

Strokovni prispevek/Professional article

DOLOČITEV ŠTEVILA AKTIVIRANIH TROMBOCITOV S PROTITELESI ZA AKTIVIRANI FIBRINOGEN IN SELEKTIN-P PRI BOLNIKIHZ ESENCIALNO TROMBOCITEMIJO IN VPLIV ANTIAGREGACIJSKIH ZDRAVIL

DEFINITION OF ACTIVATED THROMBOCYTE NUMBER WITH ANTIBODIES FOR ACTIVATED FIBRINOGEN AND P-SELECTIN IN PATIENTS WITH ESSENTIAL THROMBOCYTHEMIA AND ANTIAGGREGATION DRUG EFFECT

Samo Zver, Darja Žontar

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 2004-02-13, sprejeto 2004-03-05; ZDRAV VESTN 2004; 73: Suppl. I: 127-34

Gljučne besede: aktivirani trombociti; selektin-P; aktivni fibrinogen; klopidogrel; acetyl-salicilna kislina

Key words: activated platelets; selectin-P; activated fibrinogen; clopidogrel; acetyl-salicylic acid

Izveček – Izhodišča. Esencialna trombocitemija (ET) je kronična mieloproliferativna bolezen, za katero je značilno povečano število funkcijsko spremenjenih trombocitov v razponu od 400 do $2000 \times 10^9/L$. Večji delež trombocitov kot pri zdravi populaciji je pri bolnikih z ET tudi aktiviran. Aktivirane trombocite označujeta selektin-P in aktivirani fibrinogen na njihovih membranah. Ker so za bolezen značilni pogostejši trombembolični zapleti in krvavitve, je ET potrebno zdraviti. Skupino bolnikov z ET, ki imajo število trombocitov nižje od $1000 \times 10^9/L$ in niso utrpeli nobenega trombemboličnega zapleta, zdravimo samo z antiagregacijskim zdravilom, acetylsalicilno kislino 100 mg/dan per os. Redna uporaba klopidogrela pri bolnikih z ET ni poznana in je omejena le na posamezne opise primerov v literaturi.

Abstract – Background. Essential thrombocythemia (ET) is a chronic myeloproliferative disease with a platelet count within the range of 400 – $2000 \times 10^9/L$. Higher percentage of platelets in the circulation of patients with ET express also activation markers on their membranes. Two of such markers are P-selectin and activated fibrinogen on platelet membranes. Because of frequent thrombembolic and also bleeding related complications, treatment of ET is mandatory. Patients whose platelet count is less than $1000 \times 10^9/L$ and who did not suffer any thrombembolic complication during the course of the disease, are usually treated with an antiaggregation drug, acetylsalicylic acid 100 mg/daily orally. Clopidogrel is an adenosyn-di-phosphate (ADP) receptor antagonist in platelets. There is no routine clinical data about clopidogrel treatment in the patients with ET and only sporadic case reports can be found in the literature.

Bolniki in metode. V klinični raziskavi smo primerjali antiagregacijski učinek acetylsalicilne kisline in klopidogrela tako, da smo določali deleže izraženega selektina-P in aktiviranega fibrinogena na membranah trombocitov.

Patients and methods. In our clinical study we compared antiaggregational effects of acetylsalicylic acid and clopidogrel, by measuring the P-selectin level and activated fibrinogen expression on platelet membranes.

V raziskavo smo vključili 35 bolnikov z ET v starosti od 21 do 78 let, ki so imeli število trombocitov med 451 in $952 \times 10^9/L$ in ki v poteku bolezni niso utrpeli trombemboličnega zapleta. Bolniki so v štirinajst dnevni zaporednih obdobjih prejeli acetylsalicilno kislino 100 mg/dan per os, klopidogrel 75 mg/dan per os in nato še obe zdravili hkrati v istem odmerku. Po vsakem končanem obdobju smo delež (odstotek) aktiviranih trombocitov določili s pretočnim citometrom z monoklonskimi protitelesi proti selektinu-P in aktiviranemu fibrinogenu. Za izračun razlike med povprečjema dveh majhnih neodvisnih vzorcev smo uporabili t-porazdelitev, oziroma t-test.

There were 35 ET patients included, within the age range between 21 and 78 years and with platelet counts within 451 – $952 \times 10^9/L$. None of the patients did suffer any thrombembolic complication during the course of the disease. During the sequential 14 day periods, patients received acetylsalicylic acid 100 mg/daily orally, followed by clopidogrel 75 mg/daily orally and ultimately, together acetylsalicylic acid 100 mg/daily orally plus clopidogrel 75 mg/daily orally. After each fourteen days period the level of P-selectin and activated fibrinogen activated platelets were determined with monoclonal antibodies on flow cytometer. Statistical evaluation was calculated on the difference of average values between the two small, independent pair groups with the t-test.

Rezultati. Ko so bolniki prenehali jemati acetylsalicilno kislino in začeli prejemati klopidogrel, so se deleži izraženega selektina-P na membrani trombocitov statistično značilno zmanjšali (t-vrednost $1,99$; $p < 0,05$). Prav tako se je statistič-

no značilno zmanjšal tudi delež selektina-P v obdobju, ko so bolniki prejeli hkrati acetilsalicilno kislino in clopidogrel glede na obdobje, ko so prejeli samo acetilsalicilno kislino (*t*-vrednost 2,11; $p < 0,05$). Nobene statistično značilne razlike v deležih selektina-P pa nismo ugotovili, ko smo primerjali obdobje, v katerem so bolniki prejeli samo clopidogrel z obdobjem, ko so prejeli hkrati acetilsalicilno kislino in clopidogrel (*t*-vrednost 0,19; $p > 0,05$). Deleži aktiviranega fibrinogena na trombocitnih membranah so bili v vseh obdobjih jemanja zdravil med seboj primerljivi in brez statistično ugotovljenih značilnih razlik med seboj (za vsako parno razmerje je bil $p > 0,05$).

Zaključki. Clopidogrel statistično značilno zmanjša delež selektina-P na membranah trombocitov pri bolnikih z ET ($p < 0,05$). Acetilsalicilna kislina ne vpliva na zmanjšanje P-selektina na membrani trombocitov. Tudi kombinacija acetilsalicilna kislina/clopidogrel nima večjega učinka na zmanjšanje izraženega deleža selektina-P kot clopidogrel sam. Acetilsalicilna kislina in clopidogrel vsak posamezno kot tudi v kombinaciji ne znižata deleža aktiviranega fibrinogena na membranah trombocitov. Zaključimo lahko, da je clopidogrel morda lahko ustrezná zamenjava za acetilsalicilno kislino pri bolnikih z ET, ki acetilsalicilne kisline zaradi različnih vzrokov ne morejo prejemati.

Uvod

Esencialna trombocitemija (ET) sodi v skupino kroničnih mieloproliferativnih krvnih bolezní. Je klonška bolezen multipotentne matične krvotvorne celice, ki je usmerjena v megakariocitno-trombocitno celično vrsto. V krvni sliki je zato zvečano število trombocitov od 400 do 2000 × 10⁹/L, v kostnem mozgu pa ugotovimo povečano število velikih, zrelih megakariocitov. Ker noben klinični in laboratorijski kazalec ni značilen za ET, potrdimo diagnozo tako, da izključimo ostale mieloproliferativne in mielodisplastične bolezni, predvsem pa vsa stanja, ki bi bila lahko povezana z reaktivno oziroma sekundarno trombocitozo (1).

Večje število trombocitov kot pri zdravih osebah je pri bolnikih z ET tudi aktiviranih (2, 3). Delež aktiviranih trombocitov lahko ocenimo z določanjem števila trombocitov, ki imajo na svoji površini izražena specifična antigena. To sta aktivirani, konformacijski spremenjeni fibrinogen, ki je vezan na receptor GP II_B/III_A, in selektin-P (poznán tudi kot CD62 antigen). Pri ET so pogostejši trombembolični zapleti, ki lahko prizadejejo arterijski in/ali venski žilni sistem in so glavni vzrok obolenosti in umrljivosti pri bolnikih (4, 5). Najpogosteje prihaja do cerebro-vaskularnih infarktov (CVI), prehodnih ishemijskih osrednjega živčevja (TIA), zapor manjših perifernih arterij, miokardnih infarktov in globokih venskih tromboz s posledičnimi pljučnimi trombembolizmi. Žilje je lahko prizadeto tudi na ravni arteriol in kapilar in se klinično izrazi kot ishemijski prstov rok, nog oziroma akralnih delov telesa, kar imenujemo eritromelalgija (6). Zato je ET potrebno zdraviti.

S kliničnimi raziskavami je potrjeno, da število trombocitov 1000 × 10⁹/L in več pomembno vpliva na pogostost trombemboličnih zapletov in krvavitev pri novoodkritih kot tudi pri že zdravljenih bolnikih z ET (7). Veljavna doktrina zdravljenja bolnikov z ET na Kliničnem oddelku za hematologijo Kliničnega centra v Ljubljani in tudi v Sloveniji je, kakor sledi. Novoodkriti bolniki s številom trombocitov v razponu med 400 in 1000 × 10⁹/L, ki v anamnezi nimajo trombemboličnega zapleta, prejemajo samo antiagregacijsko zdravilo, acetilsalicilno kislino

Results. When the patients stopped with acetylsalicylic acid and began with clopidogrel, the percentage of P-selectin exposure on platelet membranes was statistically significant lower (*t*-value 1.99; $p < 0.05$). We also noticed statistically significant lower P-selectin exposure in the period, during which patients received acetylsalicylic acid plus clopidogrel, versus the period, during which they received acetylsalicylic acid only (*t*-value 2.11; $p < 0.05$). But there was no statistically significant difference in P-selectin exposure within the periods, during which patients received clopidogrel versus acetylsalicylic acid plus clopidogrel (*t*-value 0.19; $p > 0.05$). Percentages of activated fibrinogen exposures on platelet membranes were in all clinical study periods comparable and no statistically significant differences between them were noticed (for each pair-relation $p > 0.05$).

Conclusions. In patients with ET clopidogrel statistically significant ($p < 0.05$) lowers the percentage of P-selectin exposure on platelet membranes. Acetylsalicylic acid has no influence on P-selectin expression and also the combination of acetylsalicylic acid and clopidogrel, does not have higher P-selectin lowering efficacy, than clopidogrel itself. Acetylsalicylic acid and clopidogrel alone, nor in combination don't have any influence on the expression level of activated fibrinogen on platelet membranes. To conclude, that clopidogrel may be an alternative to acetylsalicylic acid in patients with ET, who can not tolerate acetylsalicylic acid because of its side-effects.

100 mg/dan per os. Bolnike z ET, ki imajo ob ugotovitvi bolezní število trombocitov večje od 1000 × 10⁹/L, in tiste, ki so že utrpeli kakršen koli trombemboličen zaplet, zdravimo s citostatiki (busulfan, hidroksiurea) ali interferonom alfa.

V zadnjih letih se uveljavlja novo antiagregacijsko zdravilo clopidogrel. Clopidogrel je antagonist receptorjev za adenosin-di-fosfat (ADP) na membrani trombocitov (9–12). ADP je v skoraj molarnih koncentracijah v gostih zrnih trombocitov, iz katerih se sprosti predvsem takrat, ko so trombociti stimulirani s trombinom in kolagenom. Sam po sebi je ADP šibak agregacijski dejavnik, zato pa je nujen kofaktor za normalno trombocitno aktivacijo z agregacijskima agonistoma trombinom in kolagenom (13, 14). V manjši meri ADP poveča tudi agregacijsko delovanje šibkejših agonistov, kot so serotonin, adrenalin in nekateri citokini (15–17).

Na trombocitih so znani trije različni receptorji za ADP. To so receptorji P2Y₁, P2Y₁₂ in P2X₁. Clopidogrel deluje na receptor P2Y₁₂. Zdravilni učinek nastopi po treh dneh jemanja zdravila in traja lahko najdlje še deset dni zatem, ko bolnik zdravila ne prejema več. Selektivno in nepovratno antagonizira z ADP inducirano inhibicijo PGE₂-adenilil ciklaze (prostaglandin E₁ adenilil ciklaza), fosforilacijo tirozina na več proteinih in defosforilacijo nekaterih proteinov (18–20). Clopidogrel zato zavira agregacijo trombocitov z različnimi agregacijskimi dejavniki, predvsem z ADP, moti vezavo fibrinogena na receptor GPII_B/III_A, znižuje delež selektina-P na trombocitni membrani in zavira povezavo med trombociti in levkociti v krvnem strdku (21, 22). Hkrati pa clopidogrel ne vpliva na spremembo oblike trombocitov in tok kalcija skozi trombocitno membrano, ki sta prav tako odvisna od ADP.

Redno se clopidogrel že uporablja v kardiologiji pri bolnikih s sindromom angine pektoris (AP) (23). Po veljavni doktrini v Sloveniji bolniki z ishemično boleznijo srca, ki jih zdravimo s koronarografijo in vstavitvijo notrajžilnih opornic v koronarne arterije, po posegu vsaj štiri tedne prejemajo clopidogrel 75 mg/dan skupaj z acetilsalicilno kislino 100 mg/dan per os (24, 25). Zdravljenje nato nadaljujejo samo z acetilsalicilno kislino. Clopidogrel lahko še naprej prejemajo tudi bolniki z is-

hemično boleznijo srca, ki zaradi drugih vzrokov ne morejo prejemati acetilsalicilne kisline.

Pri bolnikih z ET bi bil morda lahko clopidogrel alternativa antiagregacijskemu zdravljenju z acetilsalicilno kislino pri bolnikih, ki imajo ob ugotovitvi boleznih število trombocitov manjše od $1000 \times 10^9/L$ in niso doživeli tromboemboličnega zapleta. Posebno bi clopidogrel prišel v poštev kot zdravilo izbire pri bolnikih, ki imajo alergične reakcije na acetilsalicilno kislino, pri bolnikih z anamnezo ulkusne bolezni po jemanju nesteroidnih antirevmatikov ali pa pri tistih, ki imajo sočasno astmo, acetilsalicilna kislina pa lahko sproži astmatične napade in alergični rinitis/sinusitis.

Učinkovitost zdravljenja ET z acetilsalicilno kislino in/ali clopidogrelom lahko poskusimo objektivno oceniti tako, da določimo delež aktiviranih trombocitov. Aktivirani trombociti imajo na svoji površini izražen selektin-P in receptorje $GP II_B/III_A$ za aktivirano, konformacijsko spremenjeno obliko fibrinogena. Selektin-P je glikoprotein v membranah a granul trombocitov, ki se vključuje v membrano trombocita, ko je ta aktiviran (26). Če je selektin-P na membrani trombocita, se v trombus vključijo levkociti. Verjetno je to ključni dogodek pri tromboogenezi, povezan tudi s kasnejšim vnetnim odgovorom v samem trombusu (27). Clopidogrel zmanjša delež (odstotek) izraženosti selektina-P na trombocitni membrani (28, 29). Z monoklonskimi protitelesi proti P-selektinu lahko s pretočnim citometrom določimo delež aktiviranih trombocitov v celotni trombocitni populaciji bolnika.

$GP II_B/III_A$ je pri človeku receptor za fibrinogen. Na en receptor se veže ena molekula fibrinogena. Mirujoči trombocit ima na svoji površini od 40.000 do 80.000 receptorjev $GP II_B/III_A$, ki pa fibrinogena ne vežejo. Ob aktiviranju trombocita se njihovo število poveča v razponu od 0 do 100%. Aktiviranje trombocita spremeni tudi konformacijo receptorjev $GPII_B/III_A$, tako, da se izpostavijo njihova vezavna mesta za fibrinogen. Tako spremenjeni receptor ima zato veliko afiniteto za fibrinogen. Vezava fibrinogena na konformacijsko spremenjen receptor $GPII_B/III_A$ pa spremeni tudi konformacijsko obliko fibrinogena. Nastane aktivirani fibrinogen, ki ga lahko določamo z monoklonskimi protitelesi.

V pregledu literature nismo zasledili poročil o zdravljenju bolnikov z ET s clopidogrelom. Prav tako tudi ni objavljenih poročil o zdravljenju ET s kombinacijo acetilsalicilne kisline in clopidogrela in spremljanju učinka zdravljenja z določitvijo deleža aktiviranih trombocitov s protitelesi za P-selektin in aktivirani fibrinogen. Menimo, da bi lahko z določanjem deleža aktiviranih trombocitov v klinični praksi dobili pomemben podatek o tem, kaj z antiagregacijskim zdravljenjem bolnikov z ET pravzaprav dosežemo. Morda bi lahko delež aktiviranih trombocitov v prihodnje postal napovedni dejavnik tveganja nastanka tromboemboličnega zapleta pri bolnikih z ET.

Zasnova klinične raziskave in opis metod

V obdobju 12 mesecev smo v raziskavo vključili 35 bolnikov, 9 moških in 26 žensk, ki v poteku boleznih niso doživeli tromboemboličnega zapleta. Njihova povprečna starost je bila 58,6 leta v razponu od 21 let do 78 let. Pogoj za vključitev v raziskavo je bilo število trombocitov med 400 in $1000 \times 10^9/L$. Tako je bilo povprečno število trombocitov pri bolnikih $763 \times 10^9/L$, v razponu od 451 do $952 \times 10^9/L$. Pri vključenih bolnikih smo posebej pozorno opravili anamnezo v smislu izključitve boleznih srca in ožilja, predvsem sindroma angine pektoris. Ker so vključeni bolniki krajši čas prejemali dve antiagregacijski zdravili hkrati, nihče od bolnikov ni smel imeti anamnestičnih podatkov o ulkusni bolezni želodca in dvanajstnika, oziroma nagljenosti k podkožnim in sluzničnim krvavitvam.

Diagnozo ET smo postavili na osnovi zvečanega števila trombocitov, ki je moralo biti več od $400 \times 10^9/L$ in potrdili z izsledkom punkcije oziroma biopsije kostnega mozga. V kostnem mozgu ni smelo biti morfoloških znakov mielodisplastičnih krvnih boleznih in obsežnejše kolagenske fibroze. V krvni sliki je moral biti hematokrit manjši od 40% in povprečni volumen eritrocitov (PVE) normalen. Sočasno smo pri vseh bolnikih izključili vzroke za sekundarno trombocitozo.

Načrt klinične raziskave

Bolnikom smo določili delež aktiviranih trombocitov v treh različnih kliničnih obdobjih. Določili smo jih s pretočnim citometrom in monoklonskimi protitelesi proti selektinu-P in aktiviranemu fibrinogenu. *Prvič* smo odvzeli kri za določitev aktiviranih trombocitov bolnikom, ki se že vodijo v hematološki ambulanti in so vsaj štirinajst dni pred odvzemom redno prejemali acetilsalicilno kislino 100 mg/dan per os. Bolnikom acetilsalicilne kisline z namenom, da bi dobili izhodne vrednosti selektina-P in aktiviranega fibrinogena v obdobju, ko bolniki ne bi jemali zdravila, nismo ukinili. To bi za bolnike lahko predstavljalo preveliko tveganje za trombotične zaplete, kar ni skladno z medicinsko etiko. Hkrati smo vključili tudi novoodkrite bolnike z ET, ki so v tem obdobju prišli v hematološko ambulanto. Tej podskupini bolnikov smo odvzeli kri za določitev aktiviranih trombocitov, še preden so začeli jemati acetilsalicilno kislino in nato še enkrat potem, ko so že 14 dni prejemali acetilsalicilno kislino 100 mg/dan. *Drugič* smo kri za določitev aktiviranih trombocitov odvzeli, ko so bolniki prenehali jemati acetilsalicilno kislino 100 mg/dan in naslednjih 14 dni prejemali samo clopidogrel 75 mg/dan per os. *Tretjič* smo kri za določitev aktiviranih trombocitov odvzeli, ko so bolniki naslednjih 14 dni prejemali acetilsalicilno kislino 100 mg/dan per os skupaj s clopidogrelom 75 mg/dan per os. Po koncu raziskave so bolniki nadaljevali s trenutno uveljavljenim antiagregacijskim zdravljenjem z acetilsalicilno kislino 100 mg/dan. Ob menjavah zdravil (acetilsalicilna kislina/clopidogrel) nismo predvideli večdnevnega prostega intervala, v katerem naj bi se prejšnje zdravilo izplavilo iz telesa. To, upošteva življenjsko dobo trombocitov, na katere zdravili učinkujeta, niti ni bilo potrebno.

Raziskavo je odobrila komisija za medicinsko etiko dne 24. 9. 2002 (dopis št. 95/09/02).

Določitev števila aktiviranih trombocitov s pretočnim citometrom

Vsakemu bolniku smo na začetku klinične raziskave in ob koncu vsakega obdobja jemanja zdravil odvzeli kri za določitev aktiviranih trombocitov. Pri vsakem odvzemu smo odvzeli 5 ml venske krvi v epruveto s citratom kot antikoagulansom (0,105 M). Kot reagente smo uporabljali fiziološko raztopino z dodatkom pufra (PFR), 1-odstotni bovini serumski albumin (BSA), piščančja protitelesa proti selektinu-P (anti-human P-selectin-FITC WAK-FA-PSFITC-2, proizvajalec WAK Chemie, Bad Soden, Germany), piščančja protitelesa proti aktiviranemu fibrinogenu (anti human fibrinogen WAK-FA-AFFITC-2, proizvajalec WAK Chemie, Bad Soden, Germany). Izotipski kontroli za protitelesa proti selektinu-P sta bili piščančji IgY-FITC (WAK Chemie, Bad Soden, Germany) in za protitelesa proti aktiviranemu fibrinogenu piščančji IgG1-FITC (WAK Chemie, Bad Soden, Germany) (30).

Vzorec krvi v epruveti s citratom smo takoj po odvzemu petnajst minut centrifugirali pri 194 G (1000 obratih/minuto). S trombociti bogato plazmo smo odpipetirali in nato redčili vzorec s fiziološko raztopino do števila trombocitov približno $400 \times 10^9/L$. V označene epruvete smo odpipetirali 40 μl tako pripravljene s trombociti bogate plazme in dodali 10 μl protiteles oziroma izotipskih kontrol. Po petnajstminutni inkubaciji v temi in pri sobni temperaturi smo v vsako epruveto posebej

pipetirali 2 ml ohlajenega pufra PFR z BSA in odčitali fluorescenco na pretočnem citometru Coulter Epics XL-MCL. Rezultati smo zapisali v odstotkih.

Statistična obdelava podatkov

Cilj statistične obdelave zbranih podatkov je bil ovrednotiti razlike v delovanju treh načinov antiagregacijskega zdravljenja na znižanje deleža aktiviranih trombocitov z določitvijo deleža selektina-P in aktiviranega fibrinogena na membrani trombocitov. Statistična analiza je bila ločena za delež izraženega selektina-P in za delež izraženega aktiviranega fibrinogena. Statistične spremenljivke so bili deleži selektina-P (1) in aktiviranega fibrinogena (2) na trombocitnih membranah pri zdravljenju z A (acetilsalicilna kislina), P (clopidogrel) in kombinaciji AP (acetilsalicilna kislina in clopidogrel hkrati) pri vsakem od bolnikov v skupini. V celotni skupini bolnikov z ET smo oblikovali tudi podskupino novoodkritih bolnikov z ET, ki smo jim določili tudi deleže aktiviranih trombocitov, še preden so začeli prejemati acetilsalicilno kislino (0).

Uporabili smo preskus domneve o razliki med povprečema dveh majhnih neodvisnih vzorcev. Preizkus je temeljil na analizi parnih podatkov s t-testom. Primerjani parni vzorci so: (a) delovanje zdravila P na znižanje deleža selektina-P in aktiviranega fibrinogena v primerjavi z delovanjem zdravila A (kontrolni vzorec); (b) delovanje kombinacije zdravil AP na znižanje deleža selektina-P in aktiviranega fibrinogena v primerjavi z delovanjem zdravila A (kontrolni vzorec); (c) delovanje zdravila P na znižanje deleža selektina-P in aktiviranega fibrinogena v primerjavi z delovanjem kombinacije zdravil AP.

Pri podskupini novoodkritih bolnikov z ET smo izhodiščno vrednost selektina-P in aktiviranega fibrinogena na trombocitnih membranah, ko bolniki še niso prejeli nobenega zdravila s t-testom dodatno primerjali z vrednostjo selektina-P in aktiviranega fibrinogena potem, ko so bolniki začeli prejemati zdravilo A, P ali hkrati AP. Parne kombinacije A, P in AP smo pri tej podskupini bolnikov primerjali še ločeno med seboj.

Rezultati

Skupino 35 bolnikov z ET, ki smo jih vključili v klinično raziskavo kot osrednjo skupino za statistično obdelavo podatkov, smo razdelili še na dve podskupini bolnikov. V prvo podskupino 17 bolnikov smo uvrstili novoodkrite bolnike z ET, ki ob prihodu v hematološko ambulantno niso jemali antiagregacijskih zdravil oziroma acetilsalicilne kisline. Za statistično obdelavo so bili zanimivi zato, ker smo jim lahko določili izhodiščne vrednosti selektina-P in aktiviranega fibrinogena. V drugo podskupino 18 bolnikov smo uvrstili bolnike, ki so se že pred vključitvijo v klinično raziskavo vodili v hematološki ambulanti in redno prejeli acetilsalicilno kislino 100 mg/dan.

Za celotno skupino 35 bolnikov in za vsako od podskupin smo izračunali aritmetično sredino, mediano, modus, standardno deviacijo, minimalno in maksimalno vrednost posamezne meritve ter vrednosti za prvi, drugi in tretji kvartil. Za vsak primerjani par smo izračunali t-vrednost in jo nato prevedli v vrednost p pri 5-odstotni stopnji statističnega tveganja.

Za skupino 35 bolnikov v obdobju jemanja acetilsalicilne kisline (A1) je bila

aritmetična sredina za delež selektina-P 4,29% in tako precej večja kot izračunana mediana vrednost 2,85% oziroma modus 3,39% (Razpr. 1). To je posledica visokega deleža selektina-P v tem obdobju pri 4 bolnikih. Največja vrednost je bila celo 23,50%. Ko so bolniki prenehali jemati acetilsalicilno kislino (A1) in začeli jemati clopidogrel (P1), so se deleži izraženega

Razpr. 1. Statistična obdelava vseh 35 bolnikov z ET.

Table 1. Statistical data from all 35 patients with ET.

	A1	P1	AP1	A2	P2	AP2
Število bolnikov No. of patients	35	35	35	35	35	35
Aritmetična sredina Arithmetical mean value	4,2960	2,6826	2,6200	39,5771	37,1657	39,0600
Mediana Median	2,8500	2,3800	2,5800	37,2000	33,5000	38,4000
Modus Modus	3,39	2,32	1,20	17,00	34,10	38,40
Stand. deviacija SD	4,6054	1,3665	0,9772	11,2454	13,0548	10,6337
Minimum Min.	1,01	0,49	0,96	17,00	20,60	24,00
Maksimum Max.	23,50	7,09	4,65	66,60	80,20	81,90
Vsota Total	150,36	93,89	91,70	1385,20	1300,80	1367,10
Prvi kvartil 1 st quartile	25	2,4600	1,9600	2,0400	33,0000	29,8000
Drugi kvartil 2 nd quartile	50	2,8500	2,3800	2,5800	37,2000	33,5000
Tretji kvartil 3 rd quartile	75	4,0000	3,3400	3,2300	48,6000	39,4000

A - acetilsalicilna kislina, P - clopidogrel, 1 - selektin-P, 2 - aktiviran fibrinogen
A - acetylsalicylic acid, P - clopidogrel, 1 - P-selectin, 2 - activated fibrinogen

Razpr. 2. Statistična obdelava podskupine 17 novoodkritih bolnikov z ET, ki ob vključitvi v klinično raziskavo niso prejeli acetilsalicilne kisline.

Table 2. Statistical data from 17 newly diagnosed ET patients, without acetylsalicylic therapy.

	01	A1	P1	AP1	02	A2	P2	AP2
Število bolnikov No. of patient	17	17	17	17	17	17	17	17
Aritmetična sredina Arithmetical mean value	4,4700	4,8618	2,7053	2,7171	41,5824	39,6235	39,7059	39,8647
Mediana Median	3,5000	2,9300	2,3200	2,6100	39,7000	39,0000	34,1000	38,4000
Modus Modus	1,54	3,39	2,32	0,96	23,40	17,00	27,00	39,80
Stand. deviacija SD	3,6565	6,0432	0,8608	1,0007	14,9869	12,1896	13,9682	12,6233
Minimum Min.	1,54	1,01	1,59	0,96	23,40	17,00	27,00	28,40
Maksimum Max.	17,30	23,50	5,18	4,65	76,20	58,00	80,20	81,90
Vsota Total	75,99	82,65	45,99	46,19	706,90	673,60	675,00	677,70
Prvi kvartil 1 st quartile	25	2,4800	2,3300	2,1600	2,1200	30,2500	29,7500	30,2500
Drugi kvartil 2 nd quartile	50	3,5000	2,9300	2,3200	2,6100	39,7000	39,0000	34,1000
Tretji kvartil 3 rd quartile	75	4,8900	4,0350	3,2300	3,4050	46,2000	48,9000	43,2000

0 - brez zdravila, A - acetilsalicilna kislina, P - clopidogrel, 1 - selektin-P, 2 - aktiviran fibrinogen

0 - without therapy, A - acetylsalicylic acid, P - clopidogrel, 1 - P-selectin, 2 - activated fibrinogen

Razpr. 3. Statistična obdelava podskupine 18 bolnikov z ET, ki so že predhodno jemali acetilsalicilno kislino.

Table 3. Statistical data from 18 ET patients, already treated with acetylsalicylic acid.

	A1	P1	A1P1	A2	P2	A2P2
Število bolnikov No. of patient	18	18	18	18	18	18
Aritmetična sredina Arithmetical mean value	3,7617	2,6611	2,5283	39,5333	34,7667	38,3000
Mediana Median	2,8200	2,4900	2,4250	36,4000	31,5500	38,4000
Modus Modus	1,47	0,49	1,20	26,50	20,60	38,40
Stand. deviacija SD	2,7247	1,7425	0,9742	10,6334	12,0282	8,6556
Minimum Min.	1,47	0,49	1,00	26,50	20,60	24,00
Maksimum Max.	13,40	7,09	4,61	66,60	73,20	54,70
Vsota Total	67,71	47,90	45,51	711,60	625,80	689,40
Prvi kvartil 1 st quartile	25	2,4600	1,3150	1,9000	33,3000	27,9250
Drugi kvartil 2 nd quartile	50	2,8200	2,4900	2,4250	36,4000	31,5500
Tretji kvartil 3 rd quartile	75	4,0325	3,5000	3,1925	45,8000	36,7000

A - acetilsalicilna kislina, P - clopidogrel, 1 - selektin-P, 2 - aktiviran fibrinogen

A - acetylsalicylic acid, P - clopidogrel, 1 - P-selectin, 2 - activated fibrinogen

Razpr. 4. Analiza parnih vzorcev s t-testom.

Table 4. T-test matched-pair analysis.

	F	t	p
A1-P1	11,36	1,99	p < 0,05
A1-A1P1	22,21	2,11	p < 0,05
P1-A1P1	1,96	0,19	p > 0,05
A2-P2	1,35	0,002	p > 0,05
A2-A2P2	1,12	0,018	p > 0,05
P2-A2P2	1,51	0,056	p > 0,05
01-A1	2,73	0,05	p > 0,05
01-P1	20,54	2,01	p < 0,05
01-A1P1	13,35	1,98	p < 0,05
A1-P1	56,11	1,46	p > 0,05
A1-A1P1	36,47	1,44	p > 0,05
P1-A1P1	1,54	0,04	p > 0,05
02-A2	1,51	0,03	p > 0,05
02-P2	1,15	0,03	p > 0,05
02-A2P2	1,41	0,03	p > 0,05
A2-P2	1,31	0,001	p > 0,05
A2-A2P2	1,07	0,005	p > 0,05
P2-A2P2	1,22	0,003	p > 0,05

0 - brez zdravila, A - acetilsalicilna kislina, P - clopidogrel, 1 - selektin-P, 2 - akt. fibrinogen, pokončen tekst v tabeli: skupina vseh 35 v klinično raziskavo vključenih bolnikov, poševen tekst v tabeli: podskupina 17 novoodkritih bolnikov z ET

0 - without therapy, A - acetylsalicylic acid, P - clopidogrel, 1 - P-selectin, 2 - act. fibrinogen, straight text: all 35 patients who entered clinical study, italic text: subgroup of 17 newly diagnosed patients

selektina-P zmanjšali: aritmetična sredina 2,68%, mediana 2,38% in modus 2,32%. To se je prevedlo tudi v statistično značilno zmanjšanje deleža selektina-P na trombocitni membrani, t-vrednost 1,99 ($p < 0,05$) (Razpr. 4). Ko so bolniki prejeli acetilsalicilno kislino in clopidogrel hkrati (A1P1), so bile vrednosti selektina-P za aritmetično sredino 2,62%, mediano 2,58% in modus 1,20% in tako podobne tistim, ko so bolniki prejeli samo clopidogrel (P1) (t-vrednost 0,19; $p > 0,05$). Če med seboj primerjamo deleže selektina-P v obdobjih, ko so

bolniki prejeli acetilsalicilno kislino (A1) in hkrati acetilsalicilno kislino in clopidogrel (A1P1), ugotovimo, da je delež selektina-P statistično značilno manjši v obdobju A1P1, t-vrednost 2,11 ($p < 0,05$).

Deleži aktiviranega fibrinogena na trombocitnih membranah so bili v obdobjih, ko so bolniki prejeli acetilsalicilno kislino (A2), clopidogrel (P2) in acetilsalicilno kislino in clopidogrel (A2P2) med seboj primerljivi (Razpr. 1). t-vrednosti v obdobjih A2-P2, A2-A2P2 in P2-A2P2 so bile 0,002, 0,018 in 0,056 (Razpr. 4) in za vsako parno razmerje je bil $p > 0,05$.

Pri podskupini 17 bolnikov z novoodkriti ET, ki sprva niso prejeli antiagregacijskega zdravljenja, so izhodiščni deleži selektina-P (01) 4,47% in aktiviranega fibrinogena (02) 41,5824% večji v primerjavi s podskupino 18, že zdravljenih bolnikov, ki so v izhodišču klinične raziskave že prejeli acetilsalicilno kislino 100 mg/dan (A1 3,7617% in A2 39,5333%) (Razpr. 2, 3). Razliki v parnih razmerjih 01-A1 in 02-A2 niso statistično značilne ($p > 0,05$). Delež izraženega selektina-P sta potem, ko je bil v zdravljenje vključen clopidogrel v obeh skupinah 17 oziroma 18 bolnikov primerljiva (P1(17) 2,7053% : P1(18) 2,6611% in A1P1(17) 2,7053 : A1P1(18) 2,5283%) in se statistično značilno pomembno ne razlikujeta ($p > 0,05$) (Razpr. 2, 3).

V skupini 17 novoodkritih bolnikov z ET beležimo statistično značilne razlike v znižanju deleža selektina-P na membrani trombocitov v izhodiščnem obdobju, ko bolniki niso prejeli antiagregacijskih zdravil (01), v primerjavi z obdobjem, ko so bolniki prejeli clopidogrel (P1) ali pa kombinacijo zdravil acetilsalicilna kislina in clopidogrel (A1P1). Za primerjani parni vzorec 01-P1 je t-vrednost 2,01 ($p < 0,05$) in za parni vzorec 01-A1P1 t-vrednost 1,98 ($p < 0,05$). Če v skupini 17 bolnikov primerjamo parne vzorce deležev selektina-P med pari acetilsalicilna kislina (A1) - clopidogrel (P1) je t-vrednost 1,46 ($p > 0,05$) in v paru acetilsalicilna kislina (A1) - acetilsalicilna kislina in clopidogrel (A1P1) t-vrednost 1,44 ($p > 0,05$). Med primerjanima paroma A1-P1 in A1-A1P1 v tej podskupini ni statistično pomembne razlike (Razpr. 4). V podskupini A1 sta dve meritvi selektina-P 17,5% in 23,5% močno izstopali v primerjavi z ostalimi deleži selektina-P.

V podskupini 17 novoodkritih bolnikov nismo odkrili nobene statistično značilne razlike v deležih izraženega aktiviranega fibrinogena na membranah trombocitov med obdobjema, ko so bili bolniki brez antiagregacijskih zdravil ali pa so prejeli acetilsalicilno kislino, clopidogrel oziroma hkrati acetilsalicilno kislino in clopidogrel (Razpr. 3 in 4). V vseh mogočih parnih kombinacijah je bila t-vrednost največ 0,03 in zato $p > 0,05$.

Stranskih učinkov zdravljenja, kot so ulkusna bolezen želodca in dvanajsternika, alergične reakcije, slabosti, diareje, spremembe razpoloženja in kožnih izpuščajev nismo beležili. Bolniki niso navajali nobenih dodatnih težav v obdobju zadnjih štiri-najst dni, ko so prejeli hkrati acetilsalicilno kislino in clopidogrel. V celotnem obdobju klinične raziskave nismo zabeležili nobene spontane krvavitve v kožo ali sluznice notranjih organov. Nihče od bolnikov ni utrpel trombemboličnega zapleta med zdravljenjem.

Razpravljanje

ET je klonska kronična mieloproliferativna bolezen. Incidenca bolezni v Sloveniji je 1,4 na 100.000 prebivalcev in narašča, odkar so v uporabi avtomatizirani analizatorji krvne slike (31, 8). Bolezen označuje razraščanje megakariocitov v kostnem mozgu in zvečano število trombocitov v periferni krvi (32). Ker zaenkrat ni ugotovljen noben za ET značilen klinični ali laboratorijski parameter, je diagnostika še vedno zasnovana na podlagi izključitve preostalih mieloproliferativnih in/ali mielodisplastičnih sindromov in predvsem reaktivne trombocitoze.

Pred tridesetimi leti je kot eno od diagnostičnih meril za bolezen veljalo število trombocitov, ki je moralo biti večje od $1000 \times 10^9/L$ (33, 34). Z leti se je zahtevana vrednost števila trombocitov zmanjševala in danes za diagnozo ET zadošča, da je ob izključitvi reaktivne trombocitoze število trombocitov večje od $400 \times 10^9/L$ (35). Vse to ima svoj pomen pri pristopu k zdravljenju bolezni. Za bolezen je značilna nagnjenost h krvavitvam, še pogosteje pa k trombemboličnim zapletom, ki so glavni vzrok obolevnosti in umrljivosti (36, 37).

Zdravljenje ET ni povsem enotno. Jasno pa je, da je potrebno zmanjšati število trombocitov v področje normalnih vrednosti pri tistih bolnikih, ki so utrpeli kakršen koli trombembolični zaplet (38). Število trombocitov lahko učinkovito zmanjšamo z interferonom alfa, anagrelidom, hidroksiureo in busulfanom (39–41). Stroka je enotna tudi v priporočilu glede zdravljenja bolnikov z ET, ki imajo klinične težave v smislu eritromelalgije. To so boleči in pekoči občutki akralnih delov telesa, navadno v konicah prstov rok in nog. Tem bolnikom pomaga zdravljenje z acetilsalicilno kislino 100 mg/dan (42).

O tem, kako zdraviti bolnike z ET, ki v poteku bolezni niso utrpeli trombemboličnega zapleta, še ni enotnosti. Zaenkrat je tudi nerazrešeno vprašanje, kako veliko mora biti število trombocitov, da se odločimo za začetek zdravljenja z zdravili, ki zmanjšujejo število trombocitov. Po veljavni strokovni doktrini v Sloveniji bolnike z ET, ki v poteku bolezni niso utrpeli trombemboličnega zapleta in ki imajo število trombocitov, manjše od $1000 \times 10^9/L$, zdravimo z acetilsalicilno kislino 100 mg/dan (8). Če je število trombocitov večje od $1000 \times 10^9/L$ ali pa je bolnik utrpel trombembolični zaplet, se odločimo zmanjšati število trombocitov z interferonom alfa, anagrelidom, hidroksiureo ali busulfanom, po upoštevanju bolnikove starosti in stranskih učinkov zdravljenja (43).

Namen antiagregacijskega zdravljenja pri bolnikih z ET je zmanjšati funkcijsko sposobnost trombocitov. Predvsem želimo zmanjšati delež aktiviranih trombocitov, ki je pri bolnikih z ET zvečan (44, 2, 3). Pri tem moramo vedeti, da je tako zdravljeno bolnik izpostavljen spontanim krvavitvam. Antiagregacijsko zdravilo izbire pri bolnikih z ET je acetilsalicilna kislina (45, 46). Ker kot antiagregacijsko zdravilo po trenutnih strokovnih priporočilih nima ustrezne zamenjave, je antiagregacijsko zdravljenje ET neizvedljivo pri bolnikih s sočasno ulkusno boleznijo prebavil, alergičnimi reakcijami in bolnikih z astmo, pri katerih nesteroidni antirevmatiki lahko sprožijo astmatični napad.

Poročila o zdravljenju bolnikov z ET z novejšimi antiagregacijskimi zdravili so zelo redka (47). Clopidogrel je antagonist receptorjev za ADP na membrani trombocitov. V zadnjih letih je clopidogrel postal pomembno zdravilo v kardiologiji, kjer se rutinsko uporablja pri bolnikih z vstavljenjo koronarno opornico in pri bolnikih s koronarno boleznijo, ki acetilsalicilne kisline ne prenašajo (48, 49). Klinična učinkovitost je verjetno v veliki meri posledica njegovega delovanja na selektin-P. Z izraženim selektinom-P se v trombu vključujejo levkociti, kar povzroči vnetni odziv v trombu (50). V zadnjih letih raziskujejo tudi pomen selektina-P pri vnetnem odgovoru v aterosklerotični lehi pri generalizirani aterosklerozi (51).

V klinično raziskavo smo vključili 35 bolnikov z ET. Ker so bolniki prejeli antiagregacijsko zdravilo clopidogrel s še neznanim kliničnim učinkom pri ET, smo vključili samo bolnike, ki niso doživeli trombemboličnega zapleta in ki so imeli število trombocitov manjše od $1000 \times 10^9/L$. Ti med bolniki z ET predstavljajo najmanj ogroženo podskupino bolnikov. Skupina bolnikov je tudi homogena, saj morda različna zdravila, ki zmanjšujejo število trombocitov, vplivajo na rezultate. V zaporednih štirinajstdnevih intervalih so bolniki brez vmesne prekinitve (izpiralnega časa za zdravilo) prejeli acetilsalicilno kislino, zatem clopidogrel in nato še hkrati acetilsalicilno kislino in clopidogrel. Za samo štirinajstdnevne intervale smo se odločili zaradi neznanega antiagregacijskega učinka clopidogrela pri

bolniških z ET. Izpiralni čas za zdravilo ni bil potreben, ker se celotna trombocitna populacija, na katero zdravilo učinkujeta, obnovi v največ desetih dnevih. Tudi z etičnega stališča je izpiralni čas za zdravilo neprimeren, ker veljavna strokovna priporočila v Sloveniji priporočajo antiagregacijsko zdravljenje (8, 32).

Ko so bili v raziskavo vključeni bolniki, ki so se že vodili v hematološki ambulanti in prejeli acetilsalicilno kislino 100 mg/dan, jim zdravila z namenom, da bi lahko odvzeli izhodne vrednosti deležev selektina-P in aktiviranega fibrinogena nismo ukinili. Znotraj skupine 35 bolnikov smo izoblikovali podskupino 17 novoodkritih bolnikov z ET, ki ob prihodu v našo ambulanto niso prejeli antiagregacijskega zdravila. Tem bolnikom smo določili izhodne vrednosti deležev selektina-P in aktiviranega fibrinogena v obdobju brez antiagregacijskega zdravljenja.

V celotni skupini 35 bolnikov smo ugotovili statistično značilno zmanjšanje deleža selektina-P na membrani trombocitov v obdobju, ko so bolniki jemali clopidogrel (P1; A1P1) v primerjavi z začetnim obdobjem, ko so jemali samo acetilsalicilno kislino (A1) (Razpr. 1, 4). V obeh parnih primerjavah acetilsalicilna kislina – clopidogrel (A1-P1) in acetilsalicilna kislina – acetilsalicilna kislina in clopidogrel hkrati (A1-A1P1) je bil $p < 0,05$. Zaključimo lahko, da clopidogrel pomembno in značilno zmanjša delež selektina-P na trombocitni membrani pri bolniških z ET. Acetilsalicilna kislina sama ali v kombinaciji s clopidogrelom na izraženost selektina-P nima vpliva. Podobne rezultate dobimo, če analiziramo samo podskupino 17 novoodkritih bolnikov z ET. Statistično značilno zmanjšanje deleža selektina-P na trombocitni membrani ($p < 0,05$) dobimo s parno primerjavo obdobja, ko bolniki niso prejeli antiagregacijskega zdravila (01) z obdobjema, ko so prejeli clopidogrel (P1), ali pa hkrati acetilsalicilno kislino in clopidogrel (A1P1) (Razpr. 2, 4). Nekoliko presenetljivo pa v skupini 17 novoodkritih bolnikov z ET ne dobimo statistično značilne razlike s primerjavo parnih vzorcev med obdobjem, ko so bolniki prejeli acetilsalicilno kislino (A1), in obdobjem, ko so prejeli clopidogrel (P1) oziroma hkrati acetilsalicilno kislino in clopidogrel (A1P1) (Razpr. 2, 4). t-vrednost za obdobje A1-P1 je bila 1,46 ($p > 0,05$) in za obdobje A1-A1P1 1,44 ($p > 0,05$). To lahko razložimo z dvema izstopajočima, zelo visokima vrednostima deležev selektina-P na trombocitni membrani pri tej podskupini bolnikov v obdobju, ko so prejeli samo acetilsalicilno kislino (A1). Pri enem od bolnikov je bil delež selektina-P 17,5% in pri drugem celo 23,5%. Upoštevajoč nizke vrednosti izračunanih aritmetične sredine, mediane in modusa v tem obdobju ter predvsem majhnost vzorca (samo 17 enot), sta ta dva visoka deleža selektina-P verjetno preveč vplivala na celoten vzorec.

V skupini 35 bolnikov z ET nismo v deležih aktiviranega fibrinogena na membranah trombocitov v nobenem obdobju jemanja antiagregacijskih zdravil s primerjavami parnih vzorcev ugotavljali statistično značilnih razlik med njimi (Razpr. 4). Delež aktiviranega fibrinogena so bili vseskozi medsebojno primerljivi. Enake rezultate smo dobili tudi, če smo analizirali samo podskupino 17 novoodkritih bolnikov z ET. Zaključimo lahko, da acetilsalicilna kislina, clopidogrel in tudi kombinacija obeh zdravil nimajo nobenega vpliva na delež izraženega aktiviranega fibrinogena. Slednje je skladno tudi s podatki iz literature (52).

Pri nobenem od bolnikov nismo beležili resnejših neželenih učinkov zdravljenja. Pravzaprav smo jih pričakovali predvsem takrat, ko so bolniki hkrati prejeli acetilsalicilno kislino in clopidogrel. Pričakovali bi lahko spontane krvavitve, predvsem krvavitve v želodec in dvanajstnik. Kombinacija obeh zdravil se je izkazala za varno. Opozoriti je potrebno, da so bili v raziskavo vključeni izbrani bolniki brez ulkusne bolezni prebavil v anamnezi. Pri nobenem od bolnikov ni prišlo v nobenem obdobju jemanja zdravil do trombemboličnega zapleta. Slednje

smo zaradi nepoznavanja kliničnega učinka clopidogrela pri ET pričakovali kvečjemu v obdobju, ko so bolniki prejemali clopidogrel.

Kakšno je klinično uporabno sporočilo opravljene klinične raziskave? Mnenja smo, da je morda clopidogrel z zmanjšanjem deleža selektina-P na membranah trombocitov možna zamenjava za acetilsalicilno kislino pri bolnikih, ki acetilsalicilne kisline ne prenašajo oziroma jo ne morejo jemati. To so bolniki z anamnezo in klinično sliko ulkusne bolezni želodca ali dvanajstnika, bolniki, ki navajajo alergične reakcije na acetilsalicilno kislino, in bolniki z ET in astmo hkrati, pri katerih jemanje acetilsalicilne kisline lahko sproži astmatski napad. Zavedati pa se moramo, da clopidogrel kot antiagregacijsko zdravilo prve izbire pri bolnikih z ET še vedno ne predstavlja enakovrednega nadomestila za acetilsalicilno kislino. Klinična raziskava, ki bi pri bolnikih z ET primerjala klinično učinkovitost acetilsalicilne kisline in clopidogrela, namreč še ni bila narejena. Tudi stališča farmakoekonomike je acetilsalicilna kislina nekajkrat cenejše antiagregacijsko zdravilo kot clopidogrel.

Za klinične raziskave v prihodnje pa je zanimivo še eno vprašanje. Ali je mogoče znotraj skupine bolnikov z ET podskupina, ki bi lahko imela dodatno korist od hkratnega jemanja acetilsalicilne kisline in clopidogrela? Trije bolniki so imeli delež selektina-P visoko nad 10% in sicer 14%, 18% in celo 24%. Morda bi hkrati jemanje acetilsalicilne kisline in clopidogrela lahko koristilo podskupini bolnikov z ET, ki bi imeli na primer v treh časovno ločenih zaporednih določitvah selektina-P, njegov delež večji od 10%. Morda bi bilo smiselneje dodati clopidogrel, ne upoštevajoč izhodni delež selektina-P, tistim bolnikom z ET, ki imajo sočasno prisotnih tudi več dejavnikov tveganja za nastanek bolezni srca in ožilja, kot so povečana serumska vrednost lipidov, povišan krvni sladkor, debelost, kajenje, pozitivna družinska anamneza in povišan krvni tlak.

Literatura

- Kutti J, Wadenvik H. Diagnostic and differential criteria of essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *Leuk Lymph* 1996; 22: Suppl. 1: 41-6.
- Frojmovic MM. Flow cytometric analysis of platelet activation and fibrinogen binding. *Platelets* 1996; 7: 9-21.
- Griesshammer M, Beneke H, Nussbaumer B. Increased platelet surface expression of P-selectin and thrombospondin as markers of platelet activation in essential thrombocythemia. *Thromb Res* 1999; 96: 191-6.
- Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G et al. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 1990; 8: 555-62.
- Colombi M, Radaelli F, Zocchi L et al. Thrombotic and hemorrhagic complications in essential thrombocythemia. *Cancer* 1991; 67: 2926-30.
- Van Genderen PJJ, Michelijs JJ. Erythromelalgia: a pathognomonic microvascular thrombotic complication in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Thromb Haemost* 1997; 23: 357-64.
- Tefferi A. Risk based management in essential thrombocythemia. *Hematology: ASH education program book* 1999: 172-7.
- Podbregar M, Černelc P. Zapleti in zdravljenje bolnikov z ET. *Zdrav Vestn* 1999; 68: 353-6.
- Savi P, Herbert JM. Pharmacology of ticlopidin and clopidogrel. *Haematologica* 2000; 85: 66-72.
- Defreyn G, Gachet C, Savi P et al. Ticlopidin and clopidogrel selectively neutralize ADP inhibition of PGE1-activated platelet adenylate cyclase in rats and rabbits. *Thromb Haemost* 1991; 65: 186-90.
- Storey RF, Judge HM, Wilcox RG. Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y₁₂ receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin. *Thromb Haemost* 2002; 88: 488-94.
- Kanapuli SP. Functional characterization of platelet ADP receptors. *Platelets* 1998; 9: 343-51.
- Reimers H. Adenine nucleotides in blood platelets. In: Longenecker G ed. *The platelets: physiology and pharmacology*. Orlando: Academic Press, 1985: 85-98.
- Weiss HJ. Inherited abnormalities of platelet granules and signal transduction. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW eds. *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, 1994: 673-84.
- Macfarlane DE. Agonists and receptors: adenosine diphosphate. In: Holmsen H ed. *Platelet responses and metabolism*. Boca Raton CRC Press, 1987: 19-36.
- Lanza F, Beretz A, Stierle A et al. Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. *Am J Physiol* 1988; 255: H1276-H1288.
- Clementson KJ, Clementson JM, Proudfoot AE et al. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4 and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood* 2000; 96: 4046-54.
- Savi P, Artcanuthury V, Borna J et al. Effect of clopidogrel treatment on ADP-induced phosphorylation in rats platelets. *Br J Haematol* 1997; 97: 185-91.
- Geiger J, Brich J, Honig-Liedl P et al. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor mediated signalling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2007-11.
- Mills DC, Puri R, Hu CJ et al. Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 430-6.
- Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost* 2001; 86: 214-21.
- Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding and P-selectin expression. *Semin Thromb Haemost* 1995; 21: 146-51.
- The clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trial 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.
- Harding SA, Boon NA, Flapan AD. Antiplatelet treatment in unstable angina: aspirin, clopidogrel, glycoprotein IIb/IIIa antagonist or all three? *Heart* 2002; 88: 11-4.
- Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P et al. 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 (CLASSICS). *Circulation* 2000; 102: 624-9.
- McGregor JL. Adhesion molecules and platelets. *Educational sessions of the second EHA 1996*; 134-8.
- Azar RR, Waters DD. The inflammatory etiology of unstable angina pectoris. *Am Heart J* 1996; 132: 1106-16.
- Klinkhardt U, Bauersachs R, Adams J et al. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression a formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin Pharm Ther* 2003; 73: 232-41.
- Jaremo P, Lindahl TL, Fransson SG et al. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med* 2002; 252: 233-8.
- Žontar D, Černelc P. Uporaba pretočne citometrije v klinični hematologiji. *Zdrav Vestn* 1993; 62: 393-5.
- Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ et al. Population based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County study; 1976-1995. *Am J Hematol* 1996; 61: 10-5.
- Modic M. Kronične mieloproliferativne bolezni. In: Kocijančič A, Mrevlje F eds. *Interna medicina*. Ljubljana: EWO, 1998: 1088-94.
- Laszlo J. Myeloproliferative disorders (MPD): myelofibrosis, myeloid metaplasia, extramedullary hematopoiesis, undifferentiated MPD and hemorrhagic thrombocythemia. *Semin Hematol* 1975; 12: 409-32.
- Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemia. *Semin Hematol* 1975; 12: 339-51.
- Michelis JJ, Juvonen E. Proposal for revised diagnostic criteria of essential thrombocythemia and polycythemia vera by the Thrombocythemia Vera Study Group. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23: 339-47.
- Schafer AI. Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders. *Blood* 1984; 64: 1-10.
- Schafer AI. Essential thrombocythemia. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ eds. *Williams Hematology*. New York: McGraw Hill 2001: 1541-49.
- Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M et al. Hydroxyurea in the treatment of patients with essential thrombocythemia at high risk thrombosis: a prospective randomised trial. *N Engl J Med* 1995; 332: 1132-6.
- Lofvenberg E, Wahlin A. Management of polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis with hydroxyurea. *Eur J Haematol* 1988; 41: 375-81.
- Solberg LA, Tefferi A, Oles A et al. The effects of anagrelide on human megakaryopoiesis. *Br J Haematol* 1997; 99: 174-9.
- Elliot MA, Tefferi A. Interferon alpha therapy in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23: 463-71.
- Van Genderen PJJ, Michelis JJ, Van Stirk R et al. Platelet consumption in thrombocythemia complicated by erythromelalgia: reversal by aspirin. *Thromb Hemost* 1995; 73: 210-5.
- Michelis JJ. Normal life expectancy and thrombosis free survival in aspirin treated essential thrombocythemia. *Clin Appl Thromb/Hemost* 1999; 23: 335-8.
- Villmow T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff AC. Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndromes. *Thromb Res* 2002; 108: 139-45.
- Gruppo Italiano Studio Polycythemia Vera: Low dose aspirin in polycythemia vera: a pilot study. *Br J Haematol* 1997; 97: 453-7.
- Willoughby S, Pearson TC. The use of aspirin in polycythemia vera and primary thrombocythemia. *Blood Rev* 1998; 12: 12-22.
- Klinzing P, Markert UR, Liesaus K et al. Case report: successful pregnancy and delivery after myocardial infarction and essential thrombocythemia treated with clopidogrel. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2001; 28: 215-6.

48. Caprie Steering Committee. A randomized, blinded trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329-39.
 49. Gurbel PA, Cummings CC, Bell CR et al. Onset and extent of platelet inhibition by clopidogrel loading in patients undergoing elective coronary stenting: The Plavix N reduction of new thrombus occurrence (PRONTO) trial. *Am Heart J* 2003; 145: 239-47.
 50. McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 746-56.
 51. Burger PC, Wagner DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* 2003; 101: 2661-7.
 52. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the functions of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999; 79: 181-213.
-