



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Драгана С. Стокановић

**Утицај генске варијабилности П-гликопротеина
и цитохрома П450 на фармакокинетику
клопидогрела код болесника са акутним
коронарним синдромом**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2016. година



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Dragana S. Stokanović

**The effect of P-glycoprotein and cytochrome P450
genetic variability on clopidogrel pharmacokinetics
in patients with acute coronary syndrome**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.

Ментор:

Ванредни професор, проф. др Татјана Јевтовић Стоименов
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Наслов докторске дисертације:

Утицај генске варијабилности П-гликопротеина и цитохрома П450 на фармакокинетику клопидогрела код болесника са акутним коронарним синдромом

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

1. Редовни професор, проф. др Зорица Јовић, председник
Универзитет у Нишу, Медицински факултет
2. Редовни професор, проф. др Срђан Пешић, члан
Универзитет у Нишу, Медицински факултет
3. Редовни професор, проф. др Слободан Јанковић, члан са МФ у Крагујевцу
Универзитет у Крагујевцу, Медицински факултет
4. Ванредни професор, проф. др Татјана Јевтовић Стоименов, ментор
Универзитет у Нишу, Медицински факултет
5. Ванредни професор, проф. др Светлана Апостоловић, члан
Универзитет у Нишу, Медицински факултет

Датум одбране: _____

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	Проф. др Татјана Јевтовић Стоименов, ванредни професор Медицински факултет, Универзитет у Нишу
Наслов:	Утицај генске варијабилности П-гликопротеина и цитохрома П450 на фармакокинетику клопидогрела код болесника са акутним коронарним синдромом
Резиме:	Клопидогрел је антиагрегациони лек у терапији акутног коронарног синдрома. Као пролек, ресорбује у танком цреву где на његову апсорпцију утиче активност П-гликопротеина. Метаболичка трансформација до активног метаболита протиче кроз две фазе, преко интермедијерног метаболита 2-оксо-клопидогрела, уз учешће бројних ензима цитохром П-450. Истраживање је изведено на пацијентима са акутним коронарним синдромом, у чијој плазми је методом ултрабрзе течне хроматографије са тандем масеним детектором (<i>UHPLC-MS/MS</i>) измерена концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела. За потребе фармакогенетског испитивања, ДНК пацијената је изолована из узорака пуне крви и одгређивани су генски полиморфизми П-гликопротеина (<i>ABCB1 C3435T</i>) и ензима цитохром П450 (<i>CYP2C19*2</i>, <i>CYP2C19*17</i> и <i>CYP2C9*2</i>). Статистичким методама и методом популационе фармакокинетске анализе је испитиван утицај генске варијабилности, али и клиничких фактора и комедикације, на фармакокинетику клопидогрела. Добијени резултати показују да су код пацијената са <i>ABCB1 3435TT</i> генотипом, концентрације клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела ниже у поређењу са носиоцима барем једног нормалног алела овог гена. Међутим, није утврђен значај генске варијабилности <i>CYP2C19</i> и <i>CYP2C9</i>, на фармакокинетику клопидогрела. Методом популационе фармакокинетске анализе, утврђено је да на клиренс клопидогрела утичу ниво аланин аминотрансферазе, дневна доза клопидогрела, телесна маса и комедикација пантопразолом. Остали фактори који могу утицати на фармакокинетику клопидогрела, а чији је значај потврђен овим истраживањем, су: старост, пол, телесна висина, ејекциона фракција леве коморе, срчана фреквенца, липидни статус, дијабетес мелитус типа 2, као и комедикација <i>ACE</i>-инхибиторима, бета-блокаторима, амлодипином и триметазидином. Може се закључити, на основу овог истраживања, да генска варијабилност П-гликопротеина представља значајну варијаблу у фармакокинетици клопидогрела, а самим тим утиче и на инхибицију агрегације тромбоцита и на клинички ток болести. Осим тога, при прописивању антиагрегационе терапије код болесника са акутним коронарним синдромом треба узети у обзир и низ других фактора, као и могућност за настанак интеракција.
Научна област:	медицина

Научна дисциплина:	фармакологија
Кључне речи:	клопидогрел, 2-оксо-клопидогрел, фармакокинетика, фармакогенетика, П-гликопротеин, цитохром П450 ензим, <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2C9</i> , акутни коронарни синдром
УДК:	615.22.015:575]616.12(043.3)
CERIF класификација:	В 740 Фармаколошке науке, фармакогнозија, фармација, токсикологија
Тип лиценце Креативне заједнице:	<i>CC BY-NC-ND</i>

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Prof. dr Tatjana Jevtović Stoimenov University of Niš. School of Medicine
Title:	The effect of P-glycoprotein and cytochrome P450 genetic variability on clopidogrel pharmacokinetics in patients with acute coronary syndrome
Abstract:	Clopidogrel is an antiplatelet agent prescribed in patients with acute coronary syndrome. As a prodrug, it is being absorbed in small intestine, which is affected by the activity of P-glycoprotein. Its metabolic transformation towards the active metabolite has two phases, with 2-oxo-clopidogrel as an intermediary metabolite, involving numerous cytochrome P450 enzymes. The study was performed on patients with acute coronary syndrome. Using ultrahigh performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), concentrations of clopidogrel and 2-oxo-clopidogrel were measured in patients' plasma. Pharmacogenetic testing included the determination of P-glycoprotein (ABCB1 C3435T) and cytochrome P450 polymorphisms (CYP2C19*2, CYP2C19*17 and CYP2C9*2). Using statistical and population pharmacokinetic analysis methods, we aimed to determine the effect of genetic variability on clopidogrel pharmacokinetics, as well of the other clinical factors and co-medication. Our results show that patients with ABCB1 3435TT genotype achieve lower concentrations of clopidogrel and 2-oxo-clopidogrel in plasma, in comparison with the carriers of at least one wild-type allele. Genetic variability of CYP2C19 and CYP2C9 had no significance for clopidogrel pharmacokinetics. The model of clopidogrel clearance, developed by population pharmacokinetic analysis, pointed out alanine aminotransferase, clopidogrel daily dose, total body mass and co-medication with pantoprazole, as significant covariates. Other factors that may be significant, and whose role in clopidogrel pharmacokinetics was proven in this study, were: age, gender, body height, left ventricle ejection fraction, heart rate, lipid status, diabetes mellitus type 2, as well as co-medication with ACE-inhibitors, beta-blockers, amlodipine and trimetazidine. As a conclusion, it can be stated that P-glycoprotein genetic variability is significantly involved in clopidogrel pharmacokinetics, which further affects the platelet aggregation inhibition and the patients' clinical course. Besides, while prescribing antiplatelet therapy in patients with acute coronary syndrome, numerous other factors and the possibility of interactions, should be taken into account.
Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Pharmacology

Key Words:	clopidogrel, 2-oxo-clopidogrel, pharmacokinetics, pharmacogenetics, P-glycoprotein, cytochrome P450 enzymes, CYP2C19, CYP2C9, acute coronary syndrome
UDC:	615.22.015:575]616.12(043.3)
CERIF Classification:	B 740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

Желим да се захвалим својим колегама и сарадницима који су имали великог утицаја на мој професионални развој и који су, сваки на свој начин, допринели да ова дисертација угледа светлост дана.

Неизмерну захвалност дугујем проф. др Татјани Јевтовић Стоименов, свом ментору, на поверењу које ми је указала, на одлучном и стручном усмеравању, и корисним саветима баш онда када су били потребни.

Такође, желела бих да изразим своју дубоку захвалност проф. др Зорици Јовић, проф. др Срђану Пешићу, проф. др Слободану Јанковићу и проф. др Светлани Апостоловић, за безрезервну подршку коју су ми указали, стручне и веома корисне сугестије током мог рада на овој дисертацији.

Доц. др Валентини Николић, од које је и потекла идеја за ово истраживање, се захваљујем за свесрдну помоћ, ентузијазам и креативност које је делила са мном. Заједнички рад је био посебно и драгоцено искуство.

Желим да се захвалим проф. др Душици Павловић на пројекту „Превентивни, терапијски и етички приступ преклиничким и клиничким истраживањима гена и модулатора редокс ћелијске сигнализације у имунском, инфламаторном и пролиферативном одговору ћелије“ (III41018), чији је руководилац, и Министарству просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије које је финансирало овај пројекат.

И на крају, неизмерно хвала мојој породици, наслеђеној и стеченој, за пружену љубав, разумевање и неопходну подршку без које свакако не бих могла да завршим ово путовање са успехом.

Невени...

СКРАЋЕНИЦЕ

АИМ	акутни инфаркт миокарда
АКС	акутни коронарни синдром
ДМ	дијабетес мелитус тип 2
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
ЕКГ	електрокардиограм
ЕМ	екстензивни метаболизер
ИМ	интермедијерни метаболизер
ИПП	инхибитори протонске пумпе
иРНК	информациона рибонуклеинска киселина
ПИК	површина испод криве
ПФК анализа	популациона фармакокинетска анализа
СМ	спори метаболизер
УМ	ултрабрзи метаболозер
ФК	фармакокинетски
ЦВИ	цереброваскуларни инзулт
<i>ACE</i>	ангиотензин конвертујући ензим (<i>angiotensin-converting enzyme</i>)
<i>ADP</i>	аденозин дифосфат (<i>adenosin diphosphate</i>)
<i>ATP</i>	аденозин трофосфат (<i>adenosin triphosphate</i>)
<i>BMI</i>	индекс телесне масе (<i>body-mass index</i>)
<i>cAMP</i>	циклични аденозин монофосфат (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)

<i>CES</i>	карбоксилестераза (<i>carboxylesterase</i>)
<i>COX</i>	циклооксигеназа (<i>cyclooxygenase</i>)
<i>FDA</i>	Америчка агенција за храну и лекове (<i>Food and Drug Administration</i>)
<i>GP</i>	гликопротеин (<i>glycoprotein</i>)
<i>HDL</i>	липопротеини високе густине (<i>high-density lipoproteins</i>)
<i>LDL</i>	липопротеини ниске густине (<i>low-density lipoproteins</i>)
<i>MOF</i>	минимум објективне функције (<i>minimum objective function</i>)
<i>NSTEMI</i>	акутни коронарни синдрома без <i>ST</i> -елевације (<i>non-ST-segment elevation myocardial infarction</i>)
<i>PAR1</i>	тромбоцитни протеазом активирани рецептор-1 (<i>protease-activated receptor-1</i>)
<i>PCI</i>	перкутана коронарна интервенција (<i>percutaneous coronary intervention</i>)
<i>PCR</i>	полимеразна ланчана реакција (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>PG</i>	простагландин (<i>prostaglandin</i>)
<i>PON</i>	параоксоназа (<i>paraoxonase</i>)
<i>SD</i>	стандардна девијација (<i>standard deviation</i>)
<i>STEMI</i>	акутни коронарни синдрома са <i>ST</i> -елевацијом (<i>ST- segment elevation myocardial infarction</i>)
<i>TXA2</i>	тромбоксан A2 (<i>thromboxane A2</i>)
<i>UHPLC-MS/MS</i>	ултрабрза течна хроматографија са тандем масеним детектором (<i>ultrahigh performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i>)
<i>VASP</i>	фосфорилисани фосфопротеин стимулисан вазодилатацијом (<i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>)

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. АКУТНИ ИНФАРКТ МИОКАРДА	3
2.2. АГРЕГАЦИЈА ТРОМБОЦИТА	4
2.2.1. МЕХАНИЗАМ ДЕЈСТВА ИНХИБИТОРА ADP-РЕЦЕПТОРА	6
2.2.2. ФУНКЦИОНАЛНИ ТЕСТОВИ АГРЕГАЦИЈЕ ТРОМБОЦИТА	7
2.3. АНТИАГРЕГАЦИОНА ТЕРАПИЈА КОД БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ	9
2.4. КЛОПИДОГРЕЛ	11
2.4.1. НАЧИН ДОЗИРАЊА КЛОПИДОГРЕЛА	12
2.4.2. ФАРМАКОКИНЕТИКА КЛОПИДОГРЕЛА	13
2.4.2.1. Варијабилност фармакокинетице клопидогрела.....	16
2.4.3. ФАРМАКОДИНАМИКА КЛОПИДОГРЕЛА	18
2.5. РЕЗИСТЕНЦИЈА НА АНТИАГРЕГАЦИОНУ ТЕРАПИЈУ	19
2.5.1. РЕЗИСТЕНЦИЈА НА КЛОПИДОГРЕЛ.....	22
2.6. П-ГЛИКОПРОТЕИН И ЊЕГОВИ ПОЛИМОРФИЗМИ	28
2.6.1. ПОЛИМОРФИЗМИ П-ГЛИКОПРОТЕИНА	30
2.6.2. ЗНАЧАЈ ПОЛИМОРФИЗАМА ГЕНА ЗА П-ГЛИКОПРОТЕИН КОД БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ.....	32
2.7. ЕНЗИМ <i>CYP2C19</i> И ЊЕГОВИ ПОЛИМОРФИЗМИ	32
2.8. ЗНАЧАЈ ПОЛИМОРФИЗАМА ЕНЗИМА <i>CYP2C19</i> КОД БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ.....	34
2.9. ПОЛИМОРФИЗАМ ЕНЗИМА <i>CYP2C9</i>	37

2.9.1. ЗНАЧАЈ ПОЛИМОРФИЗМА ЕНЗИМА CYP2C9 КОД БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ.....	38
2.10. ПАНТОПРАЗОЛ – ГАСТРОПРОТЕКЦИЈА КОД БОЛЕСНИКА НА ДВОЈНОЈ АНТИАГРЕГАЦИОНОЈ ТЕРАПИЈИ	39
<u>3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА</u>	<u>43</u>
<u>4. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА</u>	<u>45</u>
4.1. Нулте хипотезе.....	45
4.2. Радне хипотезе	46
<u>5. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ</u>	<u>47</u>
5.1. Испитаници.....	47
5.1.1. Клиничке и демографске карактеристике пацијената.....	49
5.1.2. Медикаментозна терапија у испитиваној групи.....	49
5.2. МЕТОДЕ	51
5.2.1. Узорковање материјала	51
5.2.2. Испитивање генских полиморфизама.....	51
5.2.2.1. Изолација ДНК	51
5.2.2.2. Испитивање генског полиморфизма <i>ABCB1 C3435T (rs1045642) APMC-PCR</i> методом.....	52
5.2.2.3. Испитивање генског полиморфизма <i>CYP2C19*2 (rs4244285) PCR-RFLP</i> методом.....	54
5.2.2.4. Испитивање генског полиморфизма <i>CYP2C19*17 (rs12248560) PCR-RFLP</i> методом.....	54
5.2.2.5. Испитивање генског полиморфизма <i>CYP2C9*2 (rs1799853) PCR-RFLP</i> методом.....	55
5.2.2.6. Вертикална електрофореза на 8% полиакриламидном гелу	55
5.2.2.7. Хоризонтална електрофореза на 2% агарозном гелу	55
5.2.3. Одређивање концентрација клопидогрела, 2-ОКСО-клопидогрела и ПАНТОПРАЗОЛА У ПЛАЗМИ МЕТОДОМ УЛТРАБРЗЕ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ СА ТАНДЕМ МАСЕНИМ ДЕТЕКТОРОМ	56

5.2.3.1. Припрема стандардних раствора	56
5.2.3.2. Припрема узорака	57
5.2.3.3. UHPLC-DAD-ESI-MS/MS анализа	57
5.2.4. МЕРЕЊЕ ИНХИБИЦИЈЕ АГРЕГАЦИЈЕ ТРОМБОЦИТА	62
5.2.5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА	63
5.2.6. ПОПУЛАЦИОНА ФАРМАКОКИНЕТИСКА АНАЛИЗА КЛОПИДОГРЕЛА	64

6. РЕЗУЛТАТИ.....67

6.1. КОНЦЕНТРАЦИЈА КЛОПИДОГРЕЛА И 2-ОКСО-КЛОПИДОГРЕЛА У ПЛАЗМИ	67
6.2. РЕЗУЛТАТИ ГЕНЕТСКИХ ИСПИТИВАЊА И ЊИХОВ УТИЦАЈ НА КОНЦЕНТРАЦИЈУ КЛОПИДОГРЕЛА И 2-ОКСО-КЛОПИДОГРЕЛА У ПЛАЗМИ	72
6.2.1. ПОЛИМОРФИЗАМ ABCB1 C3435T ГЕНА ЗА П-ГЛИКОПРОТЕИН.....	72
6.2.2. ПОЛИМОРФИЗАМ ГЕНА ЗА CYP2C19.....	73
6.2.3. ПОЛИМОРФИЗАМ ГЕНА ЗА CYP2C9.....	76
6.3. ФАРМАКОКИНЕТИСКЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ КЛОПИДОГРЕЛА	77
6.3.1. КОНЦЕНТРАЦИЈА ПАНТОПРАЗОЛА У ПЛАЗМИ	77
6.3.2. ИНТЕРАКЦИЈА КЛОПИДОГРЕЛА И ПАНТОПРАЗОЛА	77
6.3.3. ИНТЕРАКЦИЈЕ КЛОПИДОГРЕЛА СА ДРУГИМ ЛЕКОВИМА	78
6.4. УТИЦАЈ ГЕНЕТСКИХ ФАКТОРА, КОМЕДИКАЦИЈЕ И ДРУГИХ КАРАКТЕРИСТИКА ИСПИТИВАНЕ ГРУПЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЈЕ КЛОПИДОГРЕЛА И 2-ОКСО-КЛОПИДОГРЕЛА	82
6.5. ПОПУЛАЦИОНА ФАРМАКОКИНЕТИЧКА АНАЛИЗА КЛОПИДОГРЕЛА.....	83
6.6. ФАРМАКОДИНАМСКИ ЕФЕКАТ КЛОПИДОГРЕЛА И РЕЗИСТЕНЦИЈА НА КЛОПИДОГРЕЛ	86
6.7. ПРОГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ГЕНСКИХ ПОЛИМОРФИЗАМА И ДРУГИХ ФАКТОРА	91
6.7.1. МОРТАЛИТЕТ	91
6.7.2. РЕХОСПИТАЛИЗАЦИЈА	93
6.7.3. ПОТРЕБА ЗА ХИТНОМ МЕДИЦИНСКОМ ПОМОЋИ	96

7. ДИСКУСИЈА.....101

7.1. ЗНАЧАЈ ПОЛИМОРФИЗМА П- ГЛИКОПРОТЕИНА ABCB1 C3435T ЗА ФАРМАКОКИНЕТИКУ И ФАРМАКОДИНАМИКУ КЛОПИДОГРЕЛА	104
---	------------

7.2. ЗНАЧАЈ ПОЛОМОРФИЗАМА ЕНЗИМА <i>CYP2C19</i> ЗА ФАРМАКОКИНЕТИКУ И ФАРМАКОДИНАМИКУ КЛОПИДОГРЕЛА	107
7.3. ЗНАЧАЈ ПОЛОМОРФИЗМА ЕНЗИМА <i>CYP2C9</i> ЗА ФАРМАКОКИНЕТИКУ И ФАРМАКОДИНАМИКУ КЛОПИДОГРЕЛА	108
7.4. ПОПУЛАЦИОНА ФАРМАКОКИНЕТИСКА АНАЛИЗА КЛОПИДОГРЕЛА	109
7.5. ЗНАЧАЈ ОСТАЛИХ КЛИНИЧКИХ КАРАКТЕРИСТИКА И КОМЕДИКАЦИЈЕ ЗА ФАРМАКОКИНЕТИКУ И ФАРМАКОДИНАМИКУ КЛОПИДОГРЕЛА	113
<u>8. ЗАКЉУЧАК</u>	<u>121</u>
<u>9. ЛИТЕРАТУРА</u>	<u>123</u>
<u>БИОГРАФИЈА АУТОРА</u>	<u>153</u>

1. УВОД

Кардиоваскуларне болести су водећи узрок смрти у развијеним земљама, а међу њима коронарна болест срца. Секундарна превенција код болесника који су већ доживели акутни инфаркт миокарда је од изузетног значаја. У одсуству контраиндикација, пре свега повећаног ризика од крварења, спроводи се двојна антиагрегациона терапија – ацетилсалицилна киселина и инхибитор рецептора за аденозин дифосфат (*ADP*) (*P2Y₁₂*). Европске смернице, у већини клиничких ситуација, препоручују тикагрелор или прасугрел из ове групе антиагрегационих лекова, а клопидогрел као њихову замену. Код нас је клопидогрел још увек лек избора за превенцију реинфаркта миокарда.

Агрегација тромбоцита је физиолошки процес који се дешава на месту оштећења крвног суда, али уједно представља и основу за настанак и развој патолошких промена у организму. Неконтролисана агрегација тромбоцита и раст тромба на месту руптуре атероматозног плака у коронарним артеријама, или након перкутане коронарне интервенције тромбоза стента, могу довести до исхемије и некрозе миокарда. Идеални антиагрегациони лек би требало да делује иреверзибилно на тромбоците и тако оствари продужени ефекат, а да, насупрот томе, има релативно кратко полувреме елиминације чиме се скраћује ризик од нежељених дејстава. И ацетилсалицилна киселина и клопидогрел испуњавају ове услове.

Клопидогрел је лек из групе тиенопиридина чији се механизам дејства заснива на иреверзибилној инхибицији *P2Y₁₂* рецептора на површини тромбоцита. На овај начин, блокира се *ADP*-зависна активација тромбоцита агонистима као што су тромбоксан, фактор активације тромбоцита, колаген и тромбин. Иако сви ови агонисти у вишку поништавају ефекте клопидогрела, антиагрегациони ефекат се остварује индиректно инхибицијом алтернативног пута активације тромбоцита преко гликопротеина (*GP*) *IIa/IIIb* смањењем активности аденил циклазе и концентрације цикличног аденозин монофосфата (*cAMP*) у тромбоцитима.

Уобичајен дозни режим подразумева ударну дозу од 300-600мг, а затим се наставља дозом одржавања од 75мг једном дневно. Интензитет интестиналне ресорпције је око 85%, али може значајно варирати у зависности од активности транспортног П-гликопротеина на мембрани интестиналних ћелија. С обзиром да је клопидогрел пролек, његова ефикасност зависи од биотрансформације у јетри и стварања активног метаболита. Синтеза 2-оксо-клопидогрела, интермедијерног метаболита, одређује пут стварања активних тиол метаболита од којих је само *H4* стереоизомер активан *in vivo*. Свега око 15% клопидогрела се оксидује до 2-оксо-клопидогрела захваљујући ензимима цитохром П450 *CYP2C19*, *CYP1A2* и *CYP2B6*. У наредној фази стварања активног метаболита учествују *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP2B6* и *CYP3A4*. Полувреме елиминације клопидогрела је око 6-8 часова, интермедијерног метаболита 2-оксо-клопидогрела око 1-2ч, а активних метаболита свега око 30 минута.

Релативно висок проценат болесника (5-10%) показује резистенцију на клопидогрел. У овом случају, појам „резистенције“ је потребно дефинисати. „Клиничка резистенција“ се односи на појаву кардиоваскуларног догађаја и поред примењене двојне антиагрегационе терапије. „Лабораторијска резистенција“ подразумева примену тестова агрегације тромбоцита, при чему не морају бити присутне и „клиничке манифестације резистенције“.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Акутни инфаркт миокарда

Појам „акутни инфаркт миокарда“ (АИМ) се односи на постојање некрозе миокарда као последица акутне исхемије миокарда. Критеријуми за постављање дијагнозе АИМ су један од наведених:

- пораст и/или пад срчаних биомаркера, пре свега тропонина, изнад 99. перцентила и макар један од следећих критеријума
 - симптоми исхемије
 - нова, или вероватно нова, промена на *ST*-сегменту или *T*-таласу, или нови блок леве гране
 - развој патолошког *Q*-зубца на електрокардиограму (ЕКГ)
 - нови губитак вијабилности миокарда или нова абнормалност у регионалним покретима зида, видљиви имицинг (енг. *imaging*) методама
 - идентификација интракоронарног тромба ангиографијом или на обдукцији

Претходни АИМ се може дијагностификовати на основу присуства следећих критеријума:

- патолошки *Q*-зубац са/без симптома, у одсуству других, не-исхемијских, узрока
- регионални губитак вијабилности миокарда који је истањен и не контрахује се, у одсуству не-исхемијских узрока, потврђен имицинг методама
- патолошки налаз претходног АИМ

Појава АИМ у року од 28 дана након првог, „инцидентног“ АИМ се назива „рекурентним инфарктом миокарда“. Након овог периода, ради се о реинфаркту [1].

Акутни инфаркт миокарда се може презентовати као АИМ са или без *ST*-елевације, на основу чега се у оквирима исхемијске болести срца, класификује у групу акутног коронарног синдрома са (*STEMI*), односно без *ST*-елевације (*NSTEMI*). Лечење болесника значајно зависи од типа ЕКГ презентације, али се у оба случаја спроводи антиагрегациона терапија.

2.2. Агрегација тромбоцита

Физиолошка улога тромбоцита се огледа у омогућавању хемостазе њиховом адхеренцијом на месту повреде крвног суда. Међутим, и адхеренција и активација тромбоцита на месту фисуре или руптуре атеросклеротског плака би се могле сматрати физиолошком када би водиле његовој репарацији. Ипак, овај процес неконтролисано прогредира, што на крају доводи до стварања интралуминалног тромба, зачепљења крвног суда и пролазне исхемије или инфаркције. Антитромбоцитни лекови могу деловати на више нивоа овог процеса (активација, адхезија, агрегација тромбоцита), спречавајући интеракцију тромбоцита са инфламаторним ћелијама, почевши од фазе стварања атероматозног плака, па све до стварања оклузивног тромба на месту његове руптуре [2].

Активација тромбоцита и коагулација се нормално не дешавају у интактном крвном суду. Међутим након повреде, адхерирање тромбоцита на субендотелни колаген доводи до стварања тромбоцитног чепа. Као последица сила трења при протицању крви и крвних елемената кроз крвни суд, тромбоцити успоравају и интерагују са фон Вилебрандовим фактором везаним за колаген, и на крају се директно везују за колаген преко *GP*-рецептора. Активација ових рецептора активира фосфолипазу *C* и покреће каскаду реакција која резултира мобилизацијом калцијума из тубуларног система и активацијом киназа које омогућавају морфолошке промене на тромбоцитима. Активација тромбоцита подразумева презентацију прокоагуланте површине, секрецију садржаја гранула (*ADP*, аденозин трифосфат (*ATP*), серотонин) и активацију *GP* и фосфолипазе *A2*. С обзиром на високу концентрацију *ADP* у тромбоцитним гранулама,

и његово ослобађање по активацији тромбоцита, овај екстрацелуларни нуклеотид има кључну улогу у хемостазу и тромбозу. По ослобађању, везује се за рецепторе из *P2* групе, који се могу поделити у две класе: *P2X* лиганд зависне катјонске канале и *P2Y* рецепторе везане за *G*-протеин. Рецептор *P2Y1* даје слаб одговор на *ADP*, али је кључан у започињању активације тромбоцита, индуковане *ADP*-ом или колагеном, што доводи до агрегације и промене облика тромбоцита. На интрацелуларном нивоу, ове промене су пољедица повећане концентрације калцијума. Насупрот томе, активација *P2Y12* рецептора, преко инхибиторног *G*-протеина инхибира аденил циклазу и доводи до амплификације сигнала, без обзира на врсту почетног сигнала. Међутим, сама агрегација тромбоцита је последица активације интегрин *GPIIb/IIIa* посредством фосфоинозитид-3 киназе [3]. Осим, тога, активација овог тромбоцитног рецептора доводи до повећане експресије *P*-селектина, ослобађања тромбосана *A2* (*TXA2*) и привлачења тромбоцита из циркулације [4]. Активирана фосфолипаза *A2* ствара арахидонску киселину, прекурсор *TXA2*, из масних киселина као што су фосфатидилхолин и фосфатидилетаноламин. Синтеза *TXA2* се одвија у два корака: најпре циклооксигеназа (*COX*)-1 ствара цикличне ендопероксида простагландине (*PG*)

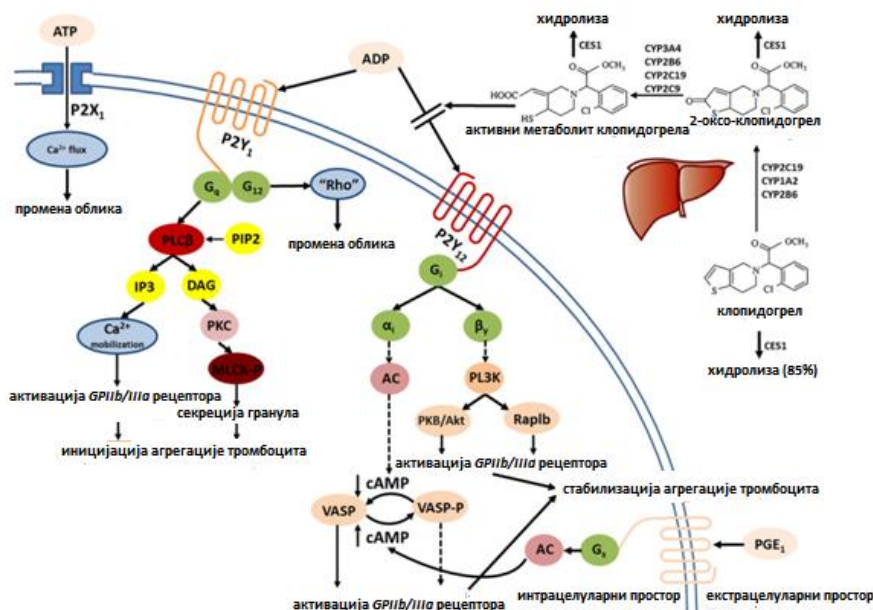
Активација тромбоцита има кључну улогу у патогенези, нарочито каснијих стадијума, болести у чијој основи лежи атеросклероза и тромбоза. Тромбоците могу активирати бројни физиолошки агонисти (*TXA2*, *ADP*, тромбин, серотонин и колаген), али и отпор при протицању кроз крвне судове. Осим тога, тромбоцити поседују способност аутоактивације, стварањем тромбина, чиме се амплификује сам сигнал за њихову агрегацију. До сада, само четири пута активације су мета антиагрегационе терапије: *COX-1*, фосфодиестераза, *GPIIa/IIIb* и *P2Y12*-рецептор за *ADP*. Инхибитори *PAR1* рецептора (тромбоцитни протеазом активирани рецептор-1) који инхибирају ефекте тромбина на тромбоцитима, али не и његову улогу у хемостазу, су још увек у фази испитивања [5].

Почетком савремене антиагрегационе терапије се може сматрати 2002. година и метаанализа *Antithrombotic Trialists metanalysis* која је показала смањење броја кардиоваскуларних догађаја за 25%. Статистички, 2% пацијената има добит од овог вида терапије што је наизглед мали проценат. Међутим, с обзиром да се ради о мултифакторској болести, она захтева и адекватну терапију из више аспеката, за

успешно лечење свих пацијената. Заправо, свега 10-20% болесника на секундарној превенцији антиагрегационим лековима развије рекурентни инфаркт миокарда [6].

2.2.1. Механизам дејства инхибитора ADP-рецептора

Клопидогрел и њему слични лекови блокирају ADP-рецепторе (P2Y₁₂) (Слика 1). Клопидогрел, и други лекови из ове групе са ирверзибилним дејством, се везују за рецептор стварањем дисулфидних мостова са Cys97 (горњи део трансмембранског домена) и Cys175 (друга екстрацелуларна петља). Реверзибилни инхибитор тикагрелор се везује за алостеријски центар, па не блокира само везивање ADP, али онемогућава конформациону промену G-протеина. Други лек са реверезибилним дејством, кангрелор, компетитивно блокира место на рецептору за везивање ADP [3]. Активација P2Y₁-рецептора започиње активацију тромбоцита, док је P2Y₁₂-рецептор задужен за промоцију одговора тромбоцита [7]. Тиме, активацијом инхибиторног G-протеина, инхибирају инхибицију аденил циклазе ADP-ом. Инхибиција аденил циклазе се супротставља стимулацији стварања cAMP под утицајем PG из ендотела. Циклични AMP има инхибиторни ефекат на инозитол трифосфат и ослобађање калцијума. Наиме, локална акумулација тромбина, TXA₂ и ADP обезбеђује накупљање тромбоцита и амплификацију сигнала за њихову агрегацију. Они доводе до активације рецептора везаних за G-протеине: тромбински рецептори (F2R и F2RL3, PAR1 и PAR4), TXA₂ рецептор и ADP рецептори (P2Y₁ и P2Y₁₂) [2]. Осим тога, сматра се да и cAMP делује инхибиторно на агрегацију тромбоцита. На тај начин, стимулацијом аденил циклазе и повећаним стварањем cAMP, добија се додатни антиагрегациони ефекат. Трећи механизам дејства ових лекова се заснива на појачаном антиагрегационом дејству PGE₁, делом и PGI₂, у присуству инхибитора ADP-рецептора [7].



Слика 1. Механизам дејства клопидогрела (преузето из Jiang и сарадници, 2015. [8])

2.2.2. Функционални тестови агрегације тромбоцита

Развијен је низ лабораторијских *in vitro* тестова чија је намена испитивање резидуалне активности тромбоцита након примене антиагрегационе терапије. Међутим, ниједан од тестова не указује на ризик од крварења, већ само на реактивност тромбоцита и ефикасност примењеног лека. На тачност мерења утиче комедикација лековима као што су антибиотици, деконгестиви и антидепресиви, али и други фактори као што су број тромбоцита, *pH* плазме, температура узорка, концентрација фибриногена, тип коришћеног антикоагуланса и техника извођача [9]. Сензитивност ових тестова се креће између 50% и 60%, специфичност је, такође, 50-60%, позитивна предиктивна вредност 5-15%, а негативна предиктивна вредност 90-95% за морталитет било ког узрока, нефатални АИМ, тромбозу стента и цереброваскуларни инзулт (ЦВИ) [10].

Најчешће коришћени тестови, са својим основним карактеристикама су следећи [5,9,8,11,12]:

- агрегометрија светлосном трансмисијом (*LTA*, енгл. *light transmission aggregometry*) – „златни стандард“
 - мери стварање агрегата тромбоцита у присуству агониста анализом светлосне пропустљивости добијене суспензије

- зависи од извођача, захтева велику запремину и припрему плазме, временски и економски захтевна метода
- агрегометрија из пуне крви на основу импеданце (енг. *impedance aggregometry*) – *Multiplate (MPA)*
 - потребна мала запремина узорка, добро стандардизована метода, велика брзина теста, слаба корелација са *LTA*
- одређивање фосфорилисаног фосфопротеина тромбоцита стимулисаног вазодилатацијом (*VASP*) уз помоћ проточне цитометрије
 - скупа метода, захтева проточни цитометар и техничко искуство извођача, компликована интерпретација резултата
- одређивање стварања хетероагрегата тромбоцита и леукоцита након стимулације *ADP*-ом, експресије активiranог *GPIIb/IIIa*, или експресије *P*-селектина на површини тромбоцита проточном цитометријом
- једноставније методе које брже дају резултате
 - *VerifyNow-P2Y12*
 - анализира ефикасност лека у инхибицији аглутинације и агрегације перлица обложених фибриногеном, активираним тромбоцитима
 - старија метода, брза, скупа, у доброј корелацији са „златним стандардом“, зависи од јачине спољашњег светла и нивоа хемоглобина
 - *PFA-100* анализатор тромбоцитне функције
 - мери отпор при протицању пуне крви кроз отвор обложен специфичним индуктором агрегације
 - варијабилност међу инструментима, зависи од нивоа фон Вилебрандовог фактора и технике извођача, недовољно клиничких студија
 - тромбоеластографија *Platelet Mapping System*
 - анализира кинетику стварања и лизирања угрушка
 - брза, али довољно стандардизована метода, захтева искуство извођача, тешка интерпретација резултата
 - *Plateletworks*
 - анализира број тромбоцита пре и након активације у пуној крви

Дугорочно гледано, примена ових тестова би требало да омогући индивидуализацију терапеутског приступа и побољша крајњи клинички исход. Међутим, висока резидуална активност тромбоцита не подразумева директно и слабу ефикасност лека, с обзиром на високу интер и интраиндивидуалну варијабилност одговора тромбоцита на *ADP*. Што се тиче интраиндивидуалне варијабилности, која иде и до 50%, најбоље време за одређивање функције тромбоцита је 30 дана од отпочињања терапије, иако би раније добијене информације биле знатно корисније [13]. Током првих месец дана од почетка узимања антиагрегационе терапије, долази до значајне конверзије претходно резистентних пацијената. У периоду након тога, само мали број, статистички незначајан, резистентних почиње да даје одговор на терапију [14]. Осим тога, резултати зависе и од времена протеклог између последње дозе и узимања узорка за тест, као и од времена у току дана, односно циркадијалног ритма [13]. Важеће препоруке подразумевају примену ових тестова само код високоризичних пацијената упућених на перкутану коронарну интервенцију (*PCI*), као и код пацијената са већ уграђеним стентом [12].

2.3. Антиагрегациона терапија код болесника са акутним коронарним синдромом

Ацетилсалицилна киселина, први и најчешће коришћени антиагрегациони лек, делује као иреверзибилни инхибитор *COX*. Његова примена као антиагрегационог лека почиње 1970-их година након *ISIS-2* студије (*Second International Study of Infarct Survival*) која је доказала корист од примене ацетилсалицилне киселине током 5 недеља након АИМ [15,16]. Антиагрегациони ефекат постиже максимум при дозама од 75-100мг. Доза је нижа у поређењу са другим индикацијама, услед разлике у дози потребне за инхибицију конститутивне *COX-1* и индуцибилне форме *COX-2*. Самим тим, ниске дозе ацетилсалицилне киселине омогућавају инхибицију синтезе проагрегационог *TXA2*, али не и антиагрегационог простаглицина [6,15]. Поред инхибиције синтезе *PG*, индиректно ацетилсалицилна киселина делује и на агрегацију тромбоцита стимулисану колагеном [2].

Морталитет болесника са *STEMI* опада при примени антиагрегационе терапије. Интрахоспитални морталитет износи 6-14%, док је смртност пацијената у првих 6

месеци око 12%. Преживљавање у великој мери зависи од начина лечења и времена његовог започињања, поред других фактора као што су старост, Килип класа, претходни АИМ, дијабетес мелитус типа 2 (ДМ), бубрежна инсуфицијенција, број захваћених коронарних артерија и ејекциона фракција леве коморе. Главним узроцима опадања mortalитета се сматрају: пораст у примени реперфузионе терапије и примарне PCI, модерна анти тромботска терапија и секундарна превенција.

Примена ниских доза ацетилсалицилне киселине смањује чак за 25% релативни ризик од озбиљних васкуларних догађаја код високоризичних пацијената након АИМ, са безначајним повећањем ризика од крварења [15]. CAPRIE студија (*Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events*) је показала да је клопидогрел ефикаснији од ацетилсалицилне киселине у превенцији АИМ, исхемијског ЦВИ и васкуларне смрти [17]. Овакав приступ има добар однос трошкова и клиничке ефикасности [18]. Увођење двојне антиагрегационе терапије доводи до додатног смањења mortalитета (за 9%), као и инциденце реинфаркта и možданог удара, без додатног повећања ризика од крварења [19].

Без обзира на тип АИМ, двојна антиагрегациона терапија (ацетилсалицилна киселина и инхибитори ADP-рецептора) се примењује 1-12 месеци након АИМ, у зависности од методе лечења. Ударна доза ацетилсалицилне киселине од 150-300мг орално, укључујући и жвакање таблете, обезбеђује потпуну инхибицију агрегације тромбоцита зависне од TXA₂. У случају немогућности оралне примене, ацетилсалицилна киселина се може дати интравенски у дози од 80-150мг. Веће дозе се не препоручују због могућности инхибиције синтезе простагличина који има антиагрегационо дејство [20,21]. Што се тиче инхибитора ADP-рецептора, препоруке обухватају два тиенопиридина (клопидогрел и прасугрел) и један триазолопиримидин (тикагрелор). Међутим, због постојања јефтинијих, генеричких формулација, клопидогрел је доминантан у односу на остале лекове из ове групе. Наиме, прасугрел је 10 пута скупљи, а тикагрелор око два пута [7].

Разлике између ова три лека су пре свега фармакокинетске. Тикагрелор је активна супстанца, за разлику од друга два који захтевају активацију у јетри. Клопидогрел има спорији почетак дејства у поређењу са тикагрелором (2-4ч у односу на 30 минута). Иако је пролек, као и клопидогрел, прасугрел делује знатно брже, и постижу се више концентрације активног метаболита у плазми, као и виши ниво инхибиције агрегације

тромбоцита, са мањом варијабилношћу. Тикагрелор делује краће (3-4 дана) у односу на 5-10 дана колико трају ефекти клопидогрела, као последица свог реверзибилног дејства. Са фармакодинамског аспекта, клопидогрел и прасугрел су иреверзибилни инхибитори. Иреверзибилна блокада је последица везивања за сулфхидрилне групе цистеина на рецептору. Осим тога, потребно је неколико дана да би се постигао максималан ефекат. Најновији лекови су кангрелор и елиногрел. Кангрелор, брзоделујући директни инхибитор тромбоцита, се даје искључиво интравенски, те се може користити само у хитним случајевима, а његово дејство престаје неколико минута по престанку инфузије. Елиногрел има сличне карактеристике, али се може примењивати и орално [7].

Клопидогрел као најстарији из ове групе се показао, врло брзо, ефикасним у смањењу појаве кардиоваскуларне смрти, као и нефаталног АИМ и ЦВИ, као додаток ацетилсалицилној киселини. Ризик од крварења јесте повећан, али без пораста ризика од фаталних крварења. *OASIS 7* студија (*Optimal Antiplatelet Strategy for Interventions*) је показала већу корист од двоструко веће ударне дозе (600мг) код примарне *PCI* са дозом одржавања од 150мг у првој недељи, јер се знатно брже постиже инхибиција *ADP*-рецептора на тромбоцитима. Двојна антиагрегациона терапија треба да се спроводи до 12 месеци након АИМ: најмање један месец након уградње леком обложених стентова и 6 месеци након уградње металних стентова. Ризик од кардиоваскуларних догађаја је смањен (количник вероватноће – 0,88), али се делимично повећава ризик од крварења (количник вероватноће – 1,28) [22]. Иако се не препоручује давање ударне дозе код особа старијих од 75 година, примена ударних доза код старијих, не доводи до значајног пораста инциденце крварења, нити повећава морталитет и појаву озбиљних нежељених догађаја током прве године након акутног коронарног синдрома (АКС) [3].

Реверзибилна инхибиција тромбоцита се може постићи применом инхибитора *GPIIa/IIIb*. Инихибитори *PAR-1*, ворапаксар и атопаксар, су за сада дали контраверзне резултате: смањен ризик од крварења и повећану учесталост крварења у мозгу [6].

2.4. Клопидогрел

Клопидогрел је снажан антиагрегациони лек уведен као замена за тиклопидин, такође лек друге генерације тиенопиридина, чија примена није била довољно безбедна

услед појаве тешких нежељених ефеката као што је агранулоцитоза, апластична анемија и тромбоцитопенична пурпура. Примарна индикација за његову примену је превенција догађаја повезаних са атеросклерозом у стањима као што је ЦВИ, АИМ и друге кардиоваскуларне болести [7].

Клопидогрел бисулфат је хемијски *S*(+)-2-(2-хлорфенил)-6,7-дихидротиен[3,2-*C*]пиридин-5(4*H*)-сирћетна киселина метил естар сулфат са апсолутном *S*-конфигурацијом на *C*7 (*R*-енантиомер је неактиван). Поједини генерички лекови садрже и до четири пута више *R*-енантиомера у поређењу са оригиналним леком (иако не постоји званична гранична вредност за овај тип нечистоће), што може имати значајне последице на његову ефикасност [23]. Међутим, данас се користе и друге соли клопидогрела, поред оригиналног бисулфата, као што је бесилат. Малобројне студије нису показале разлику у биоеквиваленцији између оригиналног лека и генеричких бесилата, мада постоји значајна интер и интраиндивидуална варијабилност када се упореде ове две соли [7].

2.4.1. Начин дозирања клопидогрела

Уобичајена доза одржавања је 75мг/дневно. Терапијски ефекат (инхибиција агрегације тромбоцита) се може очекивати већ након 2ч након примене појединачне дозе, али се максималан ефекат постиже тек након 3-7 дана. Давање ударне дозе, која се разликује у зависности од индикације, убрзава постизање корисног ефекта, па се максимална инхибиција може добити након 3-5ч. Концентрација активног метаболита зависи од примењене дозе, с тим што се дозе преко 600мг не препоручују, јер не дају додатни пораст концентрације активног метаболита. Повећање дозе 8 пута (са 75мг на 600мг) доводи до свега четири пута већег пораста у постигнутој концентрацији активног метаболита. По престанку примене лека, ефекат траје још 5-8 дана [24].

Примена клопидогрела у фиксној комбинацији са ацетилсалицилном киселином (75мг+100мг), која даје већи комфор болеснику и може се постићи боља комплијанса, нема за последицу значајне промене у фармакокинези лека. Ипак, нешто спорије време постизања максималне концентрације (0,72ч) није у опсегу биоеквиваленције [25].

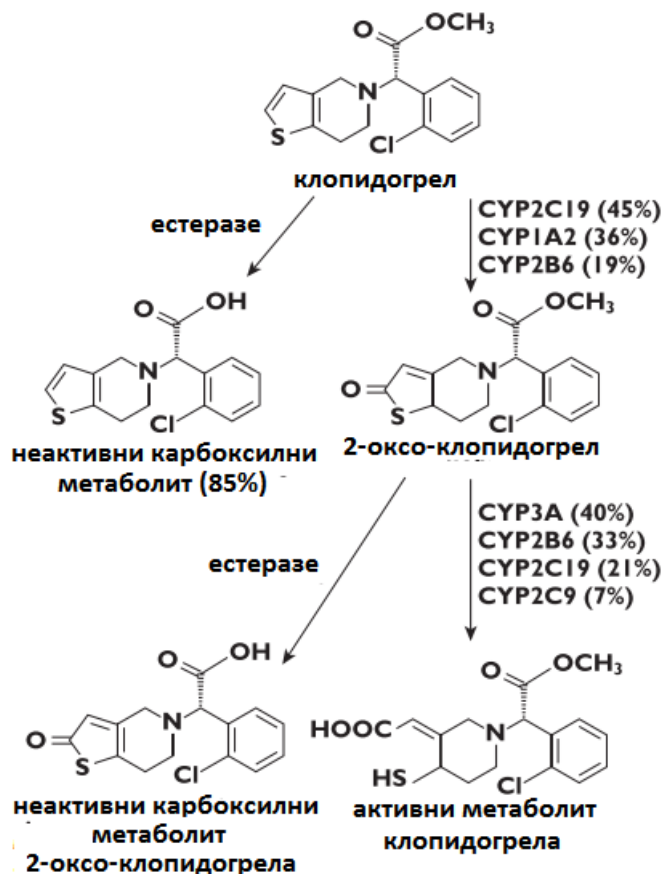
2.4.2. Фармакокинетика клопидогрела

Клопидогрел бисулфат је пролек, тако да захтева биотрансформацију у јетри како би испољио своје дејство. Самим тим, овај лек не показује никакве ефекте *in vitro* [26].

Интестинална ресорпција клопидогрела траје око 30 минута [24], и регулисана је активношћу П-гликопротеина. Његовом инхибицијом долази до повећаног базално-апикалног инфлукса и повећања интрацелуларне концентрације клопидогрела, што резултира смањеним ефлуксом [27]. Биорасположивост је преко 50% и дозно је зависна – разлика између биорасположивости доза од 75мг и 600мг је око 50% [24]. Узимање са храном повећава биорасположивост лека скоро 9 пута [26,28].

Биотрансформација клопидогрела се одвија у две фазе (Слика 2). У јетри, у највећој мери клопидогрел се хидролизује помоћу карбоксилестераза (*CES*) у неактивни дериват карбоксилне киселине (*CP26334*), око 85%. Синтеза 2-оксо-клопидогрела подразумева увођење кисеоника у молекул клопидогрела, чиме се отвара прстен и стварају карбоксилне и тиол групе, у присуству ензима цитохрома П450 (*CYP2C19*, *CYP1A2* и *CYP2B6*). Удео учешћа сваког од појединачних ензима у овој првој фази трансформације износи, редом, 45%, 36% и 19% [29]. Управо се тиол групе иреверзибилно везују за *ADP P2Y12* рецепторе на површини тромбоцита и блокирају их [26,30]. Према неким ауторима, у овој фази метаболичке трансформације учествују и *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP1A1*, *CYP2E1* и *CYP2A6* [31]. Друга фаза, синтеза активног метаболита обухвата хидролизу 2-оксо-клопидогрела, у присуству микрозомалних ензима јетре и глутатиона. Ензими који учествују у синтези активног метаболита су *CYP3A4/5* (40%), *CYP2B6* (33%), *CYP2C19* (21%) и *CYP2C9* (7%) [29]. Активни метаболит је само један Н4 изомер -{1-[1-(2-хлорфенил)-2-метокси-2-оксоетил]-4-сулфанил-3-пиперинилиден}-сирћетне киселине. Поред већ поменутих ензима, постоје претпоставке да вероватно и *CYP1A1*, *CYP2E1* и *CYP2A6* могу имати улогу у активацији клопидогрела. Укупно, свега 2% унетог клопидогрела бива метаболисано у активни метаболит [8]. Најновија теорија о метаболизму клопидогрела, је да *CYP2C19* има минорну улогу у поређењу са *CYP3A4/5*, односно да стварање 2-оксо-клопидогрела започиње још у ентероцитима посредством *CYP3A4/5*, а да се у јетри ствара мања фракција интермедијерног метаболита деловањем *CYP2C19*. Уколико се утврди да је ова теорија тачна, добиће се конкретни разлози зашто полиморфизам *CYP2C19* учествује са

највише 12% у варијабилности фармакокинетики клопидогрела, зашто су врло контраверзни резултати по питању интеракција посредованих *CYP2C19*, пре свега са инхибиторима протонске пумпе (ИПП), и зашто интеракција преко *CYP3A4* соком од грејпфрута даје много већи инхибиторни ефекат [32].



Слика 2. Метаболизам клопидогрела (преузето из Kelly и сарадници, 2012. [33])

Истраживања *Voitan* и сарадника су била усмерена на испитивање улоге параоксоназе (*PON*)-1 у активацији клопидогрела [31], али су резултати супротстављени резултатима других студија [34–36]. Претпоставка је била да се γ -тиобутиролактонски прстен 2-оксо-клопидогрела хидролизује уз помоћ естераза – *PON1* и *PON3*, без учешћа микрозомалних ензима јетре. Њихова хипотеза о биотрансформацији клопидогрела је да је управо *PON1* ензим који одређује брзину синтезе активног метаболита [31]. Испоставило се да, заправо, овај ензим учествује у синтези другог, неактивног, *Endo* метаболита клопидогрела који се од *H3* и *H4* разликује по ендоцикличној локализацији двогубе везе између атома угљеника [35].

Упоредо са метаболичким променама у молекулу клопидогрела у правцу стварања активног метаболита, долази и до елиминације клопидогрела, и то знатно

већом брзином, деловањем естераза на клопидогрел, 2-оксо-клопидогрел и тиол метаболите, при чему настају неактивни карбоксил метаболити. Ове реакције метаболичке елиминације су катализоване *CES1*, а вероватно делом и *CES2* и бутирилхолинестеразом [31]. Носиоци ретког (1-4%) *G143E* алела гена за *CES1* имају повећану ефикасност клопидогрела и мању учесталост јављања кардиоваскуларних догађаја [37].

И клопидогрел и активни метаболит се везују за протеине плазме у високом проценту (98% и 94%) [3,26]. С обзиром да је активни метаболит врло лабилан и захтева посебну припрему узорака, праћење фармакокинетики лека и терапијски мониторинг је могућ одређивањем и концентрација неактивних метаболита. Главни неактивни карбоксилни метаболит је могуће одређивати и 24-48ч по престанку терапије [26].

Након брзе ресорпције, максималне концентрације клопидогрела су 2нг/мл, 1,4ч након дозе од 75мг, односно 4,5нг/мл, 1,2ч након дозе од 300мг. У различитим студијама варира од 0,9 до 4,4нг/мл. Овако ниске концентрације су због брзог метаболизма: максималне концентрације карбоксил метаболита су и 1000 пута веће [25,38]. Међутим, у истраживању *Voitman* и сарадника [31], измерене су 10 пута веће максималне концентрације клопидогрела су биле. Давање мањих доза доводи до бржег постизања максималних концентрација у плазми. Између доза од 75мг и 600мг, та разлика износи око 30 минута [24]. Ударна доза од 600мг омогућава постизање максималног ефекта већ за 2ч [39] и знатно брже постизање фармакодинамског равнотежног стања, у поређењу са 3-7 дана ако се не даје ударна доза [3].

Максимална концентрација активног *H4* изомера је нешто већа од концентрације његовог антипода *H3* након примене 75мг клопидогрела. Фармакокинетика активног метаболита се мења пропорционално примењеној дози [24,40]. Исти ефекат су показали и *Zhou* и сарадници [40], али мерењем концентрације неактивног карбоксилног метаболита. Ипак, постоје и студије са супротним закључцима, односно да доза не утиче на максималну концентрацију и време њеног постизања [41,42]. Код већих доза (300мг), та разлика је двострука. Због брзе елиминације, концентрације тиол метаболита су немерљиве већ након 6ч, за разлику од карбоксил метаболита чије је полувреме елиминације око 7ч. Концентрација клопидогрела корелира са максималном концентрацијом и површином испод криве концентрација (ПИК) свих метаболита [38]. Након ударне дозе од 600мг, фармакокинетски параметри се разликују између болесника

са и без тромбозе стента: код пацијената без тромбозе, други корак стварања активног тиол метаболита се одвија знатно брже и интензивније [31]. Осим тога, ПИК активног метаболита је директно пропорционална инхибицији агрегације тромбоцита, мереној неким од тестова функције тромбоцита [43].

Полувреме елиминације клопидогрела је око 3,5-6ч [25], а активног метаболита око 30 минута. Како клопидогрел иреверзибилно блокира рецепторе на површини тромбоцита, брзина елиминације се не рефлектује директно на трајање његовог ефекта [41]. Након оралне примене, 50% лека се елиминише урином, а 46% фецесом. Услед интензивног метаболизма у јетри, свега 2% клопидогрела се излучује непромењен путем урина. Полувреме елиминације неактивног метаболита је 8ч. При узимању лека са храном, полувреме елиминације се двоструко повећава [3,26].

2.4.2.1. Варијабилност фармакокинетики клопидогрела

Фармакокинетика клопидогрела је изузетно варијабилна, али и поред тога, релативно је мали број фармакокинетских истраживања клопидогрела. Сматра се да је варијабилност фармакокинетики и фармакодинамике клопидогрела у највећој мери последица смањене биорасположивости [13]. Већ код оболелих од кардиоваскуларних болести, што је најчешће испитивана популација, постоји разлика у односу на здраве добровољце у смислу смањеног стварања активног метаболита [38]. Код пацијената са *STEMI*, у односу на здраву популацију, максимална концентрација, време њеног постизања, као и ПИК клопидогрела и активног метаболита је смањена три, односно пет пута. Сходно томе и инхибиција агрегације тромбоцита је нижа. Наиме, ресорпција клопидогрела може бити смањена код ових пацијената услед смањене јачине срчаног рада и компензаторних физиолошких механизма (повишен тонус симпатикуса, преусмеравање крвотока са вазоконстрикцијом периферних артерија) чиме се смањује перфузија интестиналне слузокоже и њена метаболичка активност. Осим тога ослобођени атријални натриуретски пептид, услед повишеног венског притиска, смањује мотилитет и пермеабилност црева [44].

Старост и телесна маса учествују са по 5%, односно 6% у варијабилности фармакокинетики клопидогрела [45]. Сви параметри конституције, телесна маса, телесна висина и *body-mass index (BMI)*, су у инверзној корелацији са максималном

концентрацијом и ПИК активног метаболита, што је показано у FEATHER студији [46]. Утицај телесне масе се делимично може објаснити смањењем дозе кориговане телесном масом, нисходном регулацијом ензима цитохром П450 код гојазних и појачаном активношћу *CES1* [8], с тим што поједини аутори нису утврдили значај гојазности [47]. Генетика, заједно са женским полом и бројем тромбоцита даје још 11% објашњења варијабилности у фармакокинетици активног метаболита клопидогрела, што указује да постоји још низ, до сада неоткривених фактора који су од значаја за фармакокинетику, а тиме и ефекте клопидогрела. Ако се искључе полиморфизми *CYP2C19*, мутације осталих гена (*CYP3A5*3*, *ABCB1 C3435T* и *PON1*) немају утицаја на фармакокинетику клопидогрел код здравих добровољаца [45]. Међутим код пацијената са АКС, варијабилност фармакокинетики може бити и последица полиморфизма на генима за *CYP2C9* [43], *CYP2B6*, *CYP3A4/5*, П-гликопротеин, *CES1* [8,48] или *PON1* [31], за сада без чврстих доказа. Иако је улога *PON1* у синтези активног метаболита дискутабилна, исти аутори који тврде да је управо *PON1* ензим који ограничава брзину стварања активног метаболита, су доказали значај полиморфизма (*Q192R*) за његову фармакокинетику [31].

Пушење је идентификовано као један од фактора који утиче на фармакокинетику клопидогрела, смањујући брзину елиминације за око трећину, али без ефеката на максималну концентрацију. Претпоставља се да је то последица повећане секреције у желуцу и смањене прокрвљености слузокоже желуца, мада може бити последица и деловања на ензиме цитохрома П450 (*CYP1A2*, *CYP2C19* и *CYP3A5*) [47]. Каснија *PARADOX* студија је доказала да пушење повећава концентрацију активног метаболита [49] односно да смањује концентрацију неактивног карбоксилног метаболита [40].

Код оболелих од ДМ, који чине око 30% пацијената са АКС [8], изложеност активном метаболиту је и до 40% мања. То се објашњава променама на нивоу гастроинтестиналног тракта и јетре, што доводи до смањене ресорпције, повећаном хидролизом клопидогрела у правцу стварања неактивног карбоксилног метаболита, смањеном активношћу ензима цитохром П450 и повећаном хидролизом активног метаболита [50].

Интеракције са клопидогрелом су најчешће испитиване лабораторијским тестовима функције тромбоцита, или утицајем на клинички исход болести. Међутим, за поједине лекове, доказан је ефекат и на фармакокинетику клопидогрела, односно

концентрацију клопидогрела или његових метаболита. С обзиром на ранију широку примену и чињеницу да је јак инхибитор *CYP2C19* ензима, један од чешће испитиваних лекова је омепразол. Његова истовремена примена смањује концентрацију активног метаболита и до 40%. Ова интеракција се не може избећи ни већом временском разликом између узимања једног и другог лека [51,52]. Поред омепразола, мању изложеност активном метаболиту могу узроковати и лансопризол, есомепразол и рабепразол, као и циметидин из групе *H2*-антихистаминика. Статини показују различите ефекте на ензиме цитохром П450. Хидрофобни лекови из ове групе се метболишу преко *CYP3A4*. Најчешће прописивани аторвастатин индукује *CYP2B6* и *CYP2C9*, те доводи до повећања експозиције активном метаболиту клопидогрела за 17% [42]. Инхибицијом *CYP2C9*, *CYP2C19* и *CYP3A4*, инхибитори преузимања серотонина смањују концентрацију активног метаболита у плазми [8]. Остале потенцијалне фармакокинетске интеракције укључују: фелбамат, антимицитике (флуконазол, кетоконазол, вориконазол) и етравирин [3]. Учестало конзумирање сока од грејпфрута доводи до смањења стварања активног метаболита за 80% због супресије *CYP2C19* и *CYP3A4* [8,53].

2.4.3. Фармакодинамика клопидогрела

Поред већ описаног главног ефекта клопидогрела на агрегацију тромбоцита, описана су и друга дејства клопидогрела која би могла бити корисна код пацијената са АКС. Инхибиција *ADP*-рецептора смањује имуне реакције које учествују у патогенези атеросклерозе и атеротромбозе [54]. Хронична примена клопидогрела доводи до смањене експресије *P*-селектина на површини тромбоцита [55,56], што отежава стварање агрегата тромбоцита и леукоцита [57]. Осим тога, смањује се експресија солубилног *CD40* лиганда [58] и ниво *C*-реактивног протеина [55,59]. Такође, на експерименталним животињама је показано да клопидогрел смањује системску инфламацију индуковану липополисахаридом [60], као и регионалну инфламацију у срцу смањењем густине инфламаторних ћелија [61]. Протективни ефекат у системској инфламације и сепси је доказан на животињским моделима, али и ретроспективно на људима [62].

Рецептори *P2Y12* су експримирани и на глатким мишићима, између осталог и на глаткомишићним ћелијама атеросклеротских плакова. Њихова густина је знатно већа код пацијената са АИМ, у поређењу са пацијентима који болују од стабилне ангине пекторис (Lee et al. 2011). Претпоставља се да *ADP* и активација *P2Y12* рецептора имају улогу у миграцији глаткомишићних ћелија [64], те инхибитори *P2Y12* рецептора могу блокирати овај процес. Такође, блокадом ових рецептора се може смањити вазоконстрикција и побољшати перфузија миокарда након тромбозе [3].

Све претходно наведено указује да *P2Y12* рецептори имају улогу у атерогенези регулацијом ослобађања проинфламаторних медијатора из тромбоцита, као и накупљања леукоцита, васкуларне инфилтрације и миграције глаткомишићних ћелија у атероматозни плак. На експерименталним моделима атеросклерозе је показано да клопидогрел може да смањи пораст плака [65] и да га стабилизује [66]. У случају руптуре плака хронична примена клопидогрела смањује акумулацију тромбоцита [67,68]. Међутим, како клопидогрел не може да спречи адхезију тромбоцита на инфламирани ендотел у одсуству лезије, његова улога у примарној превенцији је минорна [3].

2.5. Резистенција на антиагрегациону терапију

Клинички значајна резистенција на антиагрегациону терапију се дефинише као појава рекурентних тромботичних догађаја и поред адекватне комплијансе. С обзиром на постојање различитих путева активације, активност тромбоцита не мора бити последица неефикасности примењеног лека, па се најчешће помиње „резидуална активност тромбоцита“ након примењене терапије блокадом одређеног пута активације. Лабораторијски доказана резистенција, тестовима агрегације тромбоцита или другим *in vitro* тестовима, не мора бити и клинички значајна. Традиционални тестови су исувише компликовани за рутинску примену, и захтевају искуство. Ипак, већина лабораторијских агрегометријских тестова је прихваћено као „златни стандард“, и поред недостатака да су захтевни, зависни од извођача и скупи, што опет може бити ограничавајуће за рутинску примену. Као алтернатива, могу се одређивати биомаркери као што су: серумски и уринарни *TXB2* за ацетилсалицилну киселину или *VASP* за инхибиторе *ADP*-рецептора [5].

Резистенција на ацетилсалицилну киселину, која се јавља код 5-25% болесника, носи и до три пута већи ризик од кардиоваскуларних догађаја. Као најважнији узрок резистенције на ацетилсалицилну киселину се наводи одсуство комплијансе [15]. Она може бити последица и интеракција са нестероидним антиинфламаторним лековима који инхибирају ацетилацију *COX-1*, компетиције са активаторима *COX-1* и гликозилације протеина код ДМ. Такође, тромбоцити се убрзано стварају у неким стањима, као што су дијабетесна ангиопатија, болест периферних артерија, АКС и артеријска хипертензија [6,69]. Гојазност је, такође, један од фактора који може смањити ефикасност ацетилсалицилне киселине. Од генетских фактора се помињу полиморфизми гена за *COX-2*, *GPIb*, *GPIa*, *GPIIIa*, *P2Y12*-рецептор и уридин 5-дифосфоглукуронозилтрансферазу-1 (*UGT1A6*), али без потпуних доказа о њиховом значају [2]. Такође, ген за тромбоцитни рецептор за ендотелну агрегацију 1 (*PEAR1*, енг. *platelet endothelial aggregation receptor-1*) је повезан са резистенцијом на ацетилсалицилну киселину, односно са повећаним ризиком од кардиоваскуларних догађаја [70].

Могућности за откривање резистенције су генотипизација и мерење инхибиције агрегације тромбоцита. Многобројне студије су показале слабу корелацију између тестова функције тромбоцита и стања повезаних са резистенцијом, односно значајним кардиоваскуларним догађајима и тромбозом стента [71,72]. Проблем резистенције на антиагрегациону терапију је додатно продубљен чињеницом да између постојећих тестова тромбоцитне функције резултати значајно варирају, па стога ни не дају праву слику о ризику од појаве кардиоваскуларних догађаја. Осим тога, код појединаца постоји појачана активност тромбоцита, те ће, иако је лек ефикасан, резултат теста функције тромбоцита бити лош. Самим тим, ограничавајући фактор многих студија је у томе што није одређивана базална функција тромбоцита. Висока интринзичка активност тромбоцита је најзначајнији предиктор резистенције на клопидогрел, али не може заменити тестове по отпочињању терапије [73]. То отежава, самим тим, одређивање граничних вредности за сваки од тестова. Смањење ефекта за 10-15% не подразумева и значајне клиничке последице [74].

Увођење двојне антиагрегационе терапије, што је потврђено студијама *CURE* (*Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events*) [75] и *CHARISMA* (*Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance*) [76], је доводи до значајног смањења ризика од последица резистенције. Први приступ

превазилажења резистанције би могао бити у уклањању оних променљивих фактора који утичу на резистенцију: повећање комплијансе, избегавање интеракција, прекид пушења, губитак телесне масе, оптимална контрола гликемије... У случају ацетилсалицилне киселине и оболелих од ДМ, предлаже се подела дневне дозе. Следећи корак јесте замена клопидогрела новијим препаратима [15].

У *GRAVITAS (Gauging Responsiveness with A VerifyNow assay – Impact on Thrombosis And Safety)* студији, након повећања дозе на основу тестова агрегације, код неких пацијената је дошло до смањења резидуалне активност тромбоцита, али без значајних ефеката на клинички исход болести [77]. Сличне резултате, да повећање дозе клопидогрела или замена другим леком, на основу тестова агрегације тромбоцита, не доводи до значајног побољшања клиничког исхода, су добијени и у другим студијама [71,72,78]. Ипак, након *PCI*, повећање дозе клопидогрела на основу тестова агрегације тромбоцита може бити корисно у превенцији кардиоваскуларних догађаја, што пре свега зависи од ризика од тромбозе стента, па се овакав приступ препоручује само код високоризичних [79,80]. *MADONNA* студија на пацијентима подвргнутим *PCI* (елективни *PCI*, *STEMI*, *NSTEMI*) је показала да индивидуализација терапије (поновљена ударна доза клопидогрела или замена прасугрелом) на основу тестова агрегације тромбоцита, смањује ризик од тромбозе, без повећања ризика од крварења [81]. Сличне резултат је дала и студија *Cecchi* и сарадника [82], с тим што се ефикасност повећања дозе клопидогрела или замене другим леком, свела само на смањење морталитета.

Генетски фактори вероватно имају свега 12% удела у настанку резистенције. Они се могу превазићи применом новијих лекова. Ефикасност прасугрела и тикагрелора не зависи од генетских фактора значајних за клопидогрел. Међутим, то не значи да неке друге мутације не могу довести до резистенције и на ове лекове, на пример полиморфизми *CYP3A4* или *CYP3A5* [30,83,84]. На основу *TRITON-TIMI 38* студије (*TRial to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet inhibition – Thrombolysis In Myocardial Infarction 38*), замена клопидогрела прасугрелом током 15 месеци се показала економски исплативом, уз већи квалитет и дуже трајање живота пацијената. Уштеда је заснована, пре свега на смањењу трошкова понављаних *PCI* [85]. Замена тикагрелором, у *PLATO* студији (*PLATelet inhibition and patient Outcomes*), доводи до повећања трошкова, међутим поређењем са добијеним „квалитетним годинама живота“ (енг. *quality-adjusted life years – QALY*), цена по години је испод

граничних вредности на основу шведских стандарда (година живота кошта просечно додатних 2372€, мада значајно варира од терапијског протокола, па може бити и три пута већа) [86]. Осим заменом клопидогрела, постоје покушаји да се ефикасност лека повећа истовременом применом других лекова као што су инхибитори *GPIIa/IIIb* или цилостазол [87].

Индивидуализација терапије на основу функционалних тестова тромбоцита наизглед предствала прави приступ лечењу пацијената са АКС. Међутим, постоје многи проблеми са њиховом применом, као што су: тачност и прецизност примењених тестова, слаба корелација између различитих тестова, питање граничних вредности и одсуство доказа о њиховој ефикасности у спречавању „клиничке“ резистенције на клопидогрел и њених последица. Осим тога, цена ових тестова, оптерећење здравственог особља и нелагодност за пацијента, што може узроковати слабу комплијансу, постављају питање корисности оваквог приступа у смислу трошкова који он носи (енг. *cost-effectiveness*) [13]. Осим тога, у АКС и другим акутним стањима, свако одлагање терапије може имати негативне последице. Генотипизација је метода која захтева време, као и мерење резидуалне активности тромбоцита, јер је неопходно да прође најмање 6-12ч да би се могао проценити ефекат [88]. Поред тога, ако се узме у обзир чињеница да највећу предиктивну вредност имају резултати мерења након месец дана, промена терапије пре тог периода може чак имати и негативни ефекат, у смислу крварења [14].

2.5.1. Резистенција на клопидогрел

Фармакодинамски одговор на клопидогрел варира око 20-30%. Према томе, поједини пацијенти се могу окарактерисати slabим одговором, без одговора на лек или као резистентни на клопидогрел [33]. Према неким ауторима учесталост ових пацијената иде и до 50% [8,89]. Претпоставља се да је 83% варијабилности у одговору на клопидогрел последица генских мутација [31], иако је свега око 48% варијабилности објашњено познатим факторима [45].

Код болесника са АИМ упућених на *PCI*, преваленца резистенције на клопидогрел је око 21%. Већа учесталост је примећена међу пацијентима код којих је примећена нижа ударна доза (300мг) у односу на стандардну дозу од 600мг. Поред

ударне дозе, значајна променљива је и време протекло између давања ударне дозе и примењених тестова. То је нарочито важно код мањих доза (нпр. ударна доза од 300мг), јер већа ударна доза обезбеђује брзи ефекат, тако да време мерења није од утицаја на коначан резултат. Максимални ефекат се постиже након 8ч, у поређењу са неопходних 18-24ч када су примењене ниже дозе. Једна студија наводи да се након дозе од 600мг, потпун ефекат постиже већ након 2ч [90].

Једна од предложених могућности за настанак резистанције *in vivo* је промена хиралности молекула клопидогрела. Само *S*-конфигурација је фармакодинамски активна. Хирална инверзија посредована ензимима, *in vivo*, је мало вероватна, али се не-ензимска дешава са 4-8% лека. Ова промена је *pH*-зависна и њено полувреме је 7-12 дана [26].

Укупна количина активног метаболита, као и максимална концентрација, су значајни предиктори резидуалне активности тромбоцита [45]. Појава тромбозе стента након *PCI* се повезује са ниским концентрацијама активног метаболита, а високим концентрацијама 2-оксо-клопидогрела, као и високим односом интермедијерног и активног метаболита клопидогрела, а самим тим и слабом инхибицијом агрегације тромбоцита. Концентрације пролека и неактивног карбоксилног метаболита немају утицаја [31].

Висока активност тромбоцита, мерена након једног месеца, је најзначајнији предиктор клиничког исхода, рачунајући и могућа крварења, болесника са АКС лечених клопидогрелом [14]. Она може бити последица различитих фактора [13,91]: ниска комплијанса, интеракције (са ИПП, статинима, блокаторима калцијумских канала, бета блокаторима, *ADP*-инхибиторима), старост [92], женски пол [8], ДМ (инсулинска резистенција) [50], пушење (које за разлику од претходно поменутих фактора, побољшава фармакодинамски одговор), гојазност [46,92], висок ниво триглицерида и ниска концентрација *HDL* [92], ниска ејекциона фракција леве коморе, артеријска хипертензија [69,93], бубрежна инсуфицијенција (нарочито повезана са ДМ), болести јетре и запаљење [7].

Осим претходно наведених фактора, од изузетног значаја је и варијабилност у одговору тромбоцита на *ADP* и повећано обнављање тромбоцита [94]. Убрзано стварање тромбоцита карактерише повећан проценат младих тромбоцита веће запремине, и

ретикуларне структуре, због садржаја резидуалне иРНК која нестаје након 24ч у циркулацији. Генерално, њихов удео је већи код пацијената са АКС, нарочито након тромбозе стента. Овакви тромбоцити су реактивнији услед повећане експресије *GPIIb/IIIa*, те њихово присуство повећава ризик од АКС и других озбиљних кардиоваскуларних догађаја, као и резистенције на антиагрегационе лекове. Управо као последица њихове реактивности, велики удео младих тромбоцита, чија активација није блокирана антиагрегационим лековима, повећава ризик од нежељеног клиничког исхода [95].

При дозама одржавања од 75мг међу старијима од 75 година, постоји висока учесталост „резистентних“ пацијената (*SENIOR-PLATELET* студија), што се објашњава смањеном функцијом бубрега, чешћом применом ИПП, као и, вероватно, смањеном функцијом *CYP2C19* ензима [96,97]. Осим тога, старост је независан предиктор крварења која су последица терапије клопидогрелом [14]. У поређењу са фармакокинетиком клопидогрела, старост и *BMI*, имају мањи предиктивни значај на фармакодинамски ефекат, односно објашњавају свега 3,8% и 2,3% варијабилности [8]. Овакви резултати се могу објаснити чињеницом да су гојазни пацијенти са АИМ углавном млађе особе, које се раније обрате лекару и добију агресивнију иницијалну терапију. Мала телесна маса је повезана са горим клиничким исходом (већи ризик од крварења, смрти и АИМ), с тим што постоје и студије које су дошле до супротних резултата [97–99], као, на пример, *LEADERS* студија. Међутим, укључени гојазни пацијенти су у знатно већем проценту боловали од ДМ [8]. Повезаност ДМ и повећане активности тромбоцита је вишеструка: нижа концентрација активног метаболита у плазми (и до 40%), повећана експресија рецептора на површини тромбоцита, ендотелна дисфункција са смањеним стварањем азот оксида, појачана осетљивост на *ADP*, хиперкоагулабилност и поремећена фибринолиза [5,8,50].

Генетски фактори се сматрају најзначајнијим, те је тестиран велики број гена, пре свега они који кодирају протеине значајне за фармакокинетiku клопидогрела. Хомозиготи са мутираним *T* алелом на позицији 3435 гена за П-гликопротеин, имају 72% већи ризик од кардиоваскуларних догађаја (кардиоваскуларна смрт, АИМ, ЦВИ), у поређењу са носиоцима *СС* и *СТ* генотипа [83,100]. Комбинација са полиморфизмима *CYP2C19* даје још већу диференцијацију болесника са ниским и високим ризиком [83]. Полиморфизми *CYP2C19* са губитком функције су независни фактори предикције

значајних кардиоваскуларних догађаја. Предиктивна вредност генотипизације *ABCB1* и *CYP2C19* је око 50% (48,6% и 52,4%) [91]. Као директна последица разлике у дистрибуцији генских мутација, пре свега *CYP2C19* и *ABCB1*, резистенција на клопидогрел је најчешћа код Азијата, а најмања код народа афричког порекла [8]. Значај ових полиморфизама, ће бити објашњен у даљем тексту.

Полиморфизми *P2Y12* гена за пуринергичке рецепторе за које се везује сам клопидогрел су у потпуном генетском дисбалансу, па се посматрају кроз четири различита хаплотипа. *H2* хаплотип је повезан са повећаном *ADP*-зависном агрегацијом тромбоцита. Међутим, нема доказа да ови полиморфизми имају утицаја на ефикасност клопидогрела [37]. Мутација *PON1*, ензима који може имати улогу у стварању активног метаболита, је асоцирана са слабијом инхибицијом агрегације тромбоцита, као и већом инциденцом тромбозе стента. Иста студија је негирала улогу полиморфизама других ензима (*CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP3A4* и *CYP3A5*) и П-гликопротеина у појави тромбозе стента [31]. Значајност других полиморфизама који би могли имати утицаја, као, на пример, гена *ITGB3* за интегрин $\beta 3$, још увек није доказана [8].

Значај конститутивних и клиничких варијабли, као што су старост, ДМ или клиренс креатинина, имају највећу предиктивну вредност на почетку терапије. Са временом, након једног и 6 месеци, иако и даље значајан, њихов удео у објашњењу варијабилности одговора на клопидогрел се смањује (15%, 10% и 7%, редом). Међутим, значај генетских варијабли, *ABCB1 C3435T*, *CYP2C19*2* и *CYP2C19*17*, је уравнотежен (37,%, 6,6% и 5,2%, редом), мада са временом долази до опадања значаја полиморфизма П-гликопротеина, што се може објаснити сатурацијом транспортера [14].

Терапија пацијената са АКС већим бројем лекова, укључујући и терапију коморбидитета, повећава ризик од интеракција. Ипак, значај интеракција је дискутабилан ако се узме у обзир чињеница да се и пред ниске продукције активног метаболита, временом он акумулира и везује за неблокиране тромбоците чија је брзина обнављања релативно мала (дневно се регенерише око 10-15%). Осим тога, треба узети у обзир корист од лекова који могу ступати у интеракције са клопидогрелом, нарочито ако постоји разлика међу лековима из исте групе у потенцијалу за настанак интеракција [74].

Статини смањују ризик од кардиоваскуларних болести и смрти код пацијената са исхемијском болешћу срца или са високим ризиком за њен развој [101]. Поред снижавања нивоа *LDL*, њихова примена у АКС је вишеструка: побољшање ендотелне дисфункције, стабилизација атеросклеротског плака, инхибиција агрегације тромбоцита и стимулација фибринолитичких фактора и побољшање перфузије миокарда [102]. Интеракција са аторвастатином је доказана *in vivo*, при ударним дозама од 300мг, и *in vitro* при чему је метаболизам клопидогрела инхибиран 80-90% [74,103]. Могућност интеракције се наводи са још и симвастатином, јер се у оба случаја ради о липофилним лековима који се снажно везују за *CYP3A4*, за разлику од хидрофилног росувастатина, правастатина и флувастатина [74]. Осим на нивоу метаболизма, могуће су интеракције ових лекова и на нивоу П-гликопротеина, јер су сви статини, осим росувастатина, његови супстрати. Ловастатин и симвастатин су снажни, а аторвастатин и правастатин нешто слабији дозно-зависни инхибитори овог транспортера [104,105]. *CYP2C9* који, ипак малим процентом, учествује у метаболизму клопидогрела може бити инхибиран флувастатином и, можда, росувастатином. Такође, и клопидогрел и већина статина (осим правастатина) се у високом проценту снажно везују за протеине плазме [101]. Међутим постоје студије [39,42] које негирају постојање интеракције, нарочито при вишим ударним дозама (600мг) и када је клопидогрел уведен раније у односу на аторвастатин, што указује на дозно-зависан карактер интеракције, тако да се не може са сигурношћу рећи да постоје клинички значајне интеракције, али се таква могућност не сме ни одбацити [103].

Већина студија потврђује могућност интеракције клопидогрела са омепразолом [51,106,107]. Управо из тог разлога је потиснут пантоприазолом, а и другим ИПП, који су мање потентни у инхибицији *CYP2C19*. Ипак, новија мета-анализа генерално негира клинички значај интеракција било ког од ИПП са клопидогрелом. Закључак је да је сама потреба за гастропротекцијом предиктор лошег клиничког исхода, а не постојање интеракције [108]. Интеракције између ИПП и клопидогрела су детаљније анализиране у каснијем тексту.

Интеракција између дихидропиридина, нифедипина и амлодипина, и клопидогрела се јавља услед инхибиције *CYP3A4* и потврђена је лабораторијским тестовима агрегације тромбоцита. И остали инхибитори (еритромицин, тролеандомицин, кетоконазол, итраконазол), односно индуктори (рифампицин,

фенитоин), овог ензима могу ступати у важне интеракције, али је њихова примена код болесника са АКС знатно ређа [74]. Поред ових лекова, слабији ефекат на агрегацију тромбоцита је уочен и при симултаној примени других блокатора калцијумових канала (дилтиазем и верапамил), антиепилетика фелбамата или антиретровирусног лека етравирина. Већина ових интеракција је последица инхибиције/индукције *CYP3A4* [3]. Америчка администрација за храну и лекове (*FDA*, енг. *Food and Drug Administration*) је дала смернице у вези са лековима који се примењују заједно са клопидогрелом. Лекови су сврстани у три групе: лекови за које постоји довољно информација да се препоручи избегавање истовремене примене са клопидогрелом, лекови за које не постоје докази о постојању интеракција са клопидогрелом и лекове за које нема довољно доказа како би биле дате препоруке, те код сваког пацијента треба упоредити могућу корист и ризике (Табела 1) [88]

Табела 1. Препоруке *FDA* у вези са интеракцијама клопидогрела

Доказана интеракција	Нема доказа о интеракцији	Недовољно доказа о интеракцији
омепразол	ранитидин	пантопризол
есомепразол	фамотидин	рабепразол
циметидин	низатидин	
флуконазол		
кетоназол		
етравин		
фелбамат		
флуоксетин		
флувоксамин		
вориконазол		

Навике пацијената (пушење, кофеин, теофилин) или примена биљних препарата (кантарион – *Hypericum perforatum*, сок од грејпфрута) може утицати на ефекте клопидогрела [74]. Пушење индукује *CYP1A2* и *CYP2B6*, те на тај начин потенцира инхибицију агрегације тромбоцита (*PARADOX* студија) [49,97], мада постоје и студије које оповргавају ову тезу [39]. Метилксантини, али и инхибитори фосфодиестеразе (цилостазол), делују тако што повећавају ниво *cAMP*. Акутна примена кофеина појачава инхибицију агрегације тромбоцита 2-4ч након давања клопидогрела [3]. Додавање цилостазола двојној антиагрегационој терапији доводи до смањења резидуалне активности тромбоцита [87]. Већ након две недеље коришћења препарата кантариона, услед индукције *CYP3A4*, али и *CYP2C19*, *CYP2B6*, *CYP1A2*, *CYP2C9* и П-

гликопротеина, смањује се резидуална активност тромбоцита код резистентних на клопидогрел [28,74]. Учестало конзумирање сока од грејпфрута смањује антиагрегациони ефекат клопидогрела инхибицијом П-гликопротеина и, вероватно инактивацијом интестиналног CYP3A4 [28,53]. С обзиром да не делује на CYP3A4 у јетри, постоји могућност да и интестинална фракција има улогу у метаболизму клопидогрела [32].

2.6. П-гликопротеин и његови полиморфизми

П-гликопротеин је *ABC* (*ATP*-везујућа касета, енг. *ATP-binding cassette*) ефлукс транспортер који учествује у интестиналној ресорпцији клопидогрела. Често се назива и *MDR1* (енг. *multidrug resistance protein-1*). Ген *ABCB1* је локализован на дужем краку 7. хромозома, *7q21.12*, и садржи 29 егзона са укупно 209,6кб. Постоје два транскрипциона стартна региона: проксимални промотор у егзону 1 и интрону 1, одговоран за конститутивну експресију, и дистални који је одговоран за прекомерну експресију у појединим ћелијама и ткивима. Сам промотор је генетски релативно непроменљив. Транскрипциона иРНК садржи 4872бп, укључујући 5' регион који се не транслира, тако да се након транслације добија протеин дужине 1280 аминокиселина и молекуларне тежине 170кDa. Секундарна структура протеина подразумева две хомологе половине, од којих свака садржи по 6 трансмембранских домена и *ATP*-везујући домен. Посттранслационо, добијени протеин подлеже фосфорилацији и *N*-гликозилацији. Дванаест трансмембранских хеликса формира водену пору [109–111]. Усходна регулација генске експресије *ABCB1* може бити последица трансактивације на нивоу промотора, на пример везивањем прегнан *X*-рецептора, или независно од нуклеарних рецептора. Метилацијом специфичних нуклеотидних секвенци у промотору (тзв. *CpG* острва) може доћи до инактивације П-гликопротеина у неким туморима. До нисходне регулације може доћи и другим механизмима (на пример у одговору на кобаламин) [110].

П-гликопротеин поседује велику могућност конформације која омогућава везивање и ефлукс великог броја различитих хидрофобних и амфифилних супстрата молекулске тежине 250-4000Da. Они бивају детектовани и избачени пре него што доспеју у цитоплазму ћелије [110,112]. Високо је експримиран у ћелијским мембранама

различитих баријера у организму и органима за екскрецију. Цревна локализација (танко црева и колон) и локализација у жучним каналићима јетре игра улогу у елиминацији лекова датих орално и смањењу њихове биорасположивости. Густина ових транспортера се повећава од проксималног ка дисталном крају [109]. Бројне ендogene супстанце представљају супстрат П-гликопротеина: пептиди (β -амилоид), стероидни хормони, липиди, фосфолипиди, холестерол и цитокини. Такође, и велики број лекова се везују за П-гликопротеин. Осим тога и састојци из хране могу модулирати његову функцију (екстракт кантариона, сок од грејпфрута, зелени чај, кофеин) [110,113].

Сматра се да је главна улога П-гликопротеина управо заштита од кснобиотика, јер ограничава њихову ресорпцију у гастроинтестиналном тракту, а појачава екскрецију урином и фецесом. Додатна заштита се постиже експресијом на нивоу крвно-моздане, крвно-ликворне, крвно-тестисне и плаценталне баријере [112]. Са старашћу долази до смањења функције П-гликопротеина, нарочито на нивоу крвно-моздане баријере, што може бити додатни етиолошки фактор за развој Алцхајмерове, Паркинсонове болести и неких психичких обољења [114].

Многи лекови који се користе код кардиоваскуларних болесника се везују за П-гликопротеин [113]:

- клопидогрел
- статини: аторвастатин, ловастатин, симвастатин
- инхибитори протонске пумпе
- поједини бета-блокатори: карведилол, надолол, пропранолол, тимолол, бунитролол, целипролол, талинолол
- неки блокатори калцијумских канала: верапамил, дилтиазем, нифедипин, никардипин, фелодипин, нитрендипин, израдипин
- каптоприл, лосартан, спиронолактон
- амјодарон, дигоксин, дигитоксин, хинидин, фенитоин, пропафенон

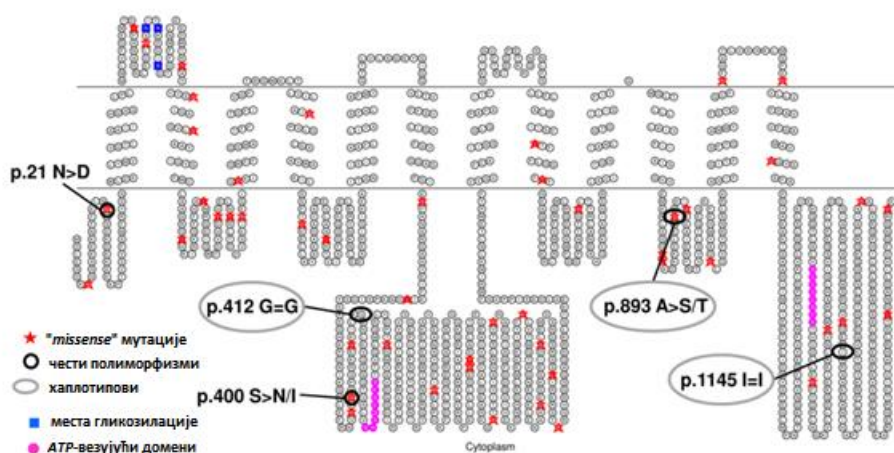
Већина ових лекова интерагује и са *CYP3A4*, што додатно повећава ризик од интеракција. Одговорност П-гликопротеина за резистенцију на лекове је највише истражена код појединих цитостатика и антиепилептика. Као могући инхибитори П-гликопротеина, и на тај начин лекови који би повећали биорасположивост супстрата, истраживани су калцијумски антагонисти. Осим оних за које се зна да су инхибитори П-

гликопротеина, и примена амлодипина је била узрок смањеног антиагрегационог ефекта клопидогрела [110,115,116]. И поред тога, за разлику од амлодипина који повећава 2,3 пута ризик за слаб одговор на клопидогрел, примена других блокатора калцијумових канала који блокирају П-гликопротеин (верапамил, дилтиазем, барнидипин, нифедипин), не представља значајан фактор ризика за резистентност на клопидогрел. Претпоставка је да је инхибиција *CYP3A4* значајнији фактор од инхибиције П-гликопротеина, те у случају примене инхибитора П-гликопротеина, због смањене апсорпције, инхибиција *CYP3A4* је смањеног интензитета [115]. *In vitro* тестови су показали да терапија аторвастатином повећава експресију иРНК П-гликопротеина око четири пута, а амјодароном око 2,5 пута. Ефекат дигоксина је дозно зависан, те се при ниским концентрацијама у плазми не уочава усходна регулација П-гликопротеина. *In vivo*, примена спиронолактона повећава експресију П-гликопротеина у танком цреву 1,5 пута [113].

2.6.1. Полиморфизми П-гликопротеина

До сада је откривено 8643 полиморфизама, од којих су 390 кодирајућа (131 синониман) (Слика 3). Ако се искључе они са фреквенцом алела мањом од 5%, има их око 120-170, у зависности од расе. Најчешћи су: *1236T<C (Gly412Gly)*, *2677T<A (Ser893Ala/Thr)* и *3435T<C (Ile1145Ile)*. Полиморфизам повезан са поремећеном ресорпцијом различитих лекова, међу њима и клопидогрелом, је *3435T>C (rs1045642)* на 7. хромозому и 26. егзону гена за П-гликопротеин. Долази до замене синонимним кодоном за 1145. аминокиселину леуцин [110,111]. Фреквенца дивљег С-алела је око 0,51 код припадника беле расе, нешто је виша код Јапанаца (0,58), затим код Афроамериканаца (0,78), а највиша код народа западне Африке (0,91). Претпоставља се да је ова разлика међу народима афричког порекла, у односу на остале, последица позитивне селекције, односно боље заштите гастроинтестиналног тракта од ендемских инфекција у тропским подручјима [110,112]. Хомозиготи *СС* показују знатно већу интестиналну експресију П-гликопротеина, што доводи до појачаног ефлуksа и смањења биорасположивости. Експресија одговарајуће иРНК у дуоденалним ентероцитима је 2-3 пута већа [117]. Поједине студије су добиле супротне резултате, односно да је полиморфан *T*-алел повезан са и до четири пута већом експресијом [118,119]. У сваком случају, хетерозиготи имају интермедијерну експресију овог транспортера. У вези са

претходно изнетим, постоје опречни резултати како се ова мутација одражава на концентрацију лека у плазми, при чему је најчешће испитивани лек дигоксин. У зависности од испитивног лека, иста мутација може бити повезана и са смањеном и повећаном максималном концентрацијом [83,110,112]. Осим што утиче на експресију П-гликопротеина, овај „неми“ полиморфизам доводи и до промене у функционалности транспортног протеина, односно до конформационих промена у структури места за везивање супстрата и инхибитора [120].



Слика 3. П-гликопротеина и његови полиморфизми (преузето из Wolking и сарадници, 2011. [111])

Други полиморфизми $2677T < G$ и $1236T < C$ немају значаја за клопидогрел. Оба полиморфизма су много мање заступљена код припадника беле расе, а резултати истраживања су контраверзни: и за и против могућности да имају утицаја на експресију П-гликопротеина и ресорпцију појединих лекова [83,110].

Осим утицаја на фармакокинетику лекова, полиморфизми П-гликопротеина су доведени у везу и са развојем појединих обољења. Настанак неуродегенеративне Паркинсонове болести се објашњава појачаном пропустљивошћу крвно-мождане баријере за неуротоксичне ксенобиотике [121]. Сличан механизам, односно повећана изложеност слузокоже црева бактеријским токсинима, можда лежи у основи настанка инфламаторне болести колона [122]. Појединачне студије су указале да су $3435TT$ хомозиготи са већим ризиком да оболе од тумора бубрега, балканске ендемске нефропатије, акутне мијелоидне леукемије и акутне лимфобластне леукемије код деце [109].

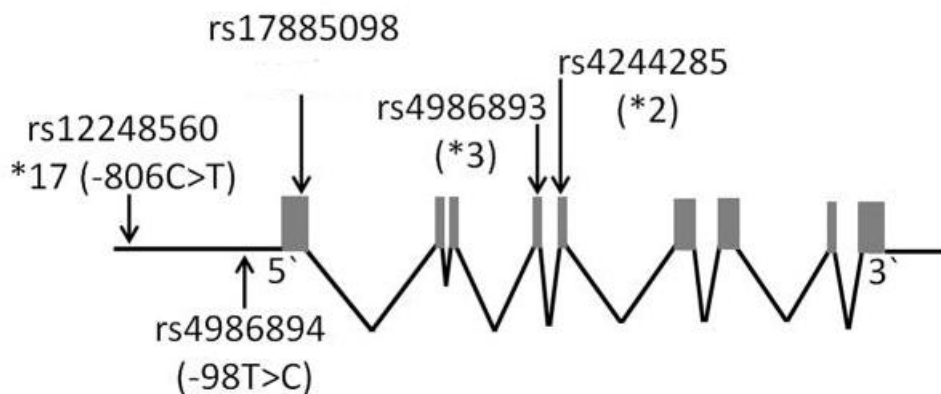
2.6.2. Значај полиморфизама гена за П-гликопротеин код болесника са акутним коронарним синдромом

Усходна регулација П-гликопротеина у танком цреву би требало да смањује апсорпцију и концентрацију клопидогрела код *ABCB1 3435TT* хомозигота. Досадашња истраживања везана за *3435T<C* полиморфизам П-гликопротеина и клопидогрел код болесника са АКС су контрадикторна. Доказано је на здравим добровољцима да се фармакокинетика, као и фармакодинамски одговор, разликују међу носиоцима различитих генотипова, пре свега варијантног хомозигота *TT*. Међутим, студије на болесницима са АИМ су дале контраверзне резултате. Тачније, постоје студије које тврде повезаност фармакокинетике клопидогрела и овог полиморфизма [27,123,124], али и оне где полиморфизам П-гликопротеина није доведен у везу са концентрацијом активног метаболита, нити са резултатима функционалних тестова тромбоцита [91,125].

2.7. Ензим *CYP2C19* и његови полиморфизми

Ензим *CYP2C19* учествује у метболизму великог броја различитих лекова, отприлике 8-10% свих регистрованих лекова [126]. Ген за овај ензим је локализован на дужем краку 10. хромозома (*10q23.33*). Састоји се од 9 кодирајућих егзона, дужине 90,2кб, са кодирајућим регионом од 1473б. Као и већина гена за ензиме цитохрома П450, врло је полиморфан. Од 28 варијанти, поред дивљег алела *1 за *CYP2C19*, полиморфизми са смањеном функцијом који су обухваћени фармакогенетским студијама су *2-*10 и *12-*14*. Варијантни алел *17 је са појачаном функцијом услед појачане експресије. Најчешће анализирани су *2, *3 и *17 (Слика 4). С обзиром на велики број полиморфизама, врло често се класификација врши на основу фенотипа. Екстензивни метаболизери (ЕМ) (генотип *1/*1) су заступљени са 35-50%, док ултрабрзи метаболизери (УМ) (генотип *1/*17 или *17/*17) чине 5-30%. Интермедијерни метаболизери (ИМ) (носиоци једног алела са смањеном функцијом) су присутни у 18-45%, а спори метаболизери (СМ) (носиоци два алела са смањеном функцијом) у 2-5%. У односу на просечних 24% који носе макар један *2 алел, ова фреквенца је нешто нижа код Хиспаноамериканаца (18%), а виша код Афроамериканаца (33%) и Азијата (51%) [34,92,126,127]. Међутим, постоје разлике у мишљењима да ли се

генотип *2/*17 треба сврстати у фенотип ИМ, или можда ЕМ. Sanford и сарадници [126] су показали да је активност *CYP2C19* код носилаца овог генотипа врло слична ЕМ (*1/*1), односно да *17 алел може да компензује смањену функцију *2 алела.



Слика 4. Полиморфизми гена за *CYP2C19* ензим (преузето из Sanford и сарадници, 2013. [126])

Варијантни алел *2 (*rs4244285*) подразумева замену *G>A* на позицији 681, односно замену 227. кодона за пролин стоп-кодоном, и аберантни сплајсинг, што доводи до губитка функције протеина. Постоје и четири субалела *2A, *2B, *2C и *2D који имају додатне мутације, али без функционалних последица. Учесталост у општој популацији је 15,4%. Фреквенца алела код припадника беле и црне расе је око 15%, али је знатно већа код Азијата (29-35%). Хетерозиготи *1/*2 имају 2,3 пута нижу активност ензима [126,127]. Фреквенца осталих алела са смањеном функцијом, је мања од 1%, осим *3 која је код источних Азијата присутна у 2-9%. Алел *3 доводи до измене у протеину W212X услед замене гуанина аденином на положају 636*G>A* (*rs4986892*). *In vitro* испитивања су показала да алели *4-*8 доводе до потпуног губитка функције ензима [34,127].

Једини алел који доводи до појачане функције *17 (806*C>T*, *rs12248560*) је просечно заступљен у 3-21%. Највиша фреквенца је забележена у јужној Европи (преко 40%), а најнижа у источној Азији (испод 1%) [127]. Експресија *CYP2C19* иРНК у јетри је повећана 1,8 пута код хетерозигота, односно скоро 3 пута код хомозигота *17/*17, док је активност ензима повећана више од два пута [126]. Хомозиготни генотип даје фенотип УМ, са појачаним ефектом клопидогрела, и можда повећаним ризиком од крварења. Међутим, хетерозиготи са једним алелом смањене функције имају ИМ, јер његова појачана функција не може да компензује губитак функције другог алела. Нису све студије потврдиле утицај овог полиморфизма на ефикасност клопидогрела, што је

можда последица поремећене равнотеже између алела *2 и *17. Наиме, алел *17 који носи појачану функцију је увек у хаплотипу са дивљим алелом на позицији *2 алела. То компликује интерпретацију резултата, тј. да ли их треба разматрати као међусобно независне факторе, јер појачана експресија може бити последица одсуства *2 алела са смањеном функцијом. Осим тога, *17 је у дисбалансу са ретким *4 алелом код појединаца јеврејског порекла, те постоји могућност погрешне интерпретације фенотипа [34].

Остали полиморфни алели се знатно ређе одређују. То може бити недостатак студија, јер се ти пацијенти класификују у носиоце дивљег *1 алела.

2.7.1. Значај полиморфизама ензима CYP2C19 код болесника са акутним коронарним синдромом

Још 2009. године америчка *FDA* је предложила узимање у обзир генотипа ензима *CYP2C19* при прописивању клопидогрела, и поред противљења америчких удружења кардиолога да још увек не постоји довољно доказа [22]. Генотипизацију би свакако требало спровести у случају одсуства очекиваног одговора на лек [34]. Индивидуализација терапије на основу генотипизације *CYP2C19*, би довела до уштеде од око 5%, ако се узму у обзир цене лечења компликација резистенције на клопидогрел [128], нарочито код високоризичних пацијената [129]. Ипак постоје студије које указују на временски лимитиран ефекат генетских полиморфизама *CYP2C19* на имхибицију тромбоцита изазвану клопидогрелом, на свега неколико недеља. Такође, и други ензими цитохрома П450 могу преузети функцију слабо активног ензима [74]

Носиоци *CYP2C19**2 имају снижен одговор на клопидогрел [22,35,43,33,97,123,125,130,131], зависан од броја мутираних алела. Међутим, ова мутација је одговорна за свега 5-12% варијабилности у одговору тромбоцита на *ADP* [13,92]. Због тога постоји велики број „резистентних“ пацијената (45%) и међу екстензивним метаболизерима, по искључивању могућих индуктора или инхибитора овог ензима [45]. Међутим, постоје студије и са опречним резултатима [91,132]. Додатни проблем генотипизације као водиле за индивидуализацију терапије је ниска сензитивност – свега 45% [13]. Осим тога, једно истраживање је показало да носиоци

алела са смањеном функцијом имају вишу базалну активност тромбоцита, што свакако има уделу у механизму резистенције на клопидогрел код СМ и ИМ [133]. Резистенцију је могуће превазићи повећањем ударне дозе на 900мг [36], односно дозе одржавања на 225мг [134], али само код хетерозигота. Друга могућност за превазилажење генетских фактора код спорих метаболизера је примена ударне дозе од 600мг и доза одржавања од 150мг [130,135]. Полиморфизам *2 је значајан предиктор ПИК и максималне концентрације активног метаболита клопидогрела [35,36,43,125]. Физиолошким фармакокинетичким моделирањем, доказана је могућност предвиђања концентрације и клопидогрела и активног метаболита на основу фенотипа. Код ИМ, концентрација активног метаболита у плазми је до 30% нижа, а код СМ за чак 40% [22,43,48,33,123,134,136–140]. Фармакодинамски ефекат клопидогрела је за 25% нижи код носилаца макар једног *2 алела, или неког другог алела са смањеном функцијом [134].

Што се тиче клиничког исхода болести, чешћа је појава рекурентних догађаја, као и троструко већа инциденца тромбозе стента у првих месец дана [134,136,137,141,142]. Осим тога, носиоци *2 алела имају 1,5 пута већи ризик од АКС и кардиоваскуларне смрти [14,92,134]. Међутим, поред уочених веза између генотипа, метаболизма клопидогрела и агрегације тромбоцита, мета-анализама је клинички значај доказан само у повећању ризика за тромбозу стента [22,138]. *Simon* и сарадници [143] нису пронашли заједничку везу између појединих полиморфизама и клиничког исхода, већ само кроз фенотип ИМ, односно СМ. Поједини аутори [31], оповргавају значај *CYP2C19* фенотипа чак и у случају тромбозе стента. То се пре свега може односити на пацијенте који су лечени искључиво медикаментозно, јер у том случају делимична генетска блокада метаболичког пута клопидогрела носи повећање ризика само 1,07 пута што је од релативно малог клиничког значаја [134].

Највећи клинички проблем је код пацијената са АИМ: без обзира што је ризик од тромбозе стента повећан, интериндивидуална варијабилност у резидуалној активности тромбоцита је велика, па треба у разматрање узети све чињенице које могу утицати на одлуку да ли променити лек (ризик од крварења, ризик од кардиоваскуларних догађаја). Повећање дозе клопидогрела може бити решење за АИМ, али је побољшање код спорих метаболизера незнатно. Резистенцију је могуће превазићи повећањем ударне дозе на 900мг само код хетерозигота [36]. Интермедијерни метаболизери захтевају дозу

одржавања од 225мг, а СМ значајно већу од 300мг, да би се постигао адекватан ефекат на тромбоцитима [91]. Велике студије са, најчешће двоструким, повећањем дозе клопидогрела само на основу резидуалне активности тромбоцита нису дале статистички значајне резултате у смислу смањења ризика од кардиоваскуларне смрти, нефаталног АИМ или тромбозе стента. Разлог може бити у томе што болесници са смањеним метаболизмом могу захтевати и више него двоструке дозе у односу на стандардне већ код хетерозигота, односно ИМ [34].

За разлику од фенотипа СМ и ИМ, носиоци *17 (УМ) показују знатно бољи одговор на 600мг клопидогрела, са нижим вредностима резидуалне активности тромбоцита [136,144]. Занимљиво је да је у *PRINC* студији (*Plavix Response In Coronary Intervention*) пронађен нижи антитромбоцитни ефекат клопидогрела код носилаца *17, у поређењу са носиоцима *1/*1 генотипа, са вредностима сличним онима код носиоца *2 алела [130]. Међутим, хомозиготи *17*17 имају већи ризик од крварења [14,144].

Екстензивни и ултрабрзи метаболизери (укупно 50-80%) не захтевају промену дозе клопидогрела или самог лека. Интермедијерним и спорим метаболизерима (чија је фреквенца знатно већа код Азијата) се препоручује замена другим леком из ове групе (прасугрел и тикагрелор). На тај начин се избегава висока резидуална активност тромбоцита, мерена неким од тестова функције тромбоцита, без значајних нежељених ефеката услед примене другог лека [145]. Осим тога, повећање ударне дозе може бити ефикасно у превазилажењу резистенције код носилаца *CYP2C19**2 [146]. Већина ових препорука је сачињено на основу студија на пацијентима лечених *PCI*, па се не могу транслирати са сигурношћу и на остале индикације за клопидогрел (остали болесници са АКС, ЦВИ, болешћу периферних артерија). Осим тога, замена лека није могућа у свим клиничким ситуацијама: повећан ризик од крварења, контраиндикације, већа цена и мања доступност лекова. Највећи клинички проблем је са АИМ: без обзира што је ризик од тромбозе стента повећан, интериндивидуална варијабилност у резидуалној активности тромбоцита је велика, па треба у разматрање узети све чињенице које могу утицати на одлуку да ли променити лек (ризик од крварења, ризик од кардиоваскуларних догађаја) или само повећати дозу [37].

2.8. Полиморфизам ензима *CYP2C9*

Ензим *CYP2C9* учествује у једној од фаза активације клопидогрела, али је клопидогрел, у високим дозама, уједно и снажан инхибитор овог ензима. Као и други ензими из субфамилије *CYP2C*, ген за *CYP2C9* је лоциран на *10q24* хромозому. Структурно је врло сличан гену за *CYP2C19* (разликују се у 43 од укупно 490 аминокиселина, односно у 9,1%), али ипак постоје значајне разлике у афинитету за супстрате [147]. Познато је више од 60 алела гена за овај ензим. Најчешћи алел је *2 (*rs1799853*, 430C>T), чиме се добија код за аминокиселину цистеин, уместо аргинина. Овакав протеин се карактерише слабом метаболичком активношћу. Фреквенца овог алела је око 6,8%. Најзаступљенији је међу припадницима беле расе, нарочито међу Европљанима (12,1%), због слабог мешања са другим расама. Најмања затупљеност *2 алела, испод 1%, је код Африканаца црне расе и у источној Азији, а нешто изнад 1% код америчких Индијанаца. Друга варијанта овог гена, која такође доводи до фенотипа СМ, је *3 (*rs1057910*, 1075A>C) са фреквенцом око 4,2%. За разлику од беле расе, ово је најфреквентнији алел међу Азијатима. Међу народима са југа Азије (Индијци, Роми), његова фреквенца је скоро 12%. Остали алели са смањеном функцијом су *5 и *11. Алели *6, *15, *25 и *35 подразумевају потпун губитак функције. Већина ових ретких алела се јавља само међу народима црне расе и источне Азије. Без обзира што постоји могућност грешке при генотипизацији, због анализе само једног нуклеарног полиморфизма, та грешка ће бити малог утицаја на коначне резултате услед ниске фреквенце [148].

Активност *CYP2C9* ензима је значајно смањена код носилаца полиморфизама са смањеном функцијом, међутим те вредности зависе од супстрата [149,150]. Ефекат ових полиморфизама је, пре свега испитиван на примерима варфарина и нестероидних антиинфламаторних лекова. Оба алела са сниженом функцијом, *2 и *3, су значајан фактор ризика за крварења изазвана варфарином, односно крварења у горњим деловима гастроинтестиналног тракта код примене нестероидних антиинфламаторних лекова [148]. Хомозиготи за *3 алел показују свега 25% активности, док је код хетерозигота тај проценат између 40% и 75%, у зависности од супстрата [151,152].

2.8.1. Значај полиморфизма ензима CYP2C9 код болесника са акутним коронарним синдромом

Значај полиморфизма CYP2C9 ензима још увек није испитиван у тој мери као када је у питању CYP2C19, пре свега због мањег удела у метаболизму клопидогрела. Малобројне студије су добиле врло различите резултате. Генотипови са смањеном функцијом CYP2C9 (*2/*2, *1/*3, *2/*3, *3/*3) су повезани са стварањем знатно мањих количина активног метаболита клопидогрела, као и слабијим ефектом клопидогрела на агрегацију тромбоцита [43]. Мада је нешто већи број студија које нису нашле статистички значајну везу [140,153].

Носиоци *2 алела немају већи ризик од тромбозе стента након PCI [31], за разлику од особа са *3 алелом код којих је ризик од субакутне тромбозе стента око два пута већи. Међутим, оба полиморфизма су значајни предиктори тромбозе стента [142]. Генотипови са смањеном функцијом (*1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3) су у вези са мањом инхибицијом агрегације тромбоцита [130,131,154,155]. Ризик од резистенције на клопидогрел је скоро четири пута већи [131], с тим што предиктивна вредност CYP2C9 генотипа зависи од примењеног теста функције тромбоцита [154]. Друга истраживања нису показала утицај полиморфизма CYP2C9 на фармакодинамски ефекат код пацијената са АКС [31,133,140,153,156].

Недостатак правих доказа о ефектима полиморфизма CYP2C9 ензима на фармакодинамику клопидогрела, може бити последица два супротна дејства овог ензима на инхибицију агрегације тромбоцита изазвану клопидогрелом. Наиме, CYP2C9 присутан у ендотелу крвних судова доводи до интензивног стварања слободних кисеоничних радикала, што индиректно стимулише агрегацију тромбоцита, највероватније инаktivацијом тромбоцитне ектоADPазе чиме се повећава ниво ADP, као и скевинџингом (енг. *scavenging*) азот оксида са антиагрегационим дејством. На тај начин, у присуству полиморфизма са смањеном функцијом долази до супротстављања „проагрегационог“ ефекта услед смањеног метаболизма клопидогрела, и „антиагрегационог“ као последица редукованог дејства на нивоу ендотела [28].

2.9. Пантопразол – гастропротекција код болесника на двојној антиагрегационој терапији

Комбинација ацетилсалицилне киселине и клопидогрела повећава ризик од настанка гастроинтестиналних компликација у виду ерозивног гастритиса и пептичног улкуса. Ацетилсалицилна киселина оштећује слузокожу желуца блокадом синтезе *PG* (што јесте значајно смањено применом ниских доза) и олакшава настанак крварења услед деловања на тромбоците. Клопидогрел додатно погоршава стање даљим спречавањем агрегације тромбоцита чиме се промовише крварење и отежава зарастање лезије. Годишња инциденца гастроинтестиналних крварења је 1-13%, у зависности од фактора ризика [157]. *CHARISMA* студија је показала значајну разлику између инциденце крварења при примени само ацетилсалицилне киселине у поређењу са двојном антиагрегационом терапијом, али само када су у питању крварења средњег интензитета [76].

Инхибитори протонске пумпе су лекови првог избора за гастропротекцију у АКС, и то само у индикацијама са високим ризиком од крварења: позитивна лична анамнеза за болести гастроинтестиналног тракта, старије особе, комедикација антикоагулансима, нестероидним или стероидним антиинфламаторним лековима, и *Helicobacter pylori* инфекција [157]. Рутинска примена *H2*-антихистаминика или ИПП се не препоручује [134]. Инхибитори протонске пумпе су инхибитори ензима који учествују у метаболизму клопидогрела, али међу појединим представницима постоје разлике. Управо интензитет инхибиције *CYP2C19* одређује могућност интеракције са клопидогрелом. *In vitro* студије су дале следећи опадајући низ, када је у питању инхибиција *CYP2C19*: лансопразол, омепразол, есомепразол, рабепразол, и пантопразол на крају. Представници са врха листе повећавају ризик код ИМ и за 40% [158]. Доказ да је инхибиција *CYP2C19* главни механизам настанка ове интеракције се види у студијама које су показале да код носилаца *2 алела, повезаног са споријим метаболизмом клопидогрела, додатна примена ИПП (омепразола, рабепразола и лансопразола) не доводи до значајног повећања резидуалне активности тромбоцита [52,159]. Међутим, аке се узме у обзир чињеница да *CYP3A4* такође учествује у стварању активног метаболита, може се претпоставити да је инхибиција овог ензима још један механизам за настанак интеракција са ИПП, пре свега

са есомепразолом и лансопразолом, а можда и пантопразолом који има знатно слабији афинитет за овај ензим [157].

Могућности за интеракције клопидогрела са ИПП су вишеструке, пре свега на нивоу метаболизма лека, али и на нивоу апсорпције. Поједини представници ове групе лекова се међусобно разликују по свом потенцијалу да делују инхибиторно на ензиме цитохром П450, као и на П-гликопротеин [134].

Сви ИПП се метаболишу преко *CYP2C19*, и уједно могу бити снажни инхибитори овог ензима. Концентрација пантопразола у плазми зависи од фенотипа *CYP2C19*, те је тако најнижа код УМ, а највиша код СМ [160]. Код СМ, концентрација пантопразола је 10 пута већа. Сматра се да је и фармакодинамски ефекат ИПП већи код СМ и ИМ [161]. Омепразол као један од првих коришћених свакако доводи до значајног смањења терапијског ефекта клопидогрела, као и повећања броја пацијената резистентних на терапију. Примена омепразола смањује концентрацију активног метаболита за 40-45%, а инхибицију агрегације тромбоцита за 20% [134]. Овакав ефекат није запажен са пантопразолом [51,107,162,163]. Наиме, пантопразол није метаболизам-зависни инхибитор *CYP2C19*, за разлику од већине других ИПП, што га чини безбеднијим за истовремену примену са клопидогрелом [164]. Мерењем активности *CYP2C19* код пацијената на двојној антиагрегационој терапији ацетилсалицилном киселином и клопидогрелом, утврђено је да истовремена примена омепразола или есомепразола доводи до смањења активности ензима, за разлику од пантопразола и ранитидина. У складу са тиме, висока резидуална активност тромбоцита је измерена код пацијената који су примали омепразол или есомепразол [165]. Три месеца након АКС, ризик од реинфаркта је 40% већи уколико се примењују ИПП (осим пантопразола) [157], а *BASKET* студија (*Basel Stent Cost-Effectiveness Trial*) је показала да је у периоду од три године након *PCI*, ризик од АИМ два пута већи код пацијената који су користили ИПП [166]. С обзиром на резултате *COGENT* студије (*Clopidogrel and Optimization of Gastrointestinal Events Trial*) [167] и других [157,168], које указују да ниједан од ИПП, чак ни омепразол, не утичу на клинички исход или јављање нежељених догађаја код пацијената са АКС, једно од понуђених објашњења зашто је у другим студијама потврђен негативни ефекат истовремене примене ИПП, је да пацијенти код којих је била неопходна гастропротекција већ имају већи основни кардиоваскуларни ризик [108,157,169].

Из групе ИПП, пантопразол је окарактерисан као најбезбеднији лек за примену у комбинацији са клопидогрелом [170]. Након препоруке *FDA* из 2009. године да се избегава комбинација клопидогрела са омепразолом или есомепразолом, дошло је до значајног смањења употребе ИПП са клопидогрелом. Примена свих лекова из класе је смањена, или је у неким случајевима лек замењен пантопразолом, јер је једино његово прописивање увећано. Оно што јесте зачуђујуће је да је од свих лекова из ове групе, омепразол и даље најпрописиванији у комбинацији са клопидогрелом [171]. Међутим, резултати студија варирају од једне крајности да не постоје никакве интеракције са клопидогрелом, до друге крајности да и пантопразол смањује ефикасност терапије клопидогрелом. Притом, једна студија наводи и да постоје и да не постоје разлике у ефикасности клопидогрела при истовременој примени омепразола, односно пантопразола, у зависности од коришћеног теста функције тромбоцита [172]. Примена пантопразола као гастропротективног лека код болесника на двојној антиагрегационој терапији не узрокује чешћу појаву значајних нежељених кардиоваскуларних догађаја [170]. Студије посматрања су указале да истовремена примена пантопразола не повећава ризик од рекурентног инфаркта миокарда [158].

Нова истраживања, ипак, указују на могућу интеракцију пантопразола са клопидогрелом. Управо мета-анализе које одбацују значај интеракција клопидогрела са ИПП, су показале значајну повезаност између појаве нежељених догађаја и примене слабо потентних инхибитора *CYP2C19*, пантопразола и рабепразола. Међутим, ти резултати су објашњени, не постојањем интеракције, већ карактеристикама самих испитиваних група, које су примале ове ИПП, а имале су већи ризик од појаве нежељених догађаја (смрт, АИМ) [108]. Истовремена примена пантопразола са клопидогрелом и ацетилсалицилном киселином значајно повећава *ADP*-индуковану агрегацију тромбоцита код болесника са АКС. Разлика у овом истраживању је што је ислучен утицај полиморфизама *CYP2C19*. Ипак, резидуална активност и даље није у тој мери повишена да повећава ризик од кардиоваскуларних догађаја [173].

3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

- Одредити учесталост алела и генотипова полиморфизма $3435T < C$ на гену за интестинални П-гликопротеин, као и алела и генотипова за ензиме јетре *CYP2C19* (*2 и *17) и *CYP2C9* (*2) код болесника са акутним коронарним синдромом
- Испитати утицај генских полиморфизама П-гликопротеина и ензима цитохром П450 на концентрације пролека клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела
- Испитати утицај демографских и клиничких карактеристика пацијената са акутним коронарним синдромом, као и комедикације, на концентрацију клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми
- Популационом фармакокинетичком анализом одредити фармакокинетичке параметре клопидогрела и одредити коваријанте клиренса клопидогрела
- Утврдити повезаност између концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми болесника са акутним коронарним синдромом на степен инхибиције агрегације тромбоцита
- Испитати утицај одређиваних генских полиморфизама на терапијски одговор код болесника са акутним коронарним синдромом
- Одредити демографске и клиничке параметре, као и комедикацију која утиче на инхибицију агрегације тромбоцита клопидогрелом код болесника са акутним коронарним синдромом
- Испитати повезаност између концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми болесника са акутним коронарним синдромом, и клиничког исхода (морталитет, рехоспитализација, потреба за хитном медицинском помоћи)

- Испитати утицај генских полиморфизама П-гликопротеина и ензима цитохром П450 на морталитет, рехоспитализацију и потребу за хитном медицинском помоћи код пацијената са акутним коронарним синдромом
- Одредити демографске и клиничке параметре, као и комедикацију која утиче на смртност и инциденцу рехоспитализације и јављања хитној медицинској помоћи

4. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

4.1. Нулте хипотезе

- Полиморфизам гена за П-гликопротеин *ABCB1* C3435T, као и полиморфизми гена за ензиме *CYP2C19* (*2 и *17) и *CYP2C9* (*2) не утичу на концентрацију клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми болесника са акутним коронарним синдромом
- Демографске и клиничке карактеристике пацијената са акутним коронарним синдромом, као ни комедикација, не утичу на концентрацију клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми
- Присуство полиморфизама на генима за П-гликопротеин и испитиване ензиме јетре, не доводи до промене у степену инхибиције агрегације тромбоцита клопидогрелом
- Демографски, клинички параметри и комедикација не утичу на ефикасност клопидогрела на нивоу тромбоцита
- Код пацијената са акутним коронарним синдромом лечених клопидогрелом, присуство варијантних алела на генима за П-гликопротеин, *CYP2C19* и *CYP2C9*, не доводи до промена у клиничком току болести, у смислу повећане смртности и потребе за рехоспитализацијом и хитном медицинском помоћи
- Демографски, клинички параметри и комедикација не доводе до повећања смртности и инциденце рехоспитализација и потребе за хитном медицинском помоћи, код болесника са акутним коронарним синдромом лечених клопидогрелом

4.2. Радне хипотезе

- Присуство одређених алела, генотипова или фенотипова на генима за П-гликопротеин и ензими *CYP2C19* и *CYP2C9*, доводи до промена у концентрацији клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми болесника са акутним коронарним синдромом
- Одређене демографске и клиничке карактеристике пацијената са акутним коронарним синдромом, или комедикација одређеним лековима, узрокује промене у концентрацији клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми
- Одређени алели, генотипови или фенотипови гена за П-гликопротеин, *CYP2C19* и *CYP2C9*, су повезани са измењеним одговором тромбоцита на антиагрегациону терапију клопидогрелом код пацијената са акутним коронарним синдромом
- Степен инхибиције агрегације тромбоцита клопидогрелом је смањен код пацијената са акутним коронарним синдромом, одређених клиничких или демографских карактеристика, или на одређеној комедикацији
- Морталитет, инциденца рехоспитализација и потребе за хитном медицинском помоћи је повећана код пацијента са одређеним алелом, генотипом или фенотипом гена *ABCB1*, *CYP2C19* и *CYP2C9*
- На повећање смртности или инциденце рехоспитализације и потребе за хитном медицинском помоћи утичу одређене клиничке и демографске карактеристике пацијената са акутним коронарним синдромом лечених клопидогрелом, или интеракције се одређеним лековима

5. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ

Истраживање је обављено у Лабораторији за функционалну геномику и протеомику Научноистраживачког центра за биомедицину Медицинског факултета у Нишу, као и на Катедри за хемију Технолошког факултета у Лесковцу и Катедри за фармакологију Медицинског факултета у Крагујевцу. Материјал који је коришћен за истраживање је сакупљен на Клиници за кардиоваскуларне болести Клиничког центра Ниш. Сви пацијенти укључени у студију су претходно обавештени о циљевима истраживања и дали своју сагласност за корешћење узетог материјала и података потписивањем информисаног пристанка. Целокупна студија је одобрена од стране Етичког комитета Медицинског факултета у Нишу и спроведена у складу са етичким принципима Хелсиншке декларације и принципима Добре клиничке и лабораторијске праксе.

5.1. Испитаници

У истраживање је укључено 175 болесника са АКС лечених на Клиници за кардиоваскуларне болести Клиничког центра Ниш. Укључивање у студију је обављено након постављања дијагнозе АКС, *STEMI* или *NSTEMI* на основу биохемијских маркера и електрокардиограма. *STEMI* је дијагностикован код 135 болесника (77,1%), а *NSTEMI* код 40 болесника (22,9%). Примарна *PCI* је изведена код 87 болесника (49,7%), а 29 пацијената је примило фибринолитичку терапију, алтеплазу у 26 случаја (14,9%), док је троје пацијената примило стрептокиназу (1,7%). Осталих 52 пацијента (64,2%) су лечена конвенционално. Код 7 болесника је након фибринолитичке терапије урађена „спасавајућа“ *PCI*.

Табела 2. Демографске и клиничке карактеристике испитиване групе

	STEMI (N=135)	NSTEMI (N=40)	t (p)
Срчана фреквенца (1/мин.)	77,78±19,14	86,12±17,62	-2,251 (0,026)
Систолни крвни притисак (ммHg)	131,60±26,04	128,55±29,73	0,539 (0,591)
Дијастолни крвни притисак (ммHg)	80,41±15,90	77,62±16,52	0,827 (0,410)
Ејекциона фракција (%)	5,2±11,51	52,32±12,30	-0,936 (0,351)
End-систолна димензија леве коморе (мм)	37,55±7,61	36,78±9,42	0,404 (0,687)
End-дијастолна димензија леве коморе (мм)	52,46±6,20	51,92±7,64	0,474 (0,636)
Систолни притисак у десној комори (ммHg)	34,48±12,80	35,75±7,74	-0,361 (0,720)
Димензије леве преткоморе (мм)	39,39±5,77	41,16±4,70	-1,443 (0,152)
Телесна висина (цм)	171,34±8,35	170,94±8,12	0,177 (0,860)
Телесна маса (кг)	82,16±15,78	77,88±13,49	1,028 (0,307)
Body-mass индекс (кг/м ²)	27,23±3,89	25,89±3,90	1,561 (0,121)
Холестерол (ммол/л)	5,64±1,30	5,37±1,56	1,069 (0,286)
LDL (ммол/л)	3,67±1,15	3,47±1,31	0,891 (0,374)
HDL (ммол/л)	1,14±0,62	1,04±0,37	0,681 (0,365)
Триглицериди (ммол/л)	2,09±2,98	1,73±1,20	0,732 (0,465)
Хемоглобин (г/л)	140,07±18,76	135,05±21,63	1,431 (0,154)
Хематокрит (л/л)	0,41±0,05	0,40±0,07	1,143 (0,255)
Еритроцити (10 ¹² /л)	4,70±0,68	4,68±0,56	0,188 (0,851)
Леукоцити (10 ⁹ /л)	12,08±12,33	10,92±3,11	0,582 (0,531)
Тромбоцити (10 ⁹ /л)	256,58±79,29	241,35±76,76	1,072 (0,285)
Глукоза (ммол/л)	8,31±4,48	8,19±4,87	0,151 (0,880)
Креатинин (μмол/л)	100,06±31,18	114,65±73,41	-1,224 (0,228)
Клиренс креатинина (мл/мин.)	80,81±22,41	73,58±36,53	0,722 (0,480)
Уреа (ммол/л)	6,41±2,30	7,92±5,06	-1,833 (0,074)
Аспартат аминотрансфераза (и.ј./л)	163,22±184,51	53,08±51,34	5,998 (0,000)
Аланин аминотрансфераза (и.ј./л)	49,98±54,77	38,77±13,74	3,983 (0,000)
Лактат дехидрогеназа (и.ј./л)	1001,33±818,66	670,78±462,85	1,499 (0,138)
Натријум (ммол/л)	136,15±11,38	137,10±3,16	-0,452 (0,652)
Калијум (ммол/л)	4,29±0,47	4,50±0,47	-2,180 (0,031)
С-реактивни протеин (мг/л)	15,23±25,64	29,62±49,48	-1,662 (0,104)
Тропонини (нг/л)	16,78±33,01	6,03±16,57	2,197 (0,030)
Креатин киназа (и.ј./л)	1237,62±1459,45	408,32±982,04	3,983 (0,000)
Креатин киназа MB (и.ј./л)	121,29±135,88	32,20±39,56	6,363 (0,000)
Фибриноген (г/л)	4,58±2,13	4,87±1,66	-0,582 (0,561)

5.1.1. Клиничке и демографске карактеристике пацијената

Испитивана група је била просечне старости $60,81 \pm 11,29$ година (од 30 до 89 година). Укупно 122 пацијента су била мушког пола (69,7%), а 53 женског пола (30,3%). Није било разлике у старосној ($t=0,242$, $p=0,809$), нити полној структури ($\chi^2=1,278$, $p=0,327$) болесника са *STEMI*, односно *NSTEMI*. Испитивани пацијенти су подељени у две групе, са *STEMI* и *NSTEMI*. Упоредне демографске и клиничке карактеристике ове две групе су приказане у Табели 2.

На основу анамнестичких података, утврђено је да је 31 пацијент (17,7%) већ имао претходни АКС (пацијенти са ре-инфарктом миокарда нису укључивани у студију). Од артеријске хипертензије је боловало 110 болесника (62,9%), са просечном дужином трајања болести од $8,64 \pm 7,83$ године. Дијабетес мелитус тип 2 је претходно дијагностикован код 49 пацијента (28,0%) пре просечно $11,29 \pm 8,61$ година. Атријална фибрилација је утврђена код 16 болесника (17,7%).

Једино је пушење евидентирано међу навикама испитиване групе, а да је имало значаја за наше истраживање. Пацијенти су класификовани као пушачи (34,3%) и непушачи или бивши пушачи (35,7%). Остале навике (учестало конзумирање или конзумирање већих количина грејпфрута, алкохола, екстракта кантариона или гинко билобе) које би могле имати утицаја на добијене резултате, су пацијенти укључени у студију негирали.

5.1.2. Медикаментозна терапија у испитиваној групи

Сви пацијенти укључени у студију су добили рутинску антиагрегациону и антикоагулантну терапију, што је у складу са важећим препорукама. У свим случајевима, као антитромбоцитни лекови, коришћени су ацетилсалицилна киселина (98,3%) и клопидогрел (100,0%). Најчешће примењивани режим дозирања ацетилсалицилне киселине (65,1%) је ударна доза од 300мг са дозом одржавања од 100мг. Што се тиче клопидогрела, 57 пацијената (32,6%) је примило ударну дозу од 600мг, а 56 (32,0%) 300мг као ударну дозу клопидогрела. На основу одговарајућих индикација, пре свега старости болесника, код 37 пацијената (21,1%) није примењена

ударна доза клопидогрела. Након једне ударне дозе (као и код болесника код којих је терапија започета дозом одржавања), већина пацијената (89,7%) је била на дози одржавања од 75мг. Код укупно 9 болесника примењене су неуобичајене ударне дозе клопидогрела од 150мг (1,7%), 450мг (2,9%) или 900мг (0,6%). С обзиром да је узоравање крви за одређивање концентрације клопидогрела и његовог метаболита обављено трећег дана од започињања терапије, код 18 болесника (10,3%) је као доза одржавања узета већа доза клопидогрела (150мг или 300мг) иако су, најчешће након трећег дана и ови пацијенти превођени на дозу одржавања од 75мг.

Табела 3. Преглед примењене терапије у испитиваној групи

	STEMI (n=135)	NSTEMI (n=40)	χ^2 (p)
Клопидогрел	175 (100,0%)	175 (100,0%)	
Ацетилсалицилна киселина	134 (99,3%)	38 (95,0%)	3,322 (0,131)
АСЕ-инхибитори	95 (70,9%)	24 (60,0%)	1,692 (0,245)
Бета-блокатори	75 (78,9%)	17 (63,0%)	2,897 (0,127)
Фуросемид	22 (16,3%)	14 (35,0%)	6,606 (0,014)
Спиронолактон	21 (15,6%)	10 (25,0%)	1,888 (0,237)
Амлодипин	11 (8,1%)	9 (22,5%)	6,274 (0,021)
Амјодарон	16 (11,9%)	2 (5,0%)	1,570 (0,372)
Дигоксин	9 (6,7%)	2 (5,0%)	0,146 (1,000)
Дуго-делујући вазодилататори	27 (20,0%)	16 (40,0%)	6,660 (0,013)
Триметазидин	11 (8,1%)	7 (17,5%)	2,925 (0,133)
Статини	126 (93,3%)	39 (97,5%)	0,994 /0,458)
Пантопразол	124 (91,9%)	34 (85,0%)	1,652 (0,226)
Анксиолитици	45 (33,3%)	14 (35,0%)	0,038 (0,851)
Деривати сулфонилурее	8 (5,9%)	4 (10,0%)	0,802 (0,474)

Примењена терапија је сумирана у Табели 3. Поред претходно описане терапије, медикаментозну терапију су чинили и АСЕ-инхибитори (68,0%), бета-блокатори (72,0%), фуросемид (20,6%), спиронолактон (17,7%), амлодипин (11,4%), амјодарон (10,3%), дигоксин (6,3%), дуго-делујући вазодилататори (33,7%) и триметазидин (10,3%). Најчешће прописиван АСЕ-инхибитор је зофеноприл (36,0%), а затим рамиприл (20,0%) и фосиноприл (9,1%). Код већине пацијената примењени бета-блокатор је био бисопролол (61,1%), а код знатно мањег броја карведилол (9,1%). Гастропротекција је постигнута применом пантопразола (90,3%), а 33,7% болесника је добило анксиолитике. Већини пацијената (94,3%) су прописани статини за регулацију липидног статуса и због плејотропног антиинфламаторног дејства статина код пацијената са АКС, и то најчешће

аторвастатин (77,7%), ређе росувастатин (9,1%) и симвастатин (7,4%). Од остале терапије се по учесталости и значају издваја примена деривата сулфонилурее (6,9%).

Пацијентима код којих је дијагностикован *NSTEMI* су нешто чешће прописивани фуросемид ($p<0,05$) и антиисхемијска терапија амлодипин ($p<0,05$) и дуго-делујући вазодилататори ($p<0,05$), што је очекивано с обзиром на пролонгирану исхемију.

5.2. Методе

5.2.1. Узорковање материјала

Од сваког пацијента укљученог у студију узета су по два узорка крви. Први узорак пуне крви коришћен је за изолацију ДНК и генетска испитивања. Други узорак је обавезно узиман три дана по отпочињању терапије клопидогрелом, 1ч након последње дозе, између 9.30ч и 10.00ч ујутру. У плазми овог узорка су одређиване концентрације клопидогрела, 2-оксо-клопидогрела и пантопразола. Наиме, након три дана терапије постиже се равнотежна концентрација лека у крви, на основу познатог полувремена елиминације, а након 1ч од примене лека могу се измерити максималне концентрације.

5.2.2. Испитивање генских полиморфизама

Сва генетска испитивања су обављена у Лабораторији за функционалну геномику и протеомику Научноистраживачког центра за биомедицину Медицинског факултета у Нишу.

5.2.2.1. Изолација ДНК

Изолација ДНК из пуне крви, са *EDTA* као антикоагулансом, је извођена методом.isoлавања. Најпре су лизирани еритроцити, уз издвајање талога леукоцита додавањем раствора *SLR* (20:5). Након центрифугирања на 1800обр./мин. супернатант је одливан.

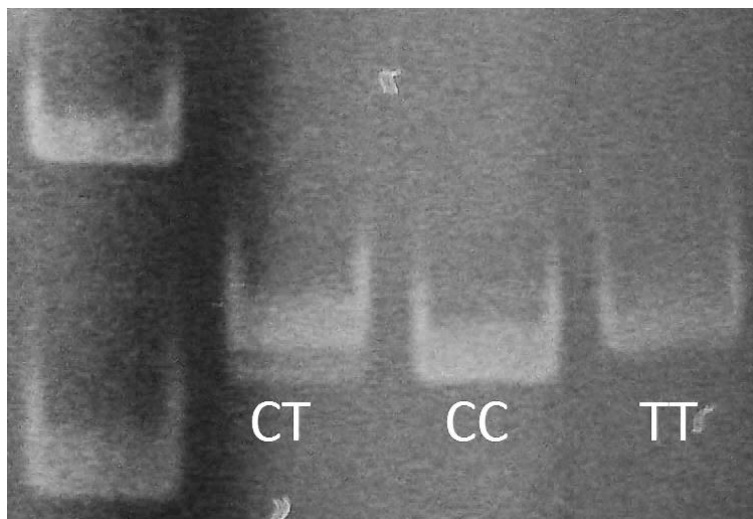
Процедура је понављана још два пута до добијања белог талога. Добијене ћелије су, затим, ресуспендоване у 1мл *SLR*, а потом је вршена њихова лиза са 5мл *SLB* раствора, 5мин. у кључалој води. Мембране су уклањане додавањем 1/3 волумена 9,5М амонијум ацетата. Након вортексирања и центрифугирања 10мин. на 3500обр./мин. супернатант је одливан. Додавањем изопропанола извршена је преципитација и омогућена је визуелизација ДНК (додаван је у односу 1:1). ДНК је и испирана у 70% етанолу. Изолована ДНК је растворена у 200μл раствора *TE* на собној температури. По потпуном растварању изоловане ДНК, мерена је концентрација на апарату *BiospecNano* (*Shimadzu*, Јапан). Добијени раствор је чуван на -20°C до испитивања генских полиморфизама. Узорци су аликвотиран са просечном концентрацијом ДНК од 50нг/μл.

5.2.2.2. Испитивање генског полиморфизма *ABCB1* C3435T (*rs1045642*)
APMC-PCR методом

За испитивање полиморфизма *ABCB1* гена *C3435T* коришћени су алел-специфични прајмери који су омогућили амплификацију дивљег *C* алела (125бп) и мутираног *T* алела (136бп) (Табела 4). Реакциона смеша је садржала укупно 25μл: 0,3μл ДНК растворене у *TE* пуферу (око 20нг ДНК), по 0,25μл сваког прајмера (концентрације 10пмол/μл), 11,45μл дејонизоване воде и 12,5μл готовог Капа микса (*KAPA2G ReadyMix FastHotStart*; *Kapa Biosystems*, Бостон, САД). Капа микс садржи *Hot Start* ДНК полимеразу, *dNTPs*, *MgCl₂* и стабилизаторе. Услови под којима је вршено ланчано умножавање гена *APMC-PCR* (енг. *polymerase chain reaction*) методом, су приказани у Табели. Умножени фрагменти су раздвајани вертикалном електрофорезом на 8% акриламидном гелу. Коришћен је ледер од 100бп (*Gene Ruler 100bp*), а 1,5μл *PCR* амплификата је мешан са 7μл дејонизоване воде и 1,5μл боје (*Thermo Scientific 6x DNA Loading Dye*). Електрофоретско раздвајање је трајало 95мин. при струји од 20mA на 120V. Након завршене електрофорезе, гел је бојен 10мин. у смеси етидијум бромида и *1xTBE* раствора (0,5μг/μл), након чега је вршена визуелизација ДНК фрагмената под *UV* зрацима (Слика 5).

Табела 4. Прајмери и услови за PCR

Генски полиморфизам	Прајмери	Услови PCR реакције	Рестрикциони ензим
ABCB1 C3435T (rs1045642)	<i>C</i> (5'-GGT GTC ACA GGA AGA GAT C-3') <i>T</i> (5'-CAG CCG GGT ATA GTC ACA GGA AGA TAT T-3') <i>Reverse</i> (5'-GGC CAG AGA GGC TGC CAC AT-3')	иницијална денатурација 95°C (2мин.) 31 циклус: денатурација 95°C (15с) анилинг 52°C (15с) елонгација 72°C (15с) терминална елонгација 72°C (5мин.) терминација 4°C	Без рестрикционог ензима
		иницијална денатурација 95°C (2мин.) 32 циклуса: денатурација 95°C (15с) анилинг 52°C (15с) елонгација 72°C (30с) терминална елонгација 72°C (30с) терминација 4°C	
CYP2C19*2 (rs4244285)	<i>Forward</i> (5'-AAT TAC AAC CAG AGC TTG GC-3') <i>Reverse</i> (5'-TAT CAC TTT CCA TAA AAG CAA G-3')	иницијална денатурација 95°C (2мин.) 35 циклуса: денатурација 95°C (15с) анилинг 52°C (15с) елонгација 72°C (15с) терминална елонгација 72°C (30с) терминација 4°C	<i>SmaI</i>
		иницијална денатурација 95°C (2мин.) 32 циклуса: денатурација 95°C (15с) анилинг 62°C (15с) елонгација 72°C (15с) терминална елонгација 72°C (30с) терминација 4°C	
CYP2C19*17 (rs12248560)	<i>Forward</i> (5'-GCC CTT AGC ACC AAA TTC TC-3') <i>Reverse</i> (5'-ATT TAA CCC CCT AAA AAA ACA CG-3')	иницијална денатурација 95°C (2мин.) 32 циклуса: денатурација 95°C (15с) анилинг 62°C (15с) елонгација 72°C (15с) терминална елонгација 72°C (30с) терминација 4°C	<i>LweI</i>
		иницијална денатурација 95°C (2мин.) 32 циклуса: денатурација 95°C (15с) анилинг 62°C (15с) елонгација 72°C (15с) терминална елонгација 72°C (30с) терминација 4°C	
CYP2C9*2 (rs1799853)	<i>Forward</i> (5'-GTA TTT TGG CCT GAA ACC CAT A-3') <i>Reverse</i> (5'-GGC CTT GGT TTT TCT CAA CTC-3')	иницијална денатурација 95°C (2мин.) 32 циклуса: денатурација 95°C (15с) анилинг 62°C (15с) елонгација 72°C (15с) терминална елонгација 72°C (30с) терминација 4°C	<i>AvaII</i>
		иницијална денатурација 95°C (2мин.) 32 циклуса: денатурација 95°C (15с) анилинг 62°C (15с) елонгација 72°C (15с) терминална елонгација 72°C (30с) терминација 4°C	



Слика 5. Полиморфизми П-гликопротеина визуелизовани на полиакриламидном гелу

5.2.2.3. Испитивање генског полиморфизма CYP2C19*2 (rs4244285) PCR-RFLP методом

За одређивање *CYP2C19*2* коришћена је *PCR-RFLP* метода. Реакциону смешу, запремине 25μл, су чинили 12,5μл Капа микса, по 0,5μл сваког прајмера (усходног и нисходног, концентрације 10пмол/μл), 10,5μл дејонизоване воде и 1μл изоловане ДНК. Прајмери, као и услови за апмпликацију фрагмената су приказани у Табели. Рестрикциони ензим *SmaI* сече фрагмент од 169бп кји одговара *CYP2C19*1* на продукте дужине 120 и 49бп. Добијени продукти су раздвајани вертикалном електрофорезом на 8% полиакриламидном гелу, а затим бојени етидијум бромидом и детектовани под *UV* светлом (Слика).

5.2.2.4. Испитивање генског полиморфизма CYP2C19*17 (rs12248560) PCR-RFLP методом

Реакциона смеша за одређивање *CYP2C19*17* генског полиморфизма је, поред 1μл изоловане ДНК, садржала по 0,5μл сваког прајмера (усходног и нисходног, концентрације 10пмол/μл), 10,5μл дејонизоване воде и 12,5μл Капа микса. Прајмери који су коришћени су наведени у Табели, као и услови за одвијање *PCR-RFLP*. Након тога, преко ноћи, смеша 7μл амплификата, 16,9μл дејонизоване воде, 2μл пуфера (*Buffer*

Tango) и 0,1μл рестрикционог ензима *LweI* је остављена на 37°C у водено купатило. Након деловања рестрикционог ензима, *CYP2C19*1* алел се детектује фрагментима од 217, 142 и 113бп, а *CYP2C19*17* алел фрагментима од 183, 142 и 113бп. Раздвајање фрагмената је вршено на 2% агарозном гелу хоризонталном електрофорезом, а затим су одређивани генотипови (Слика).

5.2.2.5. Испитивање генског полиморфизма *CYP2C9*2* (*rs1799853*) *PCR-RFLP* методом

На сличан начин као за претходно наведени генски полиморфизам, испитиван је генотип за *CYP2C9*2* полиморфизам. У Табели су наведени коришћени прајмери, као и услови за *PCR-RFLP*. Добијени амплификат је садржао фрагменте дужине 454бп. Фрагменте који одговарају *CYP2C9*1* алелу, рестрикциони ензим *AvaII* сече на фрагменте од 397 и 57бп (Слика). Визуелизација и детекција добијених фрагмената је вршена након хоризонталне електрофорезе на 2% агарозном гелу.

5.2.2.6. Вертикална електрофореза на 8% полиакриламидном гелу

Метода вертикалне електрофорезе на 8% полиакриламидном гелу је коришћена за одређивање генских полиморфизама *ABCB1 C3435T* и *CYP2C19*2*. Гел је прављен мешањем 9,2мл дејонизоване воде, 3,99мл 30% полиакриламида и 1,5мл 10% *TBE* пуфера, а затим истовременим додавањем 0,15мл *APS* (амонијум персулфат) и 0,015мл агенса *Temed*. Коришћен је ледер од 100бп (*Gene Ruler 100bp*), а 1,5μл *PCR* амплификата је мешан са 7μл дејонизоване воде и 1,5μл боје (*Thermo Scientific 6x DNA Loading Dye*). Електрофоретско раздвајање је трајало 95мин. при струји од 20mA на 120V. Након завршене електрофорезе, гел је бојен 10мин. у смеши етидијум бромаида и *1xTBE* (0,5μг/μл), након чега је вршена визуелизација ДНК фрагмената под *UV* зрацима

5.2.2.7. Хоризонтална електрофореза на 2% агарозном гелу

Метода хоризонталне електрофорезе на 2% агарозном гелу је коришћена за раздвајање ДНК фрагмената при испитивању *CYP2C19*17* и *CYP2C9*2* генских

полиморфизама. Гел је припреман тако што је 1,2г агарозе растворено у 60мл *TBE* пуфера (1:10). Пуфер се добија мешањем 0,89М *Tris-HCl*, 0,89М борне киселине и 0,5М *EDTA* (pH 8,0). Поред ледера од 100бп (*Gene Ruler 100bp*), на гел су наношени *PCR* амплификати након деловања рестрикционог ензима у количини од 9μл, помешани са 3μл боје (*Thermo Scientific 6x DNA Loading Dye*). Раздвајање је трајало 2,5ч при јачини струје 100мА и напону 100V. По завршетку електрофорезе, гел је бојен 30мин. у етидијум бромиду, а затим посматран под *UV* светлом.

5.2.3. *Одређивање концентрација клопидогрела, 2-оксо-клопидогрела и пантопразола у плазми методом ултрабрзе течне хроматографије са тандем масеним детектором*

Мерење концентрација клопидогрела, 2-оксо-клопидогрела и пантопразола у плазми методом *UHPLC-DAD-ESI-MS/MS* (*Ultra high performance liquid chromatography – diode array detection – electrospray ionization mass spectrometry analysis*) је урађено на Катедри за хемију Технолошког факултета у Лесковцу.

5.2.3.1. Припрема стандардних раствора

Основни раствор је добијен растварањем 1мг стандарда у 100цм³ метанола. Стандардни раствори су свеже прављени од основног раствора и чувани на температури од 4°C до њихове употребе. Концентрације припремљених стандардних раствора у метанолу, спремних за употребу, су приказане у Табели 5. За одређивање 2-оксо клопидогрела и пантопразола, коришћена су по два низа стандардних раствора, за распоне нижих и виших концентрација. Сви експерименти су рађени на собној температури.

Табела 5. Концентрације стандардних раствора клопидогрела, 2-оксо-клопиодгрела и пантопразола

Концентрација (мг/дм ³)				
Клопидогрел	2-оксо-клопидогрел		Пантопразол	
0,015	0,015	0,5	0,1	1,5
0,025	0,025	1,5	0,3	2,5
0,05	0,05	2,5	0,5	3,5
0,075	0,075	3,5	0,7	5,0
0,1	0,1	5,0	1,0	7,5
0,2	0,2	4,5	1,5	10,0
0,3	0,3	10,0		12,5
		12,5		15,0
		15,0		17,5
		17,5		20,0
		22,5		22,5

5.2.3.2. Припрема узорака

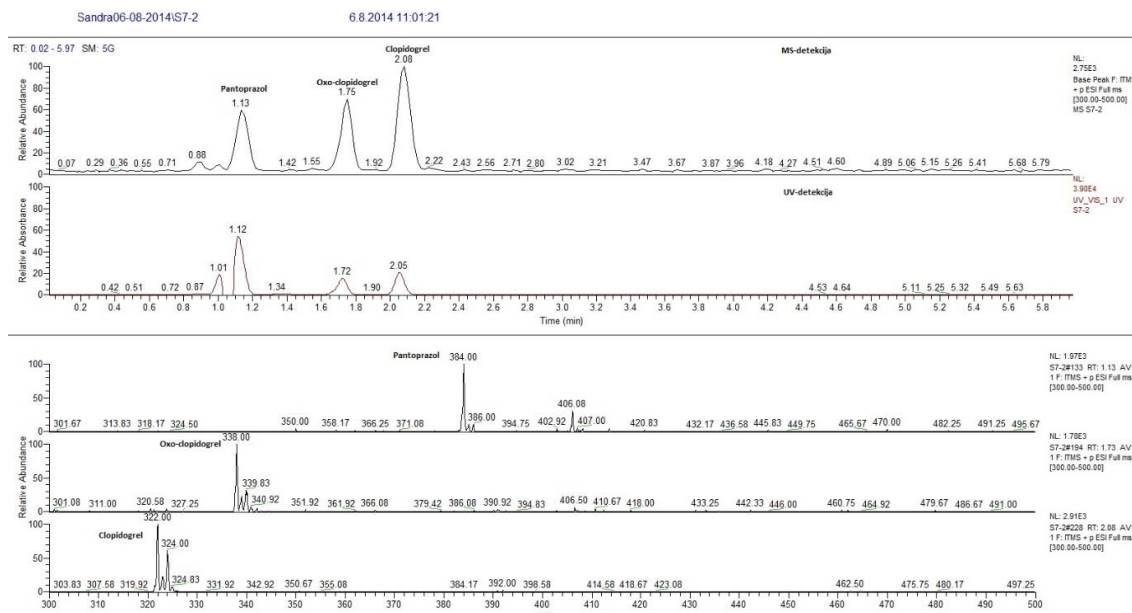
Раствори узорака су припремани мешањем 0,015мл плазме и 0,6мл ацетонитрила, а затим центрифугирањем на 13800обр./мин. 10 минута како би се највећи део протеина исталожио на дну епендорф епрувета. Супернатант је декантиран у бочице филтрирањем кроз шприц филтере величине 0,45μм за UHPLC-DAD-MS анализу.

5.2.3.3. UHPLC-DAD-ESI-MS/MS анализа

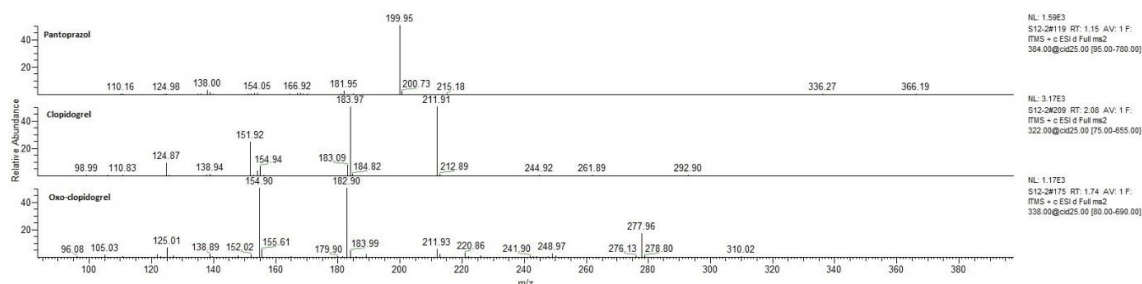
Ултрабрза течна хроматографија (UHPLC) је извођена коришћењем Dionex Ultimate 3000 UHPLC+ система опремељеним детектором са низом диода (DAD), и повезаним са масеним спектрометром са јонском замком (LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, САД). Сепарација је вршена на колонама Poroshell 120 EC-C18 (Agilent, САД) величине 4,6×50мм и величином честица 2,7μм, на 25°C. Мобилну фазу су чинили (А) 0,1% мравља киселина у води, (В) 0,1% мравља киселина у метанолу и (С) 0,1% мравља киселина у ацетонитрилу у размери 20, 10 и 70% (v/v), у изократском режиму са протоком од 0,25цм³/мин. Ињектована запремина узорака је била 2μл. Апсорпција UV-Vis спектра је детектована уз помоћ DAD (са тоталним опсегом

спектра 200-800нм), подешеног да детектује три таласне дужине, λ_{det} (240, 220 и 300нм) симултано. За масену спектрометријску анализу (MS) коришћен је LCQ масени спектрометар са 3D јонском замком и јонизацијом електропржејем (ESI) у позитивном јонском моду. Параметри ESI извора су били: напон извора 4,5кV, капиларни напон 22V, напон на конусу 65V, капиларна температура 350°C, проток носећег и помоћног гаса (N_2) 40 и 4 арбитарне јединице. MS/MS спектар је добијен раздвајањем јона у потпуном опсегу m/z 300-500. За фрагментациону студију (MS/MS), на основу добијених података извршена је дисоцијација јона изазвана сударима (CID). Нормализована колизиона енергија CID ћелије је била подешена на 25eV.

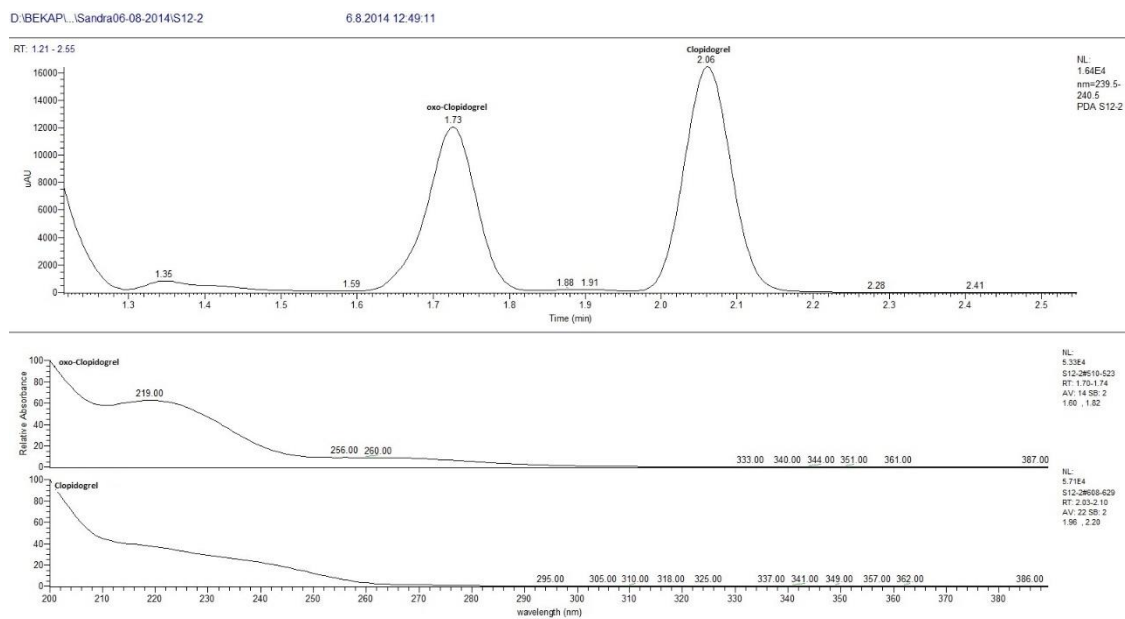
На Сликама 6-12, су приказани примери добијених хроматограма, MS/MS и UV-Vis спектра стандарда клопидогрела, 2-оксо-клопидогрела и пантопразола, као и анализираних узорак.



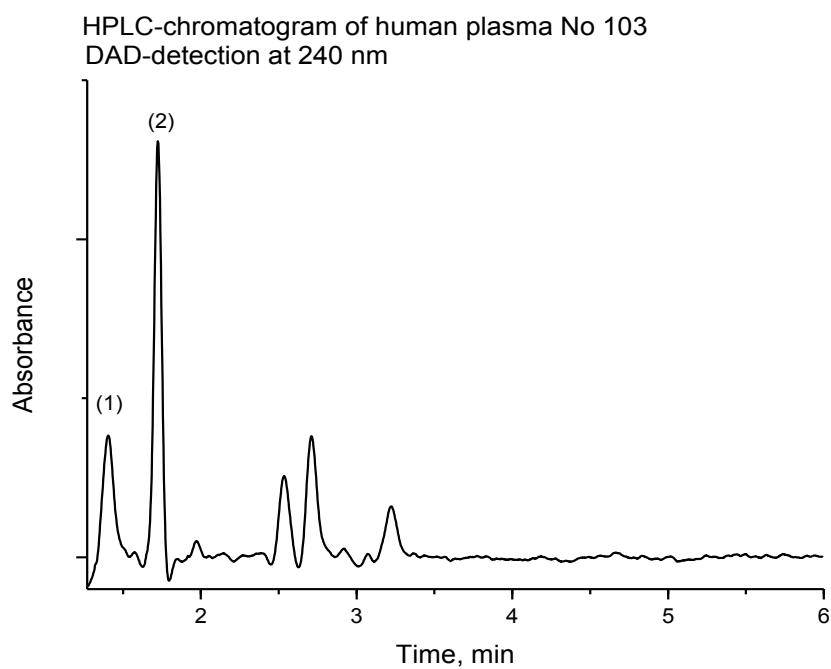
Слика 6. Хроматограми стандарда клопидогрела, 2-оксо-клопидогрела и пантопразола



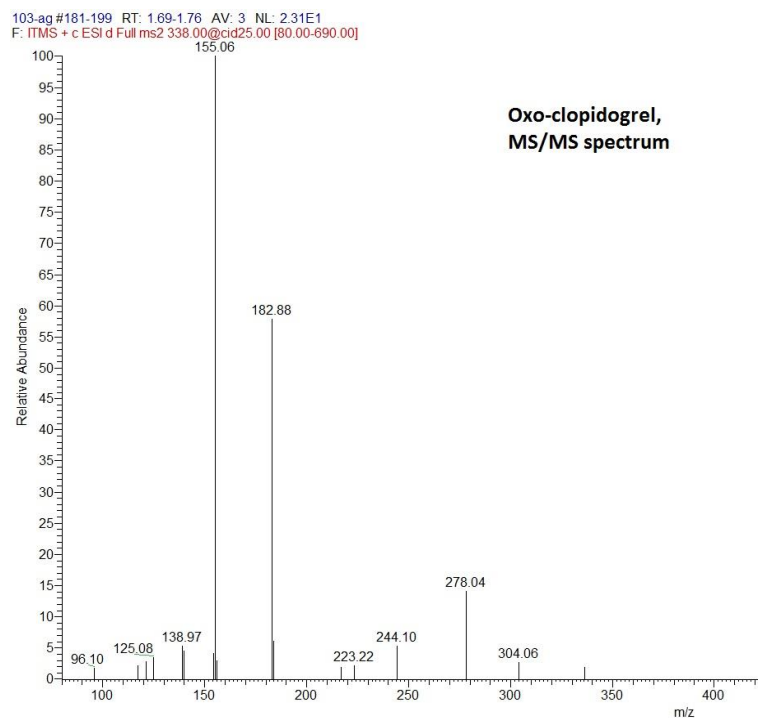
Слика 7. MS/MS спектри стандарда клопидогрела, 2-оксо-клопидогрела и пантопразола



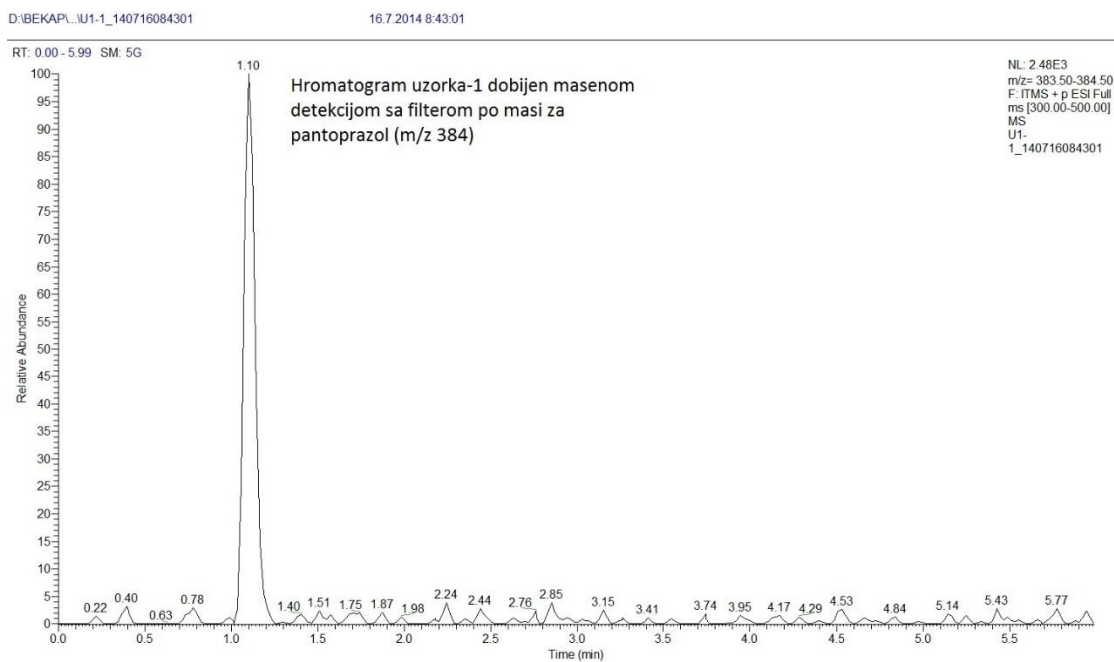
Слика 8. UV-Vis спектри клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела



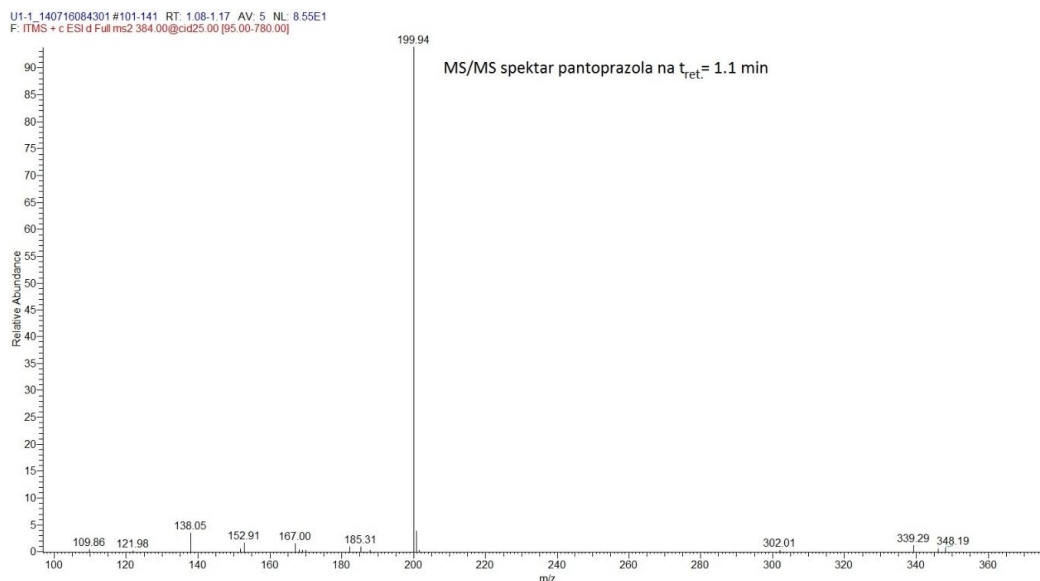
Слика 9. Хроматограм узорка хумане плазме, добијен DAD-детекцијом на 240нм таласне дужине



Слика 10. MS/MS спектар 2-оксо-клопидогрела у узорку хумане плазме



Слика 11. Хроматограм узорка хумане плазме, добијен масеном детекцијом са филтером по маси за пантопразол (m/z 384)



Слика 12. MS/MS спектар пантопразола

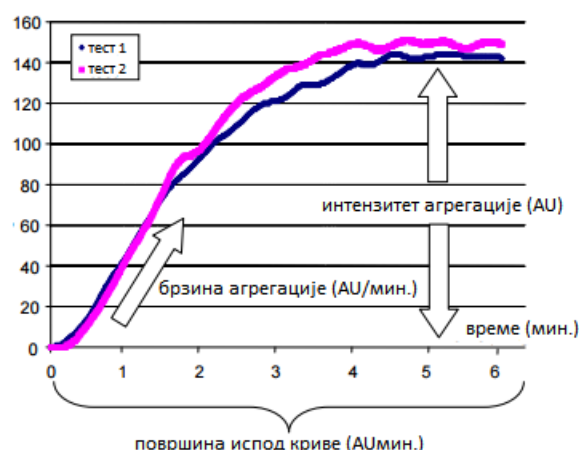
Калибрационе криве су добијене повлачењем у координатном систему концентрација у узорцима у односу на максималне површине клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела. Максималне површине стандарда су узете са хроматограма добијених DAD детектовањем на таласној дужини од 220нм. Насупрот томе, у случају пантопразола, одговарајуће максималне површине стандарда су добијене са хроматограма добијених MS-детекцијом при m/z 384 у опсегу између 300 и 500 арбитарних јединица. Пронађена је линеарна корелација између максималних ареа и концентрација у узорцима, која је приказана регресионим једначинама:

- клопидогрел
 - $t^{ret}=2,1$ мин.
 - UV-детекција у опсегу 200-500нм, $\lambda_{det}=240$ нм
 - опсег концентрација: 0,015-0,3мг/дм³
 - $c \text{ (мг/дм}^3\text{)} = (A - 18,0820) / 2323,7$
 - $R^2 = 0,992$
- 2-оксо-клопидогрел
 - $t^{ret}=1,73$ мин.
 - UV-детекција у опсегу 200-500нм, $\lambda_{det}=240$ нм
 - нижи опсег концентрација: 0,015-0,3мг/дм³
 - $c \text{ (мг/дм}^3\text{)} = (A - 4,4067) / 1267,63$
 - $R^2 = 0,985$

- виши опсег концентрација: 1,5-22,5мг/дм³
 - $c \text{ (мг/дм}^3\text{)} = (A + 438,3772) / 2467,9338$
 - $R^2 = 0,997$
- пантопразол
 - $t^{ret} = 1,13$ мин.
 - параметри MS-детекције: *ITMS + p ESI Full ms* (300,00-500,00), *scan filter*: *m/z 384*
 - нижи опсег концентрација: 0,1-1,5мг/дм³
 - $c \text{ (мг/дм}^3\text{)} = (A + 555,8974) / 6757,1669$
 - $R^2 = 0,976$
 - виши опсег концентрација: 1,5-22,5мг/дм³
 - $c \text{ (мг/дм}^3\text{)} = (A - 1245,9403) / 3725,8705$
 - $R^2 = 0,998$

5.2.4. Мерење инхибиције агрегације тромбоцита

Функција тромбоцита је мерена *Multiplate* уређајем (*Dynabate*, Минхен, Немачка) из узорака пуне крви, код 18 пацијената са *STEMI*, при равнотежном стању клопидогрела. На основу промене импеданце на површини електрода уроњених у крв (енг. *multiple electrode aggregometry – MEA*), мери се агрегација тромбоцита након индукције агонистима као што су арахидонска киселина и *PGEI*, или стимулацијом тромбинских рецептора. У овом истраживању коришћени су резултати добијени индукцијом агрегације тромбоцита уз помоћ *PGEI*, с обзиром да се ради о сензитивнијем тесту у поређењу са активацијом тромбоцита *ADP*-ом. У оба случаја је могуће одредити осетљивост тромбоцита на антагонисте *ADP* рецептора, као што је клопидогрел. Увек се врше по два мерења, при чему коефицијент корелације између две добијене криве мора бити најмање 0,980 да би се тест сматрао прихватљивим. На основу добијених графикана (Слика 13), израчунавају се вредности интензитета агрегације у арбитарним јединицама агрегације (*AU*), брзина агрегације (*AU/мин.*), и најважнији параметар – ПИК агрегације (*AUмин.*). Као гранична вредност ПИК агрегације при којој је одговор на лек сматран адекватним је била 468*AUмин* [89].



Слика 13. Резултат мерења инхибиције агрегације тромбоцита

5.2.5. Статистичка анализа

Добијени подаци су анализирани коришћењем Статистичког пакета за социјалне науке (*Statistical Package for Social Sciences (SPSS)*, верзија 16.0; Чикаго, САД). Нормалност расподеле је ипитивана на основу неколико особина расподеле (асиметрија, спљоштеност, присуство екстремних вредности, Шапиро-Вилков тест). Непрекидне променљиве су представљане средњом вредношћу са стандардном девијацијом (*SD*), или медијаном са интерквартилном разликом, у зависности од нормалности дистрибуције података. Осим у виду табела, добијени резултати су представљани и графички.

Групе непрекидних варијабли, подељене по различитим критеријумима, су међусобно упоређиване коришћењем параметријских (Студентов *t*-тест, *ANOVA*) или непараметријских тестова (Ман-Витнијев *U*-тест, Џонкхир-Терпстра тест, Крускал-Валисов тест). Међусобна повезаност непрекидних променљивих је тестирана извођењем Пирсоновог или Спирмановог теста корелације. Веза између две категоријске променљиве је истраживана применом χ^2 -теста независности са корекцијом непрекидности по Јејтсу или на основу Фишеровог тачног показатеља вероватноће.

Методом стандардне вишеструке регресије формиран су модели који показују могућност предвиђања промена зависне варијабле на основу више независних променљивих. Бинарна логистичка регресија је коришћена у случају дихотомних категоријских зависних варијабли. Методом Соx-регресије је утврђиван значај

параметара за појаву догађаја као што су смрт, рехоспитализација и јављање хитној медицинској помоћи.

Статистичка значајност је одређивана на нивоу $p < 0,05$.

5.2.6. Популациона фармакокинетска анализа клопидогрела

Популациона фармакокинетска (ПФК) анализа је извршена коришћењем *NONMEM (NONlinear Mixed Effect Modelling approach)* софтвера са *ADVAN4 TRANS3* субрутином (верзија 7.3) на Катедри за фармакологију Медицинског факултета у Крагујевцу. Модел са два компартмана, временом кашњења (енг. *lag time*) и апсорпцијом првог реда коришћен је за процену средње популацијске вредности клиренса клопидогрела и одређивање значаја различитих коваријанти.

Анализа је изведена на узорку од 85 пацијената, 53 (62,4%) мушкарца и 32 (37,6%) жене, просечне старости $60,45 \pm 11,59$ година (између 37 и 89 година). Основне карактеристике узорка су приказане у Табели 6.

С обзиром да су сви пацијенти клопидогрел узели оралним путем, апсолутна биорасположивост (F) лека није била одређивана. Након што су анализирани прикупљени подаци, процењивани су следећи фармакокинетски (ФК) параметри: индивидуални орални клиренс (CL/F), индивидуални волумен дистрибуције (Vd/F), индивидуални волумен дистрибуције у равнотежном стању (VSS/F), интеркомпартмански клиренс (Q/F), константа брзине апсорпције (Ka), време кашњења између узимања лека и почетка апсорпције (*lag time*) и интериндивидуална и резидуална варијабилност.

Табела 6. Основне карактеристике и подаци о медикаментозној терапији пацијената укључених у популациону фармакокинетску анализу

Карактеристике	$\bar{x} \pm SD$	Опсег
Број пацијената	85	
Број обсервација	85	
Пол (мушки/женски)	57/28	
Телесна маса (кг)	73,89±10,12	55-106
Старост (год.)	60,45±11,59	37-89
Дневна доза клопидогрела (мг/дан)	82,06±22,03	75-150
Концентрација клопидогрела (мг/л)	0,0289±0,0298	0,0001-0,1526
Ејекциона фракција (%)	49,95±11,75	28-79
Холестерол (ммол/л)	5,52±1,35	2,95-10,87
Триглицериди (ммол/л)	2,17±3,59	0,14-33,00
Број еритроцита ($10^{12}/л$)	4,72±0,54	3,66-6,50
Аспартат аминотрансфераза (и.ј./л)	104,95±127,87	10,2-745,0
Аланин аминотрансфераза (и.ј./л)	34,34±25,42	1,27-175,5
Клиренс креатинина (л/ч)	4,35±1,48	1,28-7,23
ABCB1:	85	
CC	25	
CT	41	
TT	19	
CYP2C19:	85	
спори метаболизери	3	
интермедијерни метаболизери	24	
екстензивни метаболизери	29	
ултрабрзи метаболизери	29	
CYP2C9:	85	
CC	66	
CT	18	
TT	1	
Дијабетес мелитус тип 2	27	
Пушење	31	
Комедикација:		
пантопразол	75	
бета-блокатори	66	
диуретици	20	
спиронолактон	16	
амлодипин	12	
амјодарон	9	
дигоксин	7	
деривати сулфонилурее	6	
статици:	79	
аторвастатин	65	
росувастатин	3	
симвастатин	11	

Најпре је било потребно одредити који модел грешке (адитивни или експоненцијални) би био оптималан за формирање базног ФК модела без коваријанти. Након тога, испитиване су потенцијалне коваријанте клиренса клопидогрела: старост, пол, телесна маса (*TBW*), укупна дневна доза клопидогрела, ејекциона фракција, ниво холестерола и триглицерида, број еритроцита (*RBC*), клиренс креатинина, аспартат аминотрансфераза (*AST*), аланин аминотрансфераза (*ALT*), *ABCB1* и *CYP2C9* генотипови, *CYP2C19* фенотип, присуство дијабетес мелитуса типа 2, пушење и комедикација пантопразолом, бета-блокаторима, диуретицима, спиронолактоном, амлодипином, амјодароном, дигоксином, дериватима сулфонилуреа и статинима. Свака од коваријанти је додавана базном моделу коришћењем линеарне или нелинеарне регресије, а онда је процењивана њихова статистичка значајност. Примарни статистички параметар је смањење минимума објективне функције (енг. *minimum objective function*, *MOF*). *MOF* се дефинише као негативни двоструки логаритам вероватноће података. Коваријанта је сматрана статистички значајном при редукцији *MOF* за најмање 3,841 ($\chi^2=3,841$ уз вероватноћу $p<0,05$ и степен слободе $df=1$). Након тога, анализирани су само униваријантни регресиони модели који су испунили претходно наведени услов. На тај начин, на крају, добијен је пуни (енг. *full*) ПФК модел који садржи само коваријанте које су задовољиле статистичке захтеве модела. Методом брисања коваријанти уназад, на основу строжег статистичког критеријума (смањење *MOF* за више од 6,6 уз вероватноћу $p<0,01$ и степен слободе $df=1$), формиран је коначан финалан ПФК модел. Валидација финалног и базног модела је извршена *bootstrap* анализом са по 200 случајева.

6. РЕЗУЛТАТИ

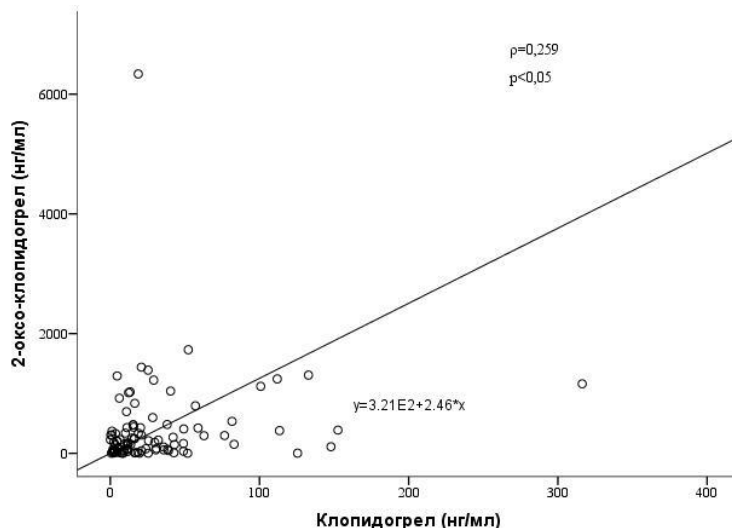
6.1. Концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми

Концентрација клопидогрела је измерена код 109 болесника (62,3%), а 2-оксо-клопидогрел код 140 болесника (80,0%). Обе концентрације су измерене код 96 болесника (54,9%). Измерене концентрације су приказане у Табели 7. Концентрација клопидогрела је варијала од 0,10нг/мл до 316,30нг/мл (просечно $32,12 \pm 42,80$ нг/мл), док су се вредности 2-оксо-клопидогрела кретале између 0,80нг/мл и 1730,90нг/мл (просечна вредност је износила $313,37 \pm 387,36$). Ман-Витнијевим *U*-тестом смо показали да се измерене концентрације не разликују значајно између свих пацијената код којих су успешно измерене концентрације и групе од 96 пацијената код којих су измерене и концентрација клопидогрела ($Z=0,191$, $p=0,848$) и његовог метаболита ($Z=0,388$, $p=0,698$).

Табела 7. Концентрације клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми испитиваних болесника

		Клопидогрел (нг/мл) (N=109)	2-оксо-клопидогрел (нг/мл) (N=140)
Сви пацијенти	$\bar{x} \pm SD$	32,12 $\pm$ 42,80	313,37 $\pm$ 387,36
	<i>M (IQ)</i>	18,3 (8,2-39,7)	181,2 (45,0-377,3)
	Опсег	0,10-316,30	0,80-1730,90
Пацијенти са измерене обе концентрације (N=96)	$\bar{x} \pm SD$	32,37 $\pm$ 44,54	328,08 $\pm$ 392,07
	<i>M (IQ)</i>	16,7 (7,0-40,0)	183,4 (52,2-426,0)
	Опсег	0,10-316,30	0,80-1730,90
Z (p)		0,191 (0,848)	0,250 (0,802)

Спирманов коефицијент корелације је показао да постоји средње јака позитивна корелација између вредности клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми испитиваних болесника ($\rho=0,259$, $p<0,05$) (Графикон 1).



Графикон 1. Корелација између вредности клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми

С обзиром да вредности концентрација и клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела одступају значајно од нормалне дистрибуције. Користили смо непараметријски Ман-Витнијев U -тест како бисмо испитали да ли се измерене концентрације разликују у зависности од демографских и клиничких карактеристика испитиваних пацијената (Табела 8). Утврдили смо да су пацијенти са тахикардијом (срчаном фреквенцом >80 /мин.) имали ниже вредности 2-оксо-клопидогрела у плазми ($Z=2,202$, $p<0,05$). Што се тиче осталих критеријума, није било статистички значајних разлика.

Табела 8. Концентрације клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми у односу на клиничке и демографске параметре

	Клопидогрел (нг/мл) (N=109)		Z (p)	2-оксо-клопидогрел (нг/мл) (N=140)		Z (p)
	$\bar{x} \pm SD$ M (IQ)	$\bar{x} \pm SD$ M (IQ)		$\bar{x} \pm SD$ M (IQ)	$\bar{x} \pm SD$ M (IQ)	
Пол (мушки/женски)	33,66±47,05 17,0 (8,2-38,7)	26,98±30,60 17,4 (1,5-40,0)	0,240 (0,811)	401,19±730,06 182,5 (49,5-431,7)	272,78±364,09 167,4 (34,2-313,8)	0,737 (0,461)
Старост (< и ≥75 година)	31,83±44,33 16,4 (8,2-38,7)	30,96±34,17 20,5 (5,4-53,0)	0,009 (0,993)	384,45±685,20 181,2 (43,2-431,7)	214,24±144,79 236,2 (62,0-324,2)	0,209 (0,835)
Гојазност (не/да)	33,31±41,08 17,6 (8,9-36,6)	23,61±23,28 15,2 (6,9-36,9)	0,559 (0,576)	472,82±1042,94 190,9 (66,3-423,7)	277,50±345,38 181,2 (30,3-329,9)	0,811 (0,417)
Хиперхолестеролемија (не/да)	37,78±57,87 20,2 (10,8-40,4)	29,19±33,70 17,0 (6,4-38,7)	0,676 (0,499)	335,04±371,29 201,4 (71,4-424,8)	382,63±746,70 169,3 (43,0-375,6)	0,945 (0,345)
STEMI/NSTEMI	28,18±31,92 16,4 (9,2-35,7)	42,95±66,45 23,0 (2,8-49,8)	0,231 (0,817)	340,80±677,55 177,5 (45,0-332,8)	436,45±516,63 226,8 (39,2-744,4)	0,921 (0,357)
Фибринолитик (не/да)	33,66±47,05 17,0 (8,2-38,7)	26,98±30,60 14,4 (4,5-40,0)	0,940 (0,347)	390,52±706,78 182,0 (50,6-387,4)	256,05±283,84 183,0 (42,0-381,6)	0,347 (0,729)
PCI (не/да)	32,49±49,55 18,3 (4,7-39,0)	31,01±36,39 16,1 (8,4-16,1)	0,118 (0,906)	302,78±397,83 159,9 (42,0-335,7)	414,57±797,42 183,8 (61,3-427,2)	0,620 (0,535)
Срчана фреквенца (≤и >80/мин.)	34,65±36,50 20,8 (11,0-49,2)	30,38±52,69 15,4 (5,0-35,7)	1,514 (0,130)	411,74±812,29 213,6 (78,4-392,2)	258,32±374,93 88,0 (25,2-287,6)	2,202 (0,028)
Ејекциона фракција (< и ≥40%)	34,91±46,02 19,6 (9,0-46,0)	28,94±43,27 11,8 (7,4-24,3)	0,937 (0,349)	396,82±734,98 183,8 (43,0-424,8)	286,22±390,00 110,9 (25,0-468,5)	0,830 (0,406)
Дијабетес мелитус тип 2 (не/да)	32,41±46,32 16,2 (6,6-38,3)	29,73±31,98 20,9 (10,4-45,6)	0,449 (0,653)	36,65±716,62 172,0 (42,7-385,3)	367,07±453,19 191,4 (64,2-397,6)	0,913 (0,361)
Артеријска хипертензија (не/да)	34,30±62,12 18,8 (11,1-38,1)	30,01±34,92 16,6 (5,9-43,8)	0,558 (0,577)	33,44±386,04 178,8 (49,5-446,8)	380,57±751,31 182,4 (42,0-370,4)	0,431 (0,667)
Атријална фибрилација (не/да)	29,87±33,86 18,5 (8,4-38,2)	49,97±91,57 14,5 (3,0-57,0)	0,312 (0,755)	366,53±669,79 178,3 (44,5-373,8)	327,89±342,43 227,4 (55,6-520,8)	0,483 (0,629)
Претходни акутни инфаркт миокарда (не/да)	32,70±45,16 18,8 (7,5-38,6)	27,97±33,38 16,3 (6,5-42,1)	0,353 (0,724)	353,30±687,49 177,5 (43,6-371,5)	400,15±434,91 228,2 (60,0-769,2)	1,052 (0,293)
Пушење (не/да)	31,55±45,83 16,4 (6,1-35,8)	32,04±36,03 17,6 (9,6-44,2)	0,497 (0,619)	388,52±727,95 183,8 (45,0-411,6)	306,25±405,59 172,0 (45,2-373,2)	0,557 (0,578)

Извођењем Спирмановог теста корелације, утврдили смо постојање статистички значајне корелације између концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми и квантитативних клиничких одлика испитиване групе (Табела 9). Концентрација клопидогрела је у средње јакој негативној корелацији са телесном висином ($\rho=-0,415$, $p<0,01$). Осим тога, статистички су били значајне корелације са ехокардиографским параметрима срчаног рада: ејекционом фракцијом ($\rho=0,235$, $p<0,05$), *end*-систоличном ($\rho=-0,250$, $p<0,05$) и *end*-дијастолном димензијом леве коморе ($\rho=-0,265$, $p<0,05$). Концентрација 2-оксо-клопидогрела је такође била директно пропорционална ејекционој фракцији ($\rho=0,292$, $p<0,001$). Негативна корелација, средње јачине је утврђена са следећим параметрима: срчаном фреквенцом ($\rho=-0,185$, $p<0,05$), нивоима *HDL* ($\rho=-0,198$, $p<0,05$) и креатин киназе ($\rho=-0,212$, $p<0,05$).

Табела 9. Корелација концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми и општих карактеристика испитиваних пацијената, параметара рада кардиоваскуларног система, липидног статуса, крвне слике и осталих лабораторијских анализа

		Клопидогрел (нг/мл)	2-оксо-клопидогрел (нг/мл)
Опште карактеристике			
Старост (год.)	ρ (p)	0,041 (0,673)	0,000 (0,997)
Телесна висина (цм)	ρ (p)	-0,415 (0,004)	-0,131 (0,282)
Телесна маса (кг)	ρ (p)	-0,173 (0,250)	0,091 (0,460)
<i>Body-mass</i> индекс (кг/м ²)	ρ (p)	-0,068 (0,541)	0,039 (0,684)
Кардиоваскуларни систем			
Срчана фреквенца (1/мин.)	ρ (p)	-0,155 (0,126)	-0,185 (0,045)
Систолни крвни притисак (ммHg)	ρ (p)	-0,112 (0,334)	-0,114 (0,247)
Дијастолни крвни притисак (ммHg)	ρ (p)	-0,063 (0,583)	0,121 (0,221)
Ејекциона фракција (%)	ρ (p)	0,235 (0,023)	0,292 (0,001)
<i>End</i> -систолична димензија леве коморе (мм)	ρ (p)	-0,250 (0,024)	-0,061 (0,537)
<i>End</i> -дијастолна димензија леве коморе (мм)	ρ (p)	-0,265 (0,019)	-0,181 (0,068)
Систолни притисак у десној комори (ммHg)	ρ (p)	-0,041 (0,810)	-0,175 (0,250)
Димензије леве преткоморе (мм)	ρ (p)	-0,106 (0,369)	0,078 (0,449)
Липидни статус			
Холестерол (ммол/л)	ρ (p)	-0,116 (0,232)	-0,132 (0,124)
<i>LDL</i> (ммол/л)	ρ (p)	-0,122 (0,215)	-0,114 (0,189)
<i>HDL</i> (ммол/л)	ρ (p)	-0,139 (0,159)	-0,198 (0,022)
Триглицериди (ммол/л)	ρ (p)	0,040 (0,685)	0,067 (0,438)

Табела 9. Корелација концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми и опитних карактеристика испитиваних пацијената, параметара рада кардиоваскуларног система, липидног статуса, крвне слике и осталих лабораторијских анализа (наставак)

		Клопидогрел (нг/мл)	2-оксо-клопидогрел (нг/мл)
Остале лабораторијске анализе			
Хемоглобин (г/л)	ρ (p)	-0,088 (0,363)	-0,128 (0,135)
Хематокрит (л/л)	ρ (p)	-0,106 (0,311)	-0,072 (0,427)
Тромбоцити (10^9 /л)	ρ (p)	0,048 (0,625)	-0,133 (0,120)
Леукоцити (10^9 /л)	ρ (p)	0,112 (0,252)	0,053 (0,546)
Еритроцити (10^{12} /л)	ρ (p)	-0,029 (0,766)	-0,102 (0,239)
Аспартат аминотрансфераза (и.ј./л)	ρ (p)	-0,060 (0,545)	-0,134 (0,126)
Аланин аминотрансфераза (и.ј./л)	ρ (p)	-0,066 (0,506)	-0,064 (0,467)
Лактат дехидрогеназа (и.ј./л)	ρ (p)	-0,249 (0,143)	-0,258 (0,065)
Глукоза (ммол/л)	ρ (p)	0,032 (0,737)	0,035 (0,686)
Креатинин (μмол/л)	ρ (p)	0,061 (0,531)	0,037 (0,664)
Клиренс креатинина (мл/мин.)	ρ (p)	0,023 (0,888)	-0,032 (0,812)
Уреа (ммол/л)	ρ (p)	0,018 (0,854)	0,083 (0,333)
Натријум (ммол/л)	ρ (p)	-0,122 (0,232)	-0,127 (0,157)
Калијум (ммол/л)	ρ (p)	0,062 (0,543)	-0,054 (0,550)
С-реактивни протеин (мг/л)	ρ (p)	0,058 (0,563)	0,035 (0,693)
Тропонини (нг/л)	ρ (p)	-0,048 (0,711)	0,010 (0,927)
Креатин киназа (и.ј./л)	ρ (p)	0,014 (0,888)	-0,212 (0,017)
Креатин киназа MB (и.ј./л)	ρ (p)	-0,031 (0,759)	-0,171 (0,057)
Фибриноген (г/л)	ρ (p)	-0,042 (0,706)	0,103 (0,297)

6.2. Резултати генетских испитивања и њихов утицај на концентрацију клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми

6.2.1. Полиморфизам *ABCB1* C3435T гена за П-гликопротеин

Дистрибуција алела и генотипова *ABCB1* C3435T гена за П-гликопротеин је приказана у Табели 10. Добијени резултати не одступају значајно од очекиваних, на основу Харди-Вајнберговог еквилибријума ($\chi^2=0,863$, $p=0,650$). Такође, дистрибуција генотипова се не разликује значајно ($\chi^2=0,038$, $p=0,981$), од дистрибуције генотипова у здравој српској популацији [174].

Табела 10. Дистрибуција алела и генотипова *ABCB1* C3435T гена за П-гликопротеин

	Алел		Генотип		
	C	T	CC	CT	TT
N (%)	163 (46,6%)	187 (53,4%)	41 (23,4%)	81 (46,3%)	53 (30,3%)
Харди-Вајнбергов еквилибријум – χ^2 (p)			0,863 (0,650)		

С обзиром да није у свим случајевима била примењивана иста доза одржавања клопидогрела, израчунате су кориговане концентрације (нг/мл/мг) дељењем концентрација у плазми дозом одржавања. Непараметријски Џонкшир-Терпстра тест је показао статистички значајну везу између *ABCB1* C3435T генотипа и концентрације клопидогрела ($J-T=-4,718$, $p<0,001$) и кориговане концентрације клопидогрела ($J-T=-4,732$, $p<0,001$), али не и са друге две променљиве: концентрацијом ($J-T=-1,257$, $p=0,209$) и коригованом концентрацијом 2-оксо-клопидогрела ($J-T=-1,394$, $p=0,163$).

Како је један функционалан алел (*wild-type*) довољан за нормално функционисање П-гликопротеина, испитивана група је подељена у две подгрупе, на основу генотипа: *CC/CT* и *TT* групу. У Табели 11 се може видети да носиоци барем једног функционалног C алела постижу значајно више концентрације клопидогрела у плазми ($Z=3,577$, $p<0,001$), као и концентрације ($Z=3,813$, $p<0,001$) и кориговане концентрације 2-оксо-клопидогрела ($Z=2,116$, $p<0,05$).

Табела 11. Концентрација и коригована концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела код носиоца СС/СТ и ТТ генотипа

	СС/СТ генотип	ТТ генотип	Z (p)
Клопидогрел (нг/мл)	36,14±50,41	10,46±7,49	3,577
	24,6 (11,2-42,7)	9,7 (3,8-16,0)	(0,000)
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	397,20±442,11	204,04±313,14	1,837
	201,4 (42,5-597,3)	144,1 (44,6-210,6)	(0,066)
Клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	0,45±0,66	0,12±0,08	3,183
	0,3 (0,1-0,5)	0,1 (0,0-0,2)	(0,000)
2-оксо-клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	4,97±5,63	2,33±4,12	2,116
	2,7 (0,5-6,4)	1,8 (0,5-2,7)	(0,034)

6.2.2. Полиморфизам гена за CYP2C19

Од великог броја алела полиморфног гена за CYP2C19 ензим, анализирали смо присуство два најчешћа, *2 алел са смањеном функцијом и *17 алел са појачаном функцијом. Остали полиморфизми овог алела се јављају у малом проценту, тако да на нашем узорку постојање неког од њих не би довело до статистички значајне грешке у резултатима. Тачан генотип је утврђен код 124 пацијента. Дистрибуција алела и одговарајућих генотипова је приказана у Табели 12. Добијени резултати не одступају значајно од фреквенци очекиваних на основу Харди-Вајнберговог еквилибријума ($\chi^2=4,649$, $p=0,460$).

Табела 12. Дистрибуција алела, генотипова и фенотипова за CYP2C19 ензим

	Алел			Генотип					
	*1	*2	*17	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*17	*17*17	*2/*17
N	140	43	65	46	20	5	28	12	13
(%)	(56,4%)	(17,3%)	(26,2%)	(37,1%)	(16,1%)	(4,0%)	(22,6%)	(9,7%)	(10,5%)
Харди-Вајнбергов еквилибријум – χ^2 (p)						4,649 (0,460)			
Фенотип	Спори			Интермедијерни		Екстензивни		Ултрабрзи	
	метаболизери			метаболизери		метаболизери		метаболизери	
N (%)	5 (4,0%)			33 (26,6%)		46 (37,1)		40 (32,3%)	

С обзиром на различите ефекте ових полиморфизама на функцију алела, за анализу њиховог утицаја на концентрацију клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела, је извршена класификација пацијената по фенотиповима (Табела).

С обзиром на претпоставку да се активност *CYP2C19* ензима повећава од фенотипа спорих метаболизера до фенотипа ултрабрзих метаболизера, за међусобно поређење постигнутих концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела, као и њихових коригованих концентрација, коришћен је Џонкшир-Терпстра тест (Табела 13). Није утврђена статистички значајна разлика у концентрацији међу фенотиповима. Изненађујуће, највише су биле концентрације свих варијабли код фенотипа спорог метаболизера, међутим то може бити случајан резултат, с обзиром на мали број пацијената са овим фенотипом.

Табела 13. Концентрација и коригована концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела код различитих фенотипова CYP2C19 ензима

	Спори метаболизери	Интермедијерни метаболизери	Екстензивни метаболизери	Ултрабрзи метаболизери	J-T (p)
Клопидогрел (нг/мл)	109,80±189,88	26,88±23,53	21,31±21,07	37,13±39,94	0,660
	10,8 (2,3-10,8)	20,5 (10,6-39,4)	15,6 (3,5-35,8)	28,4 (5,0-49,5)	(0,550)
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	680,63±488,29	254,38±403,26	295,88±415,65	234,64±303,46	-0,261
	696,3 (184,7-696,3)	81,8 (21,7-335,2)	174,6 (44,2-337,9)	110,9 (26,5-271,0)	(0,794)
Клопидогрел (кориговано)	1,46±2,39	0,32±0,22	0,26±0,27	0,46±0,54	0,488
(нг/мл/мг)	0,1 (0,0-0,1)	0,3 (0,1-0,5)	0,2 (0,0-0,4)	0,2 (0,1-0,6)	(0,626)
2-оксо-клопидогрел (кориговано)	9,08±6,51	2,92±4,71	3,83±5,55	2,89±3,93	-0,181
(нг/мл/мг)	9,3 (2,5-9,3)	0,8 (0,3-4,5)	2,3 (0,6-4,4)	1,5 (0,4-3,7)	(0,856)

6.2.3. Полиморфизам гена за CYP2C9

Од полиморфизама CYP2C9 ензима, одређивано је присуство *2 алела који доводи до смањења функције ензима код хомозиготног генотипа *2/*2. Дистрибуција алела и генотипова је приказана у Табели 14. Добијени резултати су у складу са принципом Харди-Вајнберговог еквилибријума ($\chi^2=4,634$, $p=0,099$).

Табела 14. Дистрибуција алела и генотипова CYP2C9 ензима

	Алел		Генотип		
	*1	*2	*1/*1	*1/*2	*2/*2
N (%)	258 (89,0%)	32 (11,0%)	115 (79,3%)	28 (19,3%)	2 (1,4%)
Харди-Вајнбергов еквилибријум – χ^2 (p)			4,634 (0,099)		

Као што је приказано у Табели 15, нема статистички значајне разлике у концентрацији и коригованој концентрацији клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела код различитих генотипова CYP2C9 ензима. Међутим, број пацијената са *2/*2 генотипом је био исувише мали, само два, тако да не можемо са сигурношћу извести закључке на основу добијених резултата. Наиме може се приметити да постоји тренд смањења свих зависних променљивих у присуству и чак само једног *2 алела у генотипу.

Табела 15. Концентрација и коригована концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела код различитих генотипова CYP2C9 ензима

	*1/*1 генотип	*1/*2 генотип	*2/*2 генотип	J-T (p)
Клопидогрел (нг/мл)	27,99±47,44	34,76±35,78	11,45±0,07	1,167
	15,8 (3,4-33,1)	18,9 (11,5-49,2)	11,4 (11,4-11,4)	(0,243)
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	277,44±380,01	228,93±286,46	45,25±22,70	-1,045
	148,0 (48,8-312,0)	95,5 (22,9-399,9)	45,2 (29,2-45,2)	(0,296)
Клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	0,35±0,62	0,42±0,47	0,15±0,00	1,181
	0,2 (0,0-0,4)	0,3 (0,2-0,4)	0,2 (0,2-0,2)	(0,237)
2-оксо-клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	3,32±4,82	2,98±3,86	0,60±0,30	-0,904
	2,0 (0,4-3,9)	0,6 (0,3-5,3)	0,6 (0,4-0,6)	(0,366)

6.3. Фармакокинетске интеракције клопидогрела

6.3.1. Концентрација пантопразола у плазми

Концентрација пантопразола је измерена код 122 пацијента, 77,2% од пацијената који су добијали пантопризол, са просечном вредношћу $0,35 \pm 0,46$ мг/л. Измерене вредности су се кретале од 0,08 до 2,77 мг/л.

Као и клопидогрел, пантопризол се једним делом метаболише деловањем *CYP2C19* ензима. Управо је то разлог могућих интеракција између клопидогрела и пантопразола. У Табели 16 је приказан утицај фенотипа *CYP2C19* ензима на концентрацију пантопразола. Као што се може видети, не постоји статистички значајна разлика у концентрацији пантопразола код пацијената са различитим фенотипом *CYP2C19* ензима ($J-T=0,144$, $p=0,886$).

Табела 16. Концентрација пантопразола код различитих фенотипова *CYP2C19* ензима

	Спори метаболизери	Интермедијерни метаболизери	Екстензивни метаболизери	Ултрабрзи метаболизери	J-T (p)
Пантопризол	0,35±0,23	0,34±0,45	0,28±0,27	0,46±0,66	0,144
(мг/л)	0,4 (0,2-0,4)	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,3)	(0,886)

6.3.2. Интеракција клопидогрела и пантопразола

Интеракција клопидогрела и пантопразола се може јавити на више нивоа, пре свега на нивоу П-гликопротеина и нивоу метаболизма клопидогрела. У Табели 17 су приказане концентрације и кориговане концентрације клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у зависности од комедикације пантопризолом. Применом Ман-Витнијевог *U*-теста, утврдили смо да комедикација не утиче знатно на постигнуту концентрацију клопидогрела у плазми ($Z=0,024$, $p=0,981$). Међутим, истовремена примена пантопразола доводи до статистички значајног смањења концентрације 2-оксо-клопидогрела у плазми ($Z=3,845$, $p<0,001$).

Табела 17. Концентрација и коригована концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у зависности од комедикације пантопразолом

	Пантопразол		Z (p)
	да	не	
Клопидогрел (нг/мл)	29,94±34,35 17,6 (7,0-38,8)	49,40±88,68 16,0 (5,6-49,3)	0,024 (0,981)
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	277,73±348,04 150,0 (43,6-376,7)	680,54±505,60 432,3 (259,2-1099,4)	3,845 (0,000)
Клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	0,38±0,46 0,2 (0,1-0,5)	0,60±1,16 0,2 (0,1-0,6)	0,136 (0,892)
2-оксо-клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	3,46±4,41 2,0 (0,5-4,4)	8,28±6,68 5,8 (2,7-13,8)	3,746 (0,000)

Извођењем Спирмановог теста корелације, утврђено је да не постоји корелација између концентрације пантопразола у плазми и концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела (Табела 18). То указује да претходно утврђен утицај комедикације пантопразолом на концентрацију 2-оксо-клопидогрела не зависи од концентрације пантопразола.

Табела 18. Корелација између концентрације пантопразола у плазми и концентрација и коригованих концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела

	Пантопразол (мг/л)	
	ρ	p
Клопидогрел (нг/мл)	0,211	0,169
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	-0,145	0,346
Клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	0,150	0,330
2-оксо-клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	-0,141	0,361

6.3.3. Интеракције клопидогрела са другим лековима

Пацијенти са АКС су на интензивној политерапији што ризик од интеракција чини већим. У Табели 19 су приказане концентрације и кориговане концентрације клопидогрела у односу на осталу примењену терапију. На основу изведеног Ман-Витнијевог U-теста, можемо закључити да поједини лекови ступају у интеракцију са клопидогрелом и мењају ниво пролека или његовог метаболита у плазми.

Табела 19. Концентрација и коригована концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у зависности од примене других лекова

		Клопидогрел		2-оксо-клопидогрел		Клопидогрел (кориговано)		2-оксо-клопидогрел (кориговано)	
		нг/мл	Z (p)	нг/мл	Z (p)	нг/мл	Z (p)	нг/мл	Z (p)
АСЕ инхибитори	не	46,58±63,03	0,968	429,48±461,48	1,360	0,61±0,85	1,093	5,36±6,02	1,218
		27,4 (11,9-19,2)		236,8 (147,1-595,7)		0,4 (0,1-0,7)		3,0 (1,5-6,7)	
	да	26,52±33,05	0,306	286,33±355,06	0,050	0,32±0,42	0,183	3,53±5,54	0,103
		15,5 (5,5-34,5)		147,1 (46,1-383,0)		0,2 (0,1-0,4)		2,0 (0,6-4,4)	
Бета-блокатори	не	35,45±38,13	1,389	381,21±398,79	1,446	0,46±0,51	1,184	4,75±5,34	1,306
		22,9 (12,6-42,0)		236,8 (150,9-476,0)		0,2 (0,2-0,6)		3,0 (1,5-5,6)	
	да	30,83±47,63	0,042	301,52±389,09	0,031	0,38±0,63	0,121	3,72±4,91	0,066
		14,1 (5,5-39,2)		137,6 (41,3-361,8)		0,2 (0,1-0,5)		1,8 (0,5-4,8)	
Фуросемид	не	35,77±48,80	0,798	315,13±383,21	0,564	0,45±0,65	0,833	3,85±4,86	0,564
		16,7 (8,0-42,9)		162,4 (46,1-429,2)		0,2 (0,1-0,6)		2,1 (0,5-5,4)	
	да	19,45±17,14	0,548	377,29±430,92	0,909	0,24±0,21	0,491	4,89±5,80	0,909
		17,9 (4,4-29,5)		256,0 (69,8-409,3)		0,2 (0,1-0,3)		3,1 (0,7-5,5)	
Спиронолактон	не	34,60±48,39	0,596	321,75±377,81	0,638	0,44±0,64	0,750	3,92±4,79	0,717
		16,4 (7,5-42,2)		195,2 (54,5-411,9)		0,2 (0,1-0,5)		2,3 (0,6-5,1)	
	да	22,73±18,92	0,869	355,50±459,87	0,810	0,28±0,24	0,627	4,67±6,18	0,682
		20,2 (4,8-36,4)		95,5 (48,1-649,4)		0,3 (0,1-0,4)		1,0 (0,6-8,7)	
Амлодипин	не	34,41±46,22	1,459	301,20±349,45	0,819	0,44±0,62	1,469	3,83±4,91	0,898
		18,6 (10,0-42,2)		162,4 (49,1-410,7)		0,2 (0,1-0,5)		2,1 (0,5-5,1)	
	да	20,46±31,71	0,028	485,51±500,81	0,514	0,22±0,32	0,027	5,45±5,84	0,395
		4,6 (2,2-22,9)		216,0 (123,3-1049,2)		0,1 (0,0-0,3)		2,9 (1,6-7,7)	
Амјодарон	не	32,44±45,12	0,573	333,43±405,32	0,817	0,41±0,59	1,002	4,18±5,22	0,648
		17,0 (6,6-41,2)		184,7 (44,4-424,8)		0,2 (0,1-0,5)		2,3 (0,6-5,5)	
	да	31,85±41,77	0,898	286,77±279,66	0,517	0,38±0,57	0,268	3,16±3,54	0,795
		12,1 (8,7-35,7)		159,9 (94,6-597,3)		0,2 (0,1-0,5)		2,1 (0,6-4,0)	

Табела 19. Концентрација и коригована концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у зависности од примене других лекова
(наставак)

		Клопидогрел		2-оксо-клопидогрел		Клопидогрел (кориговано)		2-оксо-клопидогрел (кориговано)	
		нг/мл	Z (p)	нг/мл	Z (p)	нг/мл	Z (p)	нг/мл	Z (p)
Дигоксин	не	33,02±46,35	0,728	347,16±398,73	1,328	0,42±0,61	0,809	4,30±5,14	1,254
		16,4 (6,2-41,7)		208,1 (64,2-429,2)		0,2 (0,1-0,5)		2,5 (0,7-5,6)	
	да	25,20±12,53	0,665	181,16±235,13	0,059	0,31±0,17	0,530	1,53±3,15	0,086
		25,6 (12,7-37,0)		42,4 (10,9-75,4)		0,5 (0,2-0,5)		0,5 (0,1-1,0)	
Дуго-делујући вазодилатори	не	32,91±47,31	0,802	325,69±396,50	0,521	0,41±0,63	0,651	4,05±5,16	0,642
		16,4 (7,7-39,0)		174,6 (50,6-422,5)		0,2 (0,1-0,5)		2,1 (0,5-5,2)	
	да	30,43±33,67	0,708	336,62±385,20	0,949	0,39±0,45	0,790	4,13±4,75	0,804
		18,3 (3,4-53,4)		200,1 (55,2-584,1)		0,2 (0,0-0,6)		2,7 (0,6-7,0)	
Триметазидин	не	32,30±46,21	0,654	310,52±390,22	1,327	0,40±0,61	0,764	3,87±5,09	1,444
		16,4 (7,0-38,3)		169,8 (46,1-385,3)		0,2 (0,1-0,5)		2,1 (0,5-4,8)	
	да	32,87±31,91	0,786	450,98±399,67	0,059	0,43±0,43	0,604	5,44±4,77	0,031
		19,4 (7,2-53,5)		376,6 (84,2-753,6)		0,3 (0,1-0,7)		5,0 (1,1-8,0)	
Аторвастатин	не	15,78±17,26	0,636	303,80±521,49	0,644	0,21±0,23	0,578	4,05±6,95	0,590
		7,7 (1,6-34,0)		44,2 (12,8-724,6)		0,1 (0,0-0,5)		0,6 (0,2-9,7)	
	да	33,28±12,43	0,814	329,41±387,47	0,802	0,42±0,60	0,892	4,07±4,98	0,877
		17,0 (8,7-42,1)		184,7 (57,8-427,2)		0,2 (0,1-0,5)		2,3 (0,6-5,4)	
Анксиолитици	не	32,92±47,99	0,592	334,94±407,31	0,692	0,42±0,64	0,802	4,22±5,35	0,624
		16,4 (6,7-40,8)		192,4 (54,5-423,7)		0,2 (0,1-0,5)		2,4 (0,5-5,5)	
	да	31,16±36,51	0,875	312,99±362,43	0,823	0,38±0,46	0,541	3,72±4,40	0,831
		17,8 (9,6-37,5)		162,4 (48,8-477,4)		0,2 (0,1-0,5)		2,1 (0,6-4,8)	
Деривати сулфонилурее	не	33,71±46,05	0,563	327,14±387,52	0,445	0,42±0,61	0,536	4,02±4,97	0,492
		17,6 (8,0-41,7)		183,4 (46,1-429,2)		0,2 (0,1-0,5)		2,2 (0,6-5,5)	
	да	17,62±17,17	0,909	338,45±468,60	0,989	0,24±0,23	0,936	4,51±6,25	0,969
		13,8 (2,5-32,0)		174,8 (62,5-397,6)		0,2 (0,0-0,4)		2,3 (0,8-5,3)	

Када су у питању АСЕ инхибитори, генерално њихова примена смањује концентрацију 2-оксо-клопидогрела ($Z=1,360, p<0,05$). Међутим, пацијенти су примали више различитих лекова, а најчешће су прописивани зофеноприл (52,9%) и рамиприл (29,4%). Примена зофеноприла смањује концентрацију ($Z=2,154, p<0,05$) и кориговану концентрацију 2-оксо-клопидогрела у плазми ($Z=2,100, p<0,05$). Такође, и примена рамиприла смањује концентрацију ($Z=2,148, p<0,05$) и кориговану концентрацију клопидогрела у плазми ($Z=2,319, p<0,05$). Поређењем комедикације са ова два лека, добијено је да зофеноприл доводи до мањег смањења кориговане концентрације клопидогрела у плазми ($Z=2,040, p<0,05$), али већег смањења концентрација 2-оксо-клопидогрела у плазми ($Z=1,979, p<0,05$).

Примена бета-блокатора доводи до редукције постигнуте концентрације и клопидогрела ($Z=1,389, p<0,05$) и 2-оксо-клопидогрела у плазми ($Z=1,446, p<0,05$). Од бета-блокатора, најчешће су прописивани бисопролол (84,9%) и карведилол (12,7%). Статистички значајне разлике између ефеката бисопролола и карведилола нема. Међутим, у односу на пацијенте који нису узимали бета-блокаторе, бисопролол је смањивао концентрацију 2-оксо-клопидогрела у плазми ($Z=1,984, p<0,05$), а карведилол концентрацију клопидогрела ($Z=2,200, p<0,05$).

Примена амлодипина, антагонисте калцијумових канала, је доводила до смањења концентрације клопидогрела ($Z=1,459, p<0,05$) и његове кориговане концентрације ($Z=1,469, p<0,05$).

Администрација триметазидина је дала позитиван ефекат у смислу повећања кориговане концентрације 2-оксо-клопидогрела у плазми код посматраних пацијената ($Z=1,444, p<0,05$).

Остали лекови (фуросемид, спиронолактон, амјодарон, дигоксин, дуго-делујући вазодилататори, аторвастатин, анксиолитици и деривати сулфонилурее) нису показали статистички значајан ефекат на концентрацију клопидогрела и 2-оксо клопидогрела. Ипак, мора се узети у обзир да мали број пацијената којима су били прописани амјодарон, дигоксин или деривати сулфонилурее, односно мали број пацијената који нису узимали статине, може бити разлог за неуочавање значајне везе.

6.4. Утицај генетских фактора, комедикације и других карактеристика испитиване групе на концентрације клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела

Методом стандардне вишеструке регресије формиран су модели којима је могуће предвидети промене у концентрацији клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела, на основу низа независних варијабли. Као независне променљиве тестиране су све опште и клиничке карактеристике испитиване групе, резултати лабораторијских анализа, *ABCB1 C3435T* и *CYP2C9* генотип, *CYP2C19* фенотип, ударна доза и доза одржавања клопидогрела, и комедикација.

Добијен је статистички значајан модел ($F=4,865$, $p<0,01$), који објашњава 20,4% варијансе концентрације клопидогрела (Табела 20). Формирани модел садржи четири независне променљиве од којих свака има и појединачан допринос моделу. Утврђено је да је концентрација клопидогрела директно пропорционална старости пацијената ($p<0,05$), ејекционој фракцији ($p<0,01$) и срчаној фреквенци ($p<0,01$), као и да је виша код мушкараца у односу на жене ($p<0,05$). При том, нешто већи значај имају ејекциона фракција и срчана фреквенца, у односу на друге две варијабле.

Табела 20. Модел предвиђања концентрације клопидогрела добијен стандардном вишеструком регресијом

Модел Клопидогрел (нг/мл)	Нестандардизовани коэффицијенти		Стандардизовани коэффицијенти	<i>t</i>	<i>p</i>
	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Beta</i>		
Константа	-116,892	45,374		-2,576	0,012
Пол (мушки/женски)	-27,159	10,516	-0,277	-2,583	0,012
Старост (год.)	0,790	0,395	0,214	2,000	0,049
Срчана фреквенца (1/мин.)	0,869	0,292	0,315	2,975	0,004
Ејекциона фракција (%)	1,447	0,452	0,344	3,201	0,002

На сличан начин формиран је модел ($F=12,017$, $p<0,001$) предвиђања концентрације 2-оксо-клопидогрела у плазми (Табела 21). Модел пружа могућност предвиђања 29,8% варијансе у концентрацији овог метаболита. Све четири независне варијабле укључене модел дају и јединствен допринос предвиђању промена зависне променљиве. Највећи значај има комедикација пантопразолом. Истовремена примена

пантопразола смањује постигнут ниво 2-оксо-клопидогрела у плазми ($p<0,001$), насупротив триметазидину који има позитиван ефекат на зависну променљиву ($p<0,05$). Осим тога, концентрација интермедијерног метаболита клопидогрела је већа са повећањем ејекционе фракције ($p<0,01$), као и код оболелих од ДМ ($p<0,001$).

Табела 21. Модел предвиђања концентрације 2-оксо-клопидогрела добијен стандардном вишеструком регресијом

Модел	Нестандардизовани		Стандардизовани	<i>t</i>	<i>p</i>
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	коэффициенти		коэффициенти		
	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Beta</i>		
Константа	211,945	176,878		1,198	0,233
Ејекциона фракција (%)	8,047	2,606	0,247	3,088	0,003
Дијабетес мелитус тип 2 (не/да)	253,536	71,439	0,285	3,549	0,001
Пантопризол (не/да)	-441,976	100,640	-0,350	-4,392	0,000
Триметазидин (не/да)	227,396	108,139	0,167	2,103	0,038

6.5. Популациона фармакокинетичка анализа клопидогрела

Циљну популацију је чинило 85 пацијената, старости 37-89 година са просечном вредношћу од 60 година, телесне масе 55-106кг, оба пола (однос мушкараца и жена – 2:1), којима је прописан клопидогрел у виду таблета у дневној дози од 75мг (90,6%). Лек је примењиван једном дневно. Измерене концентрације клопидогрела у плазми су имале широк опсег, од 0,0001 до 0,1526мг/л. Сама анализа је укључивала велики број фактора који би могли имати утицаја на ФК параметре клопидогрела, укупно 25.

Резултати добијени у првој фази истраживања, коришћењем *ADVAN4 TRANS3* субрутинe за базичне ФК параметре клопидогрела у базном популационом моделу, су следећи: индивидуалан орални клиренс клопидогрела је био 70,6л/ч, а индивидуални волумен дистрибуције 432л. Интериндивидуална и резидуална варијабилност су најбоље описане експоненцијалним моделом грешке, где су њихове вредности (изражене као коефицијент варијације) износиле 41,79% и 49,14%.

Табела 22. Вредности минимума објективне функције за базни модел, униваријантне регресионе моделе анализираних фактора, и њихова статистичка значајност у процесу формирања пуног популационо фармакокинетског модела клиренса клопидогрела

Модели клиренса	MOF	p
Базни модел		
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))$	732,448	
Униваријантни регресиони модели		
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_2*AGE$	729,114	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_3*TBW$	725,725	<0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_4*GENDER$	732,448	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_5*DD$	721,708	<0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_6*ABCB1$	730,107	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_7*CYP2C19$	730,205	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_8*CYP2C9$	729,977	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_9*EF$	732,440	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{10}*CHOL$	732,448	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{11}*TGL$	732,448	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{12}*RBC$	732,448	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{13}*AST$	729,504	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{14}*ALT$	721,792	<0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{15}*CLcr$	732,448	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{16}*DM$	732,448	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{17}*TOB$	732,448	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{18}*PANT$	694,428	<0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{19}*BB$	732,193	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{20}*DIU$	732,109	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{21}*SPI$	732,428	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{22}*AML$	732,428	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{23}*AMI$	731,008	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{24}*STAT$	732,329	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{25}*DIG$	730,945	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+\theta_{26}*SUL$	732,448	>0,05
Пун модел		
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1))+2,58*TBW+1,79*DD+5,1*ALT+0,000514*PANT$	714,169	

Вредности MOF, добијене униваријантним моделом, које одражавају ефекат појединачних коваријанти на клиренс клопидогрела, су приказане у Табели 22. На

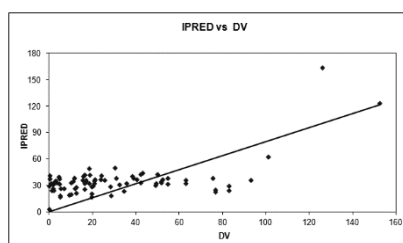
основу претходно постављеног критеријума за овај део ПФК анализе (разлика *MOF* између базног и универијантног модела већа или једнака 3,84), формиран је пун модел са четири од 25 испитиваних фактора: укупна дневна доза клопидогрела, телесна маса, ниво *ALT* и комедикација пантопразолом. Процесом делеције уназад, брисане су коваријанте из пуног модела, коришћењем строжег статистичког критеријума, чиме је развијен финални ПФК модел клиренса лека (Табела 23). У овој фази су из модела искључени следећи фактори: укупна дневна доза клопидогрела, телесна маса и комедикација пантопразолом. Статистички значајан ефекат је потврђен само за вредности *ALT*. Једначина која описује индивидуалан орални клиренс клопидогрела (*CL*) у испитиваној популацији је:

$$CL (l/h) = 130 + 5,1 \times ALT$$

Табела 23. Процес формирања финалног популационо фармакокинетског модела клиренса клопидогрела

Делеција уназад	<i>MOF</i>	<i>p</i>
<i>TBW</i>	715,358	>0,01
<i>DD</i>	714,370	>0,01
<i>ALT</i>	722,926	<0,01
<i>PANT</i>	714,169	>0,01

Процењене вредности ФК параметара финалног модела су приказане у Табели 24. Утврђено је смањење и интериндивидуалне и резидуалне варијабилности за 20,48%, односно 14,88%. Уз то, дистрибуција података измерених концентрација клопидогрела у односу на индивидуалне вредности процењене на основу финалног модела, могу се видети у дијагностичком координативном систему (Графикон 3).



Графикон 2. Дистрибуција измерених вредности концентрације клопидогрела у односу на процењене вредности, на основу финалног модела

Табела 24. Процењене вредности параметара финалног модела

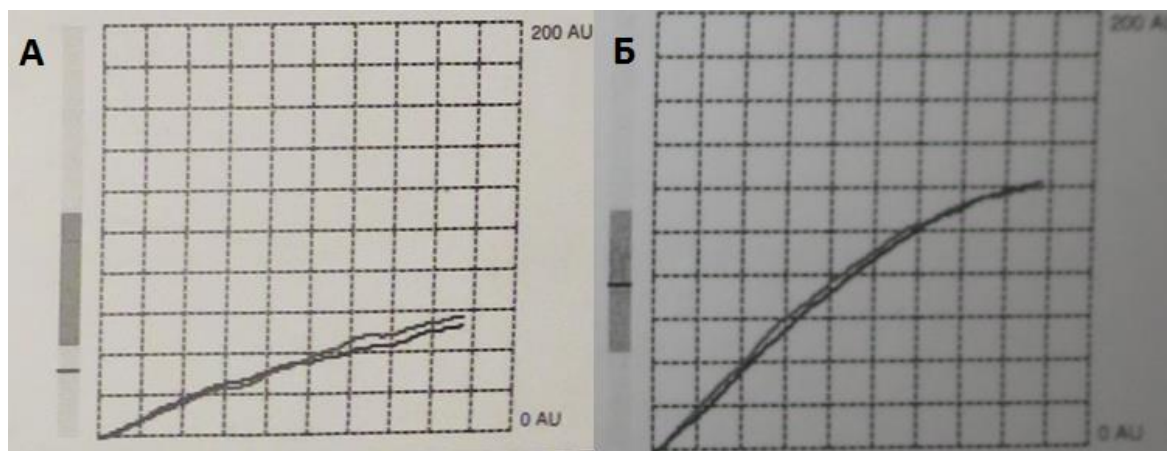
Параметри	NONMEM		Bootstrap анализа	
	Процењена вредност	95% CI	Процењена вредност	95% CI
Индивидуални орални клиренс (л/ч) – CL/F	130	100,72–159,28	133	90,30–175,70
Индивидуални волумен дистрибуције (л) – Vd/F	660	549,91–770,09	671	566,50–775,50
Индивидуални волумен дистрибуције у равнотежном стању (л) – VSS/F	8900	7654,00–10146,00	9210	7892,41–10527,59
Интеркомпартмантски клиренс (л/ч) – Q/F	1,7	1,406–1,994	1,78	1,58–1,98
Константа брзине апсорпције (1/ч) – Ka	0,42	0,344–0,496	0,438	0,376–0,5
Lag time (ч)	0,21	0,161–0,259	0,218	0,191–0,245
Интериндивидуална варијабилност клиренса – ω_{2CL}	0,0444	0,0264–0,0624	0,045	0,0394–0,0506
Резидуална варијабилност клиренса – σ^2 (експоненцијални модел)	0,111	0,0671–0,1549	0,116	0,087–0,145

Резултати *bootstrap* анализе, са 200 поновљених узорак уз замену, су приказани у Табели у виду процењених вредности ФК параметара и 95% интервала поверења за сваки од параметара. Може се уочити да се процењене вредности клиренса клопидогрела и других ПФК параметара, као и вредности интериндивидуалне и резидуалне варијабилности концентрације клопидогрела, не разликују значајно, што указује на добру прецизност и поузданост финалног модела.

6.6. Фармакодинамски ефекат клопидогрела и резистенција на клопидогрел

Код 18 пацијената извршено је мерење фармакодинамског ефекта клопидогрела, односно инхибиције агрегације тромбоцита. Адекватан ефекат је постигнут код 11 пацијената (61,1%), при чему је гранична вредност ПИК износила 468 AU_{мин}. На Слици

14 су приказани примери пацијента са постигнутим одговором на клопидогрел, и пацијента са неадекватном инхибицијом агрегације тромбоцита.



Слика 14. Пацијент са (А) адекватним одговором на клопидогрел (површина испод криве агрегације 293АУмин, интензитет агрегације 56,3АУ, брзина агрегације 3,7АУ/мин.) и (Б) неадекватним одговором на клопидогрел (површина испод криве

Просечне вредности ПИК, интензитета и брзине агрегације су приказане у Табели 25.

Табела 25. Број тромбоцита и параметри функције тромбоцита

	Број тромбоцита ($10^9/\text{л}$)	Површина испод криве агрегације (АУмин.)	Интензитет агрегације (АУ)	Брзина агрегације (АУ/мин.)
$\bar{x} \pm \text{SD}$	253,03 $\pm$ 78,75	435,94 $\pm$ 252,97	80,97 $\pm$ 45,48	10,62 $\pm$ 6,13
М (IQ)	250,0 (199,0-293,8)	349,5 (245,2-570,8)	64,3 (49,0-106,4)	8,2 (6,4-13,1)

У Табелама 26 и 27 су приказане вредности различитих клиничких параметара у зависности од фармакодинамског одговора на клопидогрел. Утврђено је да су пацијенти са неадекватном инхибицијом агрегације тромбоцита имали нижу ејекциону фракцију ($p < 0,05$) и већу *end*-сistolну димензију леве коморе ($p < 0,05$). Што се тиче осталих клиничких параметара, није пронађена статистичка значајност у односу на постојање одговора на клопидогрел. Такође, није пронађена узрочно-последична веза ни са испитиваним генетским факторима, нити комедикацијом.

Табела 26. Основни квантитативни клинички параметри у односу на постојање одговора на клопидогрел

	Одговор на клопидогрел		t (p)
	да	не	
Старост (год.)	61,29±9,71	55,00±9,52	1,356 (0,194)
Срчана фреквенца (1/мин.)	83,00±23,34	77,64±13,48	0,479 (0,651)
Систолни крвни притисак (ммHg)	138,57±31,19	124,50±18,02	1,075 (0,311)
Дијастолни крвни притисак (ммHg)	83,57±14,92	77,00±13,38	0,952 (0,356)
Ејекциона фракција (%)	58,86±10,67	44,00±10,60	2,836 (0,013)
End-систолна димензија леве коморе (мм)	30,38±7,87	38,76±5,59	2,398 (0,032)
End-дијастолна димензија леве коморе (мм)	44,72±7,99	50,13±4,22	1,803 (0,093)
Систолни притисак у десној комори (ммHg)	25,50±7,78	36,00±0,74	1,203 (0,295)
Димензије леве преткоморе (мм)	36,20±4,09	36,51±6,16	0,100 (0,922)
Телесна висина (цм)	167,33±9,45	167,00±4,76	0,062 (0,953)
Телесна маса (кг)	73,00±2,12	73,75±13,72	0,075 (0,943)
Body-mass индекс (кг/м ²)	26,72±1,76	26,84±2,72	0,107 (0,916)
Холестерол (ммол/л)	5,57±1,16	5,00±1,22	0,987 (0,338)
LDL (ммол/л)	3,68±1,30	3,32±1,07	0,624 (0,542)
HDL (ммол/л)	1,10±0,22	1,12±0,25	0,162 (0,873)
Триглицериди (ммол/л)	2,19±1,42	1,36±0,81	1,586 (0,132)
Хемоглобин (г/л)	134,57±31,41	153,36±16,79	1,663 (0,116)
Хематокрит (л/л)	0,41±0,08	0,44±0,04	1,059 (0,308)
Еритроцити (10 ¹² /л)	4,31±1,52	4,95±,48	1,328 (0,203)
Леукоцити (10 ⁹ /л)	10,36±3,39	11,88±3,87	0,853 (0,406)
Тромбоцити (10 ⁹ /л)	323,86±142,37	233,36±51,49	1,945 (0,070)
Глукоза (ммол/л)	8,63±1,87	9,49±8,34	0,267 (0,793)
Креатинин (μмол/л)	87,26±11,37	97,76±27,00	0,947 (0,348)
Клиренс креатинина (мл/мин.)	8037±28,71	68,64±14,42	0,721 (0,503)
Уреа (ммол/л)	5,71±1,02	5,24±2,30	0,515 (0,614)
Аспартат аминотрансфераза (и.ј./л)	204,66±323,92	225,12±216,21	0,162 (0,874)
Аланин аминотрансфераза (и.ј./л)	47,80±44,25	62,24±38,69	0,731 (0,476)
Лактат дехидрогеназа (и.ј./л)	649,27±354,76	1619,96±1188,36	1,966 (0,086)
Натријум (ммол/л)	137,14±2,19	125,73±37,24	0,801 (0,435)
Калијум (ммол/л)	4,16±0,45	4,46±0,59	1,137 (0,272)
С-реактивни протеин (мг/л)	9,82±7,90	7,98±7,25	0,484 (0,636)
Тропонини (нг/л)	2,55±3,72	17,04±31,31	0,772 (0,465)
Креатин киназа (и.ј./л)	2078,88±3235,54	1669,690±2094,21	0,309 (0,762)
Креатин киназа MB (и.ј./л)	157,84±173,92	176,64±195,23	0,182 (0,859)
Фибриноген (г/л)	4,33±1,14	4,01±1,10	0,563 (0,583)

Табела 27. Основни квалитативни клинички, генетски параметри и комедикација у односу на постојање одговора на клопидогрел

	Одговор на клопидогрел		χ^2 (p)
	не	да	
Пол (мушки/женски)	4 (57,1%)	9 (81,8%)	1,298 (0,326)
STEMI/NSTEMI	6 (85,7%)	11 (100,0%)	1,664 (0,389)
Фибринолитик (да/не)	2 /28,6%)	0 (0,0%)	3,536 (0,137)
PCI (да/не)	4 (57,1%)	10 (90,9%)	2,822 (0,245)
Тахикардија (да/не)	3 (60,0%)	3 (27,3%)	1,571 (0,299)
Снижена ејекциона фракција (да/не)	0 (0,0%)	3 (30,0%)	2,550 (0,228)
Хиперхолестеролемија (да/не)	3 /42,9%)	6 (54,5%)	0,234 (1,000)
ABCB1 C3435T генотип (CC+CT/TT)	7 (100,0%)	8 (72,7%)	2,291 (0,241)
CYP2C19 фенотип			1,905 (0,592)
CYP2C9 генотип (CC+CT/TT)	5 (71,4%)	7 (70,0%)	0,004 (1,000)
Дијабетес мелитус тип 2 (да/не)	2 (28,6%)	5 (45,5%)	0,513 (0,637)
Артеријска хипертензија (да/не)	4 (57,1%)	5 (45,5%)	0,234 (1,000)
Претходни акутни инфаркт миокарда (да/не)	2 (28,6%)	2 (18,2%)	0,276 (1,000)
Пушење (да/не)	2 (28,6%)	7 (63,6%)	2,104 (0,335)
Пантопразол (да/не)	6 (85,7%)	11 (100,0%)	1,664 (0,389)
АСЕ-инхибитори (да/не)	4 (57,1%)	9 (81,8%)	1,298 (0,326)
Бета-блокатори (да/не)	5 (71,4%)	8 (72,7%)	0,004 (1,000)
Фуросемид (да/не)	2 (28,6%)	2 (18,2%)	0,267 (1,000)
Спиринолактон (да/не)	1 (14,3%)	1 (9,1%)	0,117 (1,000)
Амлодипин (да/не)	2 (28,6%)	2 (18,2%)	0,367 (1,000)
Амјодарон (да/не)	2 (28,6%)	4 (36,4%)	0,117 (1,000)
Дигоксин (да/не)2 (28,6%)	2 (28,6%)	0 (0,0%)	3,536 (0,137)
Дуго-делујући вазодилататори (да/не)	1 (14,3%)	3 (27,3%)	0,417 (1,000)
Триметазидин (да/не)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	0,674 (1,000)
Статини (да/не)	5 (71,4%)	11 (100,0%)	3,536 (0,137)
Анксиолитици (да/не)	3 (42,9%)	5 (45,5%)	0,012 (1,000)
Деривати сулфонилауреа (да/не)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	0,674 (1,000)

На основу претходне поделе пацијената на оне са и без фармакодинамског одговора на клопидогрел, а на основу теста инхибиције агрегације тромбоцита, Ман-Витнијевим *U*-тестом је анализирано постојање узрочно-последичне везе између концентрација и коригованих концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела, и слабог одговора тромбоцита на клопидогрел (Табела 28). Такође, коришћењем Спирмановог теста корелације није пронађена статистичка значајност између

параметара инхибиције агрегације тромбоцита и концентрација, односно коригованих концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми (Табела 29). Одсуство статистичке значајности добијених резултата може бити и последица малог броја узорака, с обзиром да код једног броја пацијената код којих је рађен тест инхибиције агрегације тромбоцита нису била успешна мерења концентрације клопидогрела и његовог метаболита.

Табела 28. Концентрације и кориговане концентрације клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми пацијената са и без адекватног одговора

	Одговор на клопидогрел		Z (p)
	не	да	
Клопидогрел (нг/мл)	29,02±41,83 10,8 (1,6-65,6)	25,46±23,39 15,4 (5,0-51,8)	0,661 (0,724)
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	424,70±471,90 226,4 (40,8-907,8)	259,39±231,91 294,3 (14,4-476,4)	0,588 (0,635)
Клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	0,21±0,27 0,1 (0,0-0,4)	0,25±0,28 0,2 (0,1-0,3)	0,558 (0,622)
2-оксо-клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	4,09±4,11 3,0 (0,4-8,4)	2,48±2,39 2,3 (0,2-4,0)	0,745 (0,792)

Табела 29. Корелација између измерених вредности клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми, и параметара агрегације тромбоцита

		Површина испод криве агрегације (AU _{мин.})	Интензитет агрегације (AU)	Брзина агрегације (AU/мин.)
Клопидогрел (нг/мл)	ρ (p)	-0,176 (0,566)	-0,224 (0,484)	-0,308 (0,331)
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	ρ (p)	0,026 (0,922)	0,064 (0,829)	0,116 (0,692)
Клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	ρ (p)	-0,247 (0,415)	-0,245 (0,443)	-0,392 (0,208)
2-оксо-клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	ρ (p)	-0,050 (0,854)	-0,002 (0,994)	0,037 (0,899)

Методом стандардне вишеструке регресије формиран је модел ($F=11,220$, $p<0,001$), који објашњава 6,6% варијансе ПИК агрегације тромбоцита (Табела 30). Три независне варијабле су сачињавале модел: старост, ејекциона фракција и комедикација дериватима сулфониурее. Концентрације клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела нису

коришћене у моделу, јер би то смањило број узорака на основу којих је модел формиран, па би се на тај начин смањила валидност добијених резултата. Све три варијабле су дале јединствен допринос самом моделу, при чему је ефекат клопидогрела на агрегацију тромбоцита био обрнуто пропорционалан старости пацијената ($p < 0,001$) и ејекционој фракцији леве коморе ($p < 0,01$), као и већи код пацијената који су истовремено примали и деривате сулфонилурее ($p < 0,05$), што је имало мањи значај у односу на претходне две променљиве.

Табела 30. Модел предвиђања површине испод криве агрегације добијен стандардном вишеструком регресијом

Модел Површина испод криве агрегације (AУмин.)	Нестандардизовани		Стандардизовани	<i>t</i>	<i>p</i>
	коэффициенти		коэффициенти		
	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Beta</i>		
Константа	-1413,994	333,868		-4,235	0,001
Старост (год.)	21,776	4,493	0,766	4,846	0,000
Ејекциона фракција (%)	12,200	3,051	0,603	3,999	0,002
Деривати сулфонилурее (не/да)	-443,527	163,615	-0,417	-2,711	0,018

6.7. Прогностички значај генских полиморфизама и других фактора

Након укључивања у истраживање, стање пацијената је и даље праћено. У моменту прављења пресека просечна дужина посматрања је износила $414,89 \pm 147,24$ дана (максимално 20 месеци). Бележени су следећи догађаји: морталитет, поновна хоспитализација и јављање хитној медицинској помоћи услед кардиоваскуларних индикација.

6.7.1. Морталитет

Подаци о морталитету су добијени за укупно 104 особе. Смрт је наступила код 8 пацијената (7,7%), просечно након $120,13 \pm 103,48$ дана (од 7 до 297 дана). У 6 случајева, смрт је наступила као директна последица АКС. У друга два случаја, такође, је постојао

кардиоваскуларни узрок смрти: инфективни миокардитис и тромбоза доњих екстремитета. Није утврђена статистичка значајност између морталитета и концентрација, односно коригованих концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела, што може бити последица малог броја умрлих (Табела 31).

Табела 31. Концентрација и коригована концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у односу на морталитет

	Морталитет		Z (p)
	не	да	
Клопидогрел (нг/мл)	32,13±51,01 16,7 (5,0-42,9)	35,40±47,00 20,2 (0,8-85,2)	0,599 (0,569)
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	363,31±452,03 182,5 (25,2-480,2)	379,15±208,63 185,8 (35,8-915,8)	0,705 (0,481)
Клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	0,42±0,68 0,2 (0,1-0,6)	0,30±0,34 0,3 (0,0-0,6)	0,721 (0,482)
2-оксо-клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	4,79±6,05 2,2 (0,3-6,4)	3,19±3,29 2,5 (0,5-6,6)	0,689 (0,491)

У Табели 32 је приказана дистрибуција испитиваних генетских карактеристика у односу на морталитет. Као што се може видети, ни у једном случају није утврђена статистичка значајност добијених резултата, међутим, треба узети у обзир мали број умрлих пацијената.

Табела 32. Морталитет пацијената у односу на ABCB1 C3435T и CYP2C9 генотип, као и CYP2C19 фенотип

		Морталитет		χ^2 (p)
		не	да	
ABCB1 C3435T	CC	21 (21,9%)	3 (37,5%)	1,329 (0,515)
	CT	50 (52,1%)	4 (50,0%)	
	TT	25 (26,0%)	1 (12,5%)	
CYP2C19	Спори метаболизери	3 (4,3%)	0 (0,0%)	1,030 (0,794)
	Интермедијерни метаболизери	20 (29,0%)	3 (42,9%)	
	Екстензивни метаболизери	29 (42,0%)	2 (28,6%)	
	Ултрабрзи метаболизери	17 (24,6%)	2 (28,6%)	
CYP2C9	*1/*1	67 (78,8%)	6 (85,7%)	0,229 (0,892)
	*1/*2	17 (20,0%)	1 (14,3%)	
	*2/*2	1 (1,2%)	0 (0,0%)	

6.7.2. Рехоспитализација

Током периода праћења, 27 пацијената (22,3%) од укупно 121, је било поново хоспитализовано. Већина пацијената је само једном поново хоспитализована (66,7%), с тим што је један пацијент био на болничком лечењу још укупно 7 пута. Период до прве поновне хоспитализације је износио просечно $386,56 \pm 166,42$ дана (од 5 до 602 дана). Код 10 пацијената (37,0%) разлог је био поновни инфаркт (укључујући и тромбозу стента, у једном случају). Остале индикације за болничко лечење су биле: стабилна ангина пекторис, нестабилна ангина пекторис, бол у грудима нејасне етиологије, аритмија (вентрикуларне и суправентрикуларне екстрасистоле), компликација *PCI* (испадање стента у васкуларно корито) и срчана инсуфицијенција.

Коришћењем Ман-Витнијевог *U*-теста, није уочена статистички значајна разлика у концентрацијама и коригованим концентрацијама клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела између пацијената којима је било неопходно болничко лечење током периода праћења, и осталих (Табела 33).

Табела 33. Концентрација и коригована концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у односу на потребу за поновним болничким лечењем

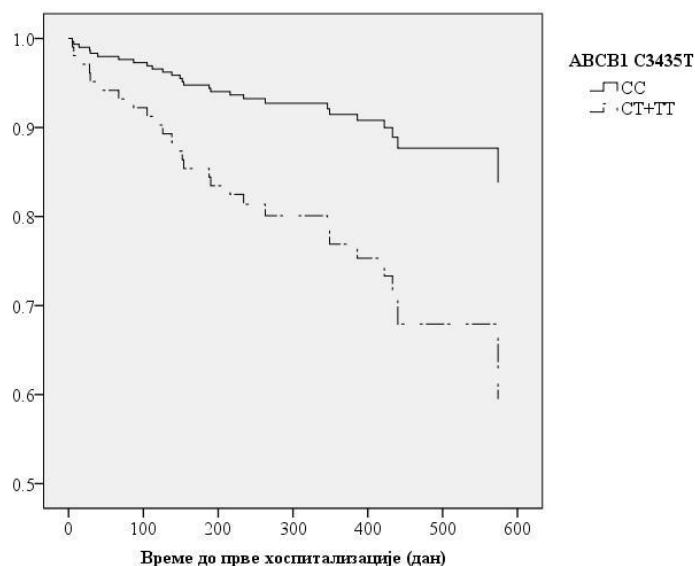
	Рехоспитализација		Z (p)
	не	да	
Клопидогрел (нг/мл)	33,38 $\pm$ 49,94 16,4 (9,32-41,68)	26,29 $\pm$ 28,52 14,8 (4,4-46,5)	0,265 (0,791)
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	386,20 $\pm$ 407,57 245,8 (105,1-465,6)	343,75 $\pm$ 370,85 247,8 (37,4-629,0)	1,358 (0,175)
Клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	0,42 $\pm$ 0,67 0,2 (0,1-0,5)	0,30 $\pm$ 0,29 0,2 (0,1-0,6)	0,285 (0,776)
2-оксо-клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	4,93 $\pm$ 5,47 3,1 (1,1-5,7)	3,56 $\pm$ 3,47 2,5 (0,5-6,6)	1,343 (0,1779)

Иако, није уочен значај утицаја концентрације клопидогрела и његовог метаболита на прогнозу пацијената са АКС, у смислу поновних хоспитализација, укључивањем ударне дозе клопидогрела, као независне варијабле, методом Сох-регресије је пронађена узрочно-последична веза ($\chi^2=7,452$, $p<0,01$). Повећање ударне дозе за 75мг смањује ризик за 20,2%, повећање ударне дозе за 150мг смањује ризик за 36,3%, односно за 59,4% код повећања дозе за 300мг ($p<0,0$).

У Табели 34 је приказана фреквенца накнадних болничких лечења у зависности од испитиваних генетских параметара. Ни за један од испитиваних генотипова, односно фенотипова, није потврђена повезаност са фреквенцом рехоспитализација међу пацијентима након АКС. Међутим, груписањем пацијената са *ABCB1* 3435CT и TT генотипом, добијена је статистички значајна Сох-регресиона крива ($\chi^2=3,911$, $p<0,05$) (Графикон 3). Пацијенти са макар једним полиморфним T алелом имају 2,9 пута већи ризик од поновних хоспитализација, 20 месеци након АКС ($p<0,05$)

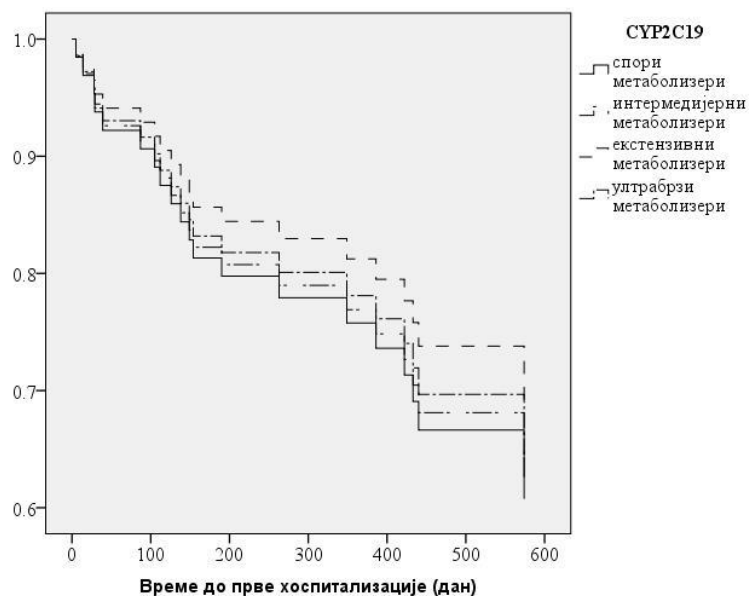
Табела 34. Рехоспитализација пацијената у зависности од *ABCB1* C3435T и *CYP2C9* генотипа, као и *CYP2C19* фенотипа

		Рехоспитализација		χ^2 (p)
		не	да	
<i>ABCB1</i> C3435T	CC	24 (25,5%)	3 (11,1%)	2,642 (0,267)
	CT	41 (43,6%)	15 (55,6%)	
	TT	29 (30,9%)	9 (33,3%)	
<i>CYP2C19</i>	Спори метаболизери	3 (5,5%)	1 (5,0%)	0,211 (0,976)
	Интермедијерни метаболизери	14 (25,5%)	6 (30,0%)	
	Екстензивни метаболизери	19 (34,5%)	6 (30,0%)	
	Ултрабрзи метаболизери	19 (34,5%)	7 (35,0%)	
<i>CYP2C9</i>	*1/*1	58 (78,4%)	19 (82,6%)	0,192 (0,775)
	*1/*2	16 (21,6%)	4 (17,4%)	

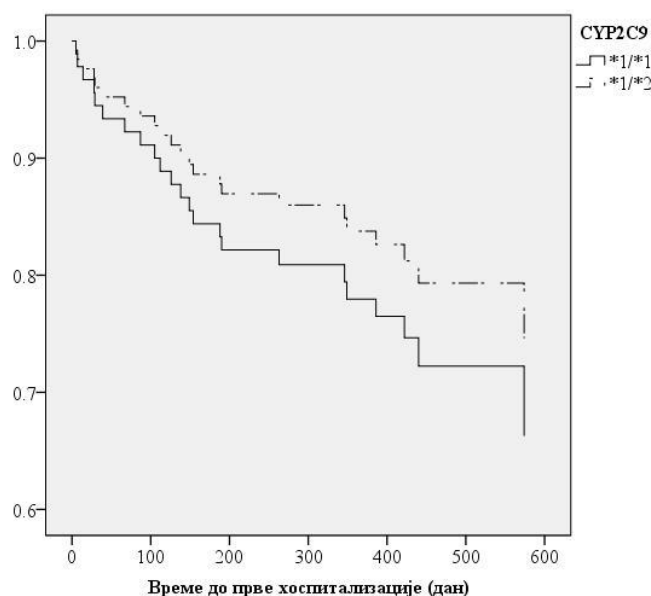


Графикон 3. Сох-регресиона крива рехоспитализација у зависности од *ABCB1* C3435T генотипа

На Графиконима 4 и 5 су на сличан начин приказане Сох-регресионе криве рехоспитализација у зависности од *CYP2C19* фенотипа ($\chi^2=0,203$, $p=0,977$; $HR(ИМvs.СМ)=0,946$, $p=0,959$; $HR(ЕМvs.СМ)=0,749$, $p=0,790$; $HR(УМvs.СМ)=0,890$, $p=0,914$) и *CYP2C9* генотипа ($\chi^2=0,410$, $p=0,522$; $HR=0,712$, $p=0,537$). Ни у једном од ова два случаја није било статистички значајне разлике између регресионих крива.



Графикон 4. Сох-регресиона крива рехоспитализација у зависности од *CYP2C19* фенотипа



Графикон 5. Сох-регресиона крива рехоспитализација у зависности од *CYP2C9* генотипа

Методом бинарне логистичке регресије, добијен је статистички значајан модел ($\chi^2=24,871$, $p<0,001$) који омогућава предвиђање 30,6-47,0% варијансе у учесталости рехоспитализација код пацијената након АКС (Табела 35). У модел су укључиване остале карактеристике пацијената (опште и клиничке). Само 1% повећања ејекционе фракције леве коморе повлачи за 7,9% мањи ризик од поновног болничког лечења, док разлика у ејекционој фракцији од 10% смањује ризик за 56,1% ($p<0,01$). Разлика у нивоу аспаратат аминотрансферазе од 1иј./мл смањује ризик за 1,4% ($p<0,05$). Осим тога, већа концентрација пантопразола (за 0,1мг/л) смањује ризик од поновног болничког лечења за 29.6% ($p<0,05$). Међутим, пацијенти који су примали дигоксин имају скоро 1000 пута већи ризик од рехоспитализације ($p<0,01$).

Табела 35. Модел предвиђања рехоспитализација добијен бинарном логистичком регресијом

Модел Рехоспитализација	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	<i>p</i>	<i>HR</i>	95%CI (<i>HR</i>)	
Ејекциона фракција (%)	-0,082	0,031	6,799	0,009	0,921	0,866	0,980
Аспартат аминотрансфераза (иј./л)	-0,014	0,006	5,231	0,022	0,986	0,974	0,998
Пантопразол (мг/л)	-3,512	1,697	4,283	0,038	0,030	0,001	0,830
Дигоксин (не/да)	6,834	2,929	5,442	0,020	928,971	2,981	289463,499
Константа	4,489	1,778	6,378	0,012	89,044		

6.7.3. Потреба за хитном медицинском помоћи

Податке о јављању хитној медицинској помоћи је добијено за 104 пацијента. Укупно 32 пацијента (18,3%) је тражило хитну медицинску помоћ због кардиоваскуларних симптома, током периода праћења. Највећи број се јављао само једном (40,6%), док је највећи број јављања, у једном случају, био 15.

У Табели 36 су приказане концентрације и кориговане концентрације клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела код пацијената који су се јављали хитној медицинској помоћи током периода праћења у односу на остале без значајних сметњи. Није уочена статистички значајна повезаност између инциденце јављања и концентрација у плазми.

Табела 36. Концентрација и коригована концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у односу на потребу за хитном медицинском помоћи

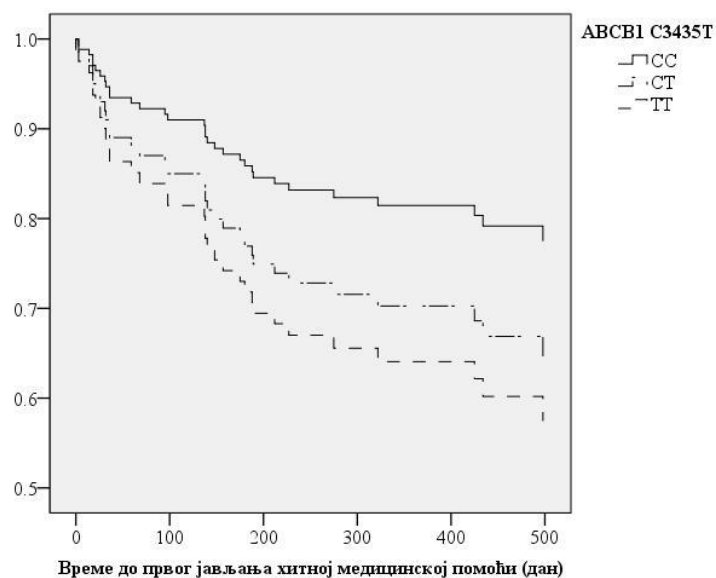
	Јављање хитној медицинској помоћи		Z (p)
	не	да	
Клопидогрел (нг/мл)	34,62±57,18 16,4 (3,8-42,8)	26,85±27,53 18,7 (4,7-49,0)	0,146 (0,884)
2-оксо-клопидогрел (нг/мл)	353,03±454,66 164,9 (27,4-449,4)	392,88±456,86 200,1 (14,4-696,3)	0,209 (0,834)
Клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	0,45±0,76 0,2 (0,0-0,6)	0,31±0,26 0,2 (0,1-0,7)	0,146 (0,884)
2-оксо-клопидогрел (кориговано) (нг/мл/мг)	4,64±6,09 2,1 (0,4-6,0)	4,74±5,52 2,7 (0,2-8,5)	0,136 (0,892)

Табела 37. Потреба за хитном медицинском помоћи у зависности од ABCB1 C3435T и CYP2C9 генотипа, као и CYP2C19 фенотипа

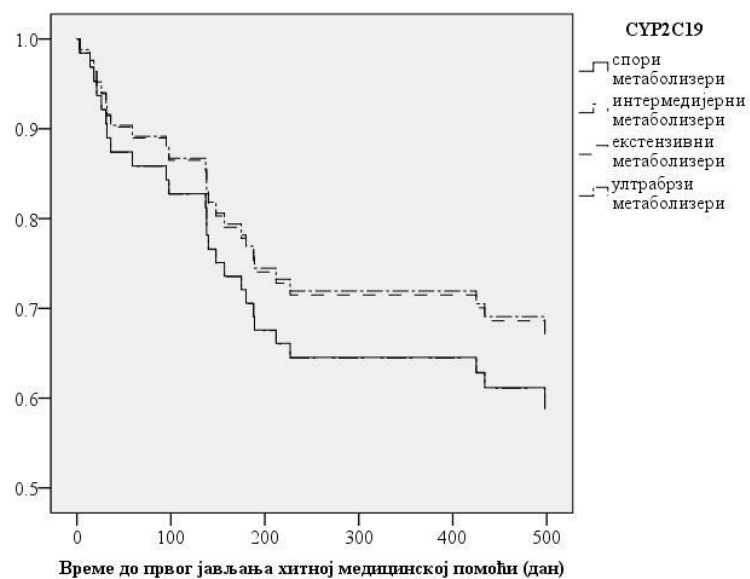
		Јављање хитној медицинској помоћи		χ^2 (p)
		не	да	
ABCB1 C3435T	CC	19 (26,4%)	5 (15,6%)	1,847 (0,397)
	CT	37 (51,4)	17 (53,1%)	
	TT	16 (22,2%)	10 (31,3%)	
CYP2C19	Спори метаболизери	2 (4,0%)	1 (3,8%)	0,359 (0,949)
	Интермедијерни метаболизери	14 (28,0%)	9 (34,6%)	
	Екстензивни метаболизери	21 (42,0%)	10 (38,5%)	
	Ултрабрзи метаболизери	13 (26,0%)	6 (23,1%)	
CYP2C9	*1/*1	46 (74,2%)	27 (90,0%)	3,202 (0,202)
	*1/*2	15 (24,2%)	3 (10,0%)	

У Табели 37 је дат приказ инциденце јављања хитној медицинској помоћи у зависности од испитиваних генотипова, ABCB1 C3435T ($\chi^2=2,199$, $p=0,333$; $HR(CTvs.CC)=1,722$, $p=0,286$; $HR(TTvs.CC)=2,173$, $p=0,158$) и CYP2C9 ($\chi^2=3,638$, $p=0,056$; $HR=0,362$, $p=0,095$), односно CYP2C19 фенотип ($\chi^2=0,455$, $p=0,929$; $HR(ИМvs.СМ)=1,002$, $p=0,998$; $HR(ЕМvs.СМ)=0,767$, $p=0,800$; $HR(УМvs.СМ)=0,753$, $p=0,793$). Није утврђена статистичка значајност пронађених разлика, што се може видети и на Графиконима 6-8, са одговарајућим Сох-регресионим кривама. Мада, може се уочити извесно груписање четири CYP2C19 фенотипа у две групе – СМ и ИМ, и ЕМ и УМ

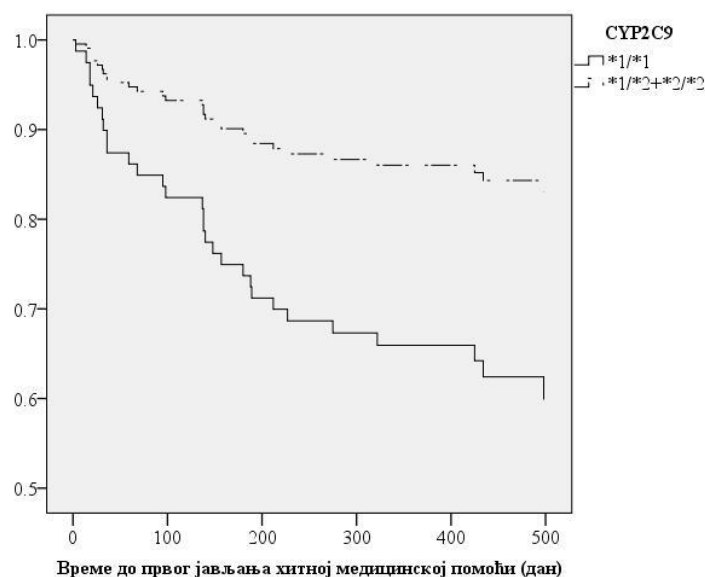
(Графикон 7), али ни ова разлика није била статистички значајна ($\chi^2=0,453$, $p=0,501$; $HR=0,760$, $p=0,496$).



Графикон 6. Сох-регресиона крива јављања хитној медицинској помоћи у зависности од ABCB1 C3435T генотипа



Графикон 7. Сох-регресиона крива јављања хитној медицинској помоћи у зависности од CYP2C19 фенотипа



Графикон 8. Сох-регресиона крива јављања хитној медицинској помоћи у зависности од CYP2C9 генотипа

Методом бинарне логистичке регресије, добијен је статистички значајан модел ($\chi^2=18,103$, $p<0,001$) који омогућава предвиђање 17,2-23,9% варијансе у јављању пацијената хитној медицинској помоћи након АКС (Табела 38). При том, у моделу су тестиране опште и клиничке карактеристике пацијената, као и комедикација. На основу модела се може закључити да добра ејекциона фракција леве коморе значајно умањује ризик од потребе за хитном медицинском помоћи. Наиме, повећање ејекционе фракције леве коморе за 1% повлачи за 5,9% мањи ризик од поновног болничког лечења, док разлика у ејекционој фракцији од 10% смањује ризик за 45,6% ($p<0,01$). Пацијенти који су доживели више од једног АКС имају 3,7 пута већи ризик ($p<0,05$), као и пацијенти који су примали спиронолактон ($p<0,05$).

Табела 38. Модел предвиђања јављања хитној медицинској помоћи добијен бинарном логистичком регресијом

Модел	B	SE	Wald	p	HR	95%CI (HR)	
Јављање хитној медицинској помоћи							
Ејекциона фракција (%)	-0,061	0,023	6,826	0,009	0,941	0,899	0,985
Претходни акутни инфаркт миокарда (не/да)	1,313	0,628	4,366	0,037	3,718	1,085	12,739
Спиронолактон (не/да)	1,260	0,595	4,490	0,034	3,527	1,099	11,314
Константа	1,889	1,162	2,642	0,104	6,610		

7. ДИСКУСИЈА

Опште је прихваћена примена двојне антиагрегационе терапије у лечењу пацијената са АКС комбинацијом ацетилсалицилне киселине и инхибитора *P2Y12* рецептора. У идеалним условима метода избора за третман пацијената са *STEMI* је примарна *PCI*. Перипроцедурална фармакотерапија подразумева двојну антиагрегациону терапију – ацетилсалицилну киселину и антагонисте *ADP*-рецептора. Европске смернице препоручују прасугрел или тикагрелор као лекове избора, уместо клопидогрела, због бржег дејства и веће ефикасности [20]. Прасугрел омогућава већу продукцију активних метаболита, снажнији је инхибитор *ADP*-зависне агрегације тромбоцита и мања је његова варијабилност у одговору [21,30]. *TRITON-TIMI 38* студија је показала супериорност прасугрела у смањењу инциденце кардиоваскуларне смрти, нефаталног АИМ и ЦВИ код болесника са *STEMI* након примарне или секундарне *PCI*, као и код умерено-до-високо ризичних болесника са *NSTEMI* [175]. Надмоћ прасугрела у односу на клопидогрел је нарочито изражена код пацијената са ДМ. Крварење је чешће код болесника на прасугрелу, али не и у *STEMI* подгрупи. Осим тога, овај лек је контраиндикуван код болесника са претходним ЦВИ или транзиторним исхемијским атаком, и не препоручује се старијим од 75 година и болесницима мале телесне масе (испод 60кг), с обзиром на веома висок ризик од крварења што потиरे могуће користи од лека [176]. Студија у којима се пореди примена двоструко ниже дозе одржавања прасугрела са осталим лековима још увек нема. Супериорност тикагрелора је потврђена *PLATO* студијом [177,178]. У случају оба лека, ризик од крварења је повећан у односу на клопидогрел – при примени тикагрелора за 25%, а прасугрела за 32% [79]. Прописивање тикагрелора је повезано и са чешћом појавом пролазне диспнее и асимптоматске брадикардије у првој недељи. Ниједан од ова два лека се не сме користити код болесника са претходним хеморагијским ЦВИ или умерено-до-тешком инсуфицијенцијом јетре. У случају контраиндикација на оба лека, или уколико нису доступни, препоручује се клопидогрел. У нашој земљи од ова два лека регистрован је

само тикагрелор и није на листама А и А1, те домаће смернице препоручују примену клопидогрела као лека првог избора [179].

Код болесника са *STEMI* код којих се спроводи фибринолиза, поред ацетилсалицилне киселине, лек избора је клопидогрел са ударном дозом 150-300мг и дозом одржавања од 75мг. *CLARITY-TIMI 28* студија (*CLopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy – Thrombolysis In Myocardial Infarction 28*) је доказала да клопидогрел значајно смањује ризик од кардиоваскуларних догађаја код болесника млађих од 75 година лечених фибринолитичима [180], а *COMMIT* студија (*Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial*) смањење укупног морталитета [19]. Прасугрел и тикагрелор нису испитивани у овој клиничкој ситуацији.

У лечењу болесника са *NSTEMI*, Европске смернице, такође, дају предност тикагрелору и прасугрелу [181,182], у односу на клопидогрел. Након ударне дозе клопидогрела од 300мг, са дозом одржавања од 75мг/дневно се наставља наредних 12 месеци. Међутим, недавна мета-анализа [183] је утврдила да треба сачекати са давањем тиенопиридина до завршетка коронарографије, коначног постављања дијагнозе и индикације за *PCI*, барем код пацијената који дођу у року од 48ч и где постоји могућност за брзу катетеризацију. Наиме, претходно давање тиенопиридина не смањује морталитет, у малом проценту смањује инциденцу кардиоваскуларних догађаја, али за 35-45% повећава ризик од великих крварења, што нарочито може бити проблем ако се укаже потреба за оперативним решавањем.

У мање развијеним земљама света, прасугрел се користи код око половине пацијената након *PCI* стентом обложеним леком, а у осталим клиничким ситуацијама клопидогрел је доминантно прописиван лек. Управо је цена један од главних разлога за непрописивање новијих лекова (16%), а нарочито код пацијената након *PCI* леком обложеним стентом (73%). Најчешћи разлог (75%) је лични однос лекара према клопидогрелу, односно савременијим лековима из исте групе, вероватно због најбољег познавања лека који је најдуже на тржишту. Контраиндикације су присутне у око 10% [184]. Међутим, и у развијеним земљама се тикагрелор, односно прасугрел, не прописују *a priori*, већ је најзаступљенији приступ индивидуализације терапије на основу генотипизације или мерења резидуалне активности тромбоцита код пацијената лечених клопидогрелом. Рана примена тикагрелора се повећава из године у годину, у већој мери код пацијената са *STEMI*. Насупрот томе, рано прописивање прасугрела и клопидогрела

се смањује, као и прописивање на отпусту из болнице [185,186]. И до 70% болесника након *PCI*, добија тикагрелор. Код медикаментозно лечених, тикагрелор се прописује у око 30%, а клопидогрел у нешто више од петине пацијената [187]. Међутим, резултати *Fan* и сардника [188] показују да је проценат употребе клопидогрела знатно већи код пацијената са АКС, а да његова замена прасугрелом и тикагрелором иде знатно спорије, нарочито код пацијената лечених неинвазивним методама. Око 10% пацијената пређе са тикагрелора на клопидогрел у периоду након четири месеца терапије [189]. Тикагрелор се најчешће прописује млађим пацијентима, беле расе, са здравственим осигурањем високог ранга, као и у случају инвазивног лечења АКС или интрахоспиталног кардиоваскуларног догађаја. Дугорочна терапија клопидогрелом је најчешћи избор код пацијената са претходним кардиоваскуларним догађајима, атријалном фибрилацијом, срчаном инсуфицијенцијом, ЦВИ или коронарним *by-pass* графтом. Прасугрел се најчешће прописује млађим мушкарцима, након *PCI*, са ДМ, артеријском хипертензијом, хиперлипидемијом или претходним АИМ [185–187]. Свега код 20% пацијената са фенотипом *CYP2C19* спорих метаболизера, клопидогрел је замењен другим леком или је повећана доза клопидогрела. Код око четвртине пацијената, сами лекари одбијају да пацијентима понуде процедуру генотипизације, вероватно због недовољно информација о значају генотипизације *CYP2C19*. Тек сваки десети пацијент сам одбија тестирање [190].

Ако се узму у обзир све претходно наведене чињенице, разлози за високу преваленцу примене клопидогрела код пацијената са АКС, и у развијеним и мање развијеним земљама света, су очигледни: недовољно доказа о факторима који утичу на фармакокинетiku клопидогрела (чак и у случају оних који су ушли у званичне препоруке), одбојност лекара, необавештеност, али и немогућност примене савременијих лекова и метода као што су генотипизација и тестови функције тромбоцита. Стога, сваки допринос изучавању фармакокинетике и клопидогрела води ка ефикаснијем и безбеднијем лечењу оболелих од АКС.

7.1. Значај поломорфизма *П*- гликопротеина *ABCB1* *C3435T* за фармакокинетику и фармакодинамику клопидогрела

Фармакокинетику клопидогрела је могуће процењивати на основу концентрације клопидогрела у плазми, али и било ког његовог метаболита (неактивног карбоксилног метаболита, 2-оксо-клопидогрела или активног *H4* тиол метаболита). У овом истраживању пацијентима су измерене концентрације клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела. Ниво активног тиол метаболита није мерен, јер, због своје нестабилности, његово одређивање захтева посебну обраду узорака одмах по сакупљању [191]. С обзиром да се измерене концентрације клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела значајно разликују од аутора до аутора, може се рећи да наше измерене вредности одговарају том широком опсегу претходних резултата. Наиме, добијени резултати могу значајно да варирају у зависности примењене дозе и времена протеклог до узимања узорка. Максимална концентрација зависи од примењене дозе, као и време њеног постизања [24,25,38]. То значи да, као и у овом истраживању, узимање узорка у исто време код свих пацијената, без обзира на различит режим дозирања, може довести до варијабилности у добијеним мерењима, мада је у првим сатима та варијабилност врло ниска [38]. Стога, фармакокинетика клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела је процењивана на основу концентрације кориговане дозом одржавања.

Измерена концентрација 2-оксо-клопидогрела је отприлике 10 пута већа од концентрације клопидогрела, што је у складу са подацима из литературе [192], те постоји значајна корелација између њихових измерених вредности, што је у складу са претходним истраживањима [38].

Фреквенца полиморфног *ABCB1* 3435T алела (53,4%) се, као што је и очекивано, не разликује у односу на здраву популацију са овог подручја [174]. Иако је можда експресија *П*-гликопротеина код хетерозигота интермедијерна [112], водећи се истраживањима *Nakamura* и сардника [118] у којима је експресија иРНК *П*-гликопротеина код хетерозигота слична *СС* хомозиготима, претпостављено је да је један неполиморфан алел довољан за нормално функционисање транспортера. Стога, на тај начин је и извршена подела пацијената на основу генотипа у две групе. У складу са претходним истраживањима [27,123,193], концентрација клопидогрела, као и

коригована концентрација су биле ниже код хомозигота за полиморфни ген. У случају 2-оксо-клопидогрела, статистички значајна редукција у концентрацији је запажена само након корекције концентрације на основу дозе. Највероватнији узрок оваквог резултата је разлика у фармакокинетици у зависности од примењене дозе [24]. Taubert и сарданици [27] су доказали да полиморфизам П-гликопротеина има за последицу нижу концентрацију клопидогрела у плазми, након доза од 300мг и 600мг. При дози од 900мг, разлика између носилаца различитих генотипова није уочена, што може бити последица сатурације транспортера. Ефекат овог полиморфизма на апсорпцију клопидогрела се може објаснити значајно већом енергијом потребном за везивање супстрата у случају *TT* генотипа, при чему је енергија везивања слична код *CC* и *CT* генотипова [194]. Међутим, *Bouman* и сарданици [31] нису утврдили значај овог полиморфизма нити за концентрацију пролека, нити за иједан од метаболита. Остала истраживања су базирана на концентрацији активног метаболита, тако да се њихови резултати могу упоредити са овима ако се узме у обзир да се синтеза активног метаболита одвија нисходно од места деловања П-гликопротеина, за разлику од синтезе 2-оксо-клопидогрела који се, можда, делимично ствара и на нивоу интестиналне слузокоже [32]. Коначан закључак је тешко извести, с обзиром да постоје студије чији су резултати у складу са нашим истраживањем [123], али и оне које оповргавају значај *ABCB1 C3435T* полиморфизма [45,125,193], међу њима и велика *TRITON-TIMI 38* студија [83] што је врло занимљиво с обзиром да је у истој студији утврђена повезаност са фармакодинамским ефектом.

Фармакодинамски ефекат клопидогрела је анализиран на два начина – мерењем резидуалне активности тромбоцита и праћењем кардиоваскуларних догађаја (смрт, рехоспитализација, јављање хитној медицинској помоћи). Ни у једном случају, није утврђена значајна узрочно-последична веза, осим да носиоци *T* алела имају скоро три пута већи ризик од поновне хоспитализације током 20 месеци праћења након АКС. Поред тога, изгледа да је концентрација клопидогрела, односно 2-оксо-клопидогрела, од минорног значаја за крајњи ефекат клопидогрела, инхибицију агрегације тромбоцита и клинички исход. Ограничавајући фактор за овај део истраживања је био релативно мали број пацијената којима је тестирана функција тромбоцита након увођења терапије клопидогрелом, као и мали број кардиоваскуларних догађаја током периода праћења, што је свакако могло да утиче на добијене резултате. Међутим, међу истраживачима још увек не постоји консензус о утицају полиморфизама П-гликопротеина на фармакодинамски ефекат клопидогрела.

Ретроспективно гледано, код болесника са рекурентним кардиоваскуларним догађајима након АИМ, је повећана учесталост *ABCB1 C3435T* полиморфизма [141]. Прва велика студија која је утврдила значај полиморфизма *C3435T* П-гликопротеина на клинички исход током годину дана праћења, је *FAST-MI* студија (*French registry on Acute ST-elevation Myocardial Infarction*) [143], а затим и *PLATO* студија, такође на пацијентима са АКС, али само у првих месец дана [84]. Након тога је *TRITON-TIMI 38* студија потврдила да *ABCB1 C3435T* полиморфизам има утицаја на клинички исход (кардиоваскуларна смрт, АИМ, ЦВИ), али не и инциденцу тромбозе стента, при чему је ризик хетерозигота сличан ризику код *CC* хомозигота (1,3 пута већи). У првих месец дана ризик је био два пута већи, а након 15 месеци око 72% [83]. У складу са тим, појава крварења је знатно ређа код носилаца полиморфног гена [195], мада има истраживања која нису показала утицај овог полиморфизма на појаву крварења узрокованог терапијом клопидогрелом [14]. Комбинација са полиморфизмима *CYP2C19* даје још бољу диференцијацију болесника са ниским и високим ризиком [83], што је последица генетског дисбаланса између гена за ова два протеина, односно чињенице да 34-66% популације носи полиморфизме оба гена [196]. Пацијенти са *CYP2C19* фенотипом *SM* и макар једним *ABCB1 C3435T* алелом имају више од 5 пута већи ризик за озбиљне нежељене кардиоваскуларне догађаје [143]. Када је у питању резидуална активност тромбоцита, она је већа за око 7% код хомозигота за испитивану генску мутацију, али само у случају ударних доза (300мг или 600мг), али не и при дозама одржавања (као што је случај у нашем истраживању) [83]. Више мањих студија је потврдило значај овог полиморфизма за инхибицију агрегације тромбоцита [14,123,135,141,197–199], односно клинички исход [14,30,100,141]. Предиктивна вредност *ABCB1 C3435T* полиморфизма за инхибицију агрегације тромбоцита је око 7%, с тим што је највећа на самом почетку терапије (око 9%), а затим се постепено смањује (6% након једног месеца, 5% након 6 месеци) [14].

У супротности са претходно наведеним литературним подацима су резултати *PRINC* студије [130] и касније велике *GRAVITAS* студије [200], такође на пацијентима са АКС након *PCI*. Утицај полиморфизама П-гликопротеина није утврђен нити тестирањем функције тромбоцита нити праћењем пацијената током 6 месеци. У две мета-анализе [195,201] дошло се до закључка да *TT* генотип подразумева чешћу појаву и раних и касних озбиљних кардиоваскуларних догађаја, али ређу појаву крварења. Повезаност са другим факторима ризика за лош клинички исход (АИМ, ЦВИ, тромбоза стента), као и

тромбоцитном активношћу није утврђена. Неколицина других мањих истраживања је добило сличне резултате, односно да *ABCB1 C3435T* полиморфизам није статистички значајан предиктор тромбозе стента након *PCI*, или неког другог кардиоваскуларног догађаја код болесника лечених клопидогрелом [45,91,125,130,142,202–206].

7.2. Значај поломорфизама ензима *CYP2C19* за фармакокинетику и фармакодинамику клопидогрела

И поред званичних препорука да код носилаца *CYP2C19* алела са смањеном функцијом треба повећати дозу клопидогрела, или га заменити другим леком из групе инхибитора *P2Y12* рецептора [22,145], нема довољно доказа који би превагнули мишљење научне јавности на једну или другу страну – да ли је полиморфизам *CYP2C19* гена значајан за терапију клопидогрелом, и колики је то значај. Наши резултати нису показали да присуство полиморфизама *CYP2C19* ензима утиче на фармакокинетику клопидогрела, као ни на ниво инхибиције агрегације тромбоцита и клинички ток код ових пацијената. Иако су овакви резултати у супротности са великим бројем истраживања са истим циљем, постоје подаци у литератури који не дају тако велики значај генотипизацији *CYP2C19*.

Фармакокинетска анализа клопидогрела и његових метаболита је показала да присуство полиморфизама не утиче на концентрацију клопидогрела нити неактивних метаболита, већ само на максималну концентрацију активног метаболита, али не и на ПИК активног метаболита. Осим тога, изражена повезаност *2 алела са фармакодинамским одговором на клопидогрел постоји тек у присуству негенетских фактора, као што су старост, ДМ и комедикација ИПП [193]. Утицај полиморфизама са смањеном функцијом на варијабилност у одговору тромбоцита на терапију клопидогрелом је процењен на свега 5-12% [13,92], а сензитивност генотипизације у предвиђању пацијената са неадекватном инхибицијом агрегације тромбоцита је ниска – око 50% [91], односно 12-20% у предвиђању нежељених клиничких ефеката код пацијената након *PCI* [207]. Новије студије на великом броју пацијената показују да присуство алела са смањеном функцијом у генотипу пацијената лечених клопидогрелом не повећава ризик од кардиоваскуларних догађаја, као што су смрт, нефатални АИМ и ЦВИ [208,209]. Између пацијената са *CYP2C19* фенотипом ЕМ, ИМ и СМ, нема разлике

у инциденти крварења, нити исхемијских догађаја [210]. Приступ овом проблему методом мета-анализа је довео до закључака да *CYP2C19* полиморфизми не утичу на крајњи клинички исход [22,138].

Значај *17 алела је маргиналан и за фармакокинетику и фармакодинамику клопидогрела [38]. У поређењу са *1/*1 генотипом, активност ензима код *17/*17 и *1/*17 генотипова је 1,8, односно 1,7 пута већа. Активност ИМ *17/*2 је 1,2 пута мања, а *1/*2 – 2,4 пута мања. Код СМ је однос активности ЕМ/СМ скоро 21 [211]. Током две године праћења, ни *17 алел није доведен у везу са увећаним ризиком од крварења, тромбозе стента или других кардиоваскуларних нежељених догађаја [212]. Овакви резултати наводе да је можда требало носиоце једног алела са повећаним и једног алела са смањеним метаболизмом класификовати као ЕМ. Осим тога, с обзиром да нисмо одређивали присуство *3 алела, могуће је да је један део ИМ класификован као ЕМ.

7.3. Значај поломорфизма ензима *CYP2C9* за фармакокинетику и фармакодинамику клопидогрела

С обзиром на мали удео *CYP2C9* ензима у метаболизму клопидогрела, свега 7% [29], мали је број студија у којима је испитиван његов значај, а нарочито фармакокинетских студија. Фреквенца полиморфног *2 алела је била 11% што одговара његовој дистрибуцији у Европи [148]. Како су само два пацијента имала генотип *2/*2, они су у свим анализама придружени хетерозиготима. То је могло имати утицаја на добијене резултате с обзиром да се код хомозигота очекује и два пута нижа активност ензима [43]. Други недостатак овог дела истраживања је што нисмо одређивали присуство *3 алела. С обзиром да је знатно ређи од *2 алела мало је вероватно да би међу пацијентима било хомозигота, али је и код хетерозигота активност прилично смањена, 40-75%, у зависности од супстрата [151,152], при чему нема литературних података за клопидогрел као супстрат. Према неким ауторима, тај проценат је још већи, односно активност *2 алела је свега 12%, а *3 алела 5% од нормалне активности *CYP2C9* ензима [213]. Осим тога, нисмо одређивали концентрацију активног метаболита, а како је овај ензим укључен у другу фазу метаболизма клопидогрела, могуће је да се присуство *2 полиморфизма не одрази на концентрацију клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела као што је приказано у нашим резултатима. Међутим, нисмо утврдили ни повезаност са

реактивношћу тромбоцита нити са инциденцом смртних исхода, рехоспитализација или јављања хитној медицинској помоћи. Изненађујуће, био је присутан врло изражен тренд, али не и статистички значајан ($p=0,056$) да су се хомозиготи $*1*/1$ скоро 3 пута чешће јављали хитној медицинској помоћи. С обзиром да је ова повезаност на фармакодинамском нивоу, као и да је супротна од очекиваног, могуће је да „антиагрегациони“ ефекат полиморфизама *CYP2C9* ензима [28] има много већи значај када је антиагрегациона терапија у питању, у поређењу са његовом улогом у метаболизму клопидогрела. Инхибиција *CYP2C9* сулфофеназолом има протективни ефекат на миокард, штитећи га од исхемијско-реперфузионог оштећења [214]. Ова теорија је у складу са чињеницом да су *CYP2C19* и *CYP2C9* у генетском дисбалансу, те да присуство полиморфизма у једном гену повлачи одсуство мутација у другом [196,215]. Самим тим, смањена активност *CYP2C9* ензима може бити компензована деловањем других. Ипак, треба имати у виду и да постоје истраживања са потпуно супротном претпоставком, односно да ендотелни *CYP2C9*, синтезом епоксиеиакоатреноичне киселине, смањује активацију и адхезију тромбоцита [216–219].

7.4. Популациона фармакокинетска анализа клопидогрела

Основни циљ ПФК анализе је био да се добије релевантан модел клиренса клопидогрела на основу измерених концентрација и карактеристика популације од значаја. До данас, рађено је свега неколико оваквих анализа клопидогрела. Као основ за развијање модела коришћене су концентрације клопидогрела [48,220], неактивног карбоксилног метаболита [221,222] или активног метаболита клопидогрела [24,48,159,223].

Од 25 испитиваних коваријанти, у финалном моделу издвојене су четири: дневна доза клопидогрела, телесна маса, ниво аланин аминотрансферазе и комедикација пантопразолом.

Претходне студије овог типа су добиле врло различите резултате. Ни у једној од њих, као коваријанте клиренса клопидогрела, нису испитиване две од четири значајне коваријанте у овом истраживању (ниво аланин аминотрансферазе и комедикација

пантопразолом), осим у анализи *Simon* и сарадника [159] чији је главни циљ и био утврђивање ефекта ИПП. Између осталог, међу свим испитиваним негенетским карактеристикама пацијената, у две ПФК анализе [220,222], ниједан од фактора није био статистички значајан. На основу истраживања *Ernest* и сарадника [24], на клиренс клопидогрела утичу ударна доза клопидогрела, старост и комедикација аторвастатином. Генетски фактори су укључени у анализу три од поменутих студија. У ПФК анализи *Xie* и сарадника [223], полиморфизми *CYP2C19* ензима су били значајне коваријанте. Међутим, треба узети у обзир да је рађена на кинеској популацији у којој је фреквенца СМ вишеструко већа, док је удео УМ мањи [127,148]. Поред *CYP2C19* фенотипа СМ и ИМ, *Jiang* и сарадници [48] су показали и значај смањене активности *CES1* услед *G143E* мутације, као и значај *BMI*. У ПФК анализи *Simon* и сарадника [159], потврђен је утицај полиморфизма *CYP2C19*, као и комедикације омепазолом или есомеперазолом, али не и пантопразолом.

Једини статистички значајан фактор у добијеном пуном моделу је ниво аланин аминотрансферазе. Клиренс клопидогрела је директно пропорционалан активности овог ензима. Како ниједан од пацијената укључених у истраживање није имао оштећење јетре, и како су лабораторијски резултати углавном били у оквирима нормалних вредности, или благо повишени, варијабилност у резултатима мерења активности аланин аминотрансферазе се може приписати оштећењу миокарда у АКС. Нагли пад ударног волумена леве коморе узрокује брзи реверзибилни пораст трансаминаза, услед смањене перфузије [224]. Ако пораст нивоа овог ензима посматрамо као маркер оштећења срца у АКС, онда ће висока концентрација аланин аминотрансферазе бити предиктор ниже биорасположивости клопидогрела, што повлачи бржи клиренс. Код пацијената са *STEMI*, клопидогрел се спорије ресорбује и спорије постиже максималну концентрацију у плазми, што је последица смањене прокрвљености интестиналне слузокоже, пермеабилности и мотилитета [44]. У сличном истраживању на реанимираним пацијентима (89% су чинили пацијенти са АКС), биорасположивост клопидогрела је била смањена, а код свих пацијената је био благо повишен ниво аланин аминотрансферазе [225].

Иако је фармакогенетски аспект од изузетног значаја за фармакокинетику клопидогрела, ниједан од тестираних полиморфизма у овој анализи (*ABCB1 C3435T*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*17*, *CYP2C9*2*) није био укључен у пуни или коначан модел

клиренса клопидогрела. У две претходне ПФК анализе [48,223], доказан је значај *CYP2C19* фенотипа, док је у истраживању *Simon* и сарадника [159], значајна коваријанта само *2 алед, али не и *17. Полиморфизам П-гликопротеина, као могућег фактора у фармакокинетици клопидогрела, је испитиван у ПФК анализама *Jiang* и сарадника [48] и *Simon* и сарадника [159], али није био укључен у коначан модел. Полиморфизми *CYP2C9* ензима нису одређивани ни у једној од поменутих ПФК анализа. Неслагање нашег резултат са претходним истраживањима може бити последица релативно малог броја укључених пацијената. Наиме, узорак је био довољан за ПФК анализу, али можда не и довољан за добијање релевантног броја пацијената са режим полиморфизмима, те је дошло до девијације у крајњим резултатима. С друге стране, као што је претходно описано, резултати и других претходних истраживања су контраверзни, односно у веома различитој мери дају значај фармакогенетици.

И поред многобројних истраживања, другог типа, која су показала интеракције између клопидогрела и других лекова код болесника са АКС, ПФК анализом је доказан само значај ИПП, нарочито код пацијената са *CYP2C19**2 алолом [159]. С обзиром да се пантопразол сматра најбезбеднијим из групе ИПП [170] због најслабијег инхибиторног дејства на *CYP2C19* [158,226], он је био једини лек из ове групе који је прописиван пацијентима укљученим у ПФК анализу. Наши резултати су у складу са ПФК моделом клиренса клопидогрела у истраживању *Simon* и сарадника [159]. Примена омепразола или есомепразола (ови пацијенти су груписани због чињенице да је есомепразол један од енантиомера омепразола) је била значајна коваријанта, али не и комедикација пантопразолом. Међутим, груписањем пацијената на оне са и без гастропротекције ИПП, ова коваријанта није изгубила на значају. Ови резултати су додатно потврђени значајним смањењем концентрације активног метаболита клопидогрела у плазми након истовремене примене пантопразола, с тим што су омепразол и есомепразол доводе до још веће редукције ПИК активног метаболита.

У пуном ПФК моделу клиренса клопидогрела, телесна маса је била значајна коваријанта. Сви параметри величине тела (телесна маса, телесна висина, *BMI*) су индиректно пропорционални концентрацији активног метаболита у плазми [46]. Популациона фармакокинетска анализа *Jiang* и сарадника [48] је указала на другачију фармакокинетику клопидогрела код гојазних, што је у складу са нашим резултатима. Највероватнији узроци су: распоређивање унете дозе на већу телесну масу [8], смањена

активација клопидогрела због смањене експресије и активности ензима цитхором P450 [227], и повећана разградња клопидогрела и његових метаболита услед индукције *CES1* [228].

Након оралне примене, клопидогрел се брзо апсорбује и метаболише, али са високом интериндивидуалном варијабилношћу [221]. С обзиром да је нашим пацијентима крв узоркована након постизања равнотежног стања клопидогрела у плазми, као коваријанта у развијању пуног модела клиренса клопидогрела је коришћена дневна доза, односно доза одржавања. Високе дозе клопидогрела, и ударне дозе и дозе одржавања, интензивирају апсорпцију и повећавају биорасположивост, што је од изузетног значаја за каснији фармакодинамски ефекат [28]. У једној од претходних ПФК анализа [24], једна од значајних детерминанти фармакокинетики клопидогрела је била ударна доза. При примени виших доза (600мг у поређењу са 75мг), максимална концентрација се постиже брже (за око 30 минута), биорасположивост је за 51% нижа, а пораст концентрације активног метаболита је непропорционално већи (само 3,9 у поређењу са осмоструким повећањем ударне дозе). Због сатурације ресорпције, даље повећање ударне дозе (на 900мг) не повећава ефикасност лека, али би се то могло превазићи дељењем дневне дозе [229]. Са развојем лабораторијских тестова за одређивање функције тромбоцита, рађене су студије којима је испитивана корист од повећања дозе код пацијената са високом резидуалном активношћу тромбоцита. Понављање ударних доза од 600мг код резистентних пацијената доводи до побољшања клиничког исхода (смањена појава тромбозе стента), без значајног повећања у инциденци крварења [80]. Овакав начин превазилажења резистенције је нарочито користан код високоризичних пацијената [79]. Такође, повећањем дозе се може смањити утицај *CYP2C19* фенотипа CM. Насупрот томе, гојазност је значајан независни предиктор неуспешности оваквог приступа дозирању лека [146].

7.5. Значај осталих клиничких карактеристика и комедикације за фармакокинетику и фармакодинамику клопидогрела

Иако је главни циљ овог истраживања био да се утврди фармакогенетски значај полиморфизама за П-гликопротеин и ензими цитохрома П450, статистичким методама су обрађени и остали подаци везани за пацијенте: опште карактеристике, општи параметри кардиоваскуларног система, укључујући и ехокардиограмски налаз, липидни статус и остале лабораторијске анализе, као и комедикацију. Наиме, неки од ових параметара представљају врло значајне варијабле за фармакокинетику и фармакодинамику клопидогрела.

Године старости су биле независан предиктор концентрације клопидогрела у плазми и тромбоцитне реактивности код пацијената са АКС на терапији клопидогрелом. Процењено је да учествују са око 5% у варијабилности фармакокинетики клопидогрела [45], нешто мање у његовој фармакодинамици [8], што је свакако последица увођења нових варијабли које делују на саме тромбоците и њихову активацију. Свакако најбољи доказ за ову хипотезу представља *SENIOR-PLATELET* студија [96] у којој је, коришћењем две различите методе за евалуацију функције тромбоцита, утврђено да старији од 75 година имају слабији одговор на клопидогрел. Овакав ефекат се може објаснити присуством других фактора, за које је доказано да утичу на фармакокинетику или фармакодинамику клопидогрела, код старих особа: смањена метаболичка функција јетре (пре свега због смањења укупне масе јетре, перфузије, и промена на ендотелу крвних судова јетре, а мањим делом услед смањења активности ензима) [230], смањена функција бубрега и чешћа потреба за гастропротекцијом ИПП.

На основу наших резултата може се закључити да пол има врло сличан предиктивни значај за концентрацију клопидогрела, као и године старости. Наиме, код мушкараца се биле постигнуте више концентрације клопидогрела у поређењу са женама. Постоје бројни докази да се код жена 2-4 пута чешће јавља резистенција на клопидогрел [96,231–235], упркос чињеници да није потврђена повезаност између пола и концентрације активног метаболита [45]. Такође постоје и појединачни резултати да мушкарци имају већу резидуалну активност тромбоцита [235]. Ризик код особа женског пола је скоро два пута већи, али су оне најчешће и старије од мушкараца са АКС, ређе

су пушачи, а чешће болују и од артеријске хипертензије, хроничних бубрежних болести и имају хиперхолестеролемију, што су све фактори повезани са слабијим одговором на клопидогрел. Ипак, и по искључивању ових фактора, женски пол остаје значајан предиктор резистенције. Осим тога, код мушкараца је повећана активност ензима прве фазе (*CYP1A2*) трансформације клопидогрела, што одређује количину клопидогрела која ће се метаболисати у правцу активног метаболита [231]. Међутим, то је највероватније последица различите фармакокинетики клопидогрела, пре свега ресорпције, што потврђује наш резултат. Наиме код жена је смањена желудачна секреција хлороводоничне киселине, успорен транзит садржаја кроз гастроинтестинални тракт и појачана активност П-гликопротеина [236]. Мада код жена је повишена и базална реактивност тромбоцита [237], што је од врло значајног утицаја на крајњи ефекат.

Од три параметра телесне конституције, телесне масе, телесне висине и *BMI*, једино смо утврдили значај телесне висине на концентрацију клопидогрела. Због повећања запремине у којој се лек распоређује, све три, претходно поменуте, независне варијабле су узрок смањене концентрације клопидогрела и његових метаболита у плазми [46]. Осим тога, претпоставља се да је активност ензима цитохром П450 смањена код гојазних особа [227]. У истој *FEATHER* студији је доказана виша резидуална активност тромбоцита код виших и тежих, односно гојазних пацијената [46]. Ова асоцијација је нарочито изражена код болесника са метаболичким синдромом. У складу са тим, у истраживању *Pankert* и сардника [238], инциденца крварења је била виша код пацијената са нормалним *BMI*. Чињеница да се базална реактивност тромбоцита не разликује између гојазних и негојазних [239], потврђује да је резистенција последица утицаја гојазности на фармакокинетику клопидогрела. Међутим, према једном истраживању [235] иницијална разлика између пацијента са ниским, нормалним и високим *BMI*, се губи након 6 месеци континуиране терапије клопидогрелом. Међутим, то има мањи значај, јер највећу предиктивну вредност за клинчки исход има реактивност тромбоцита након месец дана терапије [14].

У нашем истраживању, један од резултата је био да су пацијенти са високим *HDL* имали већу концентрацију 2-оксо-клопидогрела. Једино истраживање у коме је нађен сличан резултат је *PAPI* студија (*Pharmacogeneomics of AntiPlatelet Intervention*) [92] у којој је низак *HDL* предиктор високе резидуалне активности тромбоцита. Уз старост,

BMI и липидни статус објашњавају око 22% варијабилности фармакодинамике клопидогрела.

Добијени резултати показују да на ниво клопидогрела, односно 2-оксо клопидогрела утиче срчана фреквенца и ејекциона фракција леве коморе. Наиме, код пацијената са тахикардијом и смањеном срчаном функцијом измерене су значајно ниже концентрације клопидогрела и интермедијерног метаболита. *Heestermans* и сардници [44] су овакве резултате објаснили смањеном перфузијом у цревима, чиме се смањује ресорпција клопидогрела и његов интестинални метаболизам. Све то је последица компензаторног одговора организма на смањену срчану функцију – активација симпатикуса, тахикардија и преусмеравање крви са периферије. Осим тога, у нашем истраживању, пацијенти са нижом ејекционом фракцијом леве коморе су имали вишу резидуалну активност тромбоцита, као и нешто већи ризик од поновне хоспитализације и потребе за хитном медицинском помоћи. То је у складу са претходним истраживањима која су показала да пацијенти са смањеном срчаном функцијом чешће показују резистенцију на клопидогрел [240,241]. Ови пацијенти имају 1,7 пута већи ризик за појаву кардиоваскуларних догађаја, као што су кардиоваскуларна смрт, АИМ, ургентан *PCI* и ЦВИ, а 2,2 пута већи ризик од кардиоваскуларне смрти [242]. Повезаност између очуваности ејекционе фракције леве коморе и прогнозе болесника са АКС, је логична, с обзиром да се, свакако ради о тежим болесницима. Међутим, у појединим истраживањима снижена ејекциона фракција није била од значаја за фармакодинамски ефекат клопидогрела [205,234].

Креатин киназа има протективно дејство у АИМ, јер инхибира агрегацију тромбоцита индуковану *ADP*-ом, али у комбинацији са антиагрегационим лековима повећава ризик од крварења [243]. Код пацијената са високим вредностима креатин киназе, измерене су ниже концентрације 2-оксо-клопидогрела. С обзиром да њен ниво одражава интензитет оштећења миокарда у АКС [244], може се закључити да је ова повезаност посредна. Као што је већ описано, у АКС долази до прерасподеле крви и смањења перфузије ресорптивне способности танког црева [44], што смањује биорасположивост клопидогрела. Недостатак ове хипотезе је што није утврђена повезаност између нивоа креатин киназе и концентрације клопидогрела.

Од коморбидитета, највећи значај има ДМ, из више разлога. Дијабетес мелитус тип 2 има високу преваленцу међу пацијентима са АКС [8], а преко 50% пацијената са

слабим одговором на клопидогрел болује од ДМ. Разлози су како фармакокинетске, тако и фармакодинамске природе. Са фармакокинетског аспекта, значајне промене код оболелих од ДМ су на нивоу гастроинтестиналног тракта и јетре, чиме се смањује ресорпција и метаболизам клопидогрела. Смањена је активност ензима цитохром П450 [50] што је у складу са нашим резултатом да је ДМ значајан предиктор смањене концентрације 2-оксо-клопидогрела. То је потврђено налазима [50,245] да је концентрација активног метаболита смањена у ДМ за око 40%. С обзиром да нисмо утврдили смањење концентрације клопидогрела, могуће је да ресорпција код оболелих од ДМ није значајно смањена. Према овом истраживању, много већу улогу у резистанцији на клопидогрел има измењена фармакокинетика у поређењу са променама на нивоу тромбоцита. Код дијабетичара постоји убрзано обнављање тромбоцита и стварање реактивнијих тромбоцита, што је у спрези са појачаном агрегацијом тромбоцита. Сви ови параметри су у директној корелацији са нивоом гликозилисаног хемоглобина *A1c* [246]. Тако, висок ниво гликозилисаног хемоглобина, због слабе контроле гликемије, је добар предиктор слабог одговора на клопидогрел [232]. У условима инсулинске резистенције, тромбоцити су резистентни на инсулин, азот оксид и простагландин, али реактивнији на *ADP* и колаген, што доводи до усходне регулације њихове активности. Осим тога, уочено је повећано стварање индуктора агрегације тромбоцита, адреналина и агониста тромбоцинтских рецептора, хиперкоагулабилност и поремећена фибринолиза [232,247–249]. Сама дијагноза ДМ повећава ризик 1,5 пута [50,96,231,234,235,241,247]. Међутим, у појединим истраживањима, повезаност између ДМ и резистенције на клопидогрел није утврђена [97,205,233,240]. Због вишеструких поремећаја у фармакокинезици и фармакодинамици клопидогрела код оболелих од ДМ, замена тикагрелором представља добар терапијски избор [250].

Иако постоји могућност за интеракције између клопидогрела и деривата сулфонилуреа, нисмо утврдили разлике у фармакокинезици клопидогрела код пацијената на терапији лековима из ове групе. Деривати сулфонилуреа су супстрати за П-гликопротеин, и метаболишу се преко ензима који учествују и у метаболизму клопидогрела (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A4*) [251]. Најснажнији инхибитор *CYP2C9* у метаболизму 2-оксо-клопидогрела је глимеприд, а затим и глипизид и гликлазид [252]. Добијени резултати су показали да је резидуална активност тромбоцита мања код пацијената на терапији дериватима сулфонилуреа. Осим што нормализују гликемију, и тиме смањују ниво гликозилисаног хемоглобина (значајне предикторе резистенције на

клопидгорел, као што је већ описано), већ након 4-6 недеља терапије дериватима сулфонилуреа долази до нормализације агрегације тромбоцита. Глимепирид инхибира *COX*, а глибенкламид и *COX* и липооксигеназу и фосфолипазу *A2*, чиме се смањује стварање проагрегационих супстанци. Поред тога, инхибира се гликоген синтетаза, аденил циклаза, и мења секреторна функција тромбоцита [249].

Можда највише испитивана интеракција клопидгорела је са ИПП. Осим што је, методом ПФК анализе, показан утицај комедикације пантопразолом на клиренс клопидогрела, код ових пацијената су измерене и ниже вредности 2-оксо-клопидогрела и забележене су чешће рехоспитализације. Интеракција између пантопразола и клопидогрела се, пре свега, дешава на нивоу метаболизма клопидогрела, инхибицијом *CYP2C19*. Иако се сматра најбезбеднијим ИПП због најмањег инхибиторног ефекта на овај ензим [253], постоје литературни подаци који указују на интеракцију пантопразола са клопидогрелом. Осим тога, постоји и неколико истраживања која потврђују могућност интеракција на нивоу *CYP2C9* [254,255], али би то могло бити уочено тек мерењем концентрације активног метаболита што није рађено у овом истраживању. Иако постоји могућност интеракције на нивоу П-гликопротеина, јер је пантопразол и супстрат и инхибитор овог транспортног протеина [256,257], то би за последицу требало да има повећање биорасположивости клопидогрела, што није уочено у овом истраживању. Присуство полиморфизама са изменом у функцији П-гликопротеина, односно *CYP2C19*, требало би да утиче и на интензитет интеракција [52,159]. Међутим, у оба случаја, смањење концентрације 2-оксо-клопидогрела услед комедикације пантопразолом је било значајно, код пацијената са истим *ABCB1 C3435T* генотипом, односно *CYP2C19* фенотипом. Тако са сигурношћу можемо рећи да интеракција посредована П-гликопротеином није клинички значајна. Међутим, када је деловање преко *CYP2C19* у питању, постоје две могућности – или да интеракција има неки други механизам (не преко *CYP2C19*, можда преко *CYP3A4* [157]) или да и код пацијената са фенотипом ИМ, односно СМ, постоји активност ензима која може додатно бити инхибирана пантопразолом. Овој другој хипотези иде у прилог чињеница да је је активност *CYP2C19* најзначајнија за синтезу 2-оксо-клопидогрела [29]. Међутим, према истраживању Lee и сарадника [258], интеракција између клопидогрела и пантопразола нестаје само код фенотипа *CYP2C19* СМ (што у нашем истраживању није било могуће испитати статистички због малог броја пацијената са оваквим фенотипом), а не и код ИМ. Претходних истраживања која су у складу са нашим резултатима, односно да

комедикација пантопразолом утиче на фармакокинетику или фармакодинамику клопидогрела је мало [108,172,173,258–261]. Као што је у ранијем тексту наведено, или се оповргава значај интеракција са пантопразолом у поређењу са другим лековима из ове групе, или се чак оповргава клинички значај интеракција са било којим ИПП.

ACE-инхибитори се метаболишу уз помоћ естераза, те су наши резултати, да комедикација смањује концентрацију 2-оксо-клопидогрела у плазми, у потпуној супротности од очекиваних на основу претходних сазнања. *In vitro*, комедикација са ACE-инхибиторима повећава стварање активног метаболита услед инхибиције CES1 која инактивише клопидогрел и његове метаболите, а *in vivo* повећава ризик од крварења [262].

Од лекова из групе бета-блокатора, коршћени су бисопролол и карведилол. Смањење концентрације 2-оксо-клопидогрела код болесника на терапији бета-блокаторима се може објаснити инхибицијом ензима цитохром П450. Бисопролол се метаболише преко CYP3A4 и CYP2D6, а карведилол преко CYP1A2, CYP3A4, CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1 и CYP2C9 [263]. У литератури нису нађени подаци о могућој интеракцији, мада уколико постоји, одвија се на нивоу метаболизма клопидогрела.

Утврдили смо да комедикација амлодипином доводи до смањења концентрације клопидогрела у плазми, али не и 2-оксо-клопидогрела. На основу тога можемо закључити да се интеракција између амлодипина и клопидогрела дешава на нивоу апсорпције. Поред инхибиторног дејства на П-гликопротеин [264], долази и до стимулације ефлуksа супстрата овог транспортног протеина. Резултујући ефекат зависи од концентрације амлодипина, тако при мањим дозама доминира стимулаторни ефекат, док се при већим дозама смањује ресорпција супстрата [265]. Иако нисмо утврдили утицај симултане терапије амлодипином на концентрацију 2-оксо-клопидогрела и агрегацију тромбоцита, у литератури постоје подаци о ефекту овог инхибитора калцијумских канала на фармакодинамски ефекат клопидогрела [115,234,266], односно да се ризик од резистенције повећава чак 2,3 пута [267]. Наиме, амлодипин је инхибитор CYP3A4, ензима који учествује у другој фази трансформације клопидогрела [74,263]. У TRITON-TIMI 38 студији, пацијенти на комедикацији блокаторима калцијумских канала су имали већи ризик од кардиоваскуларних догађаја [268]. Ипак, постоје и литературни подаци који су у складу са нашим резултатима, и указују на одсуство повезаности комедикације амлодипином и фармакодинамског ефекта клопидогрела [269,270].

У нашем истраживању дошли смо до резултата да триметазидин смањује концентрацију 2-оксо-клопидогрела у плазми. Међутим, нема података у литератури који би могли објаснити постојање интеракције на фармакокинетском нивоу између овог лека и клопидогрела, нарочито ако се узме у обзир да се триметазидин не метаболише. Једино могуће објашњење је да су пацијенти којима је био прописан триметазидин тежи болесници, те измењено стање њиховог организма доводи до разлике у фармакокинетици клопидогрела.

Ниво аспартат трансаминазе, претходни АИМ и комедикација спиронолактоном и дигоксином су били добри предиктори повећаног ризика од поновне хоспитализације, односно потребе за хитном медицинском помоћи. С обзиром да сви ови параметри указују на пацијенте са озбиљнијим поремећајима на нивоу кардиоваскуларног тракта, а да нисмо утврдили повезаност ових варијабли са фармакокинетиком клопидогрела, може се рећи да је управо стање болесника узрок поновних јављања лекару.

8. ЗАКЉУЧАК

- Учесталост полиморфизама *ABCB1* *C3435T* за П-гликопротеин, као и *CYP2C19**2, *CYP2C19**17 и *CYP2C9**2 код болесника са акутним коронарним синдромом се не разликује значајно од литературних података за дистрибуцију ових алела, и одговарајућих генотипова, у здравој популацији
- Хомозиготи *ABCB1* *3435TT* имају нижу концентрацију клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми, кориговану дозом
- Концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми болесника са акутним коронарним синдромом се не разликује значајно између различитих *CYP2C19* фенотипова, екстензивних метаболизера, ултрабрзих метаболизера и спорих и интермедијерних метаболизера
- Код носилаца *CYP2C9**2 алела, концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми се не разликује значајно од концентрација измерених код носилаца *1*/1 генотипа
- Концентрација клопидогрела у плазми је смањена код старијих болесника, женског пола, веће телесне висине, са већом срчаном фреквенцом, нижом ејекционом фракцијом леве коморе, са комедикацијом бета-блокаторима и амлодипином
- Концентрација 2-оксо-клопидогрела у плазми је смањена код болесника са већом срчаном фреквенцом, нижом ејекционом фракцијом леве коморе, нижом концентрацијом *HDL*, вишим вредностима креатин киназе, оболелих од дијабетес мелитуса типа 2, и комедикацијом *ACE*-инхибиторима, бета-блокаторима, пантопразолом и триметазидином
- Методом популационе фармакокинетске анализе утврђено је да на клиренс клопидогрела утиче ниво аланин аминотрансферазе, дневна доза клопидогрела, телесна маса и комедикација пантопразолом

- Није утврђена статистички значајна веза између измерених концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми болесника са акутним коронарним синдромом, и степена инхибиције агрегације тромбоцита
- Код носилаца испитиваних генских полиморфизама (*ABCB1 C3435T*, *CYP2C19*2*, *CYP2C19*17* и *CYP2C9*2*) није утврђена редукција у фармакодинамском одговору на клопидогрел
- Виша резидуална активност тромбоцита код болесника са акутним коронарним синдромом, на антиагрегационој терапији клопидогрелом, је утврђена код старијих пацијената, са нижом ејекционом фракцијом леве коморе и са комедикацијом дериватима сулфонилуреа
- Није утврђена повезаност између измерених концентрација клопидогрела и 2-оксо-клопидогрела у плазми болесника са акутним коронарним синдромом, и смртности, као и инциденце рехоспитализација и јављања хитној медицинској помоћи
- Пацијенти са акутним коронарним синдромом, на терапији клопидогрелом, са макар једним *ABCB1 3435T* алелом за П-гликопротеин су чешће рехоспитализовани због кардиоваскуларних индикација, током 20 месеци праћења
- Полиморфизам *ABCB1 C3435T* није повезан са већом смртношћу, нити чешћим јављањем хитној медицинској помоћи код болесника са акутним коронарним синдромом на терапији клопидогрелом
- Одређивани полиморфизми за ензиме цитохром П450 нису имали утицаја на клиничког исход (морталитет, рехоспитализација, потреба за хитном медицинском помоћи) код пацијената са акутним коронарним синдромом лечених клопидогрелом
- Чешће рехоспитализације су утврђене код болесника са нижом ејекционом фракцијом, вишим вредностима аспартат аминотрансферазе, и на комедикацији пантопразолом и дигоксином
- Повећана потреба за хитном медицинском помоћи код пацијената са акутним коронарним синдромом је уочена код болесника са нижом ејекционом фракцијом, претходним акутним инфарктом миокарда и на комедикацији спиронолактоном

9. ЛИТЕРАТУРА

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA, Chaitman BA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand J-P, Menasché P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Januzzi JL, Niemenen MS, Gheorghiade M, Filippatos G, Luepker R V, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon J-L, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012;33(20):2551–67.
2. Sangkuhl K, Shuldiner AR, Klein TE, Altman RB, Manuscript A. Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenet Genomics* 2011;21(8):516–21.
3. Ferri N, Corsini A, Bellosa S. Pharmacology of the new P2Y₁₂ receptor inhibitors: insights on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drugs* 2013;73(15):1681–709.
4. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2009;102(2):248–57.
5. Gladding P, Webster M, Ormiston J, Olsen S, White H. Antiplatelet drug nonresponsiveness. *Am Heart J* 2008;155(4):591–9.
6. Coccheri S. Antiplatelet therapy: controversial aspects. *Thromb Res* 2012;129(3):225–9.
7. Wijeyeratne YD, Heptinstall S. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists. *Br J Clin Pharmacol* 2011;72(4):647–57.
8. Jiang X-L, Samant S, Lesko LJ, Schmidt S. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel. *Clin Pharmacokinet* 2015;54(2):147–66.
9. Jennings LK, Kotha J. The Utility of Platelet and Coagulation Testing of Antithrombotics: Fusing Science with Patient Care. *Drug Dev Res* 2013;74(8):587–93.
10. Shin J. Clinical pharmacogenomics of warfarin and clopidogrel. *J Pharm Pract*

- 2012;25(4):428–38.
11. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag* Dove Press; 2015;11:133–48.
 12. Gajda SN, Kołtowski Ł, Tomaniak M. Most Recent Evidence Behind Aggregometry and Genotyping Methods as Platelet Function Testing for Tailored Anti-Platelet Treatment Among PCI Patients. *Adv Clin Exp Med* 2015;24(4):687–93.
 13. Cattaneo M. Response variability to clopidogrel: is tailored treatment, based on laboratory testing, the right solution? *J Thromb Haemost* 2012;10(3):327–36.
 14. Campo G, Parrinello G, Ferraresi P, Lunghi B, Tebaldi M, Miccoli M, Marchesini J, Bernardi F, Ferrari R, Valgimigli M. Prospective evaluation of on-clopidogrel platelet reactivity over time in patients treated with percutaneous coronary intervention relationship with gene polymorphisms and clinical outcome. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(25):2474–83.
 15. Wurtz M, Lerkevang Grove E. Interindividual Variability in the Efficacy of Oral Antiplatelet Drugs: Definitions, Mechanisms and Clinical Importance. *Curr Pharm Des* 2012;18(33):5344–61.
 16. Baigent C, Collins R, Appleby P, Parish S, Sleight P, Peto R. ISIS-2: 10 year survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomised comparison of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither. The ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *BMJ* 1998;316(7141):1337–43.
 17. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996;348(9038):1329–39.
 18. Durand-Zaleski I, Bertrand M. The Value of Clopidogrel versus Aspirin in Reducing Atherothrombotic Events. *Pharmacoeconomics* 2004;22(Supplement 4):19–27.
 19. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Collins R, Liu LS. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005;366(9497):1607–21.
 20. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blömqstrom-Lundqvist C, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW, Valgimigli M, van 't Hof A, Widimsky P, Zahger D. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*

- 2012;33(20):2569–619.
21. Hamm CW, Bassand J-P, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, Caso P, Dudek D, Gielen S, Huber K, Ohman M, Petrie MC, Sonntag F, Uva MS, Storey RF, Wijns W, Zahger D. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2011;32(23):2999–3054.
 22. Holmes M V, Perel P, Shah T, Hingorani AD, Casas JP. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011;306(24):2704–14.
 23. Gomez Y, Adams E, Hoogmartens J. Analysis of purity in 19 drug product tablets containing clopidogrel: 18 copies versus the original brand. *J Pharm Biomed Anal* 2004;34(2):341–8.
 24. Ernest CS, Small DS, Rohatagi S, Salazar DE, Wallentin L, Winters KJ, Wrishko RE. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2008;35(6):593–618.
 25. Jung JA, Kim T-E, Kim J-R, Kim M-J, Huh W, Park K-M, Lee S-Y, Ko J-W. The pharmacokinetics and safety of a fixed-dose combination of acetylsalicylic acid and clopidogrel compared with the concurrent administration of acetylsalicylic acid and clopidogrel in healthy subjects: a randomized, open-label, 2-sequence, 2-period, single-dose crossover study. *Clin Ther* 2013;35(7):985–94.
 26. Mullangi R, Srinivas NR. Clopidogrel: review of bioanalytical methods, pharmacokinetics/pharmacodynamics, and update on recent trends in drug-drug interaction studies. *Biomed Chromatogr* 2009;23(1):26–41.
 27. 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(5):486–501.
 28. Xie H-G, Zou J-J, Hu Z-Y, Zhang J-J, Ye F, Chen S-L. Individual variability in the disposition of and response to clopidogrel: pharmacogenomics and beyond. *Pharmacol Ther* 2011;129(3):267–89.
 29. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug*

- Metab Dispos 2010;38(1):92–9.
30. Giusti B, Abbate R. Response to antiplatelet treatment: from genes to outcome. *Lancet* 2010;376(9749):1278–81.
 31. Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhäuser C, Waldmann C, Schmalz H-G, ten Berg JM, Taubert D. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med* 2011;17(1):110–6.
 32. Ford NF. The Metabolism of Clopidogrel: CYP2C19 is a Minor Pathway. *J Clin Pharmacol* 2016; (*in press*)
 33. Kelly RP, Close SL, Farid NA, Winters KJ, Shen L, Natanegara F, Jakubowski JA, Ho M, Walker JR, Small DS. Pharmacokinetics and pharmacodynamics following maintenance doses of prasugrel and clopidogrel in Chinese carriers of CYP2C19 variants. *Br J Clin Pharmacol* 2012;73(1):93–105.
 34. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot J-S, Mega JL, Roden DM, Klein TE, Sabatine MS, Johnson J a, Shuldiner a R. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther* 2013;94(3):317–23.
 35. Gong IY, Crown N, Suen CM, Schwarz UI, Dresser GK, Knauer MJ, Sugiyama D, DeGorter MK, Woolsey S, Tirona RG, Kim RB. Clarifying the importance of CYP2C19 and PON1 in the mechanism of clopidogrel bioactivation and in vivo antiplatelet response. *Eur Heart J* 2012;33(22):2856–2464a.
 36. Hulot J-S, Collet J-P, Cayla G, Silvain J, Allanic F, Bellemain-Appaix A, Scott S a, Montalescot G. CYP2C19 but not PON1 genetic variants influence clopidogrel pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical efficacy in post-myocardial infarction patients. *Circ Cardiovasc Interv* 2011;4(5):422–8.
 37. Scott SA, Sangkuhl K, Gardner EE, Stein CM, Hulot J-S, Johnson JA, Roden DM, Klein TE, Shuldiner AR. Supplement - Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) Genotype and Clopidogrel Therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2013;1–45.
 38. Karaźniewicz-Łada M, Danielak D, Burchardt P, Kruszyna L, Komosa A, Lesiak M, Głowska F. Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases. *Clin Pharmacokinet* 2014;53(2):155–64.
 39. Hochholzer W, Trenk D, Mega JL, Morath T, Stratz C, Valina CM, O'Donoghue ML, Bernlochner I, Contant CF, Guo J, Sabatine MS, Schömig A, Neumann F-J, Kastrati A, Wiviott SD, Sibbing D. Impact of smoking on antiplatelet effect of clopidogrel and

- prasugrel after loading dose and on maintenance therapy. *Am Heart J* 2011;162(3):518–26.e5.
40. Zhou H, Meng S, Zhao J, Dong J, Xu A, Wang F, Guzalnur T, Xin J, Zhang J, Wang J, Cai W. Influence of genetic and non-genetic factors on the plasma concentrations of the clopidogrel metabolite (SR26334) among Chinese patients. *Clin Chim Acta* 2013;416:50–3.
41. Floyd CN, Passacuale G, Ferro A. Comparative Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Platelet Adenosine Diphosphate Receptor Antagonists and their Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet* 2012;51(7):429–42.
42. Farid NA, Small DS, Payne CD, Jakubowski JA, Brandt JT, Li YG, Ernest CS, Salazar DE, Konkoy CS, Winters KJ. Effect of atorvastatin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel in healthy subjects. *Pharmacotherapy* 2008;28(12):1483–94.
43. Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS, Lachno DR, Salazar D, Winters KJ. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost* 2007;5(12):2429–36.
44. Heestermans AACM, van Werkum JW, Taubert D, Seesing TH, von Beckerath N, Hackeng CM, Schömig E, Verheugt FWA, ten Berg JM. Impaired bioavailability of clopidogrel in patients with a ST-segment elevation myocardial infarction. *Thromb Res* 2008;122(6):776–81.
45. Frelinger AL, Bhatt DL, Lee RD, Mulford DJ, Wu J, Nudurupati S, Nigam A, Lampa M, Brooks JK, Barnard MR, Michelson AD. Clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics vary widely despite exclusion or control of polymorphisms (CYP2C19, ABCB1, PON1), noncompliance, diet, smoking, co-medications (including proton pump inhibitors), and pre-existent variability in platelet function. *J Am Coll Cardiol Journal of the American College of Cardiology*; 2013;61(8):872–9.
46. Jakubowski JA, Angiolillo DJ, Zhou C, Small DS, Moser BA, Ten Berg JM, Brown PB, James S, Winters KJ, Erlinge D. The influence of body size on the pharmacodynamic and pharmacokinetic response to clopidogrel and prasugrel: a retrospective analysis of the FEATHER study. *Thromb Res* 2014;134(3):552–7.
47. Farid NA, Kurihara A, Wrighton SA. Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans. *J Clin Pharmacol* 2010;50(2):126–42.

48. Jiang X-L, Samant S, Lewis JP, Horenstein RB, Shuldiner AR, Yerges-Armstrong LM, Peletier LA, Lesko LJ, Schmidt S. Development of a physiology-directed population pharmacokinetic and pharmacodynamic model for characterizing the impact of genetic and demographic factors on clopidogrel response in healthy adults. *Eur J Pharm Sci* 2016;82:64–78.
49. Gurbel PA, Bliden KP, Logan DK, Kereiakes DJ, Lassetter KC, White A, Angiolillo DJ, Nolin TD, Maa J-F, Bailey WL, Jakubowski JA, Ojeh CK, Jeong Y-H, Tantry US, Baker BA. The influence of smoking status on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel and prasugrel: the PARADOX study. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(6):505–12.
50. Angiolillo DJ, Jakubowski JA, Ferreira JL, Tello-Montoliu A, Rollini F, Franchi F, Ueno M, Darlington A, Desai B, Moser BA, Sugidachi A, Guzman LA, Bass TA. Impaired responsiveness to the platelet P2Y₁₂ receptor antagonist clopidogrel in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2014;64(10):1005–14.
51. Angiolillo DJ, Gibson CM, Cheng S, Ollier C, Nicolas O, Bergougnan L, Perrin L, LaCreta FP, Hurbin F, Dubar M. Differential effects of omeprazole and pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy subjects: randomized, placebo-controlled, crossover comparison studies. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89(1):65–74.
52. Furuta T, Iwaki T, Umemura K. Influences of different proton pump inhibitors on the anti-platelet function of clopidogrel in relation to CYP2C19 genotypes. *Br J Clin Pharmacol* 2010;70(3):383–92.
53. Holmberg MT, Tornio A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Backman JT, Niemi M. Grapefruit juice inhibits the metabolic activation of clopidogrel. *Clin Pharmacol Ther* 2014;95(3):307–13.
54. Frelinger AL, Jakubowski JA, Li Y, Barnard MR, Fox ML, Linden MD, Sugidachi A, Winters KJ, Furman MI, Michelson AD. The active metabolite of prasugrel inhibits ADP-stimulated thrombo-inflammatory markers of platelet activation: Influence of other blood cells, calcium, and aspirin. *Thromb Haemost* 2007;98(1):192–200.
55. Cha J-K, Jeong M-H, Lee K-M, Bae H-R, Lim Y-J, Park KW, Cheon S-M. Changes in Platelet P-Selectin and in Plasma C-Reactive Protein in Acute Atherosclerotic Ischemic Stroke Treated with a Loading Dose of Clopidogrel. *J Thromb Thrombolysis* 2002;14(2):145–50.

56. Klinkhardt U, Bauersachs R, Adams J, Graff J, Lindhoff-Last E, Harder S. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73(3):232–41.
57. Xiao Z, Thérout P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(11):1982–8.
58. Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber A-A. Platelet CD40 ligand (CD40L) – subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 2009;12(2):74–82.
59. Chew DP, Bhatt DL, Robbins MA, Mukherjee D, Roffi M, Schneider JP, Topol EJ, Ellis SG. Effect of Clopidogrel added to aspirin before percutaneous coronary intervention on the risk associated with C-reactive protein. *Am J Cardiol* 2001;88(6):672–4.
60. Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Oyama M, Imatomi R, Uchida T, Noguchi T. Adenosine diphosphate receptor antagonist clopidogrel sulfate attenuates LPS-induced systemic inflammation in a rat model. *Shock* 2011;35(3):289–92.
61. Liu Y, Gao X-M, Fang L, Jennings NL, Su Y, Q X, Samson AL, Kiriazis H, Wang X-F, Shan L, Sturgeon SA, Medcalf RL, Jackson SP, Dart AM, Du X-J. Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(4):834–41.
62. Winning J, Reichel J, Eisenhut Y, Hamacher J, Kohl M, Deigner HP, Claus RA, Bauer M, Lösche W. Anti-platelet drugs and outcome in severe infection: clinical impact and underlying mechanisms. *Platelets* 2009;20(1):50–7.
63. Lee CW, Hwang I, Park C-S, Lee H, Park D-W, Kang S-J, Lee S-W, Kim Y-H, Park S-W, Park S-J. Comparison of differential expression of P2Y₁₂ receptor in culprit coronary plaques in patients with acute myocardial infarction versus stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2011;108(6):799–803.
64. Harada K, Matsumoto Y, Umemura K. Adenosine diphosphate receptor P2Y₁₂-mediated migration of host smooth muscle-like cells and leukocytes in the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 2011;92(2):148–54.
65. Schulz C, Konrad I, Sauer S, Orschielt L, Koellnberger M, Lorenz R, Walter U, Massberg S. Effect of chronic treatment with acetylsalicylic acid and clopidogrel on atheroprogession and atherothrombosis in ApoE-deficient mice in vivo. *Thromb Haemost* 2008;99(1):190–5.

66. Afek A, Kogan E, Maysel-Auslender S, Mor A, Regev E, Rubinstein A, Keren G, George J. Clopidogrel attenuates atheroma formation and induces a stable plaque phenotype in apolipoprotein E knockout mice. *Microvasc Res* 2009;77(3):364–9.
67. Li D, Wang Y, Zhang L, Luo X, Li J, Chen X, Niu H, Wang K, Sun Y, Wang X, Yan Y, Chai W, Gartner TK, Liu J. Roles of purinergic receptor P2Y₁₂, G protein-coupled 12 in the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(8):e81–9.
68. Li M, Zhang Y, Ren H, Zhang Y, Zhu X. Effect of clopidogrel on the inflammatory progression of early atherosclerosis in rabbits model. *Atherosclerosis* 2007;194(2):348–56.
69. Akturk IF, Caglar FN, Erturk M, Tuncer N, Yalcın AA, Surgit O, Uzun F, Caglar IM. Hypertension as a Risk Factor for Aspirin and Clopidogrel Resistance in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Clin Appl Thromb* 2013;20(7):749–54.
70. Lewis JP, Ryan K, O’Connell JR, Horenstein RB, Damcott CM, Gibson Q, Pollin TI, Mitchell BD, Beitelshies AL, Pakzy R, Tanner K, Parsa A, Tantry US, Bliden KP, Post WS, Faraday N, Herzog W, Gong Y, Pepine CJ, Johnson JA, Gurbel PA, Shuldiner AR. Genetic variation in PEAR1 is associated with platelet aggregation and cardiovascular outcomes. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;6(2):184–92.
71. Collet J-P, Cuisset T, Rangé G, Cayla G, Elhadad S, Pouillot C, Henry P, Motreff P, Carrié D, Boueri Z, Belle L, Van Belle E, Rousseau H, Aubry P, Monségu J, Sabouret P, O’Connor SA, Abtan J, Kerneis M, Saint-Etienne C, Barthélémy O, Beygui F, Silvain J, Vicaute E, Montalescot G. Bedside Monitoring to Adjust Antiplatelet Therapy for Coronary Stenting. *NEJM* 2012;367(22):2100–9.
72. Gurbel PA, Erlinge D, Ohman EM, Neely B, Neely M, Goodman SG, Huber K, Chan MY, Cornel JH, Brown E, Zhou C, Jakubowski JA, White HD, Fox KAA, Prabhakaran D, Armstrong PW, Tantry US, Roe MT. Platelet function during extended prasugrel and clopidogrel therapy for patients with ACS treated without revascularization: the TRILOGY ACS platelet function substudy. *JAMA* 2012;308(17):1785–94.
73. Hochholzer W, Valina CM, Bömicke T, Amann M, Stratz C, Nührenberg T, Trenk D, Neumann F-J. Intrinsic platelet reactivity before start with clopidogrel as predictor for on-clopidogrel platelet function and long-term clinical outcome. *Thromb Haemost* 2015;114(1):109–14.
74. Bates ER, Lau WC, Angiolillo DJ. Clopidogrel-drug interactions. *J Am Coll Cardiol* 2011;57(11):1251–63.

75. Fox KAA, Mehta SR, Peters R, Zhao F, Lakkis N, Gersh BJ, Yusuf S. Benefits and risks of the combination of clopidogrel and aspirin in patients undergoing surgical revascularization for non-ST-elevation acute coronary syndrome: the Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events (CURE) Trial. *Circulation* 2004;110(10):1202–8.
76. Berger PB, Bhatt DL, Fuster V, Steg PG, Fox KAA, Shao M, Brennan DM, Hacke W, Montalescot G, Steinhubl SR, Topol EJ. Bleeding complications with dual antiplatelet therapy among patients with stable vascular disease or risk factors for vascular disease: results from the Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance (CHARISMA) Trial. *Circulation* 2010;121(23):2575–83.
77. Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, Tanguay J-F, Angiolillo DJ, Spriggs D, Puri S, Robbins M, Garratt KN, Bertrand OF, Stillabower ME, Stillablower ME, Aragon JR, Kandzari DE, Stinis CT, Lee MS, Manoukian S V, Cannon CP, Schork NJ, Topol EJ. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA* 2011;305(11):1097–105.
78. Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, Antonino MJ, Wei C, Teng R, Rasmussen L, Storey RF, Nielsen T, Eikelboom JW, Sabe-Affaki G, Husted S, Kereiakes DJ, Henderson D, Patel D V, Tantry US. Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation* 2010;121(10):1188–99.
79. Aradi D, Komócsi A, Price MJ, Cuisset T, Ari H, Hazarbasanov D, Trenk D, Sibbing D, Valgimigli M, Bonello L. Efficacy and safety of intensified antiplatelet therapy on the basis of platelet reactivity testing in patients after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* 2013;167(5):2140–8.
80. Bonello L, Camoin-Jau L, Armero S, Com O, Arques S, Burignat-Bonello C, Giacomoni M-P, Bonello R, Collet F, Rossi P, Barragan P, Dignat-George F, Paganelli F. Tailored Clopidogrel Loading Dose According to Platelet Reactivity Monitoring to Prevent Acute and Subacute Stent Thrombosis. *Am J Cardiol* 2009;103(1):5–10.
81. Siller-Matula JM, Francesconi M, Dechant C, Jilma B, Maurer G, Delle-Karth G, Gouya G, Ruzicka K, Podczeck-Schweighofer A, Christ G. Personalized antiplatelet treatment after percutaneous coronary intervention: the MADONNA study. *Int J Cardiol* 2013;167(5):2018–23.

82. Cecchi E, Marcucci R, Chiostrì M, Mecarocci V, Spini V, Innocenti L, Calabretta R, Cordisco A, Romano SM, Abbate R, Gensini GF, Giglioli C. Dual antiplatelet therapy tailored on platelet function test after coronary stent implantation: a real-world experience. *Intern Emerg Med* 2015;10(7):805-14.
83. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker JR, Simon T, Antman EM, Braunwald E, Sabatine MS. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet* 2010;376(9749):1312-9.
84. Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, Husted S, Katus H, Steg PG, Shah SH, Becker RC. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet* 2010;376(9749):1320-8.
85. Mahoney EM, Wang K, Arnold S V, Proskorovsky I, Wiviott S, Antman E, Braunwald E, Cohen DJ. Cost-effectiveness of prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes and planned percutaneous coronary intervention: results from the trial to assess improvement in therapeutic outcomes by optimizing platelet inhibition with Prasugrel. *Circulation* 2010;121(1):71-9.
86. Nikolic E, Janzon M, Hauch O, Wallentin L, Henriksson M. Cost-effectiveness of treating acute coronary syndrome patients with ticagrelor for 12 months: results from the PLATO study. *Eur Heart J* 2013;34(3):220-8.
87. Jeong Y-H, Hwang J-Y, Kim I-S, Park Y, Hwang S-J, Lee S-W, Kwak CH, Park S-W. Adding cilostazol to dual antiplatelet therapy achieves greater platelet inhibition than high maintenance dose clopidogrel in patients with acute myocardial infarction: Results of the adjunctive cilostazol versus high maintenance dose clopidogrel in patie. *Circ Cardiovasc Interv* 2010;3(1):17-26.
88. Giorgi MA, Girolamo G Di, González CD. Nonresponders to clopidogrel: pharmacokinetics and interactions involved. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11(14):2391-403.
89. Mallouk N, Labruyère C, Reny J-L, Chapelle C, Piot M, Fontana P, Gris J-C, Delavenne X, Mismetti P, Laporte S. Prevalence of poor biological response to clopidogrel: a systematic review. *Thromb Haemost* 2012;107(3):494-506.
90. Snoep JD, Hovens MMC, Eikenboom JCJ, van der Bom JG, Jukema JW, Huisman M V. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary

- intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 2007;154(2):221–31.
91. Correll M, Johnson CK, Ferrari G, Brizzio M, Mak AWC, Quackenbush J, Shaw RE, Zapolanski A, Grau JB. Mutational analysis clopidogrel resistance and platelet function in patients scheduled for coronary artery bypass grafting. *Genomics* 2013;101(6):313–7.
92. Shuldiner AR, O’Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, Damcott CM, Pakyz R, Tantry US, Gibson Q, Pollin TI, Post W, Parsa A, Mitchell BD, Faraday N, Herzog W, Gurbel PA. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 2009;302(8):849–57.
93. Kim H, Lee HK, Han K, Jeon H-K. Prevalence and risk factors for aspirin and clopidogrel resistance in patients with coronary artery disease or ischemic cerebrovascular disease. *Ann Clin Lab Sci* 2009;39(3):289–94.
94. Cesari F, Marcucci R, Caporale R, Panicia R, Romano E, Gensini GF, Abbate R, Gori AM. Relationship between high platelet turnover and platelet function in high-risk patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *Thromb Haemost* 2008;99(5):930–5.
95. Freynhofer MK, Gruber SC, Grove EL, Weiss TW, Wojta J, Huber K. Antiplatelet drugs in patients with enhanced platelet turnover: biomarkers versus platelet function testing. *Thromb Haemost* 2015;114(3):459–68.
96. Silvain J, Cayla G, Hulot J-S, Finzi J, Kerneis M, O’Connor SA, Bellemain-Appaix A, Barthélémy O, Beygui F, Collet J-P, Montalescot G. High on-thienopyridine platelet reactivity in elderly coronary patients: the SENIOR-PLATELET study. *Eur Heart J* 2012;33(10):1241–9.
97. Kassimis G, Davlourous P, Xanthopoulou I, Stavrou EF, Athanassiadou A, Alexopoulos D. CYP2C19*2 and other genetic variants affecting platelet response to clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Res* 2012;129(4):441–6.
98. Badimon L, Hernández Vera R, Padró T, Vilahur G. Antithrombotic therapy in obesity. *Thromb Haemost* 2013;110(4):681–8.
99. Gaglia MA, Torguson R, Pakala R, Xue Z, Sardi G, Mahmoudi M, Suddath WO, Kent KM, Satler LF, Pichard AD, Waksman R. Relation of body mass index to on-treatment (clopidogrel + aspirin) platelet reactivity. *Am J Cardiol* 2011;108(6):766–71.

100. Patrono C, Bachmann F, Baigent C, Bode C, De Caterina R, Charbonnier B, Fitzgerald D, Hirsh J, Husted S, Kvasnicka J, Montalescot G, García Rodríguez LA, Verheugt F, Vermylen J, Wallentin L, Priori SG, Alonso Garcia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Fernández Burgos E, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Ferreira R, Steg PG, Teixeira F, Wilcox R. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European society of cardiology. *Eur Heart J* 2004;25(2):166–81.
101. Frishman WH, Horn J. Statin–drug interactions: not a class effect. *Cardiol Rev* 2008;16(4):205–12.
102. Sotiriou CG, Cheng JW. Beneficial Effects of Statins in Coronary Artery Disease—Beyond Lowering Cholesterol. *Ann Pharmacother* 2000;34(12):1432–9.
103. Bhindi R, Ormerod O, Newton J, Banning AP, Testa L. Interaction between statins and clopidogrel: is there anything clinically relevant? *QJM* 2008;101(12):915–25.
104. Wang E, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. HMG-CoA Reductase Inhibitors (Statins) Characterized as Direct Inhibitors of P-Glycoprotein. *Pharm Res* 2001;18(6):800–6.
105. Holtzman CW, Wiggins BS, Spinler SA. Role of P-glycoprotein in Statin Drug Interactions. *Pharmacotherapy* 2006;26(11):1601–7.
106. Sibbing D, Kastrati A. Risk of combining PPIs with thienopyridines: fact or fiction? *Lancet* 2009;374(9694):952–4.
107. Neubauer H, Engelhardt A, Krüger JC, Lask S, Börgel J, Mügge A, Endres HG. Pantoprazole does not influence the antiplatelet effect of clopidogrel—a whole blood aggregometry study after coronary stenting. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;56(1):91–7.
108. Cardoso RN, Benjo AM, DiNicolantonio JJ, Garcia DC, Macedo FYB, El-Hayek G, Nadkarni GN, Gili S, Iannaccone M, Konstantinidis I, Reilly JP. Incidence of cardiovascular events and gastrointestinal bleeding in patients receiving clopidogrel with and without proton pump inhibitors: an updated meta-analysis. *Open Heart* 2015;2(1):e000248.
109. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(8):423–9.
110. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, Altman RB. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* 2011;21(3):152–61.

111. Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin Pharmacokinet* 2015;54(7):709–35.
112. Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54(10):1295–310.
113. Silva R, Vilas-Boas V, Carmo H, Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, de Lourdes Bastos M, Remião F. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 2014;149:1–123.
114. Hitchcock SA. Structural modifications that alter the P-glycoprotein efflux properties of compounds. *J Med Chem* 2012;55(11):4877–95.
115. Harmsze AM, Robijns K, van Werkum JW, Breet NJ, Hackeng CM, Ten Berg JM, Ruven HJT, Klungel OH, de Boer A, Deneer VHM. The use of amlodipine, but not of P-glycoprotein inhibiting calcium channel blockers is associated with clopidogrel poor-response. *Thromb Haemost* 2010;103(5):920–5.
116. Wessler JD, Grip LT, Mendell J, Giugliano RP. The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. *J Am Coll Cardiol* 2013;61(25):2495–502.
117. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(7):3473–8.
118. Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71(4):297–303.
119. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang’a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001;11(3):217–21.
120. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim I-W, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar S V, Gottesman MM. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;315(5811):525–8.
121. Furuno T, Landi M-T, Ceroni M, Caporaso N, Bernucci I, Nappi G, Martignoni E, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Expression polymorphism of the

- blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 2002;12(7):529–34.
122. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 1998;161(10):5733–44.
123. Wang X-Q, Shen C-L, Wang B-N, Huang X-H, Hu Z, Li J. Genetic polymorphisms of CYP2C19 2 and ABCB1 C3435T affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel in 401 patients with acute coronary syndrome. *Gene* 2015;558(2):200–7.
124. Stokanovic D, Nikolic VN, Konstantinovic SS, Zvezdanovic JB, Lilic J, Apostolovic SR, Pavlovic M, Zivkovic VS, Jevtovic-Stoimenov T, Jankovic SM. P-Glycoprotein Polymorphism C3435T Is Associated with Dose-Adjusted Clopidogrel and 2-Oxo-Clopidogrel Concentration. *Pharmacology* 2016;97(3-4):101–6.
125. Braun OÖ, Angiolillo DJ, Ferreira JL, Jakubowski JA, Winters KJ, Effron MB, Duvvuru S, Costigan TM, Sundseth S, Walker JR, Saucedo JF, Kleiman NS, Varenhorst C. Enhanced active metabolite generation and platelet inhibition with prasugrel compared to clopidogrel regardless of genotype in thienopyridine metabolic pathways. *Thromb Haemost* 2013;110(6):1223–31.
126. Sanford JC, Guo Y, Sadee W, Wang D. Regulatory polymorphisms in CYP2C19 affecting hepatic expression. *Drug Metabol Drug Interact* 2013;28(1):23–30.
127. Fricke-Galindo I, Céspedes-Garro C, Rodrigues-Soares F, Naranjo MEG, Delgado Á, de Andrés F, López-López M, Peñas-Lledó E, Llerena A. Interethnic variation of CYP2C19 alleles, “predicted” phenotypes and “measured” metabolic phenotypes across world populations. *Pharmacogenomics J* 2016;16(2):113–23.
128. Johnson SG, Gruntowicz D, Chua T, Morlock RJ. Financial Analysis of CYP2C19 Genotyping in Patients Receiving Dual Antiplatelet Therapy Following Acute Coronary Syndrome and Percutaneous Coronary Intervention. *J Manag Care Spec Pharm* 2015;21(7):552–7.
129. Jiang M, You JHS. Review of pharmacoeconomic evaluation of genotype-guided antiplatelet therapy. *Expert Opin Pharmacother* 2015;16(5):771–9.
130. 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 M-L. The pharmacogenetics and pharmacodynamics of clopidogrel response: an analysis from the PRINC (Plavix Response in Coronary Intervention) trial. *JACC Cardiovasc Interv* 2008;1(6):620–7.

131. Harmsze A, van Werkum JW, Bouman HJ, Ruven HJ, Breet NJ, Ten Berg JM, Hackeng CM, Tjoeng MM, Klungel OH, de Boer A, Deneer VH. Besides CYP2C19*2, the variant allele CYP2C9*3 is associated with higher on-clopidogrel platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy undergoing elective coronary stent implantation. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20(1):18–25.
132. Namazi S, Kojuri J, Khalili A, Azarpira N. The impact of genetic polymorphisms of P2Y12, CYP3A5 and CYP2C19 on clopidogrel response variability in Iranian patients. *Biochem Pharmacol* 2012;83(7):903–8.
133. González A, Moniche F, Cayuela A, García-Lozano JR, Torrecillas F, Escudero-Martínez I, Gonzalez-Marcos JR, Mayol A, Montaner J. Effect of CYP2C19 Polymorphisms on the Platelet Response to Clopidogrel and Influence on the Effect of High Versus Standard Dose Clopidogrel in Carotid Artery Stenting. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2016;51(2):175–86.
134. Sabatine MS, Mega JL. Pharmacogenomics of antiplatelet drugs. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014;2014(1):343–7.
135. Simon T, Bhatt DL, Bergougnan L, Farenc C, Pearson K, Perrin L, Vicaut E, Lacrete F, Hurbin F, Dubar M. Genetic polymorphisms and the impact of a higher clopidogrel dose regimen on active metabolite exposure and antiplatelet response in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90(2):287–95.
136. Kubica A, Kozinski M, Grzesk G, Fabiszak T, Navarese EP, Goch A. Genetic determinants of platelet response to clopidogrel. *J Thromb Thrombolysis* 2011;32(4):459–66.
137. Yin T, Miyata T. Pharmacogenomics of clopidogrel: evidence and perspectives. *Thromb Res* 2011;128(4):307–16.
138. Bauer T, Bouman HJ, Werkum JW Van. Impact of CYP2C19 variant genotypes on clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel : systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2011;343:1–18.
139. Djebli N, Fabre D, Boulenc X, Fabre G, Sultan E, Hurbin F. Physiologically based pharmacokinetic modeling for sequential metabolism: effect of CYP2C19 genetic polymorphism on clopidogrel and clopidogrel active metabolite pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos* 2015;43(4):510–22.
140. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 2009;360(4):354–62.

141. Delaney JT, Ramirez AH, Bowton E, Pulley JM, Basford MA, Schildcrout JS, Shi Y, Zink R, Oetjens M, Xu H, Cleator JH, Jahangir E, Ritchie MD, Masys DR, Roden DM, Crawford DC, Denny JC. Predicting clopidogrel response using DNA samples linked to an electronic health record. *Clin Pharmacol Ther* 2012;91(2):257–63.
142. Harmsze AM, van Werkum JW, Ten Berg JM, Zwart B, Bouman HJ, Breet NJ, van 't Hof AWJ, Ruven HJT, Hackeng CM, Klungel OH, de Boer A, Deneer VHM. CYP2C19*2 and CYP2C9*3 alleles are associated with stent thrombosis: a case-control study. *Eur Heart J* 2010;31(24):3046–53.
143. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrières J, Danchin N, Becquemont L. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009;360(4):363–75.
144. Dai Z, Chen H, Wu X. Relationship between cytochrome P450 2C19*17 genotype distribution, platelet aggregation and bleeding risk in patients with blood stasis syndrome of coronary artery disease treated with clopidogrel. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2012;10(6):647–54.
145. Ahn SG, Yoon J, Kim J, Uh Y, Kim KM, Lee JH, Lee J-W, Youn YJ, Ahn M-S, Kim J-Y, Yoo B-S, Lee S-H, Tahk S-J, Choe K-H. Genotype- and Phenotype-Directed Personalization of Antiplatelet Treatment in Patients with Non-ST Elevation Acute Coronary Syndromes Undergoing Coronary Stenting. *Korean Circ J* 2013;43(8):541–9.
146. Bonello-Palot N, Armero S, Paganelli F, Mancini J, De Labriolle A, Bonello C, Lévy N, Maillard L, Barragan P, Dignat-George F, Camoin-Jau L, Bonello L. Relation of body mass index to high on-treatment platelet reactivity and of failed clopidogrel dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2009;104(11):1511–5.
147. Wada Y, Mitsuda M, Ishihara Y, Watanabe M, Iwasaki M, Asahi S. Important amino acid residues that confer CYP2C19 selective activity to CYP2C9. *J Biochem* 2008;144(3):323–33.
148. Céspedes-Garro C, Fricke-Galindo I, Naranjo MEG, Rodrigues-Soares F, Fariñas H, de Andrés F, López-López M, Peñas-Lledó EM, Llerena A. Worldwide interethnic variability and geographical distribution of CYP2C9 genotypes and phenotypes. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2015;11(12):1893–905.
149. Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 2002;12(3):251–63.

150. Lee CR. CYP2C9 genotype as a predictor of drug disposition in humans. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004;26(6):463–72.
151. Kirchheiner J, Brockmöller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77(1):1–16.
152. Varshney E, Saha N, Tandon M, Shrivastava V, Ali S. Genotype-phenotype correlation of cytochrome P450 2C9 polymorphism in Indian National Capital Region. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2013;38(4):275–82.
153. Varenhorst C, James S, Erlinge D, Brandt JT, Braun OO, Man M, Siegbahn A, Walker J, Wallentin L, Winters KJ, Close SL. Genetic variation of CYP2C19 affects both pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel but not prasugrel in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 2009;30(14):1744–52.
154. Gremmel T, Kopp CW, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Sunder-Plassmann R, Mannhalter C, Steiner S. Differential impact of cytochrome 2C9 allelic variants on clopidogrel-mediated platelet inhibition determined by five different platelet function tests. *Int J Cardiol* 2013;166(1):126–31.
155. Franken CC, Kaiser AFC, Krüger JC, Overbeck K, Mügge A, Neubauer H. Cytochrome P450 2B6 and 2C9 genotype polymorphism--a possible cause of prasugrel low responsiveness. *Thromb Haemost* 2013;110(1):131–40.
156. Brackbill ML, Kidd RS, Abdoo AD, Warner JG, Harralson AF. Frequency of CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, and CYP2C19 variant alleles in patients receiving clopidogrel that experience repeat acute coronary syndrome. *Heart Vessels* 2009;24(2):73–8.
157. D'Ugo E, Rossi S, De Caterina R. Proton pump inhibitors and clopidogrel: an association to avoid? *Intern Emerg Med* 2014;9(1):11–22.
158. Mistry SD, Trivedi HR, Parmar DM, Dalvi PS, Jiyo C. Impact of proton pump inhibitors on efficacy of clopidogrel: Review of evidence. *Indian J Pharmacol* 2011;43(2):183–6.
159. Simon N, Finzi J, Cayla G, Montalescot G, Collet J-P, Hulot J-S. Omeprazole, pantoprazole, and CYP2C19 effects on clopidogrel pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in stable coronary artery disease patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2015;71(9):1059–66.
160. Gawrońska-Szklarz B, Siuda A, Kurzawski M, Bielicki D, Marlicz W, Drożdżik M. Effects of CYP2C19, MDR1, and interleukin 1-B gene variants on the eradication rate of *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with pantoprazole, amoxicillin, and metronidazole. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66(7):681–7.
161. Klotz U, Schwab M, Treiber G. CYP2C19 polymorphism and proton pump inhibitors.

- Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004;95(1):2–8.
162. Fontes-Carvalho R, Albuquerque A, Araújo C, Pimentel-Nunes P, Ribeiro VG. Omeprazole, but not pantoprazole, reduces the antiplatelet effect of clopidogrel: a randomized clinical crossover trial in patients after myocardial infarction evaluating the clopidogrel-PPIs drug interaction. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011;23(5):396–404.
163. Ferreiro JL, Ueno M, Tomasello SD, Capodanno D, Desai B, Dharmashankar K, Seecheran N, Kodali MK, Darlington A, Pham J-P, Tello-Montoliu A, Charlton RK, Bass TA, Angiolillo DJ. Pharmacodynamic evaluation of pantoprazole therapy on clopidogrel effects: results of a prospective, randomized, crossover study. *Circ Cardiovasc Interv* 2011;4(3):273–9.
164. Ogilvie BW, Yerino P, Kazmi F, Buckley DB, Rostami-Hodjegan A, Paris BL, Toren P, Parkinson A. The proton pump inhibitor, omeprazole, but not lansoprazole or pantoprazole, is a metabolism-dependent inhibitor of CYP2C19: implications for coadministration with clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 2011;39(11):2020–33.
165. Harvey A, Modak A, Déry U, Roy M, Rinfret S, Bertrand OF, Larose É, Rodés-Cabau J, Barbeau G, Gleeton O, Nguyen CM, Proulx G, Noël B, Roy L, Paradis J-M, De Larochellière R, Déry J-P. Changes in CYP2C19 enzyme activity evaluated by the [(13)C]-pantoprazole breath test after co-administration of clopidogrel and proton pump inhibitors following percutaneous coronary intervention and correlation to platelet reactivity. *J Breath Res* 2016;10(1):017104.
166. Burkard T, Kaiser CA, Brunner-La Rocca H, Osswald S, Pfisterer ME, Jeger R V. Combined clopidogrel and proton pump inhibitor therapy is associated with higher cardiovascular event rates after percutaneous coronary intervention: a report from the BASKET trial. *J Intern Med* 2012;271(3):257–63.
167. Vaduganathan M, Cannon CP, Cryer BL, Liu Y, Hsieh W-H, Doros G, Cohen M, Lanus A, Schnitzer TJ, Shook TL, Lapuerta P, Goldsmith MA, Laine L, Bhatt DL. Safety of Proton-Pump Inhibitors in High-Risk Cardiovascular Subsets of the COGENT Trial. *Am J Med* 2016;(in press)
168. Huang B, Huang Y, Li Y, Yao H, Jing X, Huang H, Li J. Adverse cardiovascular effects of concomitant use of proton pump inhibitors and clopidogrel in patients with coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Arch Med Res* 2012;43(3):212–24.
169. Agewall S, Cattaneo M, Collet JP, Andreotti F, Lip GYH, Verheugt FWA, Huber K, Grove EL, Morais J, Husted S, Wassmann S, Rosano G, Atar D, Pathak A, Kjeldsen K,

- Storey RF. Expert position paper on the use of proton pump inhibitors in patients with cardiovascular disease and antithrombotic therapy. *Eur Heart J* 2013;34(23):1708–13,1713a–1713b.
170. Siller-Matula JM, Jilma B, Schrör K, Christ G, Huber K. Effect of proton pump inhibitors on clinical outcome in patients treated with clopidogrel: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2010;8(12):2624–41.
171. Guérin A, Mody R, Carter V, Ayas C, Patel H, Lasch K, Wu E. Changes in Practice Patterns of Clopidogrel in Combination with Proton Pump Inhibitors after an FDA Safety Communication. *PLoS One* 2016;11(1):e0145504.
172. Cuisset T, Frere C, Quilici J, Poyet R, Gaborit B, Bali L, Brissy O, Morange P-E, Alessi M-C, Bonnet J-L. Comparison of omeprazole and pantoprazole influence on a high 150-mg clopidogrel maintenance dose the PACA (Proton Pump Inhibitors And Clopidogrel Association) prospective randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(13):1149–53.
173. Parri MS, Gianetti J, Dushpanova A, Della Pina F, Saracini C, Marcucci R, Giusti B, Berti S. Pantoprazole significantly interferes with antiplatelet effect of clopidogrel: results of a pilot randomized trial. *Int J Cardiol* 2013;167(5):2177–81.
174. Milojkovic M, Stojnev S, Jovanovic I, Ljubisavljevic S, Stefanovic V, Sunder-Plassman R. Frequency of the C1236T, G2677T/A and C3435T MDR1 gene polymorphisms in the Serbian population. *Pharmacol Reports* 2011;63(3):808–14.
175. Antman EM, Wiviott SD, Murphy SA, Voitek J, Hasin Y, Widimsky P, Chandna H, Macias W, McCabe CH, Braunwald E. Early and late benefits of prasugrel in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: a TRITON-TIMI 38 (TRial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel-Thrombolys. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(21):2028–33.
176. Udell JA, Braunwald E, Antman EM, Antman EM, Murphy SA, Montalescot G, Wiviott SD. Prasugrel versus clopidogrel in patients with ST-segment elevation myocardial infarction according to timing of percutaneous coronary intervention: a TRITON-TIMI 38 subgroup analysis (Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Plate. *JACC Cardiovasc Interv* 2014;7(6):604–12.
177. Cannon CP, Harrington RA, James S, Ardissino D, Becker RC, Emanuelsson H, Husted S, Katus H, Keltai M, Khurmi NS, Kontny F, Lewis BS, Steg PG, Storey RF, Wojdyla D, Wallentin L. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind

- study. *Lancet* 2010;375(9711):283–93.
178. James S, Angiolillo DJ, Cornel JH, Erlinge D, Husted S, Kontny F, Maya J, Nicolau JC, Spinar J, Storey RF, Stevens SR, Wallentin L. Ticagrelor vs. clopidogrel in patients with acute coronary syndromes and diabetes: a substudy from the PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial. *Eur Heart J* 2010;31(24):3006–16.
179. Ašanin M, Beleslin B, Dobrić M, Đorđević-Dikić A, Jakovljević B, Kovačević V, Lapčević M. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje ishemijske bolesti srca. 1st ed. Beograd: Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije; 2012. 1-54 p.
180. Sabatine MS, McCabe CH, Gibson CM, Cannon CP. Design and rationale of Clopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction (CLARITY-TIMI) 28 trial. *Am Heart J* 2005;149(2):227–33.
181. Wiviott SD, White HD, Ohman EM, Fox KAA, Armstrong PW, Prabhakaran D, Hafley G, Lokhnygina Y, Boden WE, Hamm C, Clemmensen P, Nicolau JC, Menozzi A, Ruzyllo W, Widimsky P, Oto A, Leiva-Pons J, Pavlides G, Winters KJ, Roe MT, Bhatt DL. Prasugrel versus clopidogrel for patients with unstable angina or non-ST-segment elevation myocardial infarction with or without angiography: a secondary, prespecified analysis of the TRILOGY ACS trial. *Lancet* 2013;382(9892):605–13.
182. De Servi S, Goedicke J, Schirmer A, Widimsky P. Clinical outcomes for prasugrel versus clopidogrel in patients with unstable angina or non-ST-elevation myocardial infarction: an analysis from the TRITON-TIMI 38 trial. *Eur Hear journal Acute Cardiovasc care* 2014;3(4):363–72.
183. Bellemain-Appaix A, Kerneis M, O'Connor SA, Silvain J, Cucherat M, Beygui F, Barthélémy O, Collet J-P, Jacq L, Bernasconi F, Montalescot G. Reappraisal of thienopyridine pretreatment in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2014;349(aug06_2):g6269.
184. Polamraju VS, Siddiqua A, Mahammad KR, Sivasubramanian L, Rao V DS. A Pharmacoepidemiological Study Of Ticagrelor & Current Antiplatelet Agents In Acute Coronary Syndrome (ACS) & Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty (PTCA). *J Med Sci Clin Res* 2014;2(6):1454–66.
185. Basra SS, Wang TY, Simon DN, Chiswell K, Virani SS, Alam M, Nambi V, Denktas AE, Deswal A, Ballantyne CM, Peterson ED, Jneid HM. Contemporary Patterns of Use of Antiplatelet Agents in Patients With Acute Myocardial Infarction: Insight From the National Cardiovascular Data Registry (NCDR). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*

- 2016;9(Suppl_2):A138.
186. Sherwood MW, Wiviott SD, Peng SA, Roe MT, Delemos J, Peterson ED, Wang TY. Early clopidogrel versus prasugrel use among contemporary STEMI and NSTEMI patients in the US: insights from the National Cardiovascular Data Registry. *J Am Heart Assoc* 2014;3(2):e000849.
 187. Green A, Pottegård A, Broe A, Diness TG, Emneus M, Hasvold P, Gislason GH. Initiation and persistence with dual antiplatelet therapy after acute myocardial infarction: a Danish nationwide population-based cohort study. *BMJ Open* 2016;6(5):e010880.
 188. Fan W, Plent S, Prats J, Deliargyris EN. Trends in P2Y₁₂ Inhibitor Use in Patients Referred for Invasive Evaluation of Coronary Artery Disease in Contemporary US Practice. *Am J Cardiol* 2016;117(9):1439–43.
 189. Angerås O, Hasvold P, Thuresson M, Deleskog A, ÖBraun O. Treatment pattern of contemporary dual antiplatelet therapies after acute coronary syndrome: a Swedish nationwide population-based cohort study. *Scand Cardiovasc J* 2016;50(2):99–107.
 190. Desai NR, Canestaro WJ, Kyrychenko P, Chaplin D, Martell LA, Brennan T, Matlin OS, Choudhry NK. Impact of CYP2C19 genetic testing on provider prescribing patterns for antiplatelet therapy after acute coronary syndromes and percutaneous coronary intervention. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2013;6(6):694–9.
 191. Elsinghorst PW. Quantitative determination of clopidogrel and its metabolites in biological samples: a mini-review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013;917-918:48–52.
 192. Langaee TY, Zhu H-J, Wang X, El Rouby N, Markowitz JS, Goldstein JA, Johnson JA. The influence of the CYP2C19*10 allele on clopidogrel activation and CYP2C19*2 genotyping. *Pharmacogenet Genomics* 2014;24(8):381–6.
 193. Karaźniewicz-Łada M, Danielak D, Rubiś B, Burchardt P, Komosa A, Lesiak M, Głowska F. Impact of common ABCB1 polymorphism on pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel and its metabolites. *J Clin Pharm Ther* 2015;40(2):226–31.
 194. Joob B, Wiwanitkit V. ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (ABCB1) polymorphism and clopidogrel concentration in acute coronary syndrome: molecular change can explain the observed therapeutic concentration. *Anatol J Cardiol* 2016;16(4):303–4.
 195. Su J, Xu J, Li X, Zhang H, Hu J, Fang R, Chen X. ABCB1 C3435T polymorphism and

- response to clopidogrel treatment in coronary artery disease (CAD) patients: a meta-analysis. *PLoS One* 2012;7(10):e46366.
196. Martis S, Peter I, Hulot J-S, Kornreich R, Desnick RJ, Scott SA. Multi-ethnic distribution of clinically relevant CYP2C genotypes and haplotypes. *Pharmacogenomics J* 2013;13(4):369–77.
197. Zhang J-H, Tang X-F, Zhang Y, Wang J, Yao Y, Ma Y-L, Xu B, Gao R-L, Gao Z, Chen J, Song L, Wu Y, Meng X-M, Yuan J-Q. Relationship between ABCB1 polymorphisms, thromboelastography and risk of bleeding events in clopidogrel-treated patients with ST-elevation myocardial infarction. *Thromb Res* 2014;134(5):970–5.
198. Calderón-Cruz B, Rodríguez-Galván K, Manzo-Francisco LA, Vargas-Alarcón G, Fragoso JM, Peña-Duque MA, Reyes-Gómez CA, Martínez-Ríos MA, De la Peña-Díaz A. C3435T polymorphism of the ABCB1 gene is associated with poor clopidogrel responsiveness in a Mexican population undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Res* 2015;136(5):894–8.
199. Park Y, Jeong Y-H, Tantry US, Ahn JH, Kwon TJ, Park JR, Hwang S-J, Gho E-H, Bliden KP, Kwak CH, Hwang J-Y, Kim S, Gurbel PA. Accelerated platelet inhibition by switching from atorvastatin to a non-CYP3A4-metabolized statin in patients with high platelet reactivity (ACCEL-STATIN) study. *Eur Heart J* 2012;33(17):2151–62.
200. Price MJ, Murray SS, Angiolillo DJ, Lillie E, Smith EN, Tisch RL, Schork NJ, Teirstein PS, Topol EJ. Influence of genetic polymorphisms on the effect of high- and standard-dose clopidogrel after percutaneous coronary intervention: the GIFT (Genotype Information and Functional Testing) study. *J Am Coll Cardiol* 2012;59(22):1928–37.
201. Wang Q, Jin Y-Z, Zhou S-B, Wang L-J, Lei M-M, Wang Y, Miao C. ABCB1 C3435T polymorphism and the risk of ischemic heart disease: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014;18(9):636–45.
202. Tang X-F, Wang J, Zhang J-H, Meng X-M, Xu B, Qiao S-B, Wu Y-J, Chen J, Wu Y, Chen J-L, Gao R-L, Yuan J-Q, Yang Y-J. Effect of the CYP2C19 2 and 3 genotypes, ABCB1 C3435T and PON1 Q192R alleles on the pharmacodynamics and adverse clinical events of clopidogrel in Chinese people after percutaneous coronary intervention. *Eur J Clin Pharmacol* 2013;69(5):1103–12.
203. Jaitner J, Morath T, Byrne RA, Braun S, Gebhard D, Bernlochner I, Schulz S, Mehilli J, Schömig A, Koch W, Kastrati A, Sibbing D. No association of ABCB1 C3435T genotype with clopidogrel response or risk of stent thrombosis in patients undergoing coronary stenting. *Circ Cardiovasc Interv* 2012;5(1):82–8, S1–2.

204. Siller-Matula JM, Lang IM, Neunteufl T, Kozinski M, Maurer G, Linkowska K, Grzybowski T, Kubica J, Jilma B. Interplay between genetic and clinical variables affecting platelet reactivity and cardiac adverse events in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *PLoS One* 2014;9(7):e102701.
205. Chen D-Y, Wang C-Y, Wen M-S, Lee T-H, Chu Y, Hsieh M-J, Chang S-H, Lee C-H, Wang J-L, Chen C-C, Lu L-S, Lee M-T, Yeh S-J, Lin F-C, Hsieh I-C. Paraoxonase-1 is not a major determinant of stent thrombosis in a Taiwanese population. *PLoS One* 2012;7(6):e39178.
206. Shalia KK, Shah VK, Pawar P, Divekar SS, Payannavar S. Polymorphisms of MDR1, CYP2C19 and P2Y12 genes in Indian population: effects on clopidogrel response. *Indian Heart J* 2013;65(2):158–67.
207. Holmes DR, Dehmer GJ, Kaul S, Leifer D, O’Gara PT, Stein CM. ACCF/AHA clopidogrel clinical alert: approaches to the FDA “boxed warning”: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on clinical expert consensus documents and the American Heart Association endorsed by the Society for Cardiova. *J Am Coll Cardiol* 2010;56(4):321–41.
208. Choi IJ, Chang M, Kim JJ, Lim S, Kang M, Hwang B-H, Moon D, Kim JG, Choo E ho, Kim T-H, Koh YS, Kim CJ, Kim PJ, Chang K, Chung WS, Seung K-B. CYP2C19 loss-of-function alleles are not associated with vlinival outcome of clopidogrel therapy in patients treated with newer-gneration drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 2013;61(10):E1161.
209. Paré G, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, Hirsh J, Simonsen K, Bhatt DL, Fox KAA, Eikelboom JW. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med* 2010;363(18):1704–14.
210. Zhang WD, Ji FS. Observational Studies of Bleeding and Thrombotic Events in Acute Coronary Syndrome Patients Between Different Metabolizer of Clopidogrel. *J Am Coll Cardiol* 2014;63(12):S9–10.
211. Steere B, Baker JAR, Hall SD, Guo Y. Prediction of in vivo clearance and associated variability of CYP2C19 substrates by genotypes in populations utilizing a pharmacogenetics-based mechanistic model. *Drug Metab Dispos* 2015;43(6):870–83.
212. Park M-W, Her SH, Kim H-S, Choi Y-S, Park C-S, Koh Y-S, Park H-J, Kim P-J, Kim CJ, Jeon DS, Shin D Il, Seo SM, Yoo K-D, Kim D Bin, Kim HY, Lee JM, Chung W-S, Seung K-B, Shin J-G, Chang K. Impact of the CYP2C19*17 polymorphism on the clinical outcome of clopidogrel therapy in Asian patients undergoing percutaneous

- coronary intervention. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23(10):558–62.
213. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med* 2011;364(12):1144–53.
214. Elnakish MT, Hassanain HH, Janssen PM, Angelos MG, Khan M. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase. *J Pathol* 2013;231(3):290–300.
215. Pedersen RS, Brasch-Andersen C, Sim SC, Bergmann TK, Halling J, Petersen MS, Weihe P, Edvardsen H, Kristensen VN, Brøsen K, Ingelman-Sundberg M. Linkage disequilibrium between the CYP2C19*17 allele and wildtype CYP2C8 and CYP2C9 alleles: identification of CYP2C haplotypes in healthy Nordic populations. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66(12):1199–205.
216. Krötz F, Riexinger T, Buerkle MA, Nithipatikom K, Gloe T, Sohn H-Y, Campbell WB, Pohl U. Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(3):595–600.
217. Larsen BT, Campbell WB, Gutterman DD. Beyond vasodilatation: non-vasomotor roles of epoxyeicosatrienoic acids in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28(1):32–8.
218. Tacconelli S, Patrignani P. Inside epoxyeicosatrienoic acids and cardiovascular disease. *Front Pharmacol Frontiers* 2014;5:239.
219. Sudhahar V, Shaw S, Imig JD. Epoxyeicosatrienoic acid analogs and vascular function. *Curr Med Chem* 2010;17(12):1181–90.
220. Vattipali M, Devender K, Yellu NR. Population pharmacokinetics of oral clopidogrel in South Indian cardiovascular patients using NONMEM. *International Journal of Pharmacy and Biological Science* 2014;375(9711):50–9.
221. Yousef AM, Melhem M, Xue B, Arafat T, Reynolds DK, Van Wart SA. Population pharmacokinetic analysis of clopidogrel in healthy Jordanian subjects with emphasis optimal sampling strategy. *Biopharm Drug Dispos* 2013;34(4):215–26.
222. Lee J, Hwang Y, Kang W, Seong SJ, Lim M-S, Lee HW, Yim D-S, Sohn DR, Han S, Yoon Y-R. Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of clopidogrel in Korean healthy volunteers and stroke patients. *J Clin Pharmacol* 2012;52(7):985–95.
223. Xie C, Ding X-L, Xue L, Jiang B, Hang Y-F, Gao J, Miao L-Y. [Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel in patients with acute coronary syndrome]. *Yao Xue Xue Bao* 2014;49(10):1426–32.
224. Naschitz JE, Slobodin G, Lewis RJ, Zuckerman E, Yeshurun D. Heart diseases affecting

- the liver and liver diseases affecting the heart. *Am Heart J* 2000;140(1):111–20.
225. Součková L, Opatřilová R, Suk P, Čundrle I, Pavlík M, Zvoníček V, Hlinomaz O, Šrámek V. Impaired bioavailability and antiplatelet effect of high-dose clopidogrel in patients after cardiopulmonary resuscitation (CPR). *Eur J Clin Pharmacol* 2013;69(3):309–17.
226. Ohbuchi M, Noguchi K, Kawamura A, Usui T. Different effects of proton pump inhibitors and famotidine on the clopidogrel metabolic activation by recombinant CYP2B6, CYP2C19 and CYP3A4. *Xenobiotica* 2012;42(7):633–40.
227. Brill MJE, Diepstraten J, van Rongen A, van Kralingen S, van den Anker JN, Knibbe CAJ. Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adults and children. *Clin Pharmacokinet* 2012;51(5):277–304.
228. Nagashima S, Yagyu H, Takahashi N, Kurashina T, Takahashi M, Tsuchita T, Tazoe F, Wang XL, Bayasgalan T, Sato N, Okada K, Nagasaka S, Gotoh T, Kojima M, Hyodo M, Horie H, Hosoya Y, Okada M, Yasuda Y, Fujiwara H, Ohwada M, Iwamoto S, Suzuki M, Nagai H, Ishibashi S. Depot-specific expression of lipolytic genes in human adipose tissues--association among CES1 expression, triglyceride lipase activity and adiposity. *J Atheroscler Thromb* 2011;18(3):190–9.
229. von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G, Schömig E, Kastrati A, Schömig A. Absorption, metabolization, and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effect). *Circulation* 2005;112(19):2946–50.
230. Polasek TM, Patel F, Jensen BP, Sorich MJ, Wiese MD, Doogue MP. Predicted metabolic drug clearance with increasing adult age. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75(4):1019–28.
231. Park KW, Park JJ, Jeon K-H, Kang S-H, Oh I-Y, Yang H-M, Cho H-J, Lee H-Y, Kang H-J, Koo B-K, Oh B-H, Park Y-B, Kim H-S. Clinical predictors of high posttreatment platelet reactivity to clopidogrel in Koreans. *Cardiovasc Ther* 2012;30(1):5–11.
232. Hou X-M, Han W-Z, Qiu X-B, Fang W-Y. Clinical characteristics associated with high on-treatment platelet reactivity of patients undergoing PCI after a 300 mg loading dose of clopidogrel, measured by thrombelastography. *Heart Asia* 2013;5(1):66–9.
233. Al-Azzam SI, Alzoubi KH, Khabour OF, Nusair MB, Al-Hadidi H, Awidi A, Saleh A. Factors that contribute to clopidogrel resistance in cardiovascular disease patients: environmental and genetic approach. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2013;51(3):179–86.

234. Bouman HJ, Harmsze AM, van Werkum JW, Breet NJ, Bergmeijer TO, Ten Cate H, Hackeng CM, Deneer VHM, Ten Berg JM. Variability in on-treatment platelet reactivity explained by CYP2C19*2 genotype is modest in clopidogrel pretreated patients undergoing coronary stenting. *Heart* 2011;97(15):1239–44.
235. Haberka M, Mizia-Stec K, Lasota B, Kyrz-Krzemień S, Gąsior Z. Obesity and antiplatelet effects of acetylsalicylic acid and clopidogrel in patients with stable angina pectoris after percutaneous coronary intervention. *Pol Arch Med Wewnętrznej* 2015;125(9):620–30.
236. Stolarz AJ, Rusch NJ. Gender Differences in Cardiovascular Drugs. *Cardiovasc Drugs Ther* 2015;29(4):403–10.
237. Koltai K, Papp J, Kenyeres P, Feher G, Tibold A, Alexy T, Marton Z, Kesmarky G, Toth K. Gender differences in hemorheological parameters and in in vitro platelet aggregation in acetylsalicylic acid and clopidogrel treated vascular patients. *Biorheology* 2014;51(2-3):197–206.
238. Pankert M, Quilici J, Loundou AD, Verdier V, Lambert M, Deharo P, Bonnet G, Gaborit B, Morange PE, Valéro R, Dutour A, Bonnet J-L, Alessi M-C, Cuisset T. Impact of obesity and the metabolic syndrome on response to clopidogrel or prasugrel and bleeding risk in patients treated after coronary stenting. *Am J Cardiol* 2014;113(1):54–9.
239. Darlington A, Tello-Montoliu A, Rollini F, Ueno M, Ferreira JL, Patel R, Desai B, Guzman LA, Bass TA, Angiolillo DJ. Pharmacodynamic effects of standard dose prasugrel versus high dose clopidogrel in non-diabetic obese patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2014;111(2):258–65.
240. Fong J, Cheng-Ching E, Hussain MS, Katzan I, Gupta R. Predictors of biochemical aspirin and clopidogrel resistance in patients with ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2011;20(3):227–30.
241. 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(1):54–61.
242. Valenti R, Marcucci R, Capodanno D, De Luca G, Migliorini A, Gori AM, Parodi G, Giusti B, Carrabba N, Panicia R, Cantini G, Marrani M, Gensini GF, Abbate R, Antoniucci D. Residual platelet reactivity to predict long-term clinical outcomes after clopidogrel loading in patients with acute coronary syndromes: comparison of different cutoff values by light transmission aggregometry from the responsiveness to clopidogrel

- and st. *J Thromb Thrombolysis* 2015;40(1):76–82.
243. Horjus DL, Nieuwland R, Boateng KB, Schaap MCL, van Montfrans GA, Clark JF, Sturk A, Brewster LM. Creatine kinase inhibits ADP-induced platelet aggregation. *Sci Rep* 2014;4:6551.
244. Rakowski T, Dziewierz A, Legutko J, Kleczynski P, Brzozowska-Czarnek A, Siudak Z, Urbanik A, Dubiel JS, Dudek D. Creatine kinase-MB assessed in patients with acute myocardial infarction correlates with cardiac magnetic resonance infarct size at 6-month follow up. *Hell J Cardiol* 2014; 55(1):4–8.
245. Erlinge D, Varenhorst C, Braun OO, James S, Winters KJ, Jakubowski JA, Brandt JT, Sugidachi A, Siegbahn A, Wallentin L. Patients with poor responsiveness to thienopyridine treatment or with diabetes have lower levels of circulating active metabolite, but their platelets respond normally to active metabolite added ex vivo. *J Am Coll Cardiol* 2008;52(24):1968–77.
246. Neergaard-Petersen S, Hvas A-M, Grove EL, Larsen SB, Gregersen S, Kristensen SD. The Influence of Haemoglobin A1c Levels on Platelet Aggregation and Platelet Turnover in Patients with Coronary Artery Disease Treated with Aspirin. *PLoS One* 2015;10(7):e0132629.
247. Mangiacapra F, Patti G, Peace A, Gatto L, Vizzi V, Ricottini E, D'Ambrosio A, Muller O, Barbato E, Di Sciascio G. Comparison of platelet reactivity and periprocedural outcomes in patients with versus without diabetes mellitus and treated with clopidogrel and percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2010;106(5):619–23.
248. Hall HM, Banerjee S, McGuire DK. Variability of clopidogrel response in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Vasc Dis Res* 2011;8(4):245–53.
249. Papazafiropoulou A, Papanas N, Pappas S, Maltezos E, Mikhailidis DP. Effects of oral hypoglycemic agents on platelet function. *J Diabetes Complications* 2015;29(6):846–51.
250. Muldowney JAS, Bengt CD. Combination therapy with clopidogrel and proton-pump inhibitors. *Lancet* 2010;375(9708):27–8.
251. Tornio A, Niemi M, Neuvonen PJ, Backman JT. Drug interactions with oral antidiabetic agents: pharmacokinetic mechanisms and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33(6):312–22.
252. Shao H, Lu J, Xu Y-T, Zhan Y, Chen G-M, Zhang H-J. Metabolic Interaction Potential between Clopidogrel and Sulfonylurea Antidiabetic Agents: Effects on Clopidogrel Bioactivation. *Pharmacology* 2016;97(1-2):18–24.

253. Zvyaga T, Chang S-Y, Chen C, Yang Z, Vuppugalla R, Hurley J, Thorndike D, Wagner A, Chimalakonda A, Rodrigues AD. Evaluation of six proton pump inhibitors as inhibitors of various human cytochromes P450: focus on cytochrome P450 2C19. *Drug Metab Dispos* 2012;40(9):1698–711.
254. Shi R, Li J, Cao X, Zhu X, Lu X. Exploration of the binding of proton pump inhibitors to human P450 2C9 based on docking and molecular dynamics simulation. *J Mol Model* 2011;17(8):1941–51.
255. Li X-Q. Comparison of inhibitory effects of the proton-pump inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* 2004;32(8):821–7.
256. Breedveld P, Pluim D, Cipriani G, Wielinga P, van Tellingen O, Schinkel AH, Schellens JHM. The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in pat. *Cancer Res* 2005;65(7):2577–82.
257. Pauli-Magnus C, Rekersbrink S, Klotz U, Fromm MF. Interaction of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole with P-glycoprotein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2014;364(6):551–7.
258. Lee J-K, Wu C-K, Juang J-M, Tsai C-T, Hwang J-J, Lin J-L, Chiang F-T. Non-Carriers of Reduced-Function CYP2C19 Alleles are Most Susceptible to Impairment of the Anti-Platelet Effect of Clopidogrel by Proton-Pump Inhibitors: A Pilot Study. *Zhonghua Minguo xin zang xue hui za zhi* 2016;32(2):215–22.
259. Tran M, Tafreshi J, Pai RG. Review article: combination of clopidogrel and proton pump inhibitors: implications for clinicians. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2010;15(4):326–37.
260. Kwok CS, Jeevanantham V, Dawn B, Loke YK. No consistent evidence of differential cardiovascular risk amongst proton-pump inhibitors when used with clopidogrel: meta-analysis. *Int J Cardiol* 2013;167(3):965–74.
261. Karlsson E, Holm M, van der Linden JA. The in vitro effects of pantoprazole on platelet aggregation in blood samples from clopidogrel and aspirin treated patients. *J Cardiovasc Pharmacol* 2016;(in press)
262. Kristensen KE, Zhu H-J, Wang X, Gislason GH, Torp-Pedersen C, Rasmussen HB, Markowitz JS, Hansen PR. Clopidogrel bioactivation and risk of bleeding in patients cotreated with angiotensin-converting enzyme inhibitors after myocardial infarction: a proof-of-concept study. *Clin Pharmacol Ther* 2014;96(6):713–22.

263. Zisaki A, Miskovic L, Hatzimanikatis V. Antihypertensive Drugs Metabolism: An Update to Pharmacokinetic Profiles and Computational Approaches. *Curr Pharm Des* 2014;21(6):806–22.
264. Katoh M, Nakajima M, Yamazaki H, Yokoi T. Inhibitory Potencies of 1,4-dihydropyridine Calcium Antagonists to P-glycoprotein-Mediated Transport: Comparison with the Effects on CYP3A4. *Pharm Res* 2000;17(10):1189–97.
265. Darvari R, Boroujerdi M. Concentration dependency of modulatory effect of amlodipine on P-glycoprotein efflux activity of doxorubicin--a comparison with tamoxifen. *J Pharm Pharmacol* 2004;56(8):985–91.
266. Park KW, Kang J, Park JJ, Yang H-M, Lee H-Y, Kang H-J, Koo B-K, Oh B-H, Park Y-B, Kim H-S. Amlodipine, clopidogrel and CYP3A5 genetic variability: effects on platelet reactivity and clinical outcomes after percutaneous coronary intervention. *Heart* 2012;98(18):1366–72.
267. Wang Z-Y, Chen M, Zhu L-L, Yu L-S, Zeng S, Xiang M-X, Zhou Q. Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: updated review and risk management in combination therapy. *Ther Clin Risk Manag* 2015;11:449–67.
268. Ojeifo O, Wiviott SD, Antman EM, Murphy SA, Udell JA, Bates ER, Mega JL, Sabatine MS, O'Donoghue ML. Concomitant administration of clopidogrel with statins or calcium-channel blockers: insights from the TRITON-TIMI 38 (trial to assess improvement in therapeutic outcomes by optimizing platelet inhibition with prasugrel-thrombolysis in myocardial infarction). *JACC Cardiovasc Interv* 2013;6(12):1275–81.
269. Li AYW, Ng F-H, Chan FKL, Tunggai P, Chan K, Lau Y-K. Effect of amlodipine on platelet inhibition by clopidogrel in patients with ischaemic heart disease: a randomised, controlled trial. *Heart* 2013;99(7):468–73.
270. Sarafoff N, Neumann L, Morath T, Bernlochner I, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A, Sibbing D. Lack of impact of calcium-channel blockers on the pharmacodynamic effect and the clinical efficacy of clopidogrel after drug-eluting stenting. *Am Heart J* 2011;161(3):605–10.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Драгана Стокановић је рођена 5. маја 1980. године у Нишу, где је са одличним успехом завршила основну школу и Гимназију „Бора Станковић“. Студије медицине на Медицинском факултету у Нишу уписала је 1999. године, а дипломирала 2006. године са просечном оценом 9,61. Одмах након дипломирања, школске 2006/2007. године, уписала је Докторске академске студије – смер молекуларна медицина на Медицинском факултету у Нишу. Најпре као сарадник у настави на Катедри за фармакологију и токсикологију, 2008. године заснива радни однос на Медицинском факултету у Нишу, а две године касније, 2010. године је бирана у асистента на истој Катедри. Специјалистички испит из Клиничке фармакологије, положила је са одличним успехом 2014. године.

Интересовање за научно-истраживачки рад је показала у средњој школи, са чиме наставља и током студија објављивањем више студентских радова. Током професионалне каријере објавила је укупно 13 радова, од тога 6 на *SCI* листи (2 ауторска и 4 коауторска). Један је од аутора уџбеника за студенте, који се користи у настави из Фармакологије са токсикологијом.

Говори енглески и шпански језик, а служи се и француским и италијанским језиком. Одлично познаје рад на рачунару.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**УТИЦАЈ ГЕНСКЕ ВАРИЈАБИЛНОСТИ П-ГЛИКОПРОТЕИНА И
ЦИТОХРОМА П450 НА ФАРМАКОКИНЕТИКУ КЛОПИДОГРЕЛА КОД
БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 9.6.2016.

Потпис аутора дисертације:



Др Драгана С. Стокановић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**УТИЦАЈ ГЕНСКЕ ВАРИЈАБИЛНОСТИ П-ГЛИКОПРОТЕИНА И
ЦИТОХРОМА P450 НА ФАРМАКОКИНЕТИКУ КЛОПИДОГРЕЛА КОД
БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 9.6.2016.

Потпис аутора дисертације:



Др Драгана С. Стокановић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

УТИЦАЈ ГЕНСКЕ ВАРИЈАБИЛНОСТИ П-ГЛИКОПРОТЕИНА И ЦИТОХРОМА P450 НА ФАРМАКОКИНЕТИКУ КЛОПИДОГРЕЛА КОД БОЛЕСНИКА СА АКУТНИМ КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 9.6.2016.

Потпис аутора дисертације:


Др Драгана С. Стокановић