

**Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski**

Anna Dyszkiewicz-Korpany

**Wpływ polimorfizmu płytkowej glikoproteiny IIIa
na przeciwzakrzepowe działanie aspiryny i kłopidogrelu
u chorych na miażdżycę tętnic**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor pracy - Prof. dr hab. med. Jacek Musiał

**Pracę wykonano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych
Collegium Medicum UJ**

Kierownik Katedry - Prof. dr hab. med. Andrzej Szczeklik

Kraków 2005

Pracę tę dedykuję mojemu mężowi Grzegorzowi i synkowi Jankowi

Spis treści

Podziękowania	7
Wykaz skrótów używanych w pracy	9
1. Wstęp	11
1.1. Rola płytek krwi w miażdżycy	11
1.1.1. Polimorfizm GP IIIa	15
1.1.2. Polimorfizm GP IIb	16
1.1.3. Polimorfizm GP Ia/IIa	16
1.1.4. Polimorfizm GP Ib	16
1.2. Aspiryna	17
1.2.1. Historia	17
1.2.2. Mechanizm działania i farmakokinetyka	17
1.2.3. Aspiryna a układ krzepnięcia	18
1.2.4. Inne efekty działania aspiryny	18
1.2.5. Badania kliniczne z aspiryną	18
1.2.6. Zjawisko oporności na aspirynę	19
1.3. Kłopidogrel	21
1.3.1. Historia	21
1.3.2. Mechanizm działania i farmakokinetyka	21
1.3.3. Inne efekty działania kłopidogrelu	21
1.3.4. Badania kliniczne z kłopidogrelem	22
1.3.5. Zjawisko oporności na kłopidogrel	23
2. Cel i założenia pracy	25
3. Charakterystyka chorych	25
4. Schemat badania	26
5. Materiały i metody	27
5.1. Analizator płytkowy, PFA- 100™ (Dade Behring, Germany)	27
5.2. Agregacja płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym (PRP)	27
5.3. Oznaczenie generacji trombiny	27
5.4. Czas krwawienia (BT)	28
5.5. Oznaczanie polimorfizmu P1 ^{A1/A2} płytkowej glikoproteiny IIIa	28
5.6. Pozostałe metody	29
5.7. Analiza statystyczna	29
5.7.1. Statystyka opisowa	29
5.7.2. Porównanie obu grup pod względem częstości występowania czynników ryzyka choroby wieńcowej oraz liczby płytek krwi	29
5.7.3. Generacja trombiny, czas krwawienia (BT) i czas zamknięcia apertury (CT)	30

6. Wyniki	31
6.1. Porównanie obu grup pod względem częstości występowania czynników ryzyka choroby wieńcowej oraz liczby płytek krwi	31
6.2. Oznaczenie polimorfizmów glikoproteiny IIIa	32
6.3. Generacja trombiny	32
6.3.1. ANOVA, procedura Tukey'a	33
6.3.2. Test Wilcozona dla par powiązanych, porównanie pól pod krzywymi generacji trombiny	33
6.3.3. ANOVA, wskaźnik generacji trombiny λ	33
6.4. Czas krwawienia (BT)	37
6.5. Czas zamknięcia apertury (CT)	38
7. Dyskusja	39
8. Streszczenie	44
Summary	45
9. Wnioski	46
10. Piśmiennictwo	47
11. Wykaz rycin i tabel	62

Podziękowania

Składam podziękowania Panom Profesorom dr hab. med. Andrzejowi Szczeklikowi i Jackowi Musiałowi za umożliwienie mi przeprowadzenia badań w laboratorium II Katedry Chorób Wewnętrznych CMUJ.

Panu Profesorowi dr hab. med. Jackowi Musiałowi dziękuję ponadto za opiekę promotorską i wiele cennych uwag dotyczących niniejszej pracy.

Dziękuję koleżankom i kolegom, którzy wzięli udział w realizacji projektu.

Mojej rodzinie dziękuję za wsparcie i wiarę we mnie.

Wykaz skrótów używanych w pracy

A – adenina
ADP – dwufosforan adenozy
ANOVA – wielokrotna analiza regresji
ASA – aspiryna
bFGF – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
BT – czas krwawienia
C1, C2 – stężenia fragmentów protrombiny
CAD – choroba niedokrwienna serca
CADP CT – czas zamknięcia apertury wkładu z ADP
C – cytozyna
CEPI CT – czas zamknięcia apertury wkładu z epinefryną
CI – przedział ufności
COL – kolagen
COX-1,2 – cyklooksigenaza 1,2
Cz. – czynnik
EPI – epinefryna
F 1.2 – fragmenty 1,2 protrombiny
G – guanina
GP – glikoproteina
HDL – lipoproteiny o wysokiej gęstości
HPA-1a, 1b, 2b – ludzki antygen płytkowy-1a, 1b, 2b
HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa
ICAM-1 – międzykomórkowa cząstka adhezyjna-1
IL-1 – interleukina 1
Ile – izoleucyna
LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości
Lp(a) – lipoproteina a
MCP-1 – białko działające chemotaktycznie na monocyty -1
M-CSF – czynnik aktywujący kolonie makrofagów
Met – metionina
NF-κB – czynnik jądrowy κB
NO – tlenek azotu
NSAIDs – niesterydowe leki przeciwzapalne
PAOD – miażdżyca zarostowa tętnic kończyn dolnych
PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy
PDGF – czynnik wzrostu pochodzący z płytek
PFA-100™ – analizator płytkowy
PGF-2α – prostagladyna 2α
PGH₂ – prostaglandyna H₂
PPP – osocze ubogopłytkowe
Pro – prolina
PRP – osocze bogatopłytkowe
RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
SD – odchylenie standardowe

Ser – seryna
T – interwał czasu
TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β
Thr – treonina
TTP – plamica zakrzepowa małopłytkowa
T – tymina
TXA₂ – tromboksan A₂
VASP – białko aktywowane substancjami naczyniorozkurczowymi
VCAM-1 – naczyniowa cząstka adhezyjna-1
VEGF – naczyniowy czynnik wzrostu śródbłónka
VNTR – zróżnicowana liczba podwójnych powtórzeń
vWF – czynnik von Willebranda
 λ – wskaźnik generacji trombiny

1. Wstęp

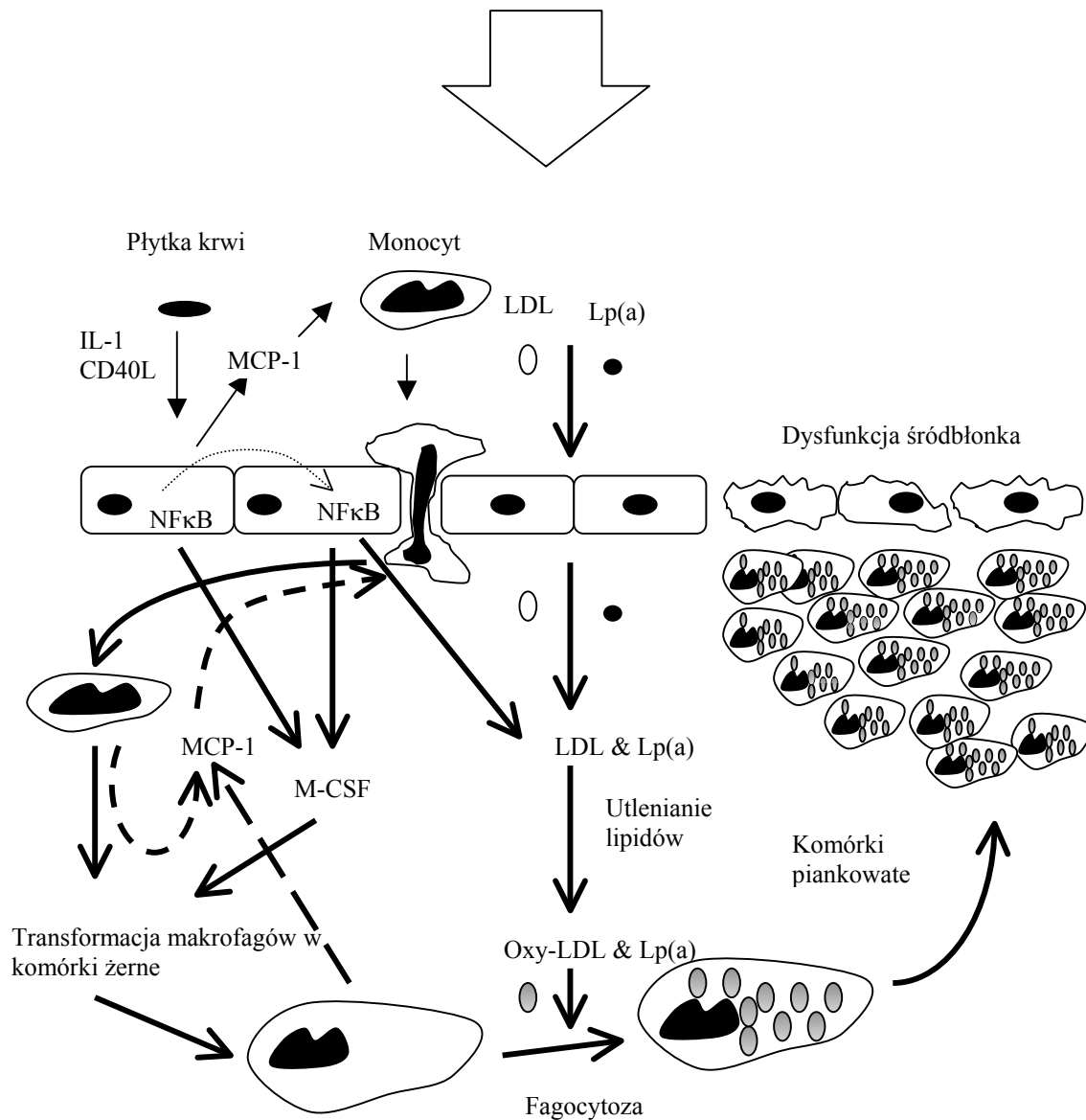
Miażdżyca tętnic jest obecnie uważana za przewlekły proces zapalny, toczący się w zakresie ściany średnich i dużych naczyń (1,2). Jedną z jej manifestacji jest choroba niedokrwienna serca, która jest wiodącą przyczyną zgonów w społeczeństwach zachodnich.

Początkowo uważano miażdżycę za proces degeneracyjny. Obecnie wiadomo, że u jej podłoża leżą mechanizmy immunologiczne i zapalne (1,3). W jej rozwój zaangażowane są zarówno komórki ściany naczyniowej, jak i leukocyty, makrofagi oraz płytki krwi. Pierwszym etapem, prowadzącym do rozwoju blaszki miażdżycowej w naczyniu jest dysfunkcja śródbłónka. Sprzyjają jej m.in: hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, hiperhomocysteinemia oraz pewne czynniki infekcyjne (1,4). Dysfunkcja śródbłónka prowadzi do zaburzenia jego funkcji sekrecyjnej, m.in. zmniejszenia produkcji tlenku azotu (NO), który hamuje agregację płytek krwi, ekspresję cząstek adhezyjnych i działa naczyniorozkurczowo (5). Spadek dostępności tlenku azotu, wzrost produkcji endoteliny-1 oraz obecność wolnych rodników sprzyjają adhezji leukocytów, proliferacji komórek, wzrostowi napięcia ściany naczyniowej, stymulując procesy zapalne i zakrzepicę.

1.1. Rola płytek krwi w miażdżycy

Płytki krwi są źródłem biologicznie aktywnych związków, takich jak cytokiny i czynniki wzrostu, które są przez nie uwalniane w miejscu tworzenia zakrzepu. W stanach sprzyjających miażdżycy (cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia, palenie tytoniu) obserwowano wzrost aktywności płytek i ich zwiększoną zdolność do agregacji. Aktywowane płytki mogą zmieniać chemotaktyczne i adhezyjne właściwości komórek śródbłónka (6,7). Uwalnienie przez trombocyty interleukiny –1 (IL-1) i ligandu CD40, powoduje ekspresję molekuł adhezyjnych ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) i VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), receptorów dla monocytów na powierzchni komórek śródbłónka naczyniowego, oraz sekrecję MCP-1 (monocyte chemoattractant protein – 1) (8,9) (Ryc.1.). Aktywowane płytki stymulują ponadto czynnik transkrypcyjny NF- κ B, sterujący m.in procesami zapalnymi w ścianie naczyniowej.

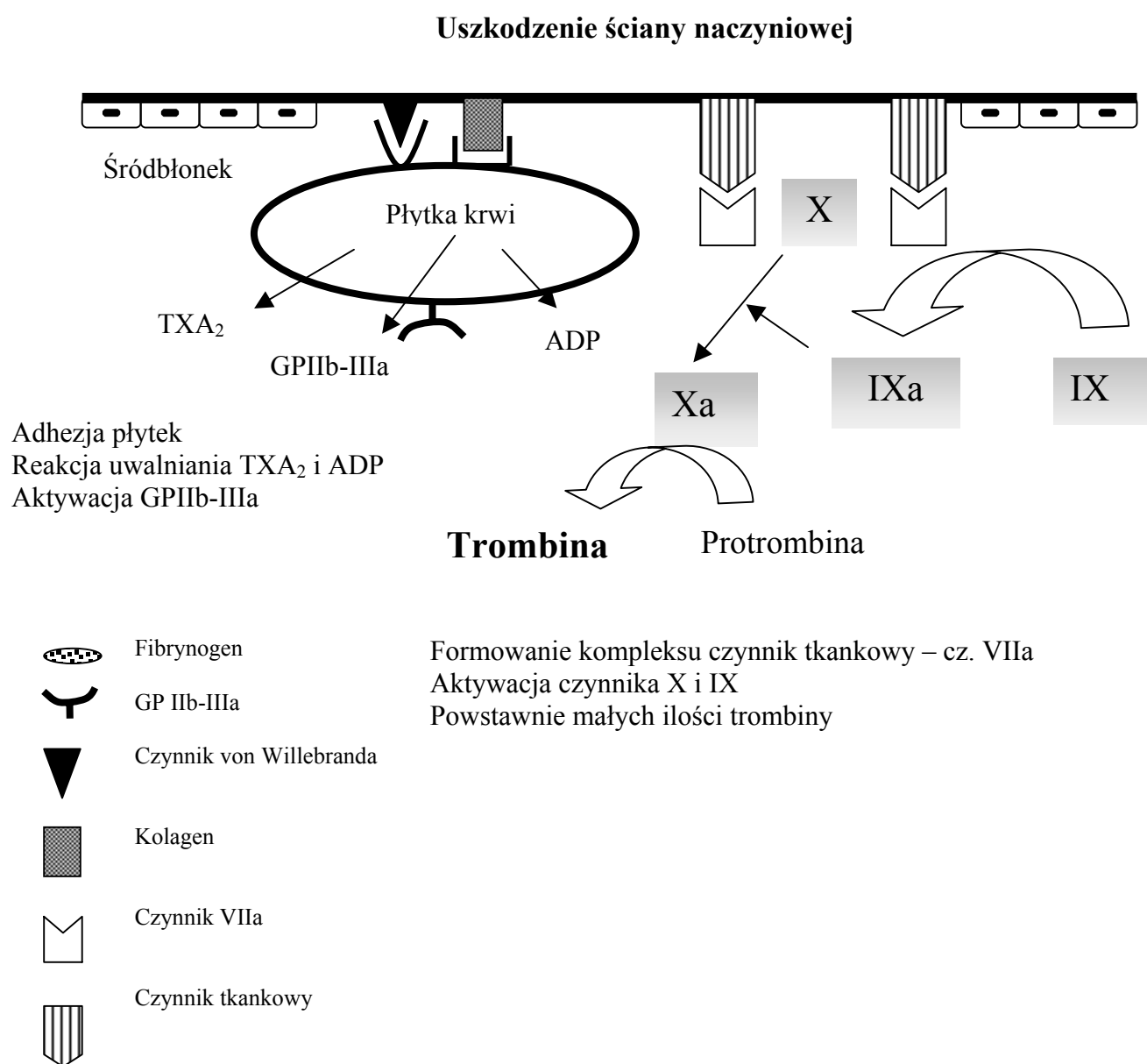
Czynniki sprzyjające rozwojowi miażdżycy



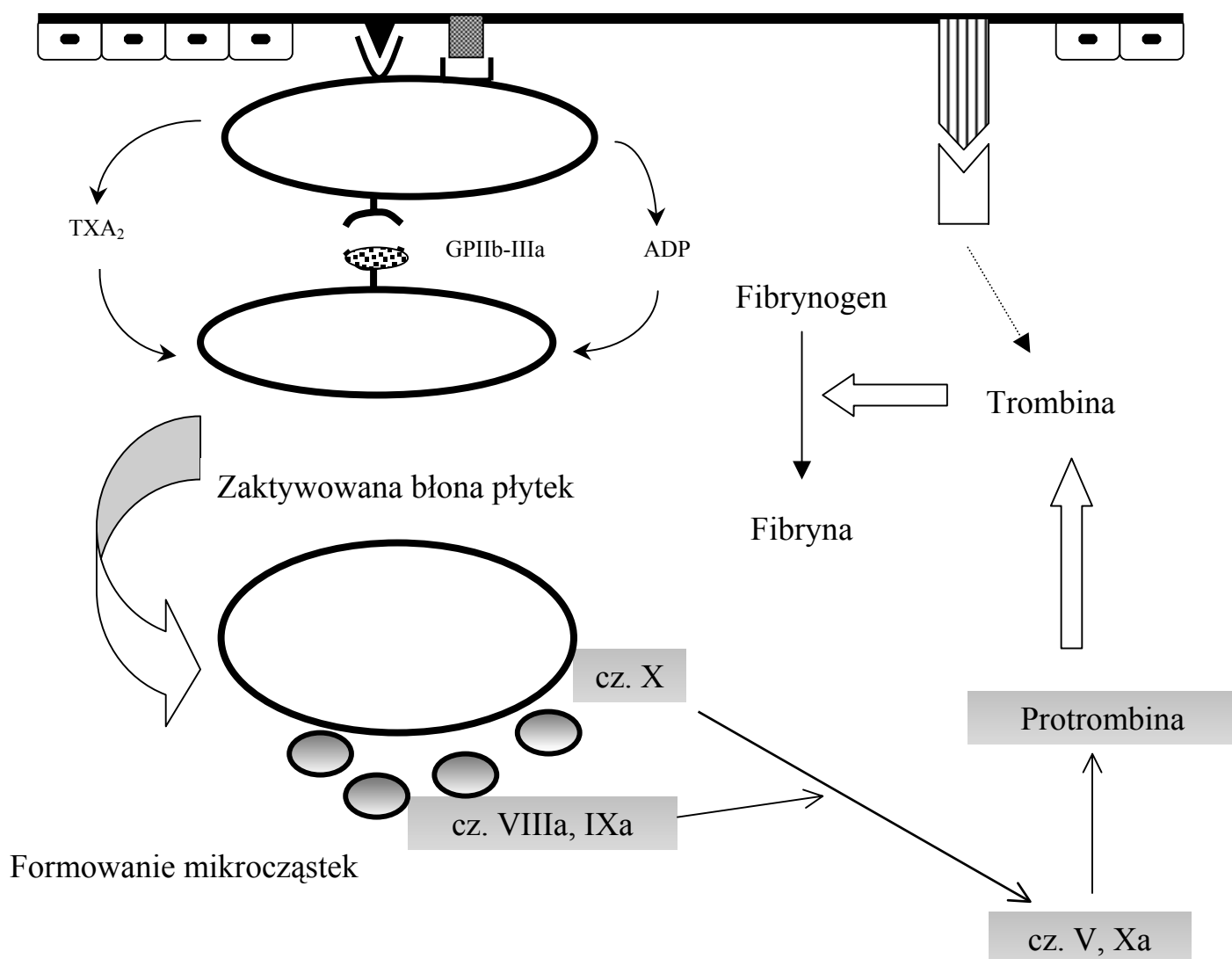
Ryc.1. Rola płytek krwi w patogenezie miażdżycy (wg M. Gawaz 2001).

Płytki są równocześnie bogatym źródłem czynników wzrostu takich jak PDGF (platelet derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor β), bFGF (fibroblast growth factor) oraz VEGF (vascular endothelial growth factor). PDGF, TGF- β i bFGF są odpowiedzialne za migrację i proliferację komórek mięśni gładkich (10), a VEGF - komórek endotelialnych, przyczyniając się w ten sposób do progresji zmian miażdżycowych (11). Płytki krwi odgrywają ponadto kluczową rolę w ostrych

zespołach wieńcowych, w których po pęknięciu niestabilnej płytki miażdżycowej dochodzi do formowania się wewnątrznacyniowego zakrzepu. Według obowiązującej koncepcji, formowanie się zakrzepu przebiega w trzech fazach: początkowej, amplifikacji oraz tworzenia włókna (12) (Ryc. 2, 3).



Ryc. 2. Faza początkowa i amplifikacji w tworzeniu zakrzepu.



Ryc.3. Faza tworzenia włókniaka (fibryny).

Błona aktywnych płytek jest miejscem tworzenia się kompleksów „tenazy” i „protrombinazy”, które katalizują generację trombiny, a w efekcie powstawanie włókniaka (12). Trombina aktywuje kolejne płytki krwi (tzw. rekrutacja), jest agonistą stymulującym ich agregację oraz indukuje zakotwiczenie się V i VIII czynnika krzepnięcia do błony trombocytów.

Czynność płytek krwi w trakcie powstawania miażdżycy i jej powikłań zakrzepowych jest najpewniej modulowana przez szereg czynników. Należą do nich m.in czynniki

genetyczne, a wśród nich polimorfizmy glikoprotein płytkowych, stanowiących receptory fibrynogenu, fibronektyny, czynnika von Willebranda (vWF) i kolagenu.

1.1.1. Polimorfizm GP IIIa

Glikoproteina (GP) IIb-IIIa (integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$), pośredniczy w agregacji płytek krwi jako receptor dla fibrynogenu, wiąże ona również vWF, fibro-i witronektynę oraz trombospondynę. Jej polimorfizm w postaci allelów PI^{A1} i PI^{A2} (HPA-1a i HPA-1b) jest związany z zamianą tyminy na cytozynę w nukleotydzie 1565, czego skutkiem jest substytucja leucyny przez prolinę w pozycji 33 łańcucha polipeptydowego (13). Allel PI^{A2} występuje u około 1/4 populacji północnej Europy, 15% mieszkańców Europy Środkowej, 3.7% Japończyków i zaledwie 0.5% Koreańczyków (14-16). Weiss i wsp. w 1996 roku wskazali po raz pierwszy na jego możliwy związek ze zwiększonym ryzykiem zawału mięśnia sercowego (17). W ciągu następnych lat pojawiły się rozbieżne doniesienia na temat wpływu polimorfizmu PI^{A2} na progresję choroby wieńcowej i występowanie epizodów zawału mięśnia sercowego w młodym wieku (18-21), lub braku takiego wpływu (22-24). Garcia-Ribes i wsp. wskazywali na znaczący związek pomiędzy polimorfizmem HPA-1b a restenozą naczyń wieńcowych u chorych po zabiegu plastyki naczyń wieńcowych (19).

Pojawiło się również pytanie, w jaki sposób polimorfizm glikoproteiny IIIa mógłby zmieniać jej funkcję jako receptora i wpływać na czynność płytek krwi. Donoszono o zwiększonej zdolności do agregacji płytek PI^{A2} w odpowiedzi na nawet niewielkie stężenia agonistów-ADP i epinefryny (25), oraz zwiększonym wiązaniu fibrynogenu przez płytki PI^{A2} (26). W innym badaniu, płytki PI^{A2} , stymulowane przez ADP, wykazywały zwiększoną ekspresję P-selektyny (27). Z kolei Andrioli i wsp. stwierdzili, że u nosicieli allelu PI^{A2} występuje upośledzona odpowiedź płytek na kwas arachidonowy oraz tromboksan A_2 (28).

Vijayan i wsp. donosili o zwiększonej aktywności układu „outside- in signalling” i funkcji adhezyjnych komórek z allelem Pro33 integryny IIIa (29), natomiast inni autorzy podkreślali, że związek między ww polimorfizmem a czynnością płytek krwi pozostaje niejasny (30).

Istotne implikacje kliniczne miałyby wpływ polimorfizmu glikoproteiny IIIa na zróżnicowaną odpowiedź na leki przeciwplatekcyjne, stosowane szeroko w pierwotnej

i wtórnej prewencji zawału mięśnia sercowego. Wydaje się, że aspiryna działa gorzej u osób z polimorfizmem PI^{A2} , co w efekcie powoduje jej słabszy wpływ na generację trombiny (31-33). Stąd polimorfizm PI^{A2} uważa się za jeden z ważnych czynników odpowiedzialnych za zjawisko oporności na aspirynę (34).

1.1.2. Polimorfizm GP IIb

Polimorfizmy tej glikoproteiny rzadziej były tematem poszukiwań badawczych. Według raportu Reintera i wsp. z 2001 roku, polimorfizm Ile-84 Ser glikoproteiny II b może być kolejnym czynnikiem ryzyka zawału serca u młodych kobiet (35). Jednak inni autorzy nie potwierdzają związku pomiędzy ww polimorfizmem a zwiększonym ryzykiem zakrzepicy tętniczej (36,37).

1.1.3. Polimorfizm GP Ia/IIa

Glikoproteina Ia/IIa (integryną $\alpha_2\beta_1$), jest płytkowym receptorem dla kolagenu, biorącym udział w adhezji płytek do macierzy podścielniczki (38). Cichy polimorfizm w pozycji 807 nukleotydu (C807T) wpływa na gęstość receptora na powierzchni płytek, jak również prawdopodobnie na jego aktywność (39). Zjawiska te mają odpowiadać za zwiększone ryzyko zawału serca i udaru mózgu, szczególnie w grupie młodszych pacjentów-nosicieli allelu 807 T (40-42). Wielu autorów nie potwierdza jednak tych związków (43,44).

1.1.4. Polimorfizm GP Ib

Glikoproteina Ib jest częścią kompleksu GP Ib-IX-V, receptora dla czynnika von Willebrandta (vWF), pośredniczącego w ich adhezji do macierzy podścielniczki. Opisano kilka polimorfizmów podjednostki α tego receptora – tzw. VNTR (variable number of tandem repeats) oraz Thr145Met (45, 46). W roku 1999 opisano kolejny polimorfizm tak zwanej sekwencji Kozak podjednostki α (T/C w nukleotydzie -5) (47). W kilku badaniach klinicznych poszukiwano związku ww polimorfizmów z ryzykiem zakrzepicy tętniczej. Stwierdzono zarówno pozytywne, jak i negatywne (48-50) korelacje pomiędzy występowaniem alleli HPA-2b (Met 145) oraz VNTR B

a zwiększonym ryzykiem zawału mięśnia sercowego i udaru. Boncler i wsp. wykazali, że polimorfizmy VNTR-B oraz Thr145Met powodują zwiększoną wrażliwość płytek na antagonistę vWF, kwas aurytrójkarboksylowy (51). Polimorfizm -5C w zakresie sekwencji Kozak zwiększa gęstość receptora na powierzchni płytek krwi (47), ale nie wpływa na częstość udaru mózgu, a być może chroni nawet młode kobiety przed zawałem serca (52).

1.2. Aspiryna

1.2.1. Historia

Aspiryna, czyli kwas acetylosalicylowy (ASA), jest jednym z najczęściej stosowanych leków na świecie. Amerykanie zażywają 35 ton tego leku dziennie (53). Kwas acetylosalicylowy został zsyntetyzowany przez Felixa Hoffmana w 1899 roku. Młody chemik miał go stworzyć dla swojego ojca, cierpiącego na chorobę stawów, który narzekał na gorzki smak kwasu salicylowego. Lek został wprowadzony na rynek przez firmę "Bayer" pod nazwą "aspiryny" jako specyfik o działaniu przeciwbólowym, przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym. Dopiero w 1950 roku, Lawrence Craven, lekarz rodzinny z Kalifornii, opublikował swoje spostrzeżenia na temat prawdopodobnych przeciwzakrzepowych właściwości aspiryny (54). W swojej końcowej publikacji, tuż przed śmiertelnym w skutkach zawałem, Craven stwierdził, że pośród 8000 osób zażywających aspirynę przez 8 lat nie znalazł ani jednego przypadku wykrywalnej zakrzepicy w zakresie naczyń wieńcowych czy mózgowych (55). W roku 1966 stwierdzono wydłużenie czasu krwawienia po zażyciu aspiryny (56,57), a w rok później w *Lancet* zostało opublikowane pierwsze doniesienie na temat działania przeciwplatektonowego kwasu acetylosalicylowego (58).

1.2.2. Mechanizm działania i farmakokinetyka

Efektem szybkiej absorpcji aspiryny w przewodzie pokarmowym jest zahamowanie czynności płytek już w krążeniu wrotnym (59); czas półtrwania leku w osoczu wynosi zaledwie 20 minut.

Mechanizm działania aspiryny polega na nieodwracalnym hamowaniu cyklooksygenazy 1 i 2 (COX-1, COX-2) przez acetylację reszt serynowych w pozycji

Ser-530 w przypadku COX-1 i Ser-516 w COX-2 (60,61). Hamowanie COX-1 przez aspirynę jest około 170-razy silniejsze niż COX-2 (62).

1.2.3. Aspiryna a układ krzepnięcia

Efekt przeciw płytkowy aspiryny jest nieodwracalny, ponieważ blokuje ona enzym w komórkach pozbawionych jądra. Oprócz zahamowania produkcji TXA₂ i efektu antyagregacyjnego, aspiryna hamuje również zależną od płytek generację trombiny, prawdopodobnie przez działanie na fosfolipidy błony komórkowej trombocytów (63).

1.2.4. Inne efekty działania aspiryny

W 1971 John Vane wykazał, że aspiryna hamuje syntezę prostaglandyn i ten mechanizm może tłumaczyć jej właściwości przeciwbólowe i przeciwzapalne (64). Efekt przeciwzapalny aspiryny jest również związany z hamowaniem COX-2, szczególnie przy stosowaniu większych dawek leku (65). Ten mechanizm jest mniej jasny i może być mediowany przez zahamowanie czynnika transkrypcyjnego NFκB (66). Według innej koncepcji, aspiryna ma hamować tworzenie się ciał lipidowych w leukocytach i metabolizowanie ich do eikozanoidów oraz blokować ekspresję genu fosfolipazy A₂ indukowaną przez cytokiny (67). Aspirynie przypisuje się również właściwości antyoksydantu, który hamuje utlenianie cholesterolu frakcji LDL (68) i poprawia funkcję śródbłoka w naczyniach zmienionych miażdżycowo (69). Aspiryna może być bezpośrednim wymiataczem rodników wodorowych (70) oraz chronić białka przed utlenieniem poprzez acetylację grup aminowych lizyny (71). Utlenienie fibrynogenu w warunkach stresu oksydacyjnego wiąże się z efektem prozakrzepowym, a acetylacja jego cząsteczki przez aspirynę zapobiega temu procesowi (72).

1.2.5. Badania kliniczne z aspiryną

Celem oceny efektów stosowania aspiryny w pierwotnej profilaktyce choroby wieńcowej, przeprowadzono dwa duże prospektywne badania: Physician's Health Study i British Doctors's Trial. W pierwszym z nich nie stwierdzono korzyści wynikających z przyjmowania kwasu acetylosalicylowego u osób w wieku

nie przekraczającym 50 lat (73). W grupie brytyjskich lekarzy nie obserwowano znamiennej statystycznie różnicy w częstości występowania świeżego zawału mięśnia sercowego między grupą otrzymującą lek a grupą kontrolną (74). Skuteczność aspiryny we wtórnej profilaktyce choroby niedokrwiennej serca oceniano w badaniu CAPRIE (Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events), porównując ją z kłopidogrelem (75). W tym badaniu aspiryna okazała się skuteczniejsza od kłopidogrelu tylko w grupie chorych z historią przebytego zawału mięśnia sercowego. W roku 1994 Antiplatelet Trialist's Collaboration, a w 2002 roku już Antithrombotic Trialist's Collaboration opublikowało metaanalizy 287 badań, porównujących skuteczność terapii przeciwplatekowej u pacjentów w porównaniu z kontrolą (76,77). Aspiryna w dawce 75-150 mg, stosowana w terapii długoterminowej, okazała się skuteczna u większości pacjentów ze zwiększonym ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych. U chorych, u których monoterapia aspiryną mogłaby nie okazać się wystarczająca, zalecono zastosowanie drugiego leku przeciwplatekowego.

1.2.6. Zjawisko oporności na aspirynę

Problem niepełnej odpowiedzi na aspirynę u niektórych pacjentów z chorobą wieńcową (CAD) jest przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Już w 1978 roku, Mehta i wsp. wykazali, że u ok. 30% pacjentów z CAD pojedyncza dawka 650 mg aspiryny słabo hamuje agregację płytek krwi (78). Podobnie Buchanan i wsp. stwierdzili brak wydłużenia czasu krwawienia przez ASA (325 mg dziennie) u około 40% pacjentów przed planowym zabiegiem pomostowania aortalno-wieńcowego (79). Według P. Gum i wsp. częstość występowania oporności na aspirynę u chorych ze stabilną CAD wynosi 5 % przy użyciu agregacji płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym oraz 9.5 % przy użyciu aparatu PFA-100™ (80). Co najważniejsze, badacze ci wykazali ostatnio związek pomiędzy nieadekwatną odpowiedzią na aspirynę a powikłaniami sercowo-naczyniowymi (81). Problem oporności na aspirynę jest, jak się okazuje, złożony i obecnie szeroko dyskutowany. Ujmowany jest też różnorodnie: jako odpowiedź agregacyjna płytek krwi w testach *in vitro* lub niedostateczne hamowanie powstawania metabolitów tromboksanu A₂, oznaczanych w moczu (80,82) albo też, jako niepełna protekcja przed klinicznymi epizodami sercowo-naczyniowymi (81).

Proponuje się szereg mechanizmów, odpowiedzialnych za to zjawisko (Tab. 1).

Tabela 1. Mechanizmy oporności na aspirynę (wg McKee i wsp. 2002, zmodyfikowane)

Zewnętrzne	Wewnętrzne
1. Nieadekwatne dawkowanie ASA (83) 2. Jednoczesne przyjmowanie innych niesterydowych leków przeciwzapalnych (NSAIDs), które mogą zakłócać acetylację cyklooksygenazy przez ASA (84,85) 3. Zwiększona produkcja płytek/dawkowanie aspiryny raz dziennie (86) 4. Aktywacja płytek przez czynniki zewnętrzne, jak palenie tytoniu stres psychogeny, intensywna aktywność fizyczna (87,88)	1. Nieadekwatne zahamowanie indukowalnej COX-2 przez ASA w małej dawce/produkcja TXA₂ przez płytki mimo zahamowania COX-1(89) 2. Polimorfizm genu dla COX-1, który zmienia strukturę jej centrum aktywnego i zapobiega acetylacji przez aspirynę (90) 3. Produkcja PGH₂ przez komórki jądrazte (makrofagi, komórki śródbłónka) posiadające aktywną COX-1/ “przeciek” PGH₂ do płytek krwi (91) 4. Polimorfizm glikoproteiny IIb/IIIa (33) 5. Zwiększona wrażliwość płytek na agonistów – kolagen, ADP (92,93). 6. Nieadekwatne zahamowanie aktywacji płytek przez erytrocyty (94) 7. Produkcja PGF_{2α}, aktywnego produktu peroksydacji kwasu arachidonowego (95) 8. Hipercholesterolemia (96) 9. Cukrzyca (97)

1.3. Kłopidogrel

1.3.1. Historia

Pierwszą pochodną tienopirydyn o silnym działaniu przeciwplatek, wprowadzoną do kliniki u schyłku lat siedemdziesiątych XX wieku, była tiklopidyna (98). Lek powodował u ok. 2% pacjentów neutropenię, czasem o ciężkim przebiegu (99), a ponadto, bardzo rzadko, plamicę zakrzepową małopłytkową, zwaną również zespołem Moschkowitza (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) (100). Kłopidogrel, kolejny lek tej grupy, wprowadzono w latach dziewięćdziesiątych XX wieku. W strukturze chemicznej różni się on od tiklopidyny jedynie obecnością grupy karboksymetylowej (101), niemniej zdecydowanie rzadziej wykazuje efekty uboczne i jest lepiej tolerowany (102). Jest też, niestety, preparatem droższym.

1.3.2. Mechanizm działania i farmakokinetyka

Kłopidogrel jest inhibitorem płytkowego receptora purynowego P2Y₁₂. Poprzez jego zablokowanie, lek nieodwracalnie hamuje indukowaną przez ADP agregację płytek krwi, jak również aktywację GP IIb/IIIa i wiązanie fibrynogenu (Tab. 2).

Kłopidogrel jest nieaktywny *in vitro*, w trakcie jego metabolizmu przez cytochrom P450 w wątrobie uwalniany jest aktywny przeciwplatekowo metabolit (103). Działanie hamujące płytki krwi rozpoczyna się 24-48 godzin po zażyciu leku (101), a stały poziom aktywności jest osiągany w ciągu 3-7 dni. Po odstawieniu kłopidogrelu, jego efekt przeciwplatekowy utrzymuje się jeszcze przez kolejne 5-7 dni (104).

1.3.3. Inne efekty działania kłopidogrelu

W 2002 roku stwierdzono w modelu *ex vivo* hamowanie przez kłopidogrel chemotaksji monocytów zależnej od czynników osocza, aktywacji śródbłonna przez cytokiny i obniżenie poziomu rozpuszczalnej ICAM-1 (105). Dodatkowy efekt przeciwzapalny leku wiąże się z hamowaniem przez niego ekspresji selektyny-P (106), cząstki adhezyjnej obecnej na aktywowanych płytkach, która pośredniczy w ich przyleganiu do leukocytów (107). W modelu zwierzęcym wykazano również, że kłopidogrel działa na mięśniówkę gładką naczyń (aktywność wazomodulacyjna),

powodując obniżenie jej wrażliwości na serotoninę, endotelinę-1 oraz mieszaninę surowicy i osocza bogatopłytkowego z kwasem arachidonowym (108).

Tabela 2. Farmakologiczne właściwości kłopidogrelu wykazane w modelu zwierzęcym (wg Jarvis B i wsp. 2000, zmodyfikowane).

Efekty <i>in vivo</i> 1) hamowanie tworzenia zakrzepu w modelach zakrzepicy zależnej od płytek krwi (109) 2) hamowanie zakrzepicy w obrębie stentu (110) 3) hamowanie ścięć intymy po uszkodzeniu śródbłonna (111) 4) aktywność trombolityczna (112)
Efekty <i>ex vivo</i>/płytki krwi 1) nieodwracalne zahamowanie agregacji płytek indukowanej przez ADP (113) 2) osłabienie efektu hamowania cykazy adenylowej przez ADP (114) 3) zmniejszenie ilości miejsc wiążących ADP bez zmiany powinowactwa receptora (115) 4) hamowanie fosforylacji reszt tyrozyny związanej z agregacją (116) 5) wydłużenie czasu krwawienia (113)

1.3.4. Badania kliniczne z kłopidogrelem

Skuteczność kłopidogrelu we wtórnej prewencji CAD została stwierdzona we wspomnianym już badaniu CAPRIE (75). Wykazano, że lek ten ma przewagę nad aspiryną w profilaktyce udaru niedokrwionego mózgu oraz powikłań zakrzepowych u chorych z miażdżycą obwodową. Ustępuje jej pod względem skuteczności jedynie w grupie chorych po przebytym zawale mięśnia sercowego. W badaniu CURE (Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events) i PCI-CURE, kłopidogrel podawany łącznie z ASA był bardziej skuteczny niż sama

aspiryna (117,118). W badaniu CURE zaobserwowano 20% spadek częstości zawału mięśnia sercowego, udaru niedokrwinnego i śmierci z powodu powikłań sercowo-naczyniowych w grupie leczonej kłopidogrelem, w porównaniu z chorymi leczonymi aspiryną. W badaniu CLASSICS (Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study) u chorych, którzy przebyli zabieg stentowania naczyń wieńcowych terapia kłopidogrelem i ASA była bezpieczniejsza niż terapia tiklopidyną i ASA (119). W trwającym obecnie badaniu COMMIT (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial), chorzy ze świeżym zawałem mięśnia sercowego, obok ASA i β -blokerów otrzymują kłopidogrel lub placebo (120). Podobnie zaprojektowane jest, będące w toku, badanie CCS-2 (Second Chinese Cardiac Study) (121). W badaniu CREDO (Clopidogrel for the Reduction of ischaemic Events During Observation) przeprowadzonym u pacjentów poddawanych zabiegowi plastyki naczyń wieńcowych stwierdzono znamiennej redukcję powikłań zakrzepowych po zabiegu w przebiegu długoterminowej (jednorocznej) terapii kłopidogrelem. Wydaje się, że przed planowanym zabiegiem plastyki naczyń wieńcowych nawet wysoką (300 mg) dawkę leku trzeba jednak podawać znacznie wcześniej niż na 3 godziny przed zabiegiem (122). Wiąże się to zapewne z metabolizmem leku.

1.3.5. Zjawisko oporności na kłopidogrel

P. Jaremo oraz P. Barragan i wsp. jako jedni z pierwszych wskazali na zróżnicowane hamowanie czynności płytek krwi przez kłopidogrel (123,124). U niektórych chorych poddawanych zabiegowi angioplastyki z założeniem stentu wykazano bardzo słabą odpowiedź na lek. Za pomocą pomiaru fosforylacji białka aktywowanego substancjami naczyniorozkurczowymi (Vasodilator – Stimulated Phosphoprotein, VASP) udało się wyodrębnić grupę chorych, u których reaktywność płytek krwi po 7 dniach zażywania tienopirydyn wynosiła > 50% (tzw. non- responders) (124). Wydaje się, że istnieje związek pomiędzy brakiem odpowiedzi na kłopidogrel/tiklopidynę a późniejszą ostrą zakrzepicą w obrębie stentu. Obecnie podejmuje się szereg prób znalezienia mechanizmu oporności na kłopidogrel. Według jednej z koncepcji, u pacjentów przyjmujących równolegle kłopidogrel i pewne statyny dochodzi do metabolicznej interferencji obu leków. Jest to efektem jednoczesnego metabolizowania kłopidogrelu oraz atorwastatyny i simwastatyny przez izoenzym

CYP3A4 cytochromu P450 (CYP3A4) (125). W rezultacie może dojść do zmniejszenia się aktywności przeciwplatek kłopidogrelu. Jak wykazano ostatnio, metaboliczna aktywność izoenzymu CYP3A4 koreluje ze stopniem zahamowania czynności płytek przez kłopidogrel (126).

Innym mechanizmem zróżnicowanej odpowiedzi na kłopidogrel może być polimorfizm receptora $P2Y_{12}$ (127). U osób z haplotypem H2 genu dla receptora $P2Y_{12}$ obserwowano bardzo silną agregację płytek krwi w odpowiedzi na ADP, co może stanowić przyczynę słabego hamowania czynności płytek krwi przez tienopiryny (128).

Z drugiej strony, w świetle doniesień o zwiększonej agregacji płytek PI^{A2} , indukowanej przez ADP, stosowanie antagonistów receptora $P2Y_{12}$ mogłoby okazać się skuteczne u chorych z tym polimorfizmem receptora dla fibrynogenu.

2. Cel i założenia pracy

Celem pracy była odpowiedź na pytanie, czy u pacjentów z miażdżycą tętnic dochodzi do zróżnicowanej odpowiedzi na aspirynę i kłopidogrel w zależności od polimorfizmu płytkowej glikoproteiny IIIa. W tym celu oceniono generację trombiny oraz parametry czynności płytek krwi: czas krwawienia i czas zamknięcia apertury mierzony aparatem PFA-100™ przed i po podaniu obu leków. Odpowiedź na powyższe pytanie stworzy możliwość zróżnicowania terapii przeciwplatekowej w profilaktyce choroby niedokrwiennej serca i miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych.

3. Charakterystyka chorych

W badaniu wzięło udział 28 mężczyzn w wieku od 30 do 65 lat z udokumentowaną, stabilną chorobą wieńcową. Pacjentów rekrutowano spośród osób hospitalizowanych w II Katedrze Chorób Wewnętrznych CMUJ oraz leczonych w Ośrodku Chorób Serca i Naczyń przy Katedrze. Wszyscy pacjenci wyrazili zgodę na udział w badaniu, a jego protokół uzyskał aprobatę Komisji Bioetycznej CMUJ. Rozpoznanie choroby wieńcowej postawiono w oparciu o wywiad oraz dodatni test wysiłkowy i/lub angiograficzne cechy miażdżycy naczyń wieńcowych. U sześciu chorych współistniała zarostowa miażdżycą tętnic kończyn dolnych (PAOD), rozpoznana na podstawie badania przedmiotowego i podmiotowego oraz angiografii.

Do kryteriów wykluczających chorych z badania należały:

- a) wiek <30 lub >65 lat
- b) cukrzyca
- c) poziom cholesterolu w surowicy krwi > 6.5 mmol/l
- d) choroba nowotworowa
- e) choroba autoimmunologiczna
- f) niewydolność wątroby i / lub nerek
- g) konieczność przewlekłego leczenia antykoagulacyjnego

Charakterystykę badanej grupy z uwzględnieniem czynników ryzyka choroby wieńcowej przedstawia Tabela 3.

Tabela 3. Czynniki ryzyka choroby wieńcowej wśród badanych chorych.

Czynniki ryzyka	Liczba chorych
Wiek	52,5 ± 7,5
Otyłość (BMI>30)	3
Nadciśnienie tętnicze	15
Hipercholesterolemia	10
Hiperhomocysteinemia	11
Hiperfibrynogynemia	10
Palenie tytoniu w wywiadzie	25
Dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób ukł. sercowo-naczyniowego	17

4. Schemat badania

Chorzy zakwalifikowani do badania nie przyjmowali nitratów i statyn, ponadto 3 tygodnie przed przystąpieniem do projektu nie zażywali żadnych leków przeciwplatektywnych.

W trakcie pierwszego etapu badania pacjenci zażywali aspirynę w dawce 300 mg/dobę przez 14 dni, a następnie po 3-tygodniowym okresie przerwy (tzw. "washout"), kłopidogrel w dawce 75 mg/dobę przez 14 dni. Przed i po podaniu aspiryny, jak również po okresie "washout" wykonywano agregację płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym, przy użyciu kwasu arachidonowego (600 µmol/l), celem oceny czynności płytek krwi.

Pomiar generacji trombiny, czasu krwawienia i badanie przy użyciu aparatu PFA-100™ wykonywano przed i po podaniu obu leków. Badania biochemiczne, morfologię krwi obwodowej i płytki krwi, poziom homocysteiny i fibrynogenu w osoczu oraz oznaczenie przeciwciał antykardiolipinowych wykonywano przed przystąpieniem pacjentów do badania.

5. Materiały i metody

5.1. Analizator płytkowy, PFA- 100™ (Dade Behring, Germany)

Krew pobierano z żyły odłokciowej do 2 plastikowych probówek zawierających zbuforowany cytrynian sodu o stężeniu 3,8 % (Pliva, Kraków). Czas zamknięcia apertury (CT) mierzono przy użyciu wkładu zawierającego kolagen oraz epinefrynę (COL/EPI) lub ADP (COL/ADP). Do rezerwuaru dla próbek krwi każdego z wkładów pipetowano 800 μ L krwi pełnej cytrynianowej i rozpoczynano pomiar czasu zamknięcia apertury w sekundach.

5.2. Agregacja płytek krwi w osoczu bogatopłytkowym (PRP)

Krew pobierano z żyły odłokciowej do plastikowej strzykawki 20 mL zawierającej 3.8% cytrynian sodu (1:9). Po starannym zmieszaniu z antykoagulantem, krew umieszczano w plastikowych probówkach i wirowano przy prędkości 1000 g przez 10 minut w celu uzyskania osocza bogatopłytkowego (PRP). Po odwirowaniu zbierano nadsącz i umieszczano w plastikowej probówce, w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano pozostały materiał przy prędkości 3000 g przez 10 minut, aby uzyskać osocze ubogopłytkowe (PPP). Kolejno oznaczano liczbę płytek krwi w PRP. Jeżeli przekraczała ona 300 tysięcy/ mm^3 , osocze bogatopłytkowe rozcieńczano przy użyciu ubogopłytkowego tak, aby liczba płytek krwi wynosiła 200-300 tysięcy/ mm^3 . Agregację płytek krwi metodą optyczną wykonywano w agregometrze (Chronolog, Havertown, PA, USA) przy użyciu 600 $\mu\text{mol/l}$ kwasu arachidonowego. Osocze ubogopłytkowe służyło jako kontrola dla testu.

5.3. Oznaczenie generacji trombiny

Przy użyciu przyrządu Simplate II (Organon Teknika, Durham, NC, USA) na bocznej powierzchni przedramienia badanych pacjentów wykonywano 2 standardowe nacięcia w warunkach ciśnienia 40 mm Hg, uzyskanego za pomocą sfingomanometru. Krew pobierano przy brzegu nacięcia do heparynizowanych kapilar (Kabe Labortechnik, Numbrecht-Elsenroth, Germany) w odstępach 30-sekundowych, a następnie przenoszono do plastikowych probówek typu "Eppendorf",

zawierających 3,8 % cytrynianu sodu. Uzyskany materiał odwirowywano w temperaturze 4° C przy prędkości 2000 g przez 20 minut. Następnie zbierano nadsącz i zamrażano w temperaturze - 80 ° C.

Generację trombiny oznaczano później w każdej z uzyskanych co 30 sekund próbek poprzez pomiar stężenia fragmentów 1.2 protrombiny (F 1.2) metodą ELISA (Enzygnost® F1.2, Dade Behring, Marburg, Germany).

5.4. Czas krwawienia (BT)

Czas krwawienia mierzono przy użyciu opisanego powyżej zestawu Simplate II, pobierając materiał do oznaczenia generacji trombiny. Po uzyskaniu 2 wartości czasów krwawienia z obu standaryzowanych nacięć, liczono średnią arytmetyczną z obu oznaczeń.

5.5. Oznaczanie polimorfizmu $PI^{A1/A2}$ płytkowej glikoproteiny IIIa

Krew pobierano do 2 plastikowych probówek zawierających 7,5 mg Na₂EDTA jako antykoagulant (Becton Dickinson Vacutainer Systems Europe, England). Materiał odwirowano przy 2000 g przez 10 minut, zbierano nadsącz i zamrażono w plastikowanych probówkach w temperaturze -20 ° C.

Omawiany polimorfizm określano przy pomocy metody reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Para primerów (5'- GCT CCA ATG TAC GGG GTA AAC i 5'- GGG GAC TGA CTT GAG TGA CCT) została użyta do zamplifikowania fragmentu 282 bp intronu 2 i egzonu 2 genu kodującego glikoproteinę IIIa według następującego profilu termicznego: 94° C przez 5 minut, a następnie 34 cykle według schematu: 94 ° C przez 1 minutę, 58 ° C przez 30 sekund oraz 72 ° C przez 1 minutę. Trawienia fragmentów DNA dokonano przy użyciu endonukleazy restrykcyjnej *MSp I*, którą dodano w ilości 2j / 3 µl produktu po amplifikacji, następnie mieszano z 1µl buforu i uzupełniono całość wodą destylowaną do objętości 10 µl. W wyniku reakcji, tylko w obecności allelu PI^{A2} , uzyskiwano fragmenty 125- i 157 bp, dzięki zdolności rozpoznawania przez enzym zamiany tyminy na cytozynę (T → C). Fragmenty te rozdzielano w trakcie elektroforezy w 2% żelu agarozowym oraz uwidaczniiano przy użyciu bromku etydium.

5.6. Pozostałe metody

- a. Morfologię krwi obwodowej oraz liczbę płytek krwi oznaczono przy użyciu aparatu Sysmex K-1000, rozmazy krwi obwodowej barwiono metodą May-Grünwalda i Giemsy i oceniano pod mikroskopem Axiolab (Zeiss).
- b. Badania biochemiczne - enzymy wątrobowe, bilirubinę, glukozę, mocznik, kreatyninę oraz kwas moczowy oznaczano za pomocą analizatora biochemicznego Hitachi typ 911.
- c. Stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji LDL, trójglicerydów określano przy pomocy aparatu Technicon RA-1000, HDL strącano chlorkiem manganu.
- d. Poziom fibrynogenu w osoczu oznaczono metodą nefelometryczną (Dade Behring, Marburg, Germany).
- e. Stężenie homocysteiny całkowitej w osoczu mierzono metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC, wg Mansona i wsp).
- f. Przeciwciała antykardiolipinowe oznaczano własną metodą ELISA (129) wg międzynarodowych standardów E.Harrisa.

5.7. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA™ (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

5.7.1. Statystyka opisowa

Czas krwawienia (BT), czas zamknięcia apertury (CT) oraz stężenie fragmentów F1.2 protrombiny przedstawione w tabelach, wyrażone są jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe (SD). W rycinach przedstawiono średnie arytmetyczne $\pm$ 95% przedział ufności (CI).

5.7.2. Porównanie obu grup pod względem częstości występowania czynników ryzyka choroby wieńcowej oraz liczby płytek krwi

Zastosowano test Wilcoxona oraz Fischera; Wartość $p \leq 0,05$ uznano za znamienne statystycznie.

5.7.3. Generacja trombiny, czas krwawienia (BT) i czas zamknięcia apertury (CT)

- a) Celem porównania badanych grup (PI^{A1} vs PI^{A2}) zastosowano wielokrotną analizę regresji (ANOVA) oraz procedurę Tukey'a. Wartość $p \leq 0,05$ uznano za znamienne statystycznie.
- b) Dodatkowo porównano pola pod krzywymi generacji trombiny w badanych grupach (PI^{A1} oraz PI^{A2}) przed i po podaniu aspiryny i kłopidogrelu. Zastosowano test Wilcoxona dla par powiązanych. Wartość $p \leq 0,05$ uznano za znamienne statystycznie.
- c) Celem oceny kinetyki generacji trombiny obliczono wskaźnik generacji trombiny λ dla obu grup, przed i po zastosowaniu obu leków.

λ obliczono wg wzoru matematycznego:

$$\lambda = (C2-C1)/ (C1 \times T),$$

gdzie $C1$, $C2$ są stężeniami F 1.2, T to interwał czasu w sekundach, w trakcie którego stężenie F1.2 wzrosło z $C1$ do $C2$.

6. Wyniki

6.1. Porównanie obu grup pod względem częstości występowania czynników ryzyka choroby wieńcowej oraz liczby płytek krwi

Homozygoty A₁ i nosiciele allelu PI^{A2} nie różnili się istotnie ani pod względem występowania czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca, ani też podstawowych parametrów morfologicznych i biochemicznych (Tabele 4 i 5).

Tabela 4. Czynniki ryzyka choroby wieńcowej wśród badanych chorych z podziałem na genotypy.

Czynniki ryzyka choroby wieńcowej	A1/A1 (n=19)	A1/A2 ; A2/A2 (n=8 ;1)
Wiek	52.7 ± 8.1	53.4 ± 2.7
Otyłość (BMI>30)	3	0
Nadciśnienie tętnicze	10	5
Hipercholesterolemia	5	5
Hiperhomocysteinemia	7	4
Hiperfibrynogynemia	6	4
Palenie tytoniu w wywiadzie	17	8
Dodatni wywiad rodzinny w kierunku chorób ukł. sercowo-naczyniowego	12	5

Tabela 5. Wyniki badań laboratoryjnych w badanej grupie.

Grupa badana	PI ^{A1}	PI ^{A2}
RBC	4,7 ± 0,4	4,8 ± 0,46
Hb	14,6 ± 2,5	13,9 ± 4,3
Ht	43,9 ± 3	44,9 ± 3,7
Płytki krwi	212,2 ± 54,1	227 ± 74,1
WBC	6,3 ± 1,5	6,46 ± 1,57
Cholesterol całkowity	5,25 ± 0,75	5,67 ± 0,78
Frakcja LDL	3,04 ± 0,76	2,95 ± 1,06
Frakcja HDL	1,17 ± 0,4	1,89 ± 1,3
Trójglicerydy	2,1 ± 1,14	2,03 ± 1,31
Homocysteina	14,12 ± 3,67	17,18 ± 9,26
Kwas moczowy	346,82 ± 58,5	361,8 ± 69,42
Fibrynogen	3,43 ± 0,85	3,17 ± 0,49

6.2. Oznaczenie polimorfizmów glikoproteiny IIIa

U 19 chorych stwierdzono występowanie polimorfizmu PI^{A1/A1}, u 8 osób polimorfizmu PI^{A1/A2}, natomiast jedna osoba była homozygotą PI^{A2/A2}.

6.3. Generacja trombiny

Stężenia F1.2 po i przed podaniem aspiryny (ASA) i kłopidogrelu w grupie PI^{A1} i PI^{A2} zilustrowano w rycinach 4-7. Wartości tych stężeń przedstawiono w tabelach 6-7.

6.3.1. ANOVA, procedura Tukey'a

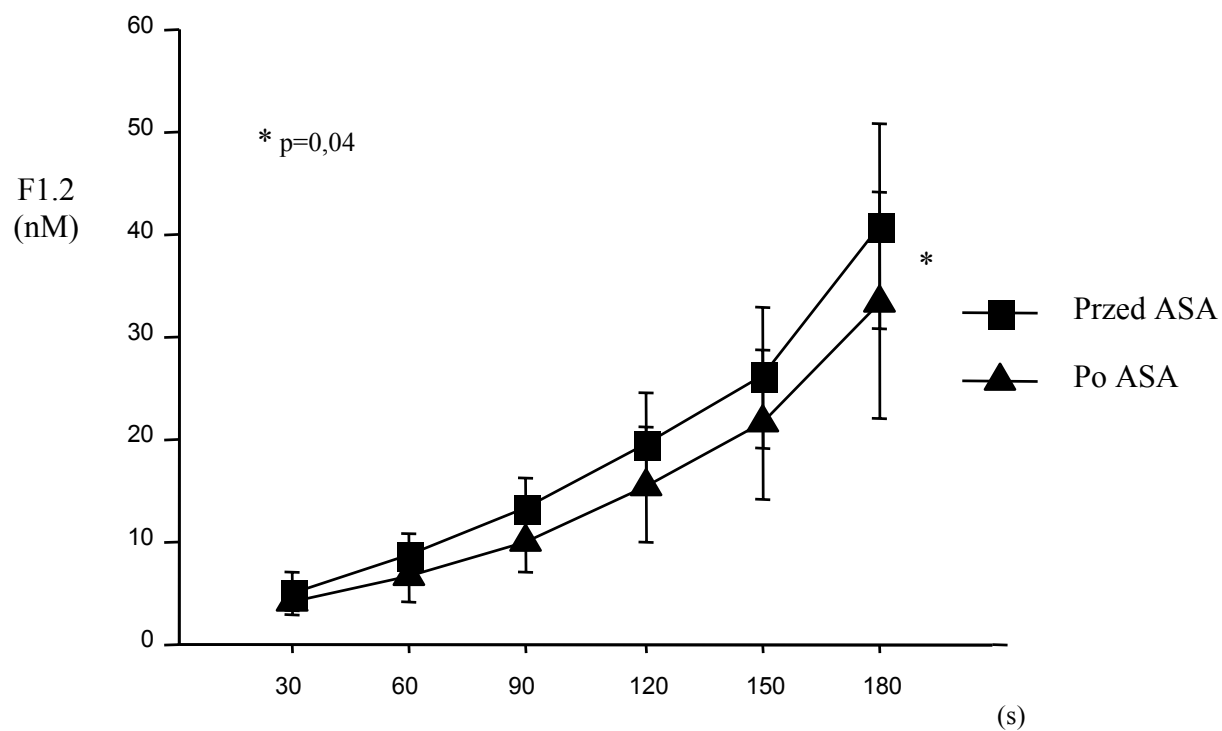
Przed podaniem leków nie wykazano różnic w generacji trombiny pomiędzy grupą PI^{A2} a grupą PI^{A1} ($p = 0,15$). Dwutygodniowa terapia aspiryną obniżyła generację trombiny w grupie PI^{A1} ($p = 0,04$), ale nie w grupie PI^{A2} ($p = 0,69$). Kłopidogrel z kolei obniżył generację trombiny u nosicieli allelu PI^{A2} ($p = 0,02$), lecz nie wpływał na jej powstawanie u homozygot $A1$ ($p = 0,38$).

6.3.2. Test Wilcoxona dla par powiązanych, porównanie pól pod krzywymi generacji trombiny

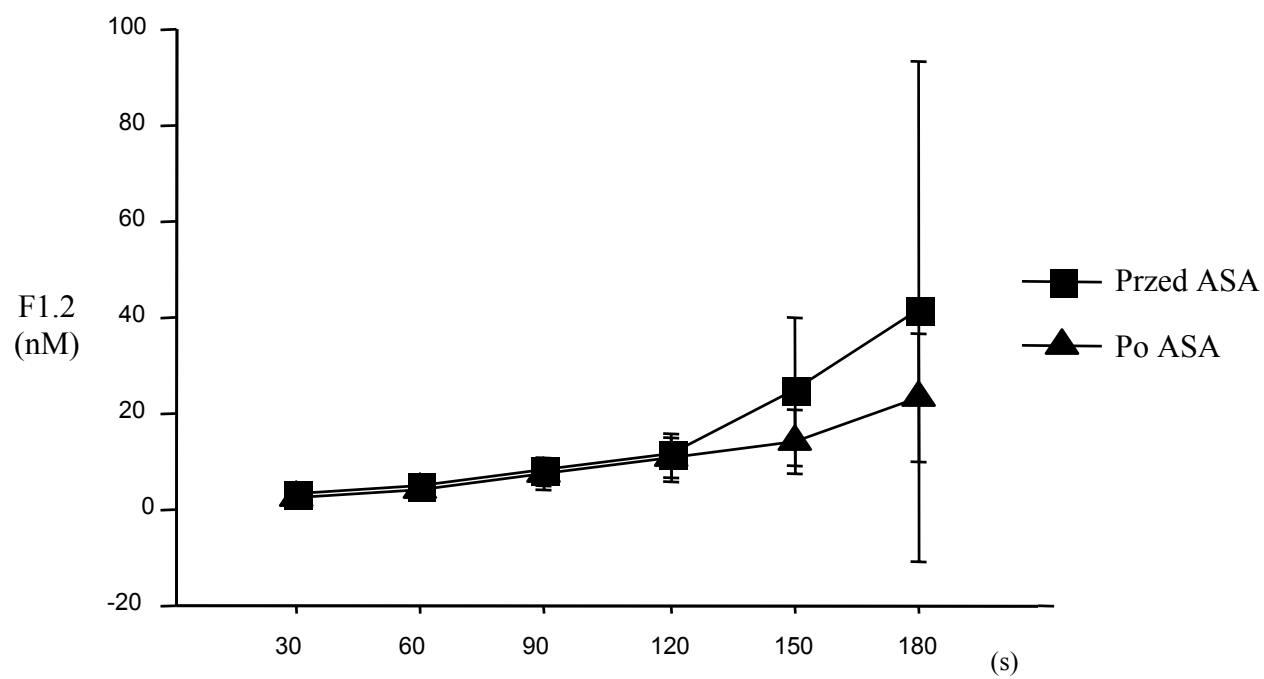
Aspiryna obniżyła generację trombiny w grupie PI^{A1} ($p = 0,04$), lecz nie w grupie PI^{A2} ($p = 0,138$). Kłopidogrel z kolei obniżył generację trombiny u osób z allelem PI^{A2} ($p = 0,028$), lecz nie wpływał na jej tworzenie u homozygot $A1$ ($p = 0,42$) (Tabela 8).

6.3.3. ANOVA, wskaźnik generacji trombiny λ

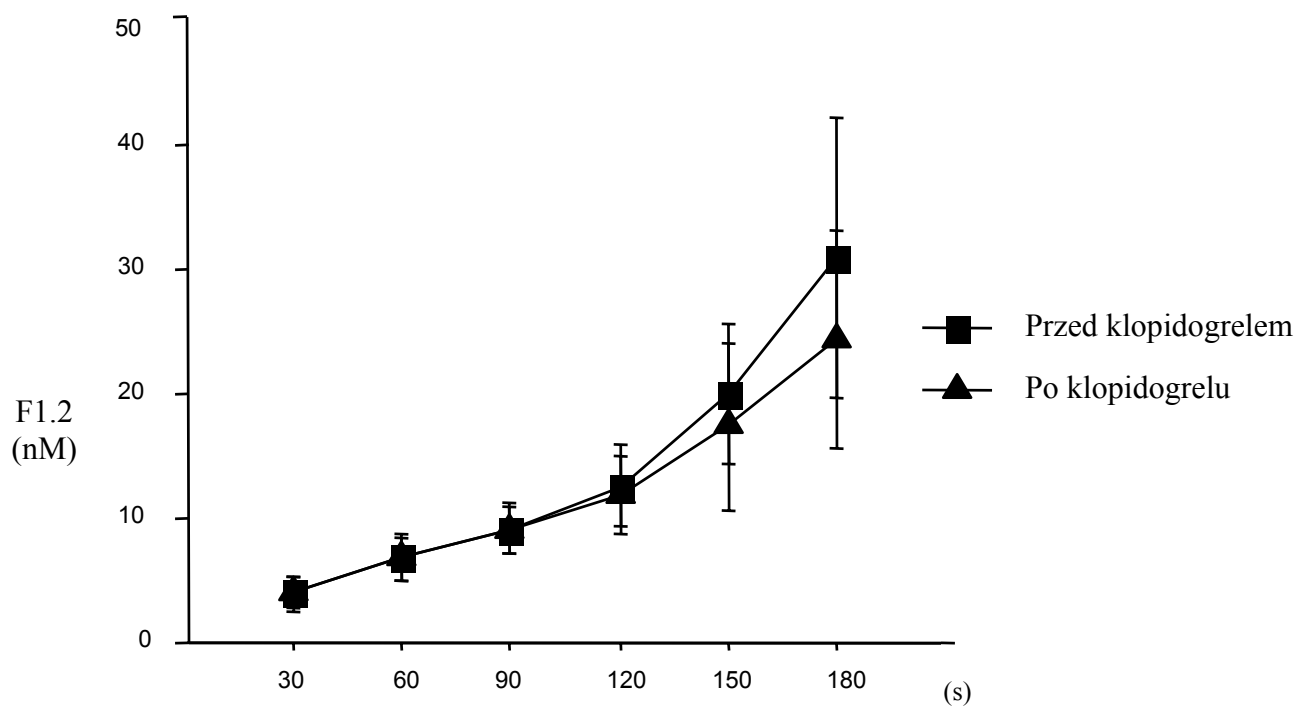
Średnie wartości wskaźników generacji trombiny $\pm$ odchylenia standardowe przedstawia Tabela 8. Stwierdzono, że cząstkowy wskaźnik generacji trombiny λ_1 wzrósł po podaniu aspiryny w grupie PI^{A2} ($p = 0,024$). Kłopidogrel natomiast obniżył cząstkowy wskaźnik generacji trombiny λ_2 zarówno w grupie PI^{A2} ($p = 0,0004$), jak i PI^{A1} ($p < 0,0001$).



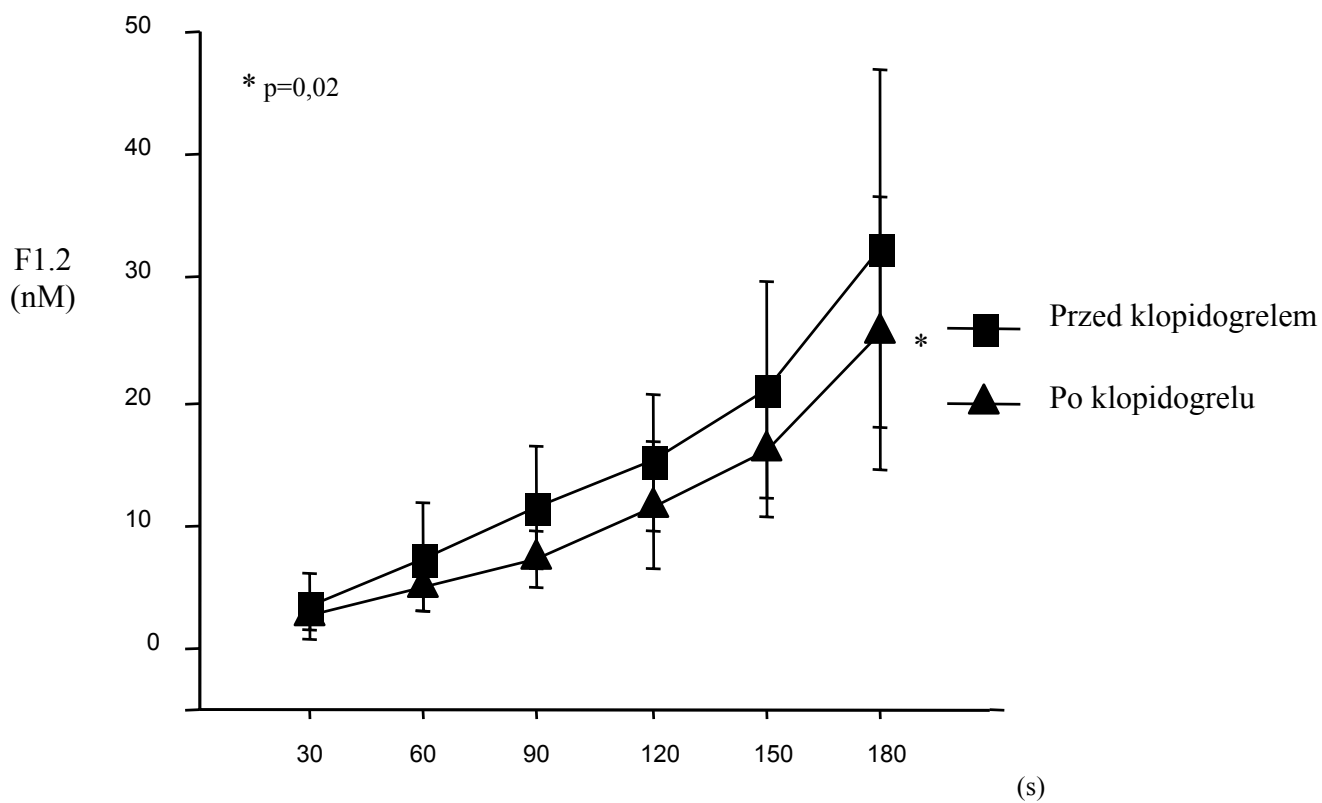
Ryc 4. Stężenie F1.2 w grupie Pl^{A1} przed i po terapii aspiryną.



Ryc 5. Stężenie F1.2 w grupie Pl^{A2} przed i po terapii aspiryną.



Ryc 6. Stężenie F1.2 w grupie PI^{A1} przed i po terapii klopidogrelem.



Ryc 7. Stężenie F1.2 w grupie PI^{A2} przed i po terapii klopidogrelem.

Tabela 6. Stężenie F 1.2 w grupie PI^{A1}.

T (s)	Stężenia F 1.2 (nM)			
	Przed ASA	Po ASA	Przed kłopidogrelem	Po kłopidogrelu
30	5,1 ± 3,73	4,23 ± 3,15	4,1 ± 2,5	3,96 ± 3,1
60	8,55 ± 4,31	6,75 ± 4,97	6,77 ± 3,69	6,8 ± 3,84
90	12,76 ± 6,24	9,7 ± 6,34	9,1 ± 4,16	8,83 ± 4,13
120	18,89 ± 10	15,4 ± 12,11	12,6 ± 6,75	11,82 ± 6,1
150	27,76 ± 17	20,6 ± 15,7	19,96 ± 11,44	18,82 ± 13,19
180	45,35 ± 46,6	30,93 ± 19,91	30,92 ± 23,28	25,56 ± 17,26

Tabela 7. Stężenie F1.2 w grupie PI^{A2}.

T (s)	Stężenia F 1.2 (nM)			
	Przed ASA	Po ASA	Przed kłopidogrelem	Po kłopidogrelu
30	3,64 ± 2,22	2,4 ± 1,72	3,49 ± 3,56	2,78 ± 1,67
60	4,98 ± 2,31	4,14 ± 2,5	7,38 ± 5,52	4,76 ± 2,12
90	8,1 ± 4,04	8,33 ± 3,1	11,32 ± 6,46	7,29 ± 3,04
120	11,98 ± 5,82	10,96 ± 3,94	15,1 ± 7,4	11,59 ± 6,53
150	19,71 ± 10,94	16,13 ± 8	20,97 ± 11,28	15,88 ± 6,57
180	29,27 ± 20,57	28,32 ± 25,95	32,53 ± 18,8	25,58 ± 14,27

Tabela 8. Kinetyka generacji trombiny. Pole pod krzywą $Fl.2(T)$, S, jako całkowita generacja trombiny oraz wskaźnik generacji trombiny λ .

Etap badania	S		λ	
	PI ^{A1}	PI ^{A2}	PI ^{A1}	PI ^{A2}
Przed ASA	2795,5 ± 1640,5	1836 ± 916,6	0,0184 ± 0,003	0,0174 ± 0,004
Po ASA	2100,7 ± 1388,5*	1647,7 ± 800,2	0,0164 ± 0,004	0,0218 ± 0,009
Przed kłopidogrelem	1976,5 ± 1026,5	2182,1 ± 1121,8	0,0169 ± 0,005	0,0196 ± 0,012
Po kłopidogrelu	1830,3 ± 1009,1	1611,0 ± 679,5**	0,0153 ± 0,006	0,0188 ± 0,004

* $p = 0,04$, ** $p = 0,028$, w porównaniu do wartości wyjściowych

6.4. Czas krwawienia (BT)

Nie stwierdzono różnicy między długością czasu krwawienia w grupie PI^{A1} i PI^{A2} ($p = 0,13$) na początku badania. Aspiryna wydłużała czas krwawienia w grupie PI^{A1} ($p = 0,02$) w przeciwieństwie do nosicieli allelu PI^{A2} ($p = 0,1$). Kłopidogrel odwrotnie, wydłużał czas krwawienia u nosicieli allelu PI^{A2} ($p = 0,0008$), nie wykazując tego efektu u homozygot A1 ($p = 0,18$) (Tab. 9).

Tabela 9. Czas krwawienia (BT).

BT (s)	Przed ASA	Po ASA	Przed kłopidogrelem	Po kłopidogrelu
PI ^{A1}	472,3 ± 139,5	560,1 ± 146,8*	549,8 ± 173,2	599,9 ± 130
PI ^{A2}	409,1 ± 84,7	497,7 ± 66,7	452 ± 136,3	653,2 ± 149,5**

* $p = 0,02$; ** $p = 0,0008$, w porównaniu do wartości wyjściowych

6.5. Czas zamknięcia apertury (CT)

Nie stwierdzono różnic między czasami zamknięcia apertury aparatu PFA-100™ w grupie PI^{A1} i PI^{A2} ($CEPI-p=0,28$; $CADP-p=0,4$) na początku badania.

Aspiryna wydłużała czas zamknięcia apertury wkładu z epinerfryną (CEPI) zarówno w grupie homozygot $A1$ ($p=0,001$), jak i nosicieli allelu PI^{A2} ($p=0,0145$).

Nie obserwowano takiego efektu przy użyciu wkładu zawierającego ADP.

Klopidogrel nie wpływał w ogóle na czas zamknięcia apertury przy użyciu obu wkładów (Tabela 10).

Tabela 10. Czas zamknięcia apertury (CT) PFA-100™

Etap badania	PI^{A1}		PI^{A2}	
	CADP	CEPI	CADP	CEPI
Przed ASA	$92,4 \pm 25,2$	$125,6 \pm 42,4$	$85,3 \pm 6,6$	$109,1 \pm 18,5$
Po ASA	$91,3 \pm 25,7$	$207,4 \pm 80,1^*$	$87,3 \pm 22,6$	$217,4 \pm 98,1^{**}$
Przed klopidogrelem	$86,3 \pm 14,5$	$121,4 \pm 23,3$	$89,4 \pm 17,9$	$126,0 \pm 27,8$
Po klopidogrelu	$84,8 \pm 23,1$	$123,2 \pm 35,7$	$98,4 \pm 24,7$	$125,5 \pm 38,6$

* $p=0,001$; ** $p=0,0145$, w porównaniu do wartości wyjściowych

7. Dyskusja

Rola płytkowej glikoproteiny IIb/IIIa w tworzeniu trombiny polega na wiązaniu protrombiny i stymulacji powstawania prozakrzepowych mikrocząstek (130,131).

Zablokowanie przyłączania protrombiny do tej integriny zmniejsza generację trombiny o 40-70 % (132,133).

Polimorfizm Pro33 w podjednostce β_3 glikoproteiny powoduje zmianę konformacji przestrzennej receptora (134), co może zmieniać jego powinowactwo do ligandów.

U pacjentów z chorobą wieńcową, którzy byli nosicielami allelu PI^{A2} rzeczywiście stwierdzono słabą odpowiedź na antagonistów receptora GP IIb/IIIa (135,136), a zatem obecność tego polimorfizmu mogłaby wpływać również na skuteczność przewlekłej terapii przeciwplatekowej.

Celem pracy była ocena przeciwwakrzepowego działania aspiryny i kłopidogrelu u pacjentów z miażdżycą tętnic, w zależności od występowania polimorfizmu glikoproteiny płytkowej IIIa.

Aspiryna zmniejszyła generację trombiny u homozygot $A1$, a kłopidogrel wyłącznie u osób z allelem Pro33. Podobne efekty działania aspiryny obserwowano u zdrowych nosicieli allelu PI^{A1} (33,137).

Wpływ aspiryny na tworzenie trombiny, bez analizy związku z polimorfizmem receptora dla fibrynogenu, był przedmiotem zainteresowania kilku badaczy.

U zdrowych ochotników stwierdzono zmniejszenie tworzenia trombiny przez aspirynę, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *ex vivo* (138,139). Aspiryna nie hamowała jednak generacji trombiny u chorych ze stabilną chorobą wieńcową, pacjentów po zawale serca oraz chorych z utrwalonym migotaniem przedsionków (140-142). Podobne obserwacje uzyskano u pacjentów z utrwalonym migotaniem przedsionków oraz u chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi bez uniesienia odcinka ST, którzy otrzymywali aspirynę oraz kłopidogrel (143,144).

Stwierdzono korelację pomiędzy wysokimi wartościami generacji trombiny ("persistent thrombin generation") a zawałem mięśnia sercowego, udarem i innymi epizodami niedokrwieniami, co potwierdza wcześniejsze doniesienie A. Szczeklika i wsp. (145). Nadreaktywność płytek krwi w ostrych epizodach sercowo-naczyniowych, jak i zwiększona ekspresja czynnika tkankowego w płytkach miażdżycowych mogłyby tłumaczyć mechanizm tego zjawiska (146,147) oraz stanowić jedną z przyczyn braku skuteczności leków przeciwplatekowych

w hamowaniu trombinogenezy.

W omawianym badaniu aspiryna nie zmniejszyła kinetyki generacji trombiny u homozygot A1, a u nosicieli allelu PI^{A2} stwierdzono nawet zwiększony wskaźnik generacji trombiny w fazie początkowej (λ_1). Brak wpływu aspiryny na kinetykę tworzenia trombiny obserwowano zarówno u chorych z hipercholesterolemią (148), jak i zdrowych ochotników (149). W innych doniesieniach stwierdzono natomiast wydłużenie fazy opóźnienia ("lag phase") i/lub zmniejszenie maksymalnego wskaźnika generacji trombiny przez aspirynę u zdrowych ochotników (150-152). Brak wpływu aspiryny na kinetykę generacji trombiny u homozygot A1 w omawianym badaniu może wiązać się z występowaniem hipercholesterolemii u niektórych chorych (149, 154-156). U pewnych pacjentów, będących nosicielami allelu Pro33, obserwowano zwiększoną generację trombiny po aspirynie w pierwszych 30-60 sekundach pomiaru, stąd zwiększył się wskaźnik generacji trombiny λ_1 .

Interesującą obserwacją jest redukcja wskaźnika generacji trombiny w fazie początkowej (λ_2) przez klopidoogrel i to niezależnie od występowania polimorfizmu integryny IIIa. Jak wykazano w modelu zwierzęcym, klopidoogrel hamuje generację trombiny i zmniejsza jej maksymalne stężenie (157). Brak jest natomiast danych na temat wpływu tej tienopirydyny na generację trombiny u ludzi, za wyjątkiem badań wspomnianych wcześniej, w których była podawana łącznie z aspiryną (143, 144). Zastosowanie innych niż klopidoogrel antagonistów receptora $P2Y_{12}$ u zdrowych ochotników zmniejszało wskaźnik generacji trombiny lub, paradoksalnie, nieco zwiększało maksymalne stężenie trombiny (152).

Odpowiedź na leki przeciwplatekcyjne u pacjentów z miażdżycą tętnic jest uwarunkowana zarówno czynnikami środowiskowymi, jak i genetycznymi.

W omawianym badaniu nie stwierdzono różnic w zakresie czynników ryzyka miażdżycy tętnic pomiędzy homozygotami A1 a nosicielami allelu PI^{A2} .

Powstaje zatem pytanie, w jaki sposób polimorfizm PI^{A2} modyfikuje działanie aspiryny i klopidoogrelu i wpływa na zależną od płytek krwi generację trombiny.

Aspiryna acetyluje białka błony komórkowej płytek krwi (158) i zmienia jej płynność (159); acetyluje ponadto receptor dla fibrynogenu (160) i hamuje jego aktywację przez interakcję z wewnątrzkomórkowym układem sygnalizacyjnym (161). Ponieważ wykazano, że leki blokujące integrynę IIb/IIIa zmniejszają wiązanie czynników V/Va

do powierzchni płytek (162), sądzi się, że może być to również jeden z mechanizmów działania aspiryny.

W obecności polimorfizmu PI^{A2} aspiryna może mieć jednak mniejsze powinowactwo do integryny IIb/IIIa, tak jak dzieje się to w przypadku abciximabu (135). Aspiryna prawdopodobnie acetyluje protrombinę (138), która może być zakotwiczona do integryny IIb/IIIa. W ten sposób polimorfizm PI^{A2} miałby również wpływ na aktywację protrombiny.

Płytki krwi osób z polimorfizmem Pro33 silniej wiążą fibrynogen pod wpływem stymulacji ADP (26), co mogłoby tłumaczyć skuteczne zahamowanie ich czynności przez kłopidogrel w grupie badanych pacjentów – nosicieli allelu PI^{A2} . Z drugiej strony, u chorych poddawanych stentowaniu naczyń wieńcowych nie potwierdzono tej obserwacji (163). Przyczyną różnic jest prawdopodobnie nadreaktywność płytek PI^{A2} i ich dodatkowa stymulacja przez zakładanie stentu do naczyń wieńcowych i terapię heparyną (164). Co więcej, metabolizm kłopidogrelu jest prawdopodobnie osobniczo zmienny (125) i hamowany przez pewne statyny, choć w tej kwestii opinie są rozbieżne (165,166). Ponieważ inhibitory HMG-CoA reduktazy są szeroko stosowane u chorych poddawanych zabiegom interwencyjnym na naczyniach wieńcowych, czynniki te mogą również wpływać na skuteczność terapii kłopidogrelem.

Nie jest jasna przyczyna, dla której kłopidogrel nie hamuje generacji trombiny u homozygot A1. Być może jego działanie jest modyfikowane przez inne czynniki genetyczne. Jednym z nich wydaje się być polimorfizm receptora purynowego $P2Y_{12}$, ponieważ u osób z haplotypem H2 genu dla tego receptora obserwowano bardzo silną agregację płytek krwi w odpowiedzi na ADP (128). Powyższy polimorfizm wiązano nie tylko z opornością na tienopirydyny, lecz także ze większą częstością występowania miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych (128,167).

W omawianym badaniu oceniano również czas krwawienia i zamknięcia apertury (CT) jako parametry czynności płytek krwi w odpowiedzi na oba leki przeciwplatekcyjne.

Aspiryna wydłużyła czas krwawienia u homozygot A1, lecz nie u nosicieli allelu PI^{A2} , co potwierdzają wcześniejsze obserwacje w grupie zdrowych ochotników (31).

Kłopidogrel wydłużył czas krwawienia wyłącznie u chorych z polimorfizmem PI^{A2} .

Wydłużenie czasu krwawienia przez aspirynę oraz przez kłopidogrel, już bez analizy związku z polimorfizmem glikoprotein płytkowych, obserwowano również w kilku

badaniach klinicznych u chorych z miażdżycą tętnic wieńcowych i obwodowych (168-171).

W omawianym badaniu aspiryna wydłużyła czas zamknięcia apertury PFA-100™ na wkładzie z epinefryną (CEPI CT) zarówno u homozygot A1, jak i nosicieli allelu Pro33. W przypadku kłopidogrelu nie obserwowano takiego efektu przy użyciu wkładu z ADP (CADP CT). Wydłużenie CEPI CT przez aspirynę potwierdzają liczne publikacje (80,172,173) i wiele z nich podkreśla przydatność PFA-100™ w diagnozowaniu oporności na aspirynę (80,172-174).

Większość doniesień wskazuje natomiast na brak wpływu kłopidogrelu i innych antagonistów receptora P2Y₁₂ na CADP CT w PFA-100™ (175-177); wydłużenie czasów zamknięcia apertury obserwowano jedynie u chorych leczonych jednocześnie aspiryną i kłopidogrelem (176,178).

Nie jest jasne, w jakich okolicznościach polimorfizm glikoproteiny IIIa może mieć wpływ na parametry czynności płytek krwi mierzone w PFA-100™.

U chorych z polimorfizmem Pl^{A2} glikoproteiny IIIa i 807 T/C integryny Ia/IIa i epizodami niedokrwieniami po pomostowaniu aortalno-wieńcowym stwierdzono skrócenie czasu zamknięcia apertury na wkładzie z ADP (179). Prawdopodobnie współistnienie kilku „prozakrzepowych” polimorfizmów glikoprotein płytkowych powoduje skrócenie obu czasów zamknięcia apertury, co potwierdza doniesienie L. Pontiggia (180). Inne badania nie stwierdzają związku między polimorfizmem Pro33 receptora dla fibrynogenu a zmienioną czynnością płytek ocenianą przez aparat PFA-100™ (181).

Rozbieżności pomiędzy klasycznym czasem krwawienia i tak zwanym „czasem krwawienia *in vitro*”, mierzonym przez aparat PFA-100™, są spowodowane najpewniej warunkami badania i różnicami w metodyce.

Tradycyjny czas krwawienia jest metodą *ex vivo*, natomiast pomiar czasu zamknięcia apertury jest sztucznym modelem hemostazy *in vitro*. Nie oznacza to wyższości klasycznego czasu krwawienia nad tym mierzonym przez analizator płytkowy, lecz wskazuje na to, że czas zamknięcia apertury nie może być traktowany jako „czas krwawienia *in vitro*”. Aparat PFA-100™ symuluje proces adhezji i agregacji płytek krwi po uszkodzeniu naczynia, przy użyciu wkładów, które zawierają kolagen oraz epinefrynę lub ADP w komercyjnie dobranych stężeniach. Duże stężenie ADP na membranie wkładu (50 µg) PFA-100™ i silna aktywacja płytek krwi w kontakcie z membraną jest prawdopodobnie przyczyną, dla której kłopidogrel nie ma wpływu

na CADP CT. Konieczna byłaby zatem modyfikacja aparatu PFA-100™, gdyby chciano użyć go do laboratoryjnej diagnostyki oporności na tienopirydyny.

U chorych z miażdżycą tętnic obserwowano zróżnicowaną odpowiedź na leki przeciwplatekcyjne w zależności od polimorfizmu glikoproteiny IIIa. Aspiryna jest skuteczna u chorych z polimorfizmem PI^{A1} , natomiast nosiciele allelu PI^{A2} wymagają terapii kłopidogrelem, lub, w zależności od kontekstu klinicznego, oboma lekami (182).

Zdaniem D. Mukherjee i E. Topola: “Farmakogenomika pozwala poznać uwarunkowaną genetycznie odpowiedź na lek i w konsekwencji pomaga w zindywidualizowaniu lub łączeniu terapii” (182).

Kontynuacja badań nad pozostałymi czynnikami genetycznymi, które wpływają na skuteczność leków przeciwplatekcyjnych stanie się kluczowym zadaniem współczesnej farmakogenomiki. Posłużą one lepszemu poznaniu mechanizmów oporności na aspirynę i kłopidogrel oraz zapobieganiu nawrotowym epizodom niedokrwinnym u chorych z miażdżycą tętnic.

8. Streszczenie

Celem niniejszej rozprawy była analiza przeciwzakrzepowego działania aspiryny i kłopidogrelu u chorych z miażdżycą tętnic w zależności od występowania polimorfizmu glikoproteiny płytkowej IIIa. U dwudziestu ośmiu pacjentów z chorobą wieńcową, spośród których sześciu miało współistniejącą miażdżycę zarostową tętnic kończyn dolnych, oceniano generację trombiny, czas krwawienia i zamknięcia apertury w aparacie PFA-100™ przed i po podaniu aspiryny i kłopidogrelu. Aspiryna zahamowała generację trombiny i wydłużyła czas krwawienia u homozygot A1, ponadto wydłużyła czas zamknięcia apertury wkładu z epinefryną bez względu na obecność polimorfizmu glikoproteiny IIIa. Kłopidogrel zahamował trombinogenezę i wydłużył czas krwawienia wyłącznie u nosicieli allelu Pl^{A2} , nie modyfikując czasu zamknięcia apertury na wkładzie z ADP, zarówno w grupie Pl^{A2} , jak i Pl^{A1} . Uzyskane wyniki wskazują na możliwość indywidualnego doboru terapii przeciwplatekowej u chorych z miażdżycą tętnic w zależności od występowania polimorfizmu glikoproteiny IIIa. Nosiciele allelu Pl^{A2} wymagają leczenia kłopidogrelem, natomiast aspiryna jest lekiem z wyboru w grupie homozygot A1.

Summary

The aim of the dissertation was to analyze the influence of platelet glycoprotein IIIa polymorphism on the antithrombotic effects of aspirin and clopidogrel in patients with atherosclerosis. Thrombin generation, bleeding time and closure time of the PFA-100™ aperture were evaluated in twenty eight patients with coronary heart disease before and after aspirin and clopidogrel intake; six of the 28 patients had co-existing peripheral arterial occlusive disease. Aspirin inhibited thrombin generation and prolonged bleeding time in homozygotes A1. The prolongation of the epinephrine cartridge closure time by aspirin was not influenced by the presence of the polymorphism of platelet glycoprotein IIIa. Clopidogrel inhibited thrombinogenesis and prolonged bleeding time in PI^{A2} allele carriers only and did not alter the ADP cartridge closure time in either the PI^{A2} or the PI^{A1} group.

The study results indicate that the choice of antiplatelet therapy could be made on an individual basis, based on platelet glycoprotein IIIa polymorphism. The PI^{A2} allele carriers require clopidogrel treatment and aspirin is a drug of choice in the homozygotes A1.

9. Wnioski

1. Polimorfizm płytkowej glikoproteiny IIIa wpływa na przeciwzakrzepowe działanie aspiryny i kłopidogrelu u chorych z miażdżycą tętnic;
 - a. Aspiryna hamuje generację trombiny i wydłuża czas krwawienia u homozygot A1, natomiast kłopidogrel zmniejsza trombinogenezę i wydłuża czas krwawienia u nosicieli allelu P1^{A2}.
 - b. Aspiryna skutecznie hamuje czynność płytek u homozygot A1, natomiast kłopidogrel u nosicieli allelu P1^{A2}.
2. W prewencji choroby wieńcowej terapia przeciwplatekowa mogłaby być stosowana indywidualnie, w zależności od występowania polimorfizmu glikoproteiny IIIa, składowej receptora dla fibrynogenu.

10. Piśmiennictwo

1. Ross R. Atherosclerosis- An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
2. Ferroni P, Basili S, Davi G. Platelet activation, inflammatory mediators and hypercholesterolemia. *Curr Vasc Pharmacol* 2003; 1:157-69.
3. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Int Med* 2000; 247:349-58.
4. Higgins JP. Chlamydia pneumoniae and Coronary Artery Disease: The Antibiotic Trilas. *Mayo Clin Proc* 2003; 78:321-2.
5. Barton M, Haudenschild CC. Endothelium and Atherogenesis: Endothelial Therapy Revisited. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38 (Supl 2): S 23-5.
6. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa- Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin –1- dependent mechanism. Implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2000; 148:75-85.
7. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig, Brand K. Activated platelets induce secretion of monocyte chemotactic protein-1 and surface expression of intercellular adhesion molecule –1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98:1164-71.
8. Dickfeld T, Lengyel E, May AE, Massberg S, Brand K, Page S, Thielen C, Langenbrink K, Gawaz M. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte – chemoattractant protein-1 via p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2001; 49:189-99.
9. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller- Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391:591-4.
10. LeBreton H, Topol E, Plow EF. Evidence for a pivotal role of platelets in vascular reocclusion and restenosis. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 235-6.
11. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, Doi K, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Chun TH, Masatsugu K, Becker AE, Nakao K. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Coronary Atherosclerotic Lesions. Possible Pathophysiological Significance of VEGF in Progression of Atherosclerosis. *Circulation* 1998; 98:2108-16.
12. Tracy PB. Role of Platelets and Leukocytes in Coagulation. W: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Eds.: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Fourth Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 575-96.

13. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83:1778-81.
14. Von der Borne AEG, Decary F. Nomenclature of platelet specific antigen. *Transfusion* 1990; 30:477.
15. Simsek S, Faber NM, Bleeker PM. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood* 1993; 81:835-40.
16. Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF. Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, white and Korean populations. *Transfusion* 1995; 35: 963-7.
17. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334:1090-4.
18. Gardemann A, Humme J, Stricker J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W. Association of the platelet glycoprotein IIIa PlA1/A2 gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients. *Thromb Haemost* 1998; 80:214-7.
19. Garcia-Ribes M, Gonzalez-Lamuno D, Hernandez-Estefania R, Colman T, Pocovi M, Delgado-Rodriguez M, Garcia-Fuentes M, Revuelta JM. Polymorphism of the platelet glycoprotein IIIa gene in patients with coronary stenosis. *Thromb Haemost* 1998; 79:1126-9.
20. Mikkelsen J, Perola M, Laippala P, Savolainen V, Pajarinen J, Lalu K, Penttila A, Karhunen PJ. Glycoprotein IIIa Pl (A) polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2573-8.
21. Mikkelsen J, Perola M, Penttila A, Goldschmidt-Clermont PJ, Karhunen PJ. The GPIIIa (beta3 integrin) PlA polymorphism in the early development of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001; 154:721-7.
22. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PlA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet*. 1997; 349:385-8.
23. Zhu MM, Weedon J, Clark LT. Meta-analysis of the association of platelet glycoprotein IIIa PlA1/A2 polymorphism with myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2000; 86:1000-5, A8.

24. Benze G, Heinrich J, Schulte H, Rust S, Nowak-Gottl U, Tataru MC, Kohler E, Assmann G, Junker R. Association of the GP Ia C807T and GPIIIa PLA1/A2 polymorphisms with premature myocardial infarction in men. *Eur Heart J* 2002; 23:325-30.
25. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, Schmitz C, Sutherland PA, Silbershatz H, D'Agostino RB, Muller JE, Myers RH, Levy D, Tofler GH. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PLA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1142-7.
26. Goodall AH, Curzen N, Panesar M, Hurd C, Knight CJ, Ouwehand WH, Fox KM. Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, PLA2, Zwb) positive platelets in patients with cardiovascular disease. *Eur Heart J* 1999; 20:742-7.
27. Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF. Platelet GP IIIa Pl(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101:1013-8.
28. Andrioli G, Minuz P, Pincelli S, Ortolani R, Lussignoli S, Bellavite P. Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A₂ in subjects with polymorphism of β_3 subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol* 2000; 110:911-8.
29. Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Roos C, Bray PF. The Pl (A2) polymorphism of integrin beta (3) enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 2000; 105:793-802.
30. Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves M. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PLA2): no association with platelet fibrinogen binding. *Br J Haematol* 1999; 105:664-6.
31. Szczeklik A, Undas A, Sanak M, Frolow M, Wegrzyn W. Relationship between bleeding time, aspirin and the PLA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa. *Br J Haematol* 2000; 110:965-7.
32. Szczeklik A, Sanak M, Undas A. Platelet glycoprotein IIIa pl (a) polymorphism and effects of aspirin on thrombin generation. *Circulation* 2001; 103: E 33-4.
33. Undas A, Brummel K, Musial J, Mann K, Szczeklik A. Pl^{A2} Polymorphism of β_3 Integrins Is Associated With Enhanced Thrombin Generation and Impaired Antithrombotic Action of aspirin at the site of Microvascular Injury. *Circulation* 2001; 104:2666-72.
34. Szczeklik A, Musiał J, Undas A. Reasons for resistance to aspirin in cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106:e181-2.
35. Reiner AP, Schwartz SM, Kumar PN, Rosendaal FR, Pearce RM, Aramaki KM, Psaty BM, Siscovick DS. Platelet glycoprotein IIb polymorphism, traditional risk

factors and non- fatal myocardial infarction in young women. *Br J Haematol* 2001;112:632-6.

36. Hato T, Minamoto Y, Fukuyama T, Fujita S. Polymorphisms of HPA-1 through 6 on platelet membrane glycoprotein receptors are not a genetic risk factor for myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardiol* 1997; 80:1222-24.

37. Bottiger C, Kastrati A, Koch W, Mehilli J, Seidl H, Schomig K, von Beckerath N, Schomig A. HPA-1 and HPA-3 polymorphisms of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2000; 83(4):559-62.

38. George JN. Platelets. *Lancet* 2000; 355:1531-9.

39. Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ. Hereditary variation in platelet integrin $\alpha_2\beta_1$ density is associated with two silent polymorphisms in the α_2 coding sequence. *Blood* 1997; 89:1939-43.

40. Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A. Association of the platelet glycoprotein Ia C₈₀₇T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 1999; 93:2449-53.

41. Carlsson LE, Santoso S, Spitzer C, Kessler C, Greinacher A. The α_2 gene coding sequence T₈₀₇/A₈₇₃ of the platelet collagen receptor integrin $\alpha_2\beta_1$ might be a genetic risk factor for the development of stroke in young patients. *Blood* 1999; 93:3583-6.

42. Reiner AP, Kumar PN, Schwartz SM, Longstreth WT Jr, Pearce RM, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS. Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women. *Stroke* 2000; 31:1628-33.

43. von Beckerath N, Koch W, Mehilli J, Bottiger C, Schomig A, Kastrati A. Glycoprotein Ia gene C807T polymorphism and risk for major adverse cardiac events within the first 30 days after coronary artery stenting. *Blood* 2000; 95:3297-301.

44. Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese. An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost* 2001; 85:226-30.

45. Lopez JA, Ludwig EH, McCarthy BJ. Polymorphism of human glycoprotein Ib alpha results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region. Structure/function implications. *J Biol Chem* 1992; 267:10055-61.

46. Li CQ, Garner SF, Davies J, Smethurst PA, Wardell MR, Ouwehand WH. Threonine-145/methionine-145 variants of baculovirus produced recombinant ligand binding domain of GPIbalpha express HPA-2 epitopes and show equal binding of von Willebrand factor. *Blood* 2000; 95:205-11.

47. Afshar-Kharghan V, Li CQ, Khoshnevis-Asl M, Lopez JA. Kozak sequence polymorphism of the glycoprotein (GP) Ibalpha gene is a major determinant of the plasma membrane levels of the platelet GP Ib-IX-V complex. *Blood* 1999; 94:186-91.
48. Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, Vicente V. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 1998; 92:2771-6.
49. Mikkelsen J, Perola M, Penttila A, Karhunen PJ. Platelet glycoprotein Ibalpha HPA-2 Met/VNTR B haplotype as a genetic predictor of myocardial infarction and sudden cardiac death. *Circulation* 2001; 104:876-80.
50. Carlsson LE, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C. Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the platelet receptors for fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand factor (GPIb/IX), and collagen (GPIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke. *Stroke* 1997; 28:1392-5.
51. Boncler MA, Golanski J, Paczuski R, Watala C. Polymorphisms of glycoprotein Ib affect the inhibition by aurintricarboxylic acid of the von Willebrand factor dependent platelet aggregation. *J Mol Med* 2002; 80:796-801.
52. Frank MB, Reiner AP, Schwartz SM, Kumar PN, Pearce RM, Arbogast PG, Longstreth WT Jr, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS. The Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Ibalpha and risk of nonfatal myocardial infarction and nonfatal stroke in young women. *Blood* 2001; 97:875-9.
53. Jack DB. One hundred years of aspirin. *Lancet* 1997; 350:437-9.
54. Craven LL. Acetylic acid; possible preventive of coronary thrombosis. *Ann West Med Surg* 1950; 4:95-9.
55. Craven LL. Prevention of coronary and cerebral thrombosis. *Miss Val Med J* 1956; 78:213-5.
56. Quick AJ. Salicylates and bleeding: the aspirin tolerance test. *Am J Med Sci* 1966; 252:265-9.
57. Wijnja L, Snijder JA, Nieweg HO. Acetylsalicylic acid as a cause of pancytopenia from bone-marrow damage. *Lancet*. 1966; 2:768-70.
58. Weiss HJ, Aledort LM. Impaired platelet/connective –tissue reaction in man after aspirin ingestion. *Lancet* 1967; 2:495-7.
59. Penderson AK, Fitzgerald GA. Dose related kinetics of aspirin: presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N Engl J Med* 1984; 311:1206-11.
60. Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 1975; 56:624-32.

61. Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nat Struct Biol* 1995; 38:97-120.
62. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38:97-120.
63. Musiał J, Radwan J, Szczeklik A. Aspirin delays thrombin generation in vitro through interaction with platelet phospholipids. *Thromb Res* 1997;85:367-8.
64. Vane JR. Inhibition of prostaglandin biosynthesis as a mechanism of action of aspirin- like drugs. *Nature New Biol* 1971; 231:232-35.
65. Higgs GA, Salmon JA, Henderson B, Vane JR. Pharmacokinetics of aspirin and salicylate in relation to inhibition of arachidonate cyclooxygenase and antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:1417-20.
66. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265:956-9.
67. Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, Weller PF. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: Cyclooxygenase – independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11091-6.
68. Steer KA, Wallace TM, Bolton CH, Hartog M. Aspirin protects low density protein from oxidative modification. *Heart* 1997; 77:333-7.
69. Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 1998; 97:716-20.
70. Ghiselli A, Laurenti O, De Mattia G, Maiani G, Ferro- Luzzi A. Salicylate hydroxylation as an early marker of in vivo oxidative stress in diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:621-6.
71. Pinckard RN, Hakins D, Farr RS. *In Vitro* acetylation of plasma proteins, enzymes, and DNA by aspirin. *Nature* 1968; 219:68-9.
72. Upchurch GR, Ramdev N, Walsh MT, Loscalzo J. Prothrombotic Consequences of the Oxidation of Fibrinogen and their Inhibition by Aspirin. *J Thromb Thrombolysis* 1998; 5: 9-14.
73. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. Physician's health study: aspirin and primary prevention of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1989; 321:1825-8.
74. Peto R, Gray R, Collins R, Wheatley K, Hennekens C, Jamrozik K, Warlow C, Hafner B, Thompson E, Norton S. Randomised trial of prophylactic daily aspirin in British male doctors. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988; 296:313-6.

75. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348:1329-39.
76. Antiplatelet Trialists' Collaboration . Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy. I. Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994; 308: 81-106.
77. Antithrombotic Trialists' Collaboration . Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.
78. Mehta J, Mehta P, Burger C, Pepine CJ. Platelet aggregation studies in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1978; 31:169-75.
79. Buchanan MR, Brister SJ. Individual variation in the effects of ASA on platelet function. Implications for the use of ASA clinically. *Can J Cardiol* 1995;11:221-7.
80. Gum P, Kottke- Marchant K, Poggio E, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ. Profile and Prevalence of Aspirin Resistance in Patients With Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol* 2001; 88:230-5.
81. Gum PA, Kottke- Marchant K, Welsh P, White J, Topol E. A prospective, Blinded Determination of the Natural History of Aspirin Resistance Among Stable Patients With Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:961-5.
82. Eikelboom JW, Hirsch J, Weitz JJ, Johnson M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin- resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 2002; 105:1650-5.
83. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL, Brace LD. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25:2331-6.
84. Rao GHR, Johnson GG, Reddy KR, White JG. Ibuprofen protects platelet cyclooxygenase from irreversible inhibition by aspirin. *Arteriosclerosis* 1983; 3:383-8.
85. Catella- Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, Fitzgerald GA. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 2001; 345:1809-45.
86. Zimmerman N, Kienzle P, Weber AA, Gams E, Schror K, Hohlfeld T. Aspirin resistance after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121:982-4.
87. Hung J, Lam JYT, Lacoste L, Letchavobski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 1995; 92:2432-6.

88. Hurlen M, Seljeflot I, Arnesen II. Increased platelet aggregation during exercise in patients with previous myocardial infarction. Lack of inhibition by aspirin. *Thromb Res* 2000; 99:487-91.
89. Weber AA, Zimmerman KC, Myerer- Kirchrath J, Schrör K. Cyclooxygenase –2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* 1999; 33:900.
90. Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73:122-30.
91. Halushka MK, Halushka PV. Why are some individuals resistant to cardioprotective effects of aspirin? Could it be thromboxane A₂? *Circulation* 2002; 105:1620-2.
92. Kawasaki T, Ozeki Y, Igawa T et al. Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low- dose aspirin. *Stroke* 2000; 31:591-5.
93. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Allal J, Mauco G, Brizard A. Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate. *Thromb Res* 2002; 107:45-9.
94. Valles J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J, Sanchez E, Broekman MJ, Marcus AJ. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation* 1998; 97:350-5.
95. Cipollone F, Ciabattini G, Patrignani P, Pasquale M, Di Gregorio D, Bucciarelli T, Davi G, Cuccurullo F, Patrono C. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation*.2000; 102:1007-13.
96. Friend M, Vucenik I, Miller M. Research pointers: Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia. *BMJ* 2003; 326:82-3.
97. Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B, Kropiwnicka A, Drzewoski J. Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)-its relation to metabolic control. *Thromb Res* 2004;113:101-13.
98. Ashida SI, Abiko Y. Inhibition of platelet aggregation by a new agent, ticlopidine. *Thromb Haemost* 1978; 40:542-50.
99. Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation*.1999; 100:1667-72.
100. Bennett C, Weinberg P, Rozenberg –Ben-Dror K, Yarnold P, Kwaan H, Green D. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine: a review of 60 cases. *Ann Intern Med* 1998; 128:541-4.

101. Kam PCA, Nethery CM. The thienopyridine derivatives (platelet adenosine diphosphate receptor antagonists), pharmacology and clinical developments. *Anaesthesia* 2003; 58:28-35.
102. Jarvis B, Simpson K. Clopidogrel. A Review of its use in the Prevention of Atherothrombosis. *Drugs* 2000; 60:347-77.
103. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost.* 2000; 84:891-6.
104. Weber AA, Braun M, Hohlfeld T, Schwippert B, Tschöpe, Schrör. Recovery of platelet function after discontinuation of clopidogrel treatment in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52:333-6.
105. Duzendorfer S, Reinisch CM, Kaneider NC, Pechlander Ch, Wiedermann ChJ. Inhibition of plasma-dependant monocyte chemokinesis and cytokine- triggered endothelial activation for neutrophil transmigration by administration of clopidogrel in man. *Austriaca* 2002; 29:100-6.
106. Xiao Z, Theroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1982-8.
107. Shebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:729-35.
108. Yang LH, Fareed J. Vasomodulatory action of clopidogrel and ticlopidine. *Thromb Res* 1997; 86:479-91.
109. Herbert JM, Dol F, Gaich C, Bernat A, Herbert JM. The antiaggregating and antithrombotic activity of clopidogrel is potentiated by aspirin in several experimental models in the rabbit. *Thromb Haemost* 1998; 80:512-8.
110. Makkar RR, Eigler NL, Kaul S, Frimerman A, Nakamura M, Shah PK, Forrester JS, Herbert JM, Litvack F. Effects of clopidogrel, aspirin and combined therapy in a porcine ex vivo model of high- shear induced stent thrombosis. *Eur Heart J* 1998; 19:1538-46.
111. Herbert JM, Tissinier A, Defreyn G. Inhibitory effect of clopidogrel on platelets adhesion and intimal proliferation after arterial injury in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993; 13: 1171-9.
112. Gryglewski RJ, Dupin JP, Uracz W, Swies J, Madej J, Hou G, Gravier D, Casadebaig F. Thrombolysis by thienopyridines and their congeners. *J Physiol Pharmacol* 2000; 51:683-93.
113. Herbert JM, Savi P, Maffrand JP. Biochemical and pharmacological properties of clopidogrel: a new ADP receptor antagonist. *Eur Heart J Suppl* 1999; 1(Suppl A): A 31-40.

114. Hechler B, Eckly A, Ohlmann P, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y₁ receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *Br J Haematol* 1998; 103:858-66.
115. Savi P, Laplace MC, Herbert JM. Evidence of the existence of two different ADP-binding sites on rat platelets. *Thromb Res* 1994; 76:157-69.
116. Savi P, Artcanuthurry V, Bornia J et al. Effect of clopidogrel treatment on ADP-induced phosphorylation in rat platelets. *Br J Haematol* 1997; 97:185-91.
117. Mehta SR, Yusuf S. Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme; rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease. *Eur Heart J* 2000; 21:2033-41.
118. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA, Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001; 358:527-33.
119. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH, Investigators FT. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 2000; 102:624-9.
120. Easton JD. Future perspectives for optimizing oral antiplatelet therapy. *Cerebrovasc Dis.* 2001; 11 (Suppl 2):23-8.
121. Second Chinese Cardiac Study (CCS-2) Collaborative Group. Rationale, design and organization of the Second Chinese Cardiac Study (CCS-2): a randomized trial of clopidogrel plus aspirin, and of metoprolol, among patients with suspected acute myocardial infarction. Second Chinese Cardiac Study (CCS-2) Collaborative Group *J Cardiovasc Risk.* 2000; 7:435-41.
122. Steinhilb SR, Berger PB, Mann JT 3-rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ, CREDO Investigators. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2002; 288:2411-20. Errata w: *JAMA.* 2003; 289:987.
123. Jaremo P, Lindahl TL, Fransson SG, Richter A. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med* 2002; 252:233-8.
124. Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, Macaluso G, Commeau P, Comet B, Lafont A, Camoin L, Walter U, Eigenthaler M. Resistance to thienopyridines: clinical

- detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003; 59:295-302.
125. Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DG, Guyer KE, Tait AR, Bates ER. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation* 2004; 109:166-71.
126. Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS, Tait AR, Carville DGM, Guyer KE, Bates ER. Atorvastatin Reduces the Ability of Clopidogrel to Inhibit Platelet Aggregation. A New Drug- Drug Interaction. *Circulation* 2003; 107:32-7.
127. Quinn MJ, Topol EJ. Common variations in platelet glycoproteins: pharmacogenomic implications. *Pharmacogenomics* 2001; 2:341-52.
128. Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003; 108:989-95.
129. Swadzba J, De Clerck LS, Stevens WJ, Bridts CH, van Cotthem KA, Musial J, Jankowski M, Szczeklik A. Anticardiolipin, anti-beta(2)-glycoprotein I, antiprothrombin antibodies, and lupus anticoagulant in patients with systemic lupus erythematosus with a history of thrombosis. *J Rheumatol* 1997; 24:1710-5.
130. Byzova TV, Plow EF. Networking in the hemostatic system. Integrin alphaIIb beta3 binds prothrombin and influences its activation. *J Biol Chem* 1997; 272:27183-8.
131. Stouffer GA, Smyth SS. Effects of thrombin on interactions between beta3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1971-8.
132. Reverter JC, Beguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC, Coller BS. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and "clinical restenosis". *J Clin Invest*.1996; 98:863-74.
133. Li Y, Spencer FA, Ball S, Becker RC. Inhibition of platelet-dependent prothrombinase activity and thrombin generation by glycoprotein IIb/IIIa receptor-directed antagonists: potential contributing mechanism of benefit in acute coronary syndromes. *J Thromb Thrombolysis* 2000; 10:69-76.
134. Honda S, Honda Y, Bauer B, Ruan C, Kunicki TJ. The impact of three-dimensional structure on the expression of P1A alloantigens on human integrin beta 3. *Blood* 1995; 86:234-42.
135. Wheeler GL, Braden GA, Bray PF, Marciniak SJ, Mascelli MA, Sane DC. Reduced inhibition by abciximab in platelets with the P1A2 polymorphism. *Am Heart J* 2002; 143:76-82.

136. Różalski M, Watała C. Antagonists of platelet fibrinogen receptor are less effective in carriers of PI (A2) polymorphism of beta (3) integrin. *Eur J Pharmacol* 2002; 454:1-8.
137. Undas A, Sanak M, Musiał J, Szczeklik A. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism, aspirin, and thrombin generation. *Lancet* 1999; 353:982-3.
138. Szczeklik A, Krzanowski M, Góra P, Radwan J. Antiplatelet drugs and generation of thrombin in clotting blood. *Blood* 1992; 80:2006-11.
139. Tuleja E, Mejza F, Cmiel A, Szczeklik A. Effects of cyclooxygenases inhibitors on vasoactive prostanoids and thrombin generation at the site of microvascular injury in healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1111-5.
140. Feinberg WM, Pearce LA, Hart RG, Cushman M, Cornell ES, Lip GY, Bovill E. Markers of thrombin and platelet activity in patients with atrial fibrillation: correlation with stroke among 1531 participants in the stroke prevention in atrial fibrillation III study. *Stroke* 1999; 30:2547-53.
141. Di Micco B, Colonna G, Di Micco P, Di Micco G, Russo BM, Macalello MA, Ragone R. Anti-thrombin action of low-dose acetylsalicylic acid. *Eur J Pharmacol* 2003; 460:59-62.
142. Seljeflot I, Hurlen M, Arnesen H. Increased levels of soluble tissue factor during long-term treatment with warfarin in patients after an acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost*. 2004; 2:726-30.
143. Müller I, Massberg S, Zierhut W, Binz C, Schuster A, Rudiger-von Hoch S, Braun S, Gawaz M. Effects of aspirin and clopidogrel versus oral anticoagulation on platelet function and on coagulation in patients with nonvalvular atrial fibrillation (CLAFIB). *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002; 32:16-24.
144. Eikelboom JW, Weitz JI, Budaj A, Zhao F, Copland I, Maciejewski P, Johnston M, Yusuf S. Clopidogrel does not suppress blood markers of coagulation activation in aspirin-treated patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2002; 23:1771-9.
145. Szczeklik A, Dropinski J, Radwan J, Krzanowski M. Persistent generation of thrombin after acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992; 12:548-53.
146. Ott I. Tissue factor in acute coronary syndromes. *Semin Vasc Med*. 2003; 3:185-92.
147. Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Tantry U. Platelet activation in myocardial ischemic syndromes. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004; 2:535-45.
148. Szczeklik A, Musiał J, Undas A, Gajewski P, Góra P, Swadzba J, Jankowski M. Inhibition of thrombin generation by simvastatin and lack of additive effects of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:1286-93.

149. Butenas S, Cawthern KM, van't Veer C, DiLorenzo ME, Lock JB, Mann KG. Antiplatelet agents in tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 2001; 97:2314-22.
150. Altman R, Scazzioti A, Rouvier J, Gonzalez C. Effect of sodium arachidonate on thrombin generation through platelet activation--inhibitory effect of aspirin. *Thromb Haemost* 2000; 84:1109-12.
151. Undas A, Brummel K, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Blood coagulation at the site of microvascular injury: effects of low-dose aspirin. *Blood* 2001; 98:2423-31.
152. Vanschoonbeek K, Feijge MA, Van Kampen RJ, Kenis H, Hemker HC, Giesen PL, Heemskerk JW. Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics. *J Thromb Haemost* 2004; 2:476-84.
153. Davi G, Aversa M, Catalano I, Barbagallo C, Ganci A, Notarbartolo A, Ciabattini G, Patrono C. Increased thromboxane biosynthesis in type IIa hypercholesterolemia. *Circulation* 1992; 85:1792-8.
154. Tremoli E, Colli S, Maderna P, Baldassarre D, Di Minno G. Hypercholesterolemia and platelets. *Semin Thromb Hemost* 1993; 19:115-21.
155. Szczeklik A, Musial J, Undas A, Swadzba J, Gora PF, Piwowarska W, Duplaga M. Inhibition of thrombin generation by aspirin is blunted in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:948-54.
156. Musiał J, Undas A, Undas R, Brozek J, Szczeklik A. Treatment with simvastatin and low-dose aspirin depresses thrombin generation in patients with coronary heart disease and borderline-high cholesterol levels. *Thromb Haemost* 2001; 85:221-5.
157. Herault JP, Dol F, Gaich C, Bernat A, Herbert JM. Effect of clopidogrel on thrombin generation in platelet-rich plasma in the rat. *Thromb Haemost* 1999; 81:957-60.
158. Winocour PD, Watala C, Perry DW, Kinlough-Rathbone RL. Decreased platelet membrane fluidity due to glycation or acetylation of membrane proteins. *Thromb Haemost* 1992; 68:577-82.
159. Watala C, Gwozdzinski K. Effect of aspirin on conformation and dynamics of membrane proteins in platelets and erythrocytes. *Biochem Pharmacol* 1993; 45:1343-9.
160. Schneider DJ, Baumann PQ, Holmes MB, Taatjes DJ, Sobel BE. Time and dose dependent augmentation of inhibitory effects of abciximab by aspirin. *Thromb Haemost* 2001; 85:309-13.

161. Dominguez-Jimenez C, Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Alvaro I, Cesar JM, Sanchez-Madrid F. Prevention of alpha II (b) beta3 activation by non-steroidal antiinflammatory drugs. *FEBS Lett* 1999; 446:318-22.
162. Furman MI, Frelinger III AL, Michelson AD. Antithrombotic therapy in the cardiac catheterization laboratory: focus on antiplatelet agents. *Curr Cardiol Rep* 2000; 2:386-94.
163. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Sabate M, Fernandez C, Stranieri C, Trabetti E, Pignatti PF, Macaya C. PlA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15:89-93.
164. Knight CJ, Panesar M, Wilson DJ, Patrinely A, Chronos N, Wright C, Clarke D, Patel D, Fox K, Goodall AH. Increased platelet responsiveness following coronary stenting. Heparin as a possible aetiological factor in stent thrombosis. *Eur Heart J* 1998; 19:1239- 48.
165. Neubauer H, Gunesdogan B, Hanefeld C, Spiecker M, Mugge A. Lipophilic statins interfere with the inhibitory effects of clopidogrel on platelet function--a flow cytometry study. *Eur Heart J* 2003; 24:1744-9.
166. Mitsios JV, Papathanasiou AI, Rodis FI, Elisaf M, Goudevenos JA, Tselepis AD. Atorvastatin does not affect the antiplatelet potency of clopidogrel when it is administered concomitantly for 5 weeks in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2004; 109:1335-8.
167. Fontana P, Gaussem P, Aiach M, Fiessinger JN, Emmerich J, Reny JL. P2Y12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case-control study. *Circulation* 2003; 108:2971-3.
168. De Caterina R, Sicari R, Bernini W, Lazzerini G, Buti Strata G, Giannessi D. Benefit/risk profile of combined antiplatelet therapy with ticlopidine and aspirin. *Thromb Haemost* 1991; 65:504-10.
169. Boneu B, Destelle G. Platelet anti-aggregating activity and tolerance of clopidogrel in atherosclerotic patients. *Thromb Haemost* 1996; 76:939-43.
170. David JL, Limet R. Antiplatelet activity of clopidogrel in coronary artery bypass graft surgery patients. *Thromb Haemost* 1999; 82:1417-21.
171. Wilhite DB, Comerota AJ, Schmieder FA, Throm RC, Gaughan JP, Rao AK. Managing PAD with multiple platelet inhibitors: the effect of combination therapy on bleeding time. *J Vasc Surg* 2003; 38:710-3.
172. Peters AJ, Borries M, Gradaus F, Jax TW, Schoebel FC, Strauer BE. In vitro bleeding test with PFA-100-aspects of controlling individual acetylsalicylic acid induced platelet inhibition in patients with cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 2001; 12:263-72.

173. Golanski J, Nocun M, Rozalski M, Drygas W, Watala C. An in vitro model for the detection of reduced platelet sensitivity to acetylsalicylic acid. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004;15:187-95.
174. Ziegler S, Maca T, Alt E, Speiser W, Schneider B, Minar E. Monitoring of antiplatelet therapy with the PFA-100 in peripheral angioplasty patients. *Platelets* 2002; 13:493-7.
175. Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med* 2001; 138:152-63.
176. Mueller T, Haltmayer M, Poelz W, Haidinger D. Monitoring aspirin 100 mg and clopidogrel 75 mg therapy with the PFA-100 device in patients with peripheral arterial disease. *Vasc Endovascular Surg* 2003; 37:117-23.
177. Golanski J, Pluta J, Baraniak J, Watala C. Limited usefulness of the PFA-100 for the monitoring of ADP receptor antagonists--in vitro experience. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:25-9.
178. Van der Planken MG, Claeys MJ, Vertessen FJ, Dilling D, Bosmans JM, Berneman ZN, Michiels JJ, Vrints C. Comparison of turbidimetric aggregation and in vitro bleeding time (PFA-100) for monitoring the platelet inhibitory profile of antiplatelet agents in patients undergoing stent implantation. *Thromb Res* 2003; 111:159-64.
179. Golanski J, Golanski R, Chizynski K, Iwaszkiewicz A, Rozalski M, Wieclawska B, Boncler M, Watala C. Platelet hyperreactivity after coronary artery bypass grafting: the possible relevance to glycoprotein polymorphisms. A preliminary report. *Platelets* 2001; 12:241-7.
180. Pontiggia L, Lassila R, Pederiva S, Schmid HR, Burger M, Beer JH. Increased platelet-collagen interaction associated with double homozygosity for receptor polymorphisms of platelet GPIa and GPIIIa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:2093-8.
181. Bennett JS, Catella-Lawson F, Rut AR, Vilair G, Qi W, Kapoor SC, Murphy S, FitzGerald GA. Effect of the PI(A2) alloantigen on the function of beta(3)-integrins in platelets. *Blood* 2001; 97:3093-9.
182. Mukherjee D, Topol E. Pharmacogenomics in Cardiovascular Diseases. *Curr Probl Cardiol* 2003; 28:317-47.

11. Wykaz rycin i tabel

Rycina 1.	Rola płytek krwi w patogenezie miażdżycy	12
Rycina 2.	Faza początkowa i amplifikacji w tworzeniu zakrzepu	13
Rycina 3.	Faza tworzenia włókniaka (fibryny)	14
Rycina 4.	Stężenie F 1.2 w grupie PI^{A1} przed i po terapii aspiryną	34
Rycina 5.	Stężenie F 1.2 w grupie PI^{A2} przed i po terapii aspiryną	34
Rycina 6.	Stężenie F 1.2 w grupie PI^{A1} przed i po terapii kłopidogrelem	35
Rycina 7.	Stężenie F 1.2 w grupie PI^{A2} przed i po terapii kłopidogrelem	35
Tabela 1.	Mechanizmy oporności na aspirynę	20
Tabela 2.	Farmakologiczne właściwości kłopidogrelu wykazane w modelu zwierzęcym	22
Tabela 3.	Czynniki ryzyka choroby wieńcowej wśród badanych chorych	26
Tabela 4.	Czynniki ryzyka choroby wieńcowej wśród badanych chorych z podziałem na genotypy	31
Tabela 5.	Wyniki badań laboratoryjnych w badanej grupie	32
Tabela 6.	Stężenia F 1.2 w grupie PI^{A1}	36
Tabela 7.	Stężenia F 1.2 w grupie PI^{A2}	36
Tabela 8.	Kinetyka generacji trombiny. Pole pod krzywą $F\ 1.2\ (T)$, S, jako całkowita generacja trombiny oraz wskaźnik generacji trombiny λ	37
Tabela 9.	Czas krwawienia (BT)	37
Tabela 10.	Czas zamknięcia apertury (CT)- PFA-100™	38