Il problema della resistenza ai farmaci antipiastrinici: meccanismi molecolari e test di laboratorio

M. Pugliano, M. Cattaneo

U.O.C. Medicina III, Ospedale San Paolo, Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano

Riassunto

I farmaci che inibiscono l'aggregazione piastrinica, tra cui l'aspirina e il clopidogrel, sono utilizzati nei pazienti con aterosclerosi per ridurre il rischio di eventi trombotici arteriosi. L'aspirina inibisce irreversibilmente la ciclossigenasi-1 (COX-1) bloccando la via del trombossano A_2 (TxA_2), mentre il clopidogrel inibisce irreversibilmente uno dei due recettori piastrinici per l'ADP, il $P2Y_{12}$[1]. Entrambe queste vie sono essenziali per l'amplificazione del segnale di attivazione che determina aggregazione piastrinica. Con il termine "resistenza ad un farmaco" s'intende l'incapacità da parte del farmaco di colpire il suo bersaglio che si traduce in una mancata risposta farmacologica, documentabile con un test di laboratorio specifico. La prevalenza di resistenza all'aspirina, valutata utilizzando un test specifico come la determinazione dei livelli di trombossano sierico B_2 (TxB_2), è intorno all'1%; ciò permette di concludere che la resistenza all'aspirina o non esiste o è un fenomeno estremamente raro. La causa più importante di resistenza al clopidogrel è dovuta all'incapacità dei citocromi epatici di metabolizzare il pro farmaco al suo metabolita attivo.

Summary

Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection

Drugs that inhibit platelet function are widely used to decrease the risk of occlusive arterial events in patients with aterosclerosis. Aspirin irreversibly inhibits cyclooxygenase-1 (COX-1), thus affecting the arachidonate-thromboxane A_2 pathway, while clopidogrel affects the adenosine diphosphate (ADP) pathway, by irreversibly blocking the ADP receptor $P2Y_{12}$. Both these pathways contribute to the amplification of platelet activation and aggregation response to platelets agonists. The term "resistance" to a drug means the inability of a drug to hit its pharmacological target, demonstrable by a specific laboratory test. The prevalence of aspirin resistance, assessed by a specific laboratory test as serum thromboxane B_2 (TxB_2), is about 1%; thus we can conclude that aspirin resistance does not exist or it is a very rare phenomenon. The most important cause of clopidogrel resistance is attributable to the inability of the hepatic cytochromes to metabolize the pro-drug to its active metabolite.

Key-words: blood platelets, drug resistance, platelet aggregation inhibitors.

Introduzione

I farmaci che inibiscono l'aggregazione piastrinica sono utilizzati nei pazienti con aterosclerosi per ridurre il rischio di eventi trombotici arteriosi. L'aspirina e il clopidogrel, una tienopiridina, vengono utilizzati nella profilassi dei pazienti sottoposti ad angioplastica coronarica, nella terapia della sindrome coronarica acuta e nella prevenzione a lungo termine degli eventi trombotici cardiovascolari e cerebrovascolari.

L'aspirina e il clopidogrel inibiscono selettivamente l'attivazione piastrinica: l'aspirina inibisce irreversibilmente la ciclossigenasi-1 (COX-1) bloccando la via del trombossano A_2 (TxA_2), mentre il clopidogrel inibisce irreversibilmente uno dei due recettori piastrinici per l'ADP, il $P2Y_{12}$[1]. Sia la via del TxA_2 che quella dell'ADP sono essenziali per l'amplificazione del segnale di attivazione e aggregazione piastrinica.

La questione della resistenza ai farmaci antipiastrinici

Ricevuto: 07-04-2009 Pubblicato on-line: 04-05-2009

Corrispondenza a: Prof. Marco Cattaneo, U.O.C Medicina III, Ospedale San Paolo, DMCO, Università degli Studi di Milano, Via di Rudinì n.8, 20142 Milano; Tel. 02-50323095, e-mail: marco.cattaneo@unimi.it

è recentemente stata enfatizzata dalla letteratura medica ma, nonostante i numerosi interventi presenti in letteratura su questo problema, la sua definizione, la diagnosi, le cause e le conseguenze cliniche sono ancora oggetto di discussione.

Aspirina

L'aspirina inibisce irreversibilmente la COX-1 acetilando un residuo serinico in posizione 530; ne consegue l'inibizione della produzione di prostaglandina-H_2 (PGH_2) a partire dall'acido arachidonico e quindi della sua conversione a TxA_2, un potente agonista piastrinico (Fig. 1A). Una singola dose giornaliera di 160 mg di aspirina inibisce completamente la produzione di TxA_2, anche se è stato dimostrato che lo stesso effetto inibitorio può essere ottenuto con la somministrazione cronica di 30-50 mg/die di aspirina[2]. L'enzima COX ha due isoforme, la COX-1 e la COX-2 che differiscono per distribuzione tissutale e sensibilità all'effetto dei farmaci antinfiammatori non steroidei. La COX-1 è presente costitutivamente in tutti i tessuti e quindi anche nelle cellule endoteliali[3], dove converte l'acido arachidonico in prostaciclina, un antagonista della funzionalità piastrinica con proprietà vasodilatatorie. La COX-2 non è un enzima costitutivo di tutte le cellule, ma può essere facilmente indotto dallo stimolo infiammatorio. Una certa quota di mRNA di COX-2 è stata trovata, in condizioni fisiologiche, anche all'interno delle piastrine[4]; in condizioni di aumentata produzione piastrinica, come in caso di infiammazione, la COX-2 può aumentare[5].

Clopidogrel

Il clopidogrel è un antiaggregante piastrinico appartenente alla classe delle tienopiridine; esso viene somministrato come pro-farmaco e successivamente convertito in forma farmacologicamente attiva attraverso un metabolismo epatico. Questo farmaco inattiva irreversibilmente il recettore per l'ADP $P2Y_{12}$ (Fig. 1B), uno dei due recettori P2Y espressi sulla membrana piastrinica la cui sinergia è indispensabile per una completa risposta allo stimolo dato dall'ADP, che si traduce in attivazione e poi aggregazione piastrinica; inoltre, il $P2Y_{12}$ svolge un ruolo fondamentale nel potenziare la secrezione piastrinica indotta da diversi agonisti[6-8].

Resistenza ai farmaci antipiastrinici

In generale, il termine "resistenza ad un farmaco" significa incapacità da parte del farmaco di colpire il suo bersaglio per varie ragioni: ridotta biodisponibilità, inattivazione *in vivo* o per alterazioni del bersaglio. Se consideriamo valida questa definizione, la resistenza all'aspirina si riferisce a quelle condizioni in cui tale farmaco non è in grado di inibire l'attività della COX-1, e quindi la funzionalità piastrinica TxA_2-dipendente. Allo stesso modo, la resistenza al clopidogrel fa riferimento alle sole condizioni in cui il clopidogrel non è in grado di inibire il recettore $P2Y_{12}$ e, quindi, la funzione piastrinica da esso dipendente.

Spesso, però, l'espressione "resistenza ai farmaci antipiastrinici" viene utilizzata per descrivere il mancato effetto antitrombotico di questi farmaci nei pazienti che, durante la terapia antiaggregante, presentano un evento trombotico. In questo caso l'evento trombotico può essere indipendente dall'efficacia di questi farmaci nel colpire il loro bersaglio farmacologico, quindi sarebbe più corretto definire questo fenomeno "fallimento terapeutico"[1,2,9].

L'attività antipiastrinica dell'aspirina e del clopidogrel si traduce in mancata formazione del trombo *in vivo*, che dovrebbe riflettere l'inibizione dell'attivazione piastrinica *in vitro*. Numerosi sono gli studi presenti in letteratura in cui sono state utilizzate tecniche diverse e diversi test diagnostici per valutare il grado di inibizione piastrinica da parte dei farmaci antipiastrinici e, in alcuni casi, per predire il rischio trombotico. Tuttavia, è

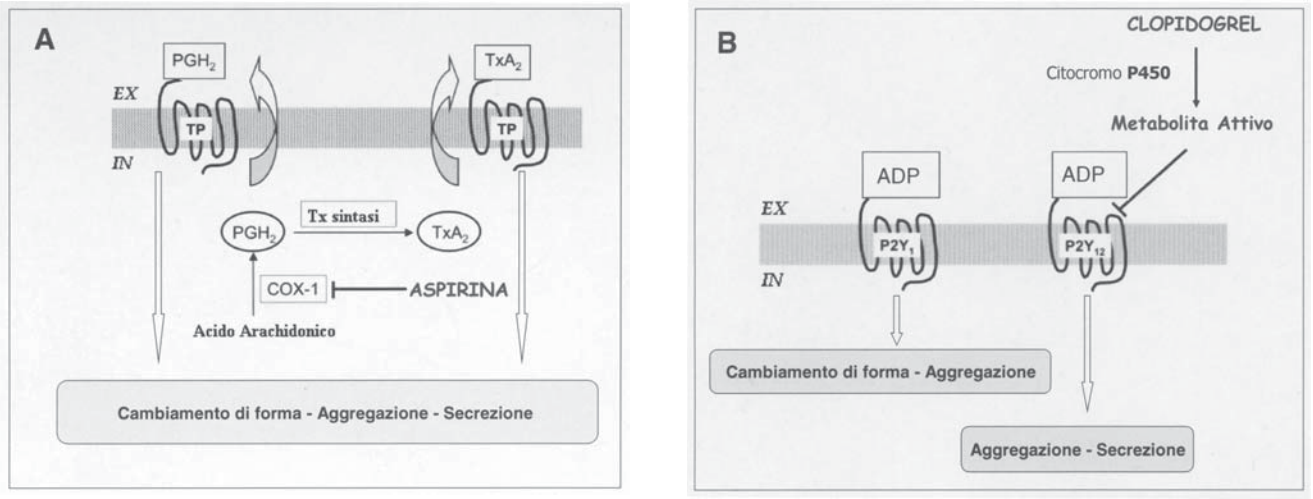

Figura 1. A) Meccanismo d'azione dell'aspirina; B) Meccanismo d'azione del clopidogrel.

importante sottolineare che il grado di inibizione del TxA_2 e del $P2Y_{12}$ è soggetta ad un'elevata variabilità tra i diversi soggetti ed i differenti test di laboratorio utilizzati, che spesso non sono sufficientemente specifici per determinare l'effetto dei farmaci anti-piastrinici sul loro bersaglio farmacologico. Per questo motivo, un'elevata attività piastrinica residua documentata con un test globale che misuri la formazione di aggregati piastrinici *in vitro* in pazienti in terapia antiaggregante, non corrisponde necessariamente ad una condizione di resistenza ai farmaci antiaggreganti. È indispensabile individuare ed utilizzare test specifici che misurino l'effetto farmacologico delle molecole antiaggreganti, per chiarire se l'attività piastrinica residua o l'iper-reattività piastrinica possano essere dovute ad un effetto insufficiente da parte del farmaco stesso o ad altre cause.

Concludendo, la definizione di "resistenza ai farmaci antipiastrinici" dovrebbe essere limitata alle sole condizioni in cui il fallimento del farmaco nel colpire il suo bersaglio sia documentabile con un test di laboratorio specifico[10,11].

Resistenza all'aspirina

La prevalenza di resistenza all'aspirina, valutata in 11 studi in cui sono stati utilizzati test di attivazione/aggregazione piastrinica non specifici per monitorare l'effetto dell'aspirina stessa, varia dal 5,5% al 61%[12]. D'altra parte, la sua prevalenza valutata in studi che hanno utilizzato la determinazione dei livelli di trombossano B_2 (TxB_2) sierico, il metabolita stabile del TxA_2, scende all'1-1,7%[13-15,16,17]. I soggetti definiti "resistenti" erano molto spesso non complianti o assumevano una dose di aspirina insufficiente. Pertanto, possiamo concludere che la resistenza all'asprina in realtà non esiste o è un fenomeno estremamente raro.

Resistenza al clopidogrel

La maggior parte degli studi pubblicati ha definito la "resistenza al clopidogrel" utilizzando la risposta *in vitro* dell'aggregazione piastrinica indotta da ADP, essendo il recettore per l'ADP, il $P2Y_{12}$, il bersaglio farmacologico del clopidogrel. Tuttavia, le piastrine esprimono un altro recettore per l'ADP, il $P2Y_1$, il quale non è inibito dal clopidogrel ed è valutabile con l'aggregazione piastrinica indotta da ADP. Il test di aggregazione piastrinica non è dunque un test specifico per valutare la resistenza al clopidogrel. Un test specifico potrebbe invece essere la determinazione dell'inibizione dell'adenil-ciclasi indotta da ADP, mediata esclusivamente dal $P2Y_{12}$, oppure la determinazione della fosforilazione della "Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein" (VASP)[18].

I meccanismi implicati nella resistenza al clopidogrel potrebbero essere:

1. *Differenze inter-individuali nel metabolismo epatico del profarmaco a metabolita attivo.* È il meccanismo più importante che causa l'ampia variabilità nell'inibizione piastrinica da parte del clopidogrel. Infatti, è stato riportato che l'inibizione dell'aggregazione piastrinica indotta dal clopidogrel correla con l'attività del citocromo P-450, che determina la conversione del farmaco nel suo metabolita farmacologicamente attivo[19]. Inoltre, è stato riportato che varianti del citocromo P-450 sono associate ad una ridotta risposta piastrinica al clopidogrel[20-22]. Un recente studio condotto su 2208 pazienti con infarto miocardico acuto in terapia con clopidogrel, ha dimostrato che i soggetti portatori di due alleli con perdita di funzione del CYP2C19 hanno un rischio significativamente aumentato di sviluppare gli eventi clinici (morte per tutte le cause, ictus non fatale e infarto miocardico acuto)[23]. Non è stata riscontrata alcuna associazione tra i polimorfismi del gene P2RY12, che codifica per il recettore $P2Y_{12}$, bersaglio del clopidogrel, e l'aumento del rischio cardiovascolare[23,24]. Inoltre, uno studio condotto su 162 soggetti sani e 1477 pazienti con sindrome coronarica acuta, tutti trattati con clopidogrel, ha dimostrato che i soggetti portatori di almeno un allele associato a ridotta funzionalità del CYP2C19, hanno una riduzione significativa del metabolita attivo plasmatico rispetto ai non portatori, ed un significativo calo nella riduzione dell'aggregazione piastrinica massima in risposta al clopidogrel[25].
2. *Interferenza con altri farmaci.* Molto discussa è l'interazione tra clopidogrel e gli inibitori di pompa protonica (IPP), frequentemente prescritti in concomitanza alla terapia antipiastrinica. È stato dimostrato che gli IPP possono inibire l'isoenzima 2C19 del citocromo P-450 e quindi alterare la farmacocinetica del clopidogrel[26-28]. Se questa alterazione metabolica possa avere un riscontro clinico sull'incidenza di eventi cardiovascolari nei pazienti che assumono clopidogrel e IPP, è ancora incerto. Molti studi recentemente pubblicati hanno dimostrato che esiste una relazione tra l'associazione clopidogrel/IPP ed un aumento del rischio di eventi cardiovascolari, mediati dall'inibizione del CYP2C19[29,30]. Viceversa, lo studio citato sopra[23], condotto su 2208 pazienti con infarto miocardico acuto in terapia con clopidogrel, non ha riportato alcun effetto da parte degli IPP sulla risposta clinica al clopidogrel. Per quanto riguarda l'interferenza degli IPP nella risposta al clopidogrel valutata mediante la determinazione della fosforilazione della VASP, uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo ha dimostrato che l'omeprazolo riduce significativamente l'effetto inibitorio del clopidogrel sul $P2Y_{12}$ in soggetti sottoposti ad impianto di *stent* coronarico trattati con clopidogrel e aspirina[31].
3. *Ridotta biodisponibilità.* L'assorbimento intestinale del clopidogrel è regolato dalla glicoproteina P[32], che potrebbe in alcuni presentare un'alterata funzionalità e ridurre così l'assorbimento intestinale di questo farmaco. È stata inoltre dimostrata una correlazione negativa tra BMI e risposta al clopidogrel[33].

Metodi di laboratorio usati per misurare la risposta alla terapia antiaggregante

La funzionalità piastrinica *in vivo* viene solitamente misurata con il tempo di emorragia, mentre la misurazione *in vitro* può avvenire con diversi test di laboratorio.

Il *tempo di emorragia* è un test invasivo, inaccurato e scarsamente riproducibile che può risentire di molte variabili, quali per esempio la funzionalità piastrinica, la conta piastrinica, i fattori della coagulazione, i globuli rossi, la parete vascolare ed il trofismo cutaneo. Per tutte queste ragioni, questo test risulta essere poco sensibile alle alterazioni lievi o moderate proprie dei difetti ereditari e acquisiti della funzionalità piastrinica e, pertanto, non dovrebbe essere utilizzato per valutare l'effetto dei farmaci antiaggreganti.

L'*aggregometria a trasmissione di luce* misura l'aumento della trasmissione luminosa che avviene attraverso una sospensione piastrinica, quando le piastrine aggregano in risposta ad un agonista. Ha però molti limiti, che non lo rendono un test ideale per misurare l'effetto dei farmaci antipiastrinici. L'aggregometria a trasmissione di luce è, infatti, una tecnica indaginosa che richiede molto tempo e può essere effettuata solo in laboratori specialistici. Inoltre, i risultati che si ottengono possono essere influenzati da molte variabili sia pre-analitiche che analitiche che rendono questo test poco accurato e riproducibile. Un altro limite è dato dalla mancanza di standardizzazione, che rende i risultati difficilmente confrontabili con quelli ottenuti da un altro laboratorio. Oltretutto, a seconda del tipo e delle concentrazioni dei diversi agenti agonisti utilizzati e dell'anticoagulante usato per il prelievo di sangue venoso, la risposta aggregante è solo parzialmente influenzata e variabilmente modulata dal TxA_2 prodotto. Anche quando si utilizzano i due agenti aggreganti più specifici (l'acido arachidonico per valutare la risposta all'aspirina e l'ADP per quella alle tienopiridine) i risultati ottenuti possono sovrastimare la prevalenza della resistenza ai farmaci antiaggreganti[1,34].

L'*aggregometria ad impedenza* misura la variazione di impedenza elettrica che avviene quando le piastrine aggregano attorno ad un elettrodo di platino, immerso in sangue intero anticoagulato, dopo aver aggiunto un agente agonista. Questo test ha gli stessi limiti dell'aggregometria a trasmissione di luce ed è stato scarsamente utilizzato nei pazienti in terapia antiaggregante.

Il *PFA-100®* può essere considerato il corrispettivo *in vitro* del tempo di emorragia. Un campione di sangue anticoagulato viene aspirato attraverso un capillare (che mima la resistenza di una piccola arteria), dotato di una piccola apertura sulla parete (che mima il danno della parete vasale) ricoperta di collageno e ADP oppure di collageno ed epinefrina. L'aggregato piastrinico si forma a livello dell'apertura e gradatamente la chiude, in un tempo di chiusura (espresso in secondi) che viene registrato dallo strumento[35]. Questo test è sensibile alla malattia di von Willebrand e ad alcuni difetti gravi di funzionalità piastrinica, quali la sindrome di Bernerd-Soullier e la trombastenia di Glanzmann[36], mentre è scarsamente sensibile ai difetti lievi e moderati, ereditari o acquisiti (tra i quali quelli indotti da farmaci antipiastrinici) della funzionalità piastrinica[36]. Esso, inoltre, è molto sensibile ad alcune variabili quali, ad esempio, la funzionalità piastrinica, la conta piastrinica, i fattori della coagulazione e i globuli rossi, il cui effetto sulla formazione dell'aggregato piastrinico può facilmente sottostimare l'effetto di una modesta inibizione della funzionalità piastrinica[1]. E' stato dimostrato che tutti gli individui in trattamento con aspirina in cui è stato valutato il PFA-100® con la cartuccia collageno/epinefrina, indipendentemente dal tempo di chiusura che poteva essere ridotto o prolungato, avevano livelli di TxB_2 molto bassi, ad indicare una completa inibizione della COX-1 da parte dell'aspirina[14,37].

L'*Ultegra Rapid Platelet Function Assay (RPFA)-Verify-Now* è un test semplice che misura l'agglutinazione di biglie rivestite da fibrinogeno da parte di piastrine stimolate da un agonista, in sangue anticoagulato con sodio citrato. Inizialmente questo test era stato concepito per valutare l'effetto antipiastrinico degli inibitori della GP IIb/IIIa. Successivamente è stato modificato per aumentare la sensibilità e la specificità ai due principali farmaci antipiastrinici, l'aspirina (RPFA-Verify-Now ASA)[18,38] e il clopidogrel (RPFA-Verify-Now $P2Y_{12}$)[39]. Quest'ultimo è probabilmente più specifico dell'aggregazione piastrinica indotta da ADP misurata con l'aggregometro a trasmissione di luce, nel monitorare il trattamento con clopidogrel[40,41].

Il *Cone-and Plate(let) Analyzer (CPA)* è un viscosimetro che misura l'adesione e l'aggregazione piastrinica in un flusso laminare sottoposto ad uno *shear* costantemente elevato. È stato dimostrato che questo test è molto accurato per indagare la malattia di von Willebrand e monitorare il trattamento con farmaci inibitori della GP IIb/IIIa.

La *citometria a flusso* permette di valutare la reattività piastrinica *in vitro* in risposta ad un agonista e la presenza di piastrine attivate, di aggregati piastrine-leucociti e di microparticelle piastriniche. Nonostante richieda uno strumento sofisticato e costoso, il vantaggio è che consente di ottenere molte informazioni in breve tempo e con una quantità di sangue minima (5-10 μL di sangue intero o PRP per campione). Questo tipo di analisi è stato utilizzato per misurare *in vitro* l'attivazione piastrinica durante il trattamento con farmaci antipiastrinici.

Il *Platelet VASP®* è un test citofluorimetrico che misura il grado di inibizione della fosforilazione di VASP da parte dell'ADP, mediata dal $P2Y_{12}$ attraverso l'inibizione dell'adenilciclasi[42]. Esso rappresenta un test altamente specifico per la misurazione dell'effetto dei farmaci che inibiscono il recettore $P2Y_{12}$[43-45]. Esiste una buona correlazione tra lo studio della fosforilazione della VASP e l'aggregazione piastrinica indotta da ADP nell'individuare l'inibizione del $P2Y_{12}$[43,46].

La *tromboelastografia (TEG)* misura il cambiamento della viscosità elastica che avviene durante la formazione del coagulo nel sangue intero. Essa è dunque influenzata dalla funzionalità piastrinica, dai fattori della coagulazione, dagli inibitori naturali della coagulazione e dalla fibrinolisi. Nonostante il suo utilizzo nel monitoraggio della terapia antiaggregante con aspirina o clopidogrel sia stato recentemente documentato in uno studio[47], il suo impiego nello scenario clinico deve esser ancora validato.

La *misurazione nel siero del metabolita stabile trombossano B_2 (TxB_2)* riflette la capacità complessiva delle piastrine di sintetizzare TxA_2. Questo è il test più specifico per misurare l'effetto farmacologico dell'aspirina[1]. In un recente studio[15] comprendente 680 soggetti in terapia con aspirina sottoposti a cateterizzazione cardiaca, ed in un altro studio di 96 soggetti sani[14], anch'essi in terapia con aspirina, misurando i livelli di TxB_2 sierico è stato dimostrato che solo l'1-2% dei soggetti mostrava un'incompleta risposta all'aspirina, o per scarsa compliance o perché la dose del farmaco era inadeguata.

La *misurazione del metabolita del TxB_2, 11-deidro-trombossano B_2 urinario*, è un altro test che permette di determinare la sintesi *in vivo* del trombossano A_2. Tuttavia, la determinazione di questo metabolita riflette la produzione sistemica del TxA_2, che non avviene esclusivamente a livello delle piastrine; è stato calcolato, infatti, che circa il 30% dell'11-deidro-trombossano B_2 deriva da fonti extra-piastriniche[48], quota che può aumentare in corso di stati infiammatori. Pertanto, questo test non può essere considerato altamente specifico per monitorare l'effetto dell'aspirina sulla COX-1 piastrinica.

Bibliografia

1. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel. Efficacy, safety and the issue of drug resistance. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24:1980-7.
2. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. N Engl J Med 1994; 330:1287-94.
3. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, et al. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. J Biol Chem 1995; 270:10902-8.
4. Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schrör K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. Lancet 1999; 353:900.
5. Rocca B, Secchiero P, Ciabattoni G, Ranelletti FO, Catani L, Guidotti L, et al. Ciclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 7634-9.
6. Cattaneo M, Gachet C. ADP receptors and clinical bleeding disorders. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19:2281-5.
7. Cattaneo M, Lombardi R, Zighetti ML, Gachet C, Ohlman P, Cazenave J-P, et al. Deficiency of [33P]2MeS-ADP binding sites on platelets with secretion defect, normal granule stores and normal thromboxaneA2 production. Evidence that ADP potentiates platelet secretion independently of the formation of large platelet aggregates and thromboxane A2 production. Thromb Haemost 1997; 77:986-90.
8. Cattaneo M, Lecchi A, Lombardi R, Gachet C, Zighetti ML. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A2 production and normal granule stores: further evidence that some cases of platelet 'primary secretion defect' are heterozygous for a defect of P2CYC receptors. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:E101-6.
9. Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. Nature Rev 2003; 2:15-28.
10. Patrono C. Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. J Thromb Haemost 2003; 1:1710-3.
11. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. J Thromb Haemost 2007; 5(Suppl 1):230-7.
12. Campbell CL, Steinhubl SR. Variability in response to aspirin: do we understand the clinical relevance? J Thromb Haemost 2005; 3:665-9.
13. Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S, Mimuro J, et al. Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. J Thromb Haemost 2006; 4:1271-8.
14. Fontana P, Nolli S, Reber G, de Moerloose P. Biological effects of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 healthy volunteers. J Thromb Haemost 2006; 4:813-9.
15. Frelinger AL 3rd, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, Barnard MR, et al. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. Circulation 2006; 113:2888-96.
16. Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. J Am Coll Cardiol 2005; 46:1705-9.
17. Williams MS, Kickler TS, Vaidya D, Ng'alla LS, Bush DE. Evaluation of platelet function in aspirin treated patients with CAD. J Thromb Thrombolysis 2006; 21:241-7.
18. Geiger J, Brich J, Honig-Liedl P, Eigenthaler M, Schanzenbacher P, Herbert JM, et al. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19:2007-11.
19. LauWC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DGM, et al. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. Circulation 2004; 109:166-71.
20. Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. Blood 2006; 108: 2244-7.
21. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Cavallari U, Trabetti E, et al. Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clo-

pidogrel. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 1895-900.
22. Suh JW, Koo BK, Zhang SY, Park KW, Cho JY, Jang IJ, et al. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel. CMAJ 2006; 174:1715-22.
23. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. N Engl J Med 2009; 360:363-75.
24. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Cavallari U, Trabetti E, et al. Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. Thromb Res 2005; 116:491-7.
25. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome P-450 polymorphisms and response to clopidogrel. N Engl J Med 2009; 360:354-62.
26. Small DS, Farid NA, Payne CD, Weerakkody GJ, Li YG, Brandt JT, et al. Effects of the proton pump inhibitor lansoprazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel. J Clin Pharmacol 2008; 48:475-84.
27. Li XQ, Andersson TB, Ahlstrom M, Weidolf L. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. Drug Metab Dispos 2004; 32:821-7.
28. Aubert RE, Epstein RS, Teagarden JR, Xia F, Yao J, Desta Z, Skaar T, et al. Proton pump inhibitors effect on clopidogrel effectiveness: the Clopidogrel Medco Outcomes Study. Circulation 2008; 118:S-815.
29. Juurlink DN, Gomes T, Ko DT, Szmitko PE, Austin PC, Tu JV et al. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. CMAJ 2009; 180:713-8.
30. Ho PM, Maddox TM, Wang L, Fihn SD, Jesse RL, Peterson ED et al. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. JAMA 2009; 301:937-44.
31. Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, Le Gal G, Lacut K, Le Calvez G et al. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study. J Am Coll Cardiol 2008; 51:256-60.
32. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. Clin Pharmacol Ther 2006; 80:486-501.
33. Feher G, Koltai K, Alkonyi B, Papp E, Keszthelyi Z, Kesmarky G et al. Clopidogrel resistance: role of body mass and concomitant medications. Int J Cardiol 2007; 120: 188-92.
34. Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S,Mimuro J et al. Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. J Thromb Haemost 2006; 4:1271-8.
35. Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. J Lab Clin Med 2001; 138:152-63.
36. Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. The Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. J Thromb Haemost 2006; 4:312-9.
37. Andersen K, Hurlen M, Arnesen H, Seljeflot I. Aspirin non-responsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. Thromb Res 2003; 108:37-42.
38. Harrison P, Segal H, Blasbery K, Furtado C, Silver L, Rothwell PM. Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. Stroke 2005; 36:1001-5.
39. Malinin A, Pokov A, Swaim L, Kotob M, Serebruany V. Validation of a VerifyNow-P2Y12 cartridge for monitoring platelet inhibition with clopidogrel. Methods Find Exp Clin Pharmacol 2006; 28:315-22.
40. von Beckerath N, Pogatsa-Murray G, Wieczorek A, Sibbing D, Schomig A, Kastrati A. Correlation of a new point-of-care test with conventional optical aggregometry or the assessment of clopidogrel responsiveness. Thromb Haemost 2006; 95:910-1.
41. van Werkum JW, van der Stelt CA, Seesing TH, Hackeng CM, ten Berg JM. A head-to-head comparison between the VerifyNow P2Y12 assay and light transmittance aggregometry for monitoring the individual platelet response to clopidogrel in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. J Thromb Haemost 2006; 4:2516-8.
42. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets – definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. Thromb Haemost 1999; 82:1145-52.
43. Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, Aktas B, Steigerwald U, Walter U, et al. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. Clin Chem 2005; 51:957-65.
44. Grossmann R, Sokolova O, Schnurr A, Bonz A, Porsche C, Obergfell A, et al. Variable extent of clopidogrel responsiveness in patients after coronary stenting. Thromb Haemost 2004; 92:1201-6.
45. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. J Thromb Haemost 2005; 3:85-92.
46. Pampuch A, Cerletti C, de Gaetano G. Comparison of VASP-phosphorylation assay to light-transmission aggregometry in assessing inhibition of the platelet ADP P2Y12 receptor. Thromb Haemost 2006; 96:767-73.
47. Agarwal S, Coakley M, Reddy K, Riddell A, Mallett S. Quantifying the effect of antiplatelet therapy: a comparison of the platelet function analyzer (PFA-100) and modified thromboelastography (mTEG) with light transmission platelet aggregometry. Anesthesiology 2006; 105: 676-83.
48. Catella F, FitzGerald GA. Paired analysis of urinary thromboxane B_2 metabolites in humans. Thromb Res 1987; 47:647-56.