

Zalecenia Sekcji Laboratoryjnej Diagnostyki Hemostazy Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej – badanie reaktywności płytek krwi. 2023

The Coagulology Section of the Polish Society of Laboratory Diagnostics recommendations on the platelet reactivity test. 2023

Jacek Golański¹ (ORCID: 0000-0003-4392-8274), Anna Raszeja-Specht²

¹Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Katedra Nauk Biomedycznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska

²Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska, emerytowany pracownik

Received: 16.11.2023

Accepted: 18.11.2023

Published: 00.00.2023

DOI: ????????

Corresponding author:

dr hab. Jacek Golański, prof. UMED, Zakład Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Katedra Nauk Biomedycznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, 92-215 Łódź, ul. Mazowiecka 6/8, tel.: +48 42 272 57 20, e-mail: jacek.golanski@umed.lodz.pl

Cite the article as:

Golański J, Raszeja-Specht A. Platelet reactivity test – review and update 2023. The Coagulology Section of the Polish Society of Laboratory Diagnostics recommendations on the platelet reactivity test. 2023. *Diagn Lab.* 2023; 59(4): ??–??



Open access

The content of the journal is available in Open Access formula which means free access to scientific data for researchers and readers.



Copyright

This material is available under the Creative Commons – Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0). The full terms of this license are available on: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Licence

Some right reserved: Polish Society of Laboratory Diagnostics. Published by Index Copernicus Sp. z o.o.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

Streszczenie

Badanie reaktywności płytek krwi wykorzystuje się do bardzo różnych celów klinicznych; po pierwsze, do badania dysfunkcji płytek krwi w ostrych krwawieniach i diagnostyki zaburzeń płytek krwi u pacjentów z długotrwałą tendencją do krwawień, a po drugie, do badania skuteczności terapii przeciwplateletowej u pacjentów ze zwiększonym ryzykiem zakrzepowo-zatorowym. Nowym kierunkiem badań jest fenotypowanie płytek krwi. Aby zapewnić przegląd współczesnych badań czynności płytek krwi, w tym przeglądzie podsumowano najczęściej stosowane testy na terenie Polski, w tym ich zalety i wady oraz użyteczność kliniczną. W przeglądzie omówiono także zmienne przedanalizacyjne, które należy wziąć pod uwagę podczas badania funkcji płytek krwi. Wreszcie, podsumowano przyszłe kierunki badań funkcji płytek krwi do celów klinicznych lub naukowo-badawczych.

Słowa kluczowe: badanie reaktywności płytek krwi, fenotypowanie płytek krwi, metody POCT badania funkcji płytek, monitorowanie terapii przeciwplateletowej

Abstract

Platelet reactivity testing is used for a wide variety of clinical purposes; firstly, to study platelet dysfunction in acute bleeding and diagnosis of platelet disorders in patients with long-term



bleeding tendency, and secondly, to study the effectiveness of antiplatelet therapy in patients with increased risk of thromboembolism. A new direction of research is platelet phenotyping. To provide an overview of contemporary platelet function testing, this review summarizes the most commonly used tests in Poland, including their advantages, disadvantages, and clinical utility. The review also discusses preanalytical variables that should be considered when examining platelet function. Finally, we concluded future directions for the study of platelet function for clinical or research purposes.

Keywords: monitoring of antiplatelet therapy, platelet phenotyping, platelet reactivity testing, point-of-care platelet function analyzers

PREPRINT

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW

1. WSTĘP	5
2. METODY	5
2.1. METODY AGREGOMETRYCZNE	5
2.1.1. Agregometria optyczna, oparta na pomiarze światła widzialnego (LTA)	6
2.1.1.1. Modyfikacje LTA	6
2.1.2. Agregacja we krwi pełnej (WBA; ang. <i>whole blood aggregometry</i>)	6
2.1.3. VerifyNow	7
2.1.4. Cytometria przepływowa	7
2.1.5. PFA-100/200	8
2.1.6. Badania lepkości	8
2.2. METODY MIKROPRZEPŁYWOWE	8
2.3. METODY BADANIA AKTYWACJI PŁYTEK KRWI	9
3. METODYCZNE PROBLEMY BADANIA FUNKCJI PŁYTEK KRWI	9
3.1. PROBLEMY PRZEDANALITYCZNE	9
3.1.1. Czynniki związane z pacjentem	9
3.1.2. Pobieranie próbek krwi	9
3.1.3. Wybór probówek i antykoagulantu	9
3.1.4. Warunki transportu i przechowywania	10
4. PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIA	10
4.1. Diagnostyka wrodzonych zaburzeń funkcji płytek krwi	10
4.2. Krwawienia	10
4.2.1. Krwawienia pooperacyjne	11
4.3. Monitorowanie leczenia przeciwplatekowego	11
4.4. Fenotypowanie płytek	12
4.4.1. Praktyczne zastosowanie fenotypowania płytek krwi	13
5. PODSUMOWANIE	14
6. PIŚMIENNICTWO	15

WYKAZ SKRÓTÓW

- CRP** – peptyd związany z kolagenem (ang. *collagen related peptide*)
- FC** – cytometria przepływowa (ang. *flow cytometry*)
- HTPR** – wysoka reaktywność płytek pomimo leczenia (ang. *High On-Treatment Platelet Reactivity*)
- IPFD** – wrodzone zaburzenia czynności płytek krwi (ang. *inherited platelet function disorders*)
- ISTH** – Międzynarodowe Towarzystwo ds. Zakrzepicy i Hemostazy (ang. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*)
- ISTH-BAT** – skala oceny krwawień ISTH (ang. *Bleeding Assessment Tool*)
- LTA** – agregometria optyczna oparta na pomiarze światła widzialnego (ang. *light transmission aggregometry*)
- MEA** – wieloelektrodowa agregometria impedancyjna (ang. *multiple electrode aggregometry*)
- PCI** – przezskórna angioplastyka wieńcowa (ang. *percutaneous coronary intervention*)
- PPP** – osocze ubogopłytkowe (ang. *platelet-poor plasma*)
- PRP** – osocze bogatopłytkowe (ang. *platelet-rich plasma*)
- ROTEM** – rotacyjna tromboelastometria
- TEG** – tromboelastografia
- TEG-PM** – zmodyfikowana tromboelastografia do oceny funkcji płytek krwi (ang. *thromboelastography with platelet mapping*)
- TEM** – tromboelastometria
- TRAP** – peptyd aktywujący receptor trombiny (ang. *thrombin receptor activating peptide*)
- T-TAS®** – analiza tworzenia się czopu płytkowego lub zakrzepu (ang. *Total Thrombus-formation Analysis System*)
- TXA2** – tromboksan A2
- VET** – testy wiskoelastometryczne

1. WSTĘP

Płytki krwi odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowej hemostazy, są również uznawane za istotny składnik rozwoju zakrzepicy tętniczej. Obecnie badanie czynności płytek krwi wykorzystuje się do bardzo różnych celów klinicznych – po pierwsze, do badania dysfunkcji płytek krwi w ostrych krwawieniach i diagnostyki zaburzeń płytek krwi u pacjentów z długotrwałą tendencją do krwawień, po drugie, do badania skuteczności terapii przeciwplatekowej u pacjentów ze zwiększonym ryzykiem zakrzepowo-zatorowym, natomiast nowym kierunkiem badań jest fenotypowanie płytek krwi. Najczęściej badanie czynności płytek krwi jest wykonywane w różnych przypadkach klinicznych, np. u pacjenta z ostrym krwawieniem czy w diagnostyce dziedzicznych zaburzeń czynności płytek [1-3].

Jeszcze 10 lat temu większość autorów sugerowała, że postęp technologiczny spowodował rozwój nowej dziedziny diagnostyki laboratoryjnej. Zakładano, że będzie możliwe wykrywanie dysfunkcji płytek krwi, a także monitorowanie leczenia przeciwplatekowego poza wyspecjalizowanymi pracownikami. W piśmiennictwie światowym [1-3] oraz na łamach czasopisma naukowego „Diagnostyka Laboratoryjna” ukazały się publikacje zawierające opisy dynamicznego rozwoju metod badania funkcji płytek z ich dokładną prezentacją [4-7]. Informację dotyczącą badań hemostazy, także płytek krwi, można znaleźć na portalu edukacyjnym dla lekarzy Grupy ds. Hemostazy Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów (www.hemostaza.edu.pl).

Aktualny opis metod jest dostosowany do polskich warunków, stąd niektóre, rzadko wykorzystywane metody zostały pominięte. Ponadto przedstawiony będzie praktyczny zakres stosowania opisanych metod i perspektywy ich rozwoju.

Szczegółowy opis nieomówionych w pracy metod można znaleźć na stronie internetowej (niektóre materiały są odpłatne): <https://www.uptodate.com/contents/platelet-function-testing>, lub w anglojęzycznych publikacjach przeglądowych [1-3].

2. METODY

2.1. METODY AGREGOMETRYCZNE

Metoda opracowana przez Borna w 1980 w roku jest najpopularniejsza i uznawana za „złoty standard” w badaniu reaktywności płytek. Na polski rynek trafiły agregometry produkowane przez wiele firm i w różnych modyfikacjach [6]. Najczęściej możemy spotkać agregometry Chrono-Log.

Mimo pojawiania się nowych metod badania reaktywności płytek krwi, agregometria zachowuje mocną pozycję i w dziedzinie rutynowej diagnostyki laboratoryjnej nie jest zagrożona przez bardziej zaawansowane technologicznie metody biologii molekularnej. Od czasu wprowadzenia tej metody przez Borna pojawiły się różne modyfikacje i wersje agregacji.

Ogromną zaletą stosowania różnorodnej liczby agonistów jest diagnostyka wrodzonych i nabytych zaburzeń funkcji płytek krwi o zróżnicowanej etiologii w jednym badaniu. Interpretacja wyników LTA powinna uwzględniać profil agregacji w odpowiedzi na pojedynczy aktywator, a ponadto całościowe spojrzenie na zastosowany panel agonistów, gdyż wiele szlaków sygnałowych sprzężonych z receptorami na powierzchni PLT jest ze sobą wzajemnie powiązanych. Nieprawidłowa agregacja płytek krwi w odpowiedzi na określonego agonistę może sugerować specyficzne zaburzenia [8, 9].

2.1.1. Agregometria optyczna, oparta na pomiarze światła widzialnego (LTA)

Stosując LTA (ang. *light transmission aggregometry*), agregację płytek krwi ocenia się za pomocą pomiaru zmiany w przepuszczalności światła po dodaniu do osocza bogatopłytkowego (PRP; ang. *platelet-rich plasma*) agonistów w rekomendowanym stężeniu. Przed analizą należy określić maksymalną przepuszczalność światła przez próbkę (100%), co oznacza się w osoczu ubogopłytkowym (PPP; ang. *platelet-poor plasma*).

Ponieważ LTA jest najpowszechniej stosowaną metodą badania agregacji płytek krwi („złoty standard”), podjęto kilka prób standaryzacji metodologii pomiędzy laboratoriami [10, 11]. Jednak ze względu na brak międzynarodowych standardowych odczynników, ten

problem pozostaje nierozwiązany. Kolejną wadą LTA jest wykorzystanie PRP, ponieważ brak innych składników krwi i niskie siły ścinające stwarzają warunki odmienne od fizjologicznych. Ponadto analiza LTA wymaga stosunkowo dużej objętości krwi, zwłaszcza jeśli stosuje się kilku agonistów. Wreszcie, badanie to jest czasochłonne i wymaga wykwalifikowanego personelu zarówno do przeprowadzania analiz, jak i interpretacji wyników. Udowodniono także, że uzyskiwane wyniki zależą od stosowanego agregometru. Problemy ze standaryzacją LTA powodują, że metoda ta wymaga zastosowania wytycznych [8] oraz współpracy specjalistycznych ośrodków i praktycznie wyklucza zasadność stosowania tej metody w rutynowych medycznych laboratoriach diagnostycznych (MLD) [10, 11].

Zakresy optymalnych stężeń agonistów są opisane w publikacji Malarczycy i wsp. [9].

Podstawowy panel obejmuje ADP (2-2,5 μ M), kwas arachidonowy (1 mM), rystocetynę (1,2 lub 0,5 mg/ml) i epinefrynę (5 μ M) [9].

2.1.1.1. Modyfikacje LTA

W publikacjach przeglądowych opisane są dwie dobrze rokujące modyfikacje klasycznej agregacji (LTA) [2, 3, 6].

Wymienione powyżej przeszkody, dotyczące klasycznej wersji LTA, przyczyniły się do opracowania metod łatwiejszych technicznie, charakteryzujących się wysoką wydajnością oraz małym zapotrzebowaniem na PRP.

Pierwsza z nich opisywana jest jako agregacja na płytkach titracyjnych albo *96-well plate-based aggregometry*. Metoda ta (w różnych wersjach) wykorzystuje także PRP i ten sam panel agonistów, jaki jest stosowany w klasycznej wersji. Różnica polega na zastosowaniu płytki 96-dołkowej i dostosowanego do niej czytnika [12].

Jedna z wersji tej modyfikacji zakłada stosowanie wcześniej połączonych płytek za pomocą agonistów, co bardzo przyspiesza pomiar po dodaniu PRP. Płytkę miesza się na wytrząsarce (37°C, mieszanie 1200 rpm, 5 minut), co prowadzi do agregacji

płytek krwi i późniejszej zmiany absorpcji światła odczytywanej w czytniku do mikropłytek dysponującym filtrem 595 nm.

Wyniki są podawane jako procent agregacji (podobnie jak w tradycyjnym LTA), ale zamiast pomiaru transmitancji światła mierzy się absorpcję światła [12]. Takie podejście nie tylko utrzymuje elastyczność LTA, lecz także umożliwia szybką ocenę różnych ścieżek aktywacji u kilku pacjentów naraz. Metoda wymaga jedynie standardowych czytników do testów ELISA (test immunoenzymatyczny), ale dodatkowo dużego doświadczenia i wiedzy niezbędnej do interpretacji wyników [13].

Ta wersja agregacji opisywana jest jako „96-well plate-based aggregometry” (Optimul) [3]. Metodologiczne aspekty tej modyfikacji LTA zostały opisane w pracy Boncler i wsp. (publikacja w przygotowaniu).

Badanie agregacji płytek krwi metodą LTA można także wykonać w automatach koagulologicznych (np. Sysmex i inne) [14, 15]. W przypadku tej metody nadal potrzebne jest przygotowanie PRP, mimo to pozwala ona na automatycznie pipetowanie zarówno PRP, jak i odczynników, co wiąże się z mniejszymi wymaganiami manualnej obsługi niż w przypadku tradycyjnych agregometrów. Została ona przetestowana na osobach zdrowych i posiadających dysfunkcje aktywności płytek krwi. Wykazano zadawalającą zgodność z klasyczną wersją LTA [12, 13]. Modyfikacja ta nie jest jeszcze powszechnie stosowana, obecnie prowadzona jest weryfikacja przydatności klinicznej [3].

Badanie to można oczywiście wykonać w analizatorach innych niż Sysmex, np. TXRA (Behnk Elektronik, Norderstedt, Germany), PAP-8 (möLab, Langenfeld, Germany) lub zbudowanych do tego celu analizatorach [13, 16].

2.1.2. Agregacja we krwi pełnej (WBA; ang. *whole blood aggregometry*)

We krwi pełnej zamiast transmisji światła jest mierzona wartość impedancji elektrycznej. Po dodaniu agonisty zanurzona we krwi elektroda (zbudowana z dwóch włókien platynowych) pokrywa się agregatami płytkowymi i płytkowo-leukocytarnymi [6].

Pierwszym narzędziem umożliwiającym ocenę agregacji płytek krwi w pełnej krwi był Chrono-Log, wprowadzony po raz pierwszy w 1980 r., wykorzystujący agregometrię impedancyjną [6, 17]. Obecnie na polskim rynku dominuje półautomatyczny analizator Multiplate® – wieloelektrodowa agregometria impedancyjna (MEA; ang. *multiple electrode aggregometry*). Aparat ten jest dobrze opisany w piśmiennictwie [18-20].

Główną zaletą agregometrii impedancyjnej jest możliwość badania płytek krwi w środowisku zbliżonym do naturalnego. Ponadto metoda wymaga mniejszej objętości próbki niż LTA, jest mniej czasochłonna i łatwiejsza do wykonania niż LTA ze względu na brak konieczności przygotowania próbki osocza (PRP, PPP).

Na wynik testu nie ma wpływu lipidemia ani hiperbilirubinemia czy hemoliza. Z drugiej strony, w porównaniu do LTA, ma ograniczony zakres analizy [3].

Niestety, jak każdy analizator mierzący reaktywność płytek krwi, Multiplate® posiada swoje wady. Pomiar zależy nie tylko od liczby płytek krwi, lecz także od liczby leukocytów [21, 22]. Należy wspomnieć również o wysokich kosztach, charakterystycznych dla metod opierających się na złożonych technologicznie kuwetach pomiarowych [3].

2.1.3. VerifyNow

VerifyNow™, analizator skonstruowany przez firmę *Accumetrics*, aktualnie oferowany przez *Accriva Diagnostics*, jest od wielu lat dostępny na polskim rynku [23, 24].

VerifyNow to urządzenie typu *Point-of-Care*, służące do monitorowania reaktywności płytek krwi u pacjentów przyjmujących leki przeciwplatekcyjne. Zasada pomiaru w tym systemie jest zbliżona do LTA, ale z licznymi modyfikacjami. Próbkę krwi pobranej na cytrynian wprowadza się do kaset pomiarowych, przypisanych konkretnemu leкови przeciwplatekowemu (VerifyNow Aspirin Test, VerifyNow PRUtest). W kasetach pomiarowych płytki krwi wchodzi w interakcje z odpowiednim agonistą i mikrokulkami opłaszczonymi fibrynogenem. VerifyNow™ jest często wykorzystywany przez kardiologów [24, 25]. Nieskomplikowana obsługa pozwala na wykonanie badania przy łóżku chorego, co zachęca klinicystów do jego

stosowania. Mimo to wykazano niezadawalającą wrażliwość kasyety pomiarowej VerifyNow Aspirin Test na działanie ASA, w porównaniu z innymi metodami, np. LTA [3]. W praktyce wykorzystywane są głównie kasyety VerifyNow PRUtest do określania skuteczności działań inhibitorów receptora dla ADP (klopidogrel, tikagrelor) [25].

Biorąc pod uwagę fakt, że nie istnieją dobrze udokumentowane wskazania do monitorowania leczenia przeciwplatekowego za pomocą metod laboratoryjnych, to możemy wspomnianą metodę uznać za mało przydatną w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej.

2.1.4. Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa (FC; ang. *flow cytometry*) jest metodą wszechstronną i łatwą do modyfikowania. Panuje obecnie uzasadnione przekonanie, że metody cytometrii przepływowej można z mniejszym lub większym powodzeniem zaadoptować i zastosować wszędzie tam, gdzie pomiary oparte są na zmianach fluorescencji znaczników lub przeciwciał wyznakowanych fluoroforami przyłączającymi się do płytek krwi.

Fluorescencja jest mierzona dla pojedynczej płytki krwi, a wynik jest wyrażony albo w średniej intensywności fluorescencji, albo w procentach. Metoda pozwala na zaprojektowanie paneli z kilkoma fluoroforami, ułatwiający jednocześnie pomiary wielu markerów aktywacji płytek krwi. Powierzchniowe markery można mierzyć na spoczynkowych płytkach krwi (np. GPIb w przypadku zespołu Bernarda-Souliera) lub po aktywacji za pomocą różnych agonistów [4, 26, 27].

Analiza funkcji płytek krwi z wykorzystaniem FC jest wrażliwa na zmiany ekspresji powierzchniowej i wewnątrzkomórkowej białek płytkowych (głównie receptorów) i pozwala na wykrycie wielu markerów w jednej próbce. Badanie można przeprowadzić w bardzo małej objętości krwi, już od 1 mL. Ponadto protokoły badawcze mogą być projektowane indywidualnie, pozwalając na dużą swobodę zarówno w badaniach, jak i zastosowaniach klinicznych. Główną zaletą tej metody jest standaryzacja i dostępne w piśmiennictwie procedury badawcze [28-31].

Wadą jest wysoki koszt aparaturowy (cytometr przepływowy) i pracochłonna procedura, a analiza wymaga jeszcze bardziej wykwalifikowanego personelu niż ma to miejsce w przypadku LTA [3].

Metoda bardzo często jest wykorzystywana przez polskich badaczy, głównie w celach naukowych [26, 32-36]. Wykorzystanie cytometrii przepływowej do badania aktywności i reaktywności płytek możliwe jest tylko w wyspecjalizowanych pracowniach.

2.1.5. PFA-100/200

Analizator przepływowy PFA-100/200 (pierwotnie: Dade-Behring, aktualnie: Siemens) jest urządzeniem skonstruowanym do oceny funkcji hemostazy pierwotnej zależnej od płytek [37]. Analizator jest dość powszechnie wykorzystywany w Polsce. PFA-100 został pierwotnie zwalidowany przy użyciu krwi pacjentów z chorobą von Willebranda (VWD), ale nie jest stosowany do diagnozowania VWD, ponieważ dostępne są inne, lepsze testy, które pozwalają na określenie podtypu VWD [9, 17, 38-40].

W analizatorze tym, który pozwala badać reaktywność płytek krwi w warunkach zbliżonych do naturalnych, początkowo zastosowano dwa rodzaje kaset pomiarowych z układem przepływowym symulującym uszkodzone naczynie krwionośne. Kasety zawierają kapilarny układ przepływowy, a różnią się rodzajem membrany aktywującej: w jednej wersji zawiera ona kolagen i epinefrynę, w drugiej kolagen i ADP. Krwinki płytkowe w pełnej krwi (pobranej na cytrynian), przepływając przez naczynie, aktywują się na powierzchni pokrytej stosownym agonistą i powodują zamknięcie otworu w membranie, co odnotowane jest przez analizator jako czas okluzji. Poza reaktywnością płytek na czas okluzji mają wpływ następujące parametry: hematokryt, liczba płytek krwi oraz stężenie czynnika von Willebranda. Najnowsza wersja analizatora nosi nazwę INNOVANCE PFA-200 System i umożliwia zastosowanie trzech typów kaset pomiarowych Dade® PFA Collagen/EPI Test Cartridge, Dade PFA Collagen/ADP Test Cartridge oraz INNOVANCE® PFA P2Y¹². System jest stale modyfikowany [39], wprowadzono także nową wersję – PFA-200 [37, 41]. Mimo tych działań i powszechnego stosowania, istnieją liczne wątpliwości związane z przydatnością tego systemu w diagnostyce funkcji płytek krwi [3, 42, 43].

2.1.6. Badania lepkości

Do grupy tej zalicza się testy wiskoelastometryczne (VET), tromboelastografię (TEG) oraz tromboelastometrię (TEM), globalne metody badania krzepnięcia, które oceniają fizyczne właściwości tworzenia się skrzepu w próbce krwi pełnej *in vitro* w czasie rzeczywistym [44].

Standardowe protokoły ROTEM (rotacyjna tromboelastometria) i TEG (tromboelastografia) nie umożliwiają testowania funkcji płytek krwi. Jednakże testy agregacji płytek krwi są dostępne zarówno dla ROTEM, jak i TEG. Agregometr jest dostępny jako urządzenie dodatkowe do ROTEM, które umożliwia pomiar agregacji płytek krwi w pełnej krwi metodą impedancyjną. Dodając kwas arachidonowy lub ADP jako agonistów, moduł płytek krwi może (teoretycznie) ocenić działanie leków przeciwplateletowych. „Mapowanie płytek krwi” metodą TEG zapewnia także możliwość pomiaru efektów terapii przeciwplateletowej. Skuteczność terapii przeciwplateletowej ocenia się poprzez dodanie reptilazy, czynnika XIIIa oraz kwasu arachidonowego lub ADP do pełnej krwi, w którym punktem odniesienia jest próbka krwi aktywowana kaolinem (zamiast agonistów płytek krwi). Jednak zastosowanie kliniczne tych metod wymaga jeszcze wielu badań [3].

Metody ROTEM (Werfen) i TEG (Haemonetics) zostały omówione, ponieważ badania lepkości są powszechnie wykorzystywane w ocenie krwawień pooperacyjnych (lub po urazach) i trwają intensywne prace nad wzbogaceniem klasycznych metod o wersję umożliwiającą ocenę funkcji płytek krwi. Szczególnie interesujący jest rozwój metody TEG-PM (ang. *thromboelastography with platelet mapping*) [44, 45]. Pomimo braku istotnych dowodów dotyczących stosowania zmodyfikowanej tromboelastografii do oceny funkcji płytek krwi, trwają intensywne badania nad potwierdzeniem wartości TEG-PM w praktyce klinicznej [46].

Według wiedzy autorów wersja TEG-PM nie jest wykorzystywana w Polsce.

2.2. METODY MIKROPRZEPLYWOWE

Opisywanych jest wiele metod badania funkcji płytek na podstawie analizy mikroprzepływu [2, 47], ale aktualnie najbliższej diagnostyki laboratoryjnej jest System T-TAS® (ang. *total thrombus-formation analysis system*). Metoda pomiaru i analizator opracowane są przez ja-

pońską firmę Fujimori Kogyo i przeznaczone do analizy tworzenia się czopu płytkowego lub zakrzepu w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. System przypomina nieco PFA, ale budowa kaset pomiarowych jest całkowicie inna. Pełna krew, pobrana na hirudynie, przepływa przez system kapilarny symulujący naczynia krwionośne, które opłaszczane są odpowiednio kolagenem (test PL) lub kolagenem i tromboplastyną tkankową (test AR lub test HD) [48, 49].

W Polsce metoda cieszy się dużym zainteresowaniem [48, 50-52], ale wdrożenie jej do użytku klinicznego wymaga jeszcze wielu badań.

2.3. METODY BADANIA AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

Mimo że praca dotyczy metod badania reaktywności płytek krwi, to warto wspomnieć także o ich aktywacji. Metodą z wyboru jest w tym przypadku cytometria przepływowa, która umożliwia badanie zmian ekspresji receptorów, w tym selektyny P, receptora fibrynogeny GPIIb/IIIa, receptora czynnika von Willebranda GPIb/IX/V czy kolagenu: GPIa/IIa, GPVI [31, 53-55].

Aktywację płytek krwi można oceniać również za pomocą metod immunoenzymatycznych, oznaczając produkty uwalniane z aktywowanych płytek krwi. Próbkę krwi zwykle pobiera się do probówek zawierających inhibitory aktywacji płytek krwi i oznacza się białka uwalniane z płytek krwi w czasie aktywacji (jest ich około 300), głównie selektynę P (CD62P), ligand CD40 (CD40L) oraz czynnik płytkowy 4 (PF4) i rozpuszczalną w osoczu selektynę P [24, 56]. Do monitorowania skuteczności działania kwasu acetylosalicylowego wykorzystuje się oznaczanie metabolitów tromboksanu w osoczu, surowicy oraz w moczu [36, 57].

Z doświadczeń własnych autorów wynika, że reaktywność płytek krwi jest przeciwstawna do aktywacji. Płytki krwi aktywowane w łożysku naczyniowym mają na ogół mniejszą reaktywność [58, 59].

3. METODYCZNE PROBLEMY BADANIA FUNKCJI PŁYTEK KRWI

Ocena funkcji płytek krwi jest zbyt złożona, by można ją prowadzić w rutynowych laboratoriach medycznej diagnostyki laboratoryjnej. Metody są czasochłonne,

słabo wystandaryzowane i wymagają dużego doświadczenia [5, 6, 53, 60]. Ponadto nie jest dostępna kontrola zewnętrznlaboratoryjna, a międzynarodowe badania porównawcze wykazały duże różnice w wartościach badanych parametrów [3, 61]. Podejmowane są jednak próby standaryzacji PFT [62, 63].

3.1. PROBLEMY PRZEDANALITYCZNE

W przypadku wszystkich czynnościowych badań płytek krwi należy zachować środki ostrożności, aby uniknąć niepotrzebnej przedanalizycznej aktywacji płytek krwi w próbce, ponieważ spowoduje to fałszywe wyniki testu (spadek reaktywności).

3.1.1. Czynniki związane z pacjentem

Do czynników związanych z pacjentem należą: rytm dobowy, spożycie kawy, palenie tytoniu, wysiłek fizyczny, dieta/suplementy diety [64-66] i przyjmowanie leków, np. niesteroidowych środków przeciwzapalnych. Próbkę krwi należy pobrać na czczo w godzinach porannych u osoby, która nie przyjmowała przez ostatnie 10 dni żadnych substancji wpływających na reaktywność płytek krwi. Przed pomiarem należy określić miano płytek, aby ułatwić interpretację wyniku pomiarów wykonywanych w pełnej krwi [3, 67].

3.1.2. Pobieranie próbek krwi

Uszkodzenie naczynia podczas nakłucia żyły powoduje kontakt płytek z kolagenem i czynnikiem tkankowym oraz narażenie na kontakt z wysokimi siłami ścinającymi w czasie przepływu krwi przez igłę. Ponadto płytki krwi pozbawione kontaktu ze śródbłonkiem naczyniowym (brak tlenu azotu i prostacykliny) ulegają spontanicznej aktywacji. Wytyczne w zakresie pobierania krwi do badania funkcji płytek krwi nie różnią się zasadniczo od wymagań dotyczących badań koagulologicznych [3, 67].

3.1.3. Wybór probówek i antykoagulantu

Krew należy pobierać do probówek o nieaktywnej powierzchni (np. polipropylen). Probówki powinny zawierać antykoagulant hamujący generację trombiny. Do analizy można zastosować różne antykoagulanty, najczęściej buforowany cytrynianu sodu o stężeniu 3,2% i hirudynę (bezpośredni inhibitor trombiny). Wybór antykoagulantu jednak będzie wpływał na wyniki w istotny sposób, w zależności od metody i mierzonych

parametrów. Należy pamiętać, że reaktywność płytek krwi we krwi pobranej na cytrynian jest niższa (niedobór Ca^{2+}) niż ma to miejsce przy zastosowaniu hirudyny. Do badania funkcji płytek nie można stosować EDTA, ponieważ usunięcie Ca^{2+} powoduje zmiany konformacyjne kompleksu GPIIb/IIIa i upośledzenie wiązania fibrynogenu [3, 67, 68].

3.1.4. Warunki transportu i przechowywania

Zaleca się transport próbek w pozycji pionowej i unikanie stosowania pneumatycznych systemów transportowych. Wyniki testów funkcjonalnych na ogół wykazują znaczny wzrost aktywacji płytek krwi w ciągu pierwszych 30 minut po pobraniu krwi. Dlatego zaleca się, aby próbkę krwi pozostawić w spoczynku przez co najmniej 30 minut przed analizą. Stabilność różni się w zależności od metody, ale ogólnie próbki do badania funkcji płytek krwi mają stosunkowo krótką stabilność (zwykle 2-4 godzin). Należy przestrzegać instrukcji producenta dla zachowania stabilności, co należy zweryfikować lokalnie. Zaleca się przechowywanie próbek w temperaturze pokojowej [3, 67].

4. PRAKTYCZNE ZASTOSOWANIA

4.1. Diagnostyka wrodzonych zaburzeń funkcji płytek krwi

Wrodzone zaburzenia czynności płytek krwi (IPFD; ang. *inherited platelet function disorders*) stanowią dużą grupę bardzo rzadko występujących skaz krwotocznych [40, 69, 70].

Według zaleceń SSC (ang. *Scientific and Standardization Committee*)/ISTH (ang. *International Society on Thrombosis and Hemostasis*) diagnostyka laboratoryjna IPFD powinna być poprzedzona badaniami wstępnymi, do których zaliczono: morfologię krwi z liczbą płytek, APTT, PT, antygen i aktywność czynnika von Willebranda oraz aktywność czynnika VIII. Jeśli wyniki tych testów są prawidłowe, to należy wykonać badania diagnostyczne w kierunku IPFD:

1. rozmaz krwi obwodowej, ze zwróceniem szczególnej uwagi na wielkość i morfologię płytek;
2. optyczną agregację płytek z pięcioma podstawowymi agonistami (epinefryna, ADP, kolagen, kwas arachidonowy i rylocetyna);

3. uwalnianie ziarnistości płytkowych za pomocą lumiagregometru i metodą immunoenzymatyczną (ELISA; ang. *enzyme-linked immunosorbent assay test*);
4. oznaczenie głównych glikoprotein (GP) błony płytkowej metodą cytometrii przepływowej (Ib, Ib/IX, IIb/IIIa, IIIa) [40, 71, 72].

Wymienione wyżej badania umożliwiają rozpoznanie najważniejszych i najczęstszych IPFD. W przypadku rozpoznania należy przejść do drugiego etapu diagnostyki. W jej skład wchodzi oznaczenie agregacji płytek z rozszerzonym panelem agonistów oraz cytometria przepływowa z dodatkowymi przeciwciałami [9, 30, 31, 40].

Niektóre publikacje sugerują także zastosowanie PFA-100/200 [9], ale zasadniczo diagnostyka funkcji płytek w IPFD opiera się na LTA i cytometrii przepływowej [3].

W publikacjach skandynawskich i czeskich poświęconych wykorzystaniu PFT w diagnostyce zaburzeń funkcji płytek powtarzają się te same metody, tj. LTA, FC i PFA [63, 73].

W większości publikacji przedstawiany jest podobny zestaw rozszerzonego panelu agonistów, tj. peptyd aktywujący receptor trombiny (TRAP; ang. *thrombin receptor activating peptide*), analog tromboksanu A2 (TXA2) – U46619 oraz peptyd związany z kolagenem (CRP; ang. *collagen related peptide*) [9, 74]. W przypadku agonistów tej grupy nie jest celowe podawanie optymalnych stężeń, ponieważ dostępne są odczynniki o różnej charakterystyce, a wytyczne nie są zgodne [74]. Z doświadczeń autorów wynika, że w przypadku peptydu aktywującego receptor kolagenu (GPVI) występuje znacząca różnica odpowiedzi płytek na różne wersje CRP (CRP-XL i CRP-A).

4.2. Krwawienia

Do oceny ryzyka krwawień stosuje się badanie funkcji płytek (LTA, FC) jako uzupełnienie (potwierdzenie) wyniku oceny ryzyka według wystandaryzowanej skali oceny krwawień ISTH-BAT (ISTH; ang. *bleeding assessment tool*) [75, 76].

Jako podstawową metodę badania czynności płytek krwi wymienia się w pierwszej kolejności LTA [31],

która została obszernie opisana w publikacji Mularczyk i wsp. [9].

Dość często do oceny ryzyka krwawienia i testowania leków stosuje się przyłóżkowe testy czynności płytek krwi [77]. Wytyczne Europejskiego Towarzystwa Anestezjologii i Intensywnej Terapii dopuszczają przedoperacyjne badanie czynności płytek jedynie w połączeniu z dodatnim wywiadem dotyczącym krwawień, za pomocą wystandaryzowanej skali oceny krwawień ISTH-BAT [75, 76]. Można wykonać również przedoperacyjne badanie czynności płytek krwi u pacjentów przyjmujących leki przeciwplatekcyjne. Jest to szczególnie ważne w przypadku podjęcia decyzji o terminie operacji kardiochirurgicznej u pacjentów, którzy niedawno otrzymywali inhibitory P2Y12 [78, 79]. Należy jednak pamiętać, że w cytowanych publikacjach przedstawiono sugestie, a nie zalecenia (klasa zaleceń 2B).

4.2.1. Krwawienia pooperacyjne

Wyżej już przywoływane zalecenia Europejskiego Towarzystwa Anestezjologii i Intensywnej Terapii dopuszczają badanie czynności płytek krwi metodami POCT (ang. *point-of-care testing*) w przypadku pacjentów pozostających przed zabiegiem na leczeniu przeciwplatekowym [79].

W badaniu Woźniak i wsp. nie wykazano zadawalającej dokładności predykcyjnej powszechnie stosowanych przyłóżkowych analizatorów do oceny krwawień w kardiochirurgii [80]. Wykazano także, że rodzaj urazu i ciężkość wstrząsu nie wpływają na dysfunkcję płytek krwi ocenianą za pomocą trzech różnych PFT. Co więcej, nie wykazano związku pomiędzy dysfunkcją płytek krwi a zapotrzebowaniem na transfuzję i śmiertelnością [81].

Można znaleźć publikacje opisujące przydatność badania funkcji płytek krwi po urazach czy zabiegach w tym PFA-200 [82] i Multiplate®, ale dostępne są również prace podważające to zastosowanie [83, 84].

Podsumowując, w diagnostyce krwawień pooperacyjnych najczęściej stosowane są metody lepko-sprężyste (ROTEM i TEG), w których reaktywność płytek krwi stanowi tylko składową ogólnego wyniku. Metody te zostały uznane jako przydatne do oceny

ryzyka zwiększonego krwawienia pooperacyjnego i w ocenie konieczności zastosowania stosowania produktów krwiopochodnych [84, 85].

4.3. Monitorowanie leczenia przeciwplatekowego

Na początku tego wieku podejmowano liczne próby uzasadnienia celowości monitorowania leczenia przeciwplatekowego za pomocą metod z grupy PFT, głównie PFA-100 i Multiplate [7, 17, 86-88].

Przez ponad dwadzieścia lat były prowadzone intensywne badania w tym kierunku. Okazało się jednak, że różne testy czynności płytek krwi stosowane do pomiaru odpowiedzi na lek przeciwplatekowy wykazują słabą zgodność pomiędzy testami [23, 34, 35, 89-91].

W czasie badań stwierdzono wady niektórych testów w zakresie wykrywania „oporności” na leki przeciwplatekowe, zjawiska opisywanego także jako HTPR (ang. *high on-treatment platelet reactivity*) [92-94]. Badania te miały charakter poszukiwania osób, których płytki krwi w niewystarczający sposób reagowały na zastosowane leczenie przeciwplatekowe. U pacjentów rejestrowano wysoką reaktywność płytek, mimo stałego przyjmowania leku. W tym przypadku można mówić o fenotypie „opornych” na leki płytek krwi [94, 95].

Dla prawidłowej interpretacji wyników PFT należy rozróżnić dwa kierunki badań. W pierwszym porównano stosowanie zwiększonego blokowania receptora P2Y12 (tj. silnych inhibitorów P2Y12 lub kłopidogrelu w podwójnej dawce) z kłopidogrelem w standardowej dawce (75 mg/dobę), selektywnie wśród pacjentów z HTPR lub nosicieli polimorfizmu CYP2C19 LoF. W tym zakresie badania GRAVITAS i TRIGGER-PCI porównały odpowiednio efekty działania prasugrelu i kłopidogrelu w podwójnej dawce z kłopidogrelem wśród pacjentów z HTPR i nie wykazały żadnych korzyści w przypadku zastosowania PFT do personalizacji leczenia przeciwplatekowego [90, 96]. Dla odmiany, inne badania sugerowały korzyść kliniczną, wynikającą z ukierunkowanego wyboru terapii przeciwplatekowej u pacjentów z HTPR [97, 98]. Szczególnie często cytowane jest badanie TROPICAL-ACS. Wykazano w nim, że zastosowanie PFT w celu indywidualizacji leczenia przeciwplatekowego u pacjentów po zawale mięśnia sercowego,

przynoszą korzyści, które wynikają z monitorowania leczenia przeciwplatekowego, np. zaobserwowano mniej niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych w grupie z dostosowaniem dawki leku na podstawie wyników badań reaktywności płytek krwi [98].

W publikacji Galli i wsp. podsumowano zastosowanie PFT do personalizacji (monitorowania) leczenia przeciwplatekowego u pacjentów po przezskórnej angioplastyce wieńcowej (PCI; ang. *percutaneous coronary intervention*). Autorzy uważają, że kierunek jest obiecujący, ale wspomniane wyżej podejście wymaga dalszych badań dostarczających dowodów klinicznych [99]. W przypadku innych zastosowań klinicznych monitorowania leczenia przeciwplatekowego całego spektrum chorób powiązanych z miażdżycą naczyń wnioski są takie same [100].

Rozważane jest także wykorzystywanie badań genetycznych (genotypowanie) do personalizacji leczenia przeciwplatekowego, jednakże aktualne dowody nie potwierdzają konieczności rutynowego stosowania badań genetycznych i/lub czynności płytek krwi [101, 102].

Ponadto nie istnieją dowody kliniczne związane z przydatnością badań tego typu funkcji u pacjentów, którzy są w trakcie zachowawczego leczenia choroby niedokrwiennej serca [103].

W najnowszych wytycznych zastosowanie PFT do personalizacji leczenia przeciwplatekowego jest dopuszczalne, ale nie jest rekomendowane [103-105].

4.4. Fenotypowanie płytek

W rozdziałach dotyczących diagnostyki zaburzeń funkcji płytek (w tym IPFD) oraz monitorowania leczenia przeciwplatekowego wspomniano już o fenotypowaniu i genotypowaniu, co miało na celu wykrycie charakterystycznych cech płytek krwi u konkretnych osób [70, 101, 102].

Rozwinięciem ww. badań jest nowy kierunek poszukiwań roli zaburzeń funkcji płytek krwi w chorobach układu krążenia. Zakłada się, że dokładna i wszechstronna ocena czynności płytek krwi może być kluczem do zrozumienia ryzyka zdarzeń zakrzepowych związanych z chorobami układu krążenia,

a tym samym pomóc w personalizacji stosowania leków przeciwplatekowych.

Próby fenotypowania płytek krwi płytkowych trwają od ponad dwudziestu lat, ale nie ma jeszcze dowodów na diagnostyczną wartość tego typu procedur [106-108].

Punktem wyjścia do dalszych badań jest założenie, że płytki krwi odgrywają istotną rolę w początkowych stadiach rozwoju miażdżycy [109, 110]. W powstawaniu zmian naczyniowych główny udział ma zmiana fenotypu śródbłonna na „prokoagulacyjny”, a fenotyp płytek krwi może się przyczyniać do progresji choroby.

Pojawiają się podstawowe pytania:

- Czy mamy do czynienia fenotypem indukowanym przez chorobę?
- Jakimi metodami można badać fenotyp płytek (opisano wiele procedur)?
- Czy fenotyp płytek krwi jest „stały” i możemy go badać przed pojawieniem się choroby? [109, 110].

W jednym z pierwszych badań w tej dziedzinie Yee i wsp. wykazali, że w badaniach agregacji płytek z wykorzystaniem niskich stężeń agonistów (ADP, kolagen, epinefryna) zdrowi dawcy cechowali się znaczną zmiennością międzyosobniczą. U niewielkiego odsetka osób zaobserwowano znacząco wyższą od średniej wartość agregacji płytek indukowanej ADP. U osób, które wykazywały taką nadreaktywność *in vitro* na jednego agonistę zauważono tendencję do podobnej reakcji na innych, co sugeruje, że nadreaktywność jest ogólną cechą płytek krwi. Autorzy zalecają wykonanie agregacji w celu wykrycia nadreaktywności płytek krwi, by na tej podstawie ocenić ryzyko zakrzepicy tętniczej [107].

Puurunen i wsp. zbadali powiązanie reaktywności płytek krwi z incydentami CVD w badaniu FHS (ang. *Framingham Heart Study*). Do badania włączono zdrowych ochotników, a do badania agregacji wykorzystano LTA z udziałem trzech agonistów: kolagen (1,9 ng/ml), ADP (0,05-15 mmol/l) i epinefrynę (0,01-15 mmol/l). W trakcie obserwacji (mediana 20,4 lat)

rejestrowano wystąpienie niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych. Nadreaktywność w agregacji indukowanej ADP (1 mmol/l) była istotnie powiązana z incydem zawazu/udaru. Z badania wynikało, że u potencjalnie zdrowych osób znacząco wyższa od średniej agregacja pod wpływem ADP jest związana z przyszłą zakrzepicą tętniczą podczas 20-letniej obserwacji. Odkrycia te potwierdzają hamowanie aktywacji indukowanej ADP jako krytyczny paradygmat leczenia i zachęcają do dalszych badań [111].

Ponadto w badaniu FHS powiązano zwiększoną reaktywność płytek krwi z ryzykiem wystąpienia choroby Alzheimera i, podobnie jak w obserwacjach chorób sercowo-naczyniowych, zauważono, że fenotyp nadreaktywnych płytek krwi może mieć wartość prognostyczną [112].

Jednakże, ze względu na koszt, czas i złożoność pomiaru agregacji płytek krwi, badania kliniczne na dużą skalę pozostają problematyczne [113].

Z drugiej strony, biorąc pod uwagę duże znaczenie nowego wykorzystania reaktywności płytek krwi w profilaktyce CVD, wiele zespołów pracuje nad opracowaniem nowej, lepszej metodologii fenotypowania płytek [54, 105, 112, 114-116].

W badaniach prowadzonych w celu wykrycia fenotypu nadreaktywnych płytek krwi dominują dwie metody, tj. cytometria przepływowa (FC) i LTA. FC umożliwia kompleksowe fenotypowanie płytek krwi [117]. Dodatkową zachętą do stosowania tej metody są dostępne w piśmiennictwie protokoły [54].

Do fenotypowania płytek krwi wykorzystuje się także zmodyfikowaną wersję agregometrii optycznej, którą opisano w innej części niniejszej publikacji [3, 13].

Dunster i wsp. opracowali test Platelet Phenomic Analysis (PPAnalytics) i powiązaną z nim platformę oprogramowania typu „open source”. Analiza PPA wykorzystuje przygotowane płytki mikrotitracyjne w celu zapewnienia szczegółowej charakterystyki funkcji płytek krwi. Automatyczna analiza wielowymiarowych danych umożliwia identyfikację

subpopulacji dawców o odrębnych fenotypach funkcji płytek krwi. Analiza PPA może być przydatnym narzędziem do stratyfikacji podgrup badanych osób na podstawie reaktywności płytek krwi, co przyspieszy postęp spersonalizowanego leczenia przeciwplatekowego [115].

4.4.1. Praktyczne zastosowanie fenotypowania płytek krwi

Wcześniejsze badania kliniczne, dotyczące pierwotnej profilaktyki chorób układu krążenia za pomocą ASA, nie uwzględniały reaktywności płytek krwi jako parametru wskazującego osoby wymagające profilaktyki pierwotnej z zastosowaniem leków przeciwplatekowych. Podejście to jest sprzeczne z paradygmatem stosowanym w innych kluczowych obszarach farmakologicznej profilaktyki chorób układu krążenia, w tym terapii hipotensyjnej i statynami, które łączą ocenę ryzyka sercowo-naczyniowego z pomiarem biomarkerów (np. ciśnienia krwi i cholesterolu LDL). Takie podejście jest zrozumiałe, jeżeli weźmiemy pod uwagę brak wiarygodnych metod oceny reaktywności płytek krwi. Opisane w tej pracy metody mogą przybliżyć moment identyfikacji osób o podwyższonym ryzyku sercowo-naczyniowym ze względu na fenotyp nadreaktywnych płytek krwi i zakwalifikowanie do profilaktyki pierwotnej za pomocą preparatów o działaniu przeciwplatekowym. Można założyć, że nowe podejście zmieni postrzeganie populacji z nadreaktywnymi płytkami krwi, a która odniesie największe korzyści ze stosowania pierwotnej profilaktyki CVD za pomocą np. kwasu acetylosalicylowego, i tym samym zapoczątkuje nową erę precyzyjnej terapii przeciwplatekowej [114].

Podobną opinię możemy znaleźć w publikacji Shpigelman i wsp. wskazującą na potencjalne korzyści fenotypowania reaktywności płytek krwi [102].

W ostatnim czasie opublikowano badanie, w którym płytki krwi (głównie ich reaktywność) opisywane są jako potencjalny czynnik ryzyka chorób układu krążenia. Opisano związek pomiędzy parametrami lipidowymi a agregacją płytek krwi. Wyniki pracy Szymańskiej i wsp. wykazują, że w hipercholesterolemii agregacja płytek krwi indukowana kolagenem jest wyższa, szczególnie ta związana z wcześniejszą fazą aktywacji płytek krwi [59].

Tabela I. Zastosowanie wybranych metod badania funkcji płytek krwi w różnych sytuacjach klinicznych.

Zastosowanie kliniczne	LTA	FC	PFA	Multiplate	VerifyNow
Diagnostyka zaburzeń funkcji płytek krwi (głównie wrodzonych)	++ [9, 40, 70, 120]	++ [30, 31, 74, 120]	+* [37, 63]	+/- [121]	-
Ocena ryzyka krwawień	++ [31, 75, 76]	+ [54, 76]	+/- [82-84]	+ [122, 123]	-
Monitorowanie leczenia przeciwplatekowego	+ [27, 124]	+ [125, 126]	+ [17, 127]	+ [19, 98]	+ [23, 25]

Rekomendacje: ++ rekomendowane, + możliwe do zastosowania, +/- brak ustalonej przydatności, - nie należy stosować
 LTA (ang. *light transmission aggregometry*) – agregacja optyczna, FC (ang. *flow cytometry*) – cytometria przepływowa
 *Głównie diagnostyka choroby von Willebranda

5. PODSUMOWANIE

Od czasu opracowania LTA 60 lat temu badania funkcji płytek (PFT) krwi zyskały szeroką popularność. Obecnie dostępnych jest wiele różnych testów funkcji płytek krwi, wykorzystywanych w diagnostyce zaburzeń krzepnięcia, ocenie pacjenta z ostrym krwawieniem i badania działania leków przeciwplatekowych. Jednak w wytycznych wartość kliniczna badania PFT potwierdzona została tylko w diagnostyce zaburzeń funkcji płytek (w tym IPFD), pozostałe zastosowania tego typu badań nie są jeszcze rozstrzygnięte [3]. W celu rozszerzenia ogólnych wiadomości warto przedstawić ranking zastosowania różnych metod (tab. I). Podobne zestawienia można znaleźć na stronie <https://www.uptodate.com/contents/platelet-function-testing> lub w anglojęzycznych publikacjach przeglądowych [1-3]. Dla osób pracujących w specjalistycznych laboratoriach przy klinikach hematologicznych przedstawione w pracy informacje nie są nowością.

Można założyć, że część diagnostów laboratoryjnych jest zainteresowana prowadzeniem badań

naukowych, w związku z tym warto zaadresować kilka propozycji do tej grupy.

W warunkach medycznego laboratorium diagnostycznego, bez dodatkowego finansowania, można pomyśleć o innowacyjnym wykorzystaniu dostępnych urządzeń. Do tej kategorii należą analizatory koagulologiczne i czytniki do oznaczeń ELISA.

Badanie agregacji płytek krwi metodą LTA można wykonać w automatach koagulologicznych (np. Sysmex) [14, 15]. Druga z nich opisywana jest jako agregacja na płytkach titracyjnych, albo '96-well plate-based aggregometry'. [12]. Więcej informacji na ten temat znajduje się w pierwszej części pracy.

Kolejna możliwość dotyczy wykorzystania analizatorów hematologicznych (np. Sysmex DI-60), umożliwiających gromadzenie obrazów wysokiej rozdzielczości [118]. Obróbka plików graficznych pozwala na dokładną analizę cech morfologicznych płytek krwi na podstawie metody uczenia maszynowego [119].

6. PIŚMIENICTWO

- Gresele P, Bury L, Mezzasoma AM, et al. Platelet function assays in diagnosis: an update. *Expert Rev. Hematol.* 2019; 12: 29–46.
- Le Blanc J, Mullier F, Wayne C, et al. Advances in Platelet Function Testing-Light Transmission Aggregometry and Beyond. *J Clin Med.* 2020; 9: 2636.
- Larsen JB, Hvas AM, Højbjerg JA. Platelet Function Testing: Update and Future Directions. *Semin Thromb Hemost.* 2023; 49: 600–608.
- Więclawska B, Boncler M, Różalski M, et al. Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny aktywności i reaktywności płytek krwi w stanach patologicznych oraz układach modelowych. *Diagn Lab.* 1999; 35: 117–126.
- Golanski J, Watala C. Znaczenie procesu aktywacji płytek krwi in vivo oraz in vitro w wybranych zagadnieniach praktyki klinicznej i diagnostyce laboratoryjnej. *Diagn Lab.* 1999; 35: 511–527.
- Golanski J, Watala C. Instrumentalne metody badania aktywacji i reaktywności płytek krwi – metody typu Point-of-Care. *Diagn Lab.* 2002; 38: 211–222.
- Syska K, Golański J. Laboratoryjne metody oceny działania kłoidogrelu oraz innych leków przeciwplateletowych blokujących receptor P2Y. *Diagn Lab.* 2012; 48: 323–332.
- 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.
- Malarczyk D, Odnoczko E. Light transmission aggregometry in the diagnosis of thrombocytopathy. *J Transf Med.* 2023; 16: 117–125.
- Munnix ICA, Van Oerle R, Verhezen P, et al. Harmonizing light transmission aggregometry in the Netherlands by implementation of the SSC-ISTH guideline. *Platelets.* 2021; 32: 516–523.
- Kaiser T, Liebscher K, Scholz U, et al. Influencing Factors and Differences in Born Aggregometry in Specialized Hemostaseological Centers: Results of a Multicenter Laboratory Comparison. *TH Open.* 2022; 6: e213–e220.
- Lordkipanidzé M, Lowe GC, Kirkby NS, et al. Characterization of multiple platelet activation pathways in patients with bleeding as a high-throughput screening option: use of 96-well Optimul assay. *Blood.* 2014; 123: e11–e22.
- Sachs UJ, Roder L, Cooper N, et al. Automated Light Transmission Aggregometry with and without Platelet Poor Plasma Reference: A Method Comparison. *TH Open.* 2023; 7: e56–e64.
- Ling LQ, Liao J, Niu Q, et al. Evaluation of an automated light transmission aggregometry. *Platelets.* 2017; 28: 712–719.
- Egashira M, Kono M, Nakajima K, et al. The basic evaluation of light transmission platelet aggregation method on an automated coagulation analyzer CN-6000. *Sysmex J Int.* 2020; 30: 1–9.
- Kim CJ, Kim J, Sabate Del Rio J, et al. Fully automated light transmission aggregometry on a disc for platelet function tests. *Lab Chip.* 2021; 21: 4707–4715.
- Golański J, Chizyński K, Golański R, et al. Use of platelet function analyzer PFA-100 and whole blood aggregometry to monitor blood platelet sensitivity to acetylsalicylic acid (aspirin). Is it possible to reliably monitor antiplatelet treatment using routine laboratory diagnostic methods? *Pol Arch Med Wewn.* 2000; 104: 355–361.
- Pluta J, Nicinska B, Trzebicki J. Multiple electrode aggregometry as a method for platelet function assessment according to the European guidelines. *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2018; 50(3): 230–233.
- Jastrzębska M, Chelstowski K, Wódecka A, et al. Factors influencing multiplate whole blood impedance platelet aggregometry measurements, during aspirin treatment in acute ischemic stroke: a pilot study. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2013; 24: 830–838.
- Szymańska P, Boncler M, Marcinkiewicz A, et al. Reaktywność płytek krwi indukowana kolagenem, oceniana metodą agregometrii wieloelektrodowej (MEA) u pacjentów stosujących podwójną terapię przeciwplateletową lub monoterapię aspiryną. *Diagn Lab.* 2022; 57: 131–136.
- Szymanska P, Boncler M, Golanski J. Predictors of high platelet reactivity assessed by Multiple Electrode Aggregometry in healthy individuals the role of leukocyte count. *Platelets.* 2022; 33: 486–487.
- Scavone M, Podda GM, Tripodi A, et al. Whole blood platelet aggregation measurement by Multiplate: potential diagnostic inaccuracy of correcting the results for the sample platelet count. *Platelets.* 2023; 34: 2156493.
- Danielak D, Komosa A, Tomczak A, et al. Determinants of high on-treatment platelet reactivity and agreement between VerifyNow and Multiplate assays. *Scand J Clin Lab Invest.* 2017; 77: 190–198.
- Ramotowski B, Undas A, Budaj A. Altered platelet reactivity, coagulation, endothelial and inflammatory markers early after smoking cessation verified with cotinine plasma concentration. *J Thromb Thrombolysis.* 2023; 56: 75–81.
- Angiolillo DJ, Been L, Rubinstein M, et al. Use of the VerifyNow point of care assay to assess the pharmacodynamic effects of loading and maintenance dose regimens of prasugrel and ticagrelor. *J Thromb Thrombolysis.* 2021; 51: 741–747.
- Wieclawska B, Boncler M, Rozalski M, et al. Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny aktywacji i reaktywacji płytek krwi w stanach patologicznych oraz układach modelowych. *Diagn Lab.* 1999; 35: 117–126.
- Alessi MC, Coxon C, Ibrahim-Kosta M, et al. Multicenter evaluation of light transmission platelet aggregation reagents: communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost.* 2023; 21: 2596–2610.
- Schmitz G, Rothe G, Ruf A, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thrombosis and haemostasis.* 1998; 79: 885–896.
- Huskens D, Sang Y, Konings J, et al. Standardization and reference ranges for whole blood platelet function measurements using a flow cytometric platelet activation test. *PLoS One.* 2018; 13: e0192079.
- Frelinger AL, 3rd, Rivera J, Connor DE, et al. Consensus recommendations on flow cytometry for the assessment of inherited and acquired disorders of platelet number and function: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost.* 2021; 19: 3193–3202.
- Frelinger AL, 3rd, Spurgeon BEJ. Clinical Cytometry for Platelets and Platelet Disorders. *Clin. Lab. Med.* 2023; 43: 445–454.
- Pietrucha T, Golanski J, Baj Z, et al. Flow cytometric analysis of the prevention of platelet activation by tissue type plasminogen activator and streptokinase. *Fibrinolysis.* 1996; 10: 239–248.
- Golański J, Pietrucha T, Baj Z, et al. Molecular insights into the anticoagulant-induced spontaneous activation of platelets in whole blood-various anticoagulants are not equal. *Thromb. Res.* 1996; 83: 199–216.
- Kuliczkowski W, Witkowski A, Polonski L, et al. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of

- the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2009; 30: 426–435.
35. Kuliczkowski W, Rychlik B, Chizynski K, et al. Comparison of the VASP assay and platelet aggregometry in the evaluation of platelet P2Y(12) receptor blockade. *Pol Arch Med Wewn*. 2011; 121: 115–120.
 36. Lukasik M, Dworacki G, Michalak S, et al. Aspirin treatment influences platelet-related inflammatory biomarkers in healthy individuals but not in acute stroke patients. *Thromb Res*. 2011; 128: e73–80.
 37. Favalaro EJ, Pasalic L, Lippi G. Towards 50 years of platelet function analyser (PFA) testing. *Clin Chem Lab Med*. 2022; 61: 851–860.
 38. Golanski J, Pluta J, Baraniak J, et al. Limited usefulness of the PFA-100 for the monitoring of ADP receptor antagonists – in vitro experience. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42: 25–29.
 39. Golanski J, Syska K, Watala C. Revival of PFA-100—how far is it useful for the monitoring of ADP receptor antagonists? *Thromb Haemost*. 2013; 109: 564–565.
 40. Chojnowski K. Wrodzone zaburzenia czynności płytek krwi. *Hematologia*. 2017; 7: 287–294.
 41. Favalaro EJ, Bonar R. An update on quality control for the PFA-100/PFA-200. *Platelets*. 2018; 29: 622–627.
 42. Ambaglio C, Zane F, Russo MC, et al. Preoperative bleeding risk assessment with ISTH-BAT and laboratory tests in patients undergoing elective surgery: A prospective cohort study. *Haemophilia*. 2021; 27: 717–723.
 43. Kim B. Diagnostic workup of inherited platelet disorders. *Blood Research*. 2022; 57: S11–S19.
 44. Wool GD, Carll T. Viscoelastic testing: Critical appraisal of new methodologies and current literature. *Int J Lab Hematol*. 2023; 45: 643–658.
 45. Majumdar M, McElroy I, Waller HD, et al. Identifying Sex Dimorphism in Peripheral Artery Disease with Platelet Mapping. *Ann Vasc Surg*. 2023; 88: 42–50.
 46. Hartmann J, Curzen N. Modified Thromboelastography for Peri-interventional Assessment of Platelet Function in Cardiology Patients: A Narrative Review. *Semin Thromb Hemost*. 2023; 49: 192–200.
 47. Caruso C, Lam WA. Point-of-Care Diagnostic Assays and Novel Preclinical Technologies for Hemostasis and Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2021; 47: 120–128.
 48. Sikora J, Karczmarzka-Wodzka A, Bugieda J, et al. The Use of Total Thrombus Formation Analysis System as a Tool to Assess Platelet Function in Bleeding and Thrombosis Risk-A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2021; 22.
 49. Fuchizaki A, Yasui K, Hayashi T, et al. A novel quantitative method to evaluate the contribution of platelet products to white thrombus formation in reconstituted blood under flow conditions. *Vox Sang*. 2023; 118: 367–375.
 50. Kedzia M, Osinski M, Mantaj U, et al. Endometriosis is associated with an increased whole-blood thrombogenicity detected by a novel automated microchip flow-chamber system (T-TAS®). *Ginekol Pol*. 2023; 94: 291–297.
 51. Czerwinska-Jelonkiewicz K, Sanetra K, Buszman PP, et al. Hemostatic disorders in patients with infective endocarditis undergoing urgent surgical valve replacement – Rethinking current beliefs. *Int J Cardiol*. 2023; 388: 131112.
 52. Kamola P, Luzak B, Przygodzka P, et al. Platelet F11 receptor (F11R)/Junctional Adhesion Molecule – A (JAM-A) is not essential for thrombus formation but contributes to its stabilisation *J Thromb Haemost*. 2023; in press.
 53. Watala C, Golanski J. Postępy w metodach badań aktywacji płytek krwi – trudności i ograniczenia. Część II. – Cytometria przeplywowa. *Acta Haematol Pol* 1999; 30: 125–132.
 54. Yaw HP, Van Den Helm S, Linden M, et al. Whole blood flow cytometry protocol for the assessment of platelet phenotype, function, and cellular interactions. *Platelets*. 2021; 32: 786–793.
 55. Frelinger III AL, Rivera J, Connor DE, et al. Consensus recommendations on flow cytometry for the assessment of inherited and acquired disorders of platelet number and function: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost*. 2021; 19: 3193–3202.
 56. Baidildinova G, Nagy M, Jurk K, et al. Soluble Platelet Release Factors as Biomarkers for Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2021; 8: 684920.
 57. Rozalski M, Watala C, Golanski J. Various laboratory protocols for measuring thromboxane A2 generation to detect the effectiveness of acetylsalicylic acid therapy: a comparative study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014; 25: 46–51.
 58. Watala C, Golański J, Więclawska B, et al. Use of flow cytometry to differentiate between activation and reactivity of blood platelets – methodological report. *Med Sci Monit*. 1999; 5: 154–161.
 59. Szymańska P, Luzak B, Siarkiewicz P, et al. Platelets as Potential Non-Traditional Cardiovascular Risk Factor—Analysis Performed in Healthy Donors. *Int J Mol Sci*. 2023; 24.
 60. Watala C, Golanski J. Postępy w metodach badań aktywacji płytek krwi – trudności i ograniczenia. Część I. *Acta Haematol Pol* 1999; 30: 117–123.
 61. Mason GA, Rabbolini DJ. The Current Role of Platelet Function Testing in Clinical Practice. *Semin Thromb Hemost*. 2021; 47: 843–854.
 62. Wagner M, Uzun G, Bakchoul T, et al. Diagnosis of Platelet Function Disorders: A Challenge for Laboratories. *Hamostaseologie*. 2022; 42: 36–45.
 63. Szanto T, Zetterberg E, Ramstrom S, et al. Platelet function testing: Current practice among clinical centres in Northern Europe. *Haemophilia*. 2022; 28: 642–648.
 64. Sut AP, M.; Zadrożny, M.; Król, E.; Różalski, M.; Golański, J. Dieta bogata w polifenole roślinne obniża agregację płytek krwi u kobiet z rakiem piersi. *Diagn Lab*. 2018; 54: 81–84.
 65. Sut A, Chizynski K, Rozalski M, et al. Dietary intake of omega fatty acids and polyphenols and its relationship with the levels of inflammatory markers in men with chronic coronary syndrome after percutaneous coronary intervention. *Kardiol Pol*. 2020; 78: 117–123.
 66. Golanski J, Szymanska P, Rozalski M. Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Metabolites on Haemostasis-Current Perspectives in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2021; 22.
 67. Raszeja-Specht A, Golanski J. Postępowanie przedanalizyczne w laboratoryjnej diagnostyce zaburzeń hemostazy. Zalecenia Sekcji Laboratoryjnej Diagnostyki Zaburzeń Hemostazy Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej. *Diagn Lab*. 2014; 50: 65–70.
 68. Golanski J, Pietrucha T, Baj Z, et al. Molecular insights into the anticoagulant-induced spontaneous activation of platelets in whole blood – Various anticoagulants are not equal. *Thromb Res*. 1996; 83: 199–216.
 69. Palma-Barqueros V, Revilla N, Sánchez A, et al. Inherited platelet disorders: an updated overview. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 4521.
 70. Watson SP, Lowe GC, Lordkipanidze M, et al. Genotyping and phenotyping of platelet function disorders. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(Suppl 1): 351–363.
 71. Gresele P, Harrison P, Gachet C, et al. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2015; 13: 314–322.
 72. Gresele P, Falcinelli E, Bury L, et al. The ISTH bleeding assessment tool as predictor of bleeding events in inherited platelet

- disorders: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost.* 2021; 19: 1364–1371.
73. Louzil J, Stikarova J, Provaznikova D, et al. Diagnosing Czech Patients with Inherited Platelet Disorders. *Int J Mol Sci.* 2022; 23.
 74. Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2022; 59: 405–444.
 75. Fasulo MR, Biguzzi E, Abbattista M, et al. The ISTH Bleeding Assessment Tool and the risk of future bleeding. *J Thromb Haemost.* 2018; 16: 125–130.
 76. Adler M, Kaufmann J, Alberio L, et al. Diagnostic utility of the ISTH bleeding assessment tool in patients with suspected platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2019; 17: 1104–1112.
 77. Sakurai Y, Hardy ET, Lam WA. Hemostasis-on-a-chip / incorporating the endothelium in microfluidic models of bleeding. *Platelets.* 2023; 34: 2185453.
 78. Matkovic M, Novakovic T, Bilbija I, et al. The routine use of platelet function tests in elective coronary artery bypass grafting: A prospective observational trial. *J Card Surg.* 2021; 36: 629–636.
 79. Kietaihl S, Ahmed A, Afshari A, et al. Management of severe peri-operative bleeding: Guidelines from the European Society of Anaesthesiology and Intensive Care: Second update 2022. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2023; 40: 226–304.
 80. Wozniak MJ, Abbasciano R, Monaghan A, et al. Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy Studies Evaluating Point-of-Care Tests of Coagulopathy in Cardiac Surgery. *Transfus Med Rev.* 2021; 35: 7–15.
 81. Pommer P, Oberladstatter D, Schlimp CJ, et al. Multiplate Platelet Function Testing upon Emergency Room Admission Fails to Provide Useful Information in Major Trauma Patients Not on Platelet Inhibitors. *J Clin Med.* 2022; 11: 2578.
 82. Cui W, Zhang J, Wu Y, et al. Novel Platelet Function Analyzer 200 Predicts Blood Transfusion After Elective Cardiac Surgery in Patients Suspended on Dual Antiplatelet Therapy. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2023; 29: 10760296231187627.
 83. Gwon JG, Ko SY, Kim H. Is the platelet function test effective in predicting blood loss in patients undergoing hepatic resection? *Ann Surg Treat Res.* 2022; 103: 227–234.
 84. Xu FWX, Lim NA, Sim MA, et al. Point-of-care platelet function testing for guided transfusion in neurosurgical management of intracranial hemorrhage: a systematic review. *Eur J Med Res.* 2022; 27: 191.
 85. Baryshnikova E, Di Dedda U, Ranucci M. Are Viscoelastic Tests Clinically Useful to Identify Platelet-Dependent Bleeding in High-Risk Cardiac Surgery Patients? *Anesth Analg.* 2022; 135: 1198–1206.
 86. Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B, et al. Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. *J Neurol.* 2003; 250: 63–66.
 87. Golanski J, Chlopicki S, Golanski R, et al. Resistance to aspirin in patients after coronary artery bypass grafting is transient: impact on the monitoring of aspirin antiplatelet therapy. *Ther Drug Monit.* 2005; 27: 484–490.
 88. Abaci A, Yilmaz Y, Caliskan M, et al. Effect of increasing doses of aspirin on platelet function as measured by PFA-100 in patients with diabetes. *Thromb Res.* 2005; 116: 465–470.
 89. Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, et al. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 2007; 28: 1702–1708.
 90. Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, et al. Standard vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *Jama.* 2011; 305: 1097–1105.
 91. Golanski J, Syska K, Chizynski K, et al. Changes in response to clopidogrel therapy in patients after percutaneous coronary interventions as assessed by different platelet function tests. *Pol Arch Med Wewn.* 2016; 126: 653–661.
 92. Golanski J, Pluta J, Baraniak J, et al. Limited usefulness of the PFA-100 (TM) for the monitoring of ADP receptor antagonists – in vitro experience. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004; 42: 25–29.
 93. Golanski J, Watala C. Czy laboratoryjne monitorowanie leczenia kwasem acetylosalicylowym jest celowe? *Kardiologia po Dyplomie.* 2005; 2: 21–25.
 94. M'Pembele R, Ahlbrecht S, Helten C, et al. High On-Treatment Platelet Reactivity: Aspirin versus Clopidogrel. *Pharmacology.* 2023; 108: 83–89.
 95. Watala C, Golański J. Fizjologiczne i molekularne mechanizmy oporności na kwas acetylosalicylowy. *Kardiologia po Dyplomie.* 2005; 2: 16–20.
 96. Trenk D, Stone GW, Gawaz M, et al. A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59: 2159–2164.
 97. Kheiri B, Osman M, Abdalla A, et al. De-Escalation of Antiplatelet Therapy in Patients With Acute Coronary Syndrome Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2019; 24: 153–159.
 98. Sibbing D, Aradi D, Jacobshagen C, et al. Guided de-escalation of antiplatelet treatment in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention (TROPICAL-ACS): a randomised, open-label, multicentre trial. *Lancet.* 2017; 390: 1747–1757.
 99. Galli M, Franchi F, Rollini F, et al. Role of platelet function and genetic testing in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Trends Cardiovasc Med.* 2023; 33: 133–138.
 100. Marcucci R, Berteotti M, Gragnano F, et al. Monitoring antiplatelet therapy: where are we now? *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2023; 24: e24–e35.
 101. Valgimigli M, Aboyans V, Angiolillo D, et al. Antithrombotic treatment strategies in patients with established coronary atherosclerotic disease. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.* 2023; 9: 462–496.
 102. Shpigelman J, Proshkina A, Daly MJ, et al. Personalized Dual Antiplatelet Therapy in Acute Coronary Syndromes: Striking a Balance Between Bleeding and Thrombosis. *Current Cardiology Reports.* 2023; 25: 693–710.
 103. Twine CP, Kakkos SK, Aboyans V, et al. Editor's Choice – European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2023 Clinical Practice Guidelines on Antithrombotic Therapy for Vascular Diseases. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2023; 65: 627–689.
 104. Saito T, Fujisaki T, Aikawa T, et al. Strategy of dual antiplatelet therapy for patients with ST-elevation myocardial infarction and non-ST-elevation acute coronary syndromes: A systematic review and network meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2023; 389: 131157.
 105. Rocca B, Patrono C. Precision antiplatelet therapy. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2023; 7: 100138.
 106. Golanski J, Golanski R, Chizynski K, et al. Platelet hyperreactivity after coronary artery bypass grafting: the possible relevance to glycoprotein polymorphisms. A preliminary report. *Platelets.* 2001; 12: 241–247.
 107. Yee DL, Sun CW, Bergeron AL, et al. Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals. *Blood.* 2005; 106: 2723–2729.

108. Berger JS, Becker RC, Kuhn C, et al. Hyperreactive platelet phenotypes: relationship to altered serotonin transporter number, transport kinetics and intrinsic response to adrenergic co-stimulation. *Thromb Haemost.* 2013; 109: 85–92.
109. Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I. Investigation of Platelet Aggregation in Atherosclerosis. *Methods Mol Biol.* 2022; 2419: 333–347.
110. Nardin M, Verdoia M, Cao D, et al. Platelets and the Atherosclerotic Process: An Overview of New Markers of Platelet Activation and Reactivity, and Their Implications in Primary and Secondary Prevention. *J Clin Med.* 2023; 12: 6074.
111. Puurunen MK, Hwang SJ, Larson MG, et al. ADP Platelet Hyperreactivity Predicts Cardiovascular Disease in the FHS (Framingham Heart Study). *J Am Heart Assoc.* 2018; 7(5): e008522.
112. Ramos-Cejudo J, Johnson AD, Beiser A, et al. Platelet Function Is Associated With Dementia Risk in the Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc.* 2022; 11: e023918.
113. 113. Berger JS. Aspirin for Primary Prevention—Time to Rethink Our Approach. *JAMA Netw Open.* 2022; 5: e2210144.
114. Cofer LB, Barrett TJ, Berger JS. Aspirin for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Time for a Platelet-Guided Approach. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2022; 42: 1207–1216.
115. Dunster JL, Bye AP, Kriek N, et al. Multiparameter phenotyping of platelet reactivity for stratification of human cohorts. *Blood Adv.* 2021; 5: 4017–4030.
116. Nurden P, Stritt S, Favier R, et al. Inherited platelet diseases with normal platelet count: phenotypes, genotypes and diagnostic strategy. *Haematologica.* 2021; 106: 337.
117. Spurgeon BEJ, Frelinger AL, 3rd. Comprehensive phenotyping of human platelets by single-cell cytometry. *Cytometry A.* 2022; 101: 290–297.
118. Lopic I, Milos M, Dorotic M, et al. Analytical validation of white blood cell differential and platelet assessment on the Sysmex DI-60 digital morphology analyzer. *Int J Lab Hematol.* 2023; 45: 668–677.
119. Kempster C, Butler G, Kuznecova E, et al. Fully automated platelet differential interference contrast image analysis via deep learning. *Sci Rep.* 2022; 12: 4614.
120. Sharma P, Sachdeva MUS, Kumar N, et al. A comparative study between light transmission aggregometry and flow cytometric platelet aggregation test for the identification of platelet function defects in patients with bleeding. *Blood Res.* 2021; 56: 109–118.
121. Moenen F, Vries MJA, Nelemans PJ, et al. Screening for platelet function disorders with Multiplate and platelet function analyzer. *Platelets.* 2019; 30: 81–87.
122. D'Andria Ursolo J, Licheri M, Barucco G, et al. Management of Microvascular Bleeding after On-Pump Cardiac Surgery in a Patient with Perioperative Diagnosis of Impairment of Platelet Responses to Adenosine Diphosphate: A Case Report and a Literature Review. *J Clin Med.* 2023; 12: 6372.
123. Sun P, McMillan-Ward E, Mian R, et al. Comparison of light transmission aggregometry and multiple electrode aggregometry for the evaluation of patients with mucocutaneous bleeding. *Int J Lab Hematol.* 2019; 41: 133–140.
124. Bultasova L, Rohan V, Ulehlova J, et al. Monitoring the Antiplatelet Therapy Efficacy in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Clin Lab.* 2023; 69.
125. Li L, Huskens D, Florin L, et al. Flow cytometric analysis of platelet function to detect high on-treatment residual platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy. *Int J Lab Hematol.* 2022; 44: e100–e102.
126. Berger M, Dressel A, Kleber ME, et al. Platelet Reactivity and Cardiovascular Mortality Risk in the LURIC Study. *J Clin Med.* 2023; 12: 1913.
127. Anaya R, Rodriguez M, Gil JM, et al. Correlation between PlateletWorks((R)) and PFA-100((R)) for Measuring Platelet Function before Urgent Surgery in Patients with Chronic Antiplatelet Therapy. *J Clin Med.* 2021; 10: 255.