

POLYMORFIZMY KREVNÍCH DESTIČEK A MOŽNOSTI MONITORACE ÚČINKU PROTIDESTIČKOVÉ LÉČBY

Jan Kvasnička¹, Jaroslava Hájková¹, Petra Bobčíková¹, Petra Křížová¹, Daniela Dušková², Poletínová Šárka², Kieferová Veronika²

¹Trombotické centrum Všeobecné fakultní nemocnice, Praha

²Fakultní transfuzní oddělení Všeobecné fakultní nemocnice, Praha

Cílem naší studie bylo zjistit prevalenci destičkových polymorfizmů, které jsou spojovány s „aspirinovou rezistencí“ či s variabilitou odpovědi na léčbu clopidogrelem v české populaci.

Metody: Ke zjištění frekvence polymorfizmů GP IIIa (HPA-1; rs5918), P2Y₁₂ (H1/H2 haplotyp; rs2046934) and COX-1 (-842A/G; rs10306114) bylo provedeno anonymní testování DNA od 1 450 dárců krve pomocí PCR na analyzátoru Light Cycler 480 (ROCHE).

Výsledky: Byly zjištěny tyto frekvence: GP IIIa (HPA-1) – 27,40 % heterozygotů, 3,66 % homozygotů a 68,94 % wild type homozygotů, P2Y₁₂ (H1/H2 haplotyp) – 25,92 % heterozygotů, 2,63 % homozygotů a 71,46 % wild type homozygotů a COX-1 (-842A/G) – 12,00 % heterozygotů, 0,41 % homozygotů a 87,59 % wild type homozygotů v testované skupině. Tyto frekvence jsou tedy v souladu s odhadovanou 10–40 % variabilitou účinku protidestičkové léčby.

Dále je uveden přehled o významu laboratorních vyšetření pro rutinní monitorování protidestičkové léčby.

Klíčová slova: rezistence na léčbu, polymorfizmy destiček, frekvence, funkce destiček, laboratorní testy.

PLATELET POLYMORPHISMS AND FEASIBILITY OF MONITORING OF ANTIPLATELETS THERAPY RESULTS

The aim of study was to assess the frequencies of platelet polymorphisms which are connected with „aspirin resistance“ or/and variability of clopidogrel response in Czech population.

The anonymous testing of 1,450 blood donors DNA by PCR using Light Cycler 480 (ROCHE) were used in finding of GP IIIa (HPA-1; rs5918), P2Y₁₂ (H1/H2 haplotype; rs2046934) and COX-1 (-842A/G; rs10306114) polymorphisms frequencies.

Results. The frequencies of GP IIIa (HPA1) were: 27.40 % heterozygotes, 3.66 % homozygotes and 68.94 % wild type homozygotes, frequencies of P2Y₁₂ (H1/H2 haplotype) were 25.92 % heterozygotes, 2.63 % homozygotes and 71.46 % wild type homozygotes and frequencies of COX-1 (-842A/G) were 12.00 % heterozygotes, 0.41 % homozygotes and 87.59 % wild type homozygotes in tested group of healthy persons.

In conclusion, the frequencies are in accordance with estimated 10–40 % variability of antiplatelets drug response.

The paper also reviews the impact of laboratory assays for routine monitoring of antiplatelet therapy.

Key words: resistance to therapy, platelets polymorphisms, frequencies, platelet function, laboratory tests.

Interv Akut Kardiolog 2008; 7(6): 215–218

Úvod

Stabilní angina pectoris i akutní koronární syndromy jsou spojeny se zvýšenou aktivitou krevních destiček, které jsou také hlavním aktérem trombogenezy v místě ruptury sklerotického plátu⁽¹⁾. To je hlavní důvod k tomu, že se k profylaxi a léčbě těchto chorobných stavů používají protidestičkové léky. Jejich dávka, načasování podání, nebo použití účinnější formy, či jejich dvoj-, nebo i trojkombinace a délka léčby jsou pak podle stávajících doporučení stále obměňovány podle výsledků právě dokončených klinických studií^(2–5). Respektují se již také vedlejší účinky této léčby, zejména krvácení, které mohou nepříznivě ovlivnit prognózu onemocnění⁽⁶⁾.

Tak, jako je třeba při podání protidestičkových léků počítat s krvácením, tak se na druhé straně množí zprávy o tom, že ne ve všech případech je tato léčba účinná, zejména pokud se jedná o účinek acetylsalicylové kyseliny (dále ASA), nebo clopidogrelu. Není tedy pochyb o tom, že odpověď nemocného na tuto léčbu může být individuálně velmi rozdílná, což může vést až k jejímu selhání, které bývá také označováno jako rezistence na léčbu aspirinem^(7–9), popřípadě clopidogrelem^(10, 11). Variabilita účinku protidestičkové léčby se v průměru vyskytuje u 10–40 % takto léčených osob. Dochází k tomu většinou v úvodu léčby,

neodpovídavost na léčbu ASA nebo clopidogrelem však byla v některých případech zjištěna i po několikaměsíční terapii. Ví se také, že během 5 let dochází k rekurenci cévní příhody i u pacientů léčených po celou dobu ASA^(12, 13).

V mnoha případech se za tím může skrývat **non compliance**, jak z důvodů nesnášenlivosti léku (iritace žaludeční sliznice při léčbě ASA aj.), tak při zanedbání pravidelné léčby samotným pacientem. Vliv na snížení účinku ASA nebo clopidogrelu může mít i souběžná léčba některými léky nebo porucha jejich vstřebávání v zažívacím traktu z organických příčin. Soudí se také, že individuální odpověď na použitý protidestičkový lék může být způsobena i genetickými mutacemi, projevující se zvýšenou aktivitou destičkových receptorů nebo enzymatického systému trombocytů, či polymorfismem genů cytochromu P 450 v játrech, potřebného při přeměně clopidogrelu na jeho aktivní metabolit^(14–17). Přehled kandidátních polymorfizmů spojovaných s nižším efektem protidestičkové léčby je spolu s dalšími faktory uveden v tabulkách 1 a 2. V mnohých případech byly již nalezeny genetické varianty spojeny nejen s laboratorním průkazem nedostatečné inhibice agregace destiček po ADP (laboratorní, neboli chemická rezistence na léčbu), ale také při provedených asociačních studiích s vyšším výskytem atherotrombotických komplikací a horším průběhem onemocnění^(18–20).

prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.

Trombotické centrum Všeobecné fakultní nemocnice, Karlovo nám. 32, 120 00 Praha 2
e-mail: kvasnicka.jan@vfn.cz

Článek přijat redakcí: 30. 9. 2008
Článek přijat po přepracování: 27. 10. 2008
Článek přijat k publikaci: 23. 11. 2008

Tabulka 1. Možné příčiny variability odpovědi na léčbu ASA	
Klinické faktory	Noncompliance Porucha rezorbce v GIT Interakce s ibuprofenem
Buněčné faktory	Nedostatečná schopnost suprese COX-1 Zvýšení exprese COX-2 mRNA TF a ADP uvolněné z erytrocytů Zvýšení adrenalinu Generace 8-iso-prostanů
Genetický polymorfismus	COX-1 Receptor GP IIIa Receptor pro kolagen GP VI Receptor pro vWF GP Ia

Tabulka 2. Možné příčiny variability odpovědi na léčbu clopidogrelem	
Klinické faktory	Noncompliance Poddávkování Porucha rezorbce v GIT Léková interakce s CYP3A4 AK sy Diabetes mellitus/inzulinová rezistence Obezita
Buněčné faktory	Zvýšený obrát destiček Redukce metabolické aktivity CYP3A4 Zvýšení nabídky ADP Zvýšená aktivita receptoru P2Y ₁₂ Zvýšená aktivita receptoru P2Y ₁ Zvýšená aktivita jiných receptorů pro kolagen, epinefrin, TXA2, trombin
Genetický polymorfismus	CYP3A4,CYP3A5,CYP2C19 Receptor GP Ia Receptor P2Y ₁₂ Receptor GP IIIa

Odpověď na otázku, v jaké šíři můžeme očekávat variabilitu účinku protideštičkových léků, poskytuje také zjištění frekvence variantních polymorfismů genů destičkových receptorů nebo klíčových destičkových enzymů v naší populaci. Cílem této studie bylo tedy získat údaje o frekvenci vybraných polymorfismů spojených se zvýšenou aktivitou, respektive agregabilitou destiček a rezistencí na léčbu ASA nebo clopidogrelem v české populaci. Analyzováno bylo zastoupení těchto genetických variant: polymorfismus genu pro ADP receptor krevních destiček P2Y₁₂ (i 744 T > C)⁽²¹⁾, polymorfismus genu receptoru pro fibrinogen GP IIIa (HPA1)^(22,23) a mutace genu enzymu COX-1 (-842 A > G)^(24, 25).

Metody

Studie byla provedena v anonymních vzorcích krve od náhodně vybraných 1 450 zdravých osob kavkazské rasy, dárců krve, které zbyly po vyšetření povinných laboratorních testů prováděných před odběrem krve pro transfuzní účely. Studie

byla provedena v rámci programu řešení Výzkumného záměru MZO 00064 165 (VFN 2005), schváleného etickou komisí 1. lékařské fakulty a VFN v Praze.

Genotypizace

Genomová DNA byla extrahována z leukocytů periferní krve a izolována pomocí MagNA Pure LC nucleic acid extraction systému (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) se soupravou MagNA Pure DNA Isolation Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) podle návodu výrobce.

V získaných vzorcích DNA byly vyšetřeny tyto polymorfizmy: haplotyp H1/H2 genu destičkového receptoru pro ADP P2Y₁₂ (**P2RY12**) určený stanovením polymorfismu i-T744C SNP (rs2046934). Dále byl vyšetřen polymorfismus HPA-1 (rs5918) genu pro glycoprotein (GP) IIIa (**ITGB3**) a polymorfismus – 842 A/G (rs10306114) v genu pro cyclooxygenazu (COX) – 1 (**PTGS1**). Polymorfismy byly stanoveny pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) následované analýzou křivky tání se specifickými fluorescenčně značenými hybridizačními sondami užitím procesu FRET (fluorescence resonance energy transfer). Vyšetření polymorfismů byla provedena na přístroji LightCycler 480 instrument™ s použitím kitů LightCycler 480 Genotyping Master® (vše Roche Diagnostics, Mannheim, SRN) podle instrukcí výrobce. Toto zařízení umožňuje provést 96 PCR reakcí najednou. Sekvenčně specifické primery a fluorescenčně značené sondy byly navrženy ve spolupráci s firmou TIB MOLBIOL (Berlin, SRN), kde byly též na zakázku připraveny. Sekvence použitých primerů a sond je uvedena v tabulce 3.

Statistické metody

Data byla zpracována v statistickém programu Windows Excel 2007, frekvence zastoupení heterozygotů, homozygotů a běžného (wild) genotypu byly vypočítány statistickým programem SAS.

Výsledky

Frekvence zastoupení jednotlivých polymorfismů ve sledovaném souboru 1 450 zdravých osob – dárců krve jsou uvedeny v tabulce 4.

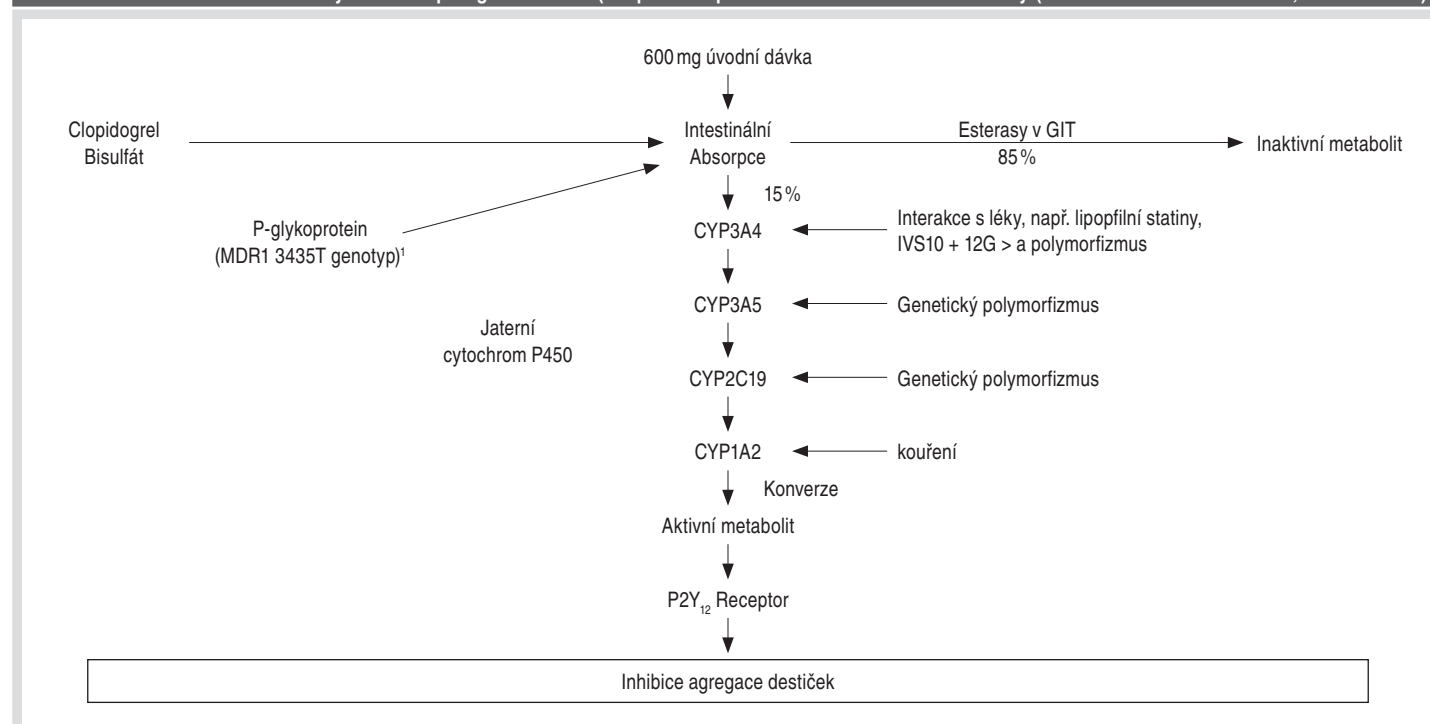
Diskuze

Zjištěné údaje o frekvenci variantních polymorfismů spojených s vyšší reaktivitou destiček a rezistencí na léčbu ASA nebo clopidogrelem v naší populaci napovídají, že možnou individuální odpověď na léčbu těmito protideštičkovými léky je třeba brát vážně i u pacientů v ČR a koresponduje také s literárními údaji o 10–40 % procentuelním zastoupením neodpovídavosti na léčbu ASA nebo clopidogrelem u nemocných s aterosklerotickou koronární nemocí, které byly uvedeny v úvodu. Vyšetřovat polymorfizmy genů spojených s tímto defektem u každého nemocného před zahájením léčby protideštičkovými léky a měnit podle toho použité léky však zatím v praxi nelze. Tato metoda zatím zůstává

Tabulka 3. Použité primery, proby a podmínky při PCR a analýza křivky tání					
Gen	SNP	SNP ID	Oligonukleotidy	PCR-T ^a (°C)	melt-T ^b (°C)
P2RY12	i-T744C	rs2046934	5'-ATTTATCTAAATATCTTTTACACgAA 5'-AAATAAAATATAggTTATTACCACA 5'-AAAAGATTACAACgTCATTTCAA--FI 5'-LCRed640-TTCCCAAgATgTAATgCCATATAgCA--ph	54	40
ITGB3	HPA-1	rs5918	5'-TGCTCCAATGTACGGGGTAAAC 5'-CTggggCACAgTTATCCTTCag 5'-gACTTCTCTTTgggCTCCTgTCTTACAgg--FI 5'-LCRed640-CCTgCCTCCgggCTCAC--ph	55	50
PTGS1	-A842G	rs10306114	5'-CCTTCCgATAACTgAgAACCT 5'-TTTCTAgCCCTCagTATTCTCAT 5'-CAATgAgggAATgCACACAAATCTCCTgg--FI 5'-LCRed640-gCAgTgCCCgCATgTAg--ph	55	50

^aannealingová teplota primerů; ^bteplota ochlazení při analýze křivky tání; FI – fluorescein; ph – phosphate; LCRed640 – LightCycler Red 640

Obrázek 1. Mechanismus variability úniku clopidogrelu in vivo (adaptováno podle P. A. Grubela a U. S. Tandy (Thrombosis Research 2007; 120: 311–321))



určena jen pro vědecké účely. V budoucnu však po zavedení rychlé a laciné chipové DNA analýzy budeme moci uvažovat o individualizované medikaci i v tomto směru⁽²⁶⁾.

Jak se tedy lze dnes přesvědčit o tom, zda je použitý protideštičkový lék u nemocného účinný či ne? Zatím, opět jen v laboratorních podmínkách, je možné vyšetřovat agregaci destiček v citrátové plazmě pacienta vyvolanou agonisty – trombinem, tromboxanem, ADP, ristocetinem, adrenalinem nebo kolagenem. Pro účely odpovědi na léčbu se hodnotí, zda přidání ADP vyvolalo v případě dosažené dysfunkce snížení agregace destiček, či ne. Specifičtější metodou, která nyní proniká do našich laboratoří, je impendační metoda, která již může zachytit přesněji i účinek clopidogrelu. Vzorek plné citrátové krve je zde nabrán do speciálních odběrovek. Z plné krve lze také orientačně a poměrně rychle (v řádu několika minut po obdržení vzorku krve do laboratoře) zjistit neodpovída-

vost na léčbu ASA pomocí přístroje PFA-100. V tabulce 5 uvádíme přehled dostupných laboratorních metod a způsob jejich provedení a hodnocení výsledků s uvedením doporučených mezních hodnot pro stanovení „rezistence“ na léčbu. Jsou to však stále metody *ex vivo*, které plně neodpovídají skutečnému ději *in vivo*, kde na destičky mimo uvedených léků působí celá řada vlivů, které ovlivní jejich reaktivitu – smykové napětí, tkáňový faktor (TF), ADP uvolněný z narušených cév a erytrocytů, prostacyklin a NO uvolněné z endotelu, aktivita endotelového enzymu ADPázy, uvolněný trombin, kolagen, aktivita ITIM destičkového receptoru PECAM-1, která je protipólem integrinového receptoru GPIIb/IIIa, cirkulující mikropartikelky s TF a P-selektinem a jiné vlivy⁽¹⁾.

Přesnější vyšetření účinnosti protideštičkové léčby clopidogrelem pak lze provést s poměrně náročným laboratorním vyšetřením fosforylace VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) proteinu vázaného v trombocytech na vlákna aktinu⁽²⁷⁾. To však zase vyžaduje nákladnou aparaturu průtokové cytometrie. Princip tkví ve stanovení fosforylovaného VASP (VASP-P) s fluoresceinem značenou monoklonální protilátkou vůči VASP-P v oblasti Ser 239 (VASP-16C2). K této fosforylaci dochází po kaskádě nitrotrombocytárních pochodů vyvolaných stykem destičky s vazodilatátorem – prostaglandinem E1 (prostacyklinem). Koncentrace VASP-P pak v destičce klesá po inhibici adenyl cyklázy a snížení cAMP vyvolané ADP. Vyšetření probíhá ve vzorcích krve pacienta léčeného clopidogrelem, ke kterým je v prvním kroku přidán prostacyklin a poté v druhém kroku ADP. Pokud tedy byl při léčbě clopidogrelem blokován destičkový receptor pro ADP P2Y₁₂, k poklesu koncentrace zvýšeného VASP-P po přidání ADP nedochází a výsledné značení monoklonální protilátkou proti VASP-P je tedy v těchto destičkách pozitivní.

Je již prokázáno, že výsledky stanovení účinnosti clopidogrelu pomocí VASP-P testu korelovaly s vyšší ischemických změn vyvolaných nedostatečnou účinností protideštičkové léčby u nemocných po provedení PCI⁽²⁸⁾. V takovém případě by tedy bylo vhodné podat místo clopidogrelu nový inhibitor ADP receptoru prasugrel, který má vyšší účinnost⁽²⁹⁾. Je však třeba podotknout, že ani toto náročné vyšetření rezistence na léčbu clopidogrelem není stoprocentně specifické, podobný nález můžeme očekávat v případě dysfunkce endotelu se snížením syntézy NO, prostacyklinu, nebo při hypercholesterolemii, či hyperglykemií⁽³⁰⁾.

Tabulka 4. Zastoupení jednotlivých polymorfizmů ve sledovaném souboru zdravých osob – oblast Praha a střední Čechy

Polymorfismus		
P2Y ₁₂ (H1/H2 haplotyp)	Počet	%
n =	1 447	
HET	375	25,92 %
HOM	38	2,63 %
neg	1 034	71,46 %
GPIIb/IIIa (HPA1)	Počet	%
n =	1 449	
HET	397	27,40 %
HOM	53	3,66 %
neg	999	68,94 %
COX-1 (-842A/G)	Počet	%
n =	1 450	
HET	174	12,00 %
HOM	6	0,41 %
neg	1 270	87,59 %

Tabulka 5. Mezní hodnoty laboratorních vyšetření pro stanovení rezistence na protidestičkovou léčbu

		metoda		
		Transmisní agregometrie	Impedanční agregometrie	PFA-100
léčivo	ASA	agregace po AA $\geq 20\%$ – zlatý standard agregace po ADP (10 mM) $\geq 70\%$ agregace po ADP (10 mM) $\geq 70\% +$ po AA $\geq 20\%$	impedance po AA $\geq 0\Omega$ impedance po AA $\geq 3\Omega$	CT CEPI < 193 s
	Clopidogrel	není dostatečně citlivá	impedance po ADP s PGE1 $\geq 0\Omega$	CT PFAP2Y – ? (nová cartridge)

Jak z uvedeného vyplývá, v klinice jsou zatím možnosti monitorovat protidestičkovou léčbu značně omezené a pro denní praxi se zatím nehodí. V doporučení ECS o protidestičkové léčbě vypracované skupinou expertů pod vedením prof. C. Patrono⁽³¹⁾, ale i v nejnovějších doporučeních 8. ACCP konference z roku 2008⁽³²⁾ zatím tedy není rutinní vyšetřování destičkové funkce pro praxi doporučováno.

Ukazuje se však, že některé nové testy by tuto situaci mohly změnit. Jedná se zejména o systém VerifyNow®, který poskytuje orientační informaci o tom, zda je u léčeného pacienta s ASA, nebo clopidogrelem destičková reaktivita potlačena, či ne. V USA byl již tento POCT (point-of-care test) schválen ke klinickému použití a v současnosti s ním probíhají validační testy u nemocných po prodělané akutní koronární příhodě⁽³³⁾. Zde se tedy rysují možnosti, jak se v indikovaných případech přesvědčit o účinku protidestičkové léčby bez zdlouhavého a přístrojově náročného laboratorního vyšetření funkce trombocytů. Hrozba časně nebo pozdní trombózy zavedeného stentu (zejména lékového) pak v případě kladných výsledků klinických studií zcela jistě převáží námitky proti nákladnosti tohoto POCT vyšetření.

Zatím však v běžné praxi nezbyvá nic jiného, než stále provádět jen neselektivní opatření zabraňující selhání efektu podané protidestičkové léčby. To je volit vyšší úvodní dávku clopidogrelu 600 mg, možná i ASA. Konečná odpověď na správnost tohoto postupu je očekávána od výsledků studie CURRENT-OASIS 7⁽³⁴⁾. Při STEMI se ukazuje vhodné podat iv. bolus inhibitoru GPIIb/IIIa tirofibanu spolu s ASA, clopidogrelem a heparinem již v přednemocniční fázi⁽³⁵⁾. Další možnosti je použití účinnějších léků inhibujících receptor P2Y₁₂, jako jsou perorální prasugrel, ne-thienopyridiny AZD 6140, nebo i v. gangrelor. V blízké budoucnosti bude možné podat i úplně nové protidestičkové léky, využívající jiných způsobů inhibice trombocytů, jako je inhibitor destičkového receptoru pro trombin PAR-1 (SCH 530348), nebo inhibitor receptoru pro tromboxan A₂ (S-1886)⁽¹²⁾. Kouření, které paradoxně po aktivaci jaterního cytochromu P 450 CYP1A2 zvyšuje tvorbu účinného metabolitu clopidogrelu⁽³⁶⁾, to však určitě nebude.

Podpořeno VZ MZO VFN 2005.

Literatura

- Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2008; 357: 2482–2494.
- Silber S, Albertsson P, Fernandez-Avil F, et al. Percutaneous coronary interventions (guidelines for). *Eur Heart J* 2005; 26: 804–847.
- King SB, Smith SC, Hirshfeld JW, et al. 2007 focused update of the 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. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51: 172–209.
- Bassand JP, Hamm CH, Ardissino D, et al. Management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2007; 28: 1598–1660.
- Fox K, Alonso Garcia MA, Diego Ardissino D, et al. Stable angina pectoris (management of). *Eur Heart J* 2006; 27: 1341–1381.
- Moscucci M, Fox KA, Cannon CP, et al. Predictors of major bleeding in acute coronary syndromes: the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Eur Heart J* 2003; 24: 1815–1823.
- Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance (editorial). *BMJ* 2004; 328: 477–479.
- Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsch PA, et al. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2003; 41: 961–965.
- Hennekens CH, Schor K, Weisman S, FitzGerald GA. Terms and conditions: semantic complexity and aspirin resistance. *Circulation* 2004; 110: 1706–1708.
- Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45: 1157–1164.
- Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109: 3171–3175.
- Husted S. Novel approaches to platelet inhibition: new agents. *WCC 2008*. <http://www.theheart.org/article/861091.do>.
- Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin „resistance“ and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008; 336: 195–198.
- Cattaneo M. Resistance to platelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 2007; 5(Suppl. 1): 230–237.
- Gurbel PA, Tandry US. Clopidogrel resistance? *Thrombosis Research* 2007; 120: 311–321.
- Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, Costa MA. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1505–1516.
- Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, et al. Platelet GP IIb/IIIa PIA polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101: 1013–1013.
- Michos ED, Ardehali R, Blumenthal RS, Lange RA, Ardehali H. Aspirin and clopidogrel resistance. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81: 518–526.
- Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. PIA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2004; 15: 89–93.

- Cooke GE, Liu-Stratton Y, Ferketich AK, et al. Effect of platelet antigen polymorphism on platelet inhibition by aspirin, clopidogrel, or their combination. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 541–546.
- Fontana P, Dupont A, Gandrille S, et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003; 108: 989–995.
- Macchi L, Christiaens L, Brabant S, et al. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet PI A1 (GP IIb/IIIa) polymorphisms but not with C807T (GP Ia IIIa) and C-5 T Kozak (GP Iba) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1115–1119.
- Undas A, Brummel K, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. PI (A2) polymorphism of beta (3) integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin in the site of microvascular injury. *Circulation* 2001; 104: 2666–2672.
- Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, et al. Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost* 2006; 3: 2340–2345.
- Lepäntalo A, Mikkelsson J, Reséndiz JC, et al. Polymorphisms of COX-1 and GP VI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost* 2006; 95: 253–259.
- Wen J, Legendre LA, Bienvenue JM, Landers JP. Purification of nucleic acids in microfluidic devices. *Anal Chem* 2008; 80: 6472–6479.
- Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, Aktas B, Steigerwald U, Walter U, Schinzel R. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. *Clinical Chemistry* 2005; 51: 957–965.
- Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, et al. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51: 1404–1411.
- Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndrome. *NEJM* 2007; 357: 2001–2015.
- Ang L, Palakodeti V, Khalid A, et al. Elevated plasma fibrinogen and diabetes mellitus are associated with lower inhibition of platelet reactivity with clopidogrel. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1052–1059.
- Patrono C, Bachmann F, Baigent C, et al. Antiplatelet agents (Expert consensus document on the use of). *Eur Heart J* 2004; 25: 166–181.
- Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians evidence – based clinical practice guidelines (8th edition). *Chest* 2008; 133: 199–233.
- Prince MJ, Endemann S, Gollapudi RR, et al. Prognostic significance of post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation. *Eur Heart J* 2008; 29: 992–1000.
- Mehta S, Mehran R. Thienopyridines in PCI: The lowdown on loading doses. <http://www.theheart.org/article/86477.do>.
- van't Hof AWJ, ten Berg J, Heestermans T, et al. Prehospital initiation of tirofiban in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary angioplasty (ON-TIME 2): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372: 537–546.
- Bliden KP, DiChiara J, Lawal L, et al. The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 531–533.