



Značaj primene testova za procenu efekta antiagregacijske terapije kod bolesnika sa rekurentnom trombozom intrakoronarnog stenta

The importance of tests applied to evaluate the effectiveness of antiplatelet therapy in patients with recurrent coronary stent thrombosis

Aleksandra Grdinić*, Danilo Vojvodić†, Vesna Ilić†, Zvonko Magić†,
Nina Đukanović‡, Mina Radovanović‡, Predrag Miljić§, Slobodan Obradović†,
Ivana Majstorović†, Bojana Cikota†, Miodrag Ostojić‡

Kliničko bolnički centar „Dragiša Mišović“, *Klinika za internu medicinu, Beograd,
Srbija; Vojnomedicinska akademija, †Institut za medicinska istraživanja,
Beograd, Srbija; Klinički centar Srbije, ‡Institut za kardiovaskularne bolesti,
§Institut za hematologiju, Beograd; Srbija

Apstrakt

Uvod. Tromboza intrakoronarnog stenta je potencijalno letalna komplikacija sa velikim ekonomskim značajem. Neadekvatan odgovor na antiagregacijsku terapiju nedovoljno je rasvetljen uzrok te komplikacije. **Prikaz bolesnika.** Prikazan je bolesnik u dobi od 54 godine sa rekurentnom trombozom stenta četvrtog, devetog i dvanaestog dana posle primarne perkutane koronarne intervencije, uprkos primene dvojne antiagregacijske terapije (aspirin+klopidogrel). S obzirom na to da su isključeni svi proceduralni uzroci, kao i na nemogućnost da se reimplantacijom stenta bolesnik klinički stabilizuje, primenjeni su testovi za procenu efekta antiagregacijske terapije: test protočne citometrije, *Platelet Function Analyzer* – PFA-100, agregometrijski test, određivanje genskog polimorfizma za P2Y₁₂ receptor preko koga deluju tienopiridini (klopidogrel i tiklopidin) i za GPIIb/IIIa receptor, finalni receptor u agregaciji trombocita. Bolesnik je bio nosilac major haplotipa H1H1 za P2Y₁₂ receptor i minor A1A2 za GPIIb/IIIa receptor. Rezultati svih navedenih testova pokazali su da je bolesnik imao nedovoljan odgovor na aspirin, zadovoljavajući na tienopiridin (nakon zamene klopidogrela tiklopidinom, bolesnik je bio stabilan). **Zaključak.** Testovi za procenu efekta antiagregacijske terapije neophodni su kod bolesnika sa neželjenim kardiološkim događajem, naročito trombozom stenta, posle implantacije intrakoronarnog stenta.

Ključne reči:

infarkt miokarda; lečenje; angioplastika, translumenska, perkutana, koronarna; stentovi; stentovi obloženi lekom; koronarna restenoza; antiagregaciona sredstva; aspirin; lečenje, ishod; lekovi, rezistencija.

Abstract

Background. Stent thrombosis is potentially lethal complication with huge economic burden. The role of insufficient response to antiplatelet therapy is still unclear reason for its occurrence. **Case report.** We presented 54-year-old man with recurrent stent thrombosis on the 4th, 9th and 12th day after the primary percutaneous coronary intervention in spite of double antiaggregation therapy (aspirin+clopidogrel). All possible procedural causes were excluded and reimplantation of intracoronary stent was insufficient to resolve the problem, so four platelet tests were performed: flow cytometry, Platelet Function Analyzer-100 test, aggregometry, and determination of gene polymorphism for P2Y₁₂ receptor (directly involved in the mechanism of thienopyridine), and GPIIb/IIIa receptor (final receptor in aggregation). The patient was the carrier of the major haplotype H1H1 for P2Y₁₂ receptor and minor A1A2 for GPIIb/IIIa receptor. The results of all the performed tests showed insufficient antiplatelet effect of aspirin and sufficient response to thienopyridin (not to clopidogrel, but to ticlopidine). **Conclusion.** Performance of platelet function tests is necessary in the case of major adverse cardiac events especially stent thrombosis, after implantation of intracoronary stent.

Key words:

myocardial infarction; therapeutics; angioplasty, transluminal, percutaneous coronary; stents; drug eluting stents; coronary restenosis; platelet aggregation inhibitors; aspirin; treatment outcome; drug resistance.

Uvod

Učestalost tromboze stenta (TS) zbog primene kombinovane antiagregacijske terapije, ali i savršenije tehnike perkutane koronarne intervencije (PCI) smanjila se drastično. Ipak, još uvek iznosi 0,9%, sa mortalitetom od 8,9%¹.

Prema periodu proteklom od implantacije stenta do njeve pojave, TS može biti akutna (javlja se u roku od 24 sata), subakutna (od 24 sata do 30 dana), kasna (posle 30 dana) i veoma kasna (od 30 dana do 12 meseci), a primenom stentova obloženih lekom – *drug eluting stents* (DES) primećeno je da se može javiti i do tri godine nakon ugradnje stenta.

Faktori koji predisponiraju TS mogu se podeliti na proceduralne karakteristike, karakteristike bolesnika i karakteristike same lezije¹.

Postoje kontroverzna mišljenja o neadekvatnom odgovoru na antiagregacijsku terapiju kao mogućem uzroku TS. Takođe, još uvek ne postoji stav o testu za procenu efekta antiagregacijske terapije u smislu postavljanja indikacije za primenu testa, vrste testa, *cut off* vrednosti i mogućnosti izmene terapije na osnovu vrednosti tih testova^{2,3}.

U radu je prikazan bolesnik kome je urađena primarna PCI uz standardnu dvojni antiagregacijsku terapiju, ali je PCI bila komplikovana rekurentnom trombozom istog stenta čija etiologija je rasvetljena primenom testova za procenu efikasnosti antitrombotične terapije.

Prikaz bolesnika

Muškarac, star 54 godine primljen je februara 2007. godine u Koronarnu jedinicu Urgentnog centra Srbije nakon urađene primarne PCI desne koronarne arterije (RCA) sa implantacijom dva intrakoronarna stenta tipa *Flexmaster* iz grupe stentova neo-

U kliničkom toku, četvrtog dana hospitalizacije bolesnik je dobio jak restrosteralni bol, a na elektrokardiogramu otkrivena je elevacija ST segmenta u odvodima D2,3 i AVF koji su ukazali na ponovnu okluziju RCA. Laboratorijske analize pokazale su porast biohemijskih markera za nekrozu miokarda: kreatin kinaza (CK) 290 IJ/L, miokardni izoenzim CK (CKMB) 33 IJ/L, troponin 8,7 IJ/L, a koronarografski nalaz potvrdio je okluziju RCA proksimalno. Zbog nađene TS urađena je ponovna PCI (rePCI) RCA sa implantacijom stenta *Flexmaster*, primenjen je tirofiban i otklonjeni su svi mogući proceduralni uzroci TS. Međutim, devetog dana hospitalizacije ponovila se klinička slika i elektrogradiografske promene u smislu rekurentne TS (jak restrosteralni bol i elevacija ST segmenta u odvodima D2,3 i AVF na elektrokardiogramu), sa ponovnim porastom biohemijskih markera za nekrozu miokarda (CK 512 IJ/L, troponin I 11,69 IJ/L) i koronarografskim dokazom ponovne TS. Izvršena je, ponovna rePCI RCA sa implantacijom stenta *Driver* u proksimalni deo RCA. Radi prevencije ponovne TS, duplirana je doza klopidogetrela na 2 × 75 mg, a doza aspirina ostavljena na 100 mg, što se pokazalo kao nedovoljna antiagregacijska terapija za ovog bolesnika. Treći put, 12. dana hospitalizacije bolesnik je dobio jak restrosteralni bol praćen elevacijom ST segmenta u D2,3 i AVF odvodima, kao i porast biohemijskih markera za nekrozu miokarda (CK 424 IJ/L, troponin I 10,19 IJ/L).

S obzirom da testovi procene antiagregacijskog efekta lekova ni u svetlu, ni u našoj kliničkoj praksi još uvek nisu u rutinskoj primeni, tek posle rekurentne TS pristupilo se njihovoj primeni. Urađen je brzi, tzv. *point of care*, *Platelet Function Analyzer* (PFA-100) test, senzitivna na preparate acetilsalicilne kiseline, koji je pokazao nedovoljnu supresiju agregacije trombocita dozom aspirina od 100 mg (tabela 1), zbog čega je doza aspirina povećana na 300 mg, uz nastavak

Tabela 1
Rezultat procene efekta aspirina testom *Platelet Function Analyzer* (PFA-100)

Agonist	Dobijena vrednost (sekunde)		Referentni opseg (sekunde)
	100 mg aspirina	300 mg aspirina	
Col/EPI (ASP)	102	104	82–150
Col/ADP	61	61	62–100

Col/EPI (ASP) – kolagen/epinefrin
Col/ADP – kolagen/ADP

bloženih lekom (*bare metal stent* – BMS), zbog akutnog infarkta miokarda inferoposteriorne lokalizacije. Anamnestički podaci pokazali su da je 5 godina ranije bolesnik hospitalizovan zbog infarkta miokarda dijafragmalne lokalizacije posle čega je primenjena medikamentna terapija. Faktori rizika od ishemijske bolesti srca bili su pušenje i hiperlipoproteinemija tip IIa. Objektivno, bio je kompenzovan, stabilan, bez bolova u grudima posle PCI RCA. Koronarografski nalaz pokazao je jednosudovnu bolest (glavno stablo – *left main*, bez stenoze, cirkumfleksna arterija bez stenoze, dominantna RCA u početnom delu bila je okludirana), zbog čega su implantirana dva stenta *Flexmaster* u proksimalnom segmentu RCA. Posle PCI primenjena je standardna terapija: preparat sa 100 mg acetilsalicilne kiseline (aspirin), klopidogetrel 75 mg, metoprolol 2 × 25 mg, heparin intravenski (iv), atrovastatin 20 mg, omeprazol 20 mg.

lečenja dvostrukom dozom klopidogetrela od 150 mg. Rezultat ponovljenog testa PFA-100 pri dozi od 300 mg aspirina i dalje je pokazivao nedovoljnu supresiju agregacije trombocita aspirinom. Kao jedino moguće rešenje *ex juvanibus*, klopidogetrel u dozi od 150 mg zamenjen je tiklopidinom u standardnoj dozi od 2 × 250 mg. Posle navedene terapije, bolesnik je bio bez anginoznih tegoba i promena na elektrokardiogramu, hemodinamski stabilan.

U cilju definitivnog razjašnjenja etiologije neadekvatnog antiagregacijskog efekta ovih lekova urađeno je merenje reaktivnosti P2Y₁₂ receptora iz grupe adenosin difosfat (ADP) receptora, protočnom citometrijom, koje je pokazalo reaktivnost od 43,1% što je ukazivalo na dobru suprimiranost tog receptora tiklopidinom (preostala aktivnost P2Y₁₂ receptora – ADPrr = 43,1%). Rezultat agregometrijskog testa,

još uvek najšire upotrebljavanog testa za procenu agregabilnosti trombocita, potvrdio je dobru supresiju agregacije trombocita tiklopidinom, a ne aspirinom (tabela 2). Da li je

Genomska dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) izolovana je iz periferne krvi pomoću *Blood Prep™ Chemistry* za ABI PRISM™ 6100 *Nucleic Acid PrepStation* (Applied

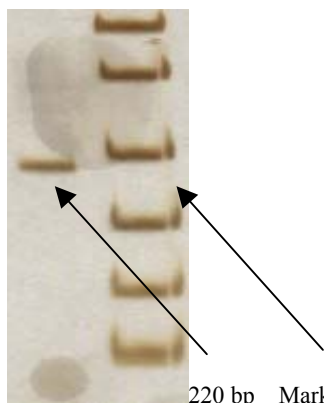
Tabela 2
Rezultat procene efekta kombinacije aspirina i tiklopidina
agregometrijskim testom (svetlosna agregometrija)

Agonist	Dobijena vrednost* (%)
ADP 10 µmL/L	4
Ag COL 10 µg/L	15
Ag ADR 10 mm/L	30
Ag RIS 1,25 mg/L	90

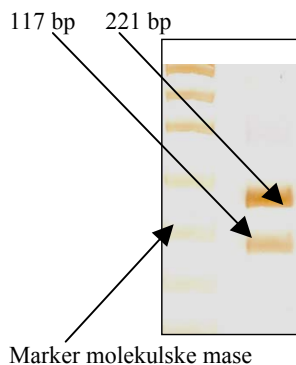
COL – kolagen; ADR – adrenalin; RIS – ristocetin

* Referentni opseg: 60–90 %

uzrok neadekvatnog antiagregacijskog odgovora na lek genetski polimorfizam za receptore preko kojih lekovi deluju provereno je analizom genetskog polimorfizma za receptor P2Y₁₂ preko koga deluju tienopiridini (tiklopidin i klopido-grel). Utvrđeno je prisustvo učestalijeg haplotipa H1H1 (slika 1), koji se u dosadašnjim radovima povezuje sa predispozicijom za zadovoljavajući odgovor na tienopiridine. Analiza genetskog polimorfizma za receptor GPIIb/IIIa, koji je finalni receptor u procesu agregacije trombocita, pokazala je prisustvo minornog A1A2 polimorfizma (slika 2), koji se u dosadašnjim radovima povezuje sa nezadovoljavajućim odgovorom na jedan od antiagregacijskih lekova.



Sl. 1 – Prikaz rezultata analize polimorfizma gena za P2Y₁₂ receptor nakon elektroforeze na 10% poliakrimidnom gelu i bojenja srebronitratom; bolesnik je bio homozigot H1H1 gena za P2Y₁₂ receptor



Sl. 2 – Prikaz rezultata analize polimorfizma gena za GPIIb/IIIa receptor; bolesnik je bio heterozigot P (A1A2)

Biosystems, USA). Za lančanu reakciju polimeraze (PCR) amplifikaciju (*Mastercycler gradient*, Germany) P2Y₁₂ (94° C u trajanju od 30 sec, 50° C/30 sec, 72° C/30 sec; 35 ciklusa) korišćeni su sledeći oligonukleotidni prajmeri: 5'-TCT GGT GAA ATA AAA AGA TTA CGT A-3' i 5'-GTC AGA AAT GGC CTG TGT NATANTAT G-3'. Produkt 220 *base pair* (bp) podvrgnut je digestiji pomoću RsaI restrikcione endonukleaze (MBI *Fermentas*, Litvania). Produkti digestije izdvojeni su elektroforezom na 10% poliakrilamidnom gelu i vizualizovani posle bojenja srebro-nitratom. Prisustvo 196 bp i 24 bp traka indikovalo je H2 haplotip, dok je traka od 220 bp indikovala H1 haplotip. GPIIb-IIIa amplifikacija (94° C u trajanju od 45 sec, 53° C/ 45 sec, 72° C/ 1 minut; 37 ciklusa) urađena je sa sledećim oligonukleotidnim prajmerom: 5'-TTC TGA TTG CTG GAC TTC TCT T-3' i 5'-TCT CTC CCA TGG CAA AGA GT-3'. Produkt 266 bp PCR digestiran je pomoću MspI (MBI *Fermentas*, Litvania). Produkti digestije izdvojeni su elektroforezom na 10% poliakrilamidnom gelu i vizualizovani posle bojenja srebro-nitratom. Prisustvo 221 bp i 24 bp traka indikovalo je P1^{A1} alel, dok je prisustvo 117 bp, 50 bp i 45 bp traka indikovalo P1^{A2} alel.

U daljem toku, do otpusta bolesnik je bio klinički i hemodinamski stabilan, a testom za neinvazivnu procenu koronarne rezerve dipiridamolom utvrđeno je adekvatno povećanje protoka u RCA, bez znakova ishemije miokarda.

Diskusija

Učestalost TS je 0,9%, ne računajući kasnu TS o kojoj ne postoje precizni podaci. Oštećenje endotela, povećana reaktivnost trombocita prilikom implantacije stenta kao stranog tela dovodi do aktivacije trombocita i pokretanja koagulacione kaskade. Od faktora vezanih za samu proceduru na njenu pojavu najviše mogu uticati dužina stenta, nedovoljna ekspanzija i rezidualna stenoza. Kompleksnije lezije podložnije su ovoj komplikaciji, a stariji bolesnici, niža ejekciona frakcija (EF) leve komore, dijabetes melitus, akutni koronarni sindrom – infarkt miokarda, naročito predisponiraju njenu pojavu¹.

Da bi se smanjila pre svega pojava restenoze stenta osmišljeni su DES, ali s obzirom da su obloženi lekovima koji utiču na povećanu ekspresiju faktora nekroze tumora i trombina, oni dovode do protrombogenog efekta. Takođe, doka-

zana je usporena ili čak prekinuta reendotelizacija pri upotrebi ovih stentova u odnosu na BMS, gde do nje dolazi u potpunosti posle 3–4 meseca od implantacije. Potvrđeno je, na osnovu nalaza autopsije bolesnika lečenih sa obe vrste stenta, da je incidencija TS veća kod DES¹.

Iako je procenat TS oko 0,9%, neophodno je rasvetliti i otkloniti sve moguće uzroke njenog nastanka, između ostalih i rezistenciju (neadekvatan antiagregacijski efekat) na klopido-grel koja se procenjuje na 4–30%⁴. Tri studije nedvosmisleno su povezale rezistenciju na klopido-grel sa najvažnijom kliničkom implikacijom TS^{5–7}.

S obzirom na to da je prikazani bolesnik bio mlađi, nije bio dijabetičar, imao očuvanu EF, proceduralni uzroci isključeni, kao i da do stabilizacije kliničkog stanja nije došlo posle udvostručavanja doze klopido-grela i aspirina, ali jeste posle zamene jednog tienopiridina drugim (klopido-grela tiklopidinom), naš rad pošao je od hipoteze da je uzrok TS bio neadekvatan odgovor na standardnu, dvojnu antiagregacijsku terapiju posle PCI (tienopiridin, i acetylsalicilna kiselina).

Mehanizam dejstva ovih lekova razlikuje se, zbog čega su i razlozi neodgovarajućeg antiagregacijskog odgovora na njih kao i testovi koji se u tu svrhu primenjuju različiti. Aspirin u dozi od 100–300 mg ireverzibilno inhibira enzim ciklo-oksigenazu 1, stvaranje tromboksana A2, što dovodi do smanjenja agregabilnosti trombocita. Tienopiridini (tiklopidin i klopido-grel) posle *per os* primene metabolišu se u jetri, ali različitim enzimskim putem (klopido-grel pomoću enzima CYP3A4, a tiklopidin pomoću CYP2A19 i CYP2D6), posle čega nastaje aktivni metabolit koji se vezuje za P2Y12 receptor (grupa ADP receptora) na trombocitima koji regulišu adenilat ciklazu preko inhibitorynog G proteina. Zbog toga se nivo trombocitnog cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) smanjuje, te se inhibira ADP-indukovana sekrecija alfa granula i ADP-zavisna agregacija trombocita. Ovo smanjenje cAMP vodi ka smanjenju aktivacije specifične protein kinaze, što uzrokuje izostanak fosforilacije vazodilatatornog stimulanog fosfoproteina (VASP) čija fosforilacija je ključni događaj za GPIIb/IIIa receptorsku inhibiciju. Koncentraciju VASP moguće je direktno meriti citometrijski i odgovarajućom formulom izračunati ADPrr⁸. To je razlog što je u ovom radu, pored zlatnog standarda za procenu agregacije trombocita (agregometrija) i brze PFA-100 metode, primenjeno i merenje ADPrr protočnom citometrijom zbog procene efikasnosti tienopiridina, kao i utvrđivanje polimorfizma gena za receptore preko kojih lekovi deluju na GPIIb/IIIa i P2Y12, direktno.

Naime, tienopiridini deluju preko svog aktivnog metabolita direktno na P2Y12 receptor, čija aktivacija/blokada utiče na aktivnost GPIIb/IIIa receptora koji je najznačajniji u finalnom procesu agregacije trombocita. Trombociti imaju brojne glikoproteine (GP) na svojoj površini i mnogi od njih su polimorfni, stoga je polimorfizam gena za ove receptore u poslednje vreme česta tema istraživača. Rezultati većine dosadašnjih radova slažu se sa tim da je PA1A2 i PA2A2 gen na GPIIb/IIIa receptoru povezan sa povećanim stvaranjem

trombina i nižim pragom za aktivaciju trombocita⁹. Polimorfizam PA2 pojedinačni je nukleotidni polimorfizam gde se umesto citozina (PA1) u obliku PA2 nalazi timin koji se javlja u poziciji 1566 egzona 2, kodirajućeg regiona za GPIIb/IIIa lociranog na hromozomu 17, što sve dovodi do izmene aminokiseline leucin u prolin. Smatra se da alelni PA2 polimorfizam doprinosi povećanoj ekspresiji GPIIb/IIIa receptora i povećanom afinitetu za fibrinogen, stoga i povećanoj mogućnosti za kardiovaskularni događaj. Takođe, dosta pažnje posvećeno je i sekvencijalnoj varijaciji P2Y12 receptora koji je ciljno mesto aktivnog metabolita klopido-grela. Identifikovana su dva haplotipa H1 i H2 u P2Y12 receptorskom genu. Pojava H2 haplotipa povezana je sa neželjenim kardiovaskularnim događajem¹⁰. Sam PA2A2 uzrokuje povećanu ekspresiju receptora posle ADP stimulacije, tako da su ova dva gena i njihovi polimorfizmi isprepleteni u pogledu uticaja na aktivaciju i agregaciju trombocita.

Bolesnik prikazan u ovom radu imao je ponovljenu TS na standardnoj dvojnoj antiagregacijskoj terapiji, i posle primene udvostručenih doza. Neadekvatan odgovor potvrdili su testovi PFA-100, koji se pokazao u dosadašnjim radovima kao senzitivniji za procenu dejstva aspirina, i svetlosna agregometrija, još uvek zlatni standard za procenu agregabilnosti trombocita posle primene i aspirina i tienopiridina^{11, 12}. Rezultati polimorfizma za GPIIb/IIIa receptor pokazali su da je zbog prisustva minoranog polimorfizma za ovaj receptor, P(A1A2), moguć neadekvatan odgovor na jedan antiagregacijski lek, u našem slučaju preparat acetylsalicilne kiseline, jer je prisustvo major haplotipa H1H1 receptora za P2Y12 receptora preko koga deluju aktivni metaboliti tienopiridina pokazao da bi antiagregacijski odgovor na jedan tienopiridin trebalo da bude zadovoljavajući (tiklopidin ili klopido-grel), što opravdava zamenu klopido-grela tiklopidinom u ovom slučaju. Konačno, da je odgovor na tiklopidin bio dobar, pored stabilizacije kliničkog stanja bolesnika, to su potvrdili i rezultati agregometrije i nalaz citometrije, koja je, za sada, najpreciznija u proceni aktivnosti P2Y12 receptora^{13, 14}. Aleil i sar.¹⁵ nedavno su prikazali tri bolesnika kod kojih je neefikasan antiagregacijski efekat klopido-grela rešen zemenom za tiklopidin, ali nisu radili genetske analize receptora.

Ograničenje ovog rada je u tome što nije postojala mogućnost da se ispituje aktivnost metabolita tienopiridina (klopido-grela i tiklopidina) i genski polimorfizam za ove proteine, što bi bila još jedna potvrda ključne uloge aktivnog metabolita kod ovih bolesnika.

Zaključak

Ovaj rad ukazuje na potrebu primene testova za procenu efekta antiagregacijskih lekova kod bolesnika sa TS. Najverovatnije objašnjenje uspešne zamene nedovoljno efikasnog klopido-grela efikasnijim tiklopidinom su različiti aktivni metaboliti ova dva leka koji se ireverzibilno vezuju za isti P2Y12 receptor, koji je u ovom slučaju imao očuvanu aktivnost.

L I T E R A T U R A

1. *Liischer TF, Steffel J, Eberli FR, Joner M, Nakazawa G, Tanner FC, et al.* Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2007; 115(8): 1051–8.
2. *Patrono C, Rocca B.* Drug insight: aspirin resistance—fact or fashion? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4(1): 42–50.
3. *Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ.* Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 2006; 27(6): 647–54.
4. *Gurbel PA, Tantry US.* Clopidogrel Resistance? *Thromb Res* 2006.
5. *Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, Macaluso G, Commeau P, Comet B, et al.* Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003; 59(3): 295–302.
6. *Ajzenberg N, Aubry P, Huisse MG, Cachier A, El Amara W, Feldman LJ, et al.* Enhanced shear-induced platelet aggregation in patients who experience subacute stent thrombosis: a case-control study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(11): 1753–6.
7. *Gurbel PA, Bliden KP, Guyer K, Cho PW, Zaman KA, Kreutz RP, et al.* Platelet reactivity in patients and recurrent events post-stenting: results of the PREPARE POST-STENTING Study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(10): 1820–6.
8. *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(3): 1145.
9. *Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Ragot S, Allal J, et al.* Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet PIA1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T (GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ibalph) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42(6): 1115–9.
10. *Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, et al.* Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003; 108(8): 989–95.
11. *Andersen K, Hurlen M, Arnesen H, Seljeflot I.* Aspirin non-responsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 2002; 108(1): 37–42.
12. *Holcholzger W, Trenk D, Frudi D, Neumann FJ.* Whole blood aggregometry for evaluation of the antiplatelet effects of clopidogrel. *Bad Krozingen: Thromb Res*; 2006.
13. *Camoin-Jau L, Bonello L, Paganelli F, Arpin M., Sampol J, Dignat-George F, et al.* VASP phosphorylation analysis prior to percutaneous coronary intervention for exclusion of post-procedural major adverse cardiovascular events. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 2007.
14. *Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL 3rd, Furman MI.* Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 2000; 21(3): 259–70.
15. *Aleil B, Rochoux G, Monassier JP, Cazenave JP, Gachet C.* Ticlopidine could be an alternative therapy in the case of pharmacological resistance to clopidogrel: a report of three cases. *J Thromb Haemost* 2007; 5(4): 879–81.

Rad primljen 8. VIII 2008.