

Antitrombotik Tedavi İzleminde Trombosit Fonksiyon Testleri

Monitoring Anti-platelet Therapy with Platelet Function Testing

Burcu Barutçuoğlu

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Bilim Dalı, İzmir

Başvuru Tarihi: 26.08.2016

Kabul Tarihi: 30.08.2016

ÖZET

Kardiyovasküler hastalarda antitrombotik ilaçların damarsal patolojileri azalttığı, bazı hastalarda ise antitrombotik tedaviye rağmen vasküler olay yaşayan hastaların olduğu bilinmektedir. Trombosit fonksiyon testlerinin antitrombotik tedavi izleminde kullanımı tartışmalı olsa da antitrombotik tedavi izleminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde çeşitli ölçüm metodları kullanan birçok trombosit fonksiyon test cihazı bulunmaktadır. Ancak farklı metodların kullanılması, standardizasyonun sağlanamaması ve hastaların klinik durumunu her zaman tam olarak yansıtamaması bu testlerin klinik uygulamalarda oldukça önemli kuşku doğurmasına neden olmaktadır. Yinede trombosit fonksiyon testleri hastalarda uygun antitrombotik ilaç seçimine, uygun dozun ayarlamasına yardımcı olur. Bu derlemede trombosit aktivasyonu ve trombositlerin trombus oluşumundaki yeri, güncel trombosit fonksiyon testleri ve antitrombotik tedavi gören hastalarda gelişen ilaç direnci ele alınacaktır.

Anahtar Sözcükler: Trombositler; trombosit fonksiyon testleri; antitrombotik ilaçlar

ABSTRACT

It is known that anti-platelet drugs reduce the vascular pathologies in patients with cardiovascular disease. Despite using these drugs there are still a number of patients suffering from vascular events. Even though monitoring antiplatelet drug therapy with platelet function tests is contentious, they are widely in use. The wide variety of available platelet function tests using different methodologies, the apparent lack of standardization, and emerging evidence on the clinical value of platelet function testing are resulting in a considerable uncertainty in the clinical practice. Nevertheless, platelet function testing has clinical benefits for the patients and also helps in identifying the right drug at the right dose for the right patient. In this review article, platelet activation, formation of thrombosis, up-to-date platelet function tests and drug resistance in patients receiving anti-platelet drugs will be discussed.

Key Words: Thrombocytes; platelet function tests; antiplatelet drugs

GİRİŞ

Trombositler; hem normal hemostazın sağlanmasında hem de patolojik kanama, tromboz ve inflamasyonda kritik öneme sahiptir. Vazokonstriksiyon, damarsal tamir, tümoral

büyüme, metastaz, inflamasyon ve ateroskleroz gibi olaylarda önemli görevleri vardır.

Antitrombotik tedavi kardiyovasküler hastalıklara bağlı mortalite ve morbiditenin azaltılmasında önemlidir. Geri dönüşümsüz sik-

loksijenaz inhibitörü olan Aspirin, ve P2Y12 adenosin difosfat (ADP) reseptör antagonisti olan Klopidoğrel gibi sık kullanılan antitrombotik ilaçlara karşı gelişen direnç, yüksek riskli hastalarda meydana gelen iskemik olaylar ile paralel olduğu bulunmuştur. Bu nedenle kardiyovasküler hastalıklarda, antitrombotik ilaçların etkisini test etmek için trombosit fonksiyon testleri ile hastaların izlenmesi gerektirmektedir. Ancak in vivo trombosit fonksiyonları ve ex vivo trombosit fonksiyon testlerinin sonuçları arasındaki ilişki net olarak tam ortaya konulamamıştır (1).

Antikoagulan tedavilerin, yıllardır bilinen sıkı laboratuvar takiplerinin tersine, antitrombotik tedavilerin takibi çok yaygınlaşmamış ve standardize edilememiştir. Antitrombotik tedaviye başlama ve izleminde de yanıtlanması gereken bazı önemli sorular mevcuttur: 1. Hastalar seçilen antitrombotik ajana karşı dirençli midir? 2. Hedeflenen düzeyde inhibisyon için gerekli doz nedir? 3. Tedavi sonlandırıldıktan sonra ne kadar sürede cerrahi girişim gibi hastayı büyük bir hemostatik sıkıntıya sokacak durum karşısında trombosit fonksiyonları normale döner? 4. Antitrombotik tedavi sonrası gözlenebilen trombositopeni gerçekten tedavinin kendisinden mi kaynaklanmaktadır? Hastaların klinik durumu ile yakından ilgili olan bu sorular nedeniyle antitrombotik tedavinin laboratuvar izlemi daha sıkı standardizasyonu ve geliştirilen yöntemler ile sağlanmaya çalışılmaktadır.

Trombosit fonksiyon testleri trombosit fonksiyonlarının ölçümünde altta yatan mekanizmalar ve klinikte kullanım kolaylığı göz önünde bulundurularak sınıflandırılmıştır: Tarama testi olarak kullanılan ancak standardizasyonu sağlanamadığı için terk edilen kanama zamanı ölçümü, trombosit agregasyonu temeline dayanan agregometri testleri, akım sitometri testleri, hasta başı testleri (POCT) (2).

Bu derlemede trombosit aktivasyonu ve trombositlerin trombüs oluşumundaki yeri, güncel trombosit fonksiyon testleri ve anti-

trombotik tedavi gören hastalarda gelişen ilaç direnci ele alınacaktır.

Trombositlerin hemostazdaki rolü ve trombosit aktivasyon mekanizmaları

Primer hemostaz sırasında trombositler ve hasarlı damar duvarı arasında çeşitli etkileşimler gerçekleşir ve adezyon, aktivasyon ve agregasyon olarak bir dizi fonksiyonel yanıt sonucunda trombüs oluşur (1,3).

Başlangıçta, damar duvarının hasarlı bölgesinde endotel tabakasının kaybı sonucu toplanan trombositler trombosit aktivasyonu'na uğrar. Subendoteliyal matrikse trombositlerin adezyonu trombosit yüzeyindeki glikoprotein Ib-V-IX (GP Ib-V-IX) kompleksi ve plazma von Willebrand Faktörü (vWF)'ün etkileşimi sonucu gerçekleşir. Adezyonu takiben bu bölgeye toplanan trombositler birbirleriyle etkileşime girer. Agregasyon olarak adlandırılan bu süreçte fibrinojen en önemlisi glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) olan spesifik trombosit reseptörlerine bağlanır. GPIIb/IIIa ayrıca vWF'ü de bağlama özelliğine sahiptir. İstirahat halindeki trombositler hiçbir zaman fibrinojen ile bağlanamaz. Trombosit aktivasyonu sonucu GPIIb/IIIa kompleksinde yapısal değişiklikler meydana gelir ve fibrinojeni bağlar. Aktive trombositlerin dens granüllerinden ADP ve serotonin salınır. Ayrıca aktive trombositlerin koagülasyon mekanizmaları üzerine de etkileri mevcuttur. Trombosit membran lipoproteinlerinde gerçekleşen çeşitli reaksiyonlar sonucunda negatif yüklü fosfolipidler; özellikle fosfatidilserin, trombosit yüzeyine doğru yer değiştirir ve K vitamini bağımlı koagülasyon faktörlerinin bağlanmasını kolaylaştırarak koagülasyon kaskadının hızlanmasını sağlar (3).

Bir grup fizyolojik agonist trombositlerde bulunan özgül reseptörleri aracılığı ile trombosit şeklinde değişiklik (diskoid şekilden sferik şekle dönüşüm), agregasyon, sekresyon ve Tromboksan A2 (TxA2) sentezini sağlar. Bu agonistler; ADP, kollajen, trombin, TxA2, epinefrin ve trombosit aktivasyon faktörü (PAF)'tır. Trombositler ADP agonistine purinerjik reseptörler aracılığı ile yanıt verir.

Bunlar P2Y1, P2Y12 ve P2X1'dir. P2Y1 reseptörü sitoplazmik kalsiyum artışına neden olur. P2Y12 reseptörü adenilil siklaz inhibisyonu yaparak trombositlerdeki siklik adenozin monofosfat seviyelerini azaltır. Tienopiridin grubu antitrombotik ajanlar (klopidogrel, tiklopidin, prasugrel) P2Y12 reseptörünü hedef alır. Trombosit aktivasyonunun en başlangıcı araştırılmak istendiğinde P2X1 reseptörü incelenmelidir.

Trombin proteaz aktive reseptörler (PAR) aracılığı ile trombosit yanıtını uyarır. Trombositlerde PAR1 ve PAR4 reseptörleri fazla miktarda bulunur. GPVI trombositlerde bulunan temel kollajen reseptörü olup immunoglobulin reseptör süper-ailesinin bir üyesidir. Trombosit reseptörleri ile trombin, ADP ve TxA2 gibi agonistlerin bağlanması sonucu fosfolipaz C ile fosfoinozitidlerden diaçilgliserol, inozitol 1,4,5-trifosfat; araşidonik asitten (AA) TxA2 gibi hücre içi mesajcı moleküller sentezlenir ve salınır. Bu mediyatörler sayesinde trombositlerde çeşitli yanıtlar oluşur: Kalsiyum (Ca^{+2}) mobilizasyonu, protein fosforilasyonu, agregasyon, sekresyon ve tromboksan sentezi (3).

Trombosit yüzey reseptörleri ve bazı anahtar hücre içi enzimler (fosfolipaz A2, fosfolipaz C ve adenil siklaz) arası etkileşimler G proteinleri aracılığı ile gerçekleşir. Birçok sekreteruar hücrede olduğu gibi trombosit aktivasyonu sonucunda sitoplazmik iyonize Ca^{+2} konsantrasyonu artar; inozitol 1,4,5-trifosfat hücre içi depolarda bulunan Ca^{+2} için haberci olarak görev yapar. Sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonunun artması farklı olayları da tetikler: fosfolipaz A2 aktivasyonu ve sonucunda TxA2 sentezi; miyozin hafif zincir fosforilasyonu ve sonucunda trombosit şekil değişikliği ve sekresyon meydana gelir. Diaçilgliserol protein kinaz C (PKC) enzim ailesini aktive ederek plekstrin, gibi bazı proteinlerin fosforilasyonunu sağlar. PKC trombosit yanıtı oluşumunda GP IIB/IIIA aktivasyonu da dahil önemli görevleri olan bir enzimdir. Trombositler, yüzey reseptörlerinden hücre içerisine sinyal transportunu sağlayan çeşitli G proteinleri içerir. Örneğin, ADP (P2Y1) ile fosfolipaz aktivasyonu ve Ca^{+2} mobilizasyonu Gq

protein aracılığıyla, P2Y12 ADP reseptörüyle adenilat siklaz inhibisyonunu Gai proteini aracılığıyla gerçekleştirir. Diğer bir iyi bilinen trombosit aktivasyon yanıtı TxA2 sentezidir. TxA2 sentezinin başlangıç ve hız kısıtlayıcı basamağı membran fosfolipidlerinden fosfolipaz A2 aracılığıyla AA'in ortaya çıkışıdır. Serbest AA sikloksijenaz enzimi ile prostoglandin G2 ve H2'ye, tromboksan sentazla TxA2'ye döner. Fibrinojenin GPIIb/IIIA kompleksine bağlanması tirozin kinaz aktivasyonu ve ilişkili olaylar ile sonuçlanır (3,4) (şekil 1).

Antitrombotik ilaçlar

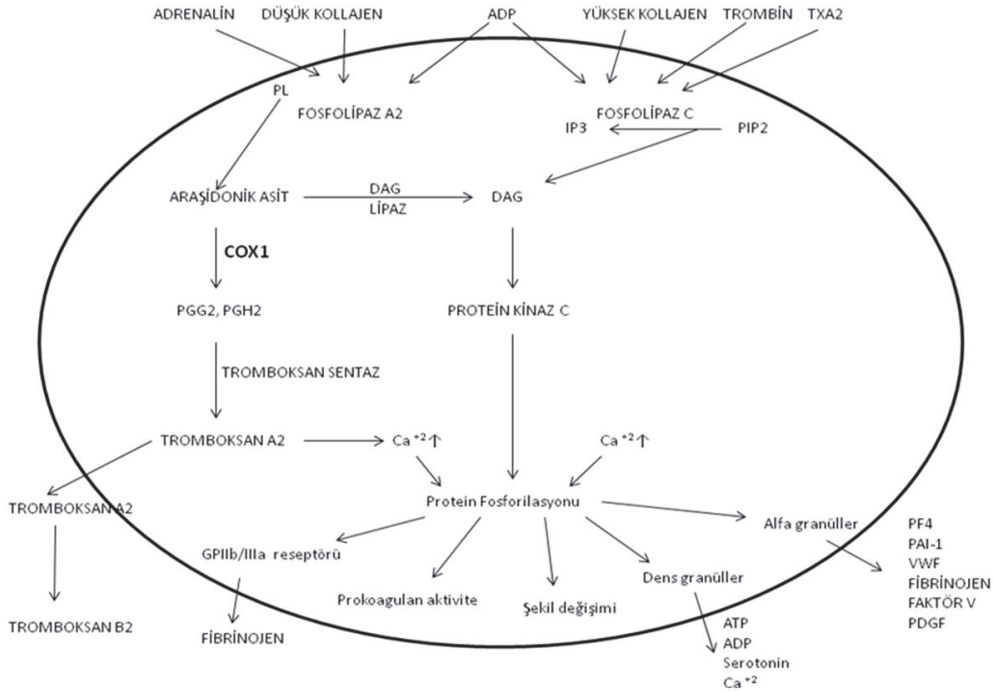
Antitrombotik tedavinin ana mekanizması trombosit fonksiyonlarının baskılanması olup, trombosit fonksiyonlarını inhibe edici ilaçlar trombosit aktivasyonunun değişik aşamalarından birini hedef alır. İyi bir antitrombotik ilaç selektif olarak TxA2 sentezini inhibe etmeli, trombosit adezyon ve agregasyonunu önlemeli, vasküler prostoglandin I2 sentezini arttırmalı, trombin ve tromboksana bağlı trombosit agregasyonunu inhibe etmelidir.

Aspirin (Asetilsalisilat)

En yaygın kullanılan antitrombotik ilaç olup kardiyovasküler hastalıklarda inme ve MI'ünü yaklaşık %22 oranında azaltır. Midede absorbe olur. Kanda, 10 dakika içinde tespit edilir ve 30-40 dakikada pik konsantrasyona ulaşır. Karaciğer ve dolaşımda esterazlar ile yıkılıp temel metaboliti salisilat ($t_{1/2}=3-6$ saat)'tır (5).

Aspirinin hedefi vücutta üç şekilde bulunan COX sikloksijenaz enzimidir. (COX1: Asıl form, COX2: Inducible (uyarılabilir) form, COX3: Putatif (varsayılan) form, COX1 ve 2'nin genetik varyantı). COX1, trombositlerde TxA2 sentezinin temel enzimidir. TxA2 güçlü vazokonstrüktör ve trombosit agonistidir. Aspirin COX1 ve COX 2 enzim aktivitelerini geri dönüşümsüz olarak inhibitördür (5).

COX enzim inhibisyonu aspirin dozu ile ilişkilidir. Düşük doz aspirin COX1 inhibisyonu yaparken, COX2 inhibisyonu için yüksek dozlara ihtiyaç vardır. Aspirinin antiagregan ve anti inflamatuvar etkilerinin farklı dozlarda



Şekil 1. Trombosit aktivasyon yolları

gerçekleşmesi bu nedenledir. Düşük dozlarda (30-375mg) selektif ve güçlü COX1 inhibisyonu yapar; antitrombotik (Tromboksan A2 inhibisyonu) etki oluşturur; miyokard enfarktüsü ve stroke önlemede yardımcıdır. Trombositlerin yaşam süresince (7-10 gün) etkilidir. Yüksek doz (1.5-2gr)'larda ise prostasiklin inhibisyonu yaparak analjezik, antipiretik, antiromatizmal ve antiinflamatuvar etkiler oluşturur. Aspirin COX1'i COX2'ye göre daha fazla inhibe etmektedir. COX1 trombositlerde yapısal olarak bulunmakta iken COX2 inflamatuvar yanıt gösteren hücrelerde daha fazla bulunmaktadır (6).

ADP reseptör inhibitörleri

Tiklodipin, klopidogrel ve prasugrel tienopiridin türevi ilaçlar olup damar çeperindeki zedelenme sonucu aktif trombositlerden salınan ADP, diğer trombositlerin yüzeylerindeki ADP reseptörlerine etki ederek diğer trombositlerin aktive edilmesini engeller. Tienopiridin türevi ilaçlar geri dönüşümsüz ADP reseptör (P2Y12 reseptörleri) blokajı yapar. Prodrug (ön ilaç) olarak vücuda alındıkları için öncelikle aktif metabolitlerine dönerek etki

gösterirler. Koroner arter hastalığı, iskemik inme, geçici iskemiler veya periferik arter hastalığı olanlarda yada önlemede kullanılırlar (7).

GP IIb/IIIa Reseptör inhibitörleri

Abisiksımab, Eptifibatid ve tirofiban GP IIb/IIIa reseptör inhibitörleri olup trombosit agregasyonunun son basamağını inhibe ederler. Damar duvarında oluşan hasar nedeniyle salınan ADP, TxA2 ve koagülasyon faktörleri gibi agonistler trombosit yüzeyinde bulunan GPIIb/IIIa reseptörlerine bağlanır ve trombositler arasında bağlar oluşturarak agregasyon sağlar. Bu grup ilaçlar GP IIb/IIIa reseptörüne bağlanmak için fibrinojen ve vWF ile yarışarak onların bağlanmasını önlerler (6). Yüksek riskli akut koroner sendromda aspirin ve düşük molekül ağırlıklı heparin ile birlikte kullanımının daha yararlı olduğu gösterilmiştir (8)

Antitrombotik tedavi direnci

Standard tek başına yada ikili antitrombotik tedavi gören akut koroner sendrom olgula-

rında bazen tekrarlayan advers kardiovasküler olaylar izlenmektedir. Başlangıçta antitrombotik tedavi alan bazı hastalarda kısmi antitrombotik etki olması aspirin direnci yada klopidogrel direnci olarak adlandırılmıştır. Ancak antitrombotik tedavide trombosit fonksiyon ölçüm yöntemlerindeki standardizasyon eksiklikleri, eşik değerlerin kesin olarak belirlenememesi gibi nedenlerle 'direnc' in tam olarak tanımı yapılamamıştır.

Direnç iki şekilde görülebilir:

- **Klinik direnc:** antitrombotik ilaç kullanımı sırasında kardiyovasküler bir olay geçirme
- **Laboratuvar direnci:** antitrombotik ilaç kullanımını sırasında in vitro trombosit reaktivitesinin tam olarak bloke edilememesi

Laboratuvar ve klinik direnc birbirinin tam olarak aynısı değildir. Laboratuvar direnci varsa her zaman kardiyovasküler bir olayla sonuçlanmaz. Klinik dirençte yetersiz tedavi mevcuttur. Antitrombotik ilaç kullananlarda gelişen dirençte her zaman laboratuvar direnci olmaz. Bazen de ikisi birlikte görülür (9,10).

Aspirine direnci etkileyen faktörler

Trombosit aktivasyonu çeşitli yollar üzerinden gerçekleşir: Trombin oluşumu, shear strese bağlı trombosit adezyonu, çeşitli trombosit agonistlerinin salınımı (ADP, AA, TxA2). COX1 ya da AA/TxA2 bağımsız yollar aktif ise aspirinin antitrombotik etkisi azalır. Vücutta kişisel volüm dağılımının heterojenitesi veya ağırlık farklılıkları gibi kişisel varyasyonlar nedeniyle aspirin direnci gelişebilir. Trombosit turnoverının arttığı cerrahi girişim, travma sonrası dönem, miyeloproliferatif hastalıklar ve diabetes gibi durumlarda trombosit sayısı ve aktif COX artışı olur. TxA2 sentezi artar. COX2'nin varlığı ve artmış aktivitesi nedeniyle direnc görülebilir. Akut koroner sendromlu olgularda TxA2 sentezi %95 aspirin ile inhibe edilirken, idrarda halen 11-dehidro TxB2 saptanması COX2 aktivitesini gösterir. Makrofaj, monosit, endotel hücrelerinde bulunan COX2 aracılığı

ile aspirine dirençli tromboksan sentezi meydana gelebilir. Genetik faktörler, trombosit reaktivitesi ile ilişkili kişiler arası değişkenliğin %30'unu oluşturmaktadır. Bunlardan en sık karşılaşılanları COX1 A842-G polimorfizmi ve P1^{A1/A2} polimorfizmi'dir. COX1 A842-G polimorfizmi nedeniyle enzim ekspresyonu, fonksiyonu, koroner arter hastalığında farmakolojik ajanlar ile etkileşimi azalır. P1^{A1/A2} polimorfizmi nedeniyle GPIIb/IIIa ekspresyonu azalır. Aspirin tedavisine rağmen trombosit aktivasyonunda alternatif yolak varlığı oluşur. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar AA'in COX1 aktif bölgesine bağlanması etkilenir. AA'in asetilasyonu inhibe olur. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların ve aspirinin COX enziminde bağlanma bölgeleri çok yakındır. Birlikte kullanıldıklarında yarışmalı etkileşimler olmaktadır. Bunun dışında enterik kaplı aspirin tabletleri ve normal aspirin tedavileri aynı etkiyi göstermez. Emilim ve biyoyararlanım ile ilgili farklılıklar mevcuttur. İlacın 1 yıldan önce kesilmesi ve düzensiz kullanımı sonucunda %18 olguda tekrarlayan kardiyovasküler hastalıklar görülmekte ve advers kardiyovasküler olay riski 3 kat artmaktadır (4,11,12).

Klopidogrel direnci etkileyen faktörler

Klopidogrel azalmış biyoyararlanımı; tedaviye uyumsuzluk, düşük doz kullanımı ve prodruginin ince barsaktan emiliminin azalması gibi durumlarda direnc gelişebilir. Tedaviye uyumsuz stentli olgularda, akut miyokard infarktüsü 30 günde %13.6 oranında görülebilmektedir. Lipofilik statinler, Ca kanal blokerleri, omeprazol gibi ilaçlar karaciğerde CYP3A4 çeşitliliği (3A4, 2C9, 2C19, 1A2) nedeniyle klopidogrel metabolizmasını etkileyebilir.

Genetik CYP2C19 681G>A (*2) polimorfizmi, P2Y1 ve P2Y12 deki polimorfizmler (ADP bağımlı trombosit agregasyonu P2Y12 geni ile ilişkilidir), CYP3A4 polimorfizmi (trombosit aktivasyonu değişikliğine neden olur). Bunlar dışında vücut kitle indeksinin artışı, diabetes mellitus, hiperkolesterolemi ve sigara kullanımının da klopidogrel direncine neden olabileceği gösterilmiştir (4,11,12).

Antitrombotik ilaç izleminde laboratuvar

Son yıllarda trombosit fonksiyon değerlendirilmesi bir dizi klinik durumda giderek artan öneme sahip olmaktadır: kanama bozukluğu olan hastaların tanısı, antitrombotik tedaviye yanıt izlemi, perioperatif hemoztazin değerlendirilmesi ve transfüzyon tıbbı gibi. Trombositlerin çok çeşitli fonksiyonları olması nedeniyle trombosit fonksiyon testleri de birçok farklı metod kullanılarak geliştirilmiştir. Farklı yöntemler kullanan cihazlarda aktivasyon sağlayan çeşitli agonistlerle trombositler aktive edilerek, trombositlerin adezyon ve agregasyon kabiliyetleri oluşan pıhtının fiziksel özellikleri yada aktive trombositlerin özellikleri ölçülür.

Trombosit fonksiyonları preanalitik faktörlerden çok hızlı etkilenmektedir. Örnek alımı sırasında trombositler kolaylıkla aktive olabilir. Preanalitik faktörler trombosit fonksiyonlarında çeşitliliğe sebep olabilir. Trombosit fonksiyon testlerinin uygulamasında yüksek düzeyde deneyim ve dikkat gerekmektedir. Örnek antikoagulan olarak trisodyum sitrat (%3.2, 0.109M)'lı tüplere 1:9 oranında alınmalıdır. Hastalar, 8 saat gece açlığı sonrası, istirahat halinde olmalıdır. Örnek alımından önce sigara, kafein kullanılmamalıdır. Örnek alımı sırasında minimum basınçta turnike uygulaması ve dokuları minimum travmatize ederek iğne girişi (19-21 gauge) olmalıdır. Önce 3-5 ml kan

aldıktan sonra, ilk sitratlı tüpe örnek alınmalıdır. Alınan örnek tüpünün en az 6 defa yavaşça alt-üst edilmelidir. Venöz kan örneği alımı sırasında erken trombosit aktivasyonu ve plazmaya ADP salınımına neden olabilmesi nedeniyle mutlaka hemolizden kaçınılmalıdır. Lipemik örnekler optik yöntemlerde optik dansite yüksekliğine neden olmasından dolayı tercih edilmez. Trombositten zengin plazma hazırlandıktan sonra erken trombosit aktivasyonuna neden olmasından dolayı cam tüplere konulmamalıdır. CO₂ kaybının önlenmesi için örnekler çalışma başlayana kadar mutlaka kapakları kapalı tutulmalıdır. Bu şekilde trombositten zengin plazmanın pH değişiklikleri önlenir. Trombositten zengin plazmanın pH'ı 7.7-8.0 arasında olmalıdır. Örnekler trombosit agregasyon inhibisyonunu önlemek için oda sıcaklığında saklanmalıdır. Örnek, trombosit aktivasyonuna neden olacağı için buz üzerine, buzdolabına, vortekse, ya da shakera konmamalıdır. Laboratuvara pnömotik sistem ile iletilmemelidir. Trombosit fonksiyon testlerinde, örnek alımı ve analiz arası süre minimum 30 dakika olmalı ve üç saat içinde ölçüm tamamlanmalıdır. Trombosit agregasyonu sadece fibrinojen varlığında gerçekleşebilir. Agregometrik yöntemler öncesi mutlaka fibrinojen düzeyleri kontrol edilir.

Agregometrik yöntemleri etkileyen birçok ilaç ve yiyecek-ışecek bulunmaktadır. Bu nedenle mutlaka Tablo 1'de yer alan ilaçların kullanımını sorgulanmalıdır (13, 14).

Tablo 1. Ölçümleri Etkileyen bazı ilaç ve yiyecek-ışecekler

- Nonsteroid antiinflatuvarlar: İndometazin, İbuprofen, mefenamik asit, COX2 inhibitörler...
- Antibiyotikler: penisilin, sefalosporin, nitrofurantoin, hidroklorokin, amfoterisin...
- Kardiyovasküler ajanlar: β blokerler (propanol), vazodilatörler (nitroprusid, nitroglicerini), diüretikler (furosemid), kalsiyum kanal blokerleri
- Antikoagulanlar: heparin, kumadin, lepuridin, argatroban, bivalirudin
- Trombolitik ajanlar: streptokinaz, ürokinaz, doku plazminojen aktivatörü
- Psikotropikler ve anestezikler: trisiklik antidepressanlar (imipramin), fenotiazinler, genel/lokal anestezikler (halotan)
- Kemoterapötikler: mitramisin, daunorubisin, karmustin
- Dekstran, Radyokontrast maddeler, kinidin, etanol
- Kafein, sarımsak, kimyon, zerdeçal

Kanama zamanı

In vivo primer hemostaz değerlendirilmesinde kullanılan bir testtir. Cilt delinmesiyle meydana gelen yaranın trombositler tarafından hemostatik tıkaç geliştirme süresi yani kanamanın durma süresi ölçülür. Derinin kalınlığı, kişilerarası sıcaklık farkları, testin doğru olmayan yöntemler ile uygulanması gibi birçok durumdan etkilenmektedir (15). Standardizasyon sağlanabilmesi için geliştirilen uygulama cihazlarına rağmen testin doğruluğu ve hastaların kliniği çoğunlukla uyumlu değildir. Kanama zamanı genel olarak doğumsal ve akiz primer hemostaz bozukluklarının değerlendirilmesinde bir tarama testi olarak kullanılmaktadır. Trombotik tedavi görmekte olan akut miyokard enfarktüsünde kanamayı öngörmeye kullanılabılır ancak antitrombotik tedavinin izleminde kullanılmamaktadır (2,3).

Trombosit agregasyonuna dayalı testler

Trombosit zengin plazmada ışık transmittans agregometri (LTA)

LTA, Born tarafından ilk defa 1960'larda geliştirildi. Birçok trombosit fonksiyonunu değerlendirmede halen 'altın standard' yöntem olarak kabul edilmektedir. Trombosit zengin plazmaya çeşitli agonistler eklenerek trombosit aktivasyonu ile ilişkili yollar değerlendirilir (16). Bu testte GP IIb/IIIa bağımlı olarak in vitro trombosit-trombosit kümeleri oluşumu, 'agregasyon' sonucu ışık transmittansında artış ölçülür. Optik dansitesi yüksek olan trombosit zengin plazmaya ekzojen bir agonist eklendikten sonra oluşan trombosit agregatları gelişerek plazma daha berrak hale gelir ve ışık transmittansındaki artış ölçülür. Ölçüm cihazında ışık kaynağı ve fotosel arasındaki küvette trombosit zengin plazma 37°C'de devamlı boncukla karıştırılır. Agonist eklendikten sonra trombositler agreg olur. Transmite edilen ışık fotosel ile ölçülür. Cihaz %0'dan (trombosit zengin plazmanın maksimal optik dansitesi) %100'e kadar (optik dansitesi olmayan otolog trombosit fakir plazma) olan hız ve maksimal optik dansite artışını

fotometrik olarak ölçer ve kaydeder. Elde edilen sinyaller trombosit agregasyonu sırasında ışık transmittans artışını otomatik olarak grafiksel bir eğriye dönüştürür. Eğrinin eğimi, agregasyonun maksimal genişliği (%) ve bekleme fazı (lag faz) otomatik olarak ölçülür ayrıca trombosit agregasyonunun 5 fazı olan bazal düzey, agonist eklenmesi ve şekil değişimi, primer dalga, sekresyon, ikinci dalga grafiksel olarak incelenir (2).

Born trombosit agregometri prensibi trombosit fonksiyon bozuklukları ve antitrombotik tedavi izleminde en yaygın kullanılan yöntemdir. En sık kullanılan agregan ajanlar yani agonistler ADP (2 µM ve 5 µM), AA (1 mM), kollajen (1 µg/mL), epinefrin (10 µM)'dir. Ayrıca kullanılan diğer bazı agonistler: trombin reseptör active edici peptid (TRAP), TxA2, mimetic U46619, kalsiyum iyonofor A23187, trombin, serotonin, yılan venomu, antijen-antikor kompleksleri, solubl fibrin monomer kompleksleri ve fibrin yıkım ürünleridir. Bir antibiyotik olan ristosetin, trombosit fonksiyonunu değerlendirmede kullanılan bir diğer agonist olup, vWF'ün GP IIb/IIIa ile kompleks oluşumunu hızlandırır (2,17).

Antitrombotik tedavi monitorizasyonunda (örneğin aspirin, tiyepiridin) LTA kullanımı yüksek riskli hastalarda istenmeyen major kardiyovasküler olayları öngörmeye kullanılmaktadır. Hem akut koroner sendrom hem de stabil koroner arter hastalığı olan hastalarda ADP -AA-LTA ile ölçülen rezidüel trombosit aktivitesi, bu kişilerde iskemik olayların beklenmesi gerektiğini gösterir. Yapılan klinik ve laboratuvar çalışmalarda ADP ve/veya AA ile trombosit agregasyon için eşik değerler belirlenerek antitrombotik tedaviye yanıt vermeyen yani major kardiyovasküler olay geçirme riski olan hastalar belirlenmeye çalışılmıştır (18,19).

Birçok laboratuvar için LTA en önemli ve trombosit fonksiyonlarını tam olarak ortaya koyan bir test olmasına rağmen uygulamada belirgin bazı sorunlar vardır. LTA tekniği örnek alımı sırasında kullanılan antikoagulan,

lipemi, hemoliz veya trombositopeni gibi preanalitik değişkenden etkilenebilir. Testi uygulayan ve sonuçları yorumlayan laboratuvar çalışanlarının yüksek derecede beceri, deneyim ve ustalıkla sahip olmaları gerekmektedir. Hasta örneklerinin çalışılması (trombositten zengin plazmanın hazırlanması, farklı agonist konsantrasyonlarının kullanımı) dikkat ve titizlik istemektedir. Bu nedenlerden dolayı LTA'nın standardizasyonu sürekli geliştirilen bir çalışma alanıdır. Sonuç olarak, LTA'nın trombosit bozukluklarının saptanmasında birinci basamak testi olarak kullanılabilir. Birçok çalışmada gösterilmektedir. LTA sonuçları daha spesifik, ileri testler ile doğrulanmalıdır. Örneğin; akım sitometrisi ile özgül trombosit komponentlerinin saptanması, lumiagregometri ile trombosit sekresyon bozukluklarının ölçümü, yada trombosit adezyon bozukluklarını gösteren yöntemlerin uygulanması önemlidir (20,21).

Tam kanda İmpedans agregometri

Antikoagulanlı tam kan kullanılması nedeniyle örnek hazırlığı basamakları uygulanmaz. Tam kan içine yerleştirilen birbirine belirli bir uzaklıktaki iki elektrod yüzeyine aktif trombositlerin sahip oldukları yüzey reseptörleri aracılığıyla yapışması sağlanır. Meydana gelen trombosit agregasyonu sonucunda artan elektriksel impedans ölçülür. Artan elektriksel impedans Ohm cinsinden kaydedilir (22).

Kanın diğer komponentlerinin de agregasyonda etkileri düşünüldüğünde; tam kan kullanımı trombosit fonksiyonlarının ölçümünde daha fizyolojik şartlara yakın bir ortam sağlamaktadır. Ayrıca bir önemli nokta da tam kan agregometri, elektrod yüzeylerinde gerçekleştiği için aktif trombositlerin agregasyon ve adezyon kabiliyetlerini daha gerçekçi olarak yansıtır. Tam kan agregometrinin iki önemli avantajı daha vardır: 1. Tüm trombosit şekillerini içeren çok az miktarda tam kan kullanır. 2. Trombositlerin agonistler ile aktive edilmesi dışında manuel bir basamak içermemesi nedeniyle daha hızlı sonuçlar elde edilir (2,22).

Multipl Elektrod Agregometri (MEA), impedans agregometri prensibine dayanan POCT cihazı olarak geliştirilmiştir. Uygulama kolaylığı, hızlı olarak komple trombosit fonksiyonu değerlendirmesi yapılabilmesi nedeniyle tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Beş kanallı, bilgisayar bağlantılı, hazır-tek kullanımlık kuvvetlerde otomatik pipetleme ile iki bağımsız sensör ünitesi ile ölçüm yapar. Reaktifler yani agonist ve diluentler ön hazırlık gerektirmeden kullanıma hazırdır. Her iki bağımsız sensör ünitesi ayrı ayrı ölçüm yapar ve otomatik olarak eğri altı alan (AUC) hesaplanır. MEA, avantajlı kullanımı ve LTA'da da kullanılan aynı agonistler ile trombosit aktivasyonu kanama diyatezi tanısı ve anti-trombotik tedavi izleminde yüksek klinik değere sahip olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle kardiyovasküler hastalarda trombosit reaktivitesini saptamak için birçok eşik değer çalışması yapılmıştır (23).

MEA sadece antitrombotik ilaç kullanan kardiyovasküler hastalarda trombosit reaktivitesini saptama değil, ayrıca bu tedavi nedeniyle gelişebilecek kanama riskini de göstermede kullanılır. Kardiyak cerrahi öncesi MEA ile ölçülen trombosit fonksiyonu postoperatif dönemde kanama riski olan hastaların saptanmasında veya intrakraniyal hemoraji riskini saptamada yardımcıdır (24).

Lumiagregometri

Trombosit granüllerinden adenin nükleotidlerinin salınımı ve trombosit agregasyonunu eş zamanlı olarak ölçer. Lumiagregometri metodunda farklı agonistler ile uyarılan ve aktif hale gelen trombositlerden salınan adenosin trifosfat (ATP) luminesans teknikleri kullanılarak değerlendirilir. Ölçümler trombositten zengin plazma, yıkanmış trombositler ve tam kanda uygulanabilir. Ölçümde aktive trombositlerden salınan adenosin difosfat lusiferin-lusiferaz reaktifi aracılığıyla ATP ye çevrilir. ATP konsantrasyonu ile ışık emisyonu doğru orantılı olup lumiagregometri ile ölçülür. Antitrombotik ilaç kullanımı izleminde kullanımı olmayıp genellikle dens granüler sekresyon bozukluklarında birinci basamak tarama testi olarak tercih edilir (25).

Plateletworks sistemi

Plateletworks tam kanda agregasyon öncesi ve sonrası trombosit sayımı temelli bir sistemdir. Plateletworks agregasyon kitinde EDTA ve ADP veya AA içeren sitratlı tüpler mevcut olup bir de tam kan sayım cihazı içermektedir. EDTAlı kontrol örneğindeki trombosit sayısı ve ADP / AA içeren sitratlı kandaki trombosit sayısı elde edilir. Yeterli trombosit agregasyonu olduğunda sitratlı örneklerin trombosit sayılarında azalma olur. Bu test sadece hasta başında uygulanabilen kardiyak cerrahi sırasında intraoperatif olarak kullanılan bir testtir. Hem trombosit sayısı hem de fonksiyonu hakkında bilgi verir (26).

Shear streste trombosit adezyon testleri

Trombosit fonksiyon analizörleri (PFA)

PFA'lar kanama zamanının standardize edilmiş hali olarak kabul edilmekte olup kanama zamanı testine alternatif bir yöntem haline gelmiştir. Shear stres altında trombositlerin adezyonu ve çeşitli agonistlere karşı agregasyonu prensibine dayalı bir methodur. Primer hemostazı in vitro şartlarda simüle eden bir sistemdir (27). Sistem içine yerleştirilmiş Kollajen/Epinefrin (CEPI), Kollajen /ADP (CADP) veya P2Y ile kaplı bir membran mevcuttur. Analiz tek kullanımlık kartujlar içinde tam kanda yapılır. Örnek, negatif basınçla kapiller sisteme doğru aspire edilir ve membran üzerindeki ADP veya epinefrin dolu mikroskopik açıklıktan (147 µm) geçer. Trombosit agonistleri varlığında mikroskopik açıklık üzerinde trombosit adezyonu ve agregasyonu ve sonunda trombosit tıkaçı oluşur ve tıkanır. Trombositlerin bu açıklığı kapaması ve kanın geçmesinin durması için geçen süreye kapanma süresi denir. Kapanma süresi trombositler ile ilişkili hemostazı ölçer. Aktif trombositler kapanma süresini uzatır (28).

CADP ve CEPI kartujları kullanarak von Willebrand Hastalığı, Glanzmann trombastenisi veya Bernard- Soluier Sendromu gibi trombosit defektlerini, antitrombotik tedaviden ayırımı sağlanır. Son yıllarda geliştirilen

P2Y kartujları ile tienopiridin grubu ilaçlara olan trombosit yanıtı da ölçülmektedir (29).

Trombosit sayısı ve hematokrit düzeyi ve trombosit bozuklukları trombosit fonksiyon analizörü kapanma süresini uzatır. Ayrıca yüksek seviyelerde vWF, fibrinojen veya eritrosit CEPI kapanma süresini kısaltmaktadır (28).

Viskoelastik metodlar ile kombine edilmiş trombosit fonksiyon testleri

Tromboelastografi trombosit haritalama sistemi

Tromboelastografi (TEG) trombusün viskoelastik ve mekanik özelliklerini değerlendirerek hemostatik sistem hakkında genel bir bilgi veren bir ölçüm yöntemidir. TEG düşük shear streste pıhtı oluşması için geçen süre ve oluşan pıhtının kalitesini ölçen dolayısıyla hemostatik sistemin hem kantitatif, hem de kalitatif değerlendirilmesini sağlayan bir sistemdir. Trombositlerin oluşan pıhtı dayanıklılığına ne kadar katkıda bulunduğunu ölçer (30). Antitrombotik ilaçların değerlendirilmesinde yaygın kullanıma sahip değildir.

Akım sitometri yöntemi ile trombosit analizi

Trombosit yüzeyindeki P2Y12 reseptörünün inhibisyonu ve reseptör aktivitesinin ölçülmesi için kullanılan yöntemlerden biri vasodilatör uyumlu fosfoprotein (VASP) testidir. VASP'a karşı işaretli antikorlar ile akım sitometrik ölçüm yapılır. ADP ile P2Y12 reseptör inhibisyonunu değerlendirmede en özgül testtir. Klopidoğrel ve diğer tienopiridinlerin etkisini ölçmede kullanılır. Ancak kompleks örnek hazırlığı kullanımını sınırlamaktadır (31).

VASP trombosit içinde normalde fosforile olmayan bir proteindir. PGE1 cAMPYi aktive eder fosforilasyonu uyarırken, ADP VASP fosforilasyonunu P2Y12 reseptör aracılığı ile inhibe eder. Devamlı VASP fosforilasyonu P2Y12 reseptör inhibisyonu ile koreledir. VASP testi P2Y12 reseptörüne özgü olup P2Y1 reseptörünün etkisini göstermez, bu durum ADP agonistli agregasyon metodlarının

dan belirgin olarak ayrılmasını sağlar. Tiye-nopiridin grubu ilaçlar ile P2Y12 reseptör blokajı fosforile VASP düzeylerini artırır. Fosforile/ defosforile VASP oranı tiyenopiridin grubu ilaçların P2Y12 blokaj etkinliğini yansıtmaktadır. ADP stimülasyonu sonrası Fosforile/ defosforile VASP oranı azalmaktadır. Işık transmittans agregometri yöntemleri ile iyi korele sonuçlar elde edilmektedir (32).

Aspirin etkisinin laboratuvar değerlendirilmesi

Öncelikle aspirinin antitrombotik etkisini değerlendirmek için COX1 enziminin substratı olan AA ile indüklenen ve aspirinle bloke edilen trombosit agregasyon testi referans metod olarak önerilmektedir. Agregometre testleri trombosit zengin plazmada optik-transmittans agregometre şeklinde ya da tam kanda impedans agregometre şeklinde uygulanır. Tam kanda impedans agregometre prensibine dayalı POCT (Multiplate®) cihazları kullanımı oldukça yaygındır. Bunun dışında tromboelastografi ve trombosit haritalama (platelet mapping®) veya POCT (Verify-Now®) sistemleri ile ölçüm yapılabilir.

Belirtilen bu metodların dışında, yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda hastaları aspirine normal yanıt veren ve yanıt vermeyen olarak sınıflandırılması için eşik değerler saptanmıştır.

Belirlenen eşik değerler, agonist olarak AA uygulanan transmittans yada impedans agregometrede tam kanda yapılan ölçümler içindir. Aspirin için düşük yanıt transmittans agregometrede %10-20'nin altı, impedans agregometrede ise 0 Ω'un üzeri olarak tanımlanmıştır (33-35). Sonuçlar LTA'da Aspirin Reaksiyon Ünitesi (ARU) olarak verilir ve ≤549 ARU aspirine bağlı trombosit disfonksiyonu ve >550 ARU ise yetersiz aspirin etkisi olarak değerlendirilir. MEA sonuçlar eğri altı alan (AUC) olarak verilir. Aspirin testinde AUC 74-136 arasında olmalıdır. AUC düşük hastalarda aspirinin antitrombotik etkisi yeterlidir (23, 36).

Aspirinin biyokimyasal etkilerinin incelenmesi için en güvenilir test antikoagülansız tam kandan 37°C'de 1 saat bekletilerek elde edilen serumda TxB2 (TxA2'nin stabil metaboliti) düzeylerinin ölçümüdür. Trombositlerin maksimum tromboksan sentezleme kapasitesini gösteren bir test olup aspirin için çok hassastır. Ancak kişilerarası değişkenlik ve tromboksan sentezini aktive eden uyarıların çeşitliliği gibi nedenler yüzünden aspirine karşı trombositlerin yanıtını göstermede klinik kullanıma çok yaygın olarak geçememiştir. Tromboksanın karaciğer metaboliti olup idrarla atılan 11-dehidro-TxB2 trombosit dışı tromboksan sentezini yansıtmaktadır. Bu test için genellikle yaygın olarak ELISA kullanılmakta ve uygun eşik değerler tam olarak belirlenememiştir (37, 38).

Klopidogrel etkisinin laboratuvar değerlendirilmesi

Klopidogrel antitrombotik etkisini değerlendirmek için ADP ile indüklenen trombosit agregasyon testi referans metod olarak önerilmektedir. Agregometre testleri trombosit zengin plazmada optik-transmittans agregometre şeklinde ya da tam kanda impedans agregometre şeklinde uygulanır. Tam kanda impedans agregometre dışında tromboelastografi ve trombosit haritalama (platelet mapping®) veya POCT (Verify-Now®) sistemleri ile ölçüm yapılabilir.

Klopidogrel kullanan hastalarda, trombosit zengin plazmada 20µM ADP ile %60'dan fazla agregasyon ve 5µM ADP ile %50'den fazlasında agregasyon görülmektedir. Sağlıklı kişilerde ise agregasyon %75'in üzerindedir. P2Y12 inhibitörleri (Klopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor) için agonistler: ADP, PGE1, iso-TRAP (Trombin Reseptör Aktive edici Peptid) kullanılır ve sonuçlar P2Y12 Reaksiyon Ünitesi (PRU) olarak verilir. Baz PRU değerine göre % inhibisyon hesaplanır.

PRU <95 ve % P2Y12 inhibisyonu yüksek ise yüksek kanama riski; PRU >208 ve % P2Y12 inhibisyonu düşük ise yüksek tromboz ve iskemi gelişme riski mevcuttur. MEA ile ADP testinde sonuçlar 53-122 AUC arasındadır.

AUC düşük hastalarda klopidogrelin anti-trombotik etkisi yeterlidir (39,40,41).

Bir diğer klopidogrelin etkilerini gösteren metod VASP fosforilasyonunun akım sitometri ile incelenmesidir. Zahmetli ve pahalı bir yöntemdir, ancak hem VASP fosforilasyonu hem de P2Y12 reseptörün klopidogrel ile inhibisyon yollarını aynı anda ölçebildiği için trombosit agregasyonuna göre daha özgül olduğu görülmüştür. Kardiyovasküler olay riski için belirlenen eşik değerler trombosit reaktivite indeksi olarak ölçülmekte olup çeşitli çalışmalarda > %53, > %48 olarak bulunmuştur (42,43,44).

SONUÇ

Trombositler trombüs oluşumunda kilit görevlere sahiptir. Trombosit aktivasyonu ile iskemik olaylar tetiklenir. Trombosit fonksiyon testleri çok çeşitli yöntemler ile çalışılabilen ve ölçülebilen, antitrombotik tedaviye yanıtı değerlendirmede kullanılmaktadır. Test cevabında azalma antitrombotik tedavinin trombosit inhibisyonundaki yetersizliği yansıtmakta ve devam eden rezidüel trombosit reaktivitesini göstermektedir. Antitrombotik tedaviler bu sonuçlar doğrultusunda yapılmalıdır. Antikoagulan ilaç izleminde kullanılan INR, doku tromboplastininde elde edilen uluslararası standardizasyon sayesinde takip protokollerine girmiş ve sıkı bir şekilde klinisyenler tarafından uygulanmaktadır. Günümüzde en çok tercih edilen cihazlar impedans ve ışık transmittans agregometri prensiplerine dayalı olan POCT cihazlarıdır. Ancak mevcut trombosit fonksiyon testleri yöntemlerinin çeşitliliği, ideal bir ölçüm metodunun tespit edilememiş olması ve ideal eşik değerlerinin olmaması antitrombotik tedavi izleminde daha çözülememiş olan sorunlardır.

KAYNAKLAR

1. Lippi G, Favaloro EJ, Salvagno GL, Franchini M. Laboratory assessment of perioperative management of patients on antiplatelet therapy: From bench to the bedside. *Clinica Chimica Acta* 2009;405:8-16.

2. Panizza R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vascular health and risk management* 2015;11:133-148.

3. Miller JL, Rao AK. Blood platelets and von Willebrand disease. McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22 Ed. Philadelphia, Elsevier-Saunders, 2011, chapter 40, 801-822.

4. Kereiakes DJ, Gurbel PA. Peri-Procedural Platelet Function and Platelet Inhibition in Percutaneous Coronary Intervention. *J. Am. Coll. Cardiol. Intv.* 2008;1:111-121.

5. Fareed J, Hoppensteadt DA, Fareed D, et al. Survival of heparins, oral anticoagulants, and aspirin after the year 2010. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:58-73.

6. Şahna E. Antitrombotik ilaçlar. *Türkiye Klinikleri J Cardiol-Special Topics*. 2009;2-5:67-85.

7. Katzung B: *Basic and Clinical Pharmacology*. 9. Ed. San Francisco. The McGraw-Hill Companies. 2003, 543-550.

8. Cannon CP, Braunwald E. Unstable angina and non-ST elevation myocardial infarction. In Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. Editors. *Braunwald's Heart Disease*. 7th ed. Philadelphia: Saunders. 2005, 1243-79.

9. Gurbel PA, Tantry US. Aspirin and clopidogrel resistance: consideration and management. *J Interv Cardiol* 2006;19:439-448.

10. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 2007;5(Suppl. 1):230-237.

11. Sweeny JM, Gorog DA, Fuster V. Antiplatelet drug 'resistance'. Part 1: mechanisms and clinical measurements. *Nat. Rev. Cardiol* 2009; 6, 273-282.

12. Kuliczkowski W, Witkowski A, Polonski L, et al. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* 2009; 30, 426-435.

13. Harrison P, Mackie I, Mumford A, et al. Guidelines for the Laboratory Investigation of Heritable Disorders of Platelet Function. *BCSH guideline*. 2011:1-41.

14. Kottke-Marchant, Corcoran G. The laboratory diagnosis of platelet disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:133-146

15. Rodgers, RP, Levin, J A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin. Thromb. Hemost.* 1990; 16:1-20.

16. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal *Nature* 1962;194:927-29.

17. 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.

18. Lev EI. Aspirin resistance transient laboratory finding or important clinical entity? *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:678-680.
19. Breet NJ, van Werkum JW, Bowman HJ, et al. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation. *JAMA* 2010;303:754-762.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Panicca R, Antonucci E, Maggini N, et al. Assessment of platelet function on whole blood by multiple electrode aggregometry in high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy. *Am J Clin Pathol*. 2009;131:834-842.
24. Beynon C, Sakowitz OW, Unterberg AW. Multiple electrode aggregometry in antiplatelet-related intracerebral haemorrhage. *J Clin Neurosci*. 2013;20:1805-1806.
25. Fritsma GA. Platelet function testing: aggregometry and lumiaggregometry. *Clin Lab Sci*. 2007;20:32-37.
26. Champbell J, Ridgway H, Carville D. Plateletworks: a novel point of care platelet function screen. *Mol Diagn Ther*. 2008;12:253-258.
27. Michelson AD, Frelinger AL, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol*. 2006;98:4N-10N.
28. Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, et al. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost*. 2006;4:312-319.
29. Edwards A, Jakubowski JA, Rechner AR, Sugidachi A, Harrison P. Evaluation of the INNOVANCE PFA P2Y test cartridge: sensitivity to P2Y(12) blockade and influence of anticoagulant. *Platelets* 2012; 23: 106-115.
30. AK K, Atalan N, Tekeli A, et al. Tromboelastografi ve kalp cerrahisinde kullanımı. *Anadolu Kardiyol Derg* 2008; 8: 154-62).
31. Carubbi C, Masselli E, Gesi M, et al. Cytofluorimetric platelet analysis. *Semin Thromb Haemost*. 2014; 40: 88-98.
32. Alein B, Ravanat C, Cazenave JP, et al. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost*. 2005;3:85-92
33. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:961-965
34. Kuliczowski W, Halawa B, Korolko B, Mazurek W. Aspirin resistance in ischaemic heart disease. *Kardiol Pol* 2005;62:14-25
35. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2001;88:230-235
36. Siller-Matula JM, Francesconi M, Dechant C, et al. Personalized antiplatelet treatment after percutaneous coronary intervention: The MADONNA study. *Int J Cardiol* 2013;167(5), 2018-2023.
37. Cattaneo, M. Laboratory detection of 'aspirin resistance': what test should we use (if any)? *Eur Heart J*. 2007;28:1673-1675.
38. Gonzalez-Conejero.. Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure? *Stroke* 2005; 36:276-280.
39. Hochholzer W, Trenk D, Bestehorn HP, et al. Impact of the degree of peri-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1742-1750.
40. Geisler T, Grass D, Bigalke B, Stellos K, Drosch T, Dietz K, Herdeg C, Gawaz M. The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *J Thromb Haemost* 2008; 6:54-61.
41. 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.
42. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, et al. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005;3:85-92.
43. Frere C, Cuisset T, Quilici J, et al. ADP-induced platelet aggregation and platelet reactivity index VASP are good predictive markers for clinical outcomes in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Thromb Haemost* 2007;98:838-843
44. Blindt R, Stellbrink K, de Taeye A, et al. The significance of vasodilator-stimulated phosphoprotein for risk stratification of stent thrombosis. *Thromb Haemost* 2007;98:1329-1334.

Yazışma adresi:

Burcu Barutçuoğlu

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

E-mail: burcu.barutcuoglu@ege.edu.tr

