

# Clinical implications of monitoring the efficacy of antiplatelet therapy in patients after percutaneous coronary intervention

Ph. D. Thesis

*by*

Dániel Aradi MD

Supervisor:

András Komócsi MD, PhD

Program Leader:

Erzsébet Róth MD, DSc, PhD

University of Pécs, Medical Faculty  
Department of Interventional Cardiology  
Doctoral School of Medical Sciences

PTE ÁOK  
2009

## **Introduction**

Percutaneous coronary interventions (PCI) have revolutionized the treatment of ischemic heart disease. Following the pioneer interventions of Andreas Grüntzig in 1977, approximately 10.000 patients are treated with this technique every year in Hungary. Exploiting numerous advantages of a minimal invasive intervention, substantial technological and pharmacological advances were made to increase the feasibility and procedural success during the last decade. Consequently, balloon angioplasty, the initial method for dilating coronary stenoses has been replaced with coronary stent implantation due to the lower rates of acute (dissection, abrupt vessel closure) and chronic (restenosis) complications of the latter. (1, 2) Although stent implantation dramatically improved the overall success rate of PCI, limitations are also evident both in short- and long-term. The main shortcomings include stent thrombosis (ST) and instent restenosis (ISR) that both result in target-vessel failure after PCI.

### **Stent thrombosis**

Stent thrombosis is an acutely occurring, quick and mostly total occlusion of a previously implanted coronary stent that usually manifests in high-mortality myocardial infarction (MI). (3) In parallel to de novo coronary artery thrombosis, stent thrombus is mainly formed by activated and aggregated platelets that are stabilized by fibrin clots. It is thought to be a multi-factorial event, in that both procedural (under-expansion, malposition and malapposition of stents, long stented segment, residual edge-dissection), clinical (low ejection fraction, acute myocardial infarction, impaired renal function, diabetes) and hemorrheologic abnormalities (premature discontinuation of antiplatelet therapy, aspirin/thienopyridine resistance) play substantial role. (4) Notably, the administration of dual antiplatelet therapy has decreased the occurrence of ST compared to aspirin monotherapy or aspirin plus anticoagulation in patients after PCI. (5-8) Thus, aggressive inhibition of platelet function seems essential to obviate these ischemic events. Although being a relatively rare event, the prevalence of ST varied largely between clinical trials and registries due to terminological heterogeneity. For obtaining universal definitions and in order to improve comparability and interpretation of results, the Academic Research Consortium (ARC) proposed consensus categories for ST, based on the event probability and level of evidence. Also known as the Glasgow-classification, these criteria define three categories of ST (ARC I: definite; II: probable; and III). Alternatively, ST can be classified based on the timing of occurrence. (Table 1) According to the ARC criteria, definite ST occurs in 0.5-1.5% after the first year of PCI, while possible ST has a prevalence of 2 to 4% (9, 10).

### **Instent restenosis**

Instent restenosis (ISR) is a chronic process that progressively and irreversibly reduces the previously stented vessel lumen. Similarly to ST, ISR is also a multi-factorial event, in that procedural (under-expansion, malposition, malapposition of stents, long stented segment, smaller stent diameter), clinical (acute myocardial infarction, diabetes, inflammation and hypersensitivity) and hemorrheologic abnormalities (slow flow, not good outflow from

stented segment) might play significant part. (11, 12) Compared to normal neointimal formation, ISR is accompanied by overproliferation of the endothelial and smooth muscle cells around the stented segment that leads to a fibrous and thickened neointima. (13, 14) In most of the cases, ISR develops in the first year after coronary intervention and is usually manifested in recurrent stable angina. However, in a minority (2-3%) of the patients, ISR leads to myocardial infarction due to the critical ischemia. (15) Recently, the role of platelet activation and impaired response to antiplatelet therapy were also suggested in the development of ISR as activated platelets might trigger the proliferation of the neointimal tissue by releasing growth factors (PDGF) and recruiting leucocytes. (13)

With the implantation of bare metal or cobalt chromium stents, ISR occurred in 20 to 40% of patients after PCI. In the past years, drug-eluting stents (DES) proved to be extremely successful in preventing in-stent restenosis. (9, 10) The anti-inflammatory, anti-proliferative and/or cytostatic drugs that are released from stents to the vessel wall were successful to prevent neointimal hyperplasia and decreased the incidence of angiographic in-stent restenosis below 10%. On the other hand, the eluted antiproliferative drugs prevent healing and complete endothelialization of such stents that prolongs the risk of stent thrombosis. Likewise, efficient and long-lasting antiplatelet therapy has a substantial importance in the DES era, as well. Despite being successful in decreasing the rate of target lesion revascularisations (TLR), the first-generation drug- (sirolimus and paclitaxel) eluting stents failed to reduce hard cardiovascular endpoints, such as cardiac death or MI compared to bare metal analogues after PCI. Moreover, higher prices also limit their availability. As the current penetration of DES does not exceed 20-25%, ISR remains a clinically relevant problem in Hungary.

### **Inter-individual differences in response to antiplatelet therapy**

According to in vitro/ex vivo measurements, administration of aspirin does not inhibit platelet activation and aggregation in a proportion of patients; their platelet reactivity is comparable to aspirin-free subjects. Classified as 'aspirin resistants' or 'non-responders', these patients can be separated from good responders with laboratory assessments. (40) On the other hand, there are subjects who incur adverse thrombotic events despite being on aspirin therapy that is considered a 'treatment failure'. Although treatment failure to aspirin and aspirin resistance are different – the first is defined by clinical the latter by laboratory assessment – aspirin resistant patients were shown to be at higher risk for ischemic vascular events. (41) Hence, aspirin resistance might be more than just a laboratory curiosity as high proportion of aspirin resistants ended up with a clinical treatment failure. (42) As a result of methodical and terminological heterogeneity, the prevalence of aspirin resistance varies a lot between authors; ranging from 5% to 65%, with a recent meta-analysis suggesting a mean prevalence of 28%. (43) These results highlight the fact that not all methods are equal in defining antiplatelet response to aspirin. (40, 44)

In patients after PCI, the administration of clopidogrel has dramatically reduced the rate of ischemic events as well as bleeding complications compared to the coumarin and aspirin combination. (5-8) However, thrombotic events still occurred in spite of the dual antiplatelet therapy, thereby extensive research started to explore the individual response to clopidogrel. Early studies demonstrated large inter-individual differences in response to a fix-dose

clopidogrel, and similar to aspirin, the term “clopidogrel resistance” was created and widely applied to refer for patients with inappropriate response. (45-47)

Numerous observational studies pointed out the higher risk of patients with inappropriate response to clopidogrel to recurrent thrombotic events. (48-55) However, according to the 2005 ACC/AHA/SCAI guidelines on PCI, antiplatelet testing is only recommended in patients in whom ST would be of catastrophic consequences (18). This is due to the lack of a uniformly available, standardized, cheap, quick and reliable bedside assay that provides comparable and interpretable results of antiplatelet efficacy. Moreover, results of randomized, sufficiently powered trials are also awaited to clarify the clinically relevant cutoff values. Currently, light transmission aggregometry is considered the historical gold-standard in monitoring the efficacy of antiplatelet therapy. (56)

## **Aims**

The main aims of our examinations were the following:

- to characterize the individual response and efficacy of both aspirin and thienopyridine therapy in patients admitted for percutaneous coronary intervention and compare the agreement between relevant methods in monitoring antiplatelet efficacy.
- to determine the possible clinical implications of the variability observed in the antiplatelet response among patients after PCI.
- to determine the significance of diabetes mellitus on the prevalence of low response to aspirin and clopidogrel.
- to determine alternative pharmacological approaches in order to overcome inadequate response to clopidogrel and to analyze possible predictors of the response to the alternative approach.
- to determine the prognostic significance of the used access site (femoral vs. radial) on both bleeding and ischemic complications after PCI in patients receiving dual/triple antiplatelet therapy.

## **Methods**

### **Light Transmission Aggregometry**

Carat TX4 four-channel light transmission aggregometer (LTA; CARAT Diagnostics, Budapest, Hungary) was used for ex vivo measurements to monitor the efficacy of antiplatelet therapy. LTA registers optical density of a suspension trans-illuminated with infrared light. The higher the optical density of the suspension, the less light reaches the sensor. LTA dynamically measures and displays infrared light intensity during assessment for 7 minutes. Having introduced in the late '60-ies, LTA became the gold-standard of measuring platelet aggregation in subjects with platelet function disorders and in patients receiving antiplatelet therapy. The method is relatively cheap, broadly available and well accepted; enables

monitoring antiplatelet efficacy selectively with specific agonists. However, measurements are poorly standardized, time-consuming, non-automated, require trained personnel for sample preparation and measurement. As a conclusion, it is difficult to compare results and generalize consequences obtained with this method.

For assessments, 10 ml blood needs to be drawn into vacuum-tubes anticoagulated with 3.8% sodium-citrate from every patient. For getting platelet-rich plasma (PRP), blood is centrifuged at 2000 rpm for 4 minutes. Further centrifugation for 10 minutes at 4000 rpm results in platelet-poor plasma (PPP). At baseline, PPP is used to set 100%, while PRP 0% light transmission on the aggregometer. Then, platelet-specific agonists are added into PRP to stimulate platelet aggregation with a continuous magnetic stirring at 37 degree Celsius. In antiplatelet-free subjects, activation of resting platelets results in formation of platelet aggregates that decrease optical density of the plasma. Thus, light transmission increases steeply after the injection of the agonist forming a plateau thereafter. Platelet reactivity is usually expressed with the maximal platelet aggregation value (Aggmax) of the registered optical curve, while other parameters (late aggregation [Agglate], steepness of slope, area under curve [AUC]) and disaggregation [disAgg] may also be determined. (Figure 3, 4) Efficient antiplatelet therapy prohibits platelet activation, limiting the formation of platelet aggregates and decreasing the peak value of the aggregation curve. Likewise, high Aggmax values are typical for untreated subjects and low responder patients, while low Aggmax reflects effective platelet inhibition. (Figure 3, 4)

As antiplatelet agents block a specific pathway of platelet activation, their efficacy can be measured with a specific agonist: ADP is used to test the efficacy of thienopyridine therapy, while adrenaline, collagen or arachidonic acid is suitable to measure efficacy of aspirin treatment. This means one of the most important advantages of the assay, i.e. to measure the efficacy of antiplatelet agents using specific agonist with high selectivity.

### Vasodilator Stimulated Phosphoprotein (VASP)

Platelets express two subtypes of ADP surface receptors: while P2Y1 is essential for initiation of platelet activation, stimulation of P2Y12 receptor causes a decrease in adenylyl-cyclase resulting in lower levels of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Cyclic AMP is necessary for phosphorylation of a second messenger known as vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). VASP is important for regulation of the cytoskeleton and for conversion of glycoprotein IIb/IIIa to its active conformation, thus permitting platelets to aggregate. VASP exists in both phosphorylated and dephosphorylated states. The phosphorylated form is characteristic for a resting platelet. Inhibition of cAMP-activity after activation of the P2Y12 receptor by ADP leads to an increase in VASP dephosphorylation, whereas blockade of P2Y12 receptor by the active metabolite of a thienopyridines inhibits dephosphorylation. Thus, the ratio of phosphorylated to dephosphorylated VASP reports the degree of the P2Y12 receptor blockade. (Figure 5)

Currently, flow cytometric measurement of VASP phosphorylation represents the most specific method for monitoring the efficacy of thienopyridine therapy. However, the kit is

expensive, the process is time-consuming, requires special instrumental and personal training giving very limited availability to the assay.

In our measurements, the phosphorylation status of VASP was analyzed with fluorescent antibody against VASP-P on a Beckmann Coulter flow cytometer using PLT VASP/P2Y12 kit (Biocytex, Marseille, France). For this assay, citrated whole blood was incubated with PGE1 with or without ADP. After fixation with paraformaldehyde, the cells were permeabilized and incubated with a primary mouse monoclonal antibody specific for phosphorylated VASP, followed by a secondary fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated polyclonal goat-antimouse antibody. Samples were then analyzed by flow cytometry to measure the level of phosphorylated VASP. The efficacy of ADP-receptor inhibition is expressed with the platelet reactivity index (PRI), which is calculated from the corrected mean fluorescence intensity (MFI) of the PGE1 and the PGE1+ADP-incubated samples as follows:  $PRI = (MFIPGE1 - MFIPGE1+ADP) / MFIPGE1 \times 100$ . (Figure 5-7)

### Soluble markers of platelet activation

We collected blood samples for examination of soluble markers of platelet activation using Multiplex Fluorescent Bead Immunoassay (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). The assay enabled the detection of soluble VCAM-1, soluble CD40L and soluble P-selectin in patients after coronary stent implantation. 5 ml blood was drawn with direct venipuncture, and centrifuged for separating plasma. Samples were immediately frozen to -20°C to avoid loss of bioactive markers. Prior to assay, the frozen plasma was brought to room temperature slowly, and added to the mixture of seven microbead clusters coated with different monoclonal antibody against the intent-to-measure activation markers (sVCAM-1, sP-selectin and sCD40L). The activation markers present in the sample bind to the antibodies adsorbed to the fluorescent beads. Phycoerythrin (PE) conjugated second antibody mixture is added and the specific antibodies bind to the activation markers captured by the first antibodies. Microbead clusters were identified according to their intrinsic far red fluorescent activities (690nm). Rows of standard dilution of the intent-to-measure markers were created in parallel to sample analysis in order to obtain standard curves of PE fluorescent intensity (575nm) of the adequate bead cluster. Far red fluorescent intensity (indicate the bead cluster, the activation marker) and PE fluorescent intensity (indicate the concentration of the activation marker in the sample) of the microbeads was read on FACSCalibur flow cytometer. Plasma levels of activation markers were calculated using standard dilution curves of mean fluorescent intensity (MFI).

## Experimental results

### *1. Monitoring P2Y12 receptor inhibition with light transmission aggregometry: a comparison with vasodilator stimulated phosphoprotein phosphorylation assay*

#### Background

As LTA is poorly standardized, the optimal platelet aggregation parameter (Aggmax, Agglate, AUC or disaggregation) to monitor P2Y12 receptor inhibition is unclear. Most of the laboratories are using the maximum value (Aggmax) of the ADP-stimulated aggregation curve that is achieved early after agonist addition. However, LTA is not P2Y12-specific, as ADP also binds to P2Y1 receptor. (20) The latter initiates shape change with degranulation leading to an unstable, early-stage platelet aggregation that might result in disaggregation during assessment if the P2Y12 receptor is blocked. Disaggregation during ex vivo testing is typical when low ADP ( $\leq 5 \mu\text{M}$ ) concentrations are used. Based on these, some laboratories prefer to use late aggregation value believing that aggregation measured at 5-6 minutes after ADP stimulation might better represent P2Y12 receptor inhibition without the influence of P2Y1-activity. (50) However, the superiority of Agglate over other aggregometry parameters has not yet been proved by an independent, P2Y12-specific assay. Flow cytometric assessment of vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation is a recently developed, completely P2Y12-specific method that is considered the gold standard for measuring P2Y12-receptor inhibition.

## **Objective**

We aimed to compare ADP-stimulated light transmission aggregometry to the P2Y12-specific VASP phosphorylation assay in order to analyze the agreement between them. Moreover, we sought to test the hypothesis that Agglate is superior to other estimates of the LTA measurement in monitoring P2Y12 receptor inhibition.

## **Methods**

Eighty-nine clopidogrel-naïve stable angina patients were prospectively recruited in whom elective percutaneous coronary interventions were performed. Exclusion criteria were acute coronary syndrome, prior thienopyridine or oral anticoagulant therapy, known contraindication to aspirin or clopidogrel, stroke in the past 6 months, known bleeding disorders or low platelet count ( $<100 \times 10^9/\text{L}$ ). All patients received a single loading dose of 600 mg clopidogrel and 300 mg enteric-coated aspirin after coronary angiography, just immediately before PCI, after giving written consent for participation in the study. Twelve to 18 hours after the 600-mg loading dose of clopidogrel, 20 ml blood was drawn from each patient from a peripheral vein and put into four 4.5-ml BD Vacuutainer tubes, with 3.8% sodium-citrate for anticoagulation for LTA and VASP assessment. All patients gave written consent for participation, and the study was approved by the local ethics committee. LTA and VASP measurements were performed as described previously. The efficacy of clopidogrel therapy was expressed using ADP  $5 \mu\text{M}$ , while epinephrine  $10 \mu\text{M}$  was used to refer for the efficacy of aspirin therapy. Maximal aggregation (Aggmax), 6-minute late aggregation (Agglate), disaggregation (disAGG) and the area under the aggregation curve (AUC) were calculated in every measurement.

## **Results**

Correlation between LTA and VASP measurements

Eighty-nine VASP and LTA measurements were performed  $19 \pm 2$  hours after receiving a 600-mg loading dose of clopidogrel and 80 patients were sampled on maintenance-phase, at  $25 \pm 2$  days after PCI. Thereby, a total number of 169 measurements were analyzed. After the administration of a 600-mg loading dose of clopidogrel, all platelet function measures demonstrated high inter-individual variability in efficacy (Aggmax:  $28.8 \pm 14.0$ ; Agglate:  $9.4 \pm 17.5$ ; disAGG:  $72.0 \pm 33.3$ ; AUC:  $66.8 \pm 52.2$ ; VASP-PRI:  $49.9 \pm 22.1$ ) that also persisted in the maintenance period (Aggmax:  $30.0 \pm 12.6$ ; Agglate:  $9.2 \pm 16.2$ ; disAGG:  $71.4 \pm 30.3$ ; AUC:  $68.6 \pm 49.5$ ; VASP-PRI:  $48.1 \pm 20.6$ ). Based on the 169 LTA measurements, high correlation was found between the maximal and late aggregation values ( $p < 0.001$ ; Spearman's  $\rho$ : 0.91). When LTA values were compared to VASP-PRI, significant, moderate-strength correlations were registered with AUC showing the highest correlation coefficient to VASP-PRI. (Figure 1) Notably, the efficacy of aspirin therapy, measured by epinephrine  $10 \mu\text{M}$ , did not correlate to VASP-PRI. ( $p = 0.75$ ). In a multivariable linear regression model with VASP-PRI as a dependent variable, AUC proved to be the independent predictor of VASP-PRI [0.50, 0.21(0.15-0.27)].

Bland-Altman plots were used to demonstrate intra-individual agreement among assays in measuring post-clopidogrel platelet reactivity. (Figure 2) In case of maximal aggregation, the plot showed that platelet reactivity is estimated quite similarly by both methods with significant disagreement in certain individuals (bias: 2.8; limits of agreement: -42.6 - 48.2, range: 90.8). When Agglate was plotted against VASP-PRI, the analysis showed that it underestimates platelet reactivity with similar intra-individual differences as Aggmax (bias: -9.4; limits of agreement: -53.6 - 34.9; range: 88.5). Disaggregation and AUC also underestimated VASP-defined platelet reactivity, with wider disagreement range of the former (bias: -19.8; limits of agreement: -75.0 - 35.5; range: 110.5 for disAGG and bias: -10.0; limits of agreement: -61.5 - 41.4, range: 102.9 for AUC). The plots also demonstrate that the underestimation of platelet reactivity by Agglate, disAGG and AUC is driven by differences in the low platelet reactivity range (markedly below 50%) where these measures of LTA give significantly lower values of platelet reactivity than VASP-PRI.

#### Agreement between assays in determining normal and high platelet reactivity

The predictive value of LTA variables in determining high platelet reactivity (HPR), defined as a VASP-PRI value greater than 50% was evaluated with receiver-operator characteristic (ROC) curve analysis. According to the analysis, the predictive value of the LTA estimates were similar. (Figure 3)

The optimal cutoff with the highest sensitivity and specificity for predicting HPR was also determined for each variable: AGGmax: 32.9%; AGGlate: 12.8%; DISagg: 63.6%; AUC: 96.5 %\*min.



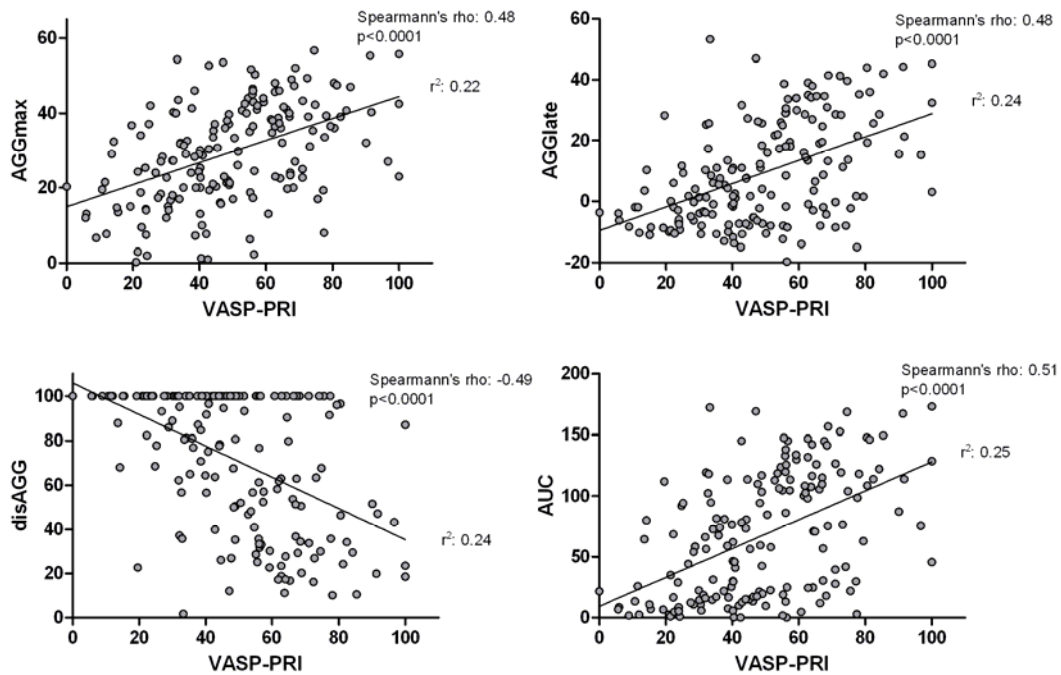


Figure 1. Scatterplots comparing vasodilator stimulated phosphoprotein phosphorylation index (VASP-PRI) and different measures of the light transmission curve. AGGmax: maximal aggregation; Agg<sub>late</sub>: 6-minute late aggregation; disAGG: disaggregation; AUC: area under the light transmission curve.

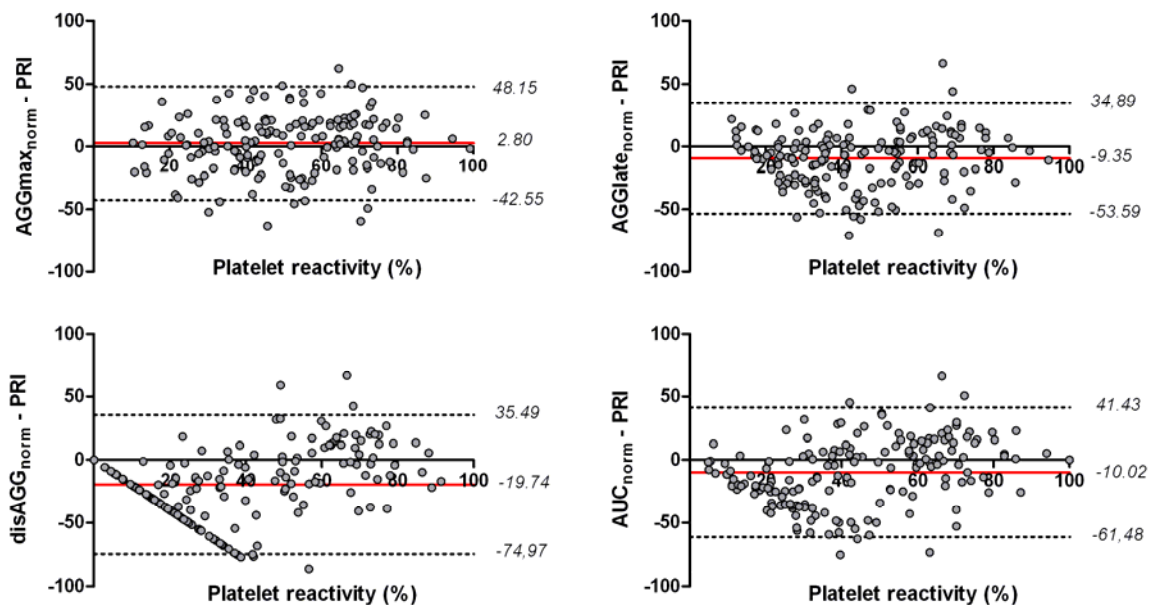


Figure 2. Bland–Altman plots are demonstrating intra-individual agreement between estimates of LTA and VASP-PRI in measuring platelet reactivity. Bias (red line) is a measure of a systematic error leading to over- or underestimation of a known value (VASP-PRI) by alternative parameters of the light transmission assessment. As a major principle of the Bland-Altman analysis is that both measurements evaluate a parameter on a same scale (platelet reactivity, %), all the light transmission parameters were normalized to the scale of VASP-PRI (from 0% to 100%). Aggmax<sub>norm</sub>: normalized maximal aggregation, Agglate<sub>norm</sub>: normalized 6-minute late aggregation; disAGG<sub>norm</sub>: normalized disaggregation, AUC<sub>norm</sub>: normalized area under the light transmission curve.

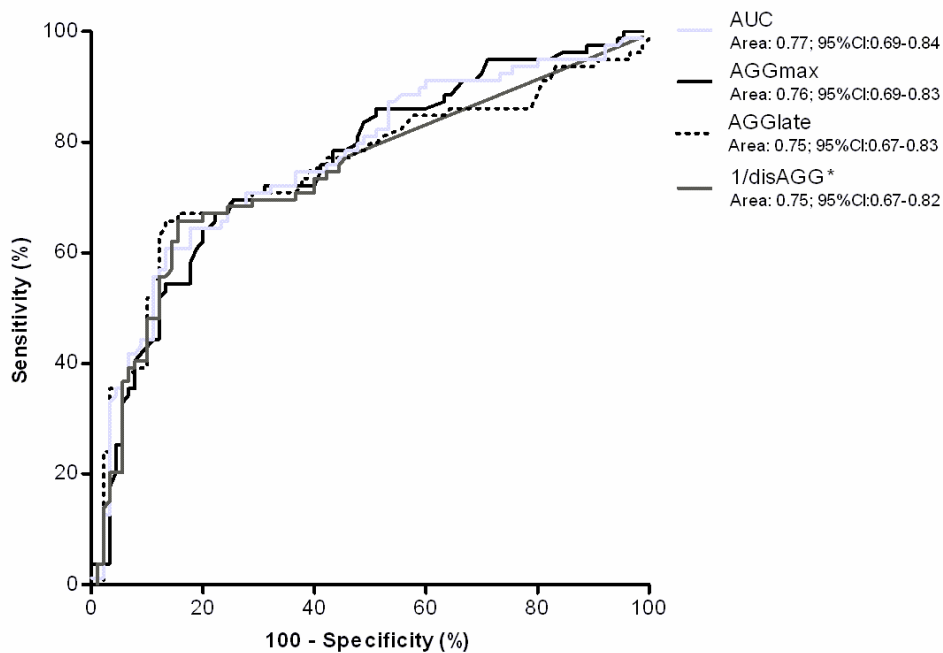


Figure 3. Receiver-operator characteristic (ROC) curve analysis of the ability of light transmission aggregation values to predict high platelet reactivity defined by VASP-PRI > 50%. The area under the ROC curve is shown with the 95% confidence intervals. AUC: area under the light transmission curve; Aggmax: maximal aggregation; Agglate: 6-minute late aggregation; disAGG: disaggregation.

\*1/disAGG: as disaggregation is in inverse correlation to VASP-PRI, its reciprocal was used for better comparability with other parameters.

## Discussion

Our results confirm that all LTA estimates are in significant, moderate-strength relationship with VASP-PRI without the superiority of Agglate over Aggmax, AUC or disAGG in monitoring the degree of P2Y12-receptor inhibition. According to the highest correlation coefficient and the result of the multivariable linear regression analysis, not Agglate, but AUC seems to be the best linear predictor of VASP-PRI. The significant correlation also validates LTA assessment for monitoring the efficacy of thienopyridine therapy and is in line with prior studies that had compared VASP with LTA. (20)

Bland-Altman plots were useful to confirm that in spite of the significant correlation there might be substantial differences in certain individuals between VASP and LTA-defined platelet reactivity. Based on these, Agglate, disAGG and AUC are systematically underestimating VASP-defined platelet reactivity in the low platelet reactivity range (markedly below 50% platelet reactivity). The observed magnitude of differences between VASP-PRI and LTA estimates emphasize that two methods are closely related, but are not able to substitute for each other.

### ***2. The efficacy of thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation***

## **Background**

At present, antiplatelet agents are used in uniform, fixed-dose manner despite the growing body of evidence supporting large inter-individual variability in response to both aspirin and clopidogrel. (20, 45) Inter-individual differences indicate that a substantial number of patients after coronary intervention persist with high platelet reactivity despite aspirin and thienopyridine treatment. It is still debated whether low response to therapy and consequential high platelet reactivity is associated with adverse thrombotic events. Moreover, no consensus exists on defining the threshold for low response to therapy; however, this threshold should be clinically adjusted.

## **Objective**

We designed a prospective study to evaluate the clinical impact of inter-individual differences in response to antiplatelet therapy. We hypothesized that low platelet reactivity measured with light transmission aggregometry after PCI was associated with a better 10-month clinical outcome.

## **Methods**

### **Study Population**

A total number of 134 eligible patients after elective PCI were recruited. Patients were considered eligible for enrolment into the study if they had clinically proven stable or unstable angina, had de novo lesion in one of the main coronary arteries causing a diameter stenosis over 50%, were feasible to direct stent implantation, were at least 18 years, and provided informed consent before enrolment. Exclusion criteria included contraindications to any antiplatelet/antithrombotic agents, haematological disorders and coagulopathies, 2 or 3 vessel disease with an indication for coronary artery bypass grafting, recent myocardial infarction (within 72 hours), poor left ventricle function (ejection fraction below 25%), history of stroke in the past 6 months and any other known disorder that may significantly influence survival (malignancy, serious liver disease, immunosuppressed conditions).

Antiplatelet agents were given in an oral bolus at the time of the procedure, 300 mg clopidogrel or 500 mg ticlopidine with 300 mg aspirin at the discretion of the operator. No platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker was used. After PCI, 75 mg clopidogrel or 2x250 mg ticlopidine were administered with 100 mg enteric-coated aspirin therapy until 12 months.

### **Platelet Function Analysis**

Platelet aggregation studies were performed 30 ±5 days after the intervention with LTA. Efficacy of thienopyridine therapy was measured with ADP 5 and 10 µM, while efficacy of aspirin treatment was evaluated with collagen 2 µg/mL and adrenaline 10 µM. At the same time, 5 ml blood was drawn for assessment of plasma concentration of soluble markers of platelet activation including soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1), soluble

CD40 ligand (sCD40L) and soluble P-selectin (sP-selectin) using Human Cardiovascular Multiplex Fluorescent Bead Immunoassay (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria).

## Results

Between May 2003 and January 2005, 134 patients were enrolled. After the intended follow-up period of 10 months, 33 major adverse cardiac events (MACE) were traced (Table 1). Adverse events developed  $151 \pm 111$  days after the index intervention, with 2 end points occurring within the first one month. These patients had subacute stent thrombosis on day 7 and 13. No cardiac or non-cardiac deaths were recorded, and 33 revascularizations were performed, including 10 CABG and 23 repeated PCIs. We registered 3 cases of MIs that were reperfused with primary PCI. Two of them were due to subacute stent thrombosis, whereas one de novo lesion triggered an athero-thrombotic event. On the basis of the control coronary angiographies, we found 27 cases of significant instent restenosis (ISR).

Based on the LTA measurements, there were large inter-individual differences in platelet reactivity in case of all agonist-stimulation. The distribution of ADP-induced maximal aggregation values shown a Gaussian pattern, whereas adrenaline-induced reactivity showed a detached group of nonresponders delineated. (Figure 4)

Table 1. Major adverse cardiac events (MACE) at 10 months in 134 patients after PCI

Death	0 (0%)
Myocardial Infarction	3 (2.2%)
Revascularisation	33 (24.6%)
Revascularisation with PCI	23 (17.1%)
Revascularisation with CABG	10 (7.5%)
Death or Myocardial infarction or revascularisation (1 <sup>o</sup> endpoint)	33 (24.6%)
Instent Restenosis	27 (20.1%)
Stent Thrombosis	2 (1.5%)
De Novo Lesion	5 (3.7%)

Maximal platelet aggregation values to ADP 5 and 10  $\mu$ M were in significant relation with MACE in the univariate Cox regression model ( $p < 0.01$  in both cases), indicating better survival in case of more effective inhibition. In Kaplan-Meier analysis, cumulative event-free survival of patients in the lower 50 percentile of ADP-induced platelet aggregation was significantly better than that of patients in the upper 50 percentile. (Figure 5A) Overall, patients in the higher 50% of ADP-aggregation had a 6.84-fold HR for MACE (95%CI: 2.64-17.72,  $p < 0.001$ ). In case of collagen 2  $\mu$ g/mL and adrenaline 10  $\mu$ M, no association was detected with primary outcome ( $p = 0.84$  and  $p = 0.76$ , respectively).

The plasma level of soluble P-selectin was also associated with MACE ( $p < 0.05$ ) in the univariate COX-regression model. This benefit was also demonstrated in the Kaplan-Meier log-rank test as well. (Figure 5B). Neither sVCAM-1 nor sCD40L had association with MACE in the Cox regression analysis.

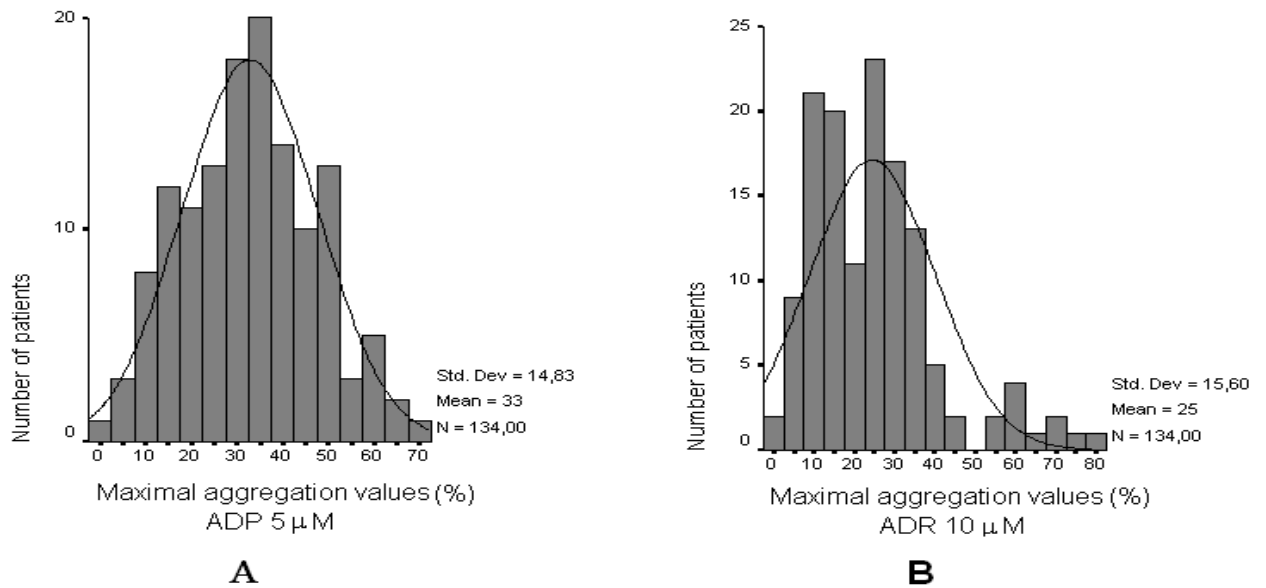


Figure 4. Distribution of maximal platelet aggregation (Aggmax) values using adenosine diphosphate 5 μM (ADP; Panel A) and adrenaline 10 μM (ADR; Panel B) reflecting the efficacy of thienopyridine and aspirin therapy, respectively. On-clopidogrel ADP-reactivity shows a normal distribution pattern (Panel A), while in case of aspirin patients with decreased efficacy constitute a segregated group above 50% of Aggmax values.

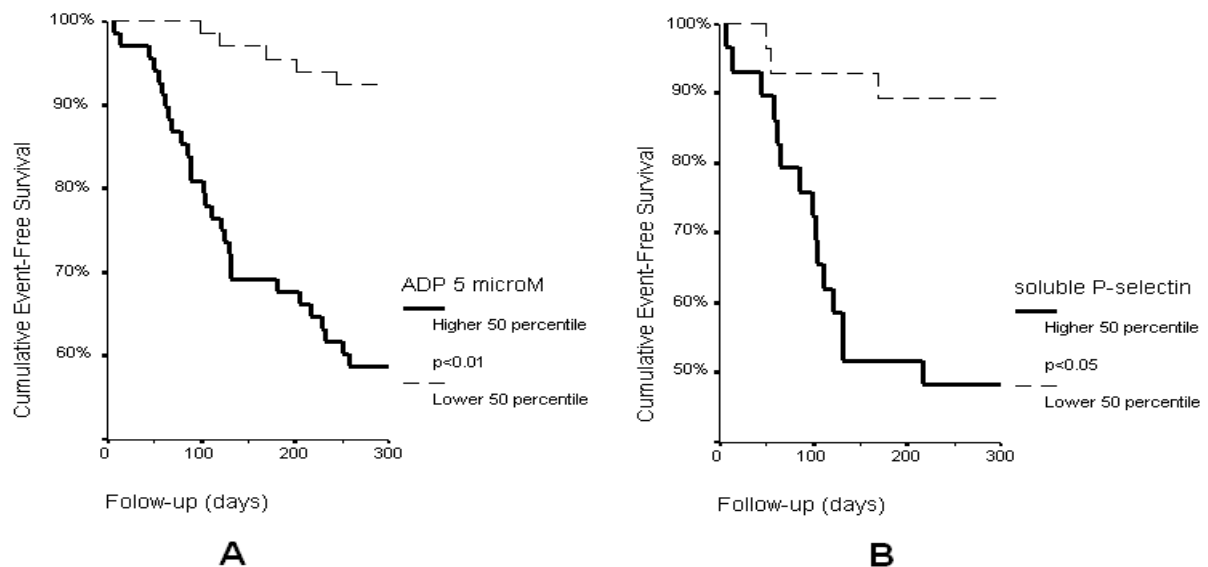


Figure 5. Kaplan-Meier diagrams of the cumulative event-free survival of patients after coronary stent implantation. Panel A: lower and higher 50 percentiles of maximal platelet aggregation values using ADP 5μM (log-rank test:  $p < 0.01$ ). Panel B: lower and higher 50 percentiles of plasma level of soluble P-selectin (log-rank test:  $p < 0.05$ ).

## Discussion

The major finding of this study is that LTA-monitored on-clopidogrel ADP-reactivity is in significant relation with the occurrence of major adverse cardiac events after PCI, showing clinical benefit in patients with more effective ADP-receptor inhibition. As sP-selectin is also a sensitive marker of platelet activation, the relation between plasma levels and MACE

supports independently that the degree of platelet activation may interfere with clinical outcome. Notably, the efficacy of aspirin therapy assessed with collagen and adrenalin had no association with the primary endpoint. Notably, the composite end point of death, MI or repeat revascularization was dominantly triggered by instent restenosis (ISR) rather than thrombotic events. Thereby, somewhat link between platelet reactivity and ISR should be hypothesized. These results suggest that the more effective the thienopyridine therapy, the less frequent the need for repeat revascularization. As neither the design, nor the sample size of the study was powered to evaluate this hypothesis, further research is needed to clarify the link between high platelet reactivity and ISR.

### ***3. The impact of diabetes mellitus on the efficacy of combined antiplatelet therapy after coronary stent implantation***

#### **Background**

Aspirin plus thienopyridine therapy is one of the foot-stones of clinical success after coronary stent implantation. (18, 19) However, impaired response to aspirin and/or thienopyridines has been demonstrated and may contribute to the development of major adverse cardiac events. Several factors might contribute to the inappropriate response to clopidogrel: genetic polymorphism of the metabolizing enzymes (CYP2C19); clinical conditions (acute coronary syndrome) and low patient compliance. (60) Many reports have suggested an impaired antiplatelet efficacy in diabetic patients that might contribute to the higher risk of this subset.

#### **Objectives**

We sought to evaluate the impact of type two diabetes mellitus (DM) on the efficacy of antiplatelet therapy in patients after coronary stent implantation.

#### **Methods**

With a retrospective search in our LTA database in patients after PCI, we collected diabetic (DM) and matching, (according to age, gender, risk profile, stent type and antiplatelet regimen) non-diabetic (ND) control subjects in order to compare their efficacy of antiplatelet therapy. Among diabetics, we differentiated oral antidiabetic- (OAD) and insulin-treated (INS) groups in whom fasting plasma glucose was also measured after stent implantation.

Blood was drawn for LTA assessment >6 hours of PCI, after receiving a 600-mg loading dose of clopidogrel and 300 mg aspirin. 1x75 mg clopidogrel and 1x100 mg aspirin was administered in the maintenance phase of treatment. ADP 5 and 10  $\mu$ M-induced maximal aggregation values (Aggmax) were used to refer for efficacy of thienopyridine therapy, while collagen 2  $\mu$ g/ml and adrenaline 10  $\mu$ M stimuli reflected the potency of aspirin treatment. The primary endpoint of the study was the difference in Aggmax values between ND and DM groups. Secondary analyses focused on Aggmax values in diabetic subgroups and correlation of actual fasting glucose to Aggmax.

## Results

We found 79 type II diabetic patients for evaluation in the database and matched them with 81 control subjects. Clinical characteristics between diabetic and non-diabetic groups were similar. Among the 79 DM patients, 56 (71%) were on oral glucose-lowering therapy and 23 (29%) received insulin treatment. On the basis of the LTA measurements, ADP-induced Aggmax values did not differ significantly between the DM and ND group (ADP 5  $\mu$ M:  $P=0.32$ ; ADP 10  $\mu$ M:  $P=0.47$ ). In diabetic patients, Aggmax values of the OAD group were lower than that of the INS group, however, the difference did not reach the level of significance (ADP 5  $\mu$ M:  $P=0.07$ ; ADP 10  $\mu$ M:  $P=0.06$ ). Meanwhile, efficacy of thienopyridine therapy showed significant difference between INS and ND patients (ADP 5  $\mu$ M and ADP 10  $\mu$ M:  $p<0.05$ ). (Figure 6A, C and E) Using our previous results for the definition of high platelet reactivity (HPR: Aggmax>33%), insulin-treated patients had an OR of 2.46 (95%CI: 0.95-6.36,  $p<0.05$ ) for HPR compared to non-diabetics. (59)

We found no relevant differences in efficacy of aspirin therapy in group comparisons according to adrenalin and collagen-stimulated measurements. (Figure 6B, D and F) Notably, the level of fasting glucose did not correlate with Aggmax values (Spearman  $r=0.13$ ,  $p=0.32$ ).

## Discussion

In this study, we demonstrated that patients with insulin-treated DM have impaired response to clopidogrel. Insulin has specific effects on platelets, as insulin receptor complex is expressed on the platelet surface. Insulin mediates inhibition of platelet activation through inactivating the  $G_{i\alpha}$ -protein that leads to an increase in cAMP formation in the platelet. Rise in cyclic AMP levels results in phosphorylation of intracellular proteins that prohibit platelet activation. In diabetic subjects, insulin-resistance has a major impact in the development of multi-organ damage. Ferreira et. al demonstrated that antiplatelet effects of insulin are diminished in diabetic patients that leads to higher platelet reactivity. (62) Moreover, endothelial dysfunction with lower prostacyclin production might also contribute to HPR in diabetics. As both insulin and ADP-receptor converge to  $G_{i\alpha}$ -protein, diminishment of  $G_i$  inhibition in diabetics might explain the excess activity of ADP-receptor, with consequently lower response to clopidogrel. (63)

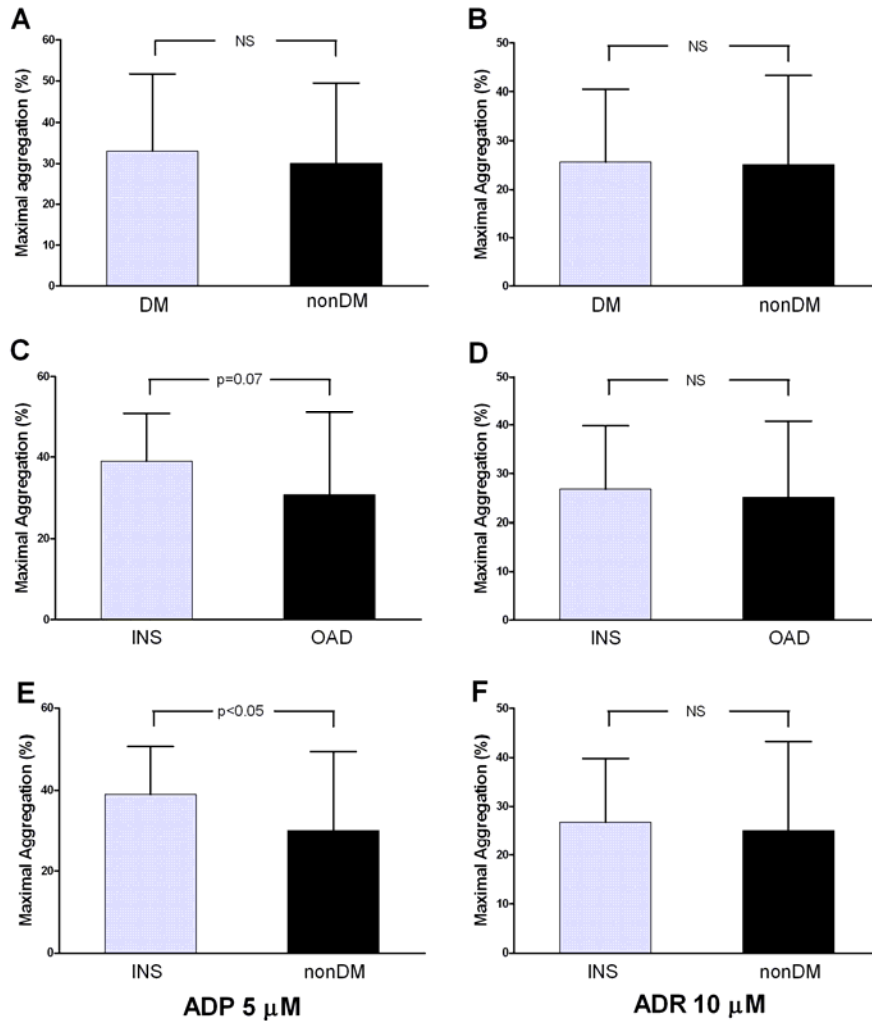


Figure 6. Inter-group comparisons in maximal aggregation values reflecting the efficacy of clopidogrel (Panel A, C, E using ADP 5  $\mu$ M) and aspirin therapy (Panel B, D, F using adrenalin 10  $\mu$ M). DM: type II. diabetes mellitus, nonDM: non-diabetic patients, INS: insulin-treated diabetes mellitus, OAD: oral glucose-lowering therapy.

#### ***4. Low platelet disaggregation predicts poor response to 150 mg clopidogrel in patients with elevated platelet reactivity***

##### **Introduction**

The response to a fixed-dose clopidogrel is not uniform between patients. Growing body of evidence suggests that low response to clopidogrel and consequential high platelet reactivity (HPPR) is associated with adverse thrombo-ischemic events. In a prospective cohort of 134 patients we found that patients with Aggmax values  $>33\%$  had a 6.84-fold HR for MACE (95CI: 2.64-17.72,  $p<0.001$ ) compared to those with  $\leq 33\%$ . (59) Recently, numerous antiplatelet protocols were tested in order to overcome elevated platelet reactivity. (64-69) Doubling the maintenance dose of clopidogrel after PCI is a promising option and has been recommended in patients in whom less than 50% of platelet inhibition is demonstrated. (18)



Importantly, all of the studies that evaluated the biological effect of 150 mg clopidogrel described large inter-individual differences in the extent of the benefit, indicating that there are patients who profited from dose-shift while others persisted with EPR. As the latter might remain at higher risk for adverse outcome, identification of variables that predict the response to 150 mg clopidogrel is awaited.

## **Objective**

The main aim of this study was to investigate the pharmacological benefits of administering a high maintenance dose (150 mg) of clopidogrel as compared to standard therapy (75 mg) in patients with verified HPPR after 600-mg loading dose. Furthermore, we sought to analyze possible determinants of response to 150 mg clopidogrel.

## **Methods**

### Patients and study design

We aimed to recruit three patient populations to compare their efficacy of clopidogrel treatment at two separate time points after PCI: a group of good responders receiving 75 mg clopidogrel (no HPPR), a group of patients with HPPR taking 75 mg (HPPR+75 mg) and a group of HPPR subjects with increased maintenance dose of clopidogrel (HPPR+150 mg). Clopidogrel-naïve patients who underwent PCI with stent implantation after the administration of 600 mg loading dose (LD) of clopidogrel were eligible. Both stable angina and acute coronary syndrome patients were enrolled. Exclusion criteria included recent (<7 days) treatment with thienopyridines, administration of GPIIb/IIIa inhibitors, concomitant anticoagulant therapy, recent (<6 months) hemorrhagic stroke, intolerance to clopidogrel/aspirin and low platelet count (<100 x10<sup>9</sup>/L).

## **Results**

### Platelet function assessment

The study cohort comprised 287 patients after PCI. 85 patients with verified baseline HPPR received 150 mg maintenance dose until 30 days of PCI (HPPR + 150 mg), 85 patients with HPPR were administered the standard 75 mg clopidogrel (HPPR + 75 mg) and 117 good responder ones (no HPPR) received 75 mg clopidogrel daily after coronary stent implantation. At baseline, after the loading dose of 600 mg clopidogrel there were no difference in Aggmax between the groups of HPPR. (Figure 7) The administration of 150 mg clopidogrel resulted in significantly lower Aggmax at time point 2 compared to 75 mg in patients with high post-treatment platelet reactivity supporting the enhanced P2Y<sub>12</sub> receptor inhibition due to higher dose of clopidogrel. In parallel, the relative percentage of HPPR patients decreased significantly with the high maintenance dose. Despite administering 150 mg clopidogrel, neither Aggmax nor the prevalence of HPPR patients reached that of good responders.

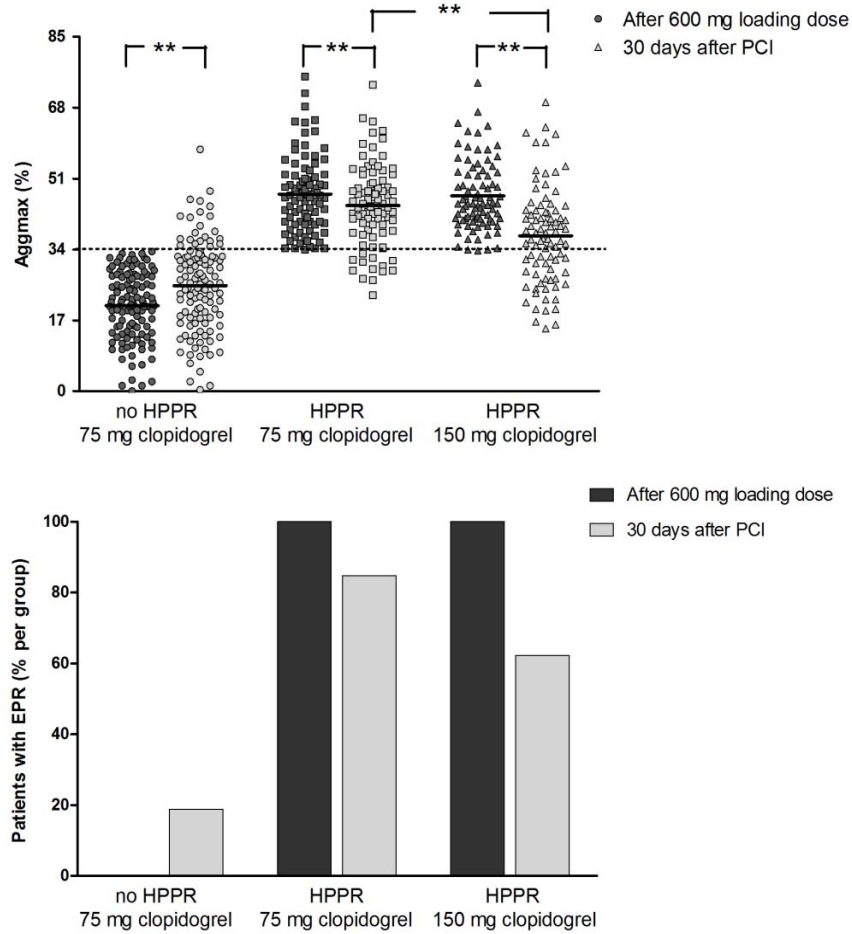


Figure 7. Comparison of platelet function profiles at baseline and on maintenance phase assessed with light transmission aggregometer in patients with good response to clopidogrel (no HPPR), in patients with high post-clopidogrel platelet reactivity receiving 75 mg maintenance dose (HPPR + 75 mg) and in patients with high post-clopidogrel platelet reactivity taking 150 mg clopidogrel (HPPR + 150 mg). Panel A shows group comparison according to  $Agg_{max}$  where dots represent individual data along with the median in each group. The dotted line indicates the cutoff limit for HPPR. (\*:  $p < 0.01$ ; \*\*:  $p < 0.001$ ; LD: loading dose). Panel B presents the relative percentage of patients with high residual platelet reactivity (HPPR) in study groups between time points.

### Determinants of response to 150 mg maintenance dose

To determine variables that significantly correlate to  $Agg_{max}$  at maintenance phase, linear regression models were generated including estimates of the aggregation curve ( $Agg_{max}$ ,  $Agg_{late}$ ,  $disAgg$ , Figure 3, 4) as well as clinical/procedural variables. In univariate linear regression models, baseline  $Agg_{max}$ ,  $Agg_{late}$ ,  $disAgg$ , administration of beta-blockers and CYP3A4-metabolized statins as well as acute coronary syndrome correlated significantly with primary endpoint. Active smoking, drug-eluting stent implantation and proton pump inhibitors also showed a trend ( $p < 0.10$ ) towards. However, in multiple linear regression analysis, disaggregation and acute coronary syndrome prevailed as the independent predictors of maintenance-phase  $Agg_{max}$  values. To corroborate these findings, multivariate logistic regression models were used to calculate odds ratios for HPPR. Without adjustment for confounding clinical and procedural variables, disaggregation (per 1% increase) and acute

coronary syndrome (ACS) were associated with an OR for HPPR of 0.95 (95% CI: 0.92-0.98, p=0.002) and 5.82 (95% CI: 1.94-17.47, p=0.002), respectively. Adjustment for beta-blockers, CYP3A4-metabolized statins and baseline Aggmax resulted in an adjusted OR of 0.96 (95% CI: 0.93-0.99, p=0.009) and 4.83 (95% CI: 1.54-15.09, p=0.008) for disaggregation and ACS, respectively. Likewise, ACS was associated with a 1.7-fold absolute risk of remaining HPPR compared to stable angina following 150 mg clopidogrel. (Table 7)

As the results confirmed that platelet disaggregation predicts the response to 150 mg clopidogrel, the optimal cut-off for predicting normal platelet reactivity (Aggmax<34%) after 150 mg clopidogrel was determined with receiver-operator characteristic (ROC) curve analysis. An area under the curve of 0.724±0.055 (Asymptotic significance: 0.001; 95% Asymptotic Confidence Interval: 0.616-0.833) was obtained and an optimal cutoff value of 16.5% was suggested, with a sensitivity of 94% and a specificity of 43%. Based on these, in HPPR+150 mg group 25 (29.8%) patients were below and 59 (70.2%) above this threshold. Among 25 patients below this cut-off, only 2 patients (8%) achieved a Aggmax value lower than 34% after 150 mg clopidogrel, representing a 92% negative predictive value. Among 59 patients with a disaggregation value higher than 16.5%, 29 (49.2%) showed good response and turned to normal platelet reactivity.

## Discussion

Our results confirm that the administration of a high maintenance dose of clopidogrel enhances platelet inhibition and reduces high post-clopidogrel platelet reactivity (HPPR) in a consecutive cohort of patients after PCI. This impact was characterized by a statistically significant decrease in Aggmax and Agglate values with increased disaggregation levels among patients receiving 150 mg clopidogrel. These results support the pharmacological benefit of administering 150 mg maintenance dose of clopidogrel in patients with HPPR evaluated after a 600-mg LD. However, the antiplatelet efficacy in response to a 150 mg maintenance dose did not reach the level of patients with normal platelet reactivity. Moreover, less than 40% of the patients with HPPR shifted to normal platelet reactivity. This means that there are patients who benefit from dose-shift, while in others, HPPR persists despite 150 mg clopidogrel. These results suggest that dose elevation to 150 mg is not the right answer in many poor responders to clopidogrel. Likewise, elucidating predictors of response to 150 mg clopidogrel might be of great importance. We evaluated possible clinical, procedural and platelet aggregation variables in multivariable models and identified platelet disaggregation and acute coronary syndrome as independent predictors of elevated platelet reactivity after 150 mg clopidogrel. Patients with acute coronary syndrome had a 1.7-fold higher absolute risk to persist with EPR compared to those with stable angina. Likewise, patients with ACS might be candidates for more potent antiplatelet therapy with newer ADP-receptor inhibitors (prasugrel, ticagrelor) being introduced in the following years. Most importantly our study shows that low platelet disaggregation is the strongest independent predictor of poor response to a high maintenance dose of clopidogrel. Based on these results, patients with a low (16.5%) disaggregation do not show substantial pharmacological benefit from an increased maintenance dose of clopidogrel, while half of those with good disaggregation might shift to normal platelet reactivity.

## ***5. Transradial versus transfemoral percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction. Systematic overview and meta-analysis***

### **Introduction**

Transradial coronary angioplasty (TRPCI) has gained widespread acceptance since its introduction by Kiemeneij and Laarman. (71) Radial access has been proven to be a highly safe and effective technique for both diagnostic- and therapeutic procedures. (72, 73) Advantages of the transradial approach over the transfemoral include safe and easy haemostasis due to compressibility of the artery, and consequent lack of need for postprocedural bed rest permitting immediate ambulation, greater comfort, and earlier discharge. These have been shown to reduce the costs of hospitalization and improve quality of life for patients. (74, 75) Although it is technically more challenging, transradial intervention is feasible in the setting of acute coronary syndromes. (76-82) The major advantage of the TRPCI is the near elimination of clinically significant access site complications, even in patients at high risk for bleeding (i.e. patients treated with GP IIb/IIIa inhibitors or shortly after systemic thrombolysis). Bleeding events, and the consequent need for transfusion, are independent determinants of survival in acute coronary syndromes. Their relation to short- and long-term mortality has been demonstrated in major randomized trials as well as through the evaluation of registries. (83-86) Thereby, low incidence of vascular access site bleeding complications suggests that the transradial approach may be a safe alternative to the femoral technique employed in acute myocardial infarction with ST segment elevation (STEMI), particularly when an aggressive anticoagulation- and antiplatelet regimen is applied. On the contrary, the possible greater occurrence of procedural failure and longer procedural times occasioned by difficulty in puncturing the radial artery, inability to cannulate the coronaries, or impossibility to perform the angioplasty, are factors that raise concerns as to whether radial access remains beneficial in the setting where timely reperfusion is critical, in STEMI for instance. The safety of transradial- and transfemoral PCI in AMI were compared in numerous trials; however, most of them included small patient groups. Despite consistent demonstration of lower bleeding rates, only inconclusive results are available regarding recurrent ischemic events; most of these studies were underpowered to evaluate this issue.

### **Objective**

Our aim was to perform a systematic review of the literature comparing the safety and efficacy of the two vascular accesses in STEMI and to complete a meta-analysis in order to achieve greater statistical power and more precise effect estimates.

### **Methods**

#### **Search strategy**

We performed a systematic review of the available literature according to the MOOSE guidelines for the conduct of meta-analyses of observational studies. (87) Relevant studies

published between January 1993 and August 2009 were identified from MEDLINE®, SCOPUS®, the Web of Science® with Conference Proceedings, and the Cochrane Central Register of Controlled trials (CENTRAL) using a search strategy that combined text word and MeSH heading. Search keywords included various combinations of the following terms: “transradial”, “radial access”, “myocardial”, “infarct\*“, and “coronary”. No language restrictions were imposed. Furthermore, we searched reference lists of relevant studies and reading reviews and editorials on this topic. In addition, relevant abstracts and presentations from the annual meetings of the American Heart Association, the American College of Cardiology, the European Society of Cardiology and Transcatheter Cardiovascular Therapeutics were identified.

### Selection criteria

Inclusion criteria for retrieved studies were a) controlled comparison of the radial- versus femoral approach for coronary intervention b) acute myocardial infarction (either primary- or rescue PCI) and c) intention-to-treat analysis. Exclusion criteria were a lack of clear- and reproducible results and incomplete follow-up, and lack of clear distinction of the clinical setting of the patients included (i.e. separate data for the acute- and elective interventions included).

## Results

### Search results and study selection

Our search detected 213 citations. These included editorials, reviews, letters, or articles regarding other aspects of the radial approach. Twelve studies were included in the final analysis. These comprised 5 randomized trials involving 516 patients: 266 of the transradial- and 250 of the transfemoral approaches. (76; 91-94) Seven further reports using the registry approach of single- or dual center experiences of primary TRPCI were identified. These included 2808 cases, made up of 1212 transradial- and 1596 transfemoral interventions. (82; 95-100) All studies were published in peer-reviewed journals.

### Clinical results

The radial approach reduced risk for major bleeding by 70% compared to TFPCI (0.77% vs 2.61%, OR: 0.30 [95% CI: 0.16, 0.55] P=0.0001). Reductions in the composite of death, myocardial infarction, and stroke were also significant (3.65% vs. 6.55%, OR: 0.56 [95% CI: 0.39, 0.79] P = 0.01). Pooling the 29 events (2.59%) of 1421 TRPCI and 55 (3.18%) of 1800 TFPCI demonstrated a significant mortality reduction in the case of TRPCI. (OR: 0.54 [95% CI: 0.33, 0.86] P=0.01). There were no differences in procedural time and in time to reperfusion between the two access routes. Fluoroscopic times were longer in case of TRPCI; however, there was significant heterogeneity among studies in these parameters. Access site crossover was less frequent in the case of the transfemoral approach while the total hospital charge, assessed in eight studies was lower in the case of the transradial.

## Discussion

The current meta-analysis of the literature demonstrated that transradial coronary intervention improves clinical outcomes by reducing major bleeding and postprocedural ischemic complications in patients with acute myocardial infarction. Thereby, this access site might maximize the benefits and reduce the potential harm of the aggressive antiplatelet and anticoagulant therapy required among these patients.

## **Novel findings**

Based on the results of the cited experiments and studies, our major novel findings can be summarized as follows:

- Results of our measurements with light transmission aggregometry confirmed that the response to a fixed-dose aspirin and thienopyridines are not uniform between patients. While the response to aspirin follows a bimodal, yes-or-no distribution, the efficacy of thienopyridine therapy is normally distributed. Likewise, it is rationale to use the term “aspirin resistance” based on laboratory assessments; however, the term “high-post treatment platelet reactivity” (HPPR) is more appropriate compared to “clopidogrel resistance” in case of thienopyridines as the measured effect (P2Y12 receptor inhibition and ADP-reactivity) seems dose-dependent.
- The significant correlation with VASP validates LTA for monitoring the efficacy of P2Y12 receptor inhibition; however, there might be clinically meaningful differences in the results in certain individuals. Indeed, 6-minute late aggregation is not superior to other estimates of LTA in monitoring the efficacy of P2Y12-receptor inhibition.
- Low response to clopidogrel and high post-clopidogrel platelet reactivity is associated with a higher risk of recurrent ischemic events in low-risk patients after percutaneous coronary interventions. Patients above the median value of maximal aggregation (>33%) had a 6.8-fold HR to MACE.
- Doubling the maintenance dose of clopidogrel to 150 mg intensifies the efficacy of clopidogrel therapy in patients with high platelet reactivity. However, less than 40% of the patients with HPPR might return to normal platelet reactivity. Low platelet disaggregation and acute coronary syndrome are independent predictors of poor response to 150 mg clopidogrel.
- In patients with AMI receiving dual or triple antiplatelet therapy, using radial artery as an access site to perform primary PCI not only reduces access site complications and major bleeding but also major adverse cardiac events and mortality.

## **Conclusions and perspective**

We started our examinations in an era when only limited evidence were available on the rationale and consequences of monitoring the efficacy of antiplatelet therapy in patients after

percutaneous coronary intervention. At that time, “aspirin resistance” was a popular and well-known term among clinicians; however, due to heterogenic definitions and non-standardized laboratory assessments, the range of aspirin resistance varied largely between authors. (43) One should be aware that the wide range of the prevalence of aspirin resistance cannot be explained by the different risk profile of the patient groups. It should be attributed to the arbitrary-used definitions and non-specific laboratory tests that might have lead to both over- and underestimation of the true incidence of aspirin resistance in many examinations.

As landmark studies demonstrated a significant clinical benefit of adding thienopyridines to aspirin monotherapy after coronary stent implantation, dual antiplatelet therapy became gold-standard in patients after PCI. (5-8) Knowing that clopidogrel has less haematological side-effects than ticlopidine, the former has become the thienopyridine of choice.

As thrombotic events still occurred in spite of the dual antiplatelet therapy, extensive research started to explore the individual response to thienopyridines. Early studies demonstrated large inter-individual differences in response to a fix-dose clopidogrel, and similar to aspirin, the term “clopidogrel resistance” was created and widely applied to refer for patients with inappropriate response. (45-47) However, compared to aspirin, there are major differences in testing the response to clopidogrel therapy. Clopidogrel is a platelet surface receptor blocker while aspirin is an intracellular enzyme inhibitor. Using a specific agonist (ADP) for testing aggregation is reliable in reflecting the inhibition of the P2Y<sub>12</sub> receptor. Though our results showed that ADP-stimulated LTA is not fully P2Y<sub>12</sub>-specific as it was also influenced by P2Y<sub>1</sub>-receptor activation, all aggregation values were in significant correlation with VASP-PRI. In contrast, the recently available assays to measure the efficacy of aspirin (urinary thromboxane and serum thromboxane levels, PFA-100 collagene-epinephrine closure time, LTA with arachidonic acid, adrenalin or collagen stimuli) are varying largely in determining the prevalence of aspirin resistance and correlating poorly amongst themselves making it difficult to compare and impossible to interpret their results. (40) These facts emphasize that not all methods are equal in estimating antiplatelet response and there are substantial differences in the reliability between assays in monitoring the efficacy of aspirin and clopidogrel treatment. (44) Based on our results, the CARAT TX4 aggregometer with ADP 5  $\mu$ M stimuli shows fair correlation to VASP measurements in monitoring the efficacy of clopidogrel therapy. Without doubting its shortcomings, LTA-assessment is a validated and valuable tool for testing clopidogrel’s response.

By measuring the efficacy of antiplatelet therapy in patients after PCI, we found that the distribution of clopidogrel response follows a normal, Gaussian distribution pattern. This is in line with the findings of several other studies and it is not considered as a laboratory artefact. (42, 45) This distribution pattern is quite frequent in processes that are under both environmental and polygenetic control. Clopidogrel is a prodrug that needs to be metabolized into a thiol derivate to inhibit P2Y<sub>12</sub> ADP receptor. (20) However, more than two thirds of the absorbed clopidogrel is converted into a pharmacologically inactive carboxyl metabolite by blood esterases, whereas only a small proportion might be metabolized into an active derivate through the cytochrome enzyme system (CYP2C19, 2C9, 3A4, 3A5, 1A2, 2B6). Importantly, the loss-of-function alleles (\*2, \*3, \*4) of the CYP2C19 enzyme, that plays a pivotal role in the bioactivation process is very frequent in the Caucasian population (22) Moreover, the absorption of clopidogrel might also differ between patients according to the

genetic polymorphisms of the P-glycoprotein. (104) Clinical factors like diabetes, acute coronary syndrome and renal insufficiency might also impair the efficacy of clopidogrel therapy. (61) As a result, high post-clopidogrel platelet reactivity (HPPR) persists in a substantial proportion of patients despite receiving the recommended dose of clopidogrel. As the distribution of platelet aggregation values and VASP-PRI is normal, the term “elevated or high platelet reactivity” is more appropriate than “clopidogrel resistance” as the effect seems dose dependent. (105)

Growing body of evidence shows that high platelet reactivity is a risk marker for recurrent thrombo-ischemic events after PCI. (48-55) In our study recruiting 134 patients, ADP-stimulated Aggmax values were significantly associated with clinical outcome. Dividing patients into quartiles according their Aggmax values showed that those in the two higher quartiles had a 6.8-fold risk to MACE compared to those in the two lower ones. (59) The worse prognosis of patients in the two higher quartiles of residual platelet aggregation values was independently demonstrated by the EXCELSIOR study in 802 patients. They registered a 6.7-fold higher risk for death, MI or urgent TLR among patients above the median value of platelet aggregation. (50) A meta-analysis also confirmed the prognostic significance of high platelet reactivity in patients after PCI. (54) Despite these results, it is unclear whether high platelet reactivity is a marker for worse prognosis (risk marker) or a modifiable parameter (risk factor). It would be of enormous importance to know whether patients with HPPR might return to normal platelet reactivity with alternative antiplatelet strategies. Results of a recent work of Bonello et al. confirmed that in patients with high platelet reactivity, repeated loading doses of 600 mg clopidogrel were able to override low response to clopidogrel in the majority of patients. (58) However, findings of other studies suggest that returning to the standard dose of clopidogrel in these patients resumes high platelet reactivity. (68) In case of the maintenance-phase treatment, there are a few studies that have demonstrated the pharmacological benefit of doubling the maintenance dose of clopidogrel. (64-69) Our results supported that giving 150 mg clopidogrel for patients with HPPR enhanced platelet inhibition. Notably, the degree of platelet reactivity after 150 mg clopidogrel did not reach that of good responders and less than 40% of the patients returned to normal platelet reactivity with the elevated maintenance dose. Analyzing possible determinants of response to 150 mg clopidogrel revealed platelet disaggregation and acute coronary syndrome as independent predictors of poor response. Acute coronary syndrome was associated with a 1.7-fold, while low disaggregation with a 6.1-fold absolute risk for persisting with HPPR after 150 mg clopidogrel. Low disaggregation had a 92% negative predicting value emphasizing that these patients are not likely to benefit from dose shift. These results might carry important clinical implications as clinicians might be able to choose optimal candidates for a 150-mg maintenance dose based on the clinical status and the result of a LTA assessment.

Based on these findings, the potency of the platelet inhibition can be influenced by the administered dose of clopidogrel. However, many of the patients with HPPR would require such high loading and maintenance doses to achieve optimal platelet reactivity that are not tolerable and also not financed by our health care system. (70) These individuals might be the candidates for alternative, more potent platelet inhibitors. One of the most important alternatives of clopidogrel is prasugrel that is recently under approval in Hungary. Based on the results of the TRITON-TIMI38 trial, the more potent antiplatelet therapy in ACS was



associated with significantly less myocardial infarctions and stent thromboses. (32) Ticagrelor, a reversible and also potent, direct-acting ADP-receptor antagonist has also demonstrated a 16% reduction in the composite of MI, cardiovascular death and stroke in the PLATO trial. (33)

Notably, the administration of prasugrel increased bleeding complications including spontaneous, fatal bleeds highlighting that the uniformly intensified antiplatelet therapy might do harm to some patients. As bleeding is an equally important predictor of morbidity and mortality as ischemia, preventing bleeding events is of essential importance. (82, 108) Patients admitted to primary PCI due to STEMI represent a high-risk group of both bleeding and ischemia. The double or triple antiplatelet therapies with excessively dosed anticoagulants are important causes of bleeding events among these patients. However, choosing the radial artery as the preferred access site dramatically lowers not only periprocedural bleeding complications but also major adverse cardiac events and mortality. (106) Many operators are fearing to puncture the radial artery for PCI in the setting of AMI, believing that it prolongs the intervention and increases the amount of contrast and radiation exposure. Our meta-analysis confirmed that the major cause of the longer procedural times and the higher radiation exposures is the learning-curve required to master the technique. This aspect was indicated by the significant heterogeneity between the included studies. Based on these results, the radial approach is also a way to maximize the benefits of an intensified antiplatelet therapy in the peri-interventional period of primary PCI.

Concluding these findings, there is a great need for an individualized antiplatelet therapy for patients in order to maximize the anti-ischemic benefits and minimize bleeding risk. Beyond clinical presentation and the genetic constellation, platelet function testing might help to find a therapeutic window for each antiplatelet agent. The novel, more potent antiplatelet agents will be essential tools to customize antiplatelet therapy to the patient's needs as suboptimal response to clopidogrel is common. The clinical relevance of an individualized antiplatelet regimen needs to be tested and supported in further clinical trials.

## **Acknowledgements**

Firstly, I would gratefully appreciate the support, enthusiasm and assistance of my tutor, Dr. András Komócsi who enabled to progress and tackle difficulties during the whole scientific period. I should also thank Dr. Iván Horváth, head of the Interventional Cardiology Department to give the clinical aspects for the entire scientific fellowship. The Author also acknowledges everyone that contributed to the design, development and assessment of both clinical and laboratory experiments, data collection and analyses that gave the basis of this thesis. Namely, Dr. Tamás Magyarlaki, Dr. Margit Tóké-Füzesi and Dr. László Pálincás should be commended for the help given in flow cytometric measurements and Tünde Puskás for the assistance in platelet function testing.

A trombocita aggregáció gátló kezelés monitorozásának  
klinikai relevanciái perkután koronária intervención  
átesett betegek körében

Ph. D. Tézis

írta: Dr. Aradi Dániel

Témavezető:  
Dr. Komócsi András PhD

Programvezető:  
Prof. Dr. Róth Erzsébet PhD

Pécsi Tudományegyetem  
Klinikai Központ, Orvostudományi Kar  
Szívgyógyászati Klinika  
Intervencionális Kardiológia Osztály

2009

## Bevezetés

A perkután koronária intervenció (PCI) elterjedése áttörést jelentett az iszkémiás szívbetegség eredményes kezelésében. Andreas Grüntzig 1977-es úttörő kísérletét követően több mint 10000 szívbetegét kezelünk eredményesen évente ezzel a technikával Magyarországon. A minimál invazív technológia számos előnyét kihasználva jelentős technológiai és farmakológiai fejlődésnek lehettünk szemtanúi az elmúlt évtizedben, melyek tovább növelték a PCI hozzáférhetőségét és eredményességét. Ennek révén a korábban egyeduralkodóan alkalmazott ballonkatéteres tágítást fokozatosan a stent implantáció váltotta fel, mely csökkentette mind az akut (disszekció, akut érokklúzió) mind a krónikus szövődmények megjelenését. (1,2) Bár a stent alkalmazása jelentősen javította a PCI sikerarányát, a beavatkozásnak jelenleg is vannak lényeges rövid, és hosszú-távú korlátai. A stent implantáció sikertelenségének fő okai a stent trombózis (ST) és az instent resztenózis (ISR), melyek a tágított szakasz ismételt beszűkülését vagy elzáródását okozhatják.

### Stent trombózis

A stent trombózis egy akutan bekövetkező, gyors és többnyire teljes stent-elzáródáshoz vezető folyamat, mely gyakran magas mortalitású szívinfarktusként jelenik meg. A *de novo* atero-trombózishoz hasonlóan a ST is főként aktivált és aggregált trombocitákat tartalmaz, melyet az aktiválódó koagulációs kaszkád fibrin-szállai stabilizálnak. Jelenlegi felfogásunk szerint a ST multi-faktoriális hátterű, melyben a beavatkozás körülményei (alulméretezett, rossz pozícióban lévő stentek, hosszú stentelt szakasz, széli disszekció), a beteg klinikai paraméterei (alacsony szisztolés baltamra funkció, akut koronária szindróma, csökkent vesefunkció, cukorbetegség) és hemorreológiai tényezők (trombocita aggregáció gátló kezelés korai felfüggesztése, aszpirin/clopidogrel rezisztencia) egyaránt szerepet játszanak. (4) A korábban alkalmazott aszpirin monoterápia, illetve az aszpirin mellett alkalmazott antikoaguláns kezeléshez képest a kombinált trombocita aggregáció gátló kezelés bevezetése jelentősen csökkentette a ST előfordulását. (5-8) Így a trombocita aktiváció és aggregáció megfelelő gátlása kulcsszerepet játszik a recidív trombótikus események kivédésében. Bár a ST előfordulása relatíve alacsony, a pontos incidencia jelentősen eltért egyes klinikai vizsgálatok és regiszterek között; melynek egyik fő oka a heterogén, néha önkényesen kialakított ST definíciók használata volt. A nomenklatúra egységesítése érdekében az Academic Research Consortium (ARC) egységesített definíciókat alkotott, melyben a ST valószínűsége és az azt alátámasztó bizonyíték minősége alapján klasszifikáltak. A Glasgow-klasszifikációként is ismert kritérium-rendszer három fő ST kategóriát határozott meg (ARC I: biztos; ARC II: valószínű; ARC III: lehetséges). A ST ugyancsak felosztható a stent okklúzió PCI-hez képesti megjelenése alapján (akut-szubakut-késői-igen késői). Az ARC kritériumok alapján meghatározott biztos ST egy éves valószínűsége körülbelül 0,5-1,5% közötti, a biztos/valószínű ST aránya 2-4% körüli. (9,10)

## **Instent restenosis**

Az instent restenosis egy krónikus folyamat, mely fokozatosan és progresszíven beszűkíti a stentelt szakasz átmérőjét. A ST-hoz hasonlóan az ISR is multi-faktoriális eredetű, melyben a beavatkozás körülményei (alulméretezett, rossz pozícióban lévő stent, hosszú stentelt szakasz, kis stent átmérő) és a beteg klinikai tulajdonságai (diabétesz, akut koronária szindróma, gyulladós betegségek) egyaránt szerepet játszanak. A normális endotelizációs folyamathoz képest ISR során a stent körüli érszakasz simaizom- és endotelsejtjei túlzott burjánzást mutatnak, mely egy heges, tömött neointimális réteg képződéséhez vezet a stenten belül. (13,14) Az esetek döntő többségében a restenosis a stent implantációt követő első évben jelentkezik, visszatérő stabil angina pectoris klinikai képében. Az esetek 2-3%-ban azonban a folyamat miokardiális infarktushoz vezet a kritikus szűkület vagy elzáródás miatt. (15) Újabban a fokozott trombocita aktiváció szerepét is felvetik a folyamat létrejöttében, hangsúlyozva, hogy az aktivált trombociták a fehérvérsejt toborzó hatásuk és az általuk szekretált növekedési faktorok (PDGF) révén jelentősen fokozhatják a neointimális szövet burjánzását. (13) Az utóbbi években a gyógyszerkibocsátó stentek (DES) megjelenése áttörést hozott az ISR kezelésében, mivel a korábbi csupasz fémstentekkel (BMS) észlelt 20-40%-os restenosis-arányt 10% alá csökkentették. (9, 10) Ugyanakkor a stentek felületéről eluált citosztatikus/citotoxicus vegyületek nem csak a restenosis kialakulását gátolják, de a normális endotelizációs folyamatot is jelentősen lelassítják. Emiatt a DES beültetés után a stent trombózis veszélye hosszabb ideig fennállhat, ami kiemelt fontosságot ad a megfelelő hosszúságú és hatékonyságú trombocita aggregáció gátló kezelésnek. Megjegyzendő továbbá, hogy az első generációs DES-ek a célér revaszkularizáció (TLR) szükségességének drámai csökkentése mellett a kemény klinikai végpontokban (halál, miokardiális infarktus) nem mutattak előnyt a BMS-hez képest. A magas ár egy további fontos tényező, mely hozzáférhetőségüket limitálja. Fentiek miatt a DES-penetrancia átlagosan 20-25% körüli Magyarországon, ami miatt az ISR egy jelenleg is releváns problémát jelent PCI után.

## **Egyének közötti különbségek a trombocita aggregáció gátló kezelés hatékonyságában**

*Ex vivo/ in vitro* mérési módszerek eredménye alapján az aspirin kezelés ellenére a betegek egy csoportjában a kezeletlen egyénnel azonos trombocita aggregációs értékek mérhetők. Ezt a laboratóriumi módszerekkel elválasztható populációt aspirin-rezisztensként vagy aspirin non-reszponderként kezdte emlegetni a nemzetközi szakirodalom. (40) A klinikai oldalról nézve az is ismert tény, hogy az aspirinnel kezelt betegek egy része a kezelés ellenére ismételt trombótikus eseményt szenved el, melyet terápiás kudarcként jellemezhetünk. Bár az aspirin rezisztencia és a klinikai kezelés kudarca egymással össze nem keverendő – az első egy laboratóriumi módszerrel igazolt jelleg, míg utóbbi egy klinikai diagnózis – az aspirin rezisztensnek talált betegek magasabb kardiovaszkuláris rizikóját több tanulmány is igazolta. (41, 42) Ugyanakkor a mérőmódszerek heterogenitása és a definíciók önkényessége folytán az aspirin rezisztensnek mondott betegek aránya 5 és 65% között változott a közlések szerint; egy meta-analízis eredménye alapján ez átlagosan 28%-ra tehető. (43) Ezek az eredmények jól jelzik, hogy az aspirin-hatékonyságot mérő módszerek között jelentős különbségek vannak, és a nem specifikus tesztek értéke kétséges. (40, 44)

PCI után az aszpirin mellett a clopidogrel alkalmazása jelentősen csökkentette a fő kardiovaszkuláris események kialakulását az aszpirin monoterápiához vagy az aszpirin plusz antikoaguláns kombinációhoz képest. (5-8) Ugyanakkor a kombinált trombocita aggregáció gátló (TAG) kezelés mellett is a betegek egy részében visszatérő trombótikus események jelentkeznek. Emiatt jelentős számú vizsgálat indult annak tisztázására, hogy az aszpirinhez hasonlóan a clopidogrel esetében is észlelhető-e non-reszponzió, rezisztencia. Az első laboratóriumi eredmények a várakozásokat igazolva a clopidogrel esetében is jelentős egyének közötti különbségeket mutattak a hatékonyság tekintetében, emiatt az aszpirinhez hasonlóan a 'clopidogrel-rezisztencia' kifejezés széles körben elterjedt. (45-47) A laboratóriumi jelenségek mögött obszervációs klinikai vizsgálatok sora igazolta, hogy a clopidogrel-rezisztens vagy non-reszponder fenotípus esetében PCI után magasabb trombótikus esemény-rizikóval kell számolni. (48-55) Az klinikai útmutatók szerint a clopidogrel hatékonyságának laboratóriumi mérése azonban csak olyan esetekben megfontolandó, ahol a stent trombózis rizikója valószínűleg fatális kimenetellel járna; ekkor az 50% alatti gátlás észlelése esetén a clopidogrel fenntartó adagja napi 150 mg-ra emelhető. (18) Ennek fő oka az, hogy jelenleg sem az aszpirin, sem a clopidogrel esetében nem rendelkezünk olyan gyors, automatizált, olcsó mérőmódszerrel, melynél a mérési folyamat standardizált, és az aszpirin- vagy clopidogrel-rezisztencia meghatározása pedig prospektív klinikai vizsgálatok eredményén alapul.

## **Célkitűzések**

A vizsgálataink fő célkitűzései az alábbiak szerint foglalhatók össze:

- Az aszpirin és thienopyridine (clopidogrel és ticlopidine) kezelés hatékonyságának meghatározása különböző laboratóriumi módszerekkel PCI-n átesett betegek körében; továbbá a mérőmódszerek összevetése az egyezőség tekintetében
- A TAG kezelésben laboratóriumi módszerekkel észlelt egyének közötti különbségek klinikai relevanciájának meghatározása PCI után
- A II-es típusú diabétesz hatásának elemzése az aszpirin és clopidogrel-kezelés laboratóriumi hatékonyságára
- Clopidogrel nonreszponder betegeknél olyan alternatív terápiai stratégiák hatékonyságának elemzése, mellyel az észlelt non-reszponzió áttörhető
- Az ST-elevációval járó akut koronária szindróma ellátása során a behatolási hely (radiális vs. femorális) prognosztikai szerepének vizsgálata kettős vagy hármas TAG kezelést kapó, magas vérzési rizikójú betegekben

## **Módszerek**

### **Optikai aggregometria**

Trombocita aggregációs méréseinkhez a CARAT TX4 négycsatornás optikai aggregométert alkalmaztuk (Carat Diagnosztika, Budapest, Magyarország). A mérőmódszer egy infravörös fényvel átvilágított közeg optikai denzitását méri. Minél nagyobb a közeg optikai sűrűsége, annál kevesebb fény jut a szenzorra. A mérés során a trombocita-mentes plazma (PPP) szolgál a 100%-os fényáteresztő-képesség beállításához, míg a trombocita-dús plazmával (PRP) a mérés kezdetén a 0%-os szintet kalibráljuk. Ezt követően a specifikus trombocita-agonista (ADP, adrenalin, kollagén) hozzáadásával a PRP-ben meginduló aggregációt a közeg optikai denzitásának csökkenése jelzi, melyet a szenzor dinamikusan érzékel és a módszer egy görbe formájában ábrázol. A thienopyridinek hatékonyságának jellemzésére az 5 vagy 10  $\mu\text{M}$ -os ADP, az aszpirin hatás mérésére a 10  $\mu\text{M}$ -os adrenalin-t és a 2  $\mu\text{g/ml}$ -es kollagént használjuk. A mérési eredmények jellemzésére a maximális aggregációs érték (Aggmax), a 6 perces aggregációs érték (Agglate), a disaggregáció (disAgg) és a görbe alatti terület (AUC) használható.

A módszer olcsó, széles körben elterjedt és elfogadott, alkalmas a különböző agonisták által kiváltott aggregáció szelektív vizsgálatára. Ugyanakkor időigényes, a minta előkészítésére képzett személyzetet igénylő, nem teljes vérből dolgozó, nem standardizált módszer, melynél a szakirodalomban megjelent mérési eredmények nehezen összevethetők és a definíciók nehezen általánosíthatók.

### **Vazodilatátor stimulált foszfoprotein (VASP) foszforiláció mérése**

A P2Y12 ADP-receptort specifikus gátló gyógyszerek (clopidogrel, ticlopidin, prasugrel, ticagrelor) hatékonyságának szelektív jellemzésére kidolgozott flow citometriás módszer. A trombociták felszínén lévő P2Y12-es ADP-receptor komplex egy gátló g-protein (Gi) rendszerhez kapcsolódik, melynek aktivációja során az adenil cikláz enzim gátlása révén csökken az intracelluláris cAMP szint. A cAMP szint csökkenése a protein foszfatázokat aktiválva a VASP nevű szekunder messzendező fehérje defoszforilációját indukálja. Ezzel szemben az ADP receptor blokkoltsága esetén a cAMP szint magas, a VASP foszforilált állapotban van jelen. A trombocitában mérhető foszforilált és defoszforilált VASP aránya (VASP-PRI) tehát jól jellemzi az ADP-receptor aktiváltsági fokát, azaz a gátló szer hatékonyságának szelektív jellemzője. A módszer előnye tehát a P2Y12-receptor specificitás, jó reprodukálhatóság, pontosság. Mivel azonban egy flow citométeres mérésről van szó, rutin klinikai használata nem lehetséges, igen költséges és speciális jártasságú személyzetet igényel.

### **A trombocita aktiváció humorális plazma markerei**

Vizsgálatunkban meghatároztuk olyan trombocita aktivációs markerek plazma szintjét is, melyek a trombocita aktiváció során szekretálódnak a vérbe. A szolubilis P-szelektin (sPselectin), a szolubilis CD40 ligand (CD40L) és a szolubilis vaszkuláris adhéziós molekula

(sVCAM-1) plazma szintjét fluorescens gyöngyhöz kötve, FACScalibur flow citométer segítségével mértük (Multiplex Fluorescent Bead Immunoassay, Bender Medsystems GmbH, Vienna, Austria).

## **Vizsgálati eredmények**

### ***1. P2Y12 receptor gátlás specifikus jellemzése optikai aggregometria segítségével: összevetés a vazodilatátor stimulált foszfoprotein foszforilációval***

#### **Háttér**

A trombociták felszínén két specifikus ADP-receptor expresszált: a P2Y1-receptor aktivációja indítja el a trombocita alakváltozást és a kezdeti, de átmeneti aggregációt; míg a végleges, irreverzibilis aggregátum létrejöttéhez a P2Y12 receptor szükséges. Az optikai aggregometriás (OAG) mérések során használt ADP mind a P2Y1, mind a P2Y12 receptort aktiválja, így az eredményekben nem csak a gyógyszer által gátolt P2Y12, de az P2Y1 receptor aktivitása is tükröződik. (20) Emiatt az OAG nem P2Y12-receptor specifikus. Mivel az Y1 receptor hatása csak átmeneti, szerepe lehet abban, hogy a mérés során diszaggregáció következhet be, és 5-6 perccel az ADP beadása után már egy alacsonyabb, az irreverzibilis hatású P2Y12-receptor aktivitását jobban tükröző aggregációs szint észlelhető. Ez a jelenség főként alacsony (< 5  $\mu$ M) ADP koncentráció használata esetén kifejezett. Fentiek miatt egyes laboratóriumok a maximális aggregáció (Aggmax) helyett az 5-6 perces késői aggregációs értéket (Agglate) használják a clopidogrel-hatás specifikusabb jellemzésére. (50) Ezek a laboratóriumok közötti különbségek is hozzájárulnak az OAG rossz standardizációjához, az eredmények szerteágazó értékeléséhez.

#### **Célkitűzés**

Vizsgálatunkban az optikai aggregometria (OAG) különböző mérési paramétereit vetettük össze a P2Y12 receptor specifikus VASP foszforilációval. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon a késői aggregáció valóban jobban jelzi-e a P2Y12 receptor gátlás mértékét a többi aggregációs paraméterhez képest.

#### **Módszerek**

Prospektív vizsgálatunkba 89 clopidogrel kezelésben nem részesülő, stabil angina pectoris miatt PCI-n átesett beteget vontunk be. Kizáró kritériumot jelentett az akut koronária szindróma, korábbi tienopyridine vagy antikoaguláns terápia, aszpirin vagy clopidogrel intolerancia, friss vérzéses stroke, ismert véralvadási zavar és az alacsony trombocita-szám (<100 G/l). Minden beteg a koronarográfia után, a PCI előtt 600 mg clopidogrel telítődőzist kapott, 300 mg aszpirin kíséretében. Fenntartó kezelésként 75 mg clopidogrel és 100 mg aszpirin járt minden betegnek. 12-18 órával a telítő adag beadása után, majd 25 nappal a PCI-t követően a betegektől 20 ml vért vettünk OAG és VASP mérésre. OAG esetében a clopidogrel kezelés hatékonyságát 5  $\mu$ M-os ADP-vel, az aszpirinét 10  $\mu$ M-os adrenalinnal határoztuk meg. A VASP foszforiláció alapján számolt trombocita reaktivitási indexet



(VASP-PRI) az OAG során kapott maximális aggregációval (Aggmax), a 6 perces késői aggregációval (Agglate), a disaggregációval (disAgg) és a görbe alatti terület nagyságával (AUC) vetettük össze.

## Eredmények

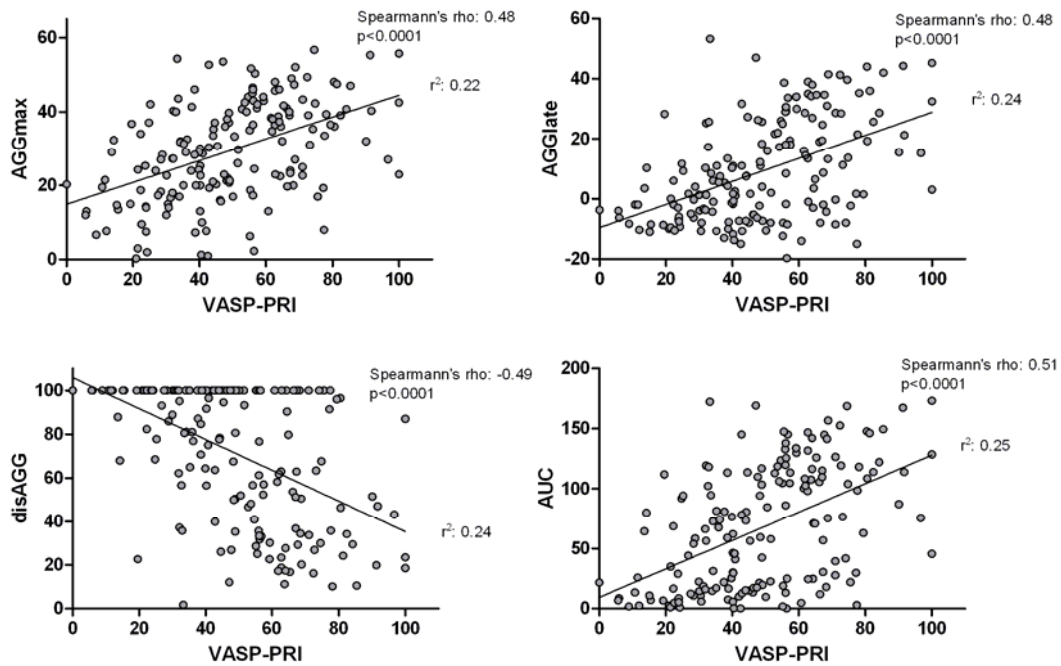
89 beteg VASP és OAG mérését  $19 \pm 2$  órával a telítő adag beadása után végeztük el, majd a 89-ből 80 beteg esetében történt  $25 \pm 2$  nappal a PCI után fenntartó fázisú meghatározás is. Így összességében 169 mérés eredményét elemeztük.

A 600 mg-os telítő adag beadása után minden trombocita-funkciós paraméterben jelentős egyének közötti különbség mutatkozott (Aggmax:  $28,8 \pm 14,0$ ; Agglate:  $9,4 \pm 17,5$ ; disAGG:  $72,0 \pm 33,3$ ; AUC:  $66,8 \pm 52,2$ ; VASP-PRI:  $49,9 \pm 22,1$ ), mely a fenntartó fázisban is jellemző maradt (Aggmax:  $30,0 \pm 12,6$ ; Agglate:  $9,2 \pm 16,2$ ; disAGG:  $71,4 \pm 30,3$ ; AUC:  $68,6 \pm 49,5$ ; VASP-PRI:  $48,1 \pm 20,6$ ). A mérések alapján erős korrelációt észleltünk Aggmax és Agglate között ( $p < 0,001$ ; Spearman's  $\rho$ : 0,91). Az OAG paraméterek VASP-PRI-vel történő összevetése alapján közepes erősségű, szignifikáns kapcsolatot regisztráltunk, melyben az AUC mutatta a legmagasabb korrelációs együtthatót. (1. ábra) Az aszpirin kezelés hatékonyságát jelző adrenalin-stimulált aggregációs értékek nem mutattak összefüggést VASP-PRI-vel ( $p = 0,75$ ). Bár az egyváltozós lineáris regressziós analízisek szerint minden aggregációs paraméter szignifikáns összefüggésben volt VASP-PRI-vel, a többváltozós modell szerint AUC volt a VASP-PRI független prediktora.

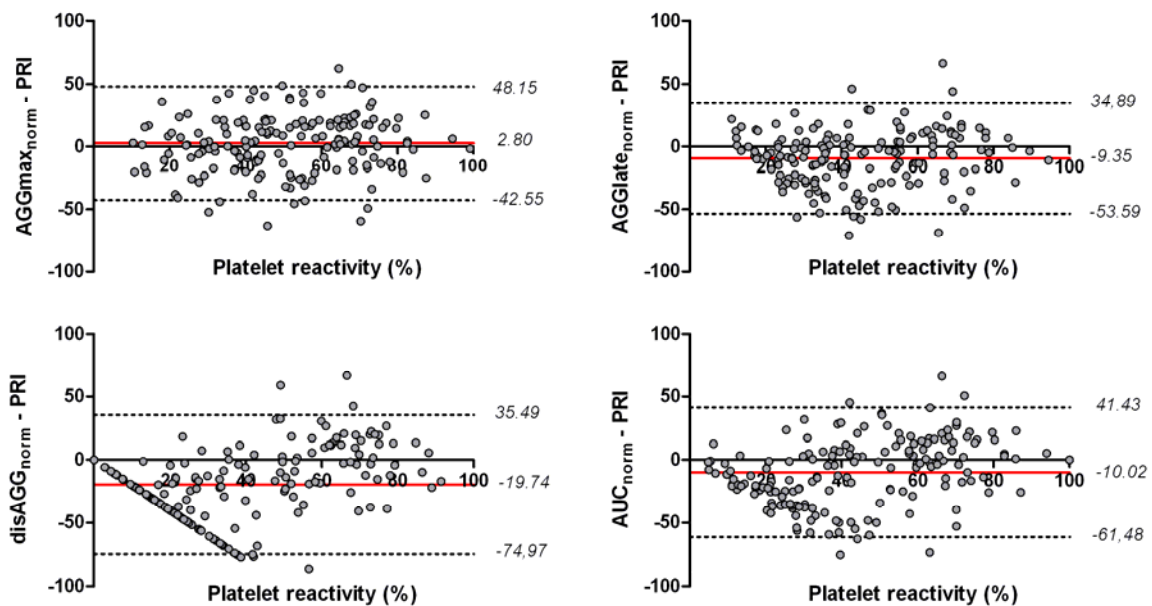
Annak vizsgálatára, hogy a közepes erősségű korreláció mellett milyen mértékű egyéneken belüli különbségek észlelhetők a VASP és OAG mérések között, Bland-Altman analízist használtunk. (2. ábra) Az eredmények alapján az Agglate, disAgg és AUC szisztematikusan alábecsli a VASP-által meghatározott trombocita-reaktivitást; továbbá a két módszer által mért értékek között jelentős egyéneken belüli különbségek lehetnek a betegek jelentős százalékában.

## Egyezés a magas trombocita-reaktivitás definiálásában

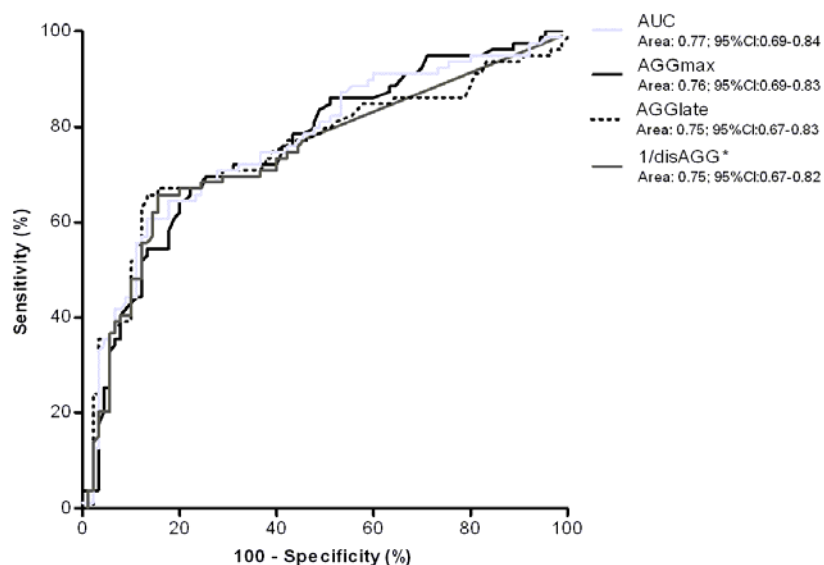
Az aggregációs paraméterek prediktív értékét a VASP-által meghatározott magas trombocita-reaktivitás (HPR) tekintetében ROC analízissel elemeztük. Korábbi vizsgálatok eredménye alapján a HPR definíciója 50% feletti VASP-PRI volt. (58) A statisztika szerint a különböző aggregációs paraméterek prediktív értéke gyakorlatilag azonos volt, bár a görbe alatti területtel jelzett prediktív érték AUC esetében volt a legmagasabb. (3. ábra)



1. ábra: Az optikai aggregációs értékek korrelációs összevetése VASP-PRI-vel. AGGmax: maximális aggregáció; AGGlate: 6-perces késői aggregáció; disAGG: disaggregáció; AUC: görbe alatti terület.



2. ábra: Bland–Altman diagramok a VASP és optikai aggregometria által meghatározott trombo-cita-reaktivitás egyéne-n belüli különbségeinek jellemzésére. A szürke vonal az átlagos különbséget jellemzi, míg a szaggatott vonalak a 95%-os konfidencia-intervallumot mutatják. Mivel a Bland-Altman analízishez szükséges, hogy a kiválasztott paraméterek azonos skálán mérjenek, ezért az aggregációs paraméterek a VASP skálájára (0-100%) lettek normalizálva.



3. ábra: ROC-analízis a VASP-által definiált magas trombocita-reaktivitás (HPR; VASP-PRI  $\geq$  50%) jelzéséről. A prediktív értéket minden egyes aggregációs paraméter esetében a görbe alatti terület (Area) jelzi a 95%-os konfidencia-intervallummal (95%CI). Mivel a disaggregáció inverz korrelációban van a VASP-PRI-vel, ezért a reciprokát vettük a többi paraméterrel való könnyebb összehasonlíthatóság érdekében.

### Következtetések

Az eredményeink megerősítik, hogy az összes vizsgált optikai aggregációs paraméter szignifikáns, közepes erősségű kapcsolatban áll a P2Y12-specifikus VASP foszforilációval. Az elemzések szerint a különböző paraméterek hasonlóak mind a P2Y12-receptor gátlás mértékének megítélésében, mind a magas trombocita-reaktivitás jellemzésében. Eredményeink szerint elvetendő az a feltételezés, mely a késői aggregáció szerepét hangsúlyozza a pontosabb P2Y12-receptor gátlás jellemzésére. A késői aggregáció helyett a különböző elemzések egybehangzó eredménye és a többváltozós regressziós modell értékelése szerint is a görbe alatti terület (AUC) jelzi legmegfelelőbben a P2Y12 receptor gátlás mértékét. Amellett, hogy a VASP és OAG között szignifikáns, közepes erősségű korreláció mutatkozott, a Bland-Altman diagramok jól jelezték, hogy a két módszer között jelentős különbségek is lehetnek. Ezek miatt a VASP validálja az optikai aggregometriát a P2Y12-receptor gátlás jellemzésére, de a különbségek miatt két módszer egymást nem helyettesítheti.

## ***2. A thienopyridine kezelés hatékonysága befolyásolja az eseménymentes túlélést stent implantációt követően***

### **Háttér**

A jelenlegi ajánlások nyomán a trombocita aggregáció gátló gyógyszereket PCI után fix dózisban adagoljuk a betegek közötti jelentős klinikai különbségek és a gyógyszerekre adott elérő válasz ellenére. (20, 45) A laboratóriumi módszerekkel jelzett jelentős egyének közötti különbségek alapján ez azt eredményezi, hogy számos betegnél nem alakul ki a kívánt, és kellően hatékony trombocita aggregáció gátló hatás; magas trombocita-reaktivitásuk rögzül a PCI után.

### **Célkitűzés**

Vizsgálatunkban azt kívántuk elemezni, hogy a laboratóriumi módszerrel meghatározott aszpirin és thienopyridine kezelési hatékonyság összefügg-e a klinikai kimenetellel PCI-n átesett betegek körében. Megvizsgáltuk azt is, hogy hol lehet az optimális laboratóriumi határ a magasabb klinikai rizikó jelzésére.

### **Módszerek**

#### **Beteganyag**

Prospektív vizsgálatunkba 2003 májusa és 2005 januárja között thienopyridine-t nem szedő, nem miokardiális infarktus miatt koronária intervención átesett 134 beteget vontunk be, akiket 10 hónapig követtünk. Beválasztási kritériumként szerepelt a stabil/instabil angina pectoris, de novo koronária lézió, 18 évnél idősebb kor. Kizáró kritériumot jelentett az akut miokardiális infarctus, korábbi thienopyridine vagy antikoaguláns terápia, instent resztenózis, aszpirin vagy thienopyridine intolerancia, friss vérzéses stroke, ismert véralvadási zavar és az alacsony trombocita-szám (<100 G/l). Minden beteg a koronarográfia után, a PCI előtt 300 mg clopidogrel vagy 500 mg ticlopidin telítődózt kapott, 300 mg aszpirin kíséretében. Fenntartó kezelésként 75 mg clopidogrel vagy 2x250 mg ticlopidine és 100 mg aszpirin járt minden betegnek.

A vizsgálat összetett, primer végpontját a halál vagy miokardiális infarktus vagy revaszkularizáció bekövetkezése jelentette.

#### **Trombocita-funkciós mérések**

30±5 nappal a PCI után a betegektől 10 ml Na-citráttal antikoagulált vért vettünk optikai aggregometriás (OAG) mérésre. A thienopyridine kezelés hatékonyságát 5 és 10 µM-os ADP-vel, az aszpirinét 10 µM-os adrenalinnal és 2 µg/ml koncentrációjú kollagén reagenssel határoztuk meg. A betegek egy kisebb részénél 5 ml vért vettünk szolubilis trombocita-funkciós faktorok (sP-szelektin, sCD40L, sVCAM-1) flow citometriás mérésére.

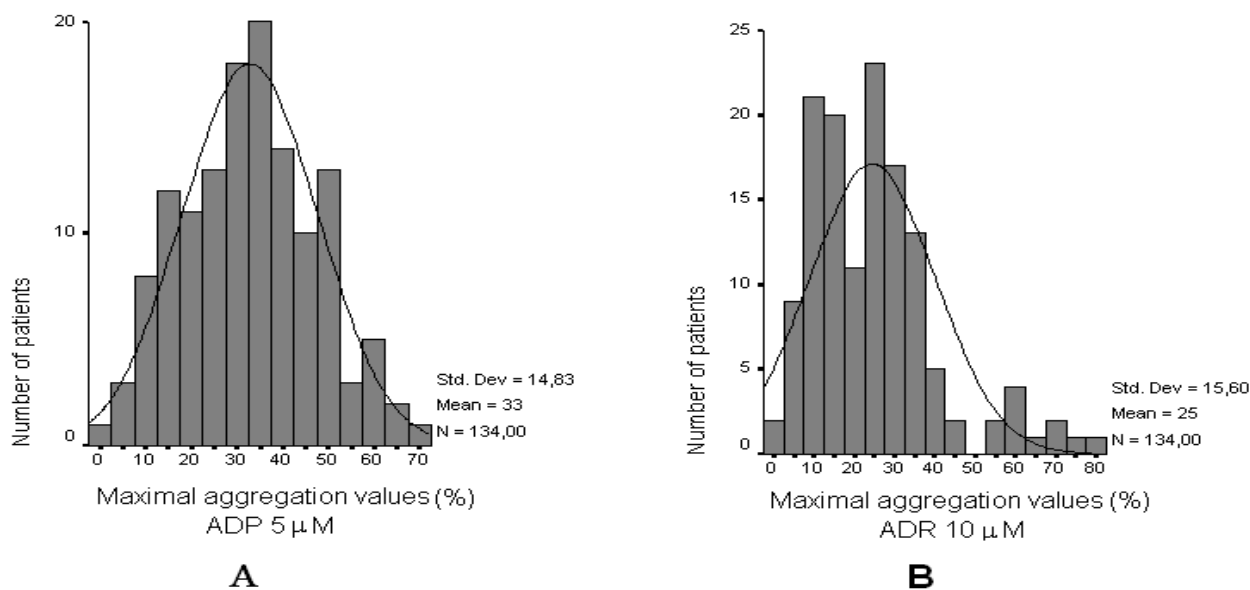
## Eredmények

2003 májusa és 2005 januárja között 134 beteget választottunk be vizsgálatunkba. A 10 hónapos tervezett követési idő során 33 betegnél következett be a primer kompozit végpont. (1. táblázat) Az adverz események átlagosan  $151 \pm 111$  nappal a PCI után jelentkeztek, 2 végpontot észleltünk az intervenciót követő 30 napon belül. Utóbbi két esetben szubakut stent trombózis következett be a 7. és 13. napon. Haláleseteket nem rögzítettünk, 3 miokardiális infarktust észleltünk, melyek közül kettőnél primer PCI, egy esetben konzervatív kezelés történt. A követési időszakban összesen 33 revaszkularizáció történt; 10 CABG és 23 ismételt PCI. A kontroll angiográfiák alapján 27 esetben alakult ki szignifikáns instent resztenózis a korábban stentelt szakaszban.

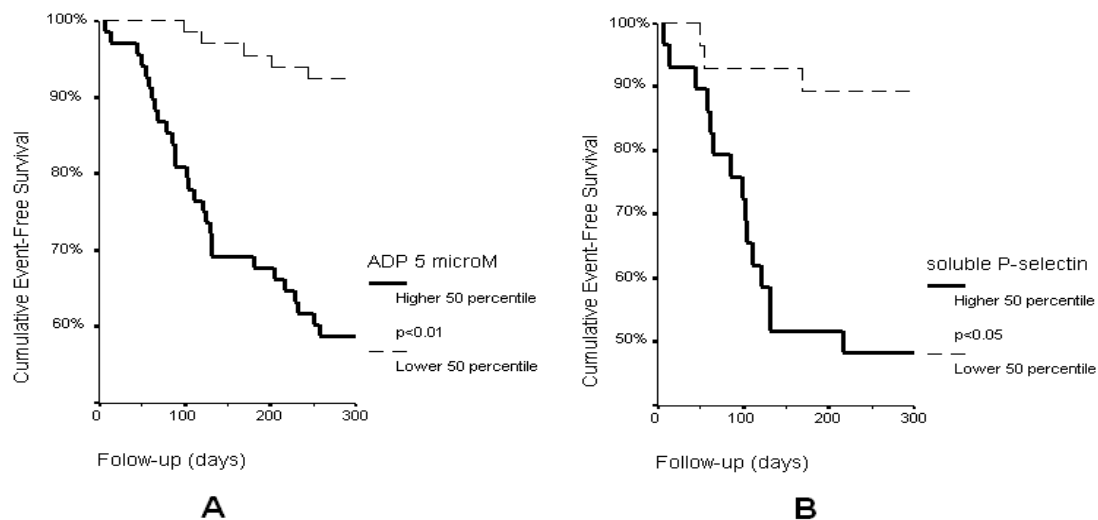
Az optikai aggregometriás mérések eredménye alapján igen jelentős egyének közötti eltérések voltak mind a thienopyridine, mind az aszpirin-hatékonyság vonatkozásában. Míg a thienopyridine esetében ez egy harang-görbére jellemző normál eloszlást jelentett, addig az aszpirinnél egy külön csoport formálódott a magasabb adrenalin-aggregációs értékeknek megfelelően (4. ábra)

Fő kardiovaszkuláris események a 10 hónapos követési idő alatt a 134 beteg esetében	
Halál	0 (0%)
Miokardiális infarktus	3 (2,2%)
Revaszkularizáció	33 (24,6%)
Revaszkularizáció PCI-vel	23 (17,1%)
Revaszkularizáció CABG-vel	10 (7,5%)
Halál, Miokardiális infarctus vagy revaszkularizáció (1 <sup>o</sup> végpont)	33 (24,6%)
Instent resztenózis	27 (20,1%)
Stent trombózis	2 (1,5%)
<i>De novo</i> lézió ellátása	5 (3,7%)

A Cox-regressziós analízis szerint az ADP-stimulált maximális aggregációs értékek szignifikáns kapcsolatban álltak a primer végponttal ( $p < 0,01$  az 5 és 10  $\mu\text{M}$ -os ADP esetén), amely a hatékonyabb aggregáció gátlás mellett jobb eseménymentes túlélést jelez. Ezt demonstrálta a Kaplan-Meier diagram is, ahol a betegek magasabb ADP-reaktivitású felének szignifikánsan rosszabb túlélése látszik (5/A ábra) Amikor a betegeket az ADP-reaktivitás szerint kvartilisekbe osztottuk, a két magasabb és két alacsonyabb kvartilis között, a medián értéknek megfelelően volt jelentős klinikai különbség. Így a betegek 50%-át kitevő magasabb ADP-reaktivitású csoport 6,84-szeres relatív rizikóval bírt az alacsony reaktivitásúakhoz képest (HR: 6,84; 95% CI: 2,64-17,72;  $p < 0,001$ ). A globális trombocita-aktivációs markernek tekintett szolubilis P-szelektin plazmaszintje ugyancsak összefüggött az eseménymentes túléléssel, ahol a magasabb plazmaszint szignifikánsan rosszabb kimenetellel társult. (5/B ábra) Az aszpirin kezelés hatékonyságát jelző adrenalin és kollagén indukálta maximális aggregációs értékek, valamint a sCD40L és sVCAM-1 plazmaszintje nem mutatott összefüggést a kimenetellel.



4. ábra: Az optikai aggregometriával meghatározott maximális aggregációs értékek megoszlása ADP és adrenalin stimuláció esetén. Az ADP-indukált aggregáció (A panel) a thienopyridine kezelés, az adrenalin-indukált aggregáció (B panel) az aszpirin kezelés hatékonyságát tükrözi.



5. ábra: Kaplan-Meier diagram az eseménymentes túlélés összevetésére az ADP-reaktivitás (A panel) és a szolubilis P-szelektin plazmaszintje (B panel) alapján kettéosztott betegcsoportokban. Mindkét esetben a magasabb 50 percentilis rosszabb túlélését mutatják az ábrák.

## Következtetések

Vizsgálatunk fő felismerése, hogy a thienopyridine kezelés hatékonyságát jelző ADP-stimulált maximális aggregációs értékek szignifikáns összefüggésben állnak a PCI utáni klinikai kimenetellel. Mivel a két magasabb ADP-reaktivitású kvartilis klinikai rizikója jelentősen magasabb volt a két alacsonyabb kvartilisú csoporthoz képest, a medián érték jól szeparálta a betegcsoportot a kardiovaszkuláris rizikó tekintetében. Ezek szerint a

thienopyridine kezelés utáni ADP-reaktivitást mérve nem csak egy minoritás, de akár a betegek 50%-a is magasabb veszélyben lehet az iszkémiás szövődmények tekintetében. Ezt a P-szelektin plazmaszintjének mérése az aggregometriától függetlenül megerősítette. Ugyanakkor a vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést az aszpirin kezelés hatékonyságát jelző paraméterek és a klinikai események között.

Megemlítendő, hogy a primer kompozit végpontot dominálónan nem a trombótikus események, hanem főként a célér-elégtelenséget okozó instent resztenózis (ISR) alkotta. Ezek alapján az eredményeink felvetik a thienopyridine kezelés utáni trombocita-reaktivitás és ISR közötti összefüggés lehetőségét.

### ***3. A kettes típusú diabétesz hatása a kombinált trombocita aggregáció kezelés hatékonyságára koronária stent implantáció után***

#### **Háttér**

A kombinált aspirin és clopidogrel kezelés alapvető fontosságú a PCI-t követő eseménymentes túlélés biztosításához. (18, 19) Ugyanakkor számos vizsgálat igazolta, hogy a két trombocita aggregáció gátló szer hatékonysága jelentős egyének közötti különbségeket mutat, mely különbség összefügg a klinikai eseményekkel. Jelen ismereteink szerint számos tényező befolyásolja a kialakuló aggregáció gátló hatékonyságot: klinikai tényezők (pl.: akut koronária szindróma), a máj metabolikus enzimrendszerének genetikai polimorfizmusai (pl.: clopidogrel esetében a CYP2C19 SNP) és a beteg-compliance. (60)

#### **Célkitűzés**

Vizsgálatunkban a kettes típusú diabétesz hatását vizsgáltuk a clopidogrel és aszpirin kezelés után mért trombocita-reaktivitás tekintetében.

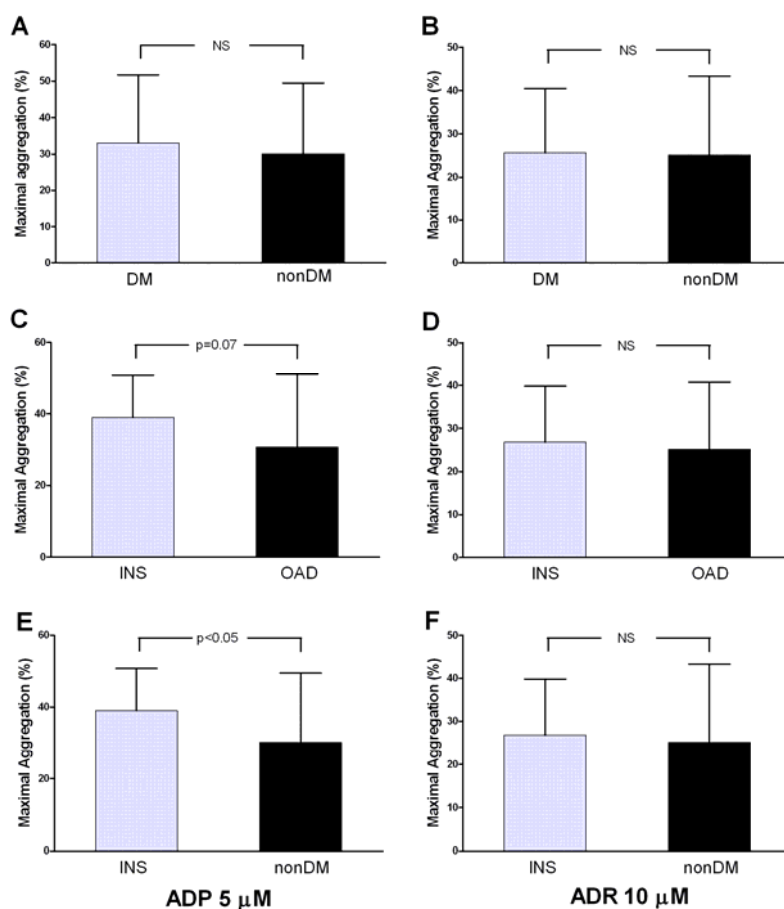
#### **Módszer**

Az optikai aggregometriás adatbázisunkból retrospektív kereséssel azonosítottunk kettes típusú diabétesz miatt kezelt, PCI-n átesett betegeket és kontrollként egy kor, nem, rizikóprofil, stent típus és TAG kezelési séma alapján illesztett csoportot. A diabéteszes csoporton belül megkülönböztettünk inzulinnal kezelt (INS) és oralis anti-diabetikummal (OAD) kezelt betegeket. Az inzulinnal és OAD-al egyaránt kezelt betegeket az INS csoportba soroltuk.

Minden betegnél több mint hat órával a telítő adag (600 mg clopidogrel és 300 mg aspirin) beadását követően történt az ADP és adrenalin stimulált maximális aggregációs értékek (Aggmax) meghatározása optikai aggregométer segítségével. Az 5 és 10  $\mu\text{M}$ -os ADP-stimulációval a clopidogrel kezelés hatékonyságát, a 10  $\mu\text{M}$ -os adrenalin és 2  $\mu\text{g/ml}$ -os kollagén indukcióval az aspirin kezelés effektivitását jellemeztük. A vizsgálat elsődleges végpontja az Aggmax értékek különbsége volt az INS és OAD csoport között.

## Eredmények

A célzott keresés révén 79, kettes típusú diabétesz miatt kezelt és 81 illesztett kontroll beteg aggregációs eredményeit vetettük össze. A két csoport között a feljebb említett klinikai és anamnesztikus tényezőkben nem volt különbség. A 79 cukorbeteg közül 56 (71%) volt OAD-al kezelt, és 23-an (29%) inzulinra szorultak. Az optikai aggregometriás mérések alapján a diabéteszes és nem cukorbeteg csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget az ADP-stimulált Aggmax értékek tekintetében. (6. ábra; A) A cukorbetegek között az OAD és INS csoportot összehasonlítva az inzulinnal kezelt betegek ADP-reaktivitása magasabbnak adódott, de ez a különbség még nem érte el a szignifikáns szintet. (6. ábra; C) Ugyanakkor a nem cukorbeteg egyének és inzulinnal kezelt diabéteszesek között már szignifikáns különbség mutatkozott a clopidogrel kezelés hatékonyságát jelző Aggmax értékekben. (6. ábra; E) A korábbi vizsgálatunkban használt definíciót alapul véve (Aggmax > 33%) az inzullinnal kezelt cukorbetegeknek 2,46-szoros relatív rizikójuk volt a magas trombocita-reaktivitás tekintetében. Az adrenalin és kollagén-indukált Aggmax értékek nem különböztek egyik csoport tekintetében sem. (6. ábra, B, D, F) Kiemelendő, hogy a éhomi vércukorszint nem korrelált az Aggmax értékekkel (Spearman's  $\rho=0,13$ ;  $p=0,32$ ).



6. ábra: Összehasonlítás a cukorbeteg (DM) és nem diabéteszes (non-DM) egyének trombocita-reaktivitásában. Az ADP-indukált maximális aggregációs értékek a clopidogrel, az adrenalin-stimulált értékek az aszpirin hatását jellemzik. INS: inzulinnal kezelt DM; OAD: gyógyszeres antidiabetikus terápia



## **Következtetések**

Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy az inzulinnal kezelt, kombinált TAG kezelést kapó cukorbeteg magasabb ADP-reaktivitással bírnak a nem diabéteszes betegekhez képest. A cukorbetegség fennállása azonban önmagában nem jelentett szignifikáns rizikót a magasabb ADP-reaktivitásra nézve. Az aszpirin kezelés hatékonyságát jelző adrenalin és kollagénstimulációs mérések nem mutattak különbséget a diabétesz megléte vagy hiánya esetén. Mivel a trombociták saját inzulin receptorral bírnak, az inzulinnak fiziológias hatásai vannak a trombocita-funkciót tekintve. Az inzulin receptor az inhibitoros g-protein komplexet ( $G_{i\alpha}$ ) gátolja, mely révén az adenil cikláz a gátlás alól felszabadulva cAMP-szint növelését okozza. A magas cAMP-szint a trombocitát nyugvó állapotba hozva az ADP-receptor felől érkező aktivációs szignál ellen hat. Ferreira és mtsai. bebizonyították, hogy a cukorbetegéknél kialakult inzulin-rezisztencia során az inzulin-függő trombocita aktiváció gátlás is sérül. (62) Ez jól magyarázza, hogy az inzulin-dependens betegekénél fokozott ADP-stimulált aggregációt észleltünk.

## ***4. Az alacsony trombocita diszaggregáció jól jelzi a 150 mg clopidogrelre adott elégtelen választ magas trombocita-reaktivitással bíró betegeknél***

### **Háttér**

A fix dózisú clopidogrel kezelésre adott egyéni válasz jelentősen eltérő a betegek között. Egyre növekvő számú vizsgálati adat támasztja alá, hogy a magas ADP-reaktivitás összefügg a trombótikus szövődményekkel PCI után. Korábbi vizsgálatunkban a 33% feletti ADP-reaktivitás esetén 6,84-szeres relatív rizikót igazoltunk a fő kardiovaszkuláris eseményekkel kapcsolatban PCI után. (59) A fokozott klinikai rizikó miatt a magas trombocita-reaktivitással bíró betegek között számos TAG stratégiát próbáltak ki az ADP-receptor gátlás hatékonyságának fokozására. (64-69) A clopidogrel fenntartó adagjának duplázása egy ígéretes lehetőség, melyet az amerikai útmutató is bizonyos esetekben megfontolandónak ítél. (18) Ugyanakkor a 150 mg clopidogrel hatását vizsgáló tanulmányokból kiderül, hogy a betegeknek csak egy bizonyos része reagál a magasabb dózissra, és a dózis duplázása az egyének közötti különbségeket nem csökkenti.

### **Célkitűzés**

Vizsgálatunk fő célja a 150 mg-os clopidogrel fenntartó dózis aggregáció gátló hatékonyságának elemzése volt magas trombocita-reaktivitású (HPPR) betegek körében. Másrészt olyan tényezőket kerestünk, melyek előre jelezhetik a clopidogrel-re adott aggregációs válasz mértékét.

## Módszerek

### Beteganyag

Jelen vizsgálatban három betegcsoport optikai aggregációs értékeit vetettük össze: 85 beteg estében, a 600 mg-os telítődózis után észlelt HPPR után 75 mg clopidogrel fenntartó kezelést alkalmaztunk (HPPR + 75 mg csoport), 85 beteg estén igazolt HPPR után 150 mg clopidogrelt adtunk egy hónapig (HPPR + 150 mg csoport), míg 117 beteg a 600 mg-os telítődózis után észlelt normál trombocita-reaktivitás után standard 75 mg clopidogrelt szedett (no HPPR). A HPPR+75 mg-os csoport adatait retrospektív módon gyűjtöttük, míg a másik két betegcsoportot prospektív klinikai körülmények között vontuk be a vizsgálatba. Kizáró kritériumot jelentett a korábbi thienopyridine vagy antikoaguláns kezelés, a glikoprotein IIb/IIIa blokkolók használata, az aszpirin/clopidogrel intolerancia, friss vérzéses stroke, alacsony trombocita-szám (<100 G/l).

## Eredmények

### Trombocita-funkció összevetése

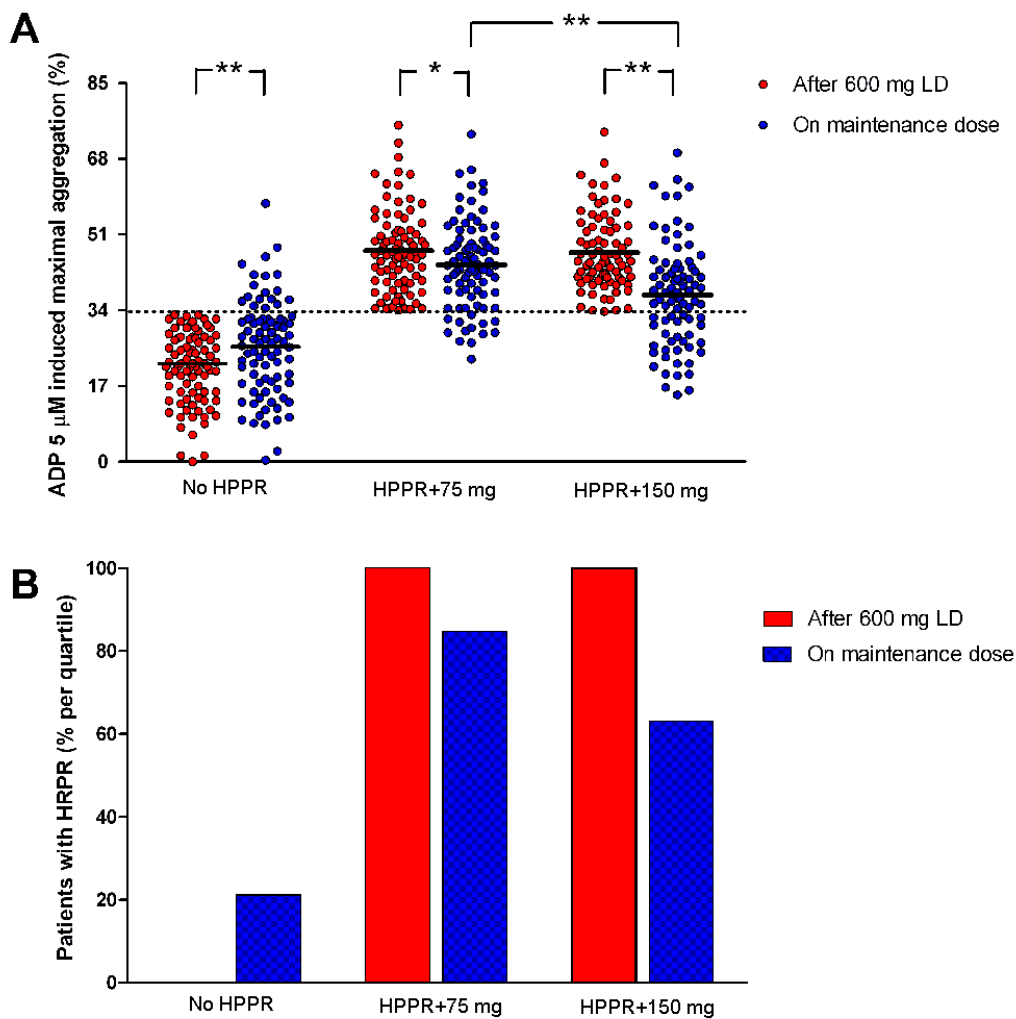
A vizsgálati populáció összesen 287 betegből állt. 85 beteg igazolt HPPR után 75 mg clopidogrelt, másik 85 fő 150 mg fenntartó dózisú clopidogrelt kapott, míg 117 normál trombocita-reaktivitású egyén standard 75 mg-os clopidogrel terápiában részesült a koronária intervenció után.

Kiinduláskor, a 600 mg-os telítődózis után nem volt különbség a két HPPR csoport ADP-reaktivitásában, ugyanakkor a 150 mg-os fenntartó adag szignifikánsan fokozta az ADP-receptor gátlás hatékonyságát a fenntartó fázisú mérésnél. Ezzel párhuzamosan a HPPR betegek aránya szignifikánsan csökkent a 150 mg hatására. Ugyanakkor, a duplázott fenntartó adag sem volt elégséges ahhoz, hogy a normális trombocita-reaktivitású betegek aggregációs szintjét elérjék. (7. ábra)

### A 150 mg-os dózistra adott választ meghatározó tényezők

A megemelt fenntartó adagra adott választ befolyásoló tényezőket először lineáris regressziós modellben elemeztük, melyben a fő klinikai jellegzetességek és a gyógyszeres kezelés mellett a kiindulási aggregációs paraméterek szerepeltek. A többváltozós lineáris regresszió alapján a 150 mg után észlelt Aggmax értékek független prediktorai az akut koronária szindróma és az alacsony diszaggregáció voltak. Ahhoz, hogy megerősítsük ezeket a statisztikai eredményeket, logisztikus regressziót végeztünk, melyben a függő változó a fenntartó fázis után észlelt HPPR volt. A kiegyensúlyozás nélküli modellben az akut koronária szindróma (ACS) és a diszaggregáció (disAgg) voltak a HPPR független prediktorai (disAgg 1%-os növekedésenként: OR: 0,95; 95% CI: 0,92-0,98; P=0,002; és ACS: OR: 5,82; 95% CI: 1,94-17,47; P=0,002). Az egyváltozós modellben 0,1 alatti p értékkel bíró tényezőkkel (bétablokkoló, CYP3A4-metabolizált statin, és kiindulási Aggmax) történt kiegyensúlyozás után a többváltozós modellben a diszaggregáció és az ACS jósló ereje a tovább erősödött (diszaggregáció: OR: 0.96; 95% CI: 0.93-0.99, p=0.009 és ACS: OR: 4.83; 95% CI: 1.54-

15.09,  $p=0.008$ ). Mivel a diszaggregáció folyamatos változó, a HPPR előre jelzéséhez optimális határt ROC analízissel vizsgáltuk. A modell szerint az optimális határvonal a 16,5%-os diszaggregáció volt, mely 94% szenzitivitással és 43%-os specificitással. Ezt a határvonalat figyelembe véve az alacsony diszaggregáció (<16,5%) volt a 150 mg clopidogrel-re adott elégtelen válasz legerősebb prediktora (OR: 12,49; 95% CI: 2,52-62,00;  $p=0,002$ ).



7. ábra: A trombocita aggregáció gátló kezelés hatékonyságának összevetése normál trombocita-reaktivitású egyéneknél (no HPPR), magas reaktivitású betegekben 75 mg clopidogrel után (HPPR + 75 mg) és magas trombocita-reaktivitású betegekben 150 mg fenntartó adag után (HPPR + 150 mg). Az A panel az ADP-indukált maximális aggregációs értékek összevetését mutatja, ahol a pöttyök egyéni mérési eredményeket jelképeznek minden csoport átlagával. A szaggatott vonal a HPPR definíció szerinti határt mutatja. (\*:  $p<0.01$ ; \*\*:  $p<0.001$ ; LD: telítő adag). A B panel a HPPR betegek relatív arányát mutatja a különböző csoportokon belül.

## Következtetések

A vizsgálatunk eredményei megerősítik, hogy magas trombocita-reaktivitással bíró egyéneknél a standard 75 mg helyett 150 mg clopidogrel adása fokozza az aggregáció gátlás hatékonyságát és csökkenti a HPPR arányát. Ugyanakkor a magasabb fenntartó dózissal sem érhető el az eredetileg alacsony reaktivitású betegek aggregációs szintje. Fontos kihangsúlyozni, hogy a 150 mg-os fenntartó adag nem csökkenti az egyének közötti variabilitás mértékét, azaz igen eltérő a betegek válasza a duplázott adagra. Ennek nyomán csupán a betegek kevesebb, mint 40%-ánál sikerült az alacsony reaktivitású tartomány elérése. Az elégtelen clopidogrel-választ előre jelző paraméterek közül a többváltozós modell az akut koronária szindrómát és az alacsony diszaggregációt emelte ki. Ezek alapján azoknál az ACS miatt kezelt betegeknél, akiknél a 600 mg-os fenntartó adag után magas trombocita-reaktivitást észlelünk alacsony diszaggregációval, nem jó választás a fenntartó clopidogrel-dózis duplázása. Ezen betegeknél a jóval hatékonyabb, bevezetés alatt álló ADP-receptor gátló szerek a hozhatnak érdemi javulást (prasugrel, ticagrelor).

### ***5. Radiális vagy femorális artériás behatolásból végzett perkután koronária intervenció akut miokardiális infarktusbán. Átfogó irodalmi áttekintés és meta-analízis***

#### **Háttér**

Kiemeneij és Laarman úttörő munkásságát követően mára a radiális artérián keresztüli koronária angioplasztika (TRPCI) széles körben elterjedt és elfogadottá vált. (71) A radiális behatolás fő előnyeit az egyszerű és gyors vérzéscessillapítás, a fekvés szükségtelensége miatti korai és gyors mobilizáció, a jobb beteg-komfort és korai hazabocsátás jelentik. Mindezek a tényezők költséghatékonyá teszik a beavatkozást és jobb életminőséget biztosítanak a betegek számára. (74, 75) Bár a radiális behatolás technikailag nagyobb kihívást jelenthet, bizonyítottan alkalmas az akut koronária szindróma perkután ellátására. (76-82) A TRPCI mellett a korábbi vizsgálatok adatai szerint gyakorlatilag kiküszöbölhetők a behatolási kapu vérzéses szövődményei, mely főként a magas vérzési rizikójú, agresszív antikoaguláns és trombocita aggregáció gátló kezelést kapó betegek körében szembetűnő. Mivel a PCI utáni vérzéses szövődmények prognosztikai szerepe a legutóbbi vizsgálatok szerint egyenértékű az iszkémiás eseményekkel, a radiális behatolás ideális választás lehet egy olyan magas vérzési rizikójú csoportban, mint az akut miokardiális infarktus (AMI). (83-86) A logikus érvek

ellenére a radiális behatolás jelenleg sem az első választandó behatolási hely a katéteres laboratóriumok jelentős részében; az amerikai kontinensen például 20% alatti penetranciájú. A hátrányoktól tartók a magasabb kontrasztanyag-felhasználást, a hosszabb sugáridőt, a hosszabb procedurális időt és a gyakoribb beavatkozási kudarcot emlegetik, kiemelve, hogy az AMI ellátásában az időfaktor szerepe elsőrendű. A jelenlegi adatok a behatolási kapu vérzéses szövődményeinek csökkentésén felül mortalitásbeli különbséget a két alternatíva között nem demonstráltak.

### **Célkitűzés**

Célunk szisztematikus irodalmi áttekintést követően egy meta-analízis létrehozása volt, melyben a TRPCI és a femoralis behatolásból végzett intervenció (TFPCI) eredményességét és biztonságosságát vetettük össze ST-eleváció miatt primer PCI-re került betegcsoportokban.

### **Módszer**

A vizsgálathoz 1993 januárja és 2005 augusztusa között publikált, releváns cikkeket kerestünk kulcsszavak segítségével a MEDLINE, SCOPUS, Web of Science és CENTRAL adatbázisokban, kongresszusi riportokban, és a témába vágó összefoglaló közlemények publikációs listájában. A kiválasztott közleményeknek egy összehasonlító elemzést kellett tartalmazniuk a TFPCI és TRPCI tekintetében, AMI miatt ellátott betegek körében. A meta-analízishez a közleményekben megjelent, kiegyensúlyozott relatív rizikókat (adjusted OR) összesítettük véletlenszerű hatást modellezve (random effect modelling), generic-inverz variancia súlyozással (generic-inverse variance weighting).

### **Eredmények**

A 213 keresési találatból 12 releváns cikket választottunk ki a kritériumoknak megfelelően a végső analízishez. Ebből 5 randomizált vizsgálat 516 betegről, míg hét regiszter vagy egycentrumos obszervációs vizsgálat 2808 betegről demonstrált összehasonlító elemzést. (76, 82, 91-100)

Az eredmények szerint a TRPCI 70%-al csökkentette a beavatkozás körüli fő vérzéses szövődményeket (OR: 0,30; 95%CI: 0,16-0,55; P=0.0001). Ezzel párhuzamosan a fő kardiovaszkuláris szövődmények (halál, miokardiális infarctus és agyvérzés) aránya 44%-os relatív rizikócsökkenést mutatott (OR: 0,56; 95%CI: 0,39-0,79; P=0.01). Mindezek mellett az analízis szignifikáns rizikó-csökkenést mutatott a halálozást tekintetében is (OR: 0,54; 95%CI: 0,33-0,86; P=0.01). Nem találtunk különbséget a teljes procedurális vagy a

reperfúziós idő tekintetében; egyedül a fluoroszkópiás idő volt magasabb TRPCI esetén. A behatolási kapuk átváltása alacsonyabb volt TFPCI esetén, de a teljes kórházi ellátás rövidebb volt radiális behatolás választásakor.

### **Következtések**

Jelen meta-analízis egyértelmű rizikócsökkentést igazolt TRPCI esetén egy magas rizikójú, AMI miatt kezelt betegcsoportban mind a vérzéses, mind az iszkémiás szövődmények tekintetében. A meta-analízis fő újdonsága a TRPCI mellett észlelt szignifikáns mortalitás csökkenés, mely a korábbi vizsgálatok kis mérete és esetszáma miatt nem volt egyértelmű. Mindezeket az előnyöket nem csökkentette a procedurális vagy reperfúziós idő megnyúlása; egyedül a sugáridő volt magasabb TRPCI esetén. Ezek alapján a TRPCI maximalizálhatja azokat az előnyöket és ellensúlyozhatja azokat a hátrányokat, melyeket egy magas rizikójú, AMI miatt kezelt betegcsoportban adott agresszív trombocita aggregáció gátló és antikoaguláns terápia jelent.

### **Új felismerések**

A fent részletezett vizsgálatok eredményei alapján a dolgozat új eredményei, felismerései az alábbiak szerint foglalhatók össze:

- Az aggregometriás méréseink eredményei megerősítették, hogy a fix dózisú aspirin és clopidogrel kezelés hatására a betegek között igen jelentős különbségek észlelhetők az aggregáció gátló kezelés hatékonyságában. Míg az aspirin esetében a trombocita-reaktivitás eloszlása kétpúpú, bimodális jellegű, addig a clopidogrel esetében ez egy normál eloszlásra jellemző harang-görbét mutat. Ezek nyomán a feltételezett 'aspirin rezisztens' betegek elkülöníthetők a laboratóriumi mérés során, míg clopidogrel esetében a non-reszponderek határának kijelölése önkényes. Emiatt a clopidogrel esetén helyesebb a határt megjelölve magas trombocita-reaktivitásról nem pedig clopidogrel-rezisztenciáról szólni; annál is inkább, mert az aggregáció gátló hatás mértéke utóbbi esetében dózis-függő.
- A P2Y12-receptor gátlás specifikus meghatározására szolgáló vazodilatátor stimulált foszfoprotein (VASP) foszforiláció szignifikáns korrelációban van az optikai aggregometria mérési paramétereivel (Aggmax, Agglate, disAgg, AUC), mely validálja az utóbbit az ADP-receptor gátlás hatékonyságának monitorozására. Ugyanakkor a két módszer között észlelt különbségek alapján a két metódus nem felcserélhető, egyes betegeknél jelentős különbségek lehetnek közöttük. Az két módszer összevetése elveti azt a hipotézist, hogy a késői aggregáció (Agglate) a legmegfelelőbb paraméter a specifikus P2Y12-receptor gátlás monitorozására; a vizsgált paraméterek között nincs jelentős különbség.

- A clopidogrel kezelés mellett észlelhető magas ADP-reaktivitás (Aggmax > 33%) szignifikáns kapcsolatban áll a PCI utáni iszkémiás szövődményekkel.
- A clopidogrel fenntartó dózisének duplázása magas trombocita-reaktivitás esetén fokozza az ADP-receptor gátlás hatékonyságát, bár a 150 mg clopidogrel mellett is csak a betegek kevesebb, mint 40%-a éri el a kívánatos tartományt. Az akut koronária szindróma és az alacsony (<16,5%) trombocita diszaggregáció a 150 mg clopidogrel-re adott elégtelen válasz független prediktorai.
- A radiális artérián keresztüli perkután koronária intervenció maximalizálja az akut miokardiális infarktus miatt kettős vagy hármas trombocita aggregáció gátló kezelést kapó betegek klinikai előnyét femorális behatoláshoz képest, csökkentve a vérzéses szövődményeket és a mortalitást.

## Konklúzió és kitekintés

Vizsgálatainkat egy olyan időszakban kezdtük, amikor még kevés információ állt rendelkezésre a kombinált trombocita aggregáció gátló kezelés hatékonyságának monitorozásáról és ennek esetleges klinikai jelentőségeiről perkután koronária intervenciót (PCI) követően. Ebben az időszakban az 'aszpirin-rezisztencia' már egy jól ismert és felkapott kifejezés volt; azonban a rezisztensnek mondott betegek aránya drámai különbségeket mutatott a különböző közlemények között. Hamar egyértelművé vált azonban, hogy a szerzők közötti különbségek nem magyarázhatók egyszerűen a vizsgált betegek különböző rizikójával, sokkal inkább a mérési módszerek és a használt definíciók heterogenitásával, önkényességével.

A koronária intervenciót követően az aszpirin kezeléssel együtt adott thienopyridine terápia jelentősen csökkentette az iszkémiás szövődmények arányát az aszpirin monoterápiához vagy az aszpirin plusz antikoaguláns kezeléshez képest. (5-8) Ismerve, hogy a clopidogrel-nek kevesebb a hematológiai mellékhatása, gyorsabb az ADP-receptor gátló hatásának kialakulása és napi egyszeri szedést igényel, ez vált a legelterjedtebb thienopyridine származékká. Mivel azonban a kettős aggregáció gátló kezelés ellenére a PCI-n átesett betegek egy kisebb részében továbbra is recidív trombótikus események jelentkeztek, jelentős kutatás indult a thienopyridine kezelés egyéni válaszána megismerésére. A korai vizsgálati eredmények *ex vivo* vagy *in vitro* módszerekkel jelentős egyének közötti különbségeket mutattak a fix dózisú clopidogrel kezelés után észlelt trombocita-reaktivásban. Mivel ekkor az aszpirin esetében a rezisztencia bizonyítottan tekinthető jelenség volt, a clopidogrel esetében is rezisztenciáról kezdtek publikálni. (45-47) Az utóbbi évek áttörő kutatási eredményei azonban rávilágítottak arra, hogy számos tekintetben igen eltérő jelenségről van szó a két trombocita aggregáció gátló vegyület esetében.

Először is a clopidogrel a trombocita felszíni P2Y<sub>12</sub>-receptor irreverzibilis bénítója, míg az aszpirin egy intracelluláris enzim, a ciklooxygenáz gátlója. Ez a lényeges különbség alapvetően fontos annak a megértéséhez, hogy a clopidogrel hatékonyságának meghatározása miért egyszerűbb és pontosabb az aszpirinhez képest. Míg ugyanis az ADP-receptor gátlása tesztelhető a specifikus ligandjával (ADP), a ciklooxygenáz enzim aktivitása és működése egy

jóval bonyolultabb gépezet része. Emiatt a clopidogrel-hatást monitorozó ADP-specifikus módszerek között jó korreláció észlelhető (például VASP és optikai aggregometria) addig az aspirin kezelés hatékonyságát mérő módszerek (arachidonsavval, adrenalinval vagy kollagénnel stimulált optikai aggregometria, PFA-100 kollagén-epinefrin záródási idő, szérumból vagy vizelet dehidro-tromboxán szint mérése) gyakorlatilag nem vagy alig korrelálnak egymással. (40) Ezek a különbségek vezettek odáig, hogy a közleményekben 5 és 65% között változott az aspirin rezisztensnek tartott betegek aránya. (43) A fenti eredmények hangsúlyozzák, hogy a különböző módszerek nem egyenrangúak az aggregáció gátló szerek hatékonyságának monitorozására, a non-specifikus tesztek helyett a specifikus agonistát használó módszerek preferáltak. A vizsgálataink során az ADP-stimulációval végzett optikai aggregometriát, a történeti aranystandardot használtuk az ADP-receptor gátlás hatékonyságának megítélésére. A módszert egy bonyolultabb, drágább, de teljesen P2Y<sub>12</sub>-specifikus módszerrel, a VASP foszforiláció flow citometriás mérésével összevetve jó korrelációt találtunk. Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a gyengeségei ellenére az 5 µM-os ADP-indukált optikai aggregometria egy értékes és valid módszer a thienopyridine terápia hatékonyságának követésére.

A trombocita aggregáció gátló kezelés hatékonyságát vizsgálva jelentős egyének közötti különbségeket észleltünk mind az ADP, mind az aspirin esetében. A thienopyridinek esetén ezek a különbségek egy normál, Gauss eloszlást mintáztak, mely eloszlás meglehetősen gyakori az olyan jellegek esetében, melyek egyaránt állnak környezeti és genetikai hatások kontrollja alatt. (42, 45) Ennek megértéséhez fontos tudni, hogy a clopidogrel egy előanyag, prodrug, melynek a máj citokróm enzimrendszerén keresztül kell aktiválódnia, hogy a P2Y<sub>12</sub> ADP-receptort irreverzibilisen bénítani tudja. A clopidogrel a bélből szívódik fel, ahol az abszorpciót befolyásoló P-glikoprotein nevű fehérje genetikai polimorfizmusa megszabja a felszívható mennyiséget. (104) Ezt követően a felszívódott clopidogrel molekulák több, mint háromnegyedéből a vér non-specifikus észterázai egy teljesen inaktív metabolitot képeznek, csak a maradék 15-25% kerülhet a májban átalakulásra. Az átalakításban számos citokróm vesz részt (CYP2C19, 2C9, 3A4, 3A5, 1A2, 2B6), melyek közül kiemelkedő jelentőségű a 2C19 izoenzim. Utóbbi izoenzim funkcióvesztő genetikai polimorfizmusai (\*2, \*3, \*4) igen elterjedtek a populációban. A funkcióvesztett allélt hordozó egyéneknél igen rossz hatékonysággal megy végbe a clopidogrel aktivációja, mely jelentősen csökkenti az aktív metabolit szintjét. Számos klinikai tényezőről (akut koronária szindróma, diabétesz, veseelégtelenség) is kiderült, hogy csökkentik a clopidogrel kezelés hatékonyságát. (61) Saját elemzésünkben az inzulinval kezelt diabétesz fennállása 2,5-szeres relatív rizikót jelentett a magas trombocita-reaktivitásra. A populációban észlelt normális eloszlás tehát a genetikai tényezők és a környezeti, klinikai hatások eredőjeképpen hozza létre az egyének között észlelhető jelentős különbségeket.

Az ADP-specifikus módszerekkel jelzett különbségek nem csupán laboratóriumi artefaktok, hanem nyilvánvalóan vált konkrét klinikai relevanciájuk. (48-55) Saját vizsgálatunkban 134 PCI-n átesett beteg követése után az találtuk, hogy a betegcsoport azon fele, akiknél 33% feletti ADP-reaktivitást mértünk, 6,8-szoros relatív rizikóval bírt a fő kardiovaszkuláris szövődmények tekintetében a 10 hónapos követési idő alatt. (59) Ezzel nagyon hasonló következtetésre jutott a 802 fős EXCELSIOR vizsgálat is, melynél a medián érték feletti aggregáció 6,7-szeres relatív rizikóval bírt a halál, infarktus, sürgős célér revaszkularizáció vonatkozásában. (50) Később egy meta-analízis is megerősítette a clopidogrel kezelés utáni ADP-reaktivitás rizikó markeri szerepét. (54) Azonban az nem volt világos, hogy a magas ADP-reaktivitás inkább egy PCI utáni rizikó marker, vagy egy befolyásolható rizikó faktor. Nem nehéz elhinni, hogy az utóbbi lehetőségnek óriási jelentősége lenne, hiszen ha a magas trombocita-reaktivitás csökkenésével a klinikai szövődmények is csökkennének, az a betegek eseménymentes túlélését és a PCI eredményességét jelentősen javíthatná.



Az első klinikai eredményt felmutató vizsgálatot Bonello és mtsai végezték, akik a VASP index mérése alapján egy non-ST-elevációs betegcsoportban a magas trombocita-reaktivitású betegeknek randomizált módon standard terápiát vagy a VASP-index által kontrollált ismételt telítő clopidogrel dózissokat adagoltak. Az újratelített csoport szignifikáns klinikai előnye jelezte, hogy a magas trombocita-reaktivitású csoport profitálhat egy hatékonyabb aggregáció gátló terápiából. (58) A PCI fenntartó fázisában a 75 mg-os clopidogrel adag duplázásának hatását is többen vizsgálták. (64-69) Saját vizsgálati eredményeink is megerősítették, hogy a 150 mg-os fenntartó adag fokozza az ADP-receptor gátlás hatékonyságát. (69) Ugyanakkor az is egyértelművé vált, hogy a 150 mg-os fenntartó adag nem csökkenti a korábban is észlelt inter-individuális variabilitást, azaz a betegeknek csak egy része, kevesebb, mint 40% profitált a megemelt adagból. A maradék egyénenként a fenntartó adag emelése ellenére a magas trombocita rizikó perzisztálhat, amit a két bekövetkezett stent trombozisz is bizonyít a vizsgálatunkban. Fontos tényező azonban, hogy a vizsgálatunk szerint ez a 150 mg-os adagra adott válasz jósolható. Az akut koronária szindróma miatt kezelt betegeknek, illetve az aggregációs mérésen észlelt alacsony trombocita diszaggregációnál nem várható érdemi javulás a megemelt fenntartó dózis ellenére sem. Mivel bevezetés előtt állnak új, fokozott hatékonyságú és megváltozott metabolizmusú ADP-receptor gátló szerek (prasugrel, ticagrelor) ezen betegek profitálhatnak az új, potens trombocita aggregáció gátló kezeléssel. A prasugrel klinikai hatékonyságát elemző TIMI38 vizsgálat fontos felismerése volt, hogy a magas rizikójú, akut koronária szindróma miatt PCI-n átesett betegeknek a hatékony ADP-receptor gátlás csökkenti az iszkémiás eseményeket, de kismértékben növeli a vérzéses szövődmények előfordulását is. Mivel a vérzés prognosztikai szerepe jelen felfogásunk szerint egyenértékű az iszkémiás szövődményekkel, a vérzés megelőzése alapvető fontosságú. Az agresszív trombocita aggregáció gátlásból fakadó előnyöket egy magas trombocita rizikójú, akut infarktusos betegcsoportban ellensúlyozhatják a periprocedurális időszakban fellépő vérzéses szövődmények. Ennek megelőzésében jelent fontos megoldást a transzradiális PCI (TRPCI). Meta-analízisünk eredményei szerint a TRPCI nem csak a vérzéses szövődmények jelentős csökkenését, hanem 46%-os relatív rizikócsökkenést jelentett a mortalitásban a femoralis behatolásból végzett primer PCI-hez képest. Összefoglalva, a PCI után jelenleg alkalmazott aggregáció gátló szerek hatékonyságában jelentős egyének közötti különbségek észlelhetők. A kombinált aszpirin és clopidogrel kezelés mellett az utóbbi esetében észlelt különbségeknek klinikai relevanciája van, azaz a magas ADP-reaktivitással bíró betegek nagyobb rizikónak vannak kitéve a recidív iszkémiás szövődményekkel szemben. Mivel a gyógyszerre adott egyéni válasz létrejöttében mind rejtett (genetikai), mind klinikai tényezők szerepet játszanak jelentős igény van egy objektív mérőmódszerre, mellyel a kiváltott hatás megítélhető, és az aggregáció gátló stratégia megtervezhető, ellenőrizhető. Mindezek révén juthatunk el ez egyénre szabott aggregáció gátló kezelés bevezetéséhez, mely során a beteg egyéni rizikóstatuszához illesztett, megfelelően hatékony és kellően biztonságos terápiát kaphat.

## **Köszönetnyilvánítás**

Először is illendő hálás köszönetet mondanom tutoromnak, Dr. Komócsi Andrásnak, a közös munkánk során adott támogató, segítő és soha nem lankadó vezetéshez és irányításhoz, mely révén ez a tudományos érték megszülethetett. Köszönöm továbbá szakmai felettesemnek, Dr. Horváth Ivánnak a lehetőséget, hogy a munkám során mindvégig a betegek közelében maradhattam, mely révén a felismerések és eredmények nem öncélú gondolatok lettek, hanem a jobb betegellátás közvetlen hozadékával kecsegtettek. Mindemellett köszönet illeti kedves

feleségemet és családomat, akik a tudományos munkával járó gyötrelmekben és örömeinkben egyaránt mellettem álltak. Köszönöm továbbá mindenkinek, akik a vizsgálataink során a trombocita-funkciós mérésekben részt vállaltak és ezzel segítették a munkámat.

#### **Publication list / Publikációs lista**

##### I. Topic-related international articles / A témához kapcsolódó nemzetközi közlemények

1. Aradi D, Kónyi A, Pálincás L, Berki T, Pintér T, Tahin T, Horváth I, Papp L, Komócsi A. Thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. *Angiology* 2008; 59:172-8. IF: 1.122
2. Dániel Aradi, András Vorobcsuk, Lenkey Zsófia, Iván Gábor Horváth, András Komócsi. Low platelet disaggregation predicts poor response to 150 mg clopidogrel in patients with elevated platelet reactivity. *Platelets* 23 Nov 2009. E-pub ahead of print. IF(2008): 2.271
3. Vorobcsuk A, Kónyi A, Aradi D, Horváth IG, Ungi I, Louvard Y, Komócsi A. Transradial versus transfemoral percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction Systematic overview and meta-analysis. *Am Heart J* 2009; 158: 814-21. IF(2008): 4.285
4. D. Aradi, Pinter T, Horvath IG, Komocsi A. Variability in response to clopidogrel: where is the threshold for 'low response'? *Eur Heart J* 2007; 28:515-6. Letter (IF: 7.286)
5. D. Aradi, T. Paska, M. Tőkés-Füzesi, A. Komócsi. Monitoring the Efficacy of Antiplatelet Therapy: All Methods are Equal, but Some Methods are More Equal than Others? *Am Heart J* 2008; 155:e33. Letter (IF: 4.285)
6. D Aradi, A Vorobcsuk, A Komócsi. "Optimizing clopidogrel therapy before stent implantation: should clinical setting be taken into account?" *J Am Coll Card* 2008; 52:1349. Letter (IF: 11.438)

##### II. Non-topic related international articles / Nem a témához kapcsolódó nemzetközi közlemények

1. Lenard L, Aradi D, Donauer E. Migrating Kirschner wire in the heart mimics acute coronary syndrome. *Eur Heart J* 2009; 30:754. IF(2008): 8.917
2. Komocsi A, Simor T, Toth L, Szabados S, Magel F, Pinter T, Aradi D, Konyi A, Horvath IG, Papp L. Magnetic resonance studies in management of adult cases with Bland-White-Garland syndrome. *Int J Cardiol.* 2007; 123:e8-11. IF: 2.234

**Impact Factor: 9.912 (41.838 including letters / a levelekkel együtt).**

##### III. International abstracts / Nemzetközi előadás-absztraktok

1. Aradi D, Konyi A, Palinkas L, Berki T, Pinter T, Tahin T, Horvath I, Papp L, Komocsi A. Efficacy of thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. (TCT2006) *Am J Cardiol* 2006; 98:(8,Suppl.1)S200-S207 Abstract No. 517. IF: 3.015
2. D. Aradi, T. Pinter, A. Konyi, T. Tahin, I. Horvath, L. Papp, A. Komocsi. Efficacy of thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. (ESC 2006) *Eur H J* 2006;27(Suppl):750. Abstract NoP4558.

IF: 7.286

3. D. Aradi, T. Pinter, I. Horvath, A. Konyi, A. Komocsi. Low response to thienopyridine therapy after stent implantation is associated with the need for target vessel revascularization in elective but not in acute coronary syndrome patients. (ESC2007) Eur Heart J Suppl. 2007;28: 497-723. Abstract No. P4005.

IF: 7.286

4. D. Aradi, Iván G. Horváth, Tünde Pintér, Attila Kónyi, András Komócsi. Low Platelet Disaggregation Predicts Impaired Response to High Maintenance Dose of Clopidogrel in Patients with High Post-Clopidogrel Platelet Reactivity. (TCT2008)

Am J Cardiol 2008; 102(8): Suppl. Abstract No.: P45.

5. D. Aradi, A. Vorobcsuk, M. Tokes-Fuzesi, T. Magyarlaki, IG. Horvath, A. Komocsi. Monitoring P2Y12 receptor inhibition with light transmission aggregometry: a comparison with vasodilator stimulated phosphoprotein phosphorylation assay. (ESC2009). Eur Heart J Suppl. 2009. Abstract No: 87661.

#### IV. Hungarian abstracts / Magyar absztraktok

1. Aradi D., Pintér T., Horváth I., Berki T., Pálkás L., Komócsi A. A thrombocytáaggregáció és adhéziós integrinek kapcsolata az eseménymentes túléléssel stentimplantáció után. *Cardiologia Hungarica* 2006; 36: A42.

2. Kónyi A., Pintér T., Aradi D., Horváth I. : Minden koszorúér-betegnél frakcionált flow rezervet kell mérni? *Cardiologia Hungarica* 2006; 36: A49.

3. Aradi D, Pintér T, Horváth I, Kovács E, Magyar B, Kónyi A, Komócsi A. The impact of diabetes mellitus on the efficacy of combined antiplatelet therapy after coronary stent implantation. *Cardiologia Hungarica* 2007.

4. Aradi D., Pintér T., Kónyi A., Horváth I., Kovács E., Magyar B., Komócsi A. 150 mg fenntartó dózisú clopidogrel csökkenti a magas reziduális thrombocytá-reaktivitás gyakoriságát percutan coronaria intervenció után. *Cardiologia Hugarica* 2008; 38: B36.

5. Magyar Balázs, Horváth Iván, Kónyi Attila, Komócsi András, Pintér Tünde, Kovács Erik, Aradi Dániel, Papp Lajos: A gyógyszerkibocsátó stent felhasználás változása a 2006-os ESC tükrében. *Cardiologia Hugarica* 2008; 38: B61.

6. Pintér Tünde, Aradi Dániel, Komócsi András, Kovács Erik, Kónyi Attila, Magyar Balázs, Horváth Iván, Francesco Burzotta, Darius Dudek: PIHRATE (Polish-Italian-Hungarian randomized thrombectomy trial) tanulmány eredményei. *Cardiologia Hugarica* 2008; 38: B86.

7. Kovács Erik, Komócsi András, Kónyi Attila, Pintér Tünde, Aradi Dániel, Magyar Balázs, Horváth Iván: Az On-site záróeszköz betanulási fázisának vizsgálata az artéria femorális behatolásból végzett diagnosztikus koronarográfián átesett betegek körében. *Cardiologia Hugarica* 2008; 38: B59

8. Aradi D, Vorobcsuk A, Sayour A, Magyarlaki T, Tökés-Füzesi M, Rideg O, Horváth IG, Komócsi A.: Optikai aggregometria mérési eredményeinek összevetése specifikus P2Y12 receptor gátlás áramlási citometriás meghatározásával. *Cardiologia Hugarica* 2009; 39: A19

9. Komócsi A, Vorobcsuk A, Ungi I, Aradi D, Horváth IG, Kónyi A.: Transzradiális PCI akut miokardiális infarktusz ellátása során – szisztematikus irodalmi áttekintés és metaanalízis. *Cardiologia Hugarica* 2009; 39: A1.

#### V. International Poster Presentations / Nemzetközi poszter demonstrációk

1. Aradi D, Konyi A, Palinkas L, Berki T, Pinter T, Tahin T, Horvath I, Papp L, Komocsi A. Efficacy of thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. *Transcatheter Cardiovascular Therapeutics* 2006 (TCT'06), Washington DC.

2. Aradi D, Konyi A, Palinkas L, Berki T, Pinter T, Tahin T, Horvath I, Papp L, Komocsi A. Efficacy of thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. *Joint Meeting of ESC and WCC, Barcelona* 2006.

3. D. Aradi, T. Pinter, I. Horvath, A. Konyi, A. Komocsi. Low response to thienopyridine therapy after stent implantation is associated with the need for target vessel revascularization in elective but not in acute coronary syndrome patients. ESC Annual Congress, 2007 Vienna.
4. D. Aradi, Iván G. Horváth, Tünde Pintér, Attila Kónyi, András Komócsi. Low Platelet Disaggregation Predicts Impaired Response to High Maintenance Dose of Clopidogrel in Patients with High Post-Clopidogrel Platelet Reactivity. Transcatheter Cardiovascular Therapeutics 2008 (TCT'08), Washington DC.
5. D. Aradi, A. Vorobcsuk, M. Tokes-Fuzesi, T. Magyarlaki, IG. Horvath, A. Komocsi. Monitoring P2Y12 receptor inhibition with light transmission aggregometry: a comparison with vasodilator stimulated phosphoprotein phosphorylation assay. ESC Annual Congress, 2009, Barcelona.

## References / Referenciák

1. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* 1994; 331: 496–501.
2. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* 1994; 331: 489–95.
3. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Horvath I, Keltai M, Herrman JP, Van de Werf F, Downey WE, Scirica BM, Murphy SA, Antman EM; TRITON-TIMI 38 Investigators. Intensive oral antiplatelet therapy for reduction of ischaemic events including stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with percutaneous coronary intervention and stenting in the TRITON-TIMI 38 trial: a subanalysis of a randomised trial. *Lancet*. 2008; 371:1353-63.
4. Rinaldi MJ, Kirtane AJ, Piana RN, Caputo RP, Gordon PC, Lopez JJ, Dauerman HL, Ryan TJ Jr, Kiernan FJ, Cutlip DE, Ho KK, Gibson CM, Murphy SA, Cohen DJ. Clinical, procedural, and pharmacologic correlates of acute and subacute stent thrombosis: results of a multicenter case-control study with 145 thrombosis events. *Am Heart J*. 2008; 155:654-60.
5. Urban P, Macaya C, Rupprecht HJ, et al. Randomized evaluation of anticoagulation versus antiplatelet therapy after coronary stent implantation in high-risk patients: the multicenter aspirin and ticlopidine trial after intracoronary stenting (MATTIS). *Circulation* 1998; 98:2126-32.
6. Bertrand ME, Legrand V, Boland J, et al. Randomized multicenter comparison of conventional anticoagulation versus antiplatelet therapy in unplanned and elective coronary stenting. The full anticoagulation versus aspirin and ticlopidine (FANTASTIC) study. *Circulation* 1998; 98:1597-603.
7. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, et al. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study (STARS) Investigators. *N Engl J Med* 1998; 339:1665-71.
8. Schömig A, Neumann FJ, Kastrati A, et al. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996; 334:1084-9.
9. Kastrati A, Dibra A, Eberle S, Mehilli J, Suárez de Lezo J, Goy JJ, Ulm K, Schömig A. Sirolimus-eluting stents vs paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease: meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 2005; 294:819-25.
10. Schömig A, Dibra A, Windecker S, Mehilli J, Suárez de Lezo J, Kaiser C, Park SJ, Goy JJ, Lee JH, Di Lorenzo E, Wu J, Jüni P, Pfisterer ME, Meier B, Kastrati A. A meta-analysis of 16 randomized trials of sirolimus-eluting stents versus paclitaxel-eluting stents in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:1373-80.
11. Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation* 2002; 105:2974-80.
12. Singh M, Gersh BJ, McClelland RL, Ho KK, Willerson JT, Penny WF, Holmes DR Jr. Clinical and angiographic predictors of restenosis after percutaneous coronary intervention: insights from the Prevention of Restenosis With Tranilast and Its Outcomes (PRESTO) trial. *Circulation* 2004; 109:2727-31.
13. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357:2482-94.
14. Virmani R, Farb A. Pathology of in-stent restenosis. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10:499-506.
15. Doyle B, Rihal CS, O'Sullivan CJ, Lennon RJ, Wiste HJ, Bell M, Bresnahan J, Holmes DR Jr. Outcomes of stent thrombosis and restenosis during extended follow-up of patients treated with bare-metal coronary stents. *Circulation* 2007; 116:2391-8.
16. Tan KT, Lip GY. The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2005; 94:488-492.
17. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324:71-86.
18. Smith SC Jr, Feldman TE, Hirshfeld JW Jr, Jacobs AK, Kern MJ, King SB III, Morrison DA, O'Neill WW, Schaff HV, Whitlow PL, Williams DO. 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 (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). American Heart Association Web Site. Available at: <http://www.americanheart.org>.
19. Silber S, Albertsson P, Avilés FF, Camici PG, Colombo A, Hamm C, Jørgensen E, Marco J, Nordrehaug JE, Ruzyllo W, Urban P, Stone GW, Wijns W; Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005; 26:804-47.
20. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, Costa MA. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1505-16.
21. Verstuyft C, Tabassome S, Kim RB. Personalized medicine and antiplatelet therapy: ready for prime time? *Eur Heart J*. 2009; 30:1943-63.

22. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009; 360(4):363-375.
23. Juurlink DN, Gomes T, Ko DT, Szmítko PE, Austin PC, Tu JV et al. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ* 2009; 180:713-718.
24. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348:1329-39.
25. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK; Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001; 345:494-502.
26. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, López-Sendón JL, Montalescot G, Theroux P, Claeys MJ, Cools F, Hill KA, Skene AM, McCabe CH, Braunwald E; CLARITY-TIMI 28 Investigators. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2005; 352:1179-89.
27. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Collins R, Liu LS; COMMIT (ClopIdogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005; 366:1607-21.
28. Wang TH, Bhatt DL, Fox KA, Steinhubl SR, Brennan DM, Hacke W, Mak KH, Pearson TA, Boden WE, Steg PG, Flather MD, Montalescot G, Topol EJ; CHARISMA Investigators. An analysis of mortality rates with dual-antiplatelet therapy in the primary prevention population of the CHARISMA trial. *Eur Heart J* 2007; 28:2200-7.
29. 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; 288:2411-20.
30. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA; Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001; 358:527-33.
31. Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT, Rickenbacher P, Hunziker P, Mueller C, Jeger R, Bader F, Osswald S, Kaiser C; BASKET-LATE Investigators. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:2584-91.
32. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann FJ, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA, Riesmeyer J, Weerakkody G, Gibson CM, Antman EM; TRITON-TIMI 38 Investigators. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007; 357:2001-15.
33. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA; the PLATO Investigators. Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med* 2009; 361:1045-57.
34. Kastrati A, Mehilli J, Neumann FJ, Dotzer F, ten Berg J, Bollwein H, Graf I, Ibrahim M, Pache J, Seyfarth M, Schühlen H, Dirschinger J, Berger PB, Schömig A; Intracoronary Stenting and Antithrombotic: Regimen Rapid Early Action for Coronary Treatment 2 (ISAR-REACT 2) Trial Investigators. Abciximab in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention after clopidogrel pretreatment: the ISAR-REACT 2 randomized trial. *JAMA* 2006; 295:1531-8.
35. Topol EJ, Mark DB, Lincoff AM, Cohen E, Burton J, Kleiman N, Talley D, Sapp S, Booth J, Cabot CF, Anderson KM, Califf RM. Outcomes at 1 year and economic implications of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade in patients undergoing coronary stenting: results from a multicentre randomised trial. EPISTENT Investigators. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting. *Lancet* 1999; 354:2019-24.
36. O'Shea JC, Hafley GE, Greenberg S, Hasselblad V, Lorenz TJ, Kitt MM, Strony J, Tchong JE; ESPRIT Investigators (Enhanced Suppression of the Platelet IIb/IIIa Receptor with Integrilin Therapy trial). Platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade with eptifibatid in coronary stent intervention: the ESPRIT trial: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285:2468-73.
37. Feit F, Voeltz MD, Attubato MJ, Lincoff AM, Chew DP, Bittl JA, Topol EJ, Manoukian SV. Predictors and impact of major hemorrhage on mortality following percutaneous coronary intervention from the REPLACE-2 Trial. *Am J Cardiol* 2007; 100:1364-9.
38. Kastrati A, Mehilli J, Schühlen H, Dirschinger J, Dotzer F, ten Berg JM, Neumann FJ, Bollwein H, Volmer C, Gawaz M, Berger PB, Schömig A; Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen-Rapid Early Action for Coronary Treatment Study Investigators. A clinical trial of abciximab in elective percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidogrel. *N Engl J Med* 2004; 350:232-8.
39. Newby LK, Califf RM, White HD, Harrington RA, Van de Werf F, Granger CB, Simes RJ, Hasselblad V, Armstrong PW. The failure of orally administered glycoprotein IIb/IIIa inhibitors to prevent recurrent cardiac events. *Am J Med* 2002; 112:647-58.
40. Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2007; 28:1702-8.
41. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation*. 2002; 105(14):1650-5.
42. Bhatt DL. Aspirin resistance: more than just a laboratory curiosity. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(6):1127-1129.
43. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008; 336:195-8.
44. D. Aradi, T. Paska, M. Tökés-Füzesi, A. Komócsi. Monitoring the Efficacy of Antiplatelet Therapy: All Methods are Equal, but Some Methods are More Equal than Others? *Am Heart J* 2008;155:e33.
45. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45:246-51.
46. Heptinstall S, Glenn JR, May JA, Storey RF, Wilcox RG. Clopidogrel resistance. *Catheter Cardiovasc Interv* 2004; 63:397-398.
47. Muller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schonig A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003; 89:783-787.

48. Foussas SG, Zairis MN, Patsourakos NG, Makrygiannis SS, Adamopoulou EN, Handanis SM, Prekates AA, Fakiolas CN, Pissimissis EG, Olympios CD, Argyrakis SK. The impact of oral antiplatelet responsiveness on the long-term prognosis after coronary stenting. *Am Heart J* 2007; 154:676-81.
49. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109:3171-3175.
50. Hochholzer W, Trenk D, Bestehorn HP, et al. Impact of the degree of peri-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48:1742-1750.
51. 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.
52. Geisler T, Langer H, Wydymus M, et al. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur Heart J* 2006; 27:2420-2425.
53. Gurbel PA, Bliden KP, Samara W, Yoho JA, et al. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1827-1832.
54. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Jukema JW, Huisman MV. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 2007; 154:221-31.
55. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, Gensini GF, Santini A, Panicia R, Moschi G, Gori AM, Abbate R, Antoniucci D. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49:2312-7.
56. Gachet C and Aleil B. Testing antiplatelet therapy. *Eur Heart J Suppl* 2008; 10:A28-A34.
57. Schäfer A, Weinberger S, Flierl U, Eigenthaler M, Störk S, Walter U, Ertl G, Bauersachs J. ADP-induced platelet aggregation frequently fails to detect impaired clopidogrel-responsiveness in patients with coronary artery disease compared to a P2Y12-specific assay. *Thromb Haemost* 2008; 100:618-25.
58. Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, Boyer C, Panagides D, Wittenberg O, Simeoni MC, Barragan P, Dignat-George F, Paganelli F. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51:1404-11)
59. Aradi D, Konyi A, Palinkas L, Berki T, Pinter T, Tahin T, Horvath I, Papp L, Komocsi A. Thienopyridine therapy influences late outcome after coronary stent implantation. *Angiology* 2008; 59:172-8.
60. Rocca B, Patrono C. Determinants of the interindividual variability in response to antiplatelet drugs. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1597-602.
61. Geisler T, Grass D, Bigalke B, Stellos K, Drosch T, Dietz K, Herdeg C, Gawaz M. The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *J Thromb Haemost*. 2008; 6:54-61.
62. Ferreira IA, Mocking AI, Feijge MA, Gorter G, van Haften TW, Heemskerk JW, Akkerman JW. Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:417-22.
63. El Haouari M, Rosado JA. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: A review. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41:119-23.
64. Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B, et al. Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) study. *Circulation* 2007; 115:708-16.
65. Fontana P, Senouf D, Mach F. Biological effect of increased maintenance dose of clopidogrel in cardiovascular outpatients and influence of the cytochrome P450 2C19\*2 allele on clopidogrel responsiveness. *Thromb Res* 2008; 121:463-8.
66. von Beckerath N, Kastrati A, Wiecek A, et al. A double-blind, randomized study on platelet aggregation in patients treated with a daily dose of 150 or 75 mg of clopidogrel for 30 days. *Eur Heart J* 2007; 28:1814-9.
67. Angiolillo DJ, Bernardo E, Palazuelos J, et al. Functional impact of high clopidogrel maintenance dosing in patients undergoing elective percutaneous coronary interventions. Results of a randomized study. *Thromb Haemost* 2008; 99:161-8.
68. Gladding P, Webster M, Zeng I, Farrell H, Stewart J, Ruygrok P, Ormiston J, El-Jack S, Armstrong G, Kay P, Scott D, Gunes A, Dahl ML. The Antiplatelet Effect of Higher Loading and Maintenance Dose Regimens of Clopidogrel The PRINC (Plavix Response in Coronary Intervention) Trial. *JACC Cardiovasc Interv* 2008; 1:612-9.
69. Aradi D, Vorobcsuk A, Zsófia L, Horváth IG, Komócsi A. Low platelet disaggregation predicts poor response to 150 mg clopidogrel in patients with elevated platelet reactivity. *Platelets* 2009 Nov 23. [Epub ahead of print]
70. Pena A, Collet JP, Hulot JS, Silvain J, Barthélémy O, Beygui F, Funck-Brentano C, Montalescot G. Can we override clopidogrel resistance? *Circulation* 2009; 119:2854-7.
71. Kiemeneij F & Laarman G. Percutaneous transradial artery approach for coronary stent implantation. *CathetCardiovascDiagn* 1993; 30:173-8.
72. Agostoni P, Biondi-Zoccai G, de Benedictis M et al. Radial versus femoral approach for percutaneous coronary diagnostic and interventional procedures; Systematic overview and meta-analysis of randomized trials. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:349-56.
73. Jolly S, Amlani S, Hamon M et al. Radial versus femoral access for coronary angiography or intervention and the impact on major bleeding and ischemic events: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am Heart J* 2009; 157:132-40.
74. Cooper C, El Shiekh R, Cohen D et al. Effect of transradial access on quality of life and cost of cardiac catheterization: A randomized comparison. *Am Heart J* 1999; 138:430-6.
75. Mann JT III, Cubeddu M, Schneider J et al. Right Radial Access for PTCA: A Prospective Study Demonstrates Reduced Complications and Hospital Charges. *J Invasive Cardiol* 1996; 8 Suppl D: 40D-44D.
76. Cantor W, Puley G, Natarajan M et al. Radial versus femoral access for emergent percutaneous coronary intervention with adjunct glycoprotein IIb/IIIa inhibition in acute myocardial infarction--the RADIAL-AMI pilot randomized trial. *Am Heart J* 2005; 150:543-9.
77. Charlat M. Rescue percutaneous coronary intervention using transradial arterial access with glycoprotein IIb/IIIa inhibitor eptifibatid therapy initiated post-fibrinolysis. *JInvasiveCardiol* 2000; 12 Suppl D:13D-15D.

78. Chen Y, Wu C, Chang H et al. Effects and safety of intracoronary thrombectomy using transradial application of the PercuSurge distal balloon protection system in patients with early or recent myocardial infarction. *Cardiology* 2004; 102:206-14.
79. Louvard Y, Benamer H, Garot P et al. Comparison of transradial and transfemoral approaches for coronary angiography and angioplasty in octogenarians (the OCTOPLUS study). *Am J Cardiol* 2004; 94:1177-80.
80. Mann T, Cubeddu G, Bowen J et al. Stenting in acute coronary syndromes: a comparison of radial versus femoral access sites. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:572-6.
81. Ochiai M, Isshiki T, Toyozumi H et al. Efficacy of transradial primary stenting in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999; 83:966-8, A10.
82. Valsecchi O, Musumeci G, Vassileva A et al. Safety, feasibility and efficacy of transradial primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *Ital Heart J* 2003; 4: 329-34.
83. Chase A, Fretz E, Warburton W et al. Association of the arterial access site at angioplasty with transfusion and mortality: the M.O.R.T.A.L study (Mortality benefit Of Reduced Transfusion after percutaneous coronary intervention via the Arm or Leg). *Heart (British Cardiac Society)* 2008; 94:1019-25.
84. Eikelboom J, Mehta S, Anand S et al. Adverse impact of bleeding on prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2006; 114:774-82.
85. Manoukian S, Voeltz M & Eikelboom J. Bleeding complications in acute coronary syndromes and percutaneous coronary intervention: predictors, prognostic significance, and paradigms for reducing risk. *Clin Cardiol* 2007; 30:II24-II34.
86. Manoukian S, Feit F, Mehran R et al. Impact of major bleeding on 30-day mortality and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes: an analysis from the ACUITY Trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:1362-8.
87. Stroup D, Berlin J, Morton S et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA* 2000; 283:2008-12.
88. Biondi-Zoccai G, Lotrionte M, Anselmino M et al. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials appraising the impact of cilostazol after percutaneous coronary intervention. *Am Heart J* 2008; 155:1081-9.
89. Jadad A, Moore R, Carroll D et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary?. *Control Clin Trials* 1996; 17:1-12.
90. Clarke M OA. Cochrane Reviewers Handbook 4.1.3. In *The cochrane library*. Oxford UK (Ed.). 2001.
91. Brasselet C, Tassan S, Nazeyrollas P et al. Randomised comparison of femoral versus radial approach for percutaneous coronary intervention using abciximab in acute myocardial infarction: results of the FARMi trial. *Heart* 2007; 93:1556-61.
92. Chodor P, Krupa H, Kurek T et al. Radial versus femoral approach for percutaneous coronary interventions in patients with acute myocardial infarction. (RADIAMI) A prospective randomized, single center clinical trial. *Cardiol J* 2009; 16:332-40.
93. Saito S, Tanaka S, Hiroe Y et al. Comparative study on transradial approach vs. transfemoral approach in primary stent implantation for patients with acute myocardial infarction: results of the test for myocardial infarction by prospective unicenter randomization for access sites (TEMPURA) trial. *CatheterCardiovascInterv* 2003; 59:26-33.
94. Yan Z, Zhou Y, Zhao Y et al. Safety and feasibility of transradial approach for primary percutaneous coronary intervention in elderly patients with acute myocardial infarction. *Chinese medical journal* 2008; 121:782-6.
95. Hetherington SL, Adam Z, Morley R et al. Primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction - changing patterns of vascular access, radial versus femoral artery. *Heart* 2009; 95:1612-8.
96. Cruden NLM, Teh CH, Starkey IR et al. Reduced vascular complications and length of stay with transradial rescue angioplasty for acute myocardial infarction. *Catheterization and cardiovascular interventions* 2007; 70:670-5.
97. Diaz de la Llera LS, Fournier Andray J, Gomez MS et al. [Transradial approach for percutaneous coronary stenting in the treatment of acute myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57:732-6.
98. Kassam S, Cantor W, Patel D et al. Radial versus femoral access for rescue percutaneous coronary intervention with adjuvant glycoprotein IIb/IIIa inhibitor use. *Can J Cardiol* 2004; 20:1439-42.
99. Kim J, Yoon J, Jung H et al. Feasibility of the radial artery as a vascular access route in performing primary percutaneous coronary intervention. *Yonsei Med J* 2005; 46:503-10.
100. Philippe F, Larrazet F, Meziane T et al. Comparison of transradial vs. transfemoral approach in the treatment of acute myocardial infarction with primary angioplasty and abciximab. *CatheterCardiovascInterv* 2004; 61:67-73.
101. Yatskar L, Selzer F, Feit F et al. Access site hematoma requiring blood transfusion predicts mortality in patients undergoing percutaneous coronary intervention: data from the National Heart, Lung, and Blood Institute Dynamic Registry. *CatheterCardiovascInterv* 2007; 69:961-6.
102. Bassand J, Hamm C, Ardissino D et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007;28:1598-660.
103. Sciahbasi A, Pristipino C, Ambrosio G et al. Arterial access-site-related outcomes of patients undergoing invasive coronary procedures for acute coronary syndromes (from the ComPaRison of Early Invasive and Conservative Treatment in Patients With Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes [PRESTO-ACS] Vascular Substudy). *Am J Cardiol* 2009; 103:796-800.
104. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, Kastrati A, Schömig A, Schömig E. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:486-501.
105. Kuliczowski W, Witkowski A, Polonski L, Watala C, Filipiak K, Budaj A, Golanski J, Sitkiewicz D, Pregowski J, Gorski J, Zembala M, Opolski G, Huber K, Arnesen H, Kristensen SD, De Caterina R. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2009;30:426-35.
106. Vorobcsuk A, Kónyi A, Aradi D, Horváth IG, Ungi I, Louvard Y, Komócsi A. Transradial Versus Transfemoral Percutaneous Coronary Intervention in Acute Myocardial Infarction. Systematic Overview and Meta-Analysis. *Am Heart J* 2009; 158: 814-21.