

Problemy współczesnej terapii przeciwplateletowej

Problems of contemporary antiplatelet treatment

Anna Komosa, Andrzej Siniawski, Maciej Lesiak, Stefan Grajek

I Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

Post Kardiol Interw 2010; 6, 1 (19): 21-29

Słowa kluczowe: klopidogrel, oporność, płytki krwi

Key words: clopidogrel, resistance, platelets

Właściwości i funkcja płytek krwi

Płytki krwi spełniają zasadniczą rolę w powstawaniu zakrzepu (skrzepiny) w uszkodzonym naczyniu tętniczym. Pierwsze doniesienia naukowe o ich roli pojawiły się już 180 lat temu. W pracy Williama Oslera (znanego m.in. z prac na temat zapalenia wsierdza) pojawia się wzmianka o odkryciach Buchana, który w 1831 r. odnosił powstanie „skrzepów” do „ciałek niemających koloru”, czyli do płytek [1]. Osler w swojej publikacji dokładnie określił rolę płytek w układzie krzepnięcia i w tym też czasie powstało określenie „biały skrzep”, oznaczające skrzep złożony z płytek krwi, w odróżnieniu od „czerwonego skrzepu” złożonego przede wszystkim z fibryny. Upowszechnienie opinii o zasadniczym znaczeniu płytek w patologii tętnic wieńcowych nastąpiło jednak dopiero po 2000 r. Konsekwencją tych odkryć było docenienie znaczenia inhibitorów płytek krwi i wprowadzenie ich do praktyki klinicznej [2]. Włączenie tych leków do codziennego użytku doprowadziło z kolei do jeszcze lepszego poznania funkcji płytek krwi.

Przez wiele lat koncepcja działania płytek związana była jedynie ze znajomością receptora tkankowego (integryn α IIb β 3 lub GPIIb/IIIa). Ich funkcja oparta jest jednak na bardziej złożonych zasadach. Płytki nieaktywne krążące w strumieniu krwi mają kształt dysku. Ich „obojętność agregacyjna” jest utrzymywana przez krążące substancje będące antagonistami ich aktywacji. Substancje takie jak podtlenek azotu (NO) i prostacyklina PGI₂ są wydzielane przez zdrowe komórki endotelium w ilości wystarczającej do utrzymania równowagi dynamicznej płytek [3]. Wraz z zachwianiem tej równowagi, warunkującej „neutralność” adhezyjną płytek, przekształcają się one w formę trójwymiarową podobną do skręconych tworów kształtu gruszkowatego. Ta aktywacja odbywa się poprzez czynniki powierzchniowe w naczyniu,

doprowadzające do stymulacji receptorów, w których zachodzi konwersja dwufosforanu adenozy (ADP) w monofosforan adenozy (AMP). Dalsza reakcja odbywa się poprzez degradację AMP do adenozy, która dalej stymuluje płytki do ich agregacji. W procesie krzepnięcia istotną rolę spełniają także jony wapnia (Ca²⁺), szczególnie odkryty niedawno kanał wapniowy aktywowany przez receptor o nazwie STIM1-Orai1 (*Stromal Interaction Molecule and Orai 1* – kanał wpływu wapnia) [4]. Wydaje się, że kompleks tego receptora mieszczącego się w błonie komórkowej płytki jest regulatorem gospodarki aktywnego wapnia w komórce. Reakcja aktywacji i uruchomienia napływu wapnia jest wynikiem połączenia się agonisty z receptorem ADP płytek. Powoduje to podwyższenie aktywności fosfolipazy C, co doprowadza do powstania inozytolu-1,4,5-trojfosforanu (IP₃) aktywującego z kolei receptor IP₃R błony cytosomu (będącego rezerwuarem wapnia) znajdujący się wewnątrz płytki krwi. Otwarcie kanału Orai1 poprzez stymulację receptora IP₃R pomaga uzupełnić rezerwuuar wapnia znajdujący się w komórce. Aktywacja kanału Orai1 napływu wapnia jest bardzo istotna w procesie pobudzenia kompleksu GP VI ITAM (receptor kolagenowy) z pominięciem receptora trombinowego. Znaczenie receptora kolagenowego jest szczególnie ważne w powstawaniu skrzepin w tętnicach wieńcowych, cechujących się szybkim przepływem krwi. Wykazano, że w takim naczyniu, jeśli płytki nie mają kanału Orai1, nie dochodzi do powstawania zakrzepu trójwymiarowego (brak aktywacji kolagenu).

Terapia przeciwplateletowa w chorobie niedokrwiennej serca

Mimo że podstawą leczenia ostrych zespołów wieńcowych (OZW) jest rewaskularyzacja, leczenie przeciwplateto-

Adres do korespondencji/Corresponding author:

lek. Anna Komosa, I Klinika Kardiologii, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, ul. Długa 1/2, 61-848 Poznań, tel.: +48 607 033 327, e-mail: komosa.ania@gmail.com

Praca wpłynęła 12.11.2009, przyjęta do druku 25.01.2010.

we nadal odgrywa kluczową rolę w poprawie wyników klinicznych i w zapobieganiu powikłaniom niedokrwinnym. Obecnie zaleca się stosowanie podwójnej terapii przeciwplatekowej złożonej z kłopidogrelu i kwasu acetylosalicylowego (ASA) [5]. Niejednorodność odpowiedzi farmakologicznej na dawki leków przeciwplatekowych, w tym kłopidogrelu [6], nadal może być jednak przyczyną powikłań zakrzepowych, pogarszając istotnie rokowanie chorego [7]. Podstawowa dawka kłopidogrelu aż u 25% chorych nie hamuje aktywności agregacyjnej płytek. Co więcej, u dalszych 30% efekt supresji płytek jest wciąż niewystarczający [8]. Istnieje wiele doniesień na temat oporności płytek na działanie ASA. Problem ten nabiera dużego znaczenia, ponieważ przezskórne interwencje wieńcowe (PCI), będące podstawowym sposobem rewaskularyzacji, zwiększają aktywność układu krzepnięcia poprzez wywoływanie urazów w naczyniach wieńcowych i pozostawianie w nich ciał obcych, jakimi są stenty. Wprowadzenie stentów uwalniających leki antyproliferacyjne (DES), które opóźniają gojenie tych urazów i mogą wywoływać reakcje zapalne, wydłużyło okres, w którym istnieje ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowych, o miesiące lub nawet lata. Mimo pojawienia się DES nowej generacji, związanych przypuszczalnie z niskim ryzykiem powikłań niedokrwinnych [9], czas leczenia oraz dawkowanie leków przeciwplatekowych nie uległy zmianie.

Leczenie przeciwplatekowe niesie ze sobą niestety ryzyko powikłań krwotocznych. Badanie CHARISMA wykazało, że stosowanie podwójnej terapii złożonej z kłopidogrelu i ASA w dawkach, odpowiednio, 75 i 75–162 mg/dzień w porównaniu z samym ASA zwiększa znacznie ryzyko poważnego i umiarkowanego krwawienia w pierwszych kilku miesiącach leczenia (do 250.–270. dnia). W tym czasie przy stosowaniu tylko ASA ryzyko krwawienia jest niskie, po czym rośnie niezamiennie po 270. dniu [10].

O ile wystąpienie powikłań krwotocznych można łatwo odnieść do stosowanych leków, to ocena ich bezpośredniej roli w zapobieganiu zakrzepicy w stencie (ST) nie jest łatwa, ponieważ ST jest zjawiskiem bardzo złożonym. Na jej wystąpienie wpływa szereg czynników związanych z pacjentem oraz z techniką zabiegu stentowania. Do tych pierwszych należą: wskazania do PCI (choroba stabilna czy OZW), morfologia i lokalizacja zmiany, rozmiar naczynia wieńcowego, a także czynniki pozawieńcowe, takie jak upośledzona funkcja lewej komory, cukrzyca, czy wreszcie niewydolność nerek. Do czynników związanych z samym zabiegiem należą: rodzaj i liczba stentów, długość segmentu pokrytego stentem, właściwe przyleganie (apozycja) stentu do ściany naczynia i wiele innych. Nie ulega jednak wątpliwości, że właściwe leczenie przeciwplatekowe w sposób istotny zmniejsza ryzyko wystąpienia ST. Pierwsze zabiegi stentowania obarczone były niezwykle wysokim ryzykiem ST, przekraczającym 20% [11]. Przyczyną tak wysokiego odsetka powikłań była niewłaściwa technika implantacji oraz złe zabezpieczenie farmakologiczne.

Dzięki zastosowaniu ultrasonografii śródnaczyniowej (IVUS) okazało się, że stenty implantowane niskim ciśnieniem na balonie, którego rozmiar dobierany był tylko na podstawie angiografii, są zbyt słabo rozprężone i nie przylegają całkowicie do zmiany. Stwarzało to doskonałe warunki do miejscowego wykrzepiania, mimo intensywnej ogólnej antykoagulacji. Na podstawie badania IVUS Colombo i wsp. zaproponowali metodę optymalnego, wysokociśnieniowego wszczepiania stentów, przy jednoczesnej rezygnacji z doustnej antykoagulacji pochodnymi dikumarolu i uzyskali wyraźną redukcję liczby incydentów ST [11]. Konsekwencją tych doniesień była poprawa techniki stentowania oraz rutynowe stosowanie podwójnej terapii przeciwplatekowej, co pozwoliło zmniejszyć ryzyko ST do ok. 1% w badanej grupie.

Kłopidogrel

Kłopidogrel nieodwracalnie modyfikuje strukturę płytkowego receptora dla ADP o nazwie P2Y₁₂, bezpośrednio i swoiście hamując wiązanie ADP i hamując wywoływaną przez ADP aktywację kompleksu glikoprotein GP IIb/IIIa. Jest pochodną tienopirydynową drugiej generacji i do hamowania receptora wymaga konwersji proleku do aktywnego metabolitu za pośrednictwem cytochromu P450. W celu uzyskania szybkiego wysycenia aktywnym lekiem stosuje się dawkę nasycającą, która umożliwi szybkie hamowanie agregacji płytek [12]. W praktyce stosowane są dawki nasycające 300 mg i 600 mg, które wykazują szybsze i silniejsze hamowanie agregacji płytek w stosunku do dawki 75 mg. Badania wykazały, że dawka 900 mg nie wykazuje istotnie większej skuteczności niż dawka 600 mg, co związane jest prawdopodobnie z ograniczonymi możliwościami wchłaniania w jelitach [13]. Biodostępność, czyli szybkość i stopień wchłaniania leku, przekracza 50%, a jego okres półtrwania wynosi 7–8 godz. Kłopidogrel wiąże się z białkami osocza i tkanek w 94–98%, metabolizowany jest w wątrobie. Głównym produktem metabolizmu, stanowiącym 85% leku, jest pochodna kwasu węglowego, która nie wywiera wpływu na agregację płytek [14]. Z pozostałych 15% jedynie połowa leku zostanie przekształcona do postaci czynnej. Zahamowanie agregacji płytek następuje ok. 2 godz. po przyjęciu dawki nasycającej 600 mg. Dalsze przyjmowanie kłopidogrelu, w dawce 75 mg/dobę, hamuje agregację płytek indukowaną ADP i powoduje osiągnięcie stanu równowagi, który utrzymuje się 3–7 dni po zaprzestaniu podawania leku. W stanie równowagi średni poziom zahamowania czynności płytek wynosi od 40–60%. Zdolność agregacyjna płytek i czas krwawienia powracają do normy po ok. 5 dniach od zaprzestania leczenia, co związane jest z tworzeniem nowych płytek. W ciągu 5 dni od przyjęcia kłopidogrelu ok. 50% leku wydalana jest z moczem i w przybliżeniu – drugie tyle z kałem [15].

W badaniu z randomizacją CURE kłopidogrel dodany do ASA u pacjentów z OZW istotnie zmniejszył częstość występowania zgonu, zawału serca lub udaru mózgu. Ceną

był jednak wzrost liczby powikłań krwotocznych, szczególnie u pacjentów poddawanych leczeniu kardiochirurgicznemu. Mimo to ostateczna korzyść ze stosowania leku była tak duża, że stosowanie kłopidogrelu u pacjentów z OZW do dziś jest standardem postępowania nie tylko w ostrej fazie choroby, lecz także przez kolejne 12 miesięcy [16].

Problem oporności na kłopidogrel

Jedną z ważnych przyczyn występowania zdarzeń niedokrwiennych u pacjentów leczonych podwójną terapią przeciwplatekową może być niepełna skuteczność tych leków. Pierwsze doniesienia dokumentujące oporność na kłopidogrel pojawiły się na przełomie XX i XXI wieku [17]. Wraz z napływem nowych informacji zmieniało się jego dawkowanie. W latach 90. dawkę podtrzymującą kłopidogrelu ustalono na poziomie 75 mg. Odpowiadała ona dawce 250 mg tiklopidyny podawanej dwa razy dziennie. Dawki dobierano, kierując się nie tylko skutecznością, lecz także ryzykiem wystąpienia powikłań krwotocznych [18]. Szczegółowe obserwacje ujawniły jednak dużą różnorodność indywidualnej odpowiedzi pacjentów na tę samą dawkę leku. Badania aktywności płytek metodą VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*), służącą do selektywnej oceny receptora P2Y₁₂, wykazały, że dawka podtrzymująca kłopidogrelu 150 mg na dzień, po dawce nasycającej (300–600 mg) często pozwala na uniknięcie niepełnego efektu terapeutycznego w porównaniu z dawką 75 mg [19]. Obecnie zarówno europejskie, jak i amerykańskie towarzystwa kardiologiczne zalecają u pacjentów wysokiego ryzyka oznaczenie oporności płytek na kłopidogrel i w razie jej stwierdzenia – podwojenie dawki leku [20]. Występowanie oporności płytek na kłopidogrel, w zależności od definicji i metody badania, opisuje się u 5–45% leczonych [21]. Oporność definiowana jest jako upośledzona reakcja płytek na kłopidogrel, co skutkuje ich dalszą zdolnością do agregacji [22]. Za kryterium oporności przyjęto hamowanie zdolności agregacyjnej nie więcej niż 10% płytek.

Do wystąpienia zjawiska oporności na kłopidogrel mogą się przyczynić następujące czynniki:

- 1) zła współpraca pacjenta z lekarzem [23],
- 2) opóźnienie absorpcji z przewodu pokarmowego i wpływ innych czynników na biodostępność leku [24],
- 3) niejednorodny proces metabolizowania leku (proleku) w wątrobie przez cytochrom P450 [25],
- 4) interakcja z innymi lekami,
- 5) wysoki wewnętrzny poziom aktywności płytek, niepodlegający się hamowaniu (uwarunkowanie genetyczne, tzw. *intrinsic activity*) [26],
- 6) interakcje z układem immunologicznym chorego (infekcja, choroby nowotworowe i in.) [27].

Ad 1. Zła współpraca pacjenta z lekarzem często wpływa na wyniki leczenia. Najczęściej polega ona na zaprzestaniu przyjmowania lub zmniejszeniu dawkowa-

nia leku. Uświadomienie choremu jego kluczowej roli w osiągnięciu sukcesu terapeutycznego jest zatem niestychanie ważne.

Ad 2. Zróżnicowana dostępność biologiczna kłopidogrelu może mieć duży wpływ na efektywność leczenia. Porównanie parametrów koncentracji niezmiennego kłopidogrelu po podaniu dużej dawki nasycającej u osób zdrowych oraz pacjentów z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST (STEMI) wykazało, że u tych drugich jego stężenie było znacznie niższe [28]. Może to świadczyć o tym, że u chorych ze zmniejszonym rzutem serca, znacznie pobudzonym układem współczulnym i wynikającą z tego wazokonstrykcją naczyń układu trawienno, wchłanianie jest znacznie gorsze niż u osób zdrowych lub ze stabilną postacią choroby niedokrwiennej serca. Efekt ten można też wyjaśnić działaniem peptydu natriuretycznego (ANP) wydzielanego w odpowiedzi na podwyższone ośrodkowe ciśnienie żyłne [29]. Ponadto u chorych „niestabilnych” obserwuje się opóźnienie czasu, jaki upływa od podania leku do uzyskania jego maksymalnej koncentracji. Heetermans i wsp. udowodnili, że stosunek nieaktywnej formy leku (karboksylowej) do postaci aktywnej (tiolowej) jest taki sam u chorych ze STEMI jak w grupie kontrolnej. Świadczy to o tym, że tempo przemiany jednej formy w drugą przebiega w obu grupach podobnie, co jest ważne, ponieważ hamowanie aktywności agregacyjnej płytek jest proporcjonalne do stężenia postaci aktywnej leku [13].

Do innych czynników zmniejszających biodostępność leku należą otyłość i cukrzyca [30]. Związek między otyłością a opornością na kłopidogrel jest złożony. Oprócz oczywistego faktu, jakim jest względnie mała dawka leku w stosunku do masy ciała, istnieje koncepcja mówiąca o roli przewlekłego procesu zapalnego u osób otyłych. Komórki tłuszczowe produkują leptynę, dla której zidentyfikowano receptory na płytkach. Ponadto substancje zwane endokannabinoidami, odgrywające rolę w regulacji masy ciała, są również aktywatorami płytek. Sama otyłość wpływa zatem na ich zwiększoną reaktywność, a w konsekwencji zmniejszoną odpowiedź na terapię przeciwplatekową. Z kolei u cukrzyków za zwiększoną oporność płytek na kłopidogrel może odpowiadać zwiększone stężenie fibrynogenu we krwi [31]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na działanie leku jest nikotynizm. Zwiększona dawka kłopidogrelu oceniana w badaniu CURRENT OASIS-7 zmniejszyła istotnie pierwszorzędowny punkt końcowy u palaczy, podczas gdy u osób niepalących nie wpływała na wystąpienie powikłań niedokrwienych [32]. Mechanizm synergicznego wpływu palenia tytoniu na zahamowanie aktywności płytek nie został jeszcze do końca poznany [33].

Ad 3. Główną rolę w metabolizmie kłopidogrelu odgrywa cytochrom P450. Początkowo niepełną skuteczność kłopidogrelu odnoszono do odmian genetycznych receptora P2Y₁₂. Badania przeprowadzone przez Fontana i wsp. [34] ujawniły występowanie odmiany tego receptora, która nie reagowała na kłopidogrel. Konsekwencją tych donie-

sień było postawienie hipotezy, iż w populacji ludzkiej odmiana ta może występować powszechnie. Miało to tłumaczyć zjawisko niepełnej skuteczności leku. Dalsze prace wykluczyły jednak powszechność odmian genetycznych w takim zakresie [35]. W ostatnim czasie badania skupiły się na poszukiwaniu polimorfizmu cytochromu P450. Wykazano, że odmiany niekonwertujące proleku do formy aktywnej mogą być przyczyną indywidualnych różnic w odpowiedzi farmakologicznej płytek. Klopido-grel jest nieaktywną formą leku, którego aktywacja jest dwustopniowa i wymaga oksydacji cytochromu wątrobowego P450, który generuje postać „tiol”. Ta właśnie postać leku jest zdolna do nieodwracalnego blokowania dwufosfatazy adenozyliny – receptora tkankowego płytek krwi – P2Y₁₂ [36]. Wyróżnia się kilka izoenzymów cytochromu P450 biorących udział w dwustopniowej drodze przemiany klopido-grelu do formy „tiol” warunkującej pełną aktywność leku. Są to enzymy oznaczone symbolami 2C19, 3A4/5, 1A2, 2B6, i 2C9 [37]. Ta różnorodność, wynikająca z różnic genetycznych, jest odpowiedzialna za upośledzenie przekształcania proleku w formę aktywną [38]. Tak więc upośledzenie odpowiedzi na klopido-grel może mieć podłoże genetyczne związane głównie ze zmiennością allele 2* (CYP-2C19*2) [39]. W badaniu EXCELSIOR (*Impact of Extent of Clopidogrel Induced Platelet Inhibition During Elective Stent Implantation on Clinical Event Rate*) wykazano, że niekorzystna odmiana genetyczna cytochromu wątrobowego P450 może być odpowiedzialna nawet za 6-krotnie większe ryzyko ST w ciągu 30 dni od implantacji stentu u pacjentów przyjmujących klopido-grel. Kolejne publikacje donoszą o 3-krotnie większym ryzyku ponownego zawału serca lub śmierci w ciągu pierwszego roku od elektywnego wszczepienia stentu [39].

Ad 4. Interakcja klopido-grelu z innymi lekami może być zarówno dodatnia (addycja), gdy działanie dwóch leków ulega zwielokrotnieniu, jak i ujemna, w przypadku wzajemnego hamowania się dwóch substancji. Stosowanie inhibitorów pompy protonowej wykorzystujących także cytochrom P450 (oraz jego izoenzymy CYP-2C19 i CYP-3A4) do swojej aktywacji wykazuje ujemną interakcję z klopido-grelem [40]. Leki te, działając w sposób konkurencyjny do klopido-grelu, powodują obniżenie jego aktywności [41]. Do najczęściej stosowanych zalicza się omeprazol [42], który znacząco obniża skuteczność działania klopido-grelu. Inny lek z tej grupy – pantoprazol [43] – nie hamuje jednak aktywności enzymu CYP-2C19, nie wchodząc przez to w interakcję z klopido-grelem. Obecnie u chorych przewlekłe przyjmujących leki przeciwplatekowe o wysokim ryzyku występowania krwawień z przewodu pokarmowego zaleca się stosowanie właśnie pantoprazolu. Prezentowana na kongresie Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego analiza badania TRITON-TIMI 38 wykazała jednak, że interakcja klopido-grelu z inhibitorami pompy protonowej nie ma istotnych konsekwencji klinicznych [44]. Kilka lat temu pojawiły się też doniesienia o możliwości niekorzystnej interakcji klopido-grelu ze statynami [45]. Kolejne

prace badające wpływ jednoczesnego stosowania klopido-grelu i statyn wykazały jednak obojętność tych dwóch grup leków na wzajemne działanie lub co najwyżej – brak statystycznie znamiennej interakcji [46]. Wyniki międzynarodowego rejestru GRACE (*Global Registry of Acute Coronary Events*) sugerują nawet synergistyczne działanie statyn i klopido-grelu u chorych z OZW bez uniesienia odcinka ST [47]. Pojawiły się również informacje o możliwości niekorzystnej interakcji klopido-grelu z antagonistami kanału wapniowego z grupy pochodnych dihydropirydyny. Leki te także metabolizowane są z udziałem enzymu CYP-3A4, co stwarza możliwość interakcji z klopido-grelem i może zmniejszać skuteczność działania przeciwplatekowego [48].

Ad 5. Jest to najmniej poznany obszar wiedzy na temat funkcji płytek krwi. Na mechanizm ten może się składać zwiększony poziom uwalnianego ADP lub polimorfizm genu receptora platekowego P2Y₁₂ [49]. Nie wydaje się jednak, że jest to istotny mechanizm powstawania zjawiska oporności.

Ad 6. Znaczenie czynnika infekcyjnego w inicjacji i akceleracji procesu krzepnięcia nie jest dokładnie poznane. Wiadomo, że reakcje prowadzące do powstania zakrzepu mogą być indukowane przez czynnik zapalny [50]. Ligandy pokrewne do czynnika martwicy nowotworu (*tumor necrosis factor*, TNF), takie jak CD40, w odpowiedzi na czynnik infekcyjny aktywują płytki swoistą ścieżką. Mimo że droga ta jest także blokowana przez klopido-grel [51], staje się ona dodatkowym czynnikiem wzmacniającym agregację płytek. Można więc wnioskować, że nie należy ignorować infekcji u pacjenta w okresie planowego zabiegu PCI.

Nowe leki przeciwplatekowe

Prasugrel

Prasugrel jest tienopirydyną nowej generacji blokującą receptor P2Y₁₂ [52], różniącą się od klopido-grelu jednoetapowym procesem aktywacji w wątrobie. Aktywny metabolit prasugrelu powstaje szybciej i w wyższych stężeniach w porównaniu z klopido-grelem, co poprawia szybkość i skuteczność działania przeciwplatekowego [53]. Prasugrel ulega najpierw hydrolizie z udziałem esteraz, a następnie jest metabolizowany z udziałem jelitowych i wątrobowych enzymów cytochromu P450, które formują aktywną postać leku. Czynną postać leku można wykryć już po 15 min od jego podania, a maksymalne stężenie we krwi osiąga już po 30 min. Dotychczasowe badania przedkliniczne i kliniczne wskazują na szybsze i skuteczniejsze działanie antyagregacyjne prasugrelu oraz mniejsze zróżnicowanie wrażliwości chorych na jego działanie w porównaniu z klopido-grelem [54]. Dawka nasycająca leku wynosi 60 mg, a podtrzymująca 10 mg, stosowana raz dziennie. Większą skuteczność prasugrelu w stosunku do klopido-grelu wykazało badanie TRITON-TIMI 38 [55]. Analiza wyników leczenia prasugrelem 13 608 pacjentów z OZW poddawanych przezskórnym interwencjom wieńcowym wykazała staty-

stycznie znamienne zmniejszenie ryzyka śmierci sercowo-naczyniowej, zawału serca lub udaru mózgu w porównaniu z kłopidogrelem. Chorzy otrzymujący prasugrel mieli jednak zwiększone ryzyko krwawienia. Szczególnie narażeni byli pacjenci, którzy przebyli udar lub przemijające niedokrwienie mózgu, osoby powyżej 75. roku życia oraz z niską masą ciała (< 60 kg). W innym badaniu grupy 110 chorych na cukrzycę i z upośledzoną odpowiedzią na leczenie przeciwplatekowe, randomizowanych do leczenia kłopidogrelem lub prasugrelem, wykazano znacznie niższy odsetek oporności na prasugrel w dawce nasycającej 60 mg i podtrzymującej 10 mg niż w grupie otrzymujących odpowiednio 600 i 75 mg kłopidogrelu. W obu grupach stosowano podobne dawki ASA [56]. Lek od niedawna dostępny jest na polskim rynku. Wydaje się, że znajdzie on swoje zastosowanie przede wszystkim u pacjentów z podejrzeniem oporności na kłopidogrel, na przykład w przypadku wystąpienia zakrzepicy w stencie lub innych zdarzeń niedokrwiennych pomimo podwójnej terapii przeciwplatekowej. Inną grupą, która odniesie korzyść ze stosowania prasugrelu, będą z pewnością pacjenci z zawałem serca z uniesieniem odcinka ST. W tej grupie chorych nie należy się spodziewać zwiększonego ryzyka powikłań krwotocznych, co wynika z faktu, że rzadko są oni leczeni kardiologicznie. Ze względu na szybkość działania prasugrel jest też dobrym lekiem do podania tuż po koronarografii u pacjentów wymagających interwencji przezskórnej, którym nie podano wcześniej tienopirydyn.

Tikagrelor

Nieustannie podejmowane są wysiłki w celu stworzenia idealnego leku przeciwplatekowego, który z jednej strony zmniejszałby występowanie powikłań niedokrwiennych w przebiegu OZW, a z drugiej nie zwiększałby ryzyka powikłań krwotocznych. Lekiem przeciwplatekowym nowej generacji jest tikagrelor, który charakteryzuje się prostym torem metabolicznym. W odróżnieniu od kłopidogrelu i prasugrelu nie ma on formy proleku, a więc działa bezpośrednio. Nie wymaga konwersji w wątrobie z udziałem enzymów cytochromu P450, a więc omija problem pasażu wątrobowego i interakcji z innymi lekami. Przejawia szybsze i silniejsze działanie w stosunku do poprzedników [57]. Stopień hamowania aktywności płytek jest proporcjonalny do stężenia leku w osoczu. Dzięki tym właściwościom wydaj się, że problem różnorodności osobniczej odpowiedzi na lek nie będzie odgrywał większej roli. Co ważne, lek ten blokuje płytkowy receptor P2Y₁₂ w sposób odwracalny i po kilkunastu godzinach od ostatniej dawki czynność płytek wraca do normy.

Tikagrelor stosuje się w dawce nasycającej 180 mg, a następnie kontynuuje się terapię podtrzymującą – 90 mg w dwóch dawkach podzielonych. Krótki czas działania stwarza szansę dla pacjentów, którzy mają zostać poddani leczeniu kardiologicznemu, ponieważ podawanie tikagreloru wystarczy przerwać na 12 godz. przed operacją

[58]. Jest to ważna zaleta, której nie mają dwa wcześniej omawiane leki, przez co ich stosowanie w sposób istotny zwiększa ryzyko krwawień okołoperacyjnych. Niestety, tikagrelor wykazuje szereg działań ubocznych, takich jak: duszność, zahamowania zatokowe, wzrost poziomu kreatyniny i kwasu moczowego [59]. Nie wiadomo też, jaka będzie tolerancja leku przy dłuższym jego stosowaniu.

W opublikowanych badaniach oceniających działanie leków przeciwplatekowych (CURE, TRITON-TIMI 38) wykazano, że nowe leki zmniejszają istotnie ryzyko powikłań niedokrwiennych, jednakże za cenę zwiększenia ryzyka powikłań krwotocznych. W niedawno opublikowanym badaniu PLATO zastosowanie tikagrelolu u pacjentów z OZW zarówno z uniesieniem, jak i bez przetrwałego uniesienia odcinka ST, w porównaniu z kłopidogrelem wiązało się z 16-procentową, istotną względną redukcją ryzyka wystąpienia pierwszorzędnego punktu końcowego, jakim był zgon z przyczyn sercowo-naczyniowych, zawał serca lub udar mózgu. W przeciwieństwie jednak do wcześniej cytowanych badań, ten korzystny efekt nie wiązał się ze wzrostem ryzyka wystąpienia poważnych krwawień, zwłaszcza związanych z interwencją kardiologiczną. To korzystne działanie leku, zapobiegające epizodom niedokrwienym bez jednoczesnego zwiększania ryzyka powikłań krwotocznych, zaowocowało istotną poprawą przeżycia pacjentów w grupie leczonej tikagrelem (częstość zgonów z jakiegokolwiek przyczyny wyniosła w tej grupie 4,5%, a w grupie leczonej kłopidogrelem 5,9%). Żadne z dotychczasowych badań porównujących dwa leki przeciwplatekowe nie wykazało istotnej redukcji śmiertelności ogólnej, jednak siła badania PLATO w stosunku do tego punktu końcowego nie pozwala wykluczyć roli przypadku. Trzeba też dodać, że w badaniu tym kłopidogrel stosowano w dawce nasycającej 300 mg, co nie jest zgodne z aktualnymi zaleceniami, które mówią, że u pacjentów z OZW poddawanych PCI dawka nasycająca kłopidogrelu powinna wynosić 600 mg.

Metody monitorowania efektów antyagregacyjnych leków przeciwplatekowych

Obecnie istnieje wiele metod oznaczania skuteczności blokowania funkcji płytek krwi przez leki przeciwplatekowe. Obok złożonych urządzeń wykonujących skomplikowane i drogie testy laboratoryjne pojawiły się proste aparaty do tzw. zastosowania przyłożkowego. Niestety mnogość testów, brak standaryzacji oraz ściśle określonych norm znacznie utrudnia interpretację badań dotyczących oporności płytek na leki. Poniżej przedstawiono krótki przegląd niektórych z dostępnych metod.

Agregometria oparta na transmisji światła widzialnego

Metoda agregometrii opartej na transmisji światła widzialnego (ang. *light transmission aggregometry*, LTA)

została opracowana w 1960 r. i jest wykorzystywana do diagnozowania zarówno nabytych, jak i wrodzonych defektów płytek. Do dziś pozostaje ona tzw. złotym standardem badania ich funkcji [60]. Agregację płytek ocenia się ilościowo, mierząc transmisję promienia świetlnego przechodzącego przez ich zawiesinę. Zjawisko to jest proporcjonalne do gęstości zaktywowanych płytek w agregometrze. W badaniach klinicznych agregację płytek bada się z użyciem bogatego w płytki osocza z cytrynianem (cPRP). Krew jest gromadzona w probówkach z cytrynianem sodu i odwirowywana przez 15 min w temperaturze pokojowej [61]. Metoda ta jest dokładna, jednak czasochłonna i powinna być stosowana jedynie w specjalistycznych laboratoriach.

VerifyNow™ – RPFA

VerifyNow™ – RPFA (*ultegra rapid platelet function assay*) (Accumetrics Inc., San Diego, CA) jest w dużej części zautomatyzowanym aparatem, który wykorzystuje próbki pełnej krwi do pomiaru odpowiedzi płytek na leki przeciwplatekowe. Aparat mierzy aglutynację płytek stymulowanych przez agonistę, opłaszczonych fibrynogenem w próbkach pełnej krwi z cytrynianem. Gdy aktywne płytki wiążą się z fibrynogenem i rozpraszają w roztworze, następuje zmiana w transmisji świetlnej. Ta zmiana jest rejestrowana w jednostkach agregacji płytek (PAU) [62]. Metoda ta jest wygodna ze względu na łatwość obsługi aparatu, szybkość wykonania pomiarów (kilka minut) oraz dużą swoistość wyników, które w badaniu agregacji indukowanej ADP jakościowo przewyższają LTA.

PFA-100®

Aparat PFA-100® (Dade-Behring, Deerfield, IL) został wprowadzony jako alternatywa dla mierzenia czasu krwawienia w ocenie dysfunkcji płytek [63]. Próbki pełnej krwi z cytrynianem są umieszczane w jednorazowych kuwetach zawierających PFA-100. Dalej trafiają do próżni, gdzie podlegają znacznym siłom ścinającym z użyciem membrany zawierającej kolagen i ADP lub kolagen i epinefrynę. W momencie, w którym płytki zaczopują membranę, przepływ ustaje i zostaje osiągnięty tzw. czas zamknięcia (*closure time*, CT). Wyniki rejestrowane są w sekundach. W porównaniu z innymi aparatami mierzącymi funkcję płytek, każde laboratorium używające PFA-100® musi ustalić wartości wyjściowe i zakresy norm w zdrowej grupie kontrolnej. Aparat PFA-100® cechuje się brakiem czułości w stosunku do łagodnych wrodzonych oraz indukowanych lekami defektów płytek. Nie jest też najlepszą metodą oceny oporności płytek na klopidogrel, ponieważ na wynik tego badania wpływa wiele czynników dodatkowych, takich jak: liczba płytek, reakcja płytek na kolagen, krwinki czerwone, czynnik von Villebranda i inne. Dlatego też PFA-100® nie jest polecany do monitorowania skuteczności terapii przeciwplatekowej [64].

Multiplate®

Multiplate® analizuje funkcję płytek z wykorzystaniem zasad agregometrii impedancyjnej. Płytki ściśle przylegają do metalowych elektrod, co prowadzi do zmiany przewodnictwa (oporności), które jest rejestrowane w sposób ciągły [65]. Rozcieńczenie próbki oraz hematokryt wpływają na wyniki oznaczenia jedynie w niewielkim stopniu [66]. Do aktywacji płytek wykorzystuje się ADP lub kolagen. Krew pełną pobiera się do probówek z cytrynianem, a następnie rozcieńcza solą fizjologiczną i po dodaniu testów zawierających aktywatory płytek poddaje analizie [67]. Metoda ta jest wygodna ze względu na prostotę, niski koszt i niewielką ilość krwi potrzebną do jej wykonania.

Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa jest wygodną techniką diagnostyczną pozwalającą na szybki pomiar liczby komórek podczas ich liniowego przepływu w komorze pomiarowej. Strumień komórek przepływa przed układami rejestrującymi (fotokomórkami lub fotopowielaczami), w których pojedyncze komórki są oświetlane przez cienkie wiązki spolaryzowanego światła lasera. Komórki rozpraszają, załamują, odbijają i absorbują światło przechodzące przez komorę pomiarową, powodując chwilowe zmiany sygnału elektrycznego w elementach rejestrujących [68]. Metoda umożliwia pomiar aktywności płytek *in vitro* oraz ocenę interakcji między płytkami i leukocytami. Umożliwia także wykrywanie zarówno nabytych, jak i wrodzonych defektów płytkowych oraz kontrolę terapii przeciwplatekowej [69].

Podsumowanie

Nadal wiele pytań dotyczących oporności na leki przeciwplatekowe pozostaje bez odpowiedzi. Przede wszystkim nie wiemy, czy zjawisko oporności na leki przeciwplatekowe niesie ze sobą poważne konsekwencje kliniczne. Inaczej mówiąc, czy oporność jest zjawiskiem klinicznym czy tylko laboratoryjnym. Istnieje szereg prac wskazujących, że zbyt duża aktywność płytek przekłada się niekorzystnie na częstość zdarzeń sercowo-naczyniowych [70–72]. W niedawno opublikowanym badaniu wykazano, że osłabiona odpowiedź na klopidogrel koreluje z istotnie większym ryzykiem wystąpienia zakrzepicy w stencie w ciągu pierwszych 30 dni po PCI [73]. Te i inne doniesienia jasno wskazują na korelację między opornością na leki a rokowaniem pacjentów z chorobą niedokrwienną serca stosujących podwójną terapię przeciwplatekową. Niemniej jednak faktem jest, że nie u każdego pacjenta, u którego laboratoryjnie wykryto zbyt słabą blokadę płytek, dojdzie do powikłań niedokrwiennych. Nie mamy też żadnej pewności, że próba przełamania oporności poprzez zwiększenie dawki leku, zastąpienie go innym lub dodanie trzeciego (np. cilostazol) przyniesie korzystny efekt kliniczny, nie wspominając już o większym ryzyku powikłań krwotocznych. Nie znamy na przykład wartości progowej, poniżej

której blokada płytek nie będzie już bezpieczna. W ostatnim czasie pojawiają się publikacje podważające wiarygodność jednorazowego pomiaru oporności na leki. Pojedynczy pomiar powinien być zastąpiony seryjnymi badaniami wykonywanymi jeszcze podczas pobytu chorego w szpitalu. Być może koniecznością stanie się indywidualne ustalanie dawki leku dostosowanej do pacjenta, a także określenie okna terapeutycznego, tj. poziomu leku, który skutecznie zmniejszałby ryzyko epizodów niedokrwiennych (np. zakrzepicy w stencie), nie zwiększając ryzyka wystąpienia powikłań krwotocznych [74]. Opisanie powyżej testy laboratoryjne mają jedną wspólną wadę: żaden z nich nie bada w całości skomplikowanej biologii płytek krwi. Brak standaryzacji oraz jednolitych norm dodatkowo utrudniają obiektywną ocenę korelacji wyników badań ze zdarzeniami klinicznymi. Te i inne wątpliwości skutkują tym, że dotychczas zarówno europejskie, jak i amerykańskie towarzystwa kardiologiczne nie zalecają rutynowego oznaczania aktywności płytek krwi u pacjentów przyjmujących leki przeciwplatekowe.

Piśmiennictwo

- Osler W. On certain problems in the physiology of the blood corpuscles. *The Medical News* 1886; 48: 421-425.
- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8: 1227-1234.
- Bhatt DL. Intensifying platelet inhibition – navigating between scylla and charybdis. *N Engl J Med* 2007; 20: 2078-2081.
- Authi KS. Orail: a channel to safer antithrombotic therapy. *Blood* 2009; 113: 1872.
- Smith SC Jr, Feldman TE, Hirshfeld JW Jr i wsp. ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 216-235.
- Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB i wsp. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 246-251.
- Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC i wsp. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 2007; 154: 221-231.
- Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL i wsp. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003; 107: 2908-2913.
- Stone GW, Midei M, Newman W i wsp. Randomized comparison of everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents: two-year clinical follow-up from the Clinical Evaluation of the Xience V Everolimus Eluting Coronary Stent System in the Treatment of Patients with de novo Native Coronary Artery Lesions (SPIRIT) III trial. *Circulation* 2009; 119: 680-686.
- Bhatt DL, Fox KA, Hacke W i wsp. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 2006; 354: 1706-1717.
- Colombo A, Hall P, Nakamura S i wsp. Intracoronary stenting without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance. *Circulation* 1995; 91: 1676-1688.
- Montalescot G, Sideris G, Meuleman C i wsp. A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 931-938.
- Von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G i wsp. Absorption, metabolism and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effects) Trial. *Circulation* 2005; 112: 2946-2950.
- Husted S, Emanuelsson H, Heptinstall S i wsp. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y12 antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin. *Eur Heart J* 2006; 27: 1038-1047.
- Steinhubl S, Roe MT. Optimizing platelet P2Y12 inhibition for patients undergoing PCI. *Cardiovasc Drug Rev* 2007; 25: 188-203.
- Yusuf S, Zhao F, Mehta SR i wsp. 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.
- Müller I, Besta F, Schulz C i wsp. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003; 89: 783-787.
- Boneu B, Destelle G. Platelet anti-aggregating activity and tolerance of clopidogrel in atherosclerotic patients. *Thromb Haemost* 1996; 76: 939-943.
- Schwarz UR, Geiger J, Walter U i wsp. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets: definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1145-1152.
- Braunwald E, Antman EM, Beasley JW i wsp. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 970-1062.
- Mason PJ, Jacobs AK, Freedman JE. Aspirin resistance and atherothrombotic disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 986-993.
- Wiviott SD, Antman EM. Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast-moving story. *Circulation* 2004; 109: 3064-3067.
- Serebruany VL, Oshrine BR, Malinin AI i wsp. Noncompliance in cardiovascular clinical trials. *Am Heart J* 2005; 150: 882-886.
- Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S i wsp. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost* 2004; 92: 311-316.
- Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E i wsp. Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1895-1900.
- Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL i wsp. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003; 107: 2908-2913.
- Thornburg CD, Smith PB, Smithwick ML i wsp. Association between thrombosis and bloodstream infection in neonates with peripherally inserted catheters. *Thrombosis Research* 2008; 122: 782-785.
- Heestermaans AACM, Van Werkum J, Taubert D i wsp. Impaired bioavailability of clopidogrel in patients with a ST-segment

- elevation myocardial infarction. *Thrombosis Research* 2008; 122: 776-781.
29. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; 339: 321-328.
 30. Feher G, Koltai K, Alkonyi B i wsp. Clopidogrel resistance: role of body mass and concomitant medications. *Int J Cardiol* 2007; 120: 188-192.
 31. Bhatt DL. What makes platelets angry. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 131060-131061.
 32. Mehta SR, on behalf of CURRENT investigators. Kongres Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego, ASC, Barcelona 2009.
 33. Mirkhel A, Shenkman B, Guetta V i wsp. Frequency of aspirin resistance in a community hospital. *Am J Cardiol* 2006; 98: 577-579.
 34. Fontana P, Dupont A, Gandrille S i wsp. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003; 26: 989-995.
 35. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E i wsp. Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2005; 116: 491-497.
 36. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF i wsp. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2000; 84: 891-896.
 37. Brandt JT, Close SL, Iturria SJ i wsp. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2429-2436.
 38. Hulot JS, Bura A, Villard E i wsp. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006; 108: 2244-2247.
 39. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF i wsp. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 1925-1934.
 40. Gilard M, Arnaud B, Cornily JC i wsp. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole Clopidogrel Aspirin) study. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 256-260.
 41. Lau WC, Gurbel PA. The drug-drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ* 2009; 180: 699-700.
 42. Li XQ, Andersson TB, Ahlström M, Weidolf L. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* 2004; 32: 821-827.
 43. Juurlink DN, Gomez T, Ko DT. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ* 2009; 180: 713-718.
 44. O'Donoghue M. The risk of cardiovascular events for patients treated with clopidogrel or prasugrel in combination of a proton pump inhibitor. Results from the TRITON-TIMI 38 Trial.
 45. Lau WC, Waskell LA, Watkins PB i wsp. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 2003; 107: 32-37.
 46. Steinhilb SR, Akers WS. Clopidogrel-statin interaction: a mountain or a mole hill? *Am Heart J* 2006; 152: 200-203.
 47. Lim MJ, Spencer FA, Gore JM i wsp. Impact of combined pharmacologic treatment with clopidogrel and a statin on outcomes of patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: perspectives from a large multinational registry. *Eur Heart J* 2005; 26: 1063-1069.
 48. Siller-Matula JM, Lang I, Christ G i wsp. Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1557-1563.
 49. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006; 27: 647-654.
 50. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M i wsp. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-594.
 51. Hermann A, Rauch BH, Braun M i wsp. Platelet CD40 ligand (CD40L) – subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 2001; 12: 74-82.
 52. Husted S. New developments in oral antiplatelet. *Eur Heart J* 2007; 9 (Suppl.): D20-D27.
 53. Jernberg T, Payne CD, Winters KJ i wsp. Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and lower rate of nonresponders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2006; 27: 1166-1173.
 54. Jakubowski J, Winters K, Naganuma H i wsp. Prasugrel: a novel thienopyridine antiplatelet agent. A review of preclinical and clinical studies and the mechanistic basis for its distinct antiplatelet profile. *Cardiovasc Drug Rev* 2007; 25: 357-374.
 55. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH i wsp. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007; 357: 2001-2015.
 56. Erlinge D, Varenhorst C, Braun OO i wsp. Patients with poor responsiveness to thienopyridine treatment or with diabetes have lower levels of circulating active metabolite but their platelets respond normally to active metabolite ex vivo. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1968-1977.
 57. Owen RT, Serradell N, Bolos J. AZD6140. *Drugs Future* 2007; 32: 845-853.
 58. Cannon CP, Husted S, Harrington RA i wsp. Safety, tolerability, and initial efficacy of AZD6140, the first reversible oral adenosine diphosphate receptor antagonist, compared with clopidogrel, in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: primary results of the DISPERSE-2 trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1844-1851.
 59. Wallentin L, Becker RC, Budaj A i wsp. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009; 361: 1045-1057.
 60. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-929.
 61. Cazenave JP, Hemmendinger S, Beretz A i wsp. Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study. *Methodology. Ann Biol Clin* 1983; 41: 167-179.
 62. Steinhilb SR. The VerifyNow system. W: Michelson AD (red.). *Platelets*. 2nd ed. Burlington, MA, Elsevier 2007; 509-518.
 63. Francis JL. The platelet function analyzer (PFA)-100. W: Michelson AD (red.). *Platelets*. 2nd ed. Burlington, MA, Elsevier 2007; 519-534.
 64. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 230-237.
 65. Mueller T, Dieplinger B, Poelz W i wsp. Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate analyzer – comparison with two flow cytometric methods. *Thromb Res* 2007; 121: 249-258.

66. Tóth O, Calatzis A, Penz S i wsp. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006; 96: 781-788.
67. Calatzis A, Wittwer M, Krueger B. A new approach to platelet function analysis in whole blood – the multiplate analyzer. *Platelets* 2004; 15: 485-486.
68. Loken MR. Immunofluorescence techniques in flow cytometry and sorting. 2nd ed. Wiley, 1990; 341-353.
69. Freilinger AL III, Furman MI, Linden MD i wsp. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700 patient study of aspirin resistance. *Circulation* 2006; 113: 2888-2896.
70. Gurbel PA, Bliden KP, Samara W i wsp. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1827-1832.
71. Hochholzer W, Trenk D, Bestehorn HP i wsp. Impact of the degree of peri-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1742-1750.
72. Huczek Z, Filipiak KJ, Kochman J i wsp. Baseline platelet reactivity in acute myocardial infarction treated with primary angioplasty – influence on myocardial reperfusion, left ventricular performance, and clinical events. *Am Heart J* 2007; 154: 62-70.
73. Sibbing D, Braun S, Jawansky S i wsp. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 849-856.
74. Mahla E, Antonino MJ, Tantry US. Point-of-care platelet function analysis. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 857-859.