija*. Zavod za udžbenike, Beograd 2011:918-930.
 206. Gruntzig A. Transluminal dilatation of coronary artery stenosis. *Lancet* 1978; 1(8058):263
 207. Mintz GS, Pichard AD, Kent KM, et al. Axial plaque redistribution as a mechanism of percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1996; 77(5):427–30.

-
208. Honye, J, et al., Morphological effects of coronary balloon angioplasty in vivo assessed by intravascular ultrasound imaging, *Circulation*, 1992; 85(3):1012–25.
 209. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 1996; 94(1):35-43.
 210. Waller, BF, et al. Morphological observations late (greater than 30 days) after clinically successful coronary balloon angioplasty. *Circulation*. 1991; 83(2 Suppl): I28–41.
 211. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, et al. 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58(24): e44-e122
 212. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, Collet JP, Cremer J, et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*. 2014; 35(37):2541–2619
 213. Mintz GS, Popma JJ, Hong MK, et al. Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis. *Am J Cardiol* 1996; 78(3A):18–22.
 214. Grech ED. ABC of interventional cardiology: Percutaneous coronary intervention. II: The procedure. *BMJ*. 2003; 326:1137– 40.
 215. Brophy JM, Belisle P, Joseph L. Evidence for use of coronary stents. A hierarchical bayesian meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2003; 138(10):777–86.
 216. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, et al. Sirolimus eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*. 2003; 349(14): 1315–23.
 217. Tone GW, Ellis SG, Cox DA, et al. A polymer based, paclitaxel-eluting stenting patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2004; 350(3):221– 31.
 218. Stone GW, Moses JW, Ellis SG, et al. Safety and efficacy of sirolimus and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J*. 2007; 356(10):998–1008.

-
219. Stettler C, Wandel S, Allemann S, et al. Outcomes associated with drug-eluting and bare metal stents: a collaborative network metaanalysis. *Lancet* 2007; 370(9591):937– 48.
 220. Hannan EL, Wu C, Walford G, et al. Drug-eluting stents vs. coronary-artery bypass grafting in multivessel coronary disease. *N Engl J M.* 2008; 358(4):331–41.
 221. Daemen J, Wenaweser P, Tsuchida K, et al. Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus- eluting and paclitaxel- eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study. *Lancet* 2007; 369(9562):667–78.
 222. Spaulding C, Daemen J, Boersma E, et al. A pooled analysis of data comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med.* 2007; 356:989.
 223. Cutlip DE, Windecker S, Mehran R, et al. Clinical end points in coronary stent trials: a case for standardized definitions. *Circulation* 2007; 115:2344.
 224. Kirtane AJ, Stone GW. How to minimize stent thrombosis. *Circulation* 2011; 124:1283.
 225. Schwartz L, Bourassa MG, Lespérance J, et al. Aspirin and dipyridamole in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med.* 1988; 318:1714.
 226. Lembo NJ, Black AJ, Roubin GS, et al. Effect of pretreatment with aspirin versus aspirin plus dipyridamole on frequency and type of acute complications of percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol.* 1990; 65:422.
 227. Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, et al. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest* 2001; 107:1591.
 228. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J.* 2017; 0:1–48
 229. Population Division. Department of Economic and Social Affairs. United Nations. Revision of World Population Prospects. <https://esa.un.org/unpd/wpp>
 230. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al. Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med.* 2009; 361:1045-1057.

-
231. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study (CLASSICS). *Circulation*. 2000; 102:624-9.
 232. Cadroy Y, Bossavy JP, Thalamas C, et al. Early potent antithrombotic effect with combined aspirin and loading dose of clopidogrel on experimental arterial thrombogenesis in humans. *Circulation*. 2000; 101:2823-8.
 233. Bhatt DL, Bertrand ME, Berger PB, et al. Meta-analysis of randomized and registry comparisons of ticlopidine with clopidogrel after stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39:9-14.
 234. Smith SC Jr, Feldman TE, Hirshfeld JW, et al. ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47(1): e1-121.
 235. Moussa I, Oetgen M, Roubin G, et al. Effectiveness of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin in preventing stent thrombosis after coronary stent implantation. *Circulation* 1999; 99:2364.
 236. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR et al. Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trials Investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2001; 345:494-502.
 237. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001; 358:527.
 238. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT 3rd, et al. CREDO Investigators. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial (CREDO). *JAMA*. 2002; 288(19):2411-20.

-
239. Steinhubl SR, Berger PB, Brennan DM, Topol EJ, for the CREDO Investigators. Optimal timing for the initiation of pre-treatment with 300 mg clopidogrel before percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2006 ;47(5):939-43.
 240. Sicari R, Nihoyannopoulos P, Evangelista A. et al. Stress echocardiography expert consensus statement European Association of Echocardiography (EAE) (a registered branch of the ESC). *European Journal of Echocardiography* 2008; 9:415–437.
 241. Gilstrap LG, Bhatia RS, Weiner RB et al. Dobutamine stress echocardiography: a review and update. *Research Reports in Clinical Cardiology* 2014; 5:69–81.
 242. Price MJ, Edemann S, Gollapudi RR. et al. Prognostic significance of post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation. *Eur Heart J* 2008; 29:992–1000.
 243. Fleischmann KE, Hunink MGM, Kuntz KM et al. Exercise echocardiography or exercise SPECT imaging? A meta-analysis of diagnostic test performance. *JAMA* 1998; 280:913-920.
 244. Roger VL, Pellikka PA, Oh JK et al. Identification of multivessel coronary artery disease by exercise echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:109–114
 245. Pamukcu B, Oflaz H, Acar RD, et al. The role of exercise on platelet aggregation in patients with stable coronary artery disease: exercise induces aspirin resistant platelet activation. *J Thromb Thrombolysis.* 2005; 20(1):17-22.
 246. Hübner K, Koudouovoh-Tripp P, Kandler C, et al. Differential changes in platelet reactivity induced by acute physical compared to persistent mental stress. *Physiol Behav* 2015; 151:284-91.
 247. El-Sayed MS, Ali N, and El-Sayed ZA. Aggregation and activation of blood platelets in exercise and training. *Sports Med* 2005; 35(1):11-22.
 248. Jiang W, Boyle SH, Ortel TL, et al. Platelet aggregation and mental stress induced myocardial ischemia: Results from the Responses of Myocardial Ischemia to Escitalopram Treatment (REMIT) study. *Am Heart J* 2015; 169:496-507.

-
249. Strike PC, Steptoe A. Behavioral and emotional triggers of acute coronary syndromes: a systematic review and critique. *Psychosom Med.* 2005; 67:179-86.
 250. Bramble DM, and Lieberman DE. Endurance running and the evolution of Homo. *Nature.* 2004; 432(7015):345–352.
 251. Thijssen DHJ, Dawson EA, Black MA, et al. Brachial artery blood flow responses to different modalities of lower limb exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 2009; 41(5):1072–1079.
 252. Wallen NH, Held C, Rehnqvist N, et al. Effects of mental and physical stress on platelet function in patients with stable angina pectoris and healthy controls. *Eur Heart J.* 1997; 18:807-15
 253. Grignani G, Pacchiarini L, Zucchella M, et al. Effect of mental stress on platelet function in normal subjects and in patients with coronary artery disease. *Haemostasis* 1992; 22:138-46.
 254. Lanza GA, Sestino A, Iacovella S, et al. Relation between platelet response to exercise and coronary angiographic findings in patients with effort angina. *Circulation.* 2003; 107:1378-1382.
 255. Pelkonen KM, Wartiovaara-Kautto U, Nieminen MS, Ahonen K, Sinisalo J. Low normal level of protein C or of antithrombin increases risk for recurrent cardiovascular events. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005; 16(4):275-80.
 256. Galloway MT, Paglieroni TG, PhD, Wun T, et al. Platelet activation during dobutamine stress echocardiography. *Am Heart J.* 1998; 135:888-900

ИНФОРМИСАНИ ПРИСТАНАК ЗА ИСПИТАНИКА

ИНФОРМАЦИЈА ЗА ИСПИТАНИКА

ИСТРАЖИВАЧ

Обавештавам испитаника да је ово проспективна студија под називом „Агрегабилност тромбоцита и активност антикоагулантних протеина током стрес ехокардиографије са добутамином код асимптоматских пацијената четири месеца након перкутане коронарне интервенције“. У студију ће бити укључени испитаници који дају добровољни писани пристанак.

УВОД

Исхемијска болест срца представља најчешћи узрок морбидитета и морталитета у развијеном свету, праћена бројним коморбидитетима који негативно утичу на укупно преживљавање болесника.

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ студије је испитати повезаност агрегабилности тромбоцита и активности антикоагулантних протеина са миокардном исхемијом током добутамин стрес ехокардиографије код асимптоматских пацијената, четири месеца након перкутане коронарне интервенције.

ПЛАН ИСТРАЖИВАЊА

Потребно је прикупити основне и епидемиолошке податке, узети узорак крви за лабораторијске претраге у учинити неинвазивне ултразвучне прегледе срца

ТАЈНОСТ ПОДАТАКА

Сви подаци и налази од испитаника укључени у студију биће чувани у тајности. Подаци и налази биће чувани и у компјутерској бази.

Учешће испитаника у овом истраживању је добровољно и повлачење из истраживања је могуће у сваком тренутку. Испитаници укључени у ово истраживање немају никакве финансијске обавезе, као ни трошкове везано за истраживање.

РИЗИК

Испитаници немају никакав ризик по здравље везан за ово истраживање. Уобичајене непријатности повезане са узимањем крви из вене су благи убод у моменту када стерилна игла продире кроз кожу и евентуално стварање мањег крвног подлива на месту убода. Ултразвучне претраге су неинвазивне природе и не представљају неугодност за испитаника.

САДРЖАЈ ПРИСТАНКА ИДСПИТАНИКА

1. У оквиру понуђеног Информисаног пристанка за испитаника у потпуности ми је објашњена врста и циљ, извођење истраживања, као и његови ризици и користи.
2. Потврђујем да ми у погледу исхода процедура нису дате никакве гаранције.
3. Прочитао/ла сам Информисани пристанак за испитаника који је јасан и пружа ми довољно информација о предложеном испитивању. Била ми је дата могућност да поставим питања у вези истраживања и да добијем одговоре.
4. Добровољно пристајем на све процедуре наведене у плану истраживања наведеног у оквиру Информације за испитаника. Не одричем се својих законских права потписом овог информисаног пристанка.

1. ИСПИТАНИК

.....

име и презиме

потпис

датум

2. ИСТРАЖИВАЧ

.....

име и презиме

потпис

датум

3. СВЕДОК*

.....

име и презиме

потпис

датум

*Сведок није обавезан осим у случају када испитаник није у стању да чита (слепило, неписменост, ментална ретардација) и неопходно је да сведок надгледа цео поступак.