

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica

Tesi di specializzazione

**“Valutazione della reattività piastrinica residua in pazienti con
sindrome coronaria acuta in terapia antiaggregante”**

Candidata

Relatore

Francesca Della Pina

Prof Aldo Paolicchi

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INDICE

RIASSUNTO	4
ABSTRACT	7
Capitolo 1: INTRODUZIONE	10
1.1 Le sindromi coronariche acute	13
1.2 Le piastrine	19
1.3 Attivazione piastrinica	25
1.4 Il ruolo delle piastrine nella patogenesi delle sindromi coronariche acute	30
1.5 I farmaci antiaggreganti	35
1.6 La resistenza ai farmaci antiaggreganti e reattività piastrinica residua (RPR)	42
1.7 Prevenzione secondaria delle sindromi coronariche acute	46
1.8 Polimorfismi del citocromo CYP2C19 e variabilità di risposta al clopidogrel	49
1.9 Farmaci inibitori di pompa protonica e interazioni con il clopidogrel	50
Capitolo 2: SCOPO DELLA TESI	54
Capitolo 3: MATERIALI E METODI	55
3.1 Disegno dello studio	55
3.2 Raccolta dei campioni	56
3.3 Test di funzionalità piastrinica	58
3.3.1 Platelet function analyzer (PFA-100)	58
3.3.2 Aggregometria ottica tipo Born	63
3.3.3 Reattività piastrinica residua valutata con i test di funzionalità piastrinica PFA-100 e aggregometria ottica	69
3.4 Analisi genetica	70

3.5 Analisi statistica	70
Capitolo 4: RISULTATI	72
Capitolo 5: DISCUSSIONE	83
BIBLIOGRAFIA	88

RIASSUNTO

Introduzione: La terapia antiaggregante con aspirina e clopidogrel, volta alla inibizione della funzione e reattività piastrinica, rappresenta il trattamento standard per la riduzione degli eventi cardiovascolari avversi maggiori (MACE) nei pazienti con sindrome coronarica acuta sottoposti ad angioplastica coronarica ed impianto di stent. Tuttavia, i MACE, inclusa la grave complicanza della trombosi su stent, si verificano, sebbene in minor percentuale, nei pazienti in duplice terapia antiaggregante. Esistono numerose evidenze che dimostrano che una residua reattività piastrinica in corso di terapia antiaggregante si associa ad un incrementato rischio di complicanze avverse cardiovascolari. La tienopiridina clopidogrel necessita di assorbimento intestinale e conversione epatica a metabolita attivo a carico di numerose isoforme del citocromo P450, tra le quali la CYP2C19 gioca un ruolo fondamentale; il metabolita attivo del clopidogrel inibisce, quindi, l'attivazione piastrinica indotta da ADP legandosi irreversibilmente al recettore piastrinico P2Y₁₂. Negli ultimi anni diversi studi hanno sottolineato la possibile interferenza dei farmaci inibitori della pompa protonica (PPI) sull'effetto antiaggregante del clopidogrel, a causa del cross-metabolismo da parte del citocromo P450. Non è ancora del tutto chiaro se questo effetto sia una proprietà dell'intera classe o se sia specifico di un farmaco, anche se per alcuni PPI (lansoprazolo, esomeprazolo) questa interazione sembra essere più influente che per altri (pantoprazolo).

Materiali e metodi: 150 pazienti consecutivi con diagnosi di sindrome coronarica acuta del tipo STEMI (n=143) e NSTEMI (n=7), trattati con angioplastica coronarica percutanea (PCI), sono stati randomizzati a ricevere un inibitore di pompa protonica (n=80) o un antagonista del recettore H₂ (H₂-

RA) (n=70). La reattività piastrinica residua (RPR) è stata valutata mediante il Platelet Function Analyzer-100 (PFA-100) utilizzando le cartucce collagene-epinefrina (CEPI) e collagene-ADP (CADP) e mediante aggregometria a trasmissione di luce (LTA) utilizzando come stimoli pro-aggreganti adenosin difosfato (ADP) 10 μ M e acido arachidonico (AA) 1mM. I prelievi sono stati effettuati dopo 5 giorni (T0) e dopo 30 giorni (T1) dalla procedura di rivascolarizzazione.

Risultati: I dati demografici, clinici e procedurali erano simili tra i due gruppi. La prevalenza di portatori del polimorfismo CYP2C19*2 non era statisticamente differente (27% per il gruppo PPI e 40% per il gruppo H2-RA, p=0,16). I tempi di chiusura delle cartucce CEPI (CEPI-CT) non sono risultati significativamente differenti tra i due gruppi: mediana 300 sec (range 90-300, percentili 25-75: 172-300) per il gruppo H2-RA e mediana 300 sec (range 79-300, percentili 25-75: 154-300) per il gruppo PPI a T0 (p=0,31); mediana 286 sec (range 99-300, percentili 25-75: 125-300) per il gruppo H2-RA e mediana 300 sec (range 84-300, percentili 25-75: 143-300) per il gruppo PPI a T1 (p=0,29).

Per i tempi di chiusura delle cartucce CADP (CADP-CT) i dati relativi alla valutazione della funzionalità piastrinica non evidenziano una differenza statisticamente significativa tra il gruppo H2-RA ed il gruppo PPI per quanto riguarda la reattività piastrinica residua misurata come CADP-CT, sia in quinta giornata (T0) che ad un mese (T1): mediana 98 sec (range 61-300, percentili 25-75: 88-300) per il gruppo H2-RA e mediana 101 sec (range 61-300, percentili 25-75: 81-300) per il gruppo PPI a T0 (**p=0,95**); mediana 95 sec (range 55-300, percentili 25-75: 79-138) per il gruppo H2-RA e mediana 98 sec (range 68-300, percentili 25-75: 79-144) per il gruppo PPI a T1 (**p=0,84**) Abbiamo osservato un aumento significativo delle mediane dei valori

di massima aggregazione (MA) indotta da ADP 10 μ M (ADP-MA) nel gruppo PPI, sia dopo 5 giorni che dopo 30 giorni: mediana 19% (range 0-64, percentili 25-75: 10-33) nel gruppo H2-RA e mediana 28% (range 2-85, percentili 25-75: 17-41) nel gruppo PPI a T0 (**p=0,0067**); mediana 28% (range 2-68, percentili 25-75: 23-44) nel gruppo H2-RA e mediana 39% (range 10-71, percentili 15-75: 30-50) nel gruppo PPI a T1 (**p=0,008**).

Non sono state invece osservate differenze statisticamente significative ad entrambi i tempi nei valori di MA indotta da AA 1mM (AA-MA) tra il gruppo PPI ed il gruppo H2-RA: mediana 4% (range 0-63, percentili 25-75: 2-12) nel gruppo H2-RA e mediana 5% (range 0-75, percentili 25-75: 2-8) nel gruppo PPI a T0 (**p=0,65**); mediana 4% (range 0-28, percentili 25-75: 2-8) nel gruppo H2-RA e mediana 3% (range 0-19, percentili 25-75: 2-8) nel gruppo PPI a T1 (**p=0,99**)

All'analisi di regressione, l'età (p=0,02), l'uso di PPI (p=0,03) e l'ipertensione (p=0,02) sono risultati significativamente associati con l'ADP-MA ad un mese, mentre a 5 giorni solo l'uso di PPI (p=0,05) era significativamente associato con l'ADP-MA.

Conclusioni: Questa è la prima documentazione in uno studio randomizzato che, dopo la correzione per il bias del polimorfismo CYP2C19*2, i farmaci inibitori di pompa protonica determinano un aumento del tasso di RPR misurato con test specifici di funzionalità piastrinica piastrinica, nei pazienti trattati con duplice terapia antiaggregante.

ABSTRACT

Background: Antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel, for the inhibition of platelet function and reactivity, is the standard treatment for the reduction of major adverse cardiovascular events (MACE) in patients with acute coronary syndromes undergoing coronary angioplasty and stenting. However, MACE, including the serious complication of stent thrombosis, occur, although to a lesser percentage, in patients receiving dual antiplatelet therapy. There are many evidence to show that a residual platelet reactivity in the course of antiplatelet therapy is associated with an increased risk of cardiovascular adverse events. The thienopyridine clopidogrel requires intestinal absorption and hepatic conversion to active metabolite through various cytochrome P450 isoforms, including the CYP2C19 that plays a major role; then, the active metabolite of clopidogrel inhibits the activation of platelets by binding irreversibly P2Y₁₂ receptor on platelet surface.

In the last few years several papers have pointed out the potential interference of proton pump inhibitors (PPI) on the anti-platelet effect of clopidogrel, due to the cytochrome P450 cross-metabolism. If this is a class or a drug-specific effect is not clear, although some PPI (lansoprazole, esomeprazole) seems to be more influent than others (pantoprazole).

Methods: One hundred and fifty consecutive patients with ST elevation myocardial infarction (STEMI n=143) and NSTEMI (n=7), treated with percutaneous coronary angioplasty (PCI), were randomized between a PPI (n=80) or a H₂-receptor antagonist (H₂-RA) (n=70). High on-antiaggregant therapy Residual Platelet Reactivity (RPR) was evaluated by Platelet Function Analyzer-100 (PFA-100) with collagen-epinephrine (CEPI) and collagene-ADP (CADP) cartridge and light transmitted aggregometry with

10 μ M adenosin diphosphate (ADP) and 1mM arachidonic acid (AA), on 5 (T0) and 30 (T1) days after the procedure.

Results: Demographic, clinical and procedural data were similar between the two groups. The prevalence of carriers of the CYP2C19*2 polymorphism was not statistically different (27% for PPI group and 40% for H2-RA group, $p=0.16$). CEPI-CT values on days 5 and 30 were not significantly different: median 300 sec (range 90-300, 25-75 percentiles: 172-300) for H2-RA group and median 300 sec (range 79-300, 25-75 percentiles: 154-300) for PPI group at T0 ($p=0.31$); median 286 sec (range 99-300, 25-75 percentiles: 125-300) for H2-RA group and median 300 sec (range 84-300, 25-75 percentiles: 143-300) for PPI group at T1 ($p=0.29$). In a similar way CADP-CT CT values on days 5 and 30 were not significantly different: median 98 sec (range 61-300, 25-75 percentiles: 88-300) for H2-RA group and median 101 sec (range 61-300, 25-75 percentiles: 81-300) for PPI group at T0 ($p=0.95$); median 95 sec (range 55-300, 25-75 percentiles: 79-138) for H2-RA group and median 98 sec (range 68-300, 25-75 percentiles: 79-144) for PPI group at T1 ($p=0.84$). We observed a significant increase in maximal aggregation (MA) values induced by 10 μ M ADP in PPI group, on days 5 and 30: median 19% (range 0-63, 25-75 percentiles: 10-33) for H2-RA group and median 28% (range 2-85, 25-75 percentiles: 17-41) for PPI group at T0 ($p=0.0067$); median 28% (range 2-68, 25-75 percentiles: 23-44) for H2-RA group and median 39% (range 10-71, 25-75 percentiles: 30-50) for PPI group at T1 ($p=0.008$). Not statistically difference were observed at day 5 and 30 in the MA values for 1mM AA stimulus between PPI and H2-RA group: median 4% (range 0-63, 25-75 percentiles: 2-12) for H2-RA group and median 5% (range 0-75, 25-75 percentiles: 2-8) for PPI group at T0 ($p=0.65$); median 4% (range 0-28, 25-75

percentiles: 2-8) for H2-RA group and median 3% (range 0-19, 25-75 percentiles: 2-8) for PPI group at T1 (p=0.99).

At the regression analysis, age (p=0.02), PPI use (0.03) and hypertension (p=0.02) were significantly associated with ADP-MA at one month, while at 5 days only the use of PPI (p=0.05) was significantly associated with ADP-MA.

Conclusions: This is the first documentation in a randomized trial after correction for the bias of CYP 2C19 polymorphism that pantoprazole increases the rate of RPR by specific tests of platelet activity in patients treated with dual antiplatelet therapy.

INTRODUZIONE

L'attivazione piastrinica è uno dei meccanismi fisiologici fondamentali coinvolti nell'innesco della cascata coagulativa e nel processo emostatico.

D'altra parte è ampiamente documentato in letteratura il ruolo che una iper-reattività piastrinica, caratterizzata da un'aumentata adesione e aggregazione, svolge nella patogenesi delle complicazioni atero-trombotiche, associate a molti disturbi cardiovascolari (angina, infarto, ictus).

Le sindromi coronariche acute comprendono uno spettro di manifestazioni cliniche di natura ischemica, imputabili generalmente alla rottura di una placca aterosclerotica a livello delle coronarie, con conseguente trombosi vascolare e riduzione del flusso sanguigno miocardico.

I farmaci cosiddetti "anti-piastrinici" devono il loro effetto inibitorio sull'aggregazione piastrinica al blocco selettivo di una specifica via di traduzione del segnale attivatorio dovuto ad uno stimolo trombotico.

La duplice terapia antiaggregante basata sull'impiego di aspirina e clopidogrel, volta alla diminuzione della funzione e aggregazione piastrinica, rappresenta attualmente il trattamento standard per la terapia delle sindromi coronariche acute (SCA) per la profilassi dei pazienti sottoposti ad angioplastica coronaria e per la prevenzione a lungo termine degli eventi trombotici cardiovascolari e cerebrovascolari.

La doppia antiaggregazione ha fornito sicuramente i fondamenti per un miglioramento dell'outcome clinico dei pazienti con SCA, sia che vengano o

meno sottoposti a intervento di rivascolarizzazione percutanea (PCI) (Pugliano M., Cattaneo M. 2009).

Tuttavia l'impiego di clopidogrel e aspirina non si è dimostrata una strategie terapeutica priva di limitazioni.

In particolare:

- il limitato beneficio del clopidogrel somministrato immediatamente prima della PCI
- il rischio di sanguinamento in caso di necessità di rivascolarizzazione chirurgica
- la ricorrenza degli eventi ischemici per sospensione anticipata della terapia dopo PCI,

hanno fatto emergere la necessità di sviluppare nuovi farmaci antiaggreganti, dotati di un effetto antiplastrinico più marcato e privi di interferenza con i normali processi dell'emostasi.

A fronte della sua efficacia antitrombotica ampiamente documentata, il clopidogrel manca infatti di alcune importanti caratteristiche proprie di un agente antitrombotico "ideale" quali: un profilo farmacodinamico prevedibile, rapidi on e offset, potente effetto antiplastrinico, basso rischio, basso costo e facile somministrazione (Cattaneo M. 2010)

Una delle limitazioni clinicamente più rilevanti del clopidogrel è la variabilità di risposta interindividuale alla terapia, che si traduce nella persistenza di una reattività piastrinica post trattamento (residual platelet reactivity, RPR), dovuta a inadeguata inibizione da parte del farmaco.

La rilevanza clinica del fenomeno "resistenza al clopidogrel" è stata ampiamente dimostrata in numerosi trials clinici, nei quali essa diviene strettamente connessa con un aumentato rischio di eventi aterotrombotici e

diviene fattore predittivo di trombosi intra-stent nei pazienti sottoposti a rivascularizzazione con impianto di stent (Cuisset et al 2006)

La bassa responsività al clopidogrel che si evidenzia in una quota di pazienti in trattamento antiaggregante, è determinata da molteplici fattori in parte legati alla variabilità farmacocinetica, che influenza la concentrazione plasmatica del metabolita attivo, e in parte alla variabilità farmacodinamica, che riguarda tutti i processi coinvolti nel meccanismo d'azione del farmaco.

In particolare la variabilità nella metabolizzazione epatica dovuta ai polimorfismi del citocromo CYP3A4 e le interferenze con farmaci che vengono metabolizzati dallo stesso citocromo e possono ridurre significativamente la biodisponibilità sistemica del metabolita attivo del clopidogrel, rappresentano i due aspetti particolarmente enfatizzati dalla letteratura medica e attualmente oggetto di numerosi dibattiti.

Da ciò deriva l'importanza del monitoraggio della funzionalità piastrinica nei pazienti in doppia terapia antiaggregante, attraverso l'impiego di opportuni test di laboratorio in grado di stabilire una correlazione fra profilo di reattività piastrinica di ciascun paziente ed evoluzione clinica, allo scopo di individuare un fattore predittivo di eventi ischemici; questo potrebbe consentire un miglioramento dell' outcome clinico dei pazienti attraverso un approccio terapeutico personalizzato.

Infatti l'attività antiplastrinica 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 stati utilizzati test diagnostici diversi per valutare il grado di inibizione piastrinica e, in alcuni casi, per predire il rischio trombotico

Tuttavia, nonostante i numerosi interventi in letteratura, ad oggi non è ancora stato chiarito quale sia il test più idoneo per monitorare la risposta ai farmaci antiaggreganti e per individuare una condizione di resistenza sulla base dell'incapacità del farmaco di colpire il bersaglio della propria azione.

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 quindi di estrema importanza 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.

1.1 - LE SINDROMI CORONARICHE ACUTE

Il termine cardiopatia ischemica racchiude in sé uno spettro di condizioni patologiche dovute a ischemia miocardia, una condizione di squilibrio fra il fabbisogno di sangue ossigenato da parte del miocardio e la reale possibilità di apporto ematico mediante la circolazione coronarica.

In oltre il 90% dei casi la causa di ischemia miocardia risiede in una riduzione del flusso coronarico, a sua volta dovuta ad una stenosi o occlusione di natura aterosclerotica delle arterie coronarie.

Pertanto si tende a considerare la cardiopatia ischemica come sinonimo di coronaropatia.

Le manifestazioni cliche della cardiopatia ischemica comprendono uno spettro molto ampio di patologie che va da quadri di aterosclerosi diffusa in assenza di sintomi, a quadri istopatologici di modesta ostruzione che si manifestano con infarto acuto o morte cardiaca improvvisa.

Pertanto rientrano nella definizione di sindrome coronaria acuta tutte le situazioni di ischemia miocardica acuta, a carattere ostruttivo, che possono essere viste come uno spettro continuo dall'angina instabile all'infarto acuto transmurale (De Caterina R, 2000)

Le sindromi coronariche acute sono caratterizzate da un meccanismo fisiopatologico estremamente complesso nel quale la rottura della placca e la trombosi rappresentano la via finale comune di un processo che vede l'interazione dinamica di più fattori quali:

- lo stress emodinamico esercitato nei confronti della placca, che ne favorisce la rottura
- la reazione infiammatoria a livello della placca, che ne determina l'indebolimento
- l'induzione di uno stato infiammatorio sistemico
- l'induzione di uno stato protrombotico, sia *in situ* che sistemico.

(Antmann et al. 2009)

Una volta iniziata in forma di stria lipidica, la lesione aterosclerotica progredisce verso stadi più avanzati dell'ateroma, in presenza continua di fattori di rischio aterogeni, mediante deposizione intra ed extracellulare di lipidi, la formazione di matrice e l'aumento del numero delle cellule muscolari lisce, sia per proliferazione *in situ* intimale che per migrazione dalla media.

Gli ateromi avanzati hanno un aspetto prevalentemente fibroso mentre manca l'aspetto ipercellulare tipico delle lesioni precoci.

Gli ateromi fibrolipidici maturi, completi di cappuccio fibroso, possono arrivare ad occludere la maggior parte del lume vasale senza tuttavia manifestare segni clinicamente evidenti.

Negli ultimi anni è andata aumentando la consapevolezza che il grado di stenosi luminale correla male con lo sviluppo delle sindromi coronariche acute; .in altre parole, la propensione di una placca ad andare incontro a rottura, e in questo modo precipitare una trombosi coronaria, non sembra correlar bene con le dimensioni della placca stessa e il grado di riduzione del lume come visualizzato all'angiografia (Little WC et al.1988, Falk E et al. 1995)

Infatti, l'esordio di una condizione ischemica, spesso improvviso, è generalmente legato alla trasformazione repentina e imprevedibile di una placca stabile moderatamente stenotica, in una lesione potenzialmente fatale, caratterizzata da erosione del cappuccio fibroso, ulcerazione o emorragia profonda e trombosi sovrainposta.

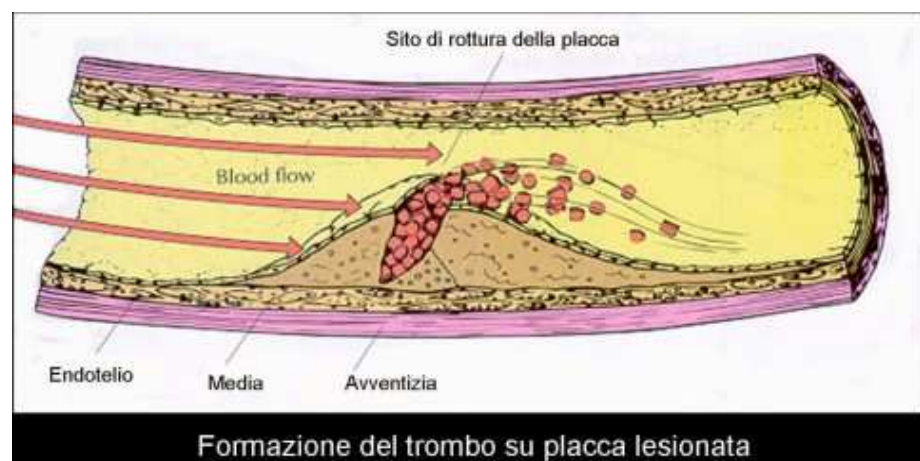


Fig. 1. Formazione del trombo su placca lesionata

La trombosi che accompagna generalmente il processo di instabilizzazione della lesione aterosclerotica, rappresenta la complicanza

cl clinicamente più temuta, in quanto la sovrapposizione di un trombo può trasformare una placca fissurata parzialmente stenotica in una ostruzione completa.

Pertanto l'attenzione degli studi è attualmente rivolta in gran parte alla possibilità di delineare l'identikit di una placca vulnerabile, attraverso l'individuazione sia di markers morfologici, con l'ausilio della diagnostica strumentale, che di meccanismi di instabilizzazione, intrinseci ed estrinseci alla placca stessa.

Studi condotti principalmente da parte del gruppo di M.J.Davies hanno mostrato che una placca vulnerabile, suscettibile alla rottura, è tipicamente costituita da un core lipidico di dimensioni abbondanti, da un cappuccio fibroso sottile e meno denso, da un'alta densità di macrofagi e da un numero relativamente basso di cellule muscolari lisce (Davies et al. 1981).

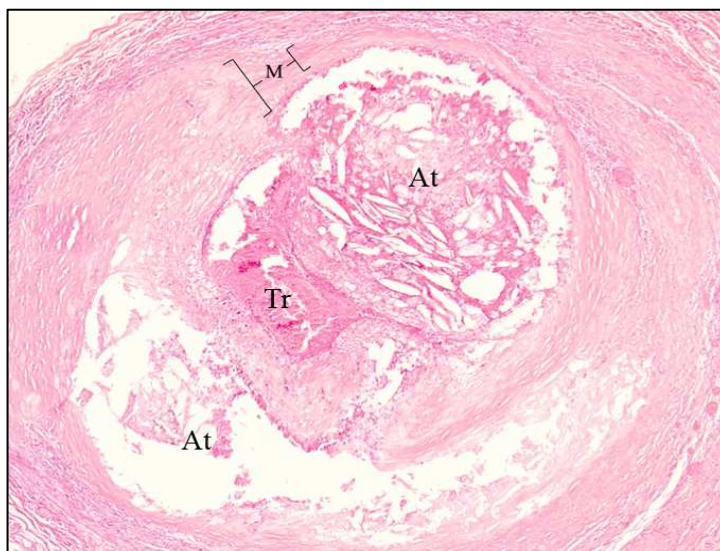


Fig. 2: Immagine istologica della "placca "vulnerabile": core centrale di pappa ateromasica ricca di colesterolo ed esteri del colesterolo, separata dal lume vascolare da un sottile cappuccio fibroso. Questo strato di fibre collagene previene il contatto del sangue circolante con il core lipidico altamente trombogenico; per tale motivo il suo spessore è una delle determinanti della stabilità della placca e dipende dalla velocità di sintesi e degradazione del collagene.

D'altra parte l'entità dell'ostruzione a livello delle coronarie determina una serie di quadri patologici acuti di ischemia miocardica con gravità differente e che, sulla base del tracciato elettrocardiografico a 12 derivazioni, vengono distinte in :

- l'infarto miocardico acuto con elevazione del tratto ST (**STEMI**), dovuto a occlusione stabile e completa del vaso coronario; esso viene definito anche transmurale e presenta le seguenti caratteristiche:
 1. dolore toracico tipico oppure epigastrico (non sempre presenti)
 2. caratteristiche alterazioni elettrocardiografiche (sopraslivellamento del tratto ST e formazione dell'onda Q)
 3. positività degli indici di necrosi miocardica (troponina, CKMB, mioglobina)
- l'infarto miocardico senza elevazione del tratto ST (**NSTEMI**), detto anche subendocardico, dovuto ad un'occlusione incompleta o temporanea del vaso coronarico. In questo caso il livello degli indici di necrosi miocardica è almeno il doppio della norma, ma manca il caratteristico quadro elettrocardiografico dell'infarto transmurale (sopraslivellamento del tratto ST e formazione dell'onda Q).

Esso presenta le seguenti caratteristiche:

- dolore toracico tipico oppure epigastrico (non sempre presenti)
- - non alterazioni significative del tratto ST
- - Positività degli indici di necrosi miocardica
- **angina instabile (UA)**: in questo quadro clinico rientrano varie tipologie di angina: a riposo, ad esordio recente e in crescendo.

Tutti questi sintomi identificano uno stato di stenosi progressivamente ingravescente che può evolvere nel tempo verso l'ostruzione completa e possono pertanto precedere l'infarto miocardico. In questa manifestazione della sindrome coronarica acuta tutti i markers biochimici, in presenza o meno di variazioni dell'elettrocardiogramma, sono o normali o lievemente al di sopra della norma.

Il 75% dei pazienti che si presentano con sopraslivellamento del tratto ST sviluppano un infarto a onde Q, mentre il restante 25% non sviluppano onde Q.

Nei pazienti che inizialmente si presentano senza sopraslivellamento del tratto ST, la diagnosi è di infarto acuto senza elevazione del tratto ST NSTEMI o angina instabile; la distinzione tra queste due ultime condizioni si basa sulla determinazione degli indici di necrosi miocardia.

1.2 - LE PIASTRINE

Le piastrine o trombociti scoperte da Bizzozzero nel 1882, sono piccoli frammenti cellulari anucleati derivati dal citoplasma dei megacariociti.

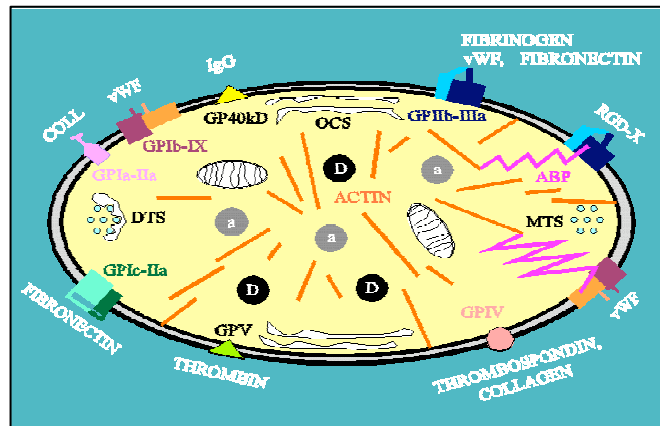


Fig. 3: Rappresentazione schematica dei componenti morfo-strutturali di una piastrina. Si possono osservare i comuni costituenti cellulari ad eccezione del nucleo (mitocondri, microtubuli, rare cisterne di Golgi). Gli elementi cellulari più numerosi sono rappresentati dai granuli di deposito, α -granuli (a) e granuli densi (D), e dalle glicoproteine di membrana con funzione recettoriale, ampiamente diversificate per mediare tutte le risposte piastriniche agli stimoli extracellulari.

Nel sangue raccolto direttamente in una soluzione fissante, senza essere prima trattato con anticoagulanti e centrifugato, le piastrine non attivate appaiono di forma discoidale a lente biconvessa, con l'asse maggiore di 1.5-3.5 μm e con un volume medio di 7-8 μm^3 . Quando si trovano in una condizione di attivazione funzionale assumono una forma sferica con molte proiezioni superficiali dette filopodi (Holmsen H.1991).

Il numero totale di piastrine circolanti, normalmente compreso tra 250.000 e 500.000 elementi per μl di sangue, è il risultato del rapporto tra piastrine prodotte a livello midollare e quelle distrutte in sede periferica.

È stato calcolato che la piastrinopoiesi midollare produce normalmente circa 100 miliardi di piastrine al giorno. Immesse in circolo, sia direttamente dal midollo o indirettamente attraverso trasfusione, le piastrine si distribuiscono in due compartimenti, quello plasmatico e quello splenico.

Da quest'ultimo, contenente circa un terzo della massa piastrinica totale, le piastrine sequestrate, possono essere rimesse in circolo, in libero scambio con il pool plasmatico.

Come tutte le cellule ematiche, le piastrine hanno una durata di vita limitata nel sangue circolante, essendo la loro vita media di circa 8-10 giorni. La loro eliminazione (piastrinocateresi), avviene ad opera del sistema reticolo-endoteliale (RES), soprattutto splenico, ma anche epatico.

Le piastrine non hanno nucleo, ma contengono la maggior parte degli organuli subcellulari comuni alle altre cellule, quali: mitocondri, microtubuli, granuli di glicogeno, rare cisterne del Golgi, ribosomi, e granuli di deposito; quest'ultimi rappresentano i componenti citoplasmatici più numerosi (circa il 20% del volume di una piastrina).

Osservate al microscopio luce, dopo trattamento con le comuni colorazioni ematologiche, appaiono costituite da una parte centrale di aspetto granulare, detta *granulomero*, e da una zona periferica meno densa agli elettroni, quasi ialina, che circonda la precedente, detta *ialomero*.

In posizione centrale nel citoplasma piastrinico si collocano i granuli delimitati da membrana, che rappresentano i componenti piastrinici più numerosi.

Le piastrine hanno un'attività secretoria molto intensa, che si manifesta in seguito ad attivazione, con il rilascio di un gran numero di molecole effettrici coinvolte nell'emostasi, nei processi trombotici e nel rimodellamento vascolare.

I costituenti granulari costituiscono, infatti, un gruppo di molecole strutturalmente e funzionalmente eterogenee, quali fattori di crescita (PDGF, TGF), proteine della coagulazione (FV, FVIII, FXa) e della fibrinogenesi (α_1 -antitripsina), molecole adesive (fibronectina, vitronectina, trombospondina), citochine, integrine, molecole infiammatorie, nucleotidi adeninici fosforilati (ADP, ATP, GTP), amine biogene (serotonina adrenalina, istamina).

Sono stati identificati tre principali tipi di granuli piastrinici di deposito: α granuli, granuli densi e lisosomi, differenziati sulla base del loro contenuto e con diverse cinetiche di rilascio:

- **α -granuli:** sono formazioni sferiche, o ovoidali, delimitate da una membrana liscia. Rappresentano i granuli più grandi e numerosi (fino ad 80 per piastrina), che contengono una varietà di mediatori solubili funzionalmente eterogenei, schematicamente suddivisibili come segue:
 - a) molecole specifiche delle piastrine, sintetizzate esclusivamente nei megacariociti (es. fattore piastrinico 4 e beta tromboglobulina)
 - b) molecole piastriniche selettive, sintetizzate nei megacariociti come pure in poche altre cellule, e sono presenti nei granuli in concentrazione più alta rispetto al plasma (es. fattore quinto della coagulazione, trombospondina, P-selectina, fattore di von Willebrand)
 - c) molecole non specifiche, prodotte da altre cellule e assunte dalle piastrine per endocitosi (es. fibrinogeno assunto per endocitosi mediata da recettore attraverso l'interazione con l'integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$).

La secrezione degli α -granuli comporta oltre al rilascio di proteine solubili nel mezzo extracellulare, anche il trasferimento sulla superficie piastrinica di proteine ancorate alla membrana degli stessi granuli. Un esempio ben noto di tale processo è la comparsa, sulla membrana piastrinica, in

seguito ad attivazione, della molecola P-selectina, che in condizioni resting si trova sul foglietto interno della membrana granulare.

- **granuli densi:** risultano nettamente meno numerosi rispetto ai precedenti, ma non meno importanti dal punto di vista funzionale, in quanto contengono elevate concentrazioni di piccole molecole con un ruolo chiave nell'attivazione piastrinica. Esse includono:
 - a) l'ADP, che rappresenta uno dei principali agonisti piastrinici esogeni e, che, quando rilasciato dai granuli, interviene nell'amplificazione dell'attivazione piastrinica necessaria per un'aggregazione stabile.
 - b) La serotonina che, come l'ADP, amplifica la risposta piastrinica a stimoli attivatori esogeni.
 - c) vari altri nucleotidi adenosinici e guanodinici in forma tri-, bi- e monofosforilata (ATP, ADP, AMP, GDP, GTP) e ioni calcio, magnesio e pirofosfato.
- **granuli lisosomiali:** similmente a quelli presenti in altre cellule contengono idrolisi acide, catepsine D ed E, come pure enzimi degradativi presumibilmente coinvolti in processi di catabolismo intracellulare [11].

Particolarmente rilevante per la funzione emostatica delle piastrine è la composizione glicoproteica della membrana plasmatica, la quale include numerosi complessi recettoriali, in grado di mediare tutte le relazioni con l'ambiente extracellulare.

Il vasto corredo recettoriale piastrinico è stato ampiamente studiato, e di molti recettori sono note sia la struttura che la funzione. I recettori piastrinici vengono suddivisi sulla base delle loro caratteristiche strutturali e della loro specificità di interazione con determinati ligandi. Possiamo menzionare alcuni di essi quali ad esempio: recettori tirosin-chinasici (es. per trombopoietina),

integrine, selectine recettori a sette domini transmembrana (per gli agonisti piastrinici), recettori per molecole prostaglandiniche, per chemochine e fattori lipidici (PAF, platelet activating factor), recettori immunoglobulinici.

Dal punto di vista funzionale possiamo fare una distinzione, seppure schematica, tra:

- recettori di adesione, in grado di interagire con molecole presenti nel plasma, nella matrice subendoteliale (collagene, trombospondina, fibronectina, vWF, fibrinogeno), o sulla membrana di altre cellule ematiche,
- recettori per agonisti fisiologici, in grado di “trasdurre” all’interno della piastrina il segnale attivatorio extracellulare.

Questa distinzione non è tuttavia assoluta, in quanto accade spesso che una molecola con funzione adesiva possa innescare, a seguito di interazione recettoriale, un processo trasduzionale intrapiastrinico .

Una classe recettoriale piastrinica, ampiamente rappresentata e condivisa con altri tipi cellulari, è quella degli eterodimeri integrinici. Questi mediano l’interazione con macromolecole (collagene, fibrinogeno, fattore di von Willebrand, trombospondina) plasmatiche, o adese alla matrice, quando opportuni segnali intrapiastrinici ne determinano il passaggio da una forma a bassa affinità, ad una dotata di elevata capacità adesiva. Mediante l’impiego di specifici anticorpi monoclonali, sono stati individuati sulla superficie piastrinica sei differenti complessi integrinici, suddivisi in tre gruppi (β_1 , β_2 , β_3) (Clemetson K. J 2002)

Tra questi il complesso glicoproteico $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa o CD41/61), è l’unica integrina espressa unicamente sulle piastrine, con 50.000-80.000 copie recettoriali per cellula. L’importanza funzionale di questa molecola, coinvolta nel legame alla superficie piastrinica di macromolecole essenziali

per l'aggregazione omotipica e l'adesione all'endotelio, è nota da studi condotti su pazienti affetti da Tromboastenia di Glanzman, un difetto congenito di sanguinamento, caratterizzato da una carente aggregazione piastrinica in risposta a qualsiasi stimolo attivatorio (Hato T. et al.2002)

Altre glicoproteine di superficie, non espresse unicamente sulle piastrine, formano complessi recettoriali, che mediano l'adesione al collagene (integrina $\alpha_2\beta_1$ o GPIa/IIa), ad altre molecole adesive presenti nella matrice extracellulare (integrine GPIb, recettore per il vWF e $\alpha_5\beta_1$ recettore per la fibronectina), come pure l'adesione eterotipica delle piastrine a cellule endoteliali e leucociti (CD40L o CD154)

1.3 -ATTIVAZIONE PIASTRINICA

Le piastrine partecipano al processo emostatico in qualità di effettori cellulari primari, ed esprimono una varietà di risposte funzionali, conseguenti ad attivazione, che sono primariamente finalizzate al ripristino dell'integrità vascolare, e all'innesco del processo coagulativo.

In relazione a questo ruolo emostatico principale, le piastrine appaiono come elementi ematici molto reattivi, in quanto si mantengono integre e isolate nel circolo sanguigno soltanto in condizioni di perfetta normalità dell'endotelio vasale e di flusso sanguigno nel loro interno.

Infatti, non appena si verificano una modificazione del flusso laminare ematico che genera uno stress meccanico (shear stress), o una qualsiasi alterazione della parete endoteliale (interruzione della sua continuità, alterazione della carica elettrica, perdita delle proprietà idrorepellenti), si innesca una sequenza di reazioni a catena che portano in brevissimo tempo alla formazione di un tappo emostatico piastrinico nella sede di lesione .

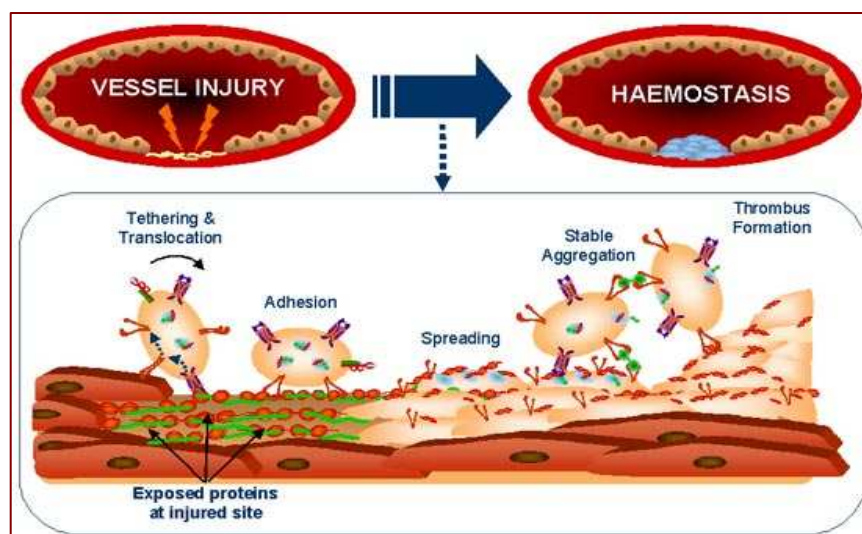


Fig. 4: Funzione emostatica delle piastrine

La prima risposta delle piastrine ad uno stimolo attivatorio, quale una lesione della parete vasale o anche un'attivazione delle cellule endoteliali dovuta a stimoli infiammatori, è la marginazione verso la periferia del vaso e l'adesione stabile all'endotelio. Questo processo è il risultato di complesse interazioni molecolari tra i costituenti della matrice subendoteliale (laminina, vitronectina, vWF, collagene, fibronectina, trombospondina), e specifici complessi recettoriali integrinici presenti sulla superficie piastrinica. A tale proposito è stata osservata la necessità dell'azione sinergica di almeno quattro recettori piastrinici:

- il complesso GPIb-IX-V
- il complesso GPIIb/IIIa
- le integrine $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$

Perché una stabile adesione all'endotelio possa avvenire in condizioni di elevata velocità di flusso, sembra essere essenziale l'interazione del collagene subendoteliale con il recettore piastrinico GPIb-IX-V- mediata dall'intervento del fattore di von Willebrand (vWF) di origine endoteliale, che forma un ponte molecolare tra i due elementi interagenti (Savage B et al 2001)

Il vWF è un complesso multimerico principalmente prodotto dalle cellule endoteliali, che lo immettono nel plasma, dove si trova in associazione al fattore VIII della coagulazione, o lo depositano direttamente nella matrice.

L'adesione all'endotelio espone le piastrine ad un microambiente di stimoli attivatori in elevata concentrazione, quali collagene, trombina, ADP o vWF, rilasciati nel sito di alterazione. Ciascun agonista, interagendo con uno o più recettori piastrinici, innesca una sequenza di eventi intracellulari, con formazione di secondi messaggeri, che mediano la trasduzione del segnale attivatorio. Sebbene i componenti delle vie di traduzione intracellulare

possano differire fra i vari agonisti, tutte confluiscono su di un bersaglio finale comune, rappresentato dal complesso glicoproteico GPIIb/IIIa (CD41/CD61).

Quest'ultimo in seguito a cambiamento conformazionale lega il fibrinogeno subendoteliale determinando la iniziale adesione piastrinica alla parete vasale, e legando il fibrinogeno solubile plasmatico, consente l'adesione omotipica tra le piastrine e l'aggregazione primaria (Abrams C.S. 2005)

Successivamente, l'aggregato piastrinico primario si accresce attraverso il reclutamento di piastrine circolanti, che si attivano in risposta agli agonisti solubili (es. ADP e TXA₂) liberati dalle piastrine già aderenti all'endotelio, a seguito della reazione di rilascio. I costituenti granulari, immessi nel plasma, rafforzano le interazioni adesive tra piastrine attivate e producono il reclutamento di nuove piastrine circolanti, avviando un processo rigenerativo di autoamplificazione. L'effetto finale è un rapido accrescimento e consolidamento dell' aggregato piastrinico

Infine, le interazioni adesive tra piastrine adiacenti si rafforzano attraverso un processo di autoamplificazione dell'attivazione, e l'aggregato si stabilizza mediante la formazione di un reticolo di fibrina (Woulfe D. et al. 2002)

ADP e trombossano A₂ rappresentano i più importanti mediatori di amplificazione del reclutamento e dell'attivazione piastrinica.

Tra i mediatori endogeni rilasciati dai granuli densi piastrinici l'ADP è classificato tra gli agonisti "deboli", in quanto non è in grado di indurre secrezione senza aggregazione (Jin J et al. 1998).

La sua capacità di indurre secrezione dei granuli, dipende infatti dall'integrità della via metabolica degli endoperossidi prostaglandinici, ed è inibita da farmaci come l'aspirina e l'indometacina. Quindi, l'aggregazione

secondaria osservabile nella stimolazione in vitro con ADP, è il risultato della produzione di TXA₂, e non riflette la risposta primaria delle piastrine a questo nucleotide.

Pertanto la funzione principale dell'ADP in vivo sembra quella di rafforzare l'effetto attivante di altri agonisti più "forti", capaci di indurre reazione di rilascio e liberazione di ADP endogeno.

L'effetto attivatorio dell'ADP dipende dalla presenza sulla membrana piastrinica di due recettori purinergici costitutivamente espressi, P2Y₁₂ e P2Y₁, recettori metabotropici accoppiati funzionalmente a proteina G.

Il recettore piastrinico P2Y₁ è associato ad una proteina G_q, e la sua stimolazione induce attivazione della fosfolipasi C (isoforma β) e innesco della via dei secondi messaggeri fosfoinositidici (DAG e IP₃), che produce reazioni proprie del metabolismo dell'acido arachidonico, quali liberazione di TXA₂, innalzamento dei livelli di calcio ionizzato intraplastrinico, e riorganizzazione del citoscheletro

Il recettore metabotropico P2Y₁₂ è accoppiato a proteina G_i la quale, tramite la sua subunità α , produce un effetto inibitorio sull'adenilato-ciclastasi, e una conseguente diminuzione dei livelli intraplastrinici del nucleotide ciclico 3'-5' adenosina monofosfato (cAMP). D'altra parte il complesso $\beta\gamma$ della suddetta proteina eterotrimerica, induce attivazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K), un enzima coinvolto nell'iniziale cambiamento conformazionale del recettore piastrinico GPIIb/IIIa, necessario per l'aggregazione primaria, come pure per la formazione di un legame stabile con il fibrinogeno, richiesto per l'aggregazione secondaria

Quando la funzione recettoriale del P2Y₁₂ viene completamente abolita, l'aggregazione piastrinica è ancora osservabile ma risulta

prontamente reversibile, come accade in pazienti affetti da deficienza congenita per questo recettore.

Quando invece è il recettore P2Y1 ad essere selettivamente bloccato, la stimolazione con ADP produce un'aggregazione che procede lentamente e che non è associata a cambiamento di forma delle piastrine.

Sulla base delle suddette considerazioni è stato evidenziato un ruolo essenziale del recettore P2Y1 nella fase di innesco dell'attivazione piastrinica, ovvero nel promuovere gli eventi necessari ad un'aggregazione primaria.

D'altra parte, il consolidamento del trombo piastrinico e l'aggregazione irreversibile, richiedono una sostenuta inibizione dell'adenilato ciclasi, ottenibile con attivazione del recettore P2Y12 [26,16].

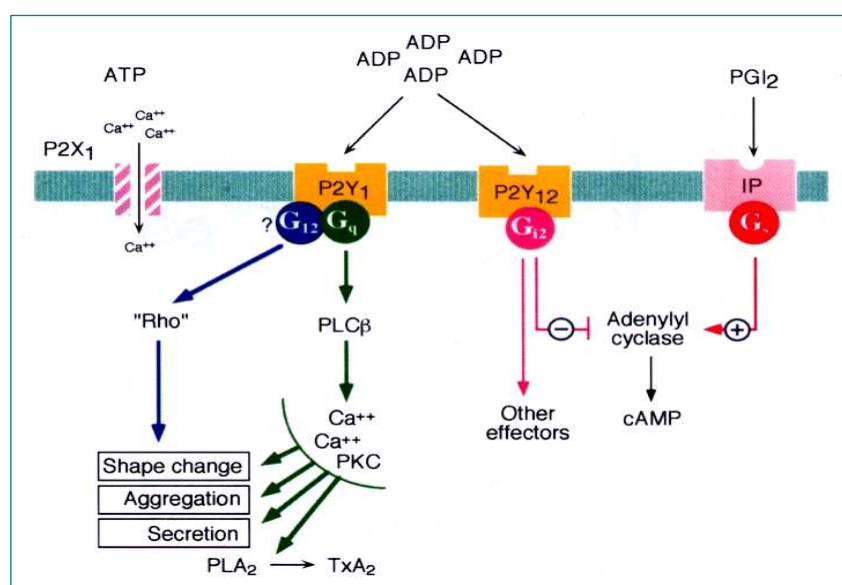


Fig. 6. Recettori piastrinici per l'ADP

L'attivazione e la conseguente aggregazione delle piastrine, sono necessarie per la formazione del tappo emostatico primario, ma intervengono anche come importante meccanismo di innesco del processo coagulativo.

Infatti le piastrine attivate manifestano un'attività procoagulante, fornendo una superficie ottimale per l'assemblaggio dei vari complessi enzimatici che presiedono alla formazione di trombina.

Nella fase iniziale del processo coagulativo le piastrine favoriscono l'attivazione dei fattori di contatto (FXII, FXI). Successivamente, i fosfolipidi a carica negativa della membrana piastrinica (es. fosfatidilcolina), vanno a costituire, assieme al FV, al FX e agli ioni calcio, la protrombinasi che opera la conversione enzimatica della protrombina in trombina [7]. In tal modo, le piastrine favoriscono la formazione del coagulo di fibrina, necessario al consolidamento del tappo emostatico, e liberano fattori che intervengono nella riparazione della lesione vascolare.

1.4 - IL RUOLO DELLE PIASTRINE NELLA PATOGENESI DELLE SINDROMI CORONARICHE ACUTE

Numerose evidenze angiografiche e angioscopiche hanno rivelato la presenza di trombi intracoronarici, in pazienti con sindrome coronarica acuta, costituiti da piastrine in variabile associazione con fibrina, eritrociti e leucociti.

Inoltre molti trials clinici hanno dimostrato l'innegabile vantaggio dell'impiego di farmaci antitrombotici nella riduzione di event ischemici in ampie categorie di pazienti affetti da coronaropatia (CAD).

Tutto questo, unitamente ai progressi nella conoscenza della fisiopatologia piastrinica, ha contribuito fortemente a rafforzare l'associazione tra attivazione piastrinica e patologia cardiovascolare ischemica.

Per questa ragione numerosi agenti con proprietà antitrombotiche (quali inibitori dell'aggregazione piastrinica, antitrombine, anticoagulanti orali, e

fibrinolitici) sono comunemente impiegati nel trattamento delle malattie cardiovascolari. In particolare contrastare la tendenza delle piastrine ad aggregare e ad avviare la cascata emocoagulativa è divenuto l'obiettivo primario nel trattamento delle sindromi coronariche acute relegando la tradizionale terapia antischemica, a base di nitrati e betabloccanti, ad un ruolo secondario (Mafri A. 2005).

Le piastrine svolgono un ruolo determinante nella patogenesi delle complicanze trombotiche tardive proprie delle placche vulnerabili; la rottura della placca, infatti, determina esposizione al flusso sanguigno del core lipidico altamente trombogenico, in grado di attivare le piastrine e di innescare la cascata coagulativa.

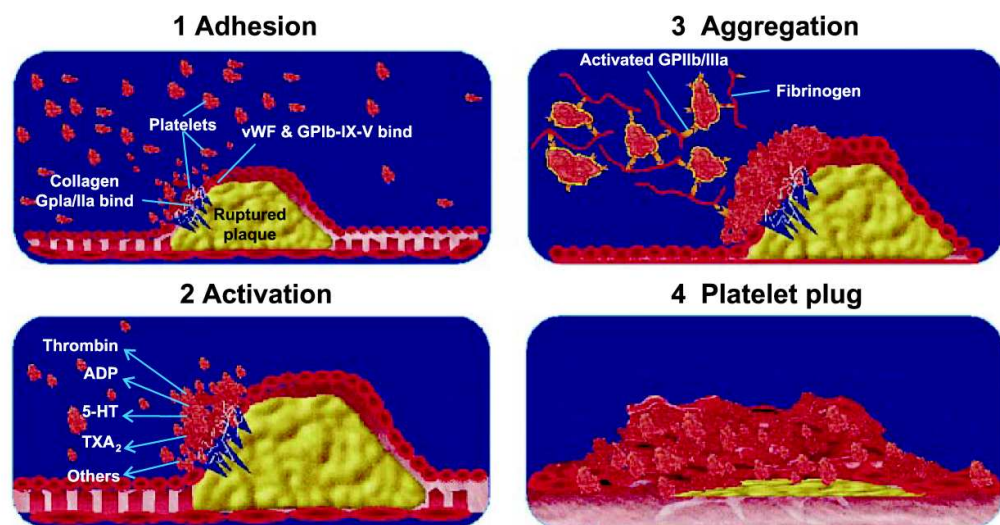


Fig. 1 Creation of platelet plug in thrombus formation. vWF = von Willebrand factor; GP = glycoprotein; ADP = adenosine diphosphate; 5-HT = serotonin; TXA₂ = thromboxane A₂. Adapted with permission from Kumar [95].

Fig. 6. Evoluzione trombotica di una placca aterosclerotica

D'altra parte è importante sottolineare che molteplici fattori genetici, biochimici e ambientali influenzano la progressione di una placca aterosclerotica attraverso diverse fasi di evoluzione, generando una serie di

circoli viziosi, con produzione di una complessa rete citochimica, come parte di una risposta infiammatoria alla disfunzione endoteliale primaria.

In questo contesto le piastrine, precocemente attivate dalle alterazioni dello stato funzionale dell'endotelio sulla superficie della placca, possono modulare, attraverso sia interazioni cellulari dirette, che rilascio di mediatori solubili (citochine pro-infiammatorie e fattori di crescita), molti aspetti della reazione infiammatoria che caratterizza l'insorgenza e la progressione della lesione ateromatosa, avendo pertanto un ruolo importante non solo nelle complicanze ischemiche tardive ma anche nelle fasi più precoci dell'aterogenesi (Libby et al. 2008)

Il processo di formazione di un trombo arterioso è determinato da una cascata di eventi nella quale molteplici componenti tra i quali le piastrine, i fattori della coagulazione, mediatori solubili dell'infiammazione, cellule circolanti, si sovrappongono e si amplificano vicendevolmente fino a determinare l'occlusione del vaso.

Le piastrine iniziano il processo trombotico in un sito di lesione vascolare prodotto generalmente dalla rottura o fissurazione di una placca aterosclerotica.

L'innnesco del processo è rappresentato dall'iniziale rotolamento delle piastrine sulla superficie endoteliale seguito dall'adesione a vari componenti del sottoendotelio, mediata principalmente da due recettori piastrinici:

- glicoproteina VI (GPVI) e GPIa: interagisce con il collagene sub-endoteliale
- glicoproteina Ib (GPIb): interagisce con il fattore di Von Willebrand

Le piastrine adese stabilmente all'endotelio subiscono poi un processo di attivazione che culmina nella modificazione conformazionale del recettore

integrinico GPIIb/IIIa, nell' esposizione di recettori di adesione (es P-selectina) sulla superficie, nella liberazione di agonisti endogeni dai granuli piastrinici citosolici e nell' innesco del processo coagulativo.

Questi eventi amplificano il processo di attivazione e consentono il sia l' accrescimento che la stabilizzazione del trombo.

In particolare, adenosina di-fosfato (ADP) e trombossano A₂ (TxA₂), secreti dalle piastrine attivate adese al sub-endotelio, sono in grado di attivare le piastrine circolanti, determinandone il reclutamento e l' aggregazione con accrescimento del trombo primario. Inoltre, la P-selectina, esposta sulla superficie delle piastrine attivate funziona da sito di legame per il fattore tissutale (TF) circolante con innesco della cascata coagulativa, mentre i fosfolipidi di membrana rappresentano i siti di ancoraggio per i fattori della coagulazione, favorendone l' interazione ed accelerando così il processo di formazione della trombina. Quest' ultima, a sua volta, non solo rappresenta il più potente attivatore fisiologico delle piastrine, ma svolge anche un' azione proteolitica sul fibrinogeno, determinando la formazione di fibrina che contribuisce in maniera decisiva all' organizzazione e stabilizzazione del trombo (Angiolillo DJ et al. 2010)

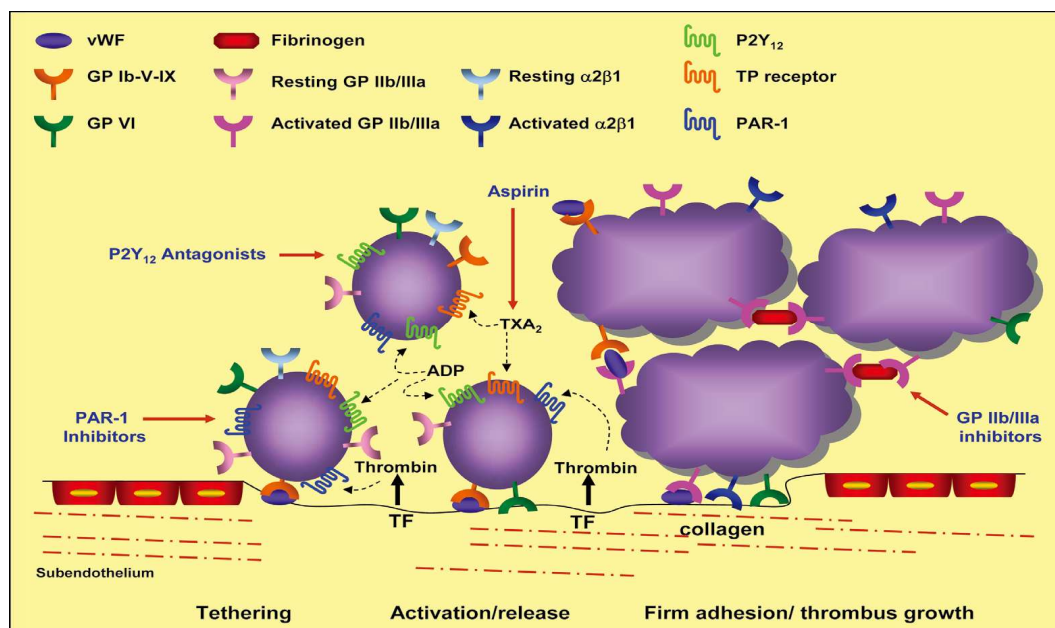


Fig. 7: Adesione e aggregazione piastrinica

Questa sequenza di eventi può essere vista come un'estensione patologica del normale processo emostatico, perciò un'adeguata inibizione farmacologica dell'aggregazione piastrinica risulta essere un presidio terapeutico fondamentale nei pazienti con sindromi coronariche acute (George et al. 2006).

1.5 - I FARMACI ANTIAGGREGANTI

Nella pratica clinica sono attualmente disponibili molti farmaci in grado di modificare in senso antitrombotico l'equilibrio emostatico:

- farmaci fibrinolitici
- farmaci antitrombinici (eparina nelle sue forme non frazionata e a basso peso molecolare)
- farmaci inibitori dell'attivazione piastrinica

La terapia "antiplateletica" si basa sull'impiego di diverse molecole che interferiscono a vari livelli con il processo di attivazione e aggregazione e sono comunemente impiegati nello spettro delle manifestazioni acute della patologia vascolare aterotrombotica :

- farmaci agenti sull'acido arachidonico (inibitori della cicloossigenasi e della trombassano sintasi))
- farmaci agenti sui recettori dell'ADP (antagonisti P2Y12)
- farmaci attivatori adenilato ciclasi (dipiridamolo)
- farmaci inibitori delle fosfodiesterasi (sucedanei stabili della prostaciclina)
- antagonisti dei recettori di adesione (anti GPIIb/IIIa, abciximab, eptifibatide, tirofiban)

Attualmente la modulazione dell'aggregabilità piastrinica rappresenta lo strumento terapeutico di scelta nelle SCA , in quanto si è dimostrato particolarmente maneggevole e di dimostrata efficacia per la prevenzione degli eventi cardiovascolari avversi.

L'attivazione piastrinica *in vivo* è caratterizzata da una complessa sequenza di eventi di "signaling" intracellulare, dovuta all'azione

contemporanea di molteplici stimoli attivatori rilasciati, esposti e generati a seguito di disfunzione endoteliale.

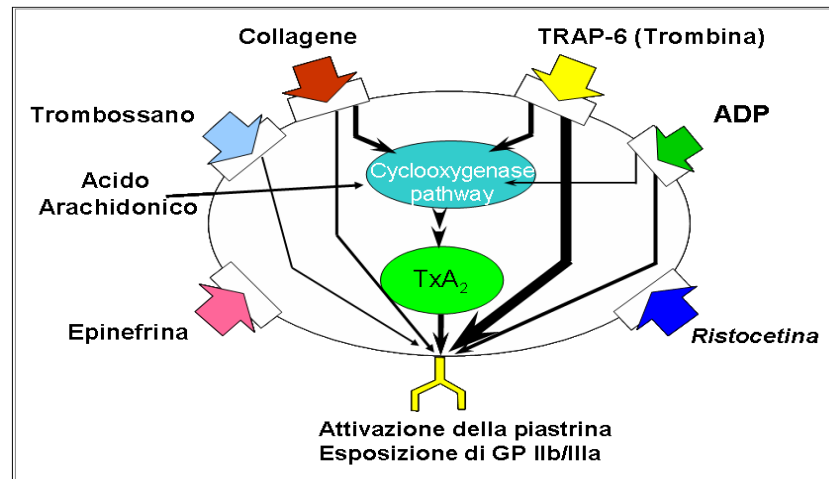


Fig. 8: Agonisti piastrinici: le vie intrapiastriniche innescate confluiscono sull'attivazione del recettore GPIIb/IIIa

La piastrina attivata va incontro a tre processi fondamentali:

- secrezione dei granuli con rilascio di ADP e modificazioni recettoriali di superficie (esposizione della P-selectina)
- sintesi dei metaboliti dell'acido arachidonico (AA), principalmente trombossano A₂ ad opera dell'enzima cicloossigenasi-1 (COX-1)
- attivazione della glicoproteina IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), principale recettore del fibrinogeno e mediatore dell'aggregazione piastrinica

Tenendo conto della sequenza schematica degli eventi biochimici che caratterizzano l'attivazione piastrinica, vi sono tre principali meccanismi attraverso i quali si può inibire l'aggregazione e quindi limitare l'accrescimento del trombo coronario:

1. blocco della via di attivazione dipendente dall'acido arachidonico (ASA, o aspirina)
2. blocco del recettore GPIIb/IIIa (antagonisti GPIIb/IIIa)
3. blocco del recettore purinergico P2Y₁₂ per l'ADP (tienopiridinici)

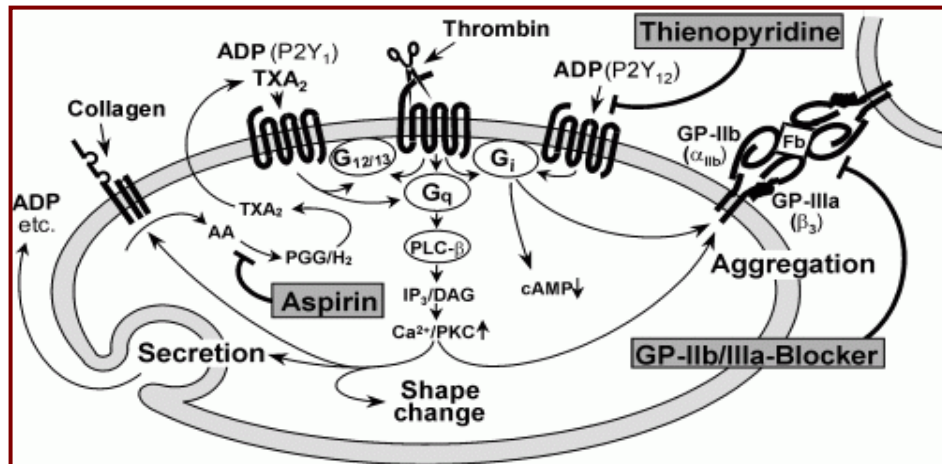


Fig. 9: Meccanismo di azione dei principali farmaci antiplastrinici

L'aspirina è un farmaco con noti effetti analgesici e antipiretici che viene largamente impiegato come antiaggregante piastrinico. Attualmente è il farmaco più utilizzato nella pratica clinica, in quanto si è dimostrato capace di prevenire una grande varietà di disordini trombotici e vascolari.

Il picco plasmatico si raggiunge dopo circa 30-40 minuti dalla somministrazione. Viene metabolizzato mediante idrolisi ad opera di esterasi tissutali e plasmatiche, formando così acido acetico e acido salicilico. L'eliminazione avviene mediante reazione di coniugazione con glicina o acido glucuronico a livello epatico e facilmente eliminato con le urine.

La sua emivita è piuttosto breve, circa 15-30 minuti.

Il meccanismo d'azione è rappresentato dall'inattivazione permanente dell'attività cicloossigenasica degli enzimi COX-1 e COX-2. In particolare,

l'enzima COX-1 converte l'acido arachidonico in prostaglandina G₂ e rappresenta il primo enzima della via dell'acido arachidonico che porta alla formazione di trombossano A₂ (TXA₂), un potente attivatore dell'aggregazione piastrinica. Diffondendo attraverso la membrana cellulare, l'aspirina entra nel canale della COX, uno stretto canale idrofobico che connette la membrana cellulare al sito catalitico dell'enzima. L'aspirina dapprima si lega al residuo di arginina-120, un sito di ancoraggio comune per tutti i FANS (farmaci antiinfiammatori non steroidei); e successivamente acetila selettivamente un residuo di serina-529 nella COX-1 umana. Questa serina acetilata occupa la parte più stretta del canale, impedendo in tal modo l'accesso dell'acido arachidonico al sito catalitico della COX.

Poiché le piastrine sono anucleate, esse non sono in grado di sintetizzare nuovamente la COX-1. In questo modo la sintesi del TXA₂ risulta bloccata per tutta la vita della piastrina (circa 7-10 giorni) anche a seguito di una singola somministrazione giornaliera di ASA a basse dosi.

Questo fattore è responsabile della lunga durata dell'azione terapeutica dell'aspirina, nonostante la sua emivita plasmatica sia di circa 15-30 minuti.

I derivati tienopiridinici agiscono tutti con un meccanismo di blocco irreversibile sul recettore purinergico P₂Y₁₂, il quale rappresenta un target molecolare preferenziale nella ricerca farmacologia sul versante piastrinico, e comprendono attualmente composti di prima, seconda e terza generazione.

La **ticlopidina** è stato il primo antiaggregante tienopiridinico a essere stato introdotto nella terapia delle SCA ma non ha avuto larga diffusione soprattutto per l'alta incidenza di effetti collaterali (granulocitopenia, anemia aplastica, neutropenia), che richiedono un attento monitoraggio ematologico.

Clopidogrel, antagonista del recettore per l'ADP P2Y₁₂, è una tienopiridina di seconda generazione, approvato dall'FDA e introdotto nella pratica clinica nel 1998, soprattutto sulla base delle evidenze ottenute da tre grandi trials clinici CURE (Clopidogrel In Unstable Angina To Prevent Recurrent Events), PCI-CURE (Effect Of Pretreatment With Clopidogrel And Aspirin Follone By Long-Term Therapy In Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention), e CREDO (Clopidogrel For The Reduction Of Events During Observation); viene assorbito nel duodeno ad opera della glicoproteina-P, codificata dal gene ABCB1, che è responsabile del trasporto attivo del farmaco.

Le tienopiridine sono definite "profarmaci", in quanto per essere attive e svolgere la propria funzione devono essere trasformate nei loro metaboliti attivi dal citocromo P450 in sede epatica.

Il pro-farmaco del clopidogrel richiede un'ossidazione da parte del sistema epatico dei citocromi P450 (CYP) per generare un metabolita tiolico attivo (SR26334) in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da adenosina difosfato (ADP).

I derivati tiolici attivi del clopidogrel riconoscono e inibiscono irreversibilmente il recettore P2Y₁₂ sulla superficie delle piastrine, impedendone il legame con l'ADP e la conseguente attivazione del complesso glicoproteico GPIIb/IIIa, coinvolto nell'interazione con il fibrinogeno e nella stabilizzazione del tappo piastrinico.

Il clopidogrel svolge pertanto la sua attività antiplastrinica interrompendo il segnale di blocco dell'ADP sulla funzione dell'adenilato ciclasi ed impedendo quindi l'abbassamento dei livelli intracellulari di cAMP. Questo determina un innalzamento della soglia di attivazione delle piastrine (Savi et al. 1998).

Circa l'85% di una dose di clopidogrel è idrolizzata da esterasi in un metabolita inattivo, mentre la dose residua è convertita nel metabolita attivo in un processo che richiede 2 tappe sequenziali in cui sono coinvolti diverse isoforme del citocromo P450 epatico (CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 e CYP1A2 nella prima ossidazione; CYP2B6 e CYP2C19 in entrambe) (Achar S 2011, Giusti B 2010b).

Diverse isoforme del citocromo P450 (CYP1A2, CYP2B6 e CYP2C19) sono responsabili dell'ossidazione dell'anello tiofene di clopidogrel a 2-oxoclopidogrel, che viene ulteriormente ossidato da CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4, con la conseguente apertura dell'anello di tiofene e la formazione sia di un gruppo carbossile che di un gruppo tiolo. Quest'ultimo forma un ponte disolfuro con i due residui extracellulari di cisteina che si trovano sul recettore per l'ADP P2Y12, espresso sulla superficie delle piastrine, e provoca un blocco irreversibile del legame di ADP con tale recettore.

Il picco plasmatico del metabolita attivo si ha dopo circa 1-2 ore e la sua eliminazione avviene tramite le urine e tramite le feci. La sua emivita è di circa 6-8 ore.

Il metabolita attivo del clopidogrel ha proprietà farmacodinamiche abbastanza simili a quelle dell'aspirina, infatti produce un'inibizione cumulativa della funzione piastrinica in seguito a somministrazioni giornaliere ripetute a basse dosi e consente un ritorno alla normale funzionalità piastrinica solo dopo 7-10 giorni dall'ultima dose.

Questo giustifica la somministrazione in singola dose giornaliera di entrambe i farmaci, nonostante la loro breve emivita plasmatica.

I crescenti progressi nella comprensione della fisiopatologia piastrinica hanno portato allo sviluppo di nuovi farmaci antiaggreganti in grado, in parte, di superare alcune limitazioni della terapia con clopidogrel.

Prasugrel è una tienopiridina di terza generazione approvato in Europa e negli Stati Uniti per la prevenzione degli eventi aterotrombotici nei pazienti con sindrome coronaria acuta sottoposti a rivascolarizzazione percutanea (PCI).

Il prasugrel presenta rispetto al clopidogrel:

- migliore profilo farmacodinamico e farmacocinetico in quanto il metabolita attivo compare più rapidamente nel plasma e raggiunge la massima concentrazione in 30 minuti
- minor variabilità interindividuale nell'inibizione della risposta piastrinica e bassa prevalenza di soggetti resistenti
- nessuna influenza del genotipo CYP sugli aspetti farmacodinamici e farmacocinetici

La maggior parte delle evidenze sono state ottenute con il trial clinico di fase III, TRITON TIMI 38 il quale ha messo in evidenza, oltre all'innegabile beneficio clinico della terapia con ASA e prasugrel rispetto alla terapia antiaggregante standard (ASA e clopidogrel) in termini di riduzione del rischio relativo di eventi ischemici (19%), un peggiore profilo di sicurezza del prasugrel in termini di rischio di sanguinamento. (Cattaneo M. 2010).

D'altra parte il prasugrel come il clopidogrel presenta un meccanismo di blocco irreversibile del recettore P2Y₁₂ e questo si traduce in una lenta cessazione dell'effetto (offset), che espone inevitabilmente a un effettivo rischio di sanguinamento in ambito perioperatorio (intra e post operatorio)

Per tale motivo i pazienti sottoposti a rivascolarizzazione chirurgica (CABG) in regime di urgenza possono beneficiare piuttosto di un un effetto antiaggregante a rapida insorgenza, potente e prontamente reversibile.

Cangrelor, ticagrelor, elinogrel sono esempi di farmaci non tienopiridinici ad azione reversibile diretta sul recettore P2Y12, che attualmente si trovano in diverse fasi di sviluppo e che presentano specifiche indicazioni d'uso nelle varie categorie di pazienti con sindrome coronarica acuta, in relazione alle differenti situazioni di rischio.

1.6 - LA RESISTENZA AI FARMACI ANTIAGGREGANTI E IL CONCETTO DI REATTIVITÀ PIASTRINICA RESIDUA (RPR)

Con il termine “resistenza” ad un qualsiasi farmaco s'intende l'incapacità da parte dello stesso farmaco di colpire il suo bersaglio, che si traduce in una mancata risposta farmacologica, documentabile attraverso test di laboratorio specifici.

Generalmente l'incapacità dei farmaci di colpire il proprio bersaglio, deriva da diverse motivazioni: ridotta biodisponibilità del farmaco, inattivazione di esso, oppure alterazione del sito-bersaglio.

L'espressione “resistenza ai farmaci antiplastrinici” spesso 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”

L'attività antiplastrinica 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 antiplastrinici e, in alcuni casi, per predire il rischio trombotico.

Tuttavia, è importante sottolineare che il grado di inibizione dalla formazione di trombociti A2 e del recettore P2Y12 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 antiplastrinici 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 quindi di estrema importanza 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 antiplastrinici” 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.

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 P2Y12, il bersaglio farmacologico del clopidogrel.

Tuttavia, le piastrine esprimono anche un altro recettore per l'ADP, il P2Y1, il quale non è inibito dal clopidogrel. 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'adenilato-ciclastasi indotta da ADP, mediata esclusivamente dal P2Y12, oppure la determinazione della fosforilazione della VASP (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein).

I meccanismi implicati nella resistenza al clopidogrel sono molteplici e potrebbero dipendere da:

- differenze inter-individuali nel metabolismo epatico del profarmaco a metabolita attivo. È uno dei meccanismi più importanti di 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 profarmaco nel metabolita attivo (Lau W.C et al 2004). Inoltre, è stato riportato che varianti del citocromo P-450 sono associate ad una ridotta risposta piastrinica al clopidogrel (Hulot J.S et al 2006, Suh J.W et al 2006)

- interferenza con altri farmaci. Molto discussa è l'interazione tra clopidogrel e gli inibitori della pompa protonica (IPP), frequentemente prescritti in concomitanza alla terapia antiplastrinica (Small D.S et al 2008, Aubert R.E et al 2008). Per quanto riguarda l'interferenza degli IPP sulla risposta al clopidogrel valutata mediante la determinazione della fosforilazione della VASP, uno studio randomizzato, in doppio ceco,

controllato con placebo ha dimostrato che l'omeprazolo riduce significativamente l'effetto inibitorio del clopidogrel sul P2Y₁₂, in soggetti sottoposti ad impianto di stent coronarico trattati con clopidogrel ed aspirina (Gilard M. et al 2008)

- ridotta biodisponibilità. L'assorbimento intestinale del clopidogrel è regolato dalla glicoproteina P, che potrebbe in alcuni soggetti presentare un'alterata funzionalità e ridurre così l'assorbimento intestinale di questo farmaco (Feher G. et al 2007).

1.7 - PREVENZIONE SECONDARIA DELLE SINDROMI CORONARICHE ACUTE

Le linee guida americane ed europee per la cura delle sindromi coronariche acute (Van de Werf et al. 2008; Antman et al. 2004; King et al. 2008; Metha et al. 2001) consigliano una terapia combinata di acido acetilsalicilico (ASA) e clopidogrel al momento dell'ammissione in ospedale, sia che si preveda o meno di intervenire con l'angioplastica (rivascolarizzazione coronarica percutanea) o chirurgicamente con il by-pass. Dopo la dimissione dall'ospedale, le stesse linee guida consigliano di proseguire il trattamento con acido acetilsalicilico e clopidogrel per un periodo di almeno 9 mesi, possibilmente 12.

Tale terapia di associazione ha lo scopo di inibire l'attivazione e l'aggregazione delle piastrine.

Numerosi studi clinici che hanno studiato un gran numero di pazienti affetti da malattia coronarica (CAD) hanno dimostrato che la duplice terapia antiaggregante piastrinica (aspirina più clopidogrel) riduce il rischio di recidive di eventi cardiovascolari in tale categoria di pazienti.

La duplice terapia antiaggregante rappresenta lo standard di cura per i pazienti con sindrome coronarica acuta (ACS), sia che vengano curati esclusivamente con terapia medica sia che vengano sottoposti ad intervento coronarico percutaneo (PCI) (Metha et al. 2001; Steinhubl et al. 2002; Bhatt et al. 2002; McFadden et al. 2004).

In particolare il trattamento con clopidogrel ha dimostrato un beneficio sostanziale in pazienti sottoposti a PCI e impianto di stent. Nei pazienti che ricevono stent metallici e stent medicati (BMS e DES) è raccomandata una

terapia di mantenimento con clopidogrel per 1-12 mesi nel caso di BMS e per almeno 12 mesi nel caso di DES.

Studi retrospettivi hanno dimostrato che la sospensione del clopidogrel, anche dopo 6 mesi dall'impianto di stent o oltre, è associata ad un aumentato rischio di eventi trombotici nei pazienti con DES (McFadden et al. 2002; Iakovou et al. 2005; Park et al. 2006).

Tuttavia, gli eventi cardiovascolari avversi maggiori (MACE), compresa la trombosi dello stent, possono verificarsi anche in pazienti che assumono clopidogrel e aspirina, e numerosi studi retrospettivi e prospettici (Matetzky et al. 2004; Gurbel et al. 2005; Cuisset et al. 2006; Marcucci et al. 2009; Gurbel et al. 2007; Bonello et al. 2010) hanno dimostrato che i pazienti che vanno incontro a trombosi dello stent hanno un reattività piastrinica residua (RPR) nonostante il duplice trattamento antiaggregante.

Ciò suggerisce che la mancata risposta all'azione del clopidogrel, che si traduce in una residua capacità di aggregazione piastrinica, possa essere la causa principale dell'evento trombotico.

Un numero sempre crescente di studi clinici mette in evidenza come una elevata reattività piastrinica residua (RPR), misurata con test di funzionalità piastrinica specifici o aspecifici, in corso di trattamento antiaggregante con aspirina e clopidogrel sia associato ad un aumentato rischio di eventi cardiovascolari avversi (Gori et al. 2008; Buonamici et al. 2007; Marcucci et al. 2009; Sofi et al. 2010).

In particolare, le evidenze maggiori sono state ottenute per quanto riguarda l'associazione della reattività piastrinica residua in corso di duplice terapia con clopidogrel e aspirina con lo sviluppo di eventi avversi quali occlusione dello stent, reinfarto, morte cardiovascolare, stroke in pazienti sottoposti ad angioplastica coronarica ed impianto di stent (Gurbel et al.

2007; Gori et al. 2008; Buonamici et al. 2007; Marcucci et al. 2009; Sofi et al. 2010).

Il clopidogrel è una tienopiridina che inibisce irreversibilmente il recettore *P2Y12* dell'ADP sulla superficie piastrinica (Giustiet al. 2010b).

La monoterapia con clopidogrel è superiore alla sola aspirina per la prevenzione di eventi ischemici ricorrenti in pazienti con recente infarto miocardico, ictus ischemico, o arteriopatia periferica sintomatica (CAPRIE Investigators 1996) ma, a causa del costo elevato, non ha sostituito l'aspirina, rimanendo invece un'alternativa per pazienti che non tollerano quest'ultima. La combinazione di aspirina e clopidogrel è risultata superiore alla sola aspirina durante un trattamento di 12 mesi per la prevenzione di eventi trombotici dopo una sindrome coronarica acuta (ACS) e dopo impianto di stent coronarico, in particolare con stent coronarici a rilascio di farmaci (Gori et al. 2007; Bhatt et al. 2006).

Va però detto che, casistiche sempre più ampie riportate in letteratura mostrano un'ampia varietà di risposta nei pazienti sottoposti a trattamento con clopidogrel (Trenk et al. 2008; Cattaneo et al. 2011; Bonello et al. 2010; Giusti et al. 2010b).

Il meccanismo che determina una ridotta risposta al clopidogrel non è stato ancora pienamente delucidato e probabilmente ha una genesi multifattoriale.

In aggiunta alla mancata compliance (aderenza del paziente al trattamento farmacologico), fattori clinici quali età, obesità (in particolare un elevato indice di massa corporea), diabete mellito (Angiolillo et al. 2006), insulino-resistenza, ridotta funzione di eiezione del ventricolo sinistro, natura dell'evento coronarico ed interazioni farmacologiche (meccanismi estrinseci)

(Angiolillo et al. 2007; Wenaweser et al. 2010; Siller-Matula et al. 2008) possono contribuire alla variabilità della risposta al clopidogrel.

Gli studi clinici hanno messo in evidenza numerosi meccanismi coinvolti nell'aumento della reattività piastrinica residua in corso di trattamento con clopidogrel. Alcuni di questi meccanismi possono essere transitori ed includono uno stato infiammatorio generalizzato (Gori et al. 2009), un accelerato turn-over piastrinico (Cesari et al. 2008), l'aumento in circolo di piastrine reticolate (forme immature delle piastrine), l'aumento di deformabilità degli eritrociti e la diminuzione dell'attività enzimatica della metalloproteasi ADAMTS-13, coinvolto nel clivaggio dei multimeri ad alto peso molecolare del fattore di Von Willebrand (Marcucciet al. 2008).

In particolare, la variabilità inter-individuale nella risposta al clopidogrel è dovuta principalmente ai due step di attivazione epatica del farmaco (Lau et al. 2004).

1.8 - POLIMORFISMI DEL CITOCROMO CYP2C19 E VARIABILITÀ DI RISPOSTA AL CLOPIDOGREL

Il citocromo CYP2C19 contribuisce in modo sostanziale ad entrambi i passaggi ossidativi richiesti per la formazione del metabolita attivo di clopidogrel. Questo spiega l'importanza del ruolo del polimorfismo genetico di CYP2C19 (Giusti et al. 2010b).

Esistono evidenze crescenti (Frere et al. 2008; Giusti et al. 2010; Collet et al. 2009) che la risposta al clopidogrel possa essere modulata da variabili farmacocinetiche quali l'assorbimento intestinale e l'attivazione metabolica nel fegato, che sono a loro volta influenzate da polimorfismi genetici in uno o

più di questi enzimi. Questi influenzano l'effetto antiplastrinico del clopidogrel e spiegano la eterogeneità interindividuale di risposte.

Il CYP450 epatico è coinvolto nel metabolismo di numerosi farmaci, quali le statine (Schatcher et al. 2005; Geisleret al. 2008) e gli inibitori di pompa protonica (PPI) (Ma et al. 2010; Cuisset et al. 2009; Gilard et al. 2008).

Diversi polimorfismi funzionali sono stati trovati in geni che codificano per isoforme di CYP450, incluso il CYP2C19, isoenzima che sembra essere coinvolto sia nella biotrasformazione del clopidogrel che nel metabolismo degli inibitori della pompa protonica (PPI).

Recentemente, l'allele CYP2C19*2 è stato associato a ridotta metabolizzazione di clopidogrel, con ridotto effetto antiaggregante del farmaco ed un conseguente aumento del rischio cardiovascolare. Nei pazienti ad alto rischio vascolare, il polimorfismo CYP2C19*2 è un forte predittore di eventi avversi e in particolare di trombosi dello stent (Giusti et al. 2009).

1.9 - FARMACI INIBITORI DI POMPA PROTONICA E INTERAZIONI CON IL CLOPIDOGREL

Gli inibitori di pompa protonica (PPI) sono farmaci con potente azione inibente della secrezione acida gastrica e vengono per questo impiegati per la prevenzione e la terapia dell'ulcera (Richardson et al. 1998).

I PPI disponibili in commercio in Italia sono 5: il capostipite omeprazolo (immeso nel 1989), il lansoprazolo (1995), il pantoprazolo (1997), il rabrepazolo (1999) e l'esomeprazolo (2002).

I PPI sono benzimidazolici sostituiti che, dopo l'assorbimento intestinale, hanno un'emivita plasmatica relativamente breve (1-2 ore); la lunga durata d'azione è legata al peculiare meccanismo d'azione che consiste nel blocco irreversibile dell'enzima H⁺/K⁺ATPasi (cosiddetta pompa protonica), via finale per la produzione dell'acido cloridrico da parte della cellula parietale gastrica, indipendentemente da ogni stimolo (istaminico, colinergico) e da ogni secondo messaggero intracellulare (Richardson et al. 1998).

Invece, il meccanismo d'azione dei farmaci H₂-antagonisti, utilizzati come alternativa agli PPI nella protezione gastrica, consiste nel blocco recettoriale del solo recettore istaminico (Colin-Jones et al. 1995).

I PPI sono metabolizzati a livello epatico da 2 enzimi del sistema del citocromo P 450: mefentoina idrossilasi (CYP2C19) e nifedipina idrossilasi (CYP3A4).

Il pantoprazolo è metabolizzato anche da una sulfotransferasi citosolica e questo spiegherebbe la minore interazione con farmaci che utilizzano il CYP per la metabolizzazione.

L'esomeprazolo è metabolizzato principalmente dal CYP2C19 mentre l'omeprazolo principalmente dal CYP3A4.

Omeprazolo e lansoprazolo hanno una maggiore interazione potenziale rispetto a pantoprazolo; esomeprazolo ha un profilo potenzialmente simile all'omeprazolo.

Un numero sempre crescente di studi clinici, suggerisce che l'uso concomitante di clopidogrel e PPI rende l'antiaggregante meno efficace, attraverso l'inibizione della formazione del metabolita attivo (Ho et al. 2009; Sibbing et al. 2009).

Al momento non vi è alcuna evidenza che le altre classi di farmaci che riducono l'acidità gastrica, come gli antagonisti dei recettori H2 e gli antiacidi, interferiscono con l'attività antiplastrinica del clopidogrel (Ng et al. 2010).

Recenti studi (Sibbing et al. 2009; Ho et al. 2009) hanno messo in evidenza una possibile interazione tra clopidogrel e PPI, che determina una ridotta efficacia del clopidogrel e di conseguenza un aumento del rischio cardiovascolare. Tale associazione pare correlata alla inibizione del CYP2C19 e, anche se non tutti gli PPI sembrano avere una uguale capacità di interferenza con clopidogrel, l'effetto sembra essere legato all'intera classe.

Anche altri farmaci che inibiscono il CYP2C19 possono avere un'analogia interazione a livello metabolico con il clopidogrel, mentre non è stata dimostrata interazione con i farmaci che riducono l'acidità gastrica come antiacidi e anti H2.

Pertanto, le schede tecniche ed i riassunti delle caratteristiche del prodotto (RCP) dei medicinali contenenti clopidogrel sono stati modificati, aggiungendo le informazioni riguardanti la possibilità di interazione con gli PPI e raccomandando altresì di evitare l'uso concomitante, se non strettamente necessario.

Nel contempo si rende necessaria una sorveglianza specifica in tale ambito e l'approfondimento degli eventuali meccanismi di interazione.

Sebbene le prove attuali restino controverse circa la potenziale interazione tra inibitori di pompa protonica e l'effetto antiaggregante del clopidogrel, la FDA e l'EMA hanno emesso un avviso di cautela per quanto riguarda la somministrazione concomitante di inibitori di pompa protonica e clopidogrel

[\(<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforP>](http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforP)

[atientandProviders;http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Plavix](http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Plavix/Plavix.pdf)).

Recentemente, tuttavia, gli investigatori di PRINCIPLE-TIMI 44 e TRITON-TIMI-38 hanno osservato che gli inibitori della pompa protonica esercitano una modesta riduzione dell'effetto inibitorio di clopidogrel sulla funzione piastrinica e in questi studi tale effetto non si è tradotto in un aumento significativo di eventi clinici (O'Donoghue et al. 2009).

La mancanza di una piena protezione gastrica con PPI, a causa di un eccesso di cautela per le presunte interferenze sull'effetto di clopidogrel, può avere gravi implicazioni cliniche con un eccesso di sanguinamenti gastrici maggiori.

SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare il ruolo dei farmaci inibitori di pompa protonica sull'effetto farmacologico del clopidogrel, quale meccanismo importante di resistenza alla terapia antiaggregante.

Tale effetto è stato valutato mediante quantificazione della reattività piastrinica residua misurata con test specifici e globali di funzionalità piastrinica.

A tale scopo pazienti affetti da sindrome coronarica acuta con elevazione del tratto ST (STEMI) ed in doppia terapia antiaggregante, sono stati randomizzati in due gruppi di trattamento:

1. gruppo PPI trattati con con inibitori di pompa protonica (omeprazolo, lansoprazolo)() e ranitidina (
2. . gruppo H2-RA trattati con ranitidina

Inoltre per una migliore comprensione del ruolo di una variabile attività metabolica del citocromo CYP3A4 dovuta a polimorfismi genetici, come meccanismo di variabilità interindividuale di risposta al clopidogrel, ci si è proposti di valutare l'interferenza del polimorfismo CYP2C19*2 nell'influenzare la risposta dei soggetti ai farmaci antiplastrinici in relazione alla somministrazione dell'inibitore di pompa protonica o del farmaco di controllo.

MATERIALI E METODI

3.1 - DISEGNO DELLO STUDIO

Per valutare la possibile interazione dei farmaci inibitori di pompa protonica (PPI) con l'inibizione dell' aggregazione piastrinica dovuta al clopidogrel, sono stati reclutati 150 pazienti consecutivi colpiti da infarto miocardico con sopraslivellamento del tratto ST (STEMI) e senza elevazione del tratto ST (NSTEMI), sottoposti ad intervento di rivascolarizzazione percutanea (PCI primaria).

In accordo a quanto indicato nelle linee guida (Van de Werf F 2008; Antman EM 2004), i pazienti sono stati trattati con aspirina 150 mg e clopidogrel 300 mg al momento dell'angioplastica (dose di carico) e successivamente hanno ricevuto aspirina (100 mg/die) e clopidogrel (75 mg/die) in dose di mantenimento per la durata di 6 mesi.

Farmaci antagonisti della glicoproteina IIb/IIIa (abciximab) sono stati utilizzati nel periodo periprocedurale a discrezione dell'operatore.

Dopo l'ottenimento del consenso informato scritto da parte dei pazienti, questi sono stati randomizzati a due gruppi di trattamento della durata di 30 giorni:

- gruppo PPI: trattati con 40 mg di pantoprazolo, lansoprazolo, omeprazolo
- gruppo H2-RA: trattati con 150 mg di ranitidina

Inoltre i pazienti sono stati arruolati tenendo conto dei seguenti criteri di esclusione

- angioplastica di salvataggio (rescue PCI), segni di scompenso cardiaco acuto in atto, indicazione a procedura di rivascularizzazione coronarica chirurgica, precedente storia di trombocitopenia (<150.000 piastrine/ μ l) o storia di patologia emorragica, anemia nota, recente trasfusione di emazie, sangue intero o piastrine, livelli di creatinina sierica >2.5 mg/dL, ulcera gastrointestinale, stato di gravidanza, storia di allergie o intolleranza ad ASA e tienopiridine e, infine, condizioni che potessero determinare una scarsa compliance del paziente al trattamento farmacologico antiaggregante.

Il Comitato Etico ha approvato il protocollo di studio (codice EudraCT:2009-010399-10).

3.2 - RACCOLTA DEI CAMPIONI

I prelievi di sangue venoso periferico sono stati effettuati a 5 giorni dalla procedura di rivascularizzazione (dimissione dei pazienti dal reparto ospedaliero) e a 30 giorni dall'inizio della terapia di mantenimento durante il follow-up ambulatoriale consistente in altre due visite aggiuntive rispettivamente a 6 mesi e a 1 anno dalla procedura.

La scelta di effettuare il primo prelievo in quinta giornata dall'intervento di PCI primaria è stata dettata dall'esigenza di escludere l'effetto inibitorio temporaneo, sulla funzionalità piastrinica,

dei farmaci anti-gpIIb/IIIa (abciximab), somministrati al momento dell'angioplastica (PCI).

Tutti i campioni necessari sono stati raccolti in tubi Vacutainer (Becton Dickinson) di differente tipologia:

- provetta contenente come anticoagulante acido etilendiammino-tetra-acetico 15% (K₃-EDTA), per l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico, e la valutazione della conta piastrinica
- provetta contenente come anticoagulante una soluzione di citrato-trisodico (3.8%), per l'esecuzione dei test di funzionalità piastrinica e la per la determinazione della concentrazione di fibrinogeno nel plasma con metodo di Clauss, utilizzando un coagulometro automatizzato (CA1500 Sysmex).
- provetta priva di anticoagulante finalizzata alla raccolta di siero per eventuali successivi dosaggi di proteine sieriche.

Particolare attenzione è stata rivolta all'eliminazione di tutte le possibili condizioni di attivazione artefattuale delle piastrine in vitro, dovuta in parte a diverse variabili relative alla modalità del prelievo; per tale motivo la prima provetta prelevata da ciascun paziente non è stata impiegata per i test di funzionalità piastrinica.

Il follow-up clinico effettuato a 30 giorni, e a 6 mesi, dall'arruolamento viene effettuato ambulatorialmente con una visita cardiologia completa di esame elettocardiografico e sottomissione di un questionario atto alla raccolta dei dati clinici post procedurali (incidenza di eventi cardiovascolari avversi).

3.3 - TEST DI FUNZIONALITÀ PIASTRINICA

3.3.1 - PFA-100 (PLATELET FUNCTION ANALYZER)

Il platelet function analyzer, PFA-100 (Siemens, Germania), è un sistema point of care (POCT) composto da uno strumento di piccole dimensioni corredato da apposite cartucce, nel quale il processo di emostasi primaria (adesione ed aggregazione piastrinica) viene simulato *in vitro*, in condizioni di flusso, sottoponendo le componenti ematiche a condizioni di “shear stress” comparabili a quelle che si creano *in vivo*, nella zona di lesione di un vaso in conseguenza di un danno endoteliale.



Figura 10: L'analizzatore PFA-100 prodotto da Siemens

Il sistema permette una valutazione rapida della funzionalità piastrinica *in toto*, attraverso la misurazione del tempo di emorragia su piccoli campioni di sangue intero addizionato di anticoagulante, in base al principio descritto da Kratzer e Born.

Le disfunzioni piastriniche rilevate dal sistema PFA-100 possono essere acquisite, ereditarie, o indotte da inibitori piastrinici; in particolare la metodica risulta sensibile alla malattia di von Willebrand, caratterizzata da una ridotta produzione o da una alterazione qualitativa del fattore di von Willebrand, che si manifesta con diminuzione dell'adesività piastrinica ai vasi danneggiati e aumento del tempo di sanguinamento (Jilma et al. 2001).

Infine questa metodica può essere impiegata come test di ausilio per il monitoraggio della terapia antiaggregante con ASA.

La cartuccia monouso è composta da un certo numero di parti integrate comprendenti: un capillare, un alloggiamento per il campione ed una membrana biochimicamente attiva con un foro centrale. Il sangue intero addizionato all'anticoagulante viene aspirato dall'alloggiamento del campione attraverso il capillare e l'apertura, con conseguente esposizione delle piastrine a condizioni di stress da scorrimento.

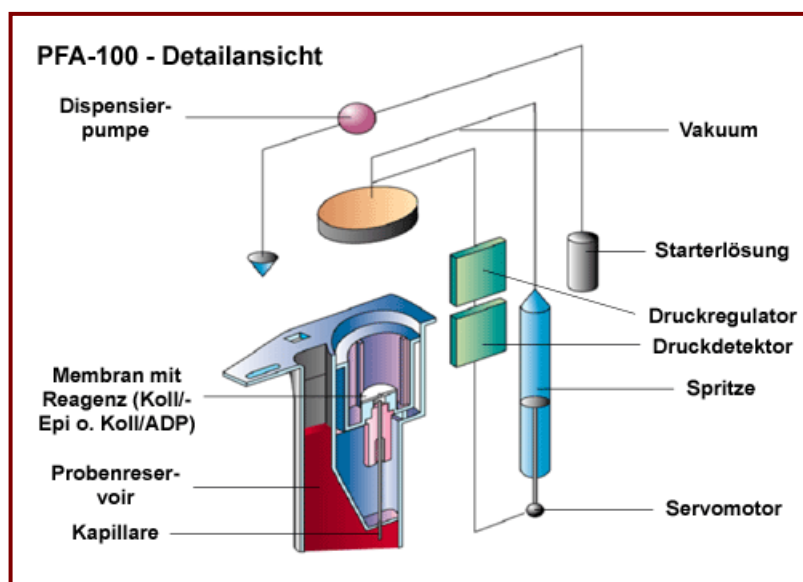


Figura 11. Componenti interne di una cartuccia del sistema PFA-100

La membrana attraverso la quale scorre il sangue è ricoperta da uno stimolo liofilo (collagene) che a contatto col sangue stesso si solubilizza e

agisce da attivatore delle piastrine. Il collagene è una proteina subendoteliale generalmente considerata la matrice iniziale sulla quale avviene l'adesione piastrinica nella zona di danno endoteliale. L'adesione delle piastrine al collagene innesca lo stimolo fisiologico dell'attivazione piastrinica. In aggiunta, la membrana è ricoperta di epinefrina o ADP, altri due agonisti fisiologici che, insieme al collagene, vengono ampiamente utilizzati nei test di stimolazione in vitro per attivare le piastrine.

Vi sono infatti due tipi di cartucce, collagene/epinefrina (Col/EPI) o collagene/ADP (Col/ADP).

Durante il test, le piastrine aderiscono alla membrana ricoperta da collagene e, successivamente, divengono attive rilasciando il contenuto dei loro granuli dopo contatto con gli agonisti ADP o epinefrina. Il rilascio del contenuto dei granuli è seguito da adesione reciproca delle piastrine con successiva formazione di aggregati. Il processo di aggregazione piastrinica determina la formazione di un trombo di piastrine sull'apertura della membrana, determinando un rallentamento graduale ed infine l'arresto del flusso di sangue (Dade Behring PFA-100 Reagent, 2007)

Lo strumento PFA-100 determina il "tempo di chiusura" (CT -clotting time), espresso in secondi, che rappresenta l'intervallo compreso tra l'inizio del test (inizio del flusso di sangue attraverso il foro) e la formazione del tappo piastrinico (cessazione del flusso di sangue per occlusione del foro).

Il test ha una durata massima di 300 secondi dopo i quali il flusso viene interrotto.

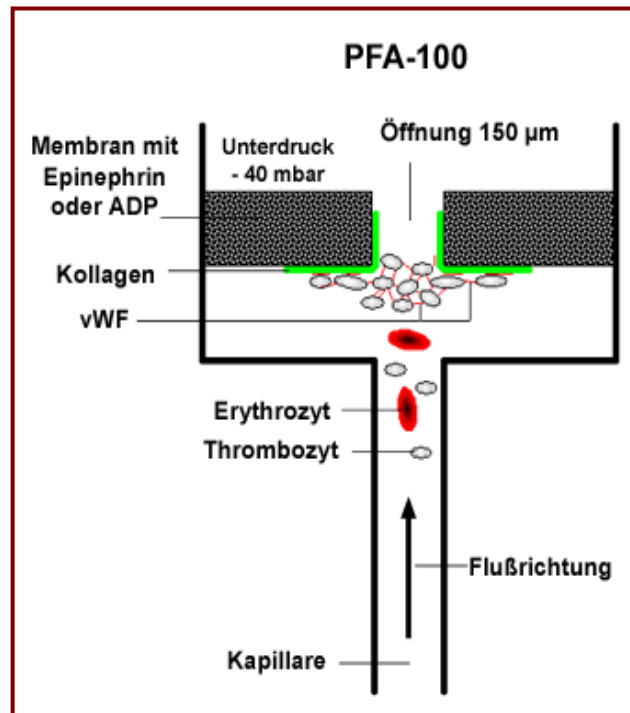


Figura 12. Principio di funzionamento della cartuccia di PFA-100

Il tempo misurato costituisce in pratica un indice della funzionalità dell'emostasi primaria nel campione di sangue analizzato: tempi di chiusura più brevi indicano una maggiore attivazione del sistema emostatico, mentre valori di CT elevati dimostrano una riduzione della capacità emostatica delle piastrine di riparazione del danno endoteliale.

Nella malattia di von Willebrand, il PFA-100 ha mostrato una sensibilità diagnostica nettamente superiore al tempo di emorragia secondo Ivy (Fressinaud et al. 1998) e consente anche di valutare la risposta terapeutica alla desmopressina (Fressinaud et al.1999).

Il tempo di chiusura risulta inoltre prolungato nelle piastrinopatie congenite con difetto di secrezione (Cattaneo et al.1999) ed in quelle acquisite in corso di cirrosi epatica e di insufficienza renale cronica. In questi ultimi casi, però, bisogna tener presente che la riduzione dei valori di

ematocrito ha un ruolo non secondario nel determinare l'alterazione osservata (Escolar et al.1999).

Come altri test di emostasi primaria, il PFA-100 è stato utilizzato per valutare il rischio emorragico legato ad intervento chirurgico e per il monitoraggio laboratoristico del trattamento con aspirina o con altri farmaci antiaggreganti (Reny et al 2008; Paniccia et al. 2007; Gori et al. 2008; Marcucci et al. 2007).

Per quanto riguarda il monitoraggio clinico dei farmaci antiaggreganti, esistono molte discordanze sia sull'effetto di questi sul tempo di chiusura del PFA-100 sia sulla modalità ottimale per rilevare tale effetto. Per quanto concerne l'aspirina, questo farmaco può determinare prolungamento del tempo di chiusura di cartucce collagene-epinefrina (CEPI-CT) ma non di quelle preparate con collagene-ADP (CADP-CT). Questa differente sensibilità dei due tipi di cartucce all'aspirina può essere utile per differenziare le turbe congenite dell'emostasi primaria (malattia di von Willebrand soprattutto) dalle forme iatrogene .

L'effetto dell'aspirina sul tempo di chiusura delle cartucce CEPI è, d'altra parte, incostante. La concentrazione di citrato, il tempo intercorrente tra prelievo e determinazione (von Pape et al. 2000) nonché il livello plasmatico di fattore von Willebrand (Homoncik et al. 2000) sembrano influenzare l'effetto dell'ASA sul tempo di chiusura di tali cartucce.

Gli effetti della ticlopidina sono ancora più incerti, mentre l'eparina non sembra avere alcuna influenza sul tempo di chiusura (Kottle-Marchant et al.1999).

Mentre l'effetto degli antiaggreganti "classici" è modesto o incostante, l'effetto degli antilibrina sul tempo di chiusura è molto marcato.

Questo test offre numerosi vantaggi, tra i quali la rapidità nel determinare la risposta piastrinica (l'intera durata è di circa 6 minuti), l'impiego di un esiguo volume di sangue (800 µL), il fatto che non richiede alcun pre-trattamento del campione.

Quest'ultima caratteristica rende il PFA-100 una metodica particolarmente utile negli studi di funzionalità piastrinica, che unitamente alla facilità di processamento del campione, che non richiede un addestramento particolare dell'operatore, e alla possibilità di esecuzione di test multipli in rapida sequenza, ne fanno uno strumento ottimale nella pratica clinica di routine.

Tuttavia, diverse limitazioni ne riducono la riproducibilità e ne aumentano la variabilità inter-test. Infatti il sistema è soggetto a variabili pre-analitiche quali la modalità del prelievo e a variabili analitiche come la concentrazione plasmatica del fattore di von Willebrand, il numero di piastrine circolanti (che non deve essere inferiore a 100.000/uL e superiore a 500.000/uL) ed il valore di ematocrito (che deve essere nel range 35-50%).

In questo studio, abbiamo eseguito il test con cartucce collagene/epinefrina (CEPI) e collagene/ADP (CADP).

Poiché, come precedentemente affermato, la conta piastrinica e l'ematocrito possono influenzare i risultati, abbiamo escluso tutti i pazienti con una conta piastrinica $<50 \times 10^9$ o ematocrito $<25\%$.

3.3.2 - AGGREGOMETRIA OTTICA TIPO BORN

I test di aggregazione "in vitro" vengono ampiamente utilizzati per lo studio della funzionalità piastrinica e hanno assunto una notevole importanza

come strumento di diagnostica clinica per la determinazione di alterazioni funzionali, congenite o acquisite, di questo tipo cellulare. La capacità o l'incapacità delle piastrine di aggregare in risposta a un particolare agente aggregante, può fornire infatti una indicazione sul tipo di disfunzione piastrinica: ad esempio nei casi di tromboastenia le piastrine aggregano bene in risposta alla ristocetina, mentre la risposta aggregometrica risulta nettamente diminuita, o addirittura assente, se come agonisti vengono impiegati il collagene, l'ADP, l'adrenalina o la trombina.

L'aggregometria ottica secondo Born è ancora attualmente considerata come il "gold standard" storico fra i test di funzionalità piastrinica *in vitro*, ed è largamente impiegata come metodo laboratoristico di riferimento per valutare la risposta alla terapia farmacologica con aspirina e clopidogrel, nei pazienti affetti da sindrome coronaria acuta (Michelson AD. 2004)

Il metodo ottico ideato da Born e O'Brien (1961), è di tipo turbidimetrico, ed è basato sulle variazioni di trasmittanza che si ottengono nel plasma ricco di piastrine (PRP) dopo l'aggiunta di agenti aggreganti, quali ADP, adrenalina, collagene e ristocetina. Il plasma ricco di piastrine (PRP), ottenuto dopo centrifugazione del sangue ad opportuna velocità, ha un aspetto torbido-lattescente e una densità ottica proporzionale al numero di piastrine presenti in sospensione, per unità di volume. L'aggiunta di un agente aggregante al PRP determina la formazione di aggregati piastrinici di dimensioni crescenti, che si uniscono tra loro e sedimentano sul fondo della cuvetta.

Il risultato di tale processo è un aumento progressivo della luce trasmessa attraverso il campione, in quanto il PRP tende a diventare sempre più trasparente (chiarificazione), fino a diventare limpido come il plasma povero quando l'aggregazione è completata.

All'interno dell'aggregometro, il raggio di luce che attraversa la cuvetta viene raccolto da una fotocellula, la quale determina una corrispondente deflessione del potenziale elettrico di un galvanometro associato alla strumentazione. Le variazioni del potenziale elettrico vengono registrate in modo continuo da un computer collegato all'aggregometro.

Si ottengono così le curve di aggregazione piastrinica che dipendono dalla variazione della densità ottica (D.O) del PRP in funzione del tempo e possono essere monofasiche, bifasiche, reversibili o irreversibili.

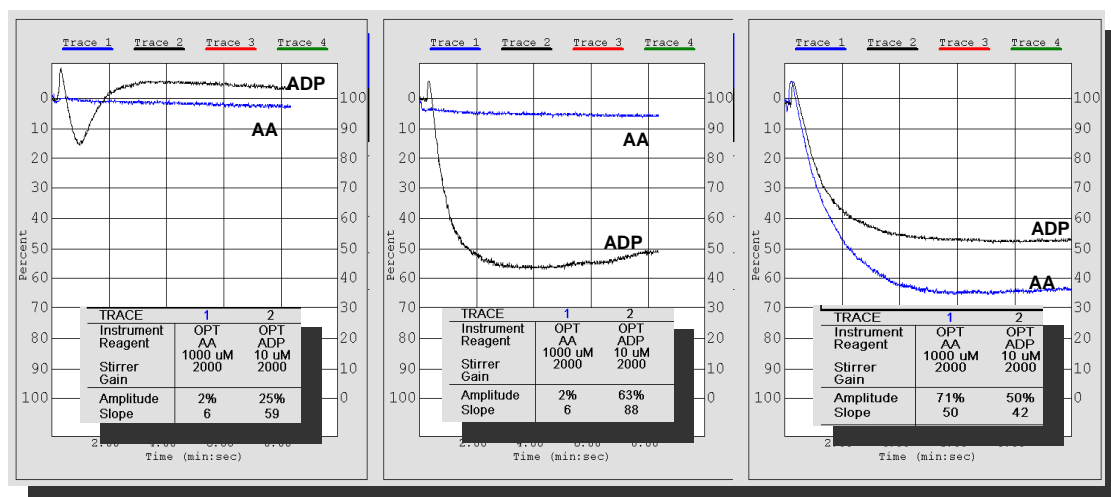


Fig. 13: Esempio di tracciati aggregometrici ottenuti con diverse concentrazioni degli agonisti ADP e Acido Arachidonico (AA).

Gli studi di aggregazione su plasma ricco comportano in generale la considerazione di altre importanti variabili tecniche che se non opportunamente controllate possono invalidare i risultati sperimentali. Queste includono:

- a) il mantenimento del sangue anticoagulato in condizioni di non agitazione per almeno 30 minuti prima dell'aggiunta dell'agonista.

b) la scelta di un opportuno anticoagulante per la raccolta del campione. Ad esempio l'eparina, pur non interferendo con la concentrazione di ioni calcio presenti nel plasma, essenziali per il fenomeno dell'aggregazione, determina tuttavia, durante la centrifugazione del sangue a bassa velocità, la formazione di aggregati che sedimentano causando così la perdita di un gran numero di piastrine. Inoltre l'EDTA non può essere utilizzato come anticoagulante per la sua ben nota proprietà di chelare completamente il calcio, impedendo di fatto l'aggregazione piastrinica.

La scelta migliore sembra essere rappresentata dal citrato di sodio impiegato al 3.8% per un valore di ematocrito compreso tra 20 e 55%. Questo anticoagulante chela parzialmente il calcio e diminuisce solo in minima parte la capacità aggregante delle piastrine e permette di avere una buona resa nell'allestimento del plasma ricco.

c) l'esclusione il più possibile completa dei globuli rossi dal PRP, perché questi non aggregano e possono interferire con la valutazione ottica dell'aggregazione piastrinica.

d) la preparazione del PRP, che deve avvenire a temperatura ambiente (22°C), perché temperature più basse comprese tra +4°C e +15°C danneggiano le piastrine. La centrifugazione, necessaria per ottenere il PRP, rappresenta uno degli aspetti più critici dell'aggregometria turbidimetrica in quanto può modificare lo stato funzionale delle piastrine e deve consentirne un buon recupero dai campioni di sangue intero. Ad esempio è necessario che il rotore della centrifuga sia di tipo oscillante e non ad angolo fisso in modo da mantenere le provette in posizione orizzontale durante la centrifugazione; in questo modo si crea una linea orizzontale di sedimentazione dei globuli rossi che facilita il recupero del plasma.

e) infine i campioni di PRP devono essere preincubati a 37°C per circa cinque minuti prima dell'esecuzione del test, e ciò può essere fatto mediante il sistema di termostatazione proprio dello strumento, che mantiene costante la temperatura all'interno dei siti di alloggiamento delle cuvette (Rafaii M.A et al. 2002)

Per questo studio è stato utilizzato un aggregometro modello Chronolog 490, che utilizza una lunghezza d'onda di lettura nell'infrarosso, dotato di due camere di alloggiamento per campioni di plasma termostatate a 37°C.



Fig. 14.: Aggregometro ottico Chronolog (Mascia Brunelli)

Ogni camera è dotata di una doppia sorgente di luce monocromatica, in modo tale che un raggio passi attraverso la cuvetta contenente il plasma ricco di piastrine (PRP, campione test), e l'altro attraverso la cuvetta con il plasma povero di piastrine (PPP, campione di riferimento).

Un fotodiode rileva la luce che attraversa i campioni: il PRP viene convenzionalmente considerato corrispondente allo 0% di trasmissione, mentre il PPP corrisponde al 100% di trasmissione. La trasmittanza attraverso il campione di plasma ricco viene misurata relativamente al

campione di riferimento e tale differenza, che è direttamente proporzionale all'entità dell'aggregazione piastrinica, viene amplificata e registrata come un segnale digitalizzato mediante un software dedicato (AGGRO/LINK).

Inoltre, durante l'esecuzione del test, il PRP viene sottoposto ad agitazione continua grazie ad un magnete che, introdotto nella cuvetta, viene tenuto in rotazione da un'elettrocalamita. L'agitazione continua ad una velocità costante è essenziale perchè permette una diffusione omogenea dell'agente aggregante all'interno del campione.

Il plasma ricco (PRP) è stato ottenuto da sangue anticoagulato in sodio-citrato, mediante centrifugazione a 100 g per 15 minuti, a temperatura ambiente. Il plasma povero (PPP) è stato preparato centrifugando il campione ematico iniziale, a 2400 g per 20 minuti, a temperatura ambiente. (White MC.M et al. 1999)

Il conteggio delle piastrine nel PRP è stato standardizzato in modo da essere compreso nell'intervallo da $180 \times 10^3 /\mu\text{L}$ a $320 \times 10^3 /\mu\text{L}$ per diluizione con plasma povero di piastrine (PPP).

Il campione di plasma povero è stato utilizzato per l'impostazione della linea del 100% di aggregazione.

Due campioni di plasma ricco per ciascun paziente e per ciascun tempo, sono stati stimolati con un appropriato volume di working solution di adenosina difosfato (ADP), preparata mediante diluizione di una soluzione stock di ADP (23,4 mM) in PBS. e con acido arachidonico (AA) ad una concentrazione finale pari a 1mM, per poter valutare rispettivamente la risposta al trattamento con clopidogrel e con aspirina.

La risposta aggregometrica piastrinica è stata quantificata in termini di massima aggregazione percentuale in risposta ai due agonisti impiegati (MA-ADP e MA-AA): essa si calcola sottraendo dalla densità ottica della massima

aggregazione quella del PRP e dividendo il valore ottenuto per la differenza fra D.O del PPP e D.O del PRP e si moltiplica per 100.

$$Q.A = \frac{D.O.Max.Agg. - D.O.PRP}{D.O.PPP - D.O.PRP} \times 100$$

3.3.3 - REATTIVITÀ PIASTRINICA RESIDUA (RPR) VALUTATA CON I TEST DI FUNZIONALITÀ PIASTRINICA PFA-100 E AGREGOMETRIA OTTICA

Come descritto precedentemente dal nostro gruppo (Gianetti et al. 2006), abbiamo considerato i pazienti con una persistente reattività piastrinica residua (RPR) quelli in cui i tempi di chiusura, misurati in secondi, dei test effettuati con PFA-100 risultavano inferiori 190 per la cartuccia Coll/Epinefrina (CEPI-CT<190 sec) e inferiori a 82 per la cartuccia collagene/ADP (CADP-CT<82 sec). Per quanto riguarda il test aggregometrico la reattività piastrinica residua allo stimolo ADP è stata definita come percentuale di massima aggregazione (MA-ADP) maggiore uguale al 70% mentre per lo stimolo AA, la reattività residua è stata identificata come MA-AA ≥ 20% (Paniccchia et al. 2010; Paniccchia et al. 2011; Bonello et al. 2010). Risultati inferiori a tali valori indicano pazienti che, conservando una certa quota di reattività piastrinica, presentano un rischio più elevato di sviluppare eventi ischemici (Cesari et al. 2008).

3.4. - ANALISI GENETICA

Il DNA genomico è stato estratto dai leucociti del sangue periferico utilizzando il kit FlexiGene DNA (Qiagen, Hilden, Germania). La presenza del polimorfismo CYP2C19*2 nei soggetti è stata determinata utilizzando il test di discriminazione allelica e il sistema di rivelazione ABI prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems); Le varianti alleliche sono state definite secondo la nomenclatura del "Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee" (www.cypalleles.ki.se).

3.5. - ANALISI STATISTICA

La consistenza del campione (number needed to treat) è stata stimata sulla base di precedenti studi osservazionali del nostro gruppo (Gianetti et al. 2006). Abbiamo stimato che un campione di studio di 100 soggetti sarebbe sufficiente per evidenziare una variazione del 10% nei valori di ADP-MA e CEPI-CT tra i due gruppi con un potere statistico dell'80% ed un rischio alfa del 5%.

Le caratteristiche dei 2 gruppi sono state confrontate con il test chi-quadro per variabili qualitative, mediante il t-test per variabili continue distribuite normalmente e con il test di Mann-Whitney per variabili continue non-distribuite normalmente. Poiché dall'analisi statistica era emerso un significativo aumento dei valori di ADP-MA sia a cinque giorni che ad un mese, abbiamo confrontato con un'analisi di regressione semplice i valori di ADP-MA a 5 e 30 giorni con tutti i classici fattori di rischio (sesso, età, abitudine al fumo, diabete, ipertensione, dislipidemia, valore di glicemia) oltre che con i dati clinici e procedurali ed i dati di laboratorio (Tabella 2).

Successivamente abbiamo effettuato un'analisi di regressione lineare multivariata (Tabella 3) includendo nel modello i fattori di rischio cardiovascolare classici, polimorfismo del CYP2C19*2, che è noto in letteratura essere associato agli alti livelli di RPR e tutti i parametri che erano risultati statisticamente significativi alla analisi univariata.

Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

In totale, sono stati valutati 240 pazienti sottoposti a angioplastica percutanea primaria che soddisfacevano i criteri di ammissibilità per lo studio.

In base alle linee guida per il trattamento delle SCA, tutti i pazienti sono stati trattati con doppia terapia antiaggregante (aspirina e clopidogrel), per tutto il periodo in cui sono stati valutati, dal momento dell'ammissione ospedaliera fino alla visita ambulatoriale al trentesimo giorno dalla procedura.

I pazienti hanno ricevuto un gastroprotettore (inibitore di pompa protonica o ranitidina) per un periodo di trattamento di un mese.

In base ai criteri di esclusione predeterminati di morte intraospedaliera per cause non cardiovascolari, precedente storia di trombocitopenia (<150.000 piastrine/ μl) o disturbi emorragici, malattie epatiche note o presenza di indici epatici alterati, ulcera gastrointestinale, stato di gravidanza e scarsa compliance del paziente, sono stati inclusi nello studio 150 pazienti randomizzati nei due gruppi di confronto PPI e H2-RA.

Al termine del follow-up ad un mese è stato possibile ottenere per tutti i pazienti un database completo dei dati anamnestici e procedurali e dei risultati dei test di funzionalità piastrinica.

Nessun paziente ha riportato eventi cardiovascolari avversi maggiori (MACE) definiti come: morte, infarto miocardico o reinfarto, trombosi intrastent, ictus, sanguinamenti maggiori ed ospedalizzazione per cause cardiovascolari.

In **Tabella 1** sono riportati i dati demografici, clinici, procedurali e di laboratorio dei pazienti divisi nei due gruppi di trattamento con gastroprotettori (pazienti trattati con PPI e pazienti trattati con H2-RA).

I due gruppi presentano caratteristiche demografiche e cliniche comparabili, in particolare per quanto riguarda i farmaci utilizzati nel periodo periprocedurale, quali gli antagonisiti della gpIIb/IIIa.

	PPI (n=80)	H2-RA (n=70)	p
Età	59.9±9.4	59.3±10.3	0.68
Sesso (maschile)	63 (78%)	57 (81%)	0.68
Fattori di rischio			
Ipertensione	45 (56%)	34 (48%)	0.34
Fumo	46 (57%)	41 (58%)	0.89
Familiarità per malattie cardiovascolari	28 (40%)	42 (40%)	0.99
Diabete mellito	14 (17%)	13 (18%)	0.86
Dislipidemia	42 (52%)	33 (47%)	0.51
Pregresso infarto	8 (10%)	8 (11%)	0.77
Indice di massa corporea (BMI)	26.0 (23.9:28.1)	26.4 (24.2:29.3)	0.60
Frazione di eiezione (EF)	46±7	47±8	0.78
Dati di laboratorio			
Piastrine	238±62	241±72	0.77
hsCRP	1.58±3.36	1.47±2.80	0.83
Fibrinogeno	362±105	348±113	0.43
Medicazioni pre-PCI			
Inibitori gpIIb/IIIa	54 (67%)	47 (67%)	0.96
Statine	69 (98%)	61 (76%)	0.19
ACE-inibitori	57(71%)	59 (84%)	0.05
Calcio antagonisiti	5 (6%)	3 (4%)	0.42
Beta-bloccanti	67 (83%)	54 (77%)	0.30
Dati procedurali			
Lunghezza dello stent	29.3±17.3	275±13.6	0.48

Tabella 1. Dati demografici, clinici e procedurali nei due gruppi di pazienti. Per le variabili quantitative sono indicati i valori di media±deviazione standard, per le variabili qualitative è indicato il numero di soggetti con la caratteristica e tra parentesi la percentuale rispetto al totale. Il BMI è espresso come mediana (25° percentile:75° percentile).

Per valutare una possibile interferenza del polimorfismo CYP2C19*2 sui risultati dei test di funzionalità piastrinica, abbiamo valutato la distribuzione di questo polimorfismo nel gruppo PPI e nel gruppo H2-RA (ranitidina). Secondo i dati presenti in letteratura (Giusti et al. 2007, Giusti et al. 2010), l'allele *2 è associato ad una minore risposta al clopidogrel, che si traduce in una residua reattività piastrinica e in un aumento degli eventi cardiovascolari avversi (Giusti et al. 2009, Giusti et al. 2010).

Sebbene la prevalenza dei portatori dell'allele *2 (eterozigoti *1*2 + omozigoti *2*2) risulti minore nei pazienti del gruppo trattato con PPI (27%) rispetto a quelli del gruppo trattato con H2-RA (40%), la differenza non raggiunge la significatività statistica ($p = 0,16$), come mostrato in Figura 15.

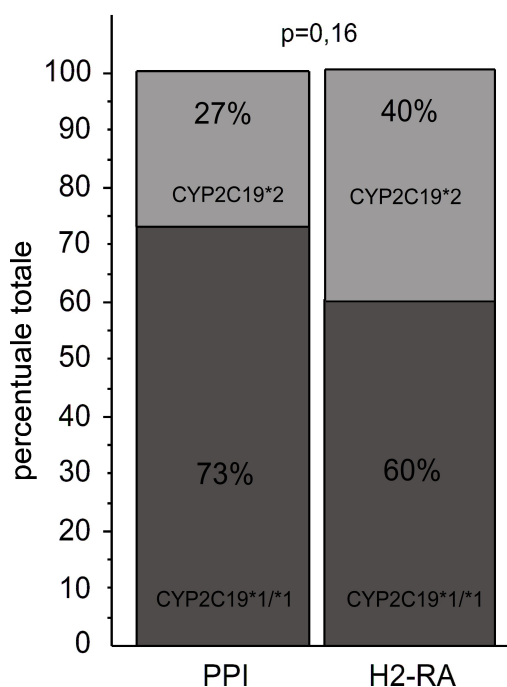


Figura 15: Distribuzione del polimorfismo CYP2C19*2 nei due gruppi di confronto PPI e H2-RA (ranitidina).

In Figura 16 sono mostrati i dati relativi alla funzionalità piastrinica valutata con test del PFA-100 effettuato con la cartuccia collagene/epinefrina. Vengono mostrate le mediane dei tempi di chiusura (CEPI-CT) a 5 giorni (T0 a sinistra) e ad un mese (T1 a destra) dalla procedura di rivascularizzazione. Come evidenziato non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo H2-RA ed il gruppo PPI per quanto riguarda la reattività piastrinica residua misurata come CEPI-CT sia in quinta giornata che ad un mese: mediana 300 sec (range 90-300, percentili 25-75: 172-300) per il gruppo H2-RA e mediana 300 sec (range 79-300, percentili 25-75: 154-300) per il gruppo PPI a T0 ($p=0,31$); mediana 286 sec (range 99-300, percentili 25-75: 125-300) per il gruppo H2-RA e mediana 300 sec (range 84-300, percentili 25-75: 143-300) per il gruppo PPI a T1 ($p=0,29$).

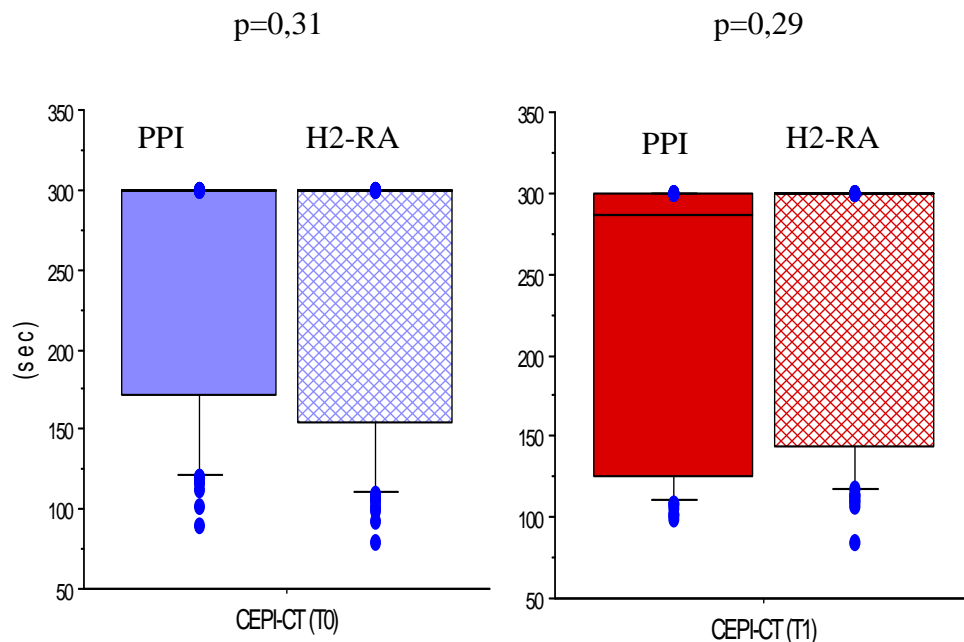


Figura 16: tempi di chiusura (CEPI-CT) valutati in secondi ottenuti con la cartuccia collagene/epinefrina, in quinta giornata (T0, grafico in azzurro) e ad un mese dalla PCI (T1, grafico in rosso). Non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo PPI ed il gruppo ranitidina (H2-RA) nei tempi di chiusura.

Per quanto riguarda il test del PFA-100 con la cartuccia collagene/ADP, i dati relativi alla valutazione della funzionalità piastrinica non evidenziano una differenza statisticamente significativa tra il gruppo H2-RA ed il gruppo PPI per quanto riguarda la reattività piastrinica residua misurata come CADP-CT, sia in quinta giornata (T0) che ad un mese (T1): mediana 98 sec (range 61-300, percentili 25-75: 88-300) per il gruppo H2-RA e mediana 101 sec (range 61-300, percentili 25-75: 81-300) per il gruppo PPI a T0 ($p=0,95$); mediana 95 sec (range 55-300, percentili 25-75: 79-138) per il gruppo H2-RA e mediana 98 sec (range 68-300, percentili 25-75: 79-144) per il gruppo PPI a T1 ($p=0,84$) (Figura 17).

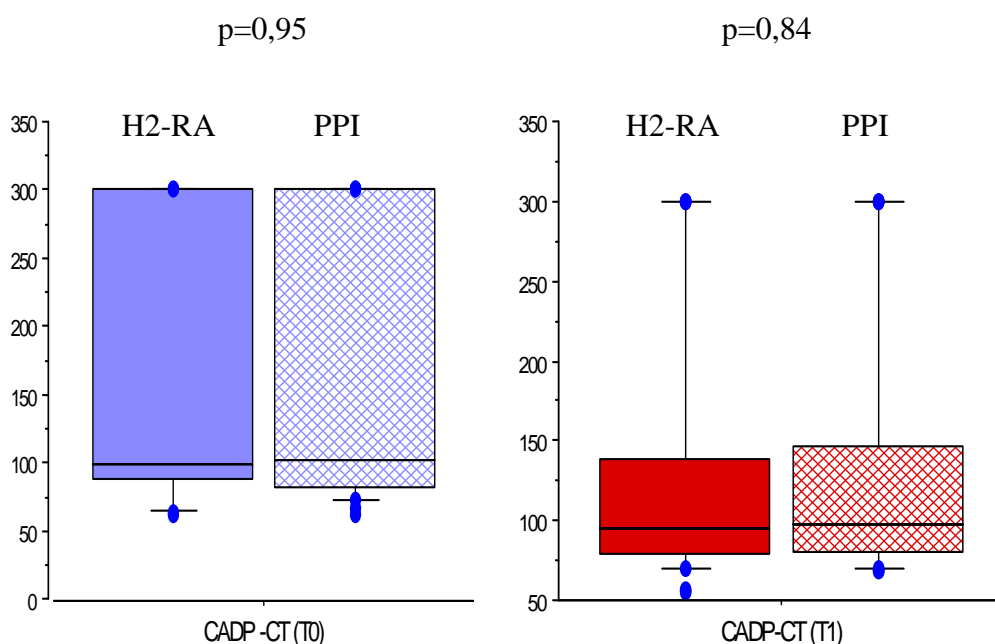


Figura 17: Valori di PFA-100 per la cartuccia collagene/ADP (CADP-CT) in quinta giornata (T0, grafico in azzurro) e ad un mese dalla PCI (T1, grafico in rosso). Non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo PPI ed il gruppo ranitidina (H2-RA) nei tempi di chiusura.

Il test aggregometrico, utilizzando come stimolo acido arachidonico (AA), è stato eseguito per valutare la reattività piastrinica residua correlata alla terapia con aspirina.

I valori massima aggregazione indotta da acido arachidonico espressi in percentuale (MA%) non sono risultati significativamente differenti nei due gruppi ad entrambi i tempi: mediana 4% (range 0-63, percentili 25-75: 2-12) nel gruppo H2-RA e mediana 5% (range 0-75, percentili 25-75: 2-8) nel gruppo PPI a T0 ($p=0,65$); mediana 4% (range 0-28, percentili 25-75: 2-8) nel gruppo H2-RA e mediana 3% (range 0-19, percentili 25-75: 2-8) nel gruppo PPI a T1 ($p=0,99$) (Figura 18).

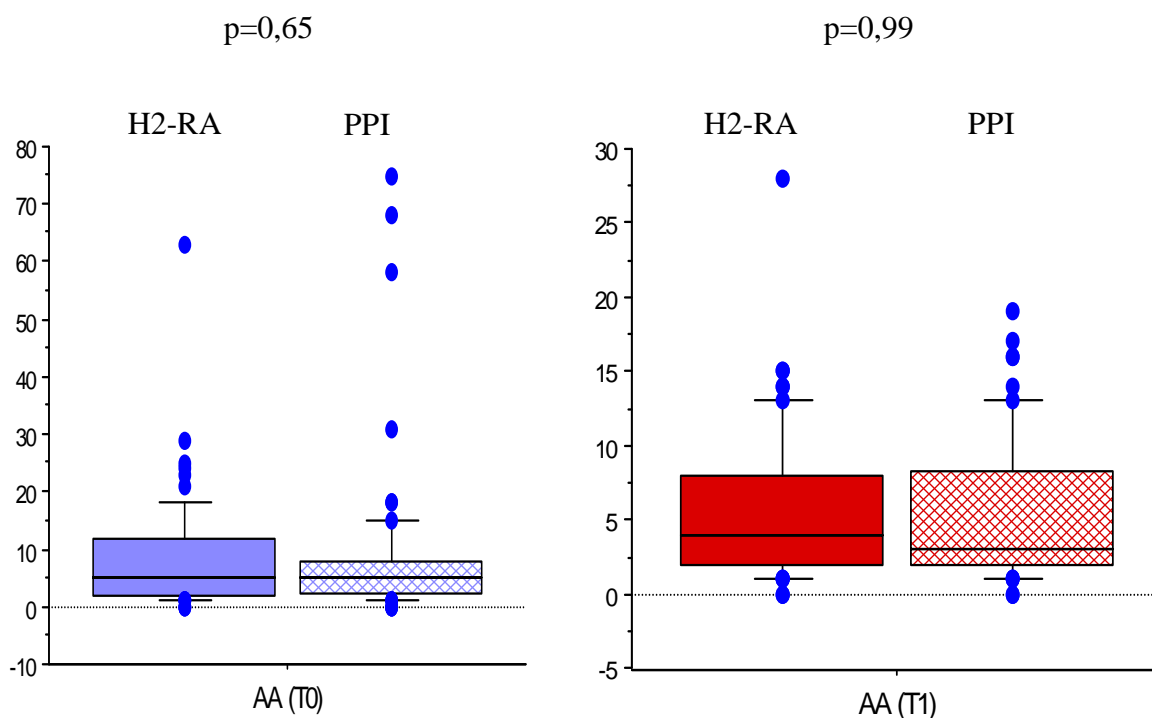


Figura 18: Percentuali di massima aggrgazione (MA%) utilizzando come stimolo acido arachidonico (AA) 1 mM. Non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo PPI ed il gruppo ranitidina (H2-RA) nella risposta aggregometrica valutata sia in quinta giornata post-PCI (T0, grafico in azzurro) che ad un mese (T1, grafico in rosso).

In Figura 19 sono mostrati i risultati relativi alle prove aggregometriche effettuate stimolando le piastrine con ADP 10 μ M. Abbiamo osservato che i soggetti trattati con PPI mostrano valori di ADP-MA, espressi in percentuale, significativamente più elevati rispetto ai soggetti trattati con H2-RA, sia a 5 che a 30 giorni: mediana 19% (range 0-64, percentili 25-75: 10-33) nel gruppo H2-RA e mediana 28% (range 2-85, percentili 25-75: 17-41) nel gruppo PPI a T0 ($p=0,0067$); mediana 28% (range 2-68, percentili 25-75: 23-44) nel gruppo H2-RA e mediana 39% (range 10-71, percentili 15-75: 30-50) nel gruppo PPI a T1 ($p=0,008$).

La eattività piastrinica residua misurata come risposta aggregometrica all'ADP, (ADP-RPR), è definita come ADP-MA \geq 70%; il numero dei soggetti in percentuale con ADP-RPR è risultato pari al 3% nel gruppo PPI e 0% nel gruppo H2-RA, ad entrambi i tempi T0 e T1, tuttavia questa differenza non è risultata statisticamente significativa ($p=0,15$ per T0 e $p=0,34$ per T1).

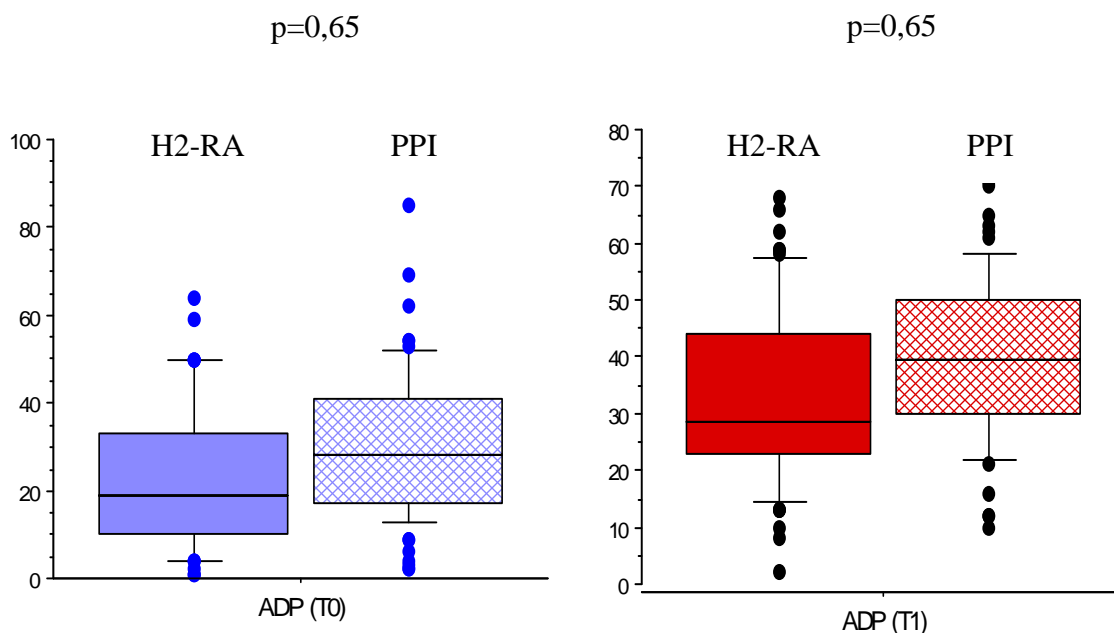


Figura 19: Percentuale di massima aggregazione (MA%) utilizzando come stimolo 10 μ M di ADP al giorno 5 (T0) e al giorno 30 (T1). Si osserva un aumento statisticamente significativo della massima aggregazione tra il gruppo pantoprazolo e il gruppo ranitidina.

Anche se la differenza nella distribuzione del polimorfismo CYP2C19*2 non era statisticamente significativa, risultava evidente una maggiore prevalenza nel gruppo H2-RA di soggetti portatori dell'allele *2, noto associarsi ad una diminuita risposta al clopidogrel (40% H2-RA versus 27% PPI).

Poiché la maggior prevalenza dell'allele *2 poteva influire sul risultato del test aggregometrico di valutazione della funzionalità piastrinica abbiamo suddiviso l'analisi di confronto dei valori di ADP-MA tra soggetti portatori dell'allele *2 o wild-type (*1*1). Per quanto riguarda i soggetti wild-type, i pazienti trattati con PPI mostravano livelli di ADP-MA significativamente più elevati rispetto ai soggetti trattati con H2-RA sia a 5 (Figura 18) che a 30 giorni (Figura 19) ($p=0,001$ e $p=0,01$ rispettivamente). Invece, l'analisi dei livelli di ADP-MA non mostrava differenze significative nei due gruppi nei soggetti portatori dell'allele *2 del polimorfismo CYP2C19($p=0,69$ e $p=0,17$ rispettivamente per l'analisi a 5 e a 30 giorni).

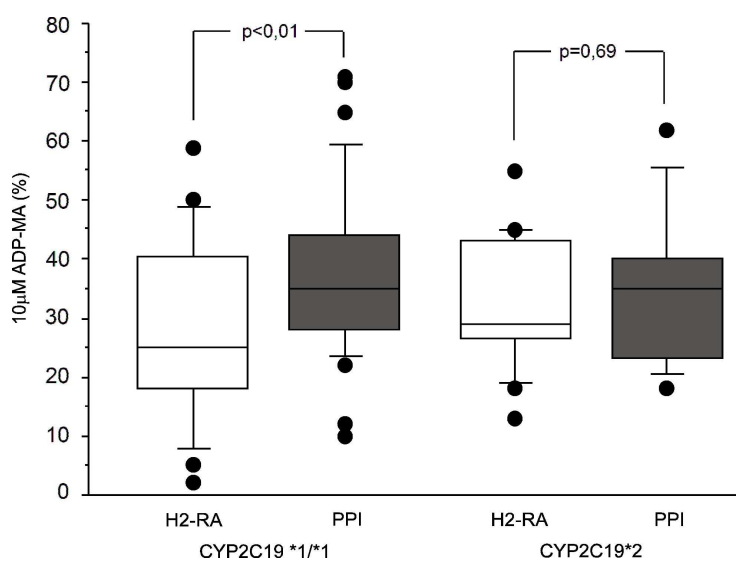


Figura 20: Valori di ADP-MA nei due gruppi (PPI e ranitidina) in quinta giornata, suddivisi tra soggetti wild type (sinistra) e soggetti portatori dell'allele *2 (destra).

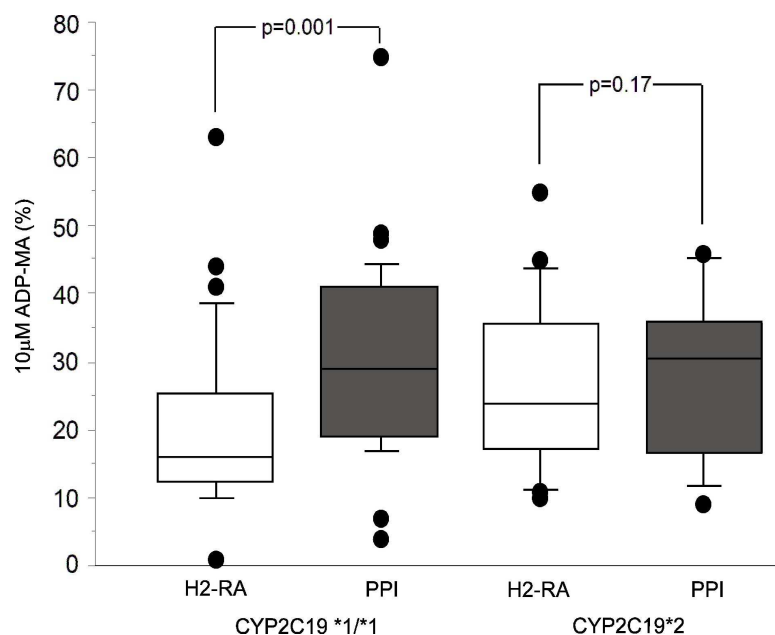


Figura 21: Valori di ADP-MA nei due gruppi (PPI e H2-RA) ad un mese, suddivisi tra soggetti wild type (sinistra) e soggetti portatori dell'allele *2 (destra).

Infine, abbiamo condotto un'analisi di regressione per verificare quali variabili avessero influenzato l'ADP-MA al giorno 5 ed al giorno 30. L'interesse maggiore era focalizzato sul dato a 30 giorni quando la terapia di mantenimento è ben instaurata e l'effetto dei farmaci somministrati nel periodo peri-procedurale non è più rintracciabile.

Mediante un'analisi di regressione univariata abbiamo confrontato i valori di ADP-MA a 5 e 30 giorni con tutti i classici fattori di rischio (sesso, età, abitudine al fumo, diabete, ipertensione, dislipidemia, valore di glicemia) oltre che con i dati clinici e procedurali ed i dati di laboratorio (Tabella 2). Successivamente abbiamo effettuato un'analisi di regressione lineare multivariata (Tabella 3) includendo nel modello i fattori di rischio cardiovascolare classici, il polimorfismo del CYP2C19*2, che è noto in

letteretaruua essere associato agli alti livelli di RPR e tutti i parametri che erano risultati statisticamente significativi alla analisi univariata.

Ad entrambi i tempi, sia l'età che l'uso di PPI sono risultati significativamente associati con l'ADP-MA anche all'analisi di regressione lineare multipla.

Variabili indipendenti	T0	T1
	p	p
Età	0,07	0,05
Sesso	0,84	0,90
Ipertensione	0,84	0,10
Dislipidemia	0,18	0,83
Diabete mellito	0,41	0,91
Glicemia	0,03	0,17
Colesterolo LDL	0,36	0,26
BMI	0,36	0,46
Fumo	0,47	0,46
Familiarità	0,91	0,07
Progresso infarto	0,98	0,36
CYP2C19*2	0,48	0,81
PPI	0,01	0,03
Anti-gpIIb/IIIa	0,24	0,62
beta-bloccanti	0,18	0,21
ACE-inibitori	0,51	0,24
Frazione di eiezione	0,11	0,97
Lunghezza dello stent	0,70	0,85
Proteina C reattiva high sensitive (hsCRP)	0,57	0,79
Fibrinogeno	0,54	0,58
BNP	0,94	0,64
Troponina I	0,03	0,12
CK-MB	0,12	0,21
Volume piastrinico medio (MPV)	0,89	0,43
Ematocrito	0,35	0,88

Tabella 2: Analisi di regressione lineare semplice per ADP a 5 giorni (T0) e a 30 giorni (T1).

Variabili indipendenti	T0	T1
	p	p
Età	0,18	0,02
Sesso	0,86	0,96
Ipertensione	0,36	0,02
Dislipidemia	0,28	0,77
Diabete mellito	0,43	0,76
Glicemia	0,38	0,78
Fumo	0,58	0,17
CYP2C19*2	0,84	0,90
PPI	0,05	0,03

Tabella 3: Analisi multivariata. Fattori che influenzano la variazione di ADP a T0 e T1.

DISCUSSIONE

I dati ottenuti in questo studio randomizzato volto al confronto di due gruppi di trattamento con gastroprotettori (Inibitori di pompa protonica e ranitidina), in pazienti affetti da sindrome coronarica acuta sottoposti ad angioplastica coronarica, dimostrano che i farmaci inibitori di pompa protonica (PPI), somministrati in concomitanza con la doppia terapia di antiaggregazione (clopidogrel più aspirina), determinano un aumento della reattività piastrinica residua (RPR), valutata mediante un test specifico di funzionalità piastrinica, quale l'aggregometria ottica su plasma ricco indotta da ADP 10 μ M.

Abbiamo, infatti, osservato un aumento significativo dei valori percentuali di aggregazione massima (ADP-MA) sia a 5 giorni che a 30 giorni dalla procedura di rivascolarizzazione.

Lo studio dimostra inoltre che l'effetto degli inibitori di pompa sull'azione antiaggregante del clopidogrel è indipendente dalla possibile interazione con il polimorfismo CYP2C19*2.

Numerosi dati di letteratura definiscono la condizione di bassa responsività al trattamento antiaggregante, detta altrimenti "residual platelet reactivity" (RPR), in corso di terapia con clopidogrel, come ADP-MA \geq 70%, sulla base della risposta delle piastrine all'ADP determinata con aggregometria ottica.

Nella popolazione studiata solamente tre pazienti, all'interno del gruppo trattato con PPI (n=80), hanno mostrato livelli di massima aggregazione indotta da ADP (ADP-MA) superiori o uguali a 70%.

Pertanto non è stato possibile dimostrare una eventuale associazione tra RPR definita sulla base del cut-off di letteratura e il trattamento con inibitori di pompa.

Soltanto dopo aver completato tutti i dati di funzionalità piastrinica relativi anche al tempo T1 (1 mese dalla rivascolarizzazione) e quelli riguardanti l'evoluzione clinica dei pazienti (ricorrenza di eventi cardiovascolari avversi, MACE), sarà possibile individuare un cut-off di non responsività con significato prognostico negativo.

A tale proposito non è possibile escludere che nella popolazione studiata il cut-off dei valori di ADP-MA predittivo di MACE risulti più basso di quelli più diffusamente riportati in letteratura, sia per la possibile influenza della variabilità inter-laboratorio dei test impiegati, che per le caratteristiche tipiche dei pazienti arruolati.

D'altra parte l'eventuale conferma dei dati presenti in letteratura, potrebbe indicare che, nonostante un aumento dei valori di ADP-MA nei pazienti trattati con PPI, tale reattività piastrinica post trattamento potrebbe non riflettersi in uno stato di attivazione tale da contribuire ad un incrementato rischio di eventi cardiovascolari avversi maggiori.

Il chiarimento del significato di tale correlazione sarebbe importante dal punto di vista clinico per poter individuare i pazienti "non responder" i quali, attraverso un monitoraggio della terapia antiaggregante ,potrebbero realmente beneficiare di un approccio terapeutico personalizzato.

L'effetto della possibile interazione della terapia con gastroprotettori PPI con la terapia antiaggregante è stato anche valutato mediante test di aggregazione indotta da acido arachidonico, che esplora preferenzialmente la via del metabolismo dell'aspirina e in tal caso non è stata rilevata una

differenza statisticamente significativa fra i due gruppi di trattamento PPI e H2-RA

Anche la valutazione della funzionalità piastrinica con un test globale point-of-care su sangue intero, quale il PFA-100 non ha evidenziato differenze significative fra i due gruppi di trattamento nei tempi di chiusura, espressi in secondi, delle cartucce collagene/epinefrina (CEPI-CT) e collagene/ADP (CADP-CT).

E' ipotizzabile che occorra studiare un numero di soggetti più elevato per raggiungere una significatività statistica.

All'analisi multivariata, fattori quali l'uso di PPI e l'età, si sono dimostrati associati in maniera indipendente all'aumentata reattività piastrinica residua in corso di trattamento antiaggregante, nella popolazione in studio.

I gastroprotettori vengono comunemente impiegati nei pazienti in terapia con clopidogrel e aspirina per contrastare le complicanze gastrointestinali dovute ai due farmaci antiaggreganti

Il meccanismo patogenico di danno alla mucosa gastrointestinale dell'aspirina è differente da quello del clopidogrel e fa sì che l'associazione dei due farmaci non consenta i normali processi di riparazione fisiologica di lesioni pre-esistenti legate all'effetto dell'aspirina o all'infezione sostenuta da *Helicobacter pilori*.

Per tali motivi nel documento di consenso ACCF/AHA/ACG del 2008 viene fortemente raccomandato l'impiego di PPI per minimizzare i sanguinamenti gastrointestinali in tutti i pazienti in terapia antiaggregante di associazione con clopidogrel e aspirina.

Negli stessi anni sono emerse le prime evidenze relative al possibile effetto inibitorio dei PPI sull'attivazione del clopidogrel e sulla sua capacità di inibire l'attivazione piastrinica.

A tale proposito i risultati dei principali trials clinici appaiono discordanti sia per quanto riguarda l'esistenza effettiva di una interazione farmacodinamica dovuta a cross- metabolismo epatico tra PPI e clopidogrel, sia nello stabilire l'entità di tale interazione relativamente ai singoli gastroprotettori.

Tenendo conto che circa il 75% dell'intera popolazione è trattata con uno dei seguenti inibitori di pompa, omeprazolo, esomeprazolo o pantoprazolo in aggiunta alla doppia antiaggregazione, i dati fino ad oggi accumulati in letteratura, sembrano favorire l'impiego di pantoprazolo, in quanto tra tutti i farmaci della sua classe viene indicato come quello con minore capacità di interferire con la terapia antiplastrinica (Norgard et al. 2009).

Siller-Matula e collaboratori (Siller-Matula et al. 2008) hanno mostrato che sia esomeprazolo che pantoprazolo non interagiscono con l'azione antiaggregante del clopidogrel, utilizzando come test di valutazione della risposta al clopidogrel la determinazione dello stato di fosforilazione della VASP intrapiastrinica (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein), mediante citometria a flusso.

Per quanto riguarda l'aspetto farmacodinamico dell'interazione tra PPI e clopidogrel, la ridotta formazione del metabolita attivo di quest'ultimo dovuta a inibizione del citocromo CYP2C19, sembra essere legata indifferentemente a tutti gli inibitori di pompa comunemente impiegati nella pratica clinica.

I dati di questo studio mostrano che, sebbene la frequenza del polimorfismo CYP2C19*2 nella nostra popolazione sia risultata simile nei due gruppi di trattamento, l'associazione del trattamento con PPI e livelli significativamente più elevati di RPR (ADP-MA) rispetto al trattamento con

H2-RA era apprezzabile nel gruppo dei pazienti omozigoti wild-type per il polimorfismo CYP2C19*2.

Mentre tale differenza era attenuata nei soggetti portatori di almeno un allele *2.

La presenza del polimorfismo CYP2C19*2 è stata associata in vari studi clinici ad una residua reattività piastrinica valutata con vari test - aggregazione piastrinica indotta da ADP, VerifyNow, VASP. Inoltre, tale polimorfismo è stato dimostrato essere un predittore significativo ed indipendente di eventi cardiovascolari avversi maggiori ed in particolare della grave complicanza della trombosi su stent.

Questi nostri dati sottolineano la necessità di ulteriori studi su casistiche ampie e ben caratterizzate clinicamente e geneticamente, volti a chiarire il reale ruolo degli inibitori di pompa protonica in considerazione delle importanti differenze esistenti tra i vari farmaci di questa classe nella variabilità di risposta al clopidogrel.

Questa esigenza è particolarmente pressante dal momento che gli inibitori di pompa protonica si sono dimostrati più efficaci nel prevenire le complicanze gastriche rispetto agli antagonisti del recettore H2. E' auspicabile quindi, alla luce dei dati di letteratura e di questi dati, l'esecuzione di studi più ampi volti a valutare l'interferenza farmacologica di pantoprazolo e degli altri PPI sull'effetto antiplastrinico del clopidogrel, valutando se tale interferenza si associa ad una residua reattività piastrinica che al di là del dato di laboratorio si traduce in un aumento degli eventi cardiovascolari avversi con le relative ricadute in termini di morbilità e mortalità.

BIBLIOGRAFIA

- Achar S. Pharmacokinetics, drug metabolism, and safety of prasugrel and clopidogrel. *Postgrad Med.* 2011 Jan;123(1):73-9.
- Angiolillo DJ, Masafumi U, Shinia G. Basic principle of platelet biology and clinical implication. *Circulation Journal* 2010; 74:597-607.
- Angiolillo DJ, Bernardo E, Ramirez C, et al. Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:298-304.
- Angiolillo DJ, Alfonso F. Clopidogrel-statin interaction: myth or reality? *J Am Coll Cardiol.* 2007 Jul 24;50(4):296-8.
- Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M, Hochman JS, Krumholz HM, Kushner FG, Lamas GA, Mullany CJ, Ornato JP, Pearle DL, Sloan MA, Smith SC Jr, Alpert JS, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Gregoratos G, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Jacobs AK, Ornato JP. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction; A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of patients with acute myocardial infarction). *J Am Coll Cardiol.* 2004 Aug 4;44(3):E1-E211.
- Antman EM, Braunwald E. ST-Elevation Myocardial Infarction: Pathology, Pathophysiology and Clinical Features. *Braunwald's Heart Disease A textbook of cardiovascular Medicine, 8th edition, Chapter 50 pp 1207-1232, Saunders (2009).*

- Aubert R.E., Epstein R.S., Teagarden J.R., 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.
- Bhatt DL, Bertrand ME, Berger PB, L'Allier PL, Moussa I, Moses JW, Dangas G, Taniuchi M, Lasala JM, Holmes DR, Ellis SG, Topol EJ. Meta-analysis of randomized and registry comparisons of ticlopidine with clopidogrel after stenting. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Jan 2;39(1):9-14.
- Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, Flather MD, Haffner SM, Hamm CW, Hankey GJ, Johnston SC, Mak KH, Mas JL, Montalescot G, Pearson TA, Steg PG, Steinhubl SR, Weber MA, Brennan DM, Fabry-Ribaudo L, Booth J, Topol EJ; CHARISMA Investigators. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* 2006 Apr 20;354(16):1706-17.
- Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, Bhatt DL, Cattaneo M, Collet JP, Cuisset T, Gachet C, Montalescot G, Jennings LK, Kereiakes D, Sibbing D, Trenk D, Van Werkum JW, Paganelli F, Price MJ, Waksman R, Gurbel PA; Working Group on High On-Treatment Platelet Reactivity. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Sep 14;56(12):919-33.

- Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, Gensini GF, Santini A, Paniccia R, Moschi G, Gori AM, Abbate R, Antonucci D. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Jun 19;49(24):2312-7
- CAPRIE Investigators. A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996; 348(9038):1329-39.
- Cattaneo M, Lecchi A, Agati B, Lombardi R, Zighetti ML. Evaluation of platelet function with the PFA-100 system in patients with congenital defects of platelet secretion. *Thromb Res*. 1999 Nov 1;96(3):213-7.
- Cattaneo M. Resistance to anti-platelet agents. *Thromb Res*. 2011 Feb;127 Suppl 3:S61-3.
- Cattaneo M. New P2Y₁₂ Inhibitors. *Circulation* 2010; 121: 171-179.
- Cesari F, Marcucci R, Caporale R, Paniccia R, Romano E, Gensini GF, Abbate R, Gori AM. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost*. 2008 May;99(5):930-5.
- Colin-Jones DG. The role and limitations of H₂-receptor antagonists in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9 (Suppl.1): 9-14.
- Collet JP, Hulot JS, Pena A, Villard E, Esteve JB, Silvain J, Payot L, Brugier D, Cayla G, Beygui F, Bensimon G, Funck-Brentano C, Mantalescot G. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet* 2009 Jan 24;373(9660):309-17.

- Cuisset T, Frere C, Quilici J, et al. High post-treatment platelet reactivity identified low-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost.* 2006;4:542-549.
- Cuisset T, Frere C, Quilici J, et al. Comparison of Omeprazole and Pantoprazole Influence on a High 150-mg Clopidogrel Maintenance Dose. The PACA (Proton Pump Inhibitors And Clopidogrel Association) Prospective Randomized Study. *J Am Coll Cardiol* 2009 Sep 22; 54: 1149-53.
- Dade Behring PFA-100 Reagent. Edizione novembre 2007
- Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357:2482-2494
- Davies MJ, Thomas T. The pathological basis and microanatomy of occlusive thrombus formation in human coronary arteries. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1981; 294: 225-9.
- De Caterina R. Attivazione endoteliale e aterosclerosi. Editore Primula Multimedia S..rL. 2000.
- DeWood MA, Spores J, Notske R, et al. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med* 1980; 303: 897-902.
- Escolar G, Cases A, Viñas M, Pino M, Calls J, Cirera I, Ordinas A. *Haematologica*. Evaluation of acquired platelet dysfunctions in uremic and cirrhotic patients using the platelet function analyzer (PFA-100): influence of hematocrit elevation. 1999 Jul;84(7):614-9.
- Falk E, Shah P, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulatio* 1995; 92;657-671.

- 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.
- Frere C, Cuisset T, Morange PE, et al. Effect of Cytochrome P450 Polymorphisms on Platelet Reactivity After Treatment With Clopidogrel in Acute Coronary Syndrome. *Am J Cardiol* 2008 Apr 15; 101 (8): 1088-93.
- Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, Meyer D. Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood*. 1998 Feb 15;91(4):1325-31.
- Fressinaud E, Veyradier A, Sigaud M, Boyer-Neumann C, Le Boterff C, Meyer D. Therapeutic monitoring of von Willebrand disease: interest and limits of a platelet function analyser at high shear rates. *Br J Haematol*. 1999 Sep;106(3):777-83.
- Geisler T, Zürn C, Paterok M, Göhring-Frischholz K, Bigalke B, Stellos K, Seizer P, Kraemer BF, Dippon J, May AE, Herdeg C, Gawaz M. Statins do not adversely affect post-interventional residual platelet aggregation and outcomes in patients undergoing coronary stenting treated by dual antiplatelet therapy. *Eur Heart J*. 2008 Jul;29(13):1635-43.
- George JN, Colman RW. Overview of platelet structure and function. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 5th Edition, Chapter 24, Lippincott Williams & Wilkins (2006).
- Gianetti J, Parri MS, Sbrana S, Paoli F, Maffei S, Paradossi U, Berti S, Clerico A, Biagini A. Platelet activation predicts recurrent ischemic

events after percutaneous coronary angioplasty: a 6 months prospective study. *Thromb Res.* 2006;118(4):487-93.

- Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, 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.
- Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccia R, Valente S, Antonucci D, Abbate R, Gensini GF. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2007 Dec;17(12):1057-64.
- Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccia R, Buonamici P, Antonucci D, Abbate R, Gensini GF. Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis. *Am J Cardiol.* 2009 Mar 15;103(6):806-11.
- Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Abbate R. Relation of CYP2C19 loss-of-function polymorphism to the occurrence of stent thrombosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010 Apr;6(4):393-407. Review.
- Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Vestrini A, Abbate R. Determinants to optimize response to clopidogrel in acute coronary syndrome. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 2010;3 33-50
- Gori AM, Marcucci R, Paniccia R, Giusti B, Fedi S, Antonucci E, Buonamici P, Antonucci D, Gensini GF, Abbate R. Thrombotic events

in high risk patients are predicted by evaluating different pathways of platelet function. *Thromb Haemost.* 2008 Dec;100(6):1136-45.

- Gori AM, Cesari F, Marcucci R, et al. The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with platelet aggregability in acute coronary syndrome patients. *Atherosclerosis* 2009;202:255-62.
- Gurbel PA, Bliden KP, Samara W, Yoho JA, Hayes K, Fissaha MZ, Tantry US. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Nov 15;46(10):1827-32.
- Gurbel PA, Tantry UA. Clopidogrel resistance? *Thrombosis Research* 2007; 120: 311-321. *J Am Coll Cardiol.* 2007. Vol. 50. No.19.
- Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease.
- Ho PM, Maddox TM, Wang L, Fihn SD, Jesse RL, Peterson ED, Rumsfeld JS. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *JAMA.* 2009 Mar 4;301(9):937-44.
- Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W. Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost.* 2000 Feb;83(2):316-21.
- <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Plavix>
- <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientandProviders>
- Hulot J.S., Bura A., Villard E., Azizi M., Remones V., Goyenvallé 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.

- Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, Ge L, Sangiorgi GM, Stankovic G, Airolidi F, Chieffo A, Montorfano M, Carlino M, Michev I, Corvaja N, Briguori C, Gerckens U, Grube E, Colombo A. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA*. 2005 May 4;293(17):2126-30.
- Jilma B. Platelet function analyzer - PFA-100: a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med* 2001;138:152-63.
- King SB III, Smith SC Jr, Hirshfeld JW Jr, et al. 2007 focused update of the ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:172-209.
- Kottke-Marchant K, Powers JB, Brooks L, Kundu S, Christie DJ. The effect of antiplatelet drugs, heparin, and preanalytical variables on platelet function detected by the platelet function analyzer (PFA-100). *Clin Appl Thromb Hemost*. 1999 Apr;5(2):122-30.
- 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;109:166-171.
- Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111:3481-3488.

- Little WC, Costantinescu M, Applegate RJ, Kutcher M, Burrows MT, Kahr FR, Santamore WP. Can coronary angiography predict the site of subsequent myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 56-62.
- Ma TK, Lam YY, Tan VP, Kiernan TJ, Yan BP. *Pharmacol Ther.* Impact of genetic and acquired alteration in cytochrome P450 system on pharmacologic and clinical response to clopidogrel. 2010 Feb;125(2):249-59.
- Marcucci R, Paniccia R, Antonucci E, Poli S, Gori AM, Valente S, Giglioli C, Lazzeri C, Prisco D, Abbate R, Gensini GF. Residual platelet reactivity is an independent predictor of myocardial injury in acute myocardial infarction patients on antiaggregant therapy. *Thromb Haemost.* 2007 Oct;98(4):844-51.
- Marcucci R, Cesari F, Cinotti S, Paniccia R, Gensini GF, Abbate R, Gori AM. ADAMTS-13 activity in the presence of elevated von Willebrand factor levels as a novel mechanism of residual platelet reactivity in high risk coronary patients on antiplatelet treatment. *Thromb Res.* 2008;123(1):130-6.
- Marcucci R, Gori AM, Paniccia R, Giusti B, Valente S, Giglioli C, Buonamici P, Antonucci D, Abbate R, Gensini GF. Cardiovascular death and nonfatal myocardial infarction in acute coronary syndrome patients receiving coronary stenting are predicted by residual platelet reactivity to ADP detected by a point-of-care assay: a 12-month follow-up. *Circulation.* 2009 Jan 20;119(2):237-42.
- Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Bienart R, Goldenberg I, Novikov I, Pres H, Savion N, Varon D, Hod H. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent

atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004 Jun 29;109(25):3171-5.

- McFadden EP, Stabile E, Regar E, Cheneau E, Ong AT, Kinnaird T, Suddath WO, Weissman NJ, Torguson R, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Waksman R, Serruys PW. Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet*. 2004 Oct 23-29;364(9444):1519-21.
- Metha SR, Yusuf S, Peters RJ, et al. Effects of pre-treatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001; 358:527-33.
- Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation* 2004; 110:e489-93-
- Ng FH, Chan P, Kwanching CP, Loo CK, Cheung TK, Wong SY, Kng C, Ng KM, Lai ST, Wong BC. Management and outcome of peptic ulcers or erosions in patients receiving a combination of aspirin plus clopidogrel. *J Gastroenterol*. 2008;43(9):679-86.
- Ng SC, Chan FK. NSAID-induced gastrointestinal and cardiovascular injury. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010 Nov;26(6):611-7.
- Norgard NB, Mathews KD, Wall GC. Drug-drug interaction between clopidogrel and the proton pump inhibitors. *Ann Pharmacother* 2009; 43: 1266-74.
- O'Donoghue ML, Braunwald E, Antman EM, Murphy SA, Bates ER, Rozenman Y, Michelson AD, Hautvast RW, Ver Lee PN, Close SL, Shen L, Mega JL, Sabatine MS, Wiviott SD. Pharmacodynamic effect and clinical efficacy of clopidogrel and prasugrel with or without a

proton-pump inhibitor: an analysis of two randomised trials. *Lancet*. 2009 Sep 19;374(9694):989-97.

- Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, Marcucci R, Poli S, Romano E, Valente S, Giglioli C, Fedi S, Gensini GF, Abbate R, Prisco D. Comparison of different methods to evaluate the effect of aspirin on platelet function in high-risk patients with ischemic heart disease receiving dual antiplatelet treatment. *Am J Clin Pathol*. 2007 Jul;128(1):143-9.
- Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Miranda M, Gori AM, Marcucci R, Giusti B, Balzi D, Prisco D, Abbate R. Comparison of methods for monitoring residual platelet reactivity after clopidogrel by point-of-care tests on whole blood in high-risk patients. *Thromb Haemost*. 2010 Aug 2;104(2):287-92.
- Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Miranda M, Romano E, Gori AM, Marcucci R, Prisco D, Abbate R. Light transmittance aggregometry induced by different concentrations of adenosine diphosphate to monitor clopidogrel therapy: a methodological study. *Ther Drug Monit*. 2011 Feb;33(1):94-8.
- Park DW, Park SW, Park KH, Lee BK, Kim YH, Lee CW, Hong MK, Kim JJ, Park SJ. Frequency of and risk factors for stent thrombosis after drug-eluting stent implantation during long-term follow-up. *Am J Cardiol*. 2006 Aug 1;98(3):352-6.
- Pugliano M, Cattaneo M. Il problema della resistenza ai farmaci antiplastrinici: meccanismi molecolari e test di laboratorio. *RIMeL/IJMaL* 2009; 5.

- Rafani M.A, La posata M. Platelet aggregation. In: Platelets. Edited by A.D Michelson 2002.
- Reny JL, De Moerloose P, Dauzat M, Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2008 Mar;6(3):444-50. Review.
- Richardson P, Hawkey CJ, Stack WA. Proton pump inhibitors. Pharmacology and rationale for use in gastrointestinal disorders. *Drugs* 1998; 56:307-35.
- Savi P, Nurden P, Nurden AT, Levy-Toledano S, Herbert JM. Clopidogrel: a review of its mechanism of action. *Platelets.* 1998;9(3-4):251-5.
- Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental and clinical pharmacology* 2005;19(1):117-125.
- Sibbing D, Morath T, Stegherr J, Braun S, Vogt W, Hadamitzky M, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N. Impact of proton pump inhibitors on the antiplatelet effects of clopidogrel. *Thromb Haemost.* 2009 Apr;101(4):714-9.
- Siller-Matula JM, Spiel AO, Lang IM, Kreiner G, Christ G, Jilma B. Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am Heart J* 2008; 157: 148.e.
- Small D.S., Farid N.A., Payne C.D., Weerakkody G.J., Li Y.G., Brandt J.T., 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.

- Sofi F, Marcucci R, Gori AM, Giusti B, Abbate R, Gensini GF. Clopidogrel non-responsiveness and risk of cardiovascular morbidity. An updated meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2010 Apr;103(4):841-8.
- Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT 3rd, 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 Nov 20;288(19):2411-20.
- Suh J.W., Koo B.K., Zhang S.Y., Park K.W., Cho J.Y., Jang I.J., et al. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel. *CMAJ* 2006; 174:1715-22.
- Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Chialda LE, Pahl A, Valina CM, Stratz C, Schmiebusch P, Bestehorn HP, Büttner HJ, Neumann FJ. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol.* 2008 May 20;51(20):1925-34.
- van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89:36-44.
- Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg PG, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M; ESC Committee for

Practice Guidelines (CPG). Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2008 Dec;29(23):2909-45.

- von Pape KW, Aland E, Bohner J. Platelet function analysis with PFA-100 in patients medicated with acetylsalicylic acid strongly depends on concentration of sodium citrate used for anticoagulation of blood sample. *Thromb Res.* 2000 May 15;98(4):295-9.
- Wenaweser P, Eshtehardi P, Abrecht L, Zwahlen M, Schmidlin K, Windecker S, Meier B, Haerberli A, Hess OM. A randomised determination of the Effect of Fluvastatin and Atorvastatin on top of dual antiplatelet treatment on platelet aggregation after implantation of coronary drug-eluting stents. The EFA-Trial. *Thromb Haemost* 2010 Sep;104(3):554-62.
- White MC.M, Jennings LK. Platelet protocol: research and clinical laboratory procedures. Academic Press, 1999.