

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Dragana T. Bačković

**UTICAJ *CYP2C19*\*2 VARIJANTE GENA NA  
TERAPIJSKI ODGOVOR U TOKU PRIMENE  
KLOPIDOGRELA KOD BOLESNIKA SA  
STENOZOM KAROTIDNIH ARTERIJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Dragana T. Bačković

**INFLUENCE OF *CYP2C19*\*2 GENE VARIANT  
ON THERAPEUTIC RESPONSE DURING  
CLOPIDOGREL TREATMENT IN PATIENTS  
WITH CAROTID ARTERY STENOSIS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017.

## Članovi komisije:

\_\_\_\_\_  
Dr Svetlana Ignjatović, mentor  
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

\_\_\_\_\_  
Dr Mirjana Kovač  
naučni saradnik, Institut za transfuziju krvi, Beograd

\_\_\_\_\_  
Dr Dragoslav Nenezić  
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

\_\_\_\_\_  
Dr Ljiljana Rakićević  
viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

Kandidat:  
Dragana Bačković  
Farmaceutski fakultet  
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

# Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija nije rezultat samo mog rada.*

*Prvo, bih želela da zahvalim svom mentoru prof. dr Svetlani Ignjatović na ogromnom znanju i iskustvu koje mi je nesebično prenosila tokom svih godina naše saradnje. Zahvaljujem na strpljenju i pomoći u svim fazama izrade i pisanja doktorske disertacije, dragocnim savetima i slobodi u radu koju sam imala.*

*Posebnu zahvalnost upućujem prof. dr Nadi Majkić-Singh na mentorstvu tokom i nakon redovnih studija i na bezuslovnoj podršci mojoj profesionalnoj karijeri.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Mirjani Kovač, koja je imala ključnu ulogu u definisanju teme, planiranju istraživanja i izradi doktorske disertacije. Ukazala mi je poverenje, podelila sa mnom svoju ideju i verovala u mene, kao i u to da će rezultati ovog projekta ugledati svetlost dana. Uloga dr Mirjane Kovač u ovom radu od neprocenjive je važnosti. Dugujem joj neizmernu zahvalnost za sve što me je naučila, za bezgraničnu pomoć, strpljenje, za duge i smislene diskusije, ohrabrenja i vreme koje mi je posvetila tokom izrade i pisanja doktorske disertacije. Takođe, njena nepresušna energija stimulisala me je da istrajem i na pravi način završim ovaj rad. Posebno sam joj zahvalna na podršci i prijateljskim savetima u trenucima kada je to bilo najpotrebnije mojoj porodici.*

*Ovo istraživanje ne bi bilo moguće bez uspešne saradnje sa akademikom prof. dr Đorđem Radakom, pa mu ovom prilikom zahvaljujem na ukazanom poverenju, na volji i strpljenju da mi pomogne u savladavanju kliničkih aspekata disertacije. Posebno zahvaljujem na sugestijama i pomoći u svim fazama eksperimentalnog rada i tokom publikovanja rezultata istraživanja.*

*Zahvaljujem celokupnom kolektivu Službe za transfuziju krvi Instituta za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“ na ukazanom gostoprimstvu i izuzetnoj saradnji.*

*Duboku zahvalnost dugujem dr Branku Čaliji na dugogodišnjoj saradnji, nesebičnoj podršci i ogromnom znanju koje je podelio sa mnom. Zahvaljujući svom velikom iskustvu, dr Branko Čalija je svojim korisnim komentarima i sugestijama učestvovao u kreiranju projekta i realizaciji istraživanja i pomogao da ova disertacija bude kvalitetnija i sveobuhvatnija.*

*Veliko hvala upućujem dr Evgeniji Strugarević na odabiru bolesnika i prikupljenim uzorcima i podacima. Bez njene pomoći kako u eksperimentalnom radu, tako i u rešavanju brojnih problema na koje smo nailazili, ne bih uspela da završim ovu disertaciju.*

*Izuzetnu zahvalnost dugujem dr Dragici Radojković i njenim kolegama na Intitutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo na pruženoj mogućnosti da deo eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije odradim u njihovoj laboratoriji. Posebnu zahvalnost upućujem dr Ljiljani Rakićević na razumevanju, dragocenoj pomoći i sugestijama tokom sprovođenja istraživanja, sumiranja rezultata, publikovanja rezultata istraživanja i izradi ove disertacije, kao i na rečima podrške i ohrabrenja koje su mi puno značile. Time je i njen doprinos ovom radu neprocenjiv.*

*Iskrenu zahvalnost upućujem i prof. dr Dragoslavu Neneziću, što je prihvatio da učestvuje u izradi ove disertacije kao član komisije. Njegove sugestije i korekcije bile su mi od velike pomoći, kao i diskusije o primeni dobijenih rezultata u disertaciji u svakodnevnom radu vaskularnih hirurga.*

*Zahvalnost dugujem i Tamari Bačković, koja je lektorskim i korektorskim intervencijama doprinela kvalitetu disertacije.*

*I na kraju, želim da zahvalim svojim roditeljima na bezuslovnoj ljubavi koju su mi pružali svih ovih godina i na tome što su me uvek pratili u mojim odlukama i mojim snovima.*

*Nedostaju mi reči kojima bih zahvalila svojoj porodici – suprugu Nikoli i deci Dušanu i Mariji. Sve što bih napisala umanjilo bi njihovu ulogu u mom životu.*

# UTICAJ *CYP2C19*\*2 VARIJANTE GENA NA TERAPIJSKI ODGOVOR U TOKU PRIMENE KLOPIDOGRELA KOD BOLESNIKA SA STENOZOM KAROTIDNIH ARTERIJA

## *Rezime*

Aterosklerotske promene karotidnih arterija su najčešći uzrok moždane ishemije. Karotidna endarterektomija (KE) predstavlja efektivan tretman stenozе karotidnih arterija i danas je najčešći operativni zahvat za prevenciju moždanog udara. Još uvek se kod 2%-5% bolesnika razvija tromboza karotidnih arterija u perioperativnom periodu i dvojna antitrombocitna terapija (aspirin i klopidogrel) značajno smanjuje rizik od razvoja moždanog udara posle KE. Međutim, i pored dokazane kliničke efikasnosti ovih lekova, značajan broj bolesnika nema dobar terapijski odgovor na aspirin i/ili klopidogrel. U literaturi, prevalenca rezistencije na klopidogrel varira od 5% do 44% i najveća je kod bolesnika sa moždanim udarom. *CYP2C19* enzim je uključen u oba oksidaciona procesa metabolizma klopidogrela. Nekoliko farmakogenetičkih studija je pokazalo da osobe koje su nosioci *CYP2C19*\*2 alela imaju smanjeno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela i visoku reaktivnost trombocita, što dovodi do povećanja rizika od razvoja neželjenih kardiovaskularnih događaja. Međutim, postoje studije koje nisu ukazale na uticaj *CYP2C19* genotipa na klinički efekat klopidogrela niti na prediktivnu vrednost *CYP2C19*\*2 varijantne gena.

Glavni cilj ove studije je bio da se ispita povezanost terapijskog odgovora na antitrombocitni lek klopidogrel, koji je praćen laboratorijskim ispitivanjem agregacije trombocita, i prisustva *CYP2C19*\*2 varijante gena i da se utvrdi uticaj genetskih i negenetskih faktora na reaktivnost trombocita kod bolesnika sa stenozom karotidnih arterija kod kojih je izvršena karotidna endarterektomija.

U istraživanju efekat antiagregacijskog leka klopidogrela praćen je ADP-indukovanom agregacijom trombocita. Vrednosti testa očekivano su opadale tokom prvih mesec dana tretmana i pokazana je statistički značajna razlika između vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita dobijene pre hirurške intervencije, dvadeset četiri časa

nakon uzimanja prve doze klopidogrela (75 mg), sedmog i tridesetog dana od uvođenja terapije ( $P < 0,001$ ). Dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze klopidogrela, povećana reaktivnost trombocita detektovana je kod 75,9% bolesnika, da bi broj bolesnika, koji imaju loš terapijski odgovor na klopidogrel, pao na četvrtinu ispitivane populacije posle tridesetog dana uzimanja terapije.

Zastupljenost *CYP2C19\*2* alela u ispitivanoj populaciji je 26,8%. Nosioци *CYP2C19\*2* varijante gena imali su značajno veće vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita u odnosu na bolesnike koji nisu nosioци pomenutog alela tokom perioda praćenja. Kod nosioca *CYP2C19\*1/\*1* genotipa, vrednosti testa pokazuju tendenciju pada u toku vremena. Kod nosioca *CYP2C19\*2* varijante gena, zapaženo je opadanje agregabilnosti trombocita tokom prvih sedam dana uzimanja terapije, dok u periodu od sedmog do tridesetog dana uzimanja klopidogrela nije zapažena promena agregabilnosti trombocita ( $P = 0,241$ ). 46,7% bolesnika među nosiocima *CYP2C19\*2* alela imali su loš terapijski odgovor na klopidogrel 30 dana terapije klopidogrelom, odnosno 17,1% bolesnika u grupi nosioca *wild type* genotipa ( $P = 0,001$ ).

Pokazano je da su prisustvo *CYP2C19\*2* varijante gena i visok nivo ukupnog holesterola nezavisni faktori rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel. Bolesnici koji su nosioци *CYP2C19\*2* varijante gena imaju skoro 4,5 puta veći rizik da će nakon 30 dana uzimanja klopidogrela imati loš odgovor na lek u odnosu na bolesnike sa *wild type* genotipom. Analizom ROC krive, utvrđeno je da model, koji uključuje nivo ukupnog holesterola i prisustvo *CYP2C19\*2* varijante gena, može biti prediktor lošeg odgovora na klopidogrel 30 dana nakon uzimanja leka. U ovom istraživanju, 25,4% interindividualne varijabilnosti u terapijskom odgovoru na lek objašnjeno je holesterolom i prisustvom pomenutog alela. Dakle, značajan deo varijabilnosti je ostao neobjašnjen, odnosno faktori rizika su ostali nepoznati.

**Ključne reči:** stenoza karotidnih arterija, karotidna endarterektomija, klopidogrel, reaktivnost trombocita, *CYP2C19\*2*, faktori rizika

**Naučna oblast:** Medicinske nauke - farmacija

**Uža naučna oblast:** Medicinska biohemija

**UDK broj:** 577.21:615.22:616.133-085(043.3)

# INFLUENCE OF *CYP2C19\*2* GENE VARIANT ON THERAPEUTIC RESPONSE DURING CLOPIDOGREL TREATMENT IN PATIENTS WITH CAROTID ARTERY STENOSIS

## *Abstract*

Carotid artery atherosclerosis is one of the many causes of acute ischemic stroke. Carotid endarterectomy (KE) is the standard treatment for carotid stenosis and is the most frequently performed operation to prevent stroke. Perioperative carotid thrombosis remains a significant problem in 2%-5% of patients and dual antiplatelet therapy, including aspirin and clopidogrel, has a potential role in reducing the risk of stroke after KE. Despite their proven clinical effect, a considerable number of patients don't have an adequate response to aspirin, clopidogrel or both. According to published data, the prevalence of clopidogrel resistance varies from 5% and may be as high as 44% in patients with acute ischemic stroke. The *CYP2C19* enzyme is involved in both oxidative steps of clopidogrel metabolism. Several pharmacogenomic studies have demonstrated that individuals who are carriers of *CYP2C19\*2* allele have a reduced conversion of clopidogrel into its active metabolite and higher platelet reactivity, which increases the risk of adverse cardiovascular events. However, there are contrasting conclusions in the literature regarding the predictive value of the *CYP2C19\*2* variant allele

The aim of this study was to determine the prevalence of low responsiveness to clopidogrel and to identify risk factors, both genetic (*CYP2C19\*2*) and non-genetic, for low responsiveness based on platelet function testing in patients with carotid artery stenosis undergoing KE.

ADP-induced platelet aggregation was used to analyze the effect of clopidogrel. ADP-induced platelet aggregation showed a tendency of decline during the first month of treatment and the values of platelet aggregation obtained before the KE. Twenty four hours after the first dose of the clopidogrel, 7 and 30 days of taking the drug were statistical significantly different ( $P < 0,001$ ). In the study group, the number of patients with high



platelet reactivity declined from 79.5% after 24 h to about a quarter of the patients after 30 days of clopidogrel treatment.

In the study group, *CYP2C19\*2* genotype frequency was 26.8%. The platelet aggregation was significantly higher in patients carrying *CYP2C19\*2* allele than in the group of non-carriers in all three measurements. In the group with wild type, ADP-induced platelet aggregation showed a tendency of decline over time. In patients with the *CYP2C19\*2* allele, the decline of platelet aggregation was observed 7 days after clopidogrel and remained largely unchanged in the last measurement performed 30 days after clopidogrel intake (P=0,241). 46,7% of those who were carriers of this allele had low response to clopidogrel after 30 days of taking the drug, in contrast to 17,1% of patients who were not carriers of the *CYP2C19\*2* variant (P=0,001).

*CYP2C19\*2* variant allele and high total cholesterol were shown to be the only independent risk factors for low responsiveness to clopidogrel. The risk for being a clopidogrel low-responder is 4.5-fold higher for heterozygous for the *CYP2C19\*2* allele compared to homozygous for wild type after 30 days of taking the drug. Using ROC analysis, it has been found that a model that includes total cholesterol levels and the presence of *CYP2C19\*2* gene variant may be a predictor of a low clopidogrel responsiveness 30 days after taking the drug. However, a combination of these factors was responsible for 25,4% of the interindividual variability and most of the variation in platelet response to clopidogrel remains unexplained.

**Key words:** carotid artery stenosis; carotid endarterectomy; clopidogrel; platelet reactivity; *CYP2C19\*2*; risk factors.

**Field of science:** Medical sciences – Pharmacy

**Scientific subfield:** Medical biochemistry

**UDK number:** 577.21:615.22:616.133-085(043.3)

# LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

**GP** - glikoproteinski receptori

**vWf** - von Willebrandov faktor

**ADP** - adenzin difosfat

**ATP** - adenzin trifosfat

**TXA2** - tromboksan A2

**PGG2** - prostaglandin G2

**PGH2** - prostaglandin H2

**cAMP** – ciklični adenzin monofosfat

**AMP** - adenzin monofosfat

**IP3** - inozitol trifosfat

**DAG** - diacilglicerol

**PI3K** - fosfatidilinozitol 3 kinaza

**LDL** - low density lipoprotein

**TIA** - tranzitorni ishemijski atak

**KE** - karotidna endarterektomija

**KAS** - karotidna angioplastika sa ugradnjom stenta

**AHA** - American Heart Association

**ASA** - American Stroke Association

**ACE** – angiotenzin konvertujući enzim

**MES** - mikroembolijski signal

**CYP P450** - citohrom P450

**AKS** - akutni koronarni sindrom

**PKI** - perkutana koronarna intervencija

**VASP** - vazodilatator stimulirajući fosfoprotein

**ACCF** - American College of Cardiology Foundation

**PON1** – paraoksonaza 1

**CES1** - karboksilesteraza 1

**LTA** – svetlosna transmitovana agregometrija (light transmittance aggregometry)

**MEA** - Multipla elektrodna agregometrija

**ITM** - indeks telesne mase

**TRAP** – peptid aktivator trombinskog receptora

**ALT** - alanin-aminotransferaza

**AST** - aspartat-aminotransferaza

**PGE2** - prostaglandin E2

**DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina

**ROC** – receiver operating curve

**HDL** - high density lipoprotein

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Trombociti .....	1
1.1.1. Uloga trombocita .....	3
1.1.2. Adenozin difosfat (ADP) .....	6
1.1.3. P2Y receptori .....	7
1.2. Ateroskleroza .....	7
1.3. Karotidna bolest .....	10
1.3.1. Dijagnostika i lečenje karotidne bolesti .....	11
1.3.2. Karotidna endarterektomija .....	14
1.4. Antitrombocitni lekovi .....	17
1.4.1. P2Y12 inhibitori .....	18
1.4.2. Klopido­grel .....	20
1.4.2.1. Farmakokinetika i farmakodinamika klopido­grela.....	21
1.4.2.2. Rezistencija na klopido­grel .....	24
1.4.2.3. Značaj genetičkih ispitivanja .....	31
1.4.3. Metode određivanja reaktivnosti trombocita .....	32
1.4.3.1. Klinički značaj funkcionalnih testova .....	38
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	39
3. METODE .....	40
3.1. Vreme i mesto istraživanja .....	40
3.2. Dizajn studije i ispitanici .....	40
3.3. Uzorkovanje krvi .....	42
3.4. Metode određivanja krvne slike sa diferencijacijom leukocita.....	43
3.5. Metode određivanja koagulometrijskih parametara .....	43
3.6. Metode određivanja biohemijskih parametara .....	44
3.7. Metoda određivanja reaktivnosti trombocita .....	44

3.7.1.	Način rada .....	47
3.7.2.	Korišćeni reagensi .....	48
3.8.	Genetičke analize .....	49
3.8.1.	Ekstrakcija DNK .....	49
3.8.2.	Merenje koncentracije DNK .....	49
3.8.3.	Detekcija <i>CYP2C19*2</i> alela .....	49
3.9.	Statistička analiza podataka .....	51
4.	REZULTATI .....	53
4.1.	Demografske i biohemijske karakteristike ispitivane populacije.....	53
4.2.	Farmakogenetski profil ( <i>CYP2C19*2</i> ) ispitivane populacije .....	55
4.3.	Promena agregabilnosti trombocita prilikom terapije klopidogrela tokom perioda praćenja .....	57
4.3.1.	Promena agregabilnosti trombocita tokom primene klopidogrela u odnosu na prisustvo <i>CYP2C19*2</i> alela .....	59
4.4.	Povezanost <i>CYP2C19*2</i> alela sa terapijskim odgovorom na antiagregacijski lek klopidogrel .....	63
4.4.1.	Procena terapijskog odgovora na klopidogrel na osnovu vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita u ispitivanoj populaciji.....	63
4.4.1.1.	Povezanost vrednosti ADP testa dobijene pre hirurške intervencije i terapijskog odgovora na klopidogrel.....	66
4.4.2.	Procena terapijskog odgovora bolesnika na klopidogrel na osnovu vrednosti ADP-TRAP odnosa u ispitivanoj populaciji.....	68
4.5.	Uticaj genetskih i negenetskih faktora na terapijski odgovor na klopidogrel u ispitivanoj populaciji .....	71
4.5.1.	Uticaj stečenih faktora rizika za loš terapijski odgovor na klopidogrel u ispitivanoj populaciji .....	73
4.5.2.	Uticaj drugih lekova na odgovor ispitanika na terapiju klopidogrelom.....	77
4.6.	Povezanost neželjenih događaja i terapijskog odgovora na klopidogrel.....	79

5. DISKUSIJA .....	81
6. ZAKLJUČAK .....	99
7. LITERATURA .....	101
BIOGRAFIJA .....	124
PRILOZI .....	125

Izjava o autorstvu

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada

Izjava o korišćenju

# 1. UVOD

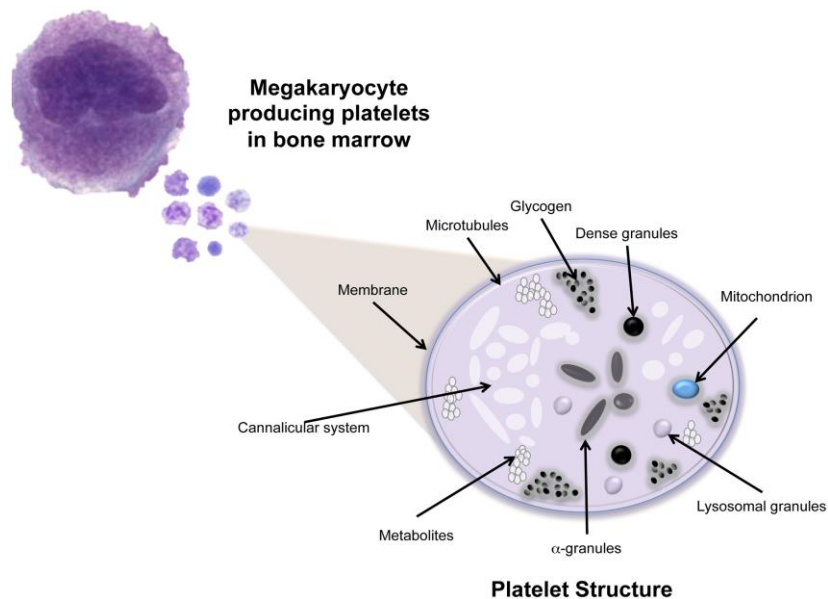
## 1.1. Trombociti

Trombociti predstavljaju fundamentalnu komponentu procesa hemostaze. To su krvne ćelije bez jedra, diskoidnog oblika dijametra od 2 do 3  $\mu\text{m}$ . Imaju bledoplavu citoplazmu sa crvenkasto-ljubičastim granulama (1,2).

Trombociti vode poreklo od matične ćelije hematopoeze, koja u sklopu diferencijacije i sazrevanja daje zajedničku mijeloidnu progenitor ćeliju; u daljem toku diferencijacije ona prelazi u morfološki prepoznatljivu ćeliju megakarioblast. Iz megakarioblasta dalje nastaje promegakariocit i megakariocit (3). Trombociti predstavljaju fragmente citoplazme megakariocita i nastaju u kostnoj srži, ali i u plućima iz megakariocita koji su putem krvi došli iz kostne srži u pluća (oko 50%) (4). Makrofage kostne srži, jetre i slezine odgovorne su za razgradnju ovih krvnih ćelija. Za proces stvaranja trombocita potrebno je oko 72h, a njihov životni vek traje od 7 do 10 dana (3,5).

Broj trombocita u cirkulaciji kreće se od 150000 do 400000/ $\mu\text{L}$ . Dnevno je potrebno da nastane  $15 \times 10^{10}$  trombocita kako bi se održao potreban broj u cirkulaciji. U trombocitima razlikujemo:

- membranu koja omogućava adheziju i agregaciju trombocita,
- citoskelet odgovoran za kontrakciju i
- organele odgovorne za sekretornu ulogu trombocita (6) (Slika 1).



**Slika 1.** Struktura trombocita (Preuzeto iz: Zapata JC, Cox D, Salvato MS. The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. PLoS Negl Trop Dis 2014;8: e2858)

Na svojoj površini trombociti sadrže glikoproteinske (GP) receptore za različite adhezivne molekule. Najznačajniji trombocitni receptori su:

- GP Ib/IX/V – receptor za vezivanje von Willebrandovog faktora (vWf),
- GP IIb/IIIa – receptor za vezivanje fibrinogena, ali u manjoj meri i za vezivanje vWf, fibronektina, trombospondina,
- GP VI - receptor za vezivanje kolagena,
- GP V – receptor za vezivanje trombina,
- GP IV - receptor za vezivanje kolagena II i trombospondina(6).

Aktinski filamenti, miozin i drugi kontraktilni proteini održavaju oblik trombocita i potpomažu retrakciju trombocitnog koaguluma.

Trombociti sadrže tri tipa granula: alfa granule, delta (guste) granule i lizozomi koji sadrže kisele hidrolaze. Alfa granule sadrže molekule koji pospešuju adheziju trombocita, faktore koagulacije (fibrinogen, vWf, faktor V) i trombocitne specifične proteine (beta-

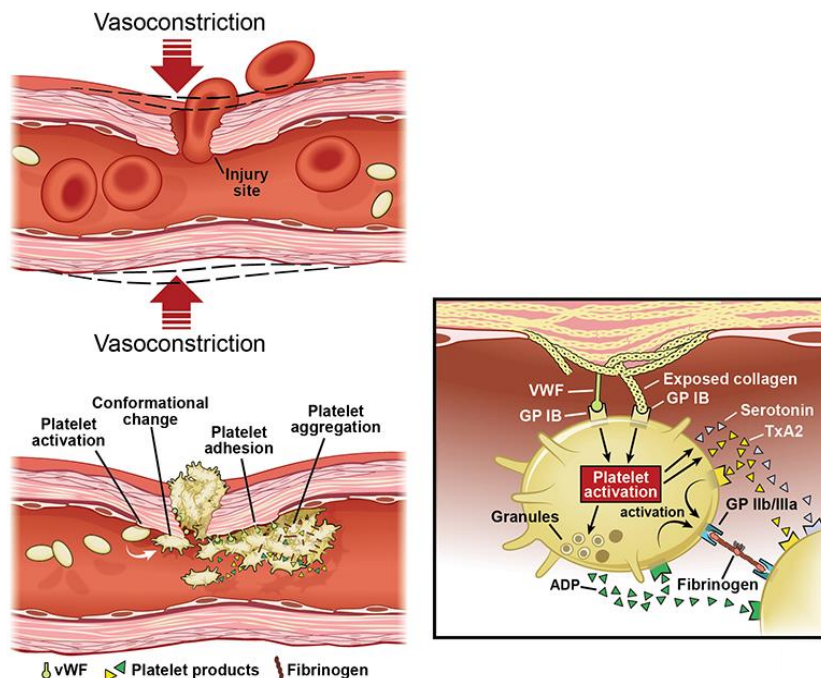


tromboglobulin, trombocitni faktor 4, trombocitni faktor rasta, trombospondin). Adenozin difosfat (ADP), adenozin trifosfat (ATP), kalcijum, serotonin, kateholamini nalaze se u delta granulama i odgovorni su za amplifikaciju aktivacije trombocita. Sadržaj granula se oslobađa iz aktiviranih trombocita i važan je za stimulaciju trombocitne agregacije i za procese koagulacije (1,3).

### **1.1.1. Uloga trombocita**

Trombociti zajedno sa vWf učestvuju u primarnoj hemostazi stvarajući trombocitni koagulum. Ukoliko je povreda endotelnog zida krvnog suda mala, taj koagulum može da zaustavi krvarenje. Ukoliko je oštećenje veće, potrebna je i aktivacija proteina koagulacione kaskade (sekundarna hemostaza) koja dovodi do konverzije fibrinogena u fibrin, a njegova polimerizacija dovodi do formiranja koaguluma (1).

Formiranje trombocitnog koaguluma nakon povrede zida krvnog suda odvija se u tri faze: adhezija, aktivacija i sekrecija (7) (Slika 2).



**Slika 2.** Aktivacija i agregacija trombocita (Preuzeto iz: Bermudez P, Beushausen M, Horan M. Management of Inherited, Acquired, and Iatrogenically Induced Coagulopathies in Oral Surgery. A Textbook of Advanced Oral and Maxillofacial Surgery Volume 3, Prof. Mohammad Hosein Kalantar Motamedi (Ed.). InTech 2016)

Oštećenje endotela dovodi do izlaganja subendotelnog kolagena. Trombociti se vezuju za kolagen direktno preko svog receptora GP VI ili indirektno preko vWf multimera koji se preko A3 domena vezuju za kolagen, a preko A1 domena za GP Ib-IX/V trombocitne receptore, dovodeći do adhezije trombocita. Trombociti menjaju svoj oblik povećavajući svoju površinu nekoliko puta ispoljavanjem pseudopoda (Slika 3) (8). Kontrakcijom mikrotubula dolazi do izbacivanja sadržaja granula i aktiviranja ostalih trombocita. Sekrecija sadržaja dovodi do međusobne interakcije trombocita, formiranja agregata trombocita i trombocitnog koagulumuma (3). Agonisti ADP, trombin i tromboksan A2 (TXA2) odgovorni su za aktivaciju trombocita.



**Slika 3.** Neaktivni, delimično aktivni i aktivni trombociti slikani elektronskim mikroskopom (Preuzeto iz: Kroll MH, Afshar-Kharghan V. Platelets in pulmonary vascular physiology and pathology. *Pilm Circ.* 2012;2:291-308.)

Pri dodiru trombocita kolagenom oštećenog krvnog suda dolazi do aktivacije fosfolipaze A2 koja stvara arahidonsku kiselinu iz fosfolipida membrane trombocita. Delovanjem enzima ciklooksigenaze stvaraju se endoperoksidi, prostaglandin G2 (PGG2) i prostaglandin H2 (PGH2). Delovanjem enzima tromboksan sintetaze iz PGH2 nastaje TXA2, koji dovodi do lokalne vazokonstrikcije, stimulacije agregacije trombocita i oslobađanja sadržaja iz granula. TXA2 je nestabilan i brzo prelazi u neaktivnu formu TXB2. Ciklooksigenazom iz PGG2 dolazi do stvaranja prostaglandina I2 (prostaciklin) koji predstavlja antagonistu agregacije trombocita i njegova primarna sinteza je u endotelnim ćelijama. Trombociti primarno stvaraju TXA2 koji, vezujući se za tromboksan receptore, dovodi do aktivacije fosfolipaze C, povećanja intracelularnog kalcijuma i do oslobađanja ADP molekula iz deltra granula trombocita (1, 3).

Trombocitna aktivnost je modulirana regulatornim molekulima, kao što je ciklični adenozin monofosfat (cAMP). Trombociti sadrže adenilat ciklazu, enzim koji konvertuje ATP u cAMP, kao i cikličnu nukleotid fosfodiesterazu; ona prevodi cAMP u adenozin monofosfat (AMP) kontrolišući intracelularnu koncentraciju cAMP. cAMP stimuliše protein kinazu dovodeći do fosforilizacije sistema ATP - zavisnih kalcijumovih pumpi koje

uklanjaju jone kalcijuma iz citozola. cAMP inhibira promenu oblika i adheziju trombocita, sekreciju i agregaciju trombocita (9).

Smatra se da aktivirani trombociti kolagenom ili ADP-om dovode do proteolitičke aktivnosti faktora XII i faktora XI i tako učestvuju u aktivaciji faktora X. Studije su pokazale i da specifične grupe receptora na membrani aktiviranih trombocita vezuju faktor IXa, faktor VIIa i faktor X omogućavajući i na taj način aktivaciju faktora X. Smatra se da površina aktiviranih trombocita ima i protektivnu ulogu jer štiti koagulacione proteaze od njihovih inhibitora. Oni dovode i do lokalizacije koagulacionih reakcija na površini trombocita i lokalnog stvaranja trombina na mestu povrede krvnog suda (9).

### **1.1.2. Adenozin difosfat (ADP)**

ADP se deponuje u delta granulama u trombocitima. Koliko je važna njegova uloga agoniste aktivnosti trombocita govori studija koja je pokazala da prazni depoi ADP-a u trombocitima ili disfunkcija ADP trombocitnih receptora dovodi do krvarenja. ADP dovodi do promene oblika trombocita, sekrecije granula i agregacije trombocita, do konformacionih promena i ekspresije vezujućeg mesta za fibrinogen na receptoru GP IIb/IIIa.

ADP ostvaruje efekat vezujući se za svoje receptore na trombocitima i dovodi do:

- inhibicije adenilat ciklaze stimulišući  $G_{\alpha i}$  protein i smanjujući koncentraciju intracelularnog cAMP,
- stvaranja inozitol trifosfata (IP3) dovodeći do mobilizacije kalcijuma iz ćelijskih depoa,
- oslobađanja arahidonske kiseline dovodeći do stvaranja TXA2 i aktivacije fosfolipaze A2 (10).

Smatra se da ADP svoj efekat ispoljava vezujući se za tri purinergička receptora: P2Y1, P2Y12 i P2X1 (11). Uloga P2X1 receptora u procesima aktivacije trombocita ispoljava se kroz ATP agonistu koji se primarno vezuje za ovaj receptor i dovodi do povećanja

intracelularne koncentracije jona kalcijuma dovoljne za promenu oblika trombocita, ali ne i za proces agregacije. ADP igra ulogu antagonistu tog receptora (10).

### **1.1.3. P2Y receptori**

P2Y receptori pripadaju grupi P2 receptora povezanih sa G proteinom. P2Y1 receptor je povezan sa Gq proteinom. Kad je receptor aktiviran ADP-om, dolazi do stimulacije fosfolipaze C, koja dovodi do stvaranja IP3 i diacilglicerola (DAG). IP3 oslobađa jone kalcijuma iz depoa u trombocitima. DAG aktivira protein kinazu C koja dovodi do fosforilizacije proteina, sekrecije granula i ekspresije receptora za fibrinogen. P2Y1 menja oblik ćelije i izaziva brzu agregaciju trombocita (10, 12).

P2Y12 je povezan sa G $\alpha$ i2 proteinom čija stimulacija dovodi do inhibicije adenilat ciklaze i aktivacije fosfatidilinozitol 3 kinaze (PI3K) i nema značajnu ulogu u promeni oblika trombocita (13). Međutim, kad je P2Y12 receptor stimulisan ADP-om, to dovodi do:

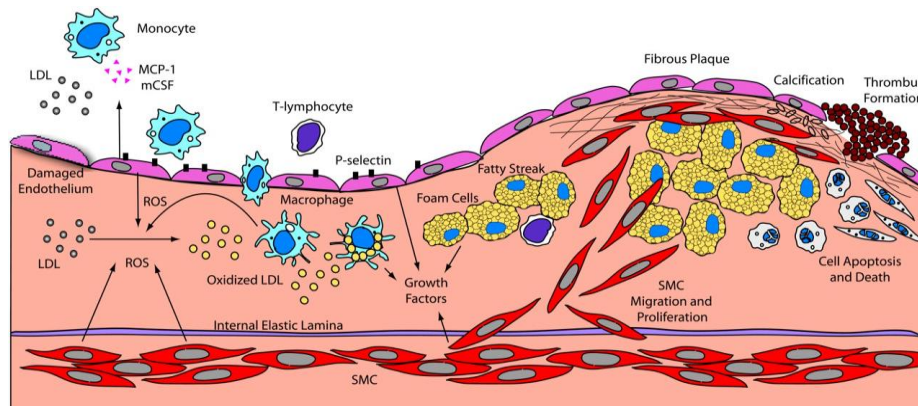
- stvaranja TXA2 i oslobađanja sadržaja iz delta granula,
- konformacionih promena receptora GP IIa/IIIb i ispoljavanja vezujućeg mesta za fibrinogen na površini ćelija,
- amplifikacije agregacije trombocita,
- ekspresije P selektina na površini trombocita i
- ima prokoagulantnu aktivnost (8,10).

Pošto se smatra da ima centralnu ulogu u formiranju koagulumu, ovaj receptor predstavlja ciljani molekul za antritrombocitnu terapiju.

## **1.2. Ateroskleroza**

Ateroskleroza je dugotrajan proces praćen hroničnim inflamatornim procesima unutar zida krvnih sudova, koji dovode do zadebljanja zida, stenozne lumena i distalne ishemije

(14). Ateroskleroza predstavlja kompleksan proces povezan sa brojnim faktorima rizika koji mogu biti promenljivi (pušenje, poremećaj u toleranciji glukoze, gojaznost, hormonski status, arterijska hipertenzija, rezistencija na insulin) i faktorima rizika na koje ne možemo uticati (pol, rasa) (15).



**Slika 4.** Razvoj aterosklerotskog plaka (Preuzeto iz: Madamanchi N, Vendrov A, Runge M. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:29-38)

Proces aterogeneze započinje dejstvom faktora rizika za aterosklerozu dovodeći do oštećenja endotela i nastanka endotelne disfunkcije koji je praćen promenom permeabilnosti i abnormalnom sekretornom aktivnošću endotelnih ćelija (14). Oslobođeni citokini iz endotelnih ćelija dovode do ekspresije adhezivnih molekula na površini endotela, za koje se vezuju prvenstveno monociti koji migriraju u intimu, gde diferenciraju u makrofage i ispoljavaju receptore za modifikovane lipoproteine male gustine (Low density lipoprotein – LDL). Lipidi iz cirkulacije prolaze kroz endotel i talože se u intimi oštećujući i endotelni i glatki mišićni sloj, što dovodi do još većeg ulaska lipida u intimu. U arterijskoj intimi lipoproteinske partikule podležu modifikaciji procesima oksidacije i glikolizacije (u prisustvu hiperglikemije) (16). Endotelne ćelije zajedno sa monocitima i makrofagama proizvode slobodne radikale koji oksidišu LDL molekule (17). Oksidovane LDL molekule imaju izražen aterogeni potencijal. Makrofage nekontrolisano preuzimaju holesterol iz LDL molekula i nastaju depoi lipida koji daju penast izgled ćelijama. Modifikovani LDL se vezuje za receptore hvatače (*scavenger* receptori) na makrofagama koji preuzimaju čestice u ogromnim količinama. Daljom akumulacijom holesterola, koji se

akumulira ne samo u „penastim ćelijama” već i ekstracelularno, nastaju masne pruge na mestu lokalizovane endotelne disfunkcije (15,18). Ove lezije su reverzibilne, ne sužavaju lumen i ne dovode do kliničkih simptoma. U stadijumu masnih pruga veliki broj penastih ćelija migrira nazad u cirkulaciju zbog čega se smatra da ovaj proces ima zaštitnu ulogu i da služi za čišćenje zidova krvnih sudova od naslaga lipida koji su u subendotel prodrli iz cirkulacije. Tranzitorne lezije nastaju pri dugotrajnom dejstvu aterogenih faktora rizika i sadrže, pored penastih ćelija, i lipidno jezgro. Fagocitoza oksidativnih LDL molekula aktivira makrofage koje lučenjem citokina i faktora rasta stimulišu proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih ćelija iz medije u intimu (14,18). Ćelije glatkih mišića proizvode ekstracelularni matriks-kolagen, što vodi ka stvaranju fibrozne kape i aterosklerotskog plaka. Aterosklerotski plak čini osnovica od glatkih mišićnih ćelija i jezgro s penastim ćelijama, od kojih procesom nekroze ostaju naslage lipida; one čine lipidni bazen oko kog se nalazi fibrozna kapa. Od debljine fibrozne kape zavisi stabilnost plaka. Plak s tankom opnom lako može da pukne, naročito na krajevima, i da dovede do izlivanja lipidnog sadržaja u lumen krvnog suda, distalne embolizacije i lokalne tromboze (14,15).

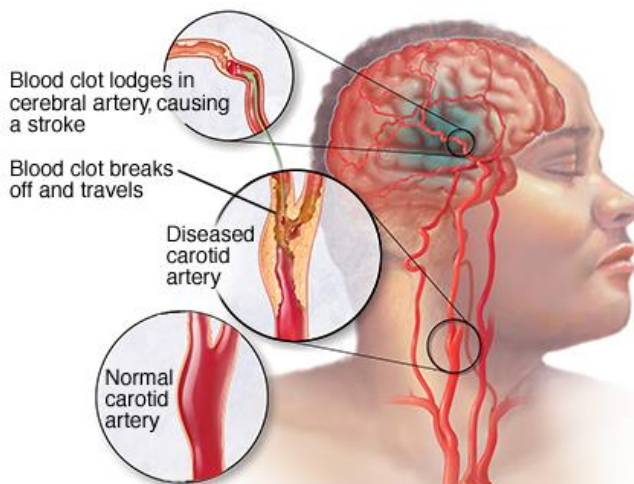
Kompleksna interakcija između trombocita, inflamatornih ćelija, vaskularnih ćelija i hemokina takođe ima veliku ulogu kod formiranja arterosklerotskog plaka. Trombociti dovode do sekrecije hemokina i njihovih prekursora iz endotelnih ćelija, koji aktiviraju vaskularne ćelije i prate proces angiogeneze. Međutim, bilo kao primarni uzročnik bilo kao posledica, aktivacija trombocita je povezana i sa oštećenjima aterosklerotskog plaka (19). Huo i saradnici su pokazali da interakcija aktiviranih trombocita dovodi do pogoršanja aterosklerotske lezije, ispoljavanjem receptora na površini trombocita koji dovode do regurgitacije mononuklearnih ćelija (19,20). Trombocitni faktor 4, najzastupljeniji trombocitni hemokin, korelira sa ozbiljnošću lezije, ukazujući na to da aktivnost trombocita može da doprinese razvoju vaskularnih lezija. Zato je opravdana upotreba hronične antitrombocitne terapije kod pacijenata s visokim rizikom od ateroskleroze (19).

Tromboza predstavlja proces patološkog stvaranja koaguluma unutar krvnog suda u odsustvu krvarenja. Tri najvažnija predisponirajuća faktora koji dovode do tromboze, poznata kao Virchowljeva trijada, jesu oštećenje zida krvnog suda, poremećaj toka krvi i patološki izmenjena koagulabilnost krvi. Do oštećenja zida krvnog suda najčešće dolazi

zbog ruptуре aterosklerotskog plaka ili njegove erozije. Oštećenje krvnog suda dovodi do vazokonstrikcije koja je praćena adhezijom i aktivacijom trombocita i stvaranjem fibrina. Arterijska tromboza je obično povezana sa aterosklerozom. Arterijski tromb se uglavnom sastoji od trombocita i leukocita zarobljenih u fibrinskoj mreži. Deo tromba koji se odvoji od osnove putuje kao embolus kroz krvotok i kad zastane, u krvnim sudovima izaziva ishemiju i infarkt (17).

### 1.3. Karotidna bolest

Karotidna bolest se najčešće manifestuje kao aterosklerotska stenozna karotidne arterije (21). Klinički relevantna stenozna karotidnih arterija koja povećava rizik od moždane ishemije definisana je kao stenozna veća od 50% (22).



**Slika 5.** Aterosklerotska stenozna karotidne arterije (Preuzeto iz: mayoclinic website)

Aterosklerotske promene karotidnih arterija su najčešći uzrok moždane ishemije jer dovode do limitiranog protoka krvi kroz lumen arterija. Na taj način dolazi do cerebralne hipoperfuzije ili do razvoja tromboembolijskog događaja usled ruptуре aterosklerotskog plaka (Slika 5) (23). Oko 20% do 30% ishemijskih moždanih udara desi se usled karotidne bolesti (24,25), a oko 80% ovih slučajeva dogodi se kod asimptomatskih bolesnika koji nisu imali moždani udar ili tranzitorni ishemijski atak (TIA) (22). Prevalenca karotidne bolesti



varira od geografske lokacije zbog kulturoloških, genetskih i socijalnoekonomskih razlika (23).

Stenoza karotidnih arterija može biti simptomatska ili asimptomatska. Simptomatska karotidna bolest praćena je neurološkim događajima i može se manifestovati kao epizode TIA, prolaznog gubitka vida ili ishemijskog moždanog udara (26). Tranzitorni ishemijski atak je akutni reverzibilni poremećaj neuroloških funkcija sa simptomima koji traju manje od dvadeset četiri časa, a izazvani su cerebralnom ishemijom. Moždani udar predstavlja akutni neurološki deficit sa simptomatologijom dužom od dvadeset četiri časa i može biti izazvan cerebralnom ishemijom ili krvarenjem. Karotidna bolest koja nije praćena nijednim neurološkim simptomom definisana je kao asimptomatska i razvija se sporo, uz istovremeno uspostavljanje kolateralnog krvotoka (27). Asimptomatska karotidna stenoza jedan je od najboljih indikatora generalizovane aterosklerotske bolesti (28). Prevalenca asimptomatske stenozе karotidnih arterija značajna je kod bolesnika s koronarnom arterijskom bolešću (11%–26%) i kod periferne arterijske bolesti (25%–49%) (22). Svaki četvrti bolesnik s perifernom arterijskom okluzivnom bolešću ima i stenozu karotidnih arterija veću od 70%, pri čemu je 90% tih pacijenata bez simptoma (27).

Ta klasifikacija je veoma važna zato što prognoza i lečenje zavise od tipa karotidne bolesti. Kod bolesnika sa simptomatskom stenozom karotidnih arterija (ukoliko primaju samo medikamentoznu terapiju nakon ishemijskog događaja), rizik od ponovnog moždanog udara ili TIA je veoma veliki i najveći je tokom prvih dana i nedelja, kada je rizik od moždanog udara više od 100 puta veći nego kod pacijenata sa asimptomatskom karotidnom bolešću (28).

### **1.3.1. Dijagnostika i lečenje karotidne bolesti**

Karotidna angiografija je zlatni standard za dijagnostikovanje karotidne stenozе. Međutim, u današnje vreme se najčešće koriste neinvazivne metode za procenu stepena stenozе (29). Duplex ultrasonografsko ispitivanje karotidnih arterija predstavlja neinvazivnu, pouzdanu i preciznu metodu, koja omogućava analizu stepena stenozе,

morfološko ispitivanje aterosklerotskog plaka, analizu emboligenosti površine plaka i hemodinamskih karakteristika protoka (27). Ultrasonografski se razlikuje:

- stepen stenozе od 50% do 69%,
- stepen stenozе od 70% do 99%,
- potpuna okluzija lumena krvnog suda.

Kad su rezultati dobijeni ultrasonografijom neodređeni, neophodna su dalja ispitivanja CT (kompjuterizovana tomografija) angiografijom i MR (magnetna rezonanca) angiografijom vrata, koje su u stanju da vizuelizuju proksimalne i distalne segmente arterija, kao i anatomske varijacije krvnih sudova. Ove tehnike ne zamenjuju utrazvučni pregled karotidnih arterija, kao inicijalnu dijagnostičku metodu, bilo da se ona koristi kao jedina metoda, bilo kao dodatna metoda za procenu stepena stenozе (21).

U lečenju karotidne bolesti primenjuje se karotidna endarterektomija (KE) i karotidna angioplastika sa ugradnjom stenta (KAS). Po poslednjim preporukama AHA (American Heart Association) i ASA (American Stroke Association) udruženja, operativno lečenje stenozе karotidnih arterija indikovano je kod simptomatskih bolesnika sa stenozom većom od 70%, naročito kod osoba starijih od 70 godina. Kod obostrane stenozе karotidnih arterija rizik je veći, pa je hirurško lečenje od veće koristi (30). Hirurška intervencija, bilo KAS bilo KE, nije preporučena kod simptomatskih bolesnika sa stenozom manjom od 50% ili asimptomatski sa stenozom manjom od 60% (31). Da li će KE biti primenjena kod simptomatske stenozе karotidnih arterija između 50% i 69% zavisi od starosti bolesnika, pola i drugih faktora rizika. Karotidna endarterektomija može biti preporučena kod asimptomatskih bolesnika ispod 75 godina starosti s karotidnom stenozom od 70% do 90%. Kod asimptomatskih bolesnika starijih od 75 godina sa suženjem dijametra karotidnih arterija od 70%, endarterektomija je prepolovila petogodošnji rizik od moždanog udara sa 12% na 6% (27).

Efektivnost hirurške intervencije zavisi od pola, starosti bolesnika i vremenskog trenutka kad se intervencija sprovodi. Karotidnu endarterektomiju trebalo bi izvršiti u toku prve dve nedelje nakon poslednjih simptoma, ukoliko nema kontraindikacija (30). Ova

preporuka se zasniva na podacima o riziku od ponovnog moždanog udara u ranom periodu (tokom prvih 7 do 10 dana) od akutnog ishemijskog događaja, koji može biti visok i 10%-11,2% (29). Korist od hirurške intervencije je značajan kod muškaraca, bolesnika preko 75 godina i kod onih bolesnika kod kojih je intervencija urađena u okviru dve nedelje od poslednjeg događaja (28). Osobe ženskog pola imaju veću stopu hirurških i neuroloških komplikacija i manju dobit od hirurškog lečenja uz češću pojavu restenoza karotidnih arterija, naročito ukoliko je u pitanju simptomatska stenoza karotidnih arterija od 50% do 69% (21,32).

Karotidna angioplastika sa ugradnjom stenta smatra se adekvatnim alternativnim tretmanom umesto KE kod lečenja bolesnika sa simptomatskom karotidnom bolešću srednjeg ili niskog rizika od komplikacija endovaskularnog lečenja i indikovana je kod stenoze veće od 70% (33).

Terapija ateroskleroze je glavna komponenta lečenja karotidne bolesti (34). Kod bolesnika sa stenozom karotidnih arterija, bez obzira na to da li je planirana hirurška intervencija, lečenje karotidne bolesti zahteva primenu medikamentozne terapije i promenu životnih navika (prekid pušenja, smanjenje telesne težine, praćenje hipertenzije, hiperlipidemije i dijabetesa) kako bi se kontrolisao razvoj stvaranja aterosklerotskog plaka. Takođe, neophodna je upotreba antitrombocitnih lekova da bi se smanjio rizik od razvoja ishemijskih događaja (22,30,31).

Postoperativna antitrombocitna i antikoagulantna terapija primenjuje se radi sprečavanja stvaranja novih embolusa iz istog ili drugog emboligenog žarišta i sprečavanja tromboze zida embolektomisane arterije (27). Primena dvojne antitrombocitne terapije (acetil salicilna kiselina - aspirin i klopidogrel) i statina sa inhibitorima angiotensin konvertujućeg enzima (ACE) ili blokatorima  $\beta$ -adrenergičkih receptora posle KE ili KAS dovodi do niže incidence restenoze i neželjenih postoperativnih događaja (35). Upotreba malih doza aspirina (75–150 mg dnevno) preporučena je za prevenciju moždanog udara. Međutim, klopidogrel se smatra znatno potentnijim antiagregacijskim lekom u odnosu na aspirin. CAPRIE studija je pokazala superiornost monoterapije klopidogrelom u odnosu na dvojni terapiju u prevenciji ishemijskih događaja. Isto tako, MATCH studija nije ukazala ni

na jednu dobit kod primene kombinacije tih lekova u prevenciji moždanog udara, već na povećanje hemoragijskih komplikacija u poređenju s monoterapijom klopidogrelom (26).

Bolesnici sa stenozom karotidnih arterija, identifikovani nakon cerebrovaskularnog ishemijskog događaja ili po prisustvu mikroembolijskih signala (MES) pripadaju grupi bolesnika kod kojih bi trebalo razmatrati uvođenje antitrombotične terapije (36). Studije su pokazale da je kod bolesnika dvojna terapija efikasnija nego sam aspirin u smanjenju MES nakon KE (36,37). Asimptomatski mikroembolijski signali otkriveni transkranijalnim Doppler ultrazvukom predstavljaju *in vivo* marker koji može ukazati na antitrombotični efekat lekova. Visoko su specifični i senzitivni u otkrivanju trombotičnih embolusa i predstavljaju nezavisni prediktor rizika od TIA ili moždanog udara kod karotidne bolesti (36).

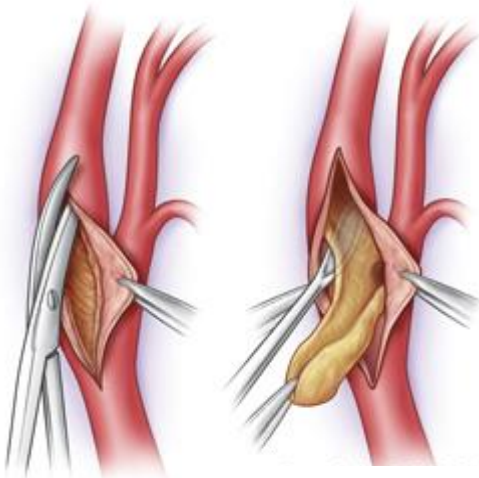
Kod bolesnika sa simptomatskom karotidnom stenozom, medikamentozna terapija je indikovana kod svih (29) i apsolutno je opravdana primena antiagregacijske terapije. Kod bolesnika sa karotidnom aterosklerotičkom bolešću koji su imali TIA ili moždani udar, preporučena je monoterapija aspirinom ili klopidogrelom (38). Prema European Stroke Initiative (ESI) udruženju, kod pacijenata sa asimptomatskom karotidnom stenozom opravdano je uvođenje antiagregacijske terapije u cilju prevencije kardiovaskularnih komplikacija i kao sekundarna prevencija moždanog udara (31,39).

Na osnovu poslednjih literaturnih podataka, KE praćena medikamentoznom terapijom predstavlja najbolji pristup u redukciji kardiovaskularnih događaja (35).

### **1.3.2. Karotidna endarterektomija**

Karotidna endarterektomija predstavlja „kamen-temeljac” u profilaksi moždanog udara (31). Ta hirurška intervencija podrazumeva odstranjivanje aterosklerotično izmenjenog sloja intime i medije koji izaziva kritičnu stenozu (Slika 6). Ovo je efektivan način lečenja stenozne karotidne arterije i danas je najčešći operativni zahvat u vaskularnoj hirurgiji za prevenciju moždanog udara (32). Postoje dve glavne tehnike karotidne endarterektomije: everziona i konvencionalna (29). Everziona tehnika je povezana sa

značajno manjom stopom restenoza većom od 50% i postoperativnih okluzija, nižom incidencom postoperativnih mikroembolijskih događaja i nižom incidencom postoperativne smrti i neuroloških komplikacija (35).



**Slika 6.** Karotidna endarterektomija (Preuzeto iz: vascularweb website)

Studije koje su poredile KE sa medikamentoznom terapijom pokazale su korist hirurške intervencije kod bolesnika sa simptomatskom i sa asimptomatskom karotidnom bolešću u prevenciji moždanog udara (33, 34). U studiji koju su sprovodili Rothwell i saradnici, petogodišnji rizik od moždanog udara bio je 21,2% kod bolesnika sa simptomatskom stenozom karotidnih arterija, koji su lečeni samo lekovima (40). Hirurška intervencija (KE) je smanjila ovaj rizik za 16% kod pacijenata kod kojih je stenoza arterija bila 70%–90% (41). NASCET (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial), ESCT (European Carotid Surgery Trial) i VAKS (Veterans Affairs Cooperative Study Program) jesu studije koje su pokazale da je karotidna endarterektomija zajedno sa medikamentoznom terapijom značajno efikasnija u prevenciji moždanog udara u odnosu na primenu samo medikamentozne terapije kod pacijenata sa simptomatskom stenozom karotidne arterije većom od 70% (30,42–44). NASCET predstavlja jednu od najznačajnijih studija u kojoj je pokazan veliki značaj KE. Po NASCET kriterijumima, primena KE se preporučuje kod simptomatske stenozе karotidnih arterija koja je veća od 50% kod muškaraca, odnosno veća od 70% kod žena (23).

AKST studija (Asymptomatic Carotid Surgery Trial) je zabeležila 6,4% moždanih udara i perioperativne smrti kod bolesnika sa asimptomatskom stenozom karotidnih arterija preko 60%, kod kojih je primenjena KE, dok je incidenca ishemijskih događaja kod bolesnika koji su primali samo medikamentoznu terapiju bila 11,8% (34). ACAS (Asymptomatic Carotid Atherosclerosis study) je takođe pokazala prednosti KE u odnosu na medikamentoznu terapiju (32). Na osnovu rezultata ove studije, hirurška intervencija preporučena je kod asimptomatske stenozе karotidnih arterija veće od 60%. Međutim, druge studije smatraju da je medikamentozna terapija dovoljna s obzirom na nisku incidencu neželjeni događaja kod te grupe bolesnika (23).

Čim se uspostavi protok krvi kroz krvni sud nakon karotidne endarterektomije, trombociti adheriraju na ogoljenu spoljašnju elastičnu laminu. Dolazi do oslobađanja ADP i TXA2 agonista iz granula trombocita, što pokreće dalju agregaciju. Adherirani trombociti se stabilizuju pomoću fibrina stvarajući tromb. Potpuna endotelizacija se završava unutar prvog meseca. Nakon endotelizacije endarterektomisane površine, lokalna aktivnost trombocita se ne detektuje. Agregacija trombocita na trombogenu površinu endarterektomisane arterije povećava sklonost ka lokalnoj trombozi i kasnijoj restenozi (27). I dalje se kod 2%–5% bolesnika razvija moždani udar u postoperativnom period (22). Incidenca restenoze posle KE iznosi 5%–7% (21).

Cochraneova analiza autora Engelter i saradnika pokazala je da primena antitrombocitnih lekova najmanje 30 dana nakon karotidne endarterektomije smanjuje stopu moždanih udara (45). Acetil-salicilna kiselina bi trebalo da se ordinira pre, tokom i nakon karotidne endarterektomije u dozi od 75 do 325 mg dnevno. Tokom prvog meseca nakon KE, preporučuje se terapija aspirinom (75–325 mg dnevno) i klopidogrelom (75 mg dnevno) u cilju profilakse ishemijskih kardiovaskularnih događaja (21). Klopidogrel u dozi od 75 mg smanjuje za 40% vezivanje fibrinogena za trombocite, kao odgovor na ADP stimulaciju (46).

Klopidogrel je, u kombinaciji sa acetil-salicilnom kiselinom, koristan u redukciji cerebralne embolizacije prilikom karotidne endarterektomije. Ulogu klopidogrela u kombinaciji sa aspirinom u redukciji cerebralne embolizacije, kod bolesnika kojima

predstoji KE, analizirali su Payne i saradnici. Dvojna terapija data noć pre intervencije dovela je do smanjenja incidence postoperativnih neuroloških događaja, smanjenja broja embolizacija u ranom postoperativnom periodu bez povećanja hemoragijskih komplikacija. Porast broja embolizacija, dijagnostikovao transkranijalnim doplerom u prvih tri sata nakon operacije, bio je prisutan kod 2,2% bolesnika kojima je ordiniran klopidogrel i kod 18,5% placebo grupe (47). Sharpe i saradnici pokazali su nisku incidencu postoperativne mikroembolizacije kod bolesnika koji primaju dvojnju terapiju, u poređenju sa bolesnicima koji su primali samo aspirin (35).

#### **1.4. Antitrombocitni lekovi**

Antikoagulantna i antitrombocitna terapija najčešće je primenjivana terapija za primarnu i sekundarnu prevenciju kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti.

Aktivacija trombocita je ključan proces kako u normalnoj hemostazi, tako i u nastanku tromboze. Postoje tri značajne grupe antitrombocitnih lekova: inhibitori ciklooksigenaze 1, antagonisti ADP receptora i antagonisti GP IIb/IIIa receptora (48). Ovi lekovi se vezuju za receptore ili enzime trombocita kako bi se sprečilo neželjeno formiranje koaguluma (49).

Način delovanja i efikasnost antitrombocitnih lekova proučavani su i pokazano je da značajno smanjuju incidencu ishemijskih događaja kod bolesnika sa aterosklerotskim bolestima. Zato ti lekovi imaju široku primenu u kliničkoj praksi (50). Antitrombocitni lekovi predstavljaju zlatni standard u lečenju kardiovaskularnih oboljenja. Indikovani su kod prevencije ishemijskih događaja kod bolesnika sa moždanim udarom i sa sistemskom perifernom arterijskom bolešću (30,51). Antitrombocitni lekovi smanjuju stopu moždanog udara posle KE, dok je rizik od krvarenja izuzetno nizak (45).

Dvojna antitrombocitna terapija (aspirin i klopidogrel) predstavlja „kamen–temeljac” u lečenju akutnog koronarnog sindroma (AKS) (52). Međutim, poslednjih godina pokazano je da se i tokom primene dvojne terapije javljaju sekundarni ishemijski događaji zbog prisustva visoke agregabilnosti trombocita tokom terapije aspirinom, odnosno klopidogrelom. U studiji Albertsa i saradnika, u koju je bilo uključeno 129 bolesnika sa

dijagnozom ishemijskog moždanog udara, TIA ili karotidne bolesti, rezistancija na aspirin zapažena je kod 39% bolesnika (53).

I pored činjenice da varijabilnost u odgovoru na antitrombocitnu terapiju predstavlja značajan izazov za njihovu kliničku primenu, aspirin i klopidogrel su zbog svoje dokazane efikasnosti i dalje najčešće prepisivani antitrombocitni lekovi.

#### **1.4.1. P2Y12 inhibitori**

Smatra se da P2Y12 receptor ima ključnu ulogu u patogenezi arterijskog tromba. P2Y12 receptor posreduje u ADP-indukovanoj agregaciji trombocita, potencira sekreciju granula pod dejstvom agonista, stabilizira trombinom indukovanu agregaciju trombocita i potencira inhibiciju antitrombocitnog efekta prirodnih regulatora funkcije trombocita, prostaciklina (54).

Tiklopidin predstavlja prvu generaciju tienopiridina. To je prolek koji zahteva konverziju u aktivnu formu pomoću enzima citohroma P450 (CYP P450). Aktivni oblik leka vezuje se i ireverzibilno inhibira P2Y12 receptor. Maksimalna inhibicija agregacije trombocita postiže se 3-5 dana nakon primene leka (49). Zbog toksičnosti tiklopidina i neželjenih efekata koji prate njegovu primenu (neutropenija, trombocitna trombotopenijska purpura), ovaj lek je u kliničkoj praksi upotpunosti zamenjen klopidogrelom (55).

Prasugrel, ireverzibilni inhibitor P2Y12 receptora, predstavlja treću generaciju tienopiridina, koji pokazuje veći stepen inhibicije agregacije trombocita (49). Nakon apsorpcije pomoću intestinalnog P-glikoproteina, prasugrel se metabolizuje do tiolaktona procesom hidrolize intestinalnim enzimom karboksilesterazom 2 (CES2) (52). U drugoj fazi metabolizma prasugrela učestvuju enzimi CYP3A4 i CYP2B6 i delimično CYP2C9 i CYP2C19 (56). Smatra se da je 50%–70% uzete doze konvertovano u aktivni metabolit. Tokom 15 minuta od uzimanja leka, aktivni metabolit se pojavljuje u cirkulaciji, tako da se maksimalna koncentracija leka u plazmi postiže u periodu od 30 minuta. Prasugrel se sporo eliminiše iz cirkulacije, što predstavlja problem kod bolesnika kod kojih je potrebno



izvršiti hiruršku intervenciju, jer su u povećanom riziku od krvarenja. Zapažena je manja interindividualna varijabilnost u odgovoru na taj lek i izuzetno mali broj bolesnika koji pokazuju rezistenciju na prasugrel. Prasugrel predstavlja odličnu alternativu kod bolesnika koji pokazuju rezistenciju na klopidogrel (55).

Direktni i reverzibilni antagonisti P2Y<sub>12</sub> receptora kangrelor, tikagrelor i elinogrel mogu biti alternativna terapija tienopiridinima. Kangrelor pripada grupi ATP analoga koji ima veliki afinitet prema P2Y<sub>12</sub> receptoru. Taj lek ne zahteva konverziju u aktivan metabolit i svoj efekat dostiže odmah nakon intravenske primene (56). Poluživot kangrelora je 3–6 minuta. Nije pokazana superiornost ovog leka u odnosu na klopidogrel u prevenciji trombotičkih događaja kod bolesnika kod kojih je izvršena perkutana koronarna intervencija (PKI). Klinička efikasnost i primena ovog leka kao „bridging therapy” još uvek se proučava kod bolesnika kod kojih je zbog predstojeće hirurške intervencije potrebno ukinuti tienopiridine (55).

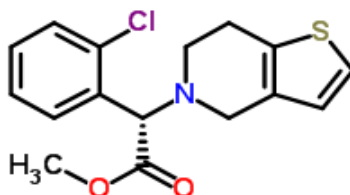
Tikagrelor pripada grupi ciklopentil-triazolo-pirimidina i reverzibilno se vezuje za P2Y<sub>12</sub> receptor (49). Poslednje studije su pokazale da način delovanja ovog leka nije kompetitivan sa ADP-om, što ukazuje da postoji nezavisno receptorsko mesto preko koga ispoljava svoj efekat. Primenjuje se oralnim putem. Poluživot tikagrelora je 7–8,5 sati (12). Oko 30%–50% leka eliminiše se CYP3A4 metabolizmom, pri čemu nastaje metabolit koji takođe ispoljava antitrombocitni efekat. Smatra se da je manje potentan lek u odnosu na kangrelor, ali da je superiorniji u odnosu na klopidogrel u prevenciji neželjenih događaja kod akutnog koronarnog sindroma (55).

Elinogrel je aktivan lek koji reverzibilno inhibira P2Y<sub>12</sub> receptor. Može se primeniti oralnim putem ili intravenski. Ovaj lek je još uvek u fazi kliničkih istraživanja (55).

I pored dostupnosti novih oralnih antitrombocitnih lekova, klopidogrel je i dalje najprimenljiviji antagonista P2Y<sub>12</sub> receptora (57).

### 1.4.2. Klopidogrel

Klopidogrel pripada grupi antagonista ADP trombocitnih receptora i predstavlja drugu generaciju tienopiridina (Slika 7).



**Slika 7.** Struktura klopidogrela (Preuzeto iz: ChemSpider website)

Ovaj antitrombocitni lek ireverzibilno se vezuje za P2Y<sub>12</sub> receptore trombocita i inhibira aktivnost GP IIb/IIIa receptora, čime utiče na finalnu fazu agregacije trombocita i na stabilizaciju koaguluma. Klopidogrel dovodi i do:

- fosforilacije fosfoproteina, intracelularnog signalnog molekula, koji stimulira vazodilataciju (VASP), pa samim tim i do smanjenja efekta P2Y<sub>12</sub> receptora,
- smanjenja ekspresije adhezionih molekula, kao što je P-selektin,
- smanjenja ekspresije inflamatornih markera, kao što je CD40L (58).

Ovaj lek je odobren 1997. godine i pošto je pokazao sličnu antitrombocitnu efikasnost, ali i to da je značajno bezbedniji lek za bolesnika, potpuno je zamenio tiklopidin.

Klopidogrel je oralni antitrombocitni lek koji se koristi za inhibiciju stvaranja koaguluma kod koronarnih arterijskih, perifernih vaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti (56). Klopidogrel se koristi za prevenciju aterotrombotičkih događaja kod bolesnika koji su imali infarkt miokarda (u rasponu od nekoliko dana do najviše 35 dana), ishemijski moždani udar (u rasponu od 7 dana do najviše 6 meseci) ili imaju potvrđenu bolest perifernih arterija, kao i kod bolesnika koji boluju od AKS (59). U kombinaciji sa aspirinom,

klopidogrel predstavlja zlatni standard za prevenciju tromboze stenta nakon PKI kod bolesnika sa AKS (60).

Kod pacijenata sa istorijom moždanog udara, poznato je da antitrombocitna terapija smanjuje incidence ponovnih ishemijskih događaja do 22%. Klopidogrel se pokazao superiornijim u odnosu na aspirin u smanjenju rizika i preporučen je za sekundarnu prevenciju od moždanog udara (61). Prema preporukama AHA i ACCF (American College of Cardiology Foundation) udruženja iz 2011. godine, kombinovana terapija aspirinom i klopidogrelom indikovana je kod bolesnika sa aterosklerotskom stenozom karotidnih arterija, koji su imali TIA ili ishemijski moždani udar (62).

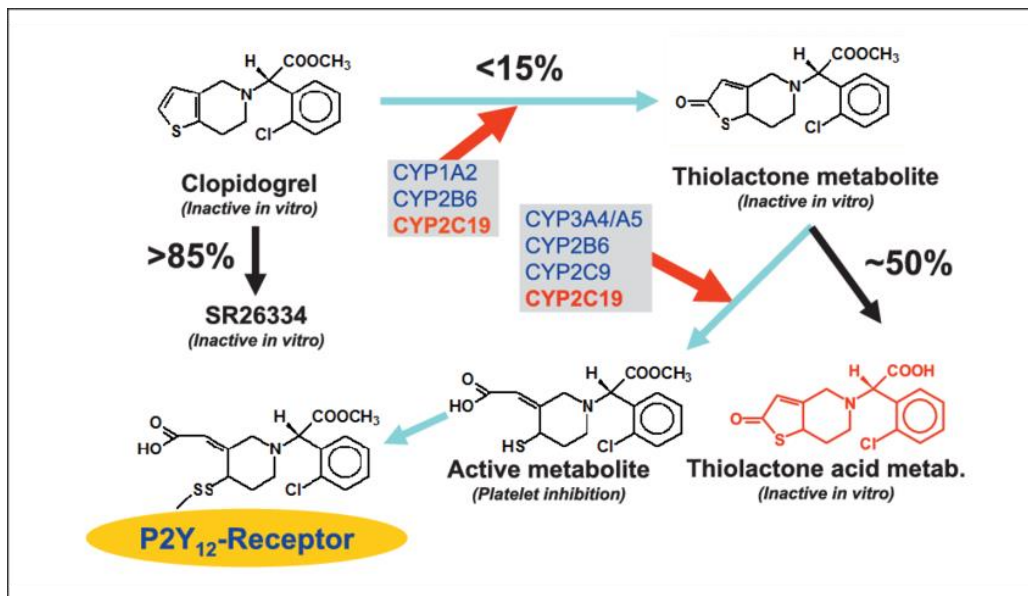
#### **1.4.2.1. Farmakokinetika i farmakodinamika klopidogrela**

Klopidogrel je prolek koji se apsorbuje u intestinumu, a aktivira se u jetri. Oko 85% apsorbovanog klopidogrela hidrolizuje se esterazama u inaktivni oblik, a 15% leka podleže hepatičnom metabolizmu (56). Na kraju se samo 2% klopidogrela vezuje i deluje preko purinergičkih P2Y<sub>12</sub> receptora (Slika 8) (63).

Mala količina oralno uzete doze klopidogrela se veoma brzo apsorbuje iz intestinuma. Bioraspoloživost leka zavisi od transportnih proteina, kao što je P-glikoprotein ispoljen na intestinalnim enterocitima, koji jedan deo leka odmah transportuje nazad u intestinalni lumen (58).

Metabolizam klopidogrela se odvija kroz dve faze u hepatocitima. U prvoj fazi procesom oksidacije formira se 2-okso-klopidogrel, koji je po strukturi tiolakton. Smatra se da u ovoj fazi učestvuju CYP2C19, CYP1A2 i CYP2B6 enzimi. U sledećoj fazi 2-okso-klopidogrel podleže hidrolizi, kada se prsten otvara formirajući aktivan metabolit R-130964. Enzimi CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 i CYP2B6 učestvuju u konačnom procesu formiranja aktivnog metabolita (50,64). Smatra se da je u procesu hidrolize uključena i esteraza paraoksonaza 1 (PON1) koja dovodi do hidroliznog oslobađanja gama-tiobutiroilaktonskog prstena iz 2-okso-klopidogrela (60,65).

Istovremeno, esteraze u jetri konvertuju klopidogrel i 2-okso-klopidogrel u inaktivni metabolit, tako da je mala količina klopidogrela prevedena u aktivnu formu (58). Većina apsorbovanog leka hidrolizovana je karboksilesterazom 1 (CES1), koja se primarno nalazi u jetri, u neaktivni karboksilni metabolit (S26334). Oko 50% 2-okso-klopidogrela je metabolizovan CES1 u neaktivan metabolit koji limitira količinu aktivnog metabolita sa antitrombocitnim efektom (52).



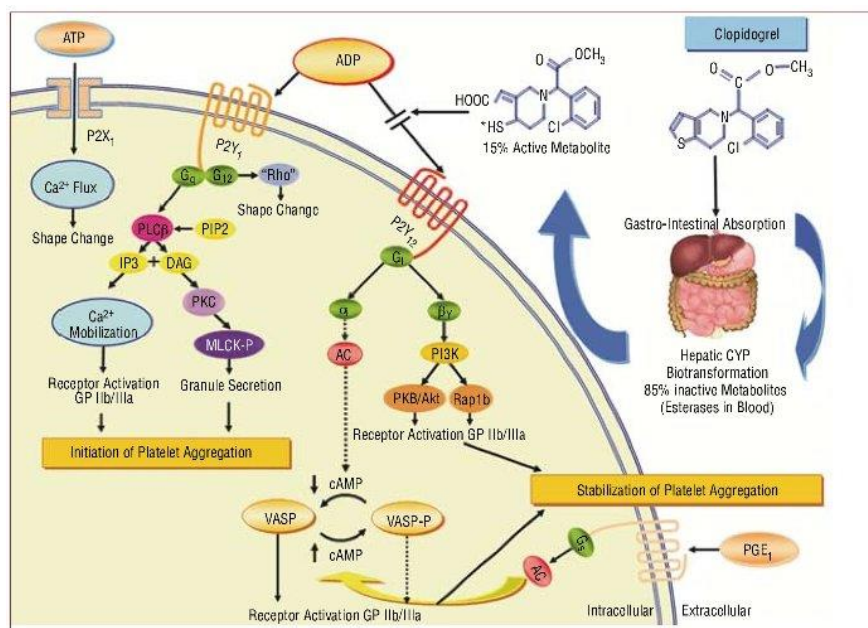
**Slika 8.** Metabolizam klopidogrela (Preuzeto iz: Trenk D; Kristensen S; Hochholzer W; Neuman F. High on-treatment platelet reactivity and P2Y12 antagonists in clinical trials Thromb Haemost 2013; 109: 834–845)

Postoje različita mišljenja o ključnom enzimu u metabolizmu leka. Istraživači su došli do saznanja da enzim CYP3A ima glavnu ulogu u prvom koraku oksidacije i da klopidogrel prvo podleže metabolizmu uz pomoć enzima CYP3A u enterocitima, a ne u hepatocitima (66).

Klopidogrel i inaktivni metaboliti izlučuju se putem urina (40%) i putem fecesa (35%–60%) (67).

Proizvođač Sanofi je sproveo nekoliko studija s ciljem utvrđivanja strukture aktivnog metabolita. Prve rezultate su objavili Savi i istraživači (68), koji su pokazali da samo jedan od 8 mogućih stereoizomera aktivnog metabolita imaju antitrombocitnu

aktivnost.. Aktivni metabolit klopidogrela sadrži otvoren prsten s karboksilnom i tiolnom grupom, koja se vezuje disulfidnim mostovima za dva ekstracelularna cisteinska ostatka P2Y<sub>12</sub> receptora. Dolazi do ireverzibilne promene receptora, tako da su vezivanje ADP i aktivacija ovog receptora onemogućeni (58). Vezujući se za receptor, klopidogrel dovodi do aktivacije adenilat ciklaze i povećanja koncentracije cAMP, smanjene aktivacije PI3K i ekspresije GP IIb/IIIa receptora (50). Istovremeno, cAMP zavisna protein kinaza, koja aktivira trombocite, inaktivirana je fosforilacijom VASP, što dovodi do inhibicije funkcije trombocita (69) (Slika 9).



**Slika 9.** Mehanizam delovanja klopidogrela (Preuzeto iz: Angiolillo D, Luis Ferreiro J. Platelet Adenosine Diphosphate P2Y<sub>12</sub> Receptor Antagonism: Benefits and Limitations of Current Treatment Strategies and Future Direction. Rev Esp Cardiol. 2010;63:60-76.)

Zbog ireverzibilne inhibicije P2Y<sub>12</sub> receptora, efekat klopidogrela je prisutan tokom života trombocita (7–10 dana). Oporavak ćelija se očekuje u periodu od 3 do 5 dana, odnosno trombociti su potpuno funkcionalni, u proseku, za 7 dana nakon uzete poslednje doze leka (67). Maksimalna inhibicija P2Y<sub>12</sub> receptora je dostignuta nakon 4-5 dana svakodnevnog uzimanja 75 mg klopidogrela. Ovaj interval se može svesti na 3-5 sati uzimanjem udarne doze od 300-600 mg (70). Zato je ACCF/AHA preporuka da se kod određenih kliničkih stanja primenjuje inicijalna doza klopidogrela 300 ili 600 mg, koju

prati standardna doza održavanja od 75 mg dnevno oko 12 meseci (71,72). Međutim, fiksne doze leka ne uzimaju u obzir interindividualnu varijabilnost terapije klopidogrelom (73).

Dakle, pored dokazanog antitrombocitnog efekta, klopidogrel ima i svoje nedostatke:

- njegov antitrombocitni efekat odložen je zbog potrebnog metabolizma i aktivacije proleka,
- ireverzibilna inhibicija P2Y<sub>12</sub> receptora može predstavljati prepreku za bolesnike kod kojih je potrebno izvršiti urgentni hirurški zahvat (npr. koronarna bypass hirurgija),
- pokazana je interindividualna varijabilnost u terapijskom odgovoru na lek (12).

#### **1.4.2.2. Rezistencija na klopidogrel i genetičke osnove rezistentnosti**

Klopidogrel efikasno štiti od trombotičkih događaja kod bolesnika sa aterosklerotskim vaskularnim bolestima. Međutim, terapijski odgovor na klopidogrel je varijabilan među bolesnicima. Relevantan broj studija pokazao je da je prisustvo visoke reaktivnosti trombocita prilikom primene klopidogrela povezano s povećanim rizikom od ishemijskih događaja (50). U metaanalizi Sofi i saradnika pokazano je da su bolesnici s koronarnom arterijskom bolešću, koji su pokazali loš terapijski odgovor na klopidogrel nakon PKI, u povećanom riziku od kardiovaskularnih događaja u odnosu na bolesnike sa dobrim terapijskim odgovorom na lek (74).

Procena rezistencije na klopidogrel zavisi od metode kojom pratimo agregaciju i definišemo visoku reaktivnost trombocita tokom terapije. U literaturi, prevalenca rezistencije na ovaj lek varira od 5% do 44% (75) i najveća je kod bolesnika sa moždanim udarom (76).

Pošto su mala koncentracija i dostupnost aktivnog metabolita povezani sa smanjenim antitrombocitnim efektom leka i pojavom neželjenih ishemijskih događaja, smatra se da su pojedinačni nukleotidni polimorfizmi gena koji kodiraju transportne proteine i enzime koji

učestvuju u metabolizmu leka povezani sa antitrombocitnim efektom klopidogrela. Polimorfizam gena koji su uključeni u apsorpciju (ABCB1), metabolizam (CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4/5) i delovanje leka (P2Y12, ITGB3) identifikovani su kao potencijalni uzročnici smanjenog odgovora na klopidogrel (52).

Kako bi se identifikovale varijante gena koje utiču na terapijski odgovor bolesnika na klopidogrel, proučavan je veliki broj kandidata. Geni koji kodiraju CYP P450 enzime polimorfni su i otkrivene su genske varijante koje utiču na transformaciju klopidogrela u aktivni metabolit (77). GWAS (Single genome-wide association study) i PAPI (Pharmacogenomics in Antiplatelet Intervention) studije otkrile su i pokazale da su varijante gena u okviru *cluster*a CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8 na hromozomu 10q2 povezane sa smanjenim odgovorom na klopidogrel kod zdravih Amiša (78). Ova studija je takođe odredila da je odgovor trombocita na terapiju klopidogrelom visoko "heritable trait" ( $h^2=0.73$ ).

Pošto enzim CYP2C19 učestvuje u oba procesa metabolizma klopidogrela, dosta se izučavao polimorfizam gena koji kodira ovaj enzim. *CYP2C19* gen je lociran na hromozomu 10 (10q24.1-q24.3) i sadrži 490 aminokiselinskih ostataka (60). Ovo je najpolimorfiji gen unutar CYP2C subfamilije, sa preko 2000 pojedinačnih nukleotidnih varijanti (SNV). The Human Cytochrome P450 (*CYP*) Allele Nomenclature Database (79, 80) sadrži 35 varijanti *CYP2C19* gena sa zastupljenošću koja varira među etničkim grupama. Pokazano je da neki aleli utiču na enzimsku funkciju, samim tim i na farmakokinetiku i efikasnost klopidogrela (81, 82) (Tabela 1). *CYP2C19\*1/\*1* genotip predstavlja *wild type* i odgovoran je za normalan metabolizam klopidogrela. *CYP2C19\*2* i *CYP2C19\*3* aleli su najčešće varijantne gena koje dovode do gubitka enzimske funkcije (77). *CYP2C19\*2* alel predstavlja *crupitic splice* G681A mutaciju u okviru egzona 5 koja rezultira odsustvom enzimske aktivnosti *in vivo*. *CYP2C19\*3* alel predstavlja G636A mutaciju koja sadrži *stop* kodon u egzonu 4. Nosioци ovih alela imaju smanjen metabolizam klopidogrela i smanjenu inhibiciju trombocita

indukovanu klopidogrelom. Postoje i mutacije u okviru inicijalnog kodona (CYP2C19\*4), *splice* mutacija u okviru introna 5 (CYP2C19\*7), izmena amino-kiselina u vezujućem regionu (CYP2C19\*5), izmena Arg132Gln u eksonu 3 (CYP2C19\*6) i Trp120Arg u egzonu 3 (CYP2C19\*8) (83). Navedene genske varijantne prati odsustvo funkcije enzima, ali njihov uticaj na inhibiciju trombocita klopidogrelom još uvek nije dokazan. Identifikovane CYP varijante gena koje su takođe povezane sa smanjenim terapijskim odgovorom na klopidogrel su CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, CYP2B6\*6, CYP2B6\*9, CYP3A4\*1B, CYP3A4\*3 i CYP3A5\*3. (63)

CYP2C19\*17 alel predstavlja C806T mutaciju u egzonu 5 i odgovoran je za povećanu katalitičku sposobnost CYP2C19 enzima zbog povećane transkripcije ovog gena (52). Prisustvo ovog alela dovodi do ubrzanog metabolizma, povećane produkcije aktivnog metabolita i povećane inhibicije trombocita klopidogrelom. Nosioci CYP2C19\*17 alela imaju značajno nisku reaktivnost trombocita i visok rizik od krvarenja tokom lečenja u odnosu na nenosioce (60).

**Tabela 1.** Najčešći CYP2C19 aleli i njihov uticaj na funkciju CYP2C19 enzima

CYP2C19 alel	Nukleotidna izmena	Uticaj na enzimsku funkciju	Prevalenca kod različitih populacija (%)
*1	Nema ( <i>wild type</i> )	normalna funkcija	
*2	681G>A	inaktivan enzim	25 – 55
*3	636G>A	inaktivan enzim	1 – 7
*4	1A>G	inaktivan enzim	<1
*5	1297C>T	inaktivan enzim	<1
*17	991A>G	povećana funkcija	4 – 41

Tabela modifikovana prema: Kubica A, Kozinski M, Grzesek G et al. Genetic determinants of platelet response to clopidogrel. J Thromb Thrombolysis. 2011;32:459-466)

Prevalenca različitih alela varira između etičkih grupa. CYP2C19\*2 je najfrekventnija varijanta gena. Ovaj alel je prisutan kod 40% Afrikanaca i kod preko 55% Azijata (77). CYP2C19\*1/\*2 genotip je zastupljen kod oko 25% pripadnika bele rase, dok je



CYP2C19\*2/\*2 genotip veoma redak (oko 2%). Prevalenca ostalih alela je manja od 1%, pa je samim tim i njihov klinički uticaj neznatan, osim kod Azijata kod kojih je zastupljenost CYP2C19\*3 alela 2%–9% (84). Zastupljenost CYP2C19\*17 alela je 15%–30% kod bele rase (kod nemačke populacije 41%) i oko 4% kod kineske populacije (77).

Najfrekventnije genske varijante CYP2C19\*2 i CYP2C19\*17 smatraju se važnim faktorima koji utiču na varijabilnost antitrombocitnog efekta klopidogrela. Neki autori smatraju da aleli CYP2C19\*2 i CYP2C19\*17 nisu nezavisni. Osobe koje su nosioci bar jednog CYP2C19\*17 alela imaju malu verovatnoću da poseduju i CYP2C19\*2 alel i obrnuto. Po nekim autorima, uzimajući u obzir prirodu ovih varijanti gena, izražen odgovor na klopidogrel kod osoba s jednim ili više CYP2C19\*17 alela može biti i zbog nedostatka CYP2C19\*2 varijante gena (85,86).

Povezanost CYP2C19\*2 alela i visoke reaktivnosti trombocita prilikom terapije klopidogrelom potvrđena je u *in vitro* studijama koje su uključivale zdrave volontere (87–90), ali i bolesnike sa kardiovaskularnim bolestima koji su lečeni klopidogrelom (91–98). Prva studija koja se bavila praćenjem agregacije trombocita prilikom terapije klopidogrelom uključivala je 28 volontera. ADP-indukovana agregacija trombocita u toku primene klopidogrela (75 mg dnevno) bila je povećana kod nosioca CYP2C19\*2 alela (99). Postoje dokazi da nosioci bar jednog CYP2C19\*2 alela imaju i povećan rizik od neželjenih događaja tokom terapije klopidogrelom. U studijama TRITON-TIMI 38 i PLATO utvrđen je povećan rizik od neželjenih događaja kod nosioca CYP2C19\*2 alela koji su primali klopidogrel u odnosu na nenosiocce (100,101). Takođe, studija koja je uključila bolesnike sa akutnim moždanim udarom ukazala je na to da bolesnici sa CYP2C19\*2 alelom imaju smanjen odgovor na klopidogrel i lošiji klinički ishod nakon moždanog udara (24). Collet i saradnici (91) pokazali su multivarijantnom analizom da je CYP2C19\*2 alel nezavistan prediktor kardiovaskularnih događaja kod mlađih osoba, kod kojih se klopidogrel primenjuje nakon infarkta miokarda. Druga studija je pokazala da je CYP2C19\*2 nezavistan prediktor tromboze stenta i ishemijskih događaja kod bolesnika nakon PKI (102).

Međutim, postoje studije i metaanalize koje pokazuju manji uticaj CYP2C19 genotipa na klinički efekat klopidogrela (103–106). CURE i ACTIVE studije nisu pronašle povezanost

između povećane incidence neželjenih događaja i prisustva *CYP2C19\*2* alela (106). Neki autori su pokazali da je efekat klopidozola sličan kod osoba sa homozigotnom i heterozigotnom formom *CYP2C19\*2* varijante gena i kod osoba koji nisu nosioci pomenutog alela (107,108). Trenk i saradnici (109) su proučavali uticaj *CYP2C19\*2* alela na različite parametre funkcije trombocita, kao i na incidencu infarkta miokarda i smrti tokom jednogodišnjeg praćenja bolesnika nakon PKI. Autori su potvrdili uticaj alela na funkciju trombocita i na odgovor trombocita na terapiju, ali ne i uticaj alela na klinički ishod. Iako postoje kliničke studije u kojima je pokazana povezanost *CYP2C19\*2* alela i neželjenih kliničkih događaja, uključujući i povećan rizik od tromboze stenta nakon PKI, ovakav zaključak nisu dali istraživači studija u koje su uključeni bolesnici s koronarnom arterijskom bolešću ili bolesnici sa drugim indikacijama kao što je atrijalna fibrilacija (106, 110). Metaanaliza Holmes i saradnika je obuhvatila studije koje su uključile populaciju bolesnika kod kojih nije primenjivana PKI ili bolesnike koji nisu oboleli od koronarnih bolesti. Rezultati istraživanja nisu pokazali značajan uticaj *CYP2C19\*2* varijante gena na razvoj kardiovaskularnih događaja u toku terapije klopidozolom (111).

Na osnovu rezultata do tada objavljenih studija i ustanovljene veze između *CYP2C19\*2* genotipa i rizika od ishemijskih događaja kod bolesnika koji su primali klopidozol nakon PKI, FDA je 12. marta 2010. godine odobrio upozorenje na pakovanju leka, kojim se lekari i bolesnici obaveštavaju o smanjenoj efikasnosti leka kod osoba sa smanjenom sposobnošću da metabolišu lek u njegovu aktivnu formu (65). Preporuka od strane FDA sadrži farmakogenetički odeljak u kome se ukazuje na uticaj *CYP2C19* polimorfizma i koristi farmakogenetičkih ispitivanja u identifikaciji *CYP2C19* genotipova (112). Trebalo bi istaći da se FDA upozorenje odnosilo samo na *CYP2C19\*2/\*2*, *CYP2C19\*3/\*3* ili *CYP2C19\*2/\*3* genotipove. U svom izveštaju iz juna iste godine, ACCF i AHA udruženja istakla su svoje neslaganje sa FDA upozorenjem i rutinskim genetičkim testiranjem, navodeći da je samo kod 12% varijabilnosti terapijskog odgovora na klopidozol odgovorna *CYP2C19\*2* varijanta gena (86). Međutim, u istom izveštaju sugerisano je da bi genetička testiranja trebalo razmatrati kod bolesnika sa srednjim ili visokim rizikom od razvoja neželjenih događaja i da bi „lošim metabolizerima” (nosioci *CYP2C19\*2/\*2*, *CYP2C19\*3/\*3* ili *CYP2C19\*2/\*3* genotipa) trebalo preporučiti alternativnu terapiju. Prema preporuci CPIC

(Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium), bolesnici sa AKS ili nakon PKI, nosioci bar jednog navedenog alela, trebalo bi da prime alternativnu terapiju kako bi se smanjio rizik od neželjenih događaja (84). Udruženja ACCF/AHA u svojim preporukama objavljenim 2012. godine ne savetuju rutinsko genetičko testiranje, ali smatraju da bi trebalo sprovoditi testiranje ukoliko bi dobijeni rezultati uticali na odluku o terapiji bolesnika, naročito kod ponovljenih kardiovaskularnih događaja koji su se razvili tokom terapije klopidogrelom (113). Dalje, istraživači Vanderbilt univerziteta zalagali su se da se implementira preventivno određivanje *CYP2C19* genotipa kod bolesnika kod kojih se planira uvođenje terapije klopidogrelom (84).

*CYP2C19* genotip utiče na efikasnost klopidogrela i kod bolesnika sa moždanim udarom (114, 115), što ukazuje na mogućnost da bi u budućnosti genetičko testiranje bilo korisno kod ove grupe bolesnika.

*CYP2C19\*17* alel je odgovoran za povećanu enzimsku aktivnost koja dovodi do povećane bioaktivacije klopidogrela. Klinički uticaj ovog polimorfizma je diskutabilan, s obzirom na to da su neki autori pokazali povezanost krvarenja sa ovim alelom (116), dok neke studije nisu došle do ovog zaključka (101, 106–108).

Pored *CYP2C19* gena, dostupni su literaturni podaci o kliničkom uticaju gena uključenih u apsorpciju (*ABCB1*) i aktivaciju leka (*PON1*), intracelularni prenos signala (*ITGB3*, koji kodira integrin beta3 GPIIb/IIIa receptora) ili o uticaju gena koji kodiraju vezujuće mesto aktivnog metabolita. Neka istraživanja su pokazale da ovi geni dovode do povećanog rizika od ishemijskih događaja. Međutim, mnoge studije nisu potvrdile ova viđenja (8).

Smatra se da je polimorfizam *ABCB1* gena (ATP-vezujući protein subfamilije B član 1) koji kodira P-glikoprotein veoma važan segment kardiovaskularne genetike (54). Genetička varijanta C3435T je povezana sa smanjenom funkcijom interstinalnog transportera. Kod francuske populacije, prevalenca homozigotne forme CC je 25,8%, heterozigotne CT 48% i homozigotne forme TT je 26,2% (117). Mega i saradnici (100) su kod zdravih osoba tretiranih klopidogrelom, koji su nosioci C3435T varijante gena, zapazili smanjenu inhibiciju trombocita i povećan rizik od razvoja ishemijskih događaja. Takođe, metaanaliza autora Luo i saradnika ukazuje na povezanost *ABCB1* CT genotipa i rizika od tromboze stenta, ali i

krvarenja kod bolesnika koji su primali klopidogrel (118). Međutim, druge studije ukazuju na to da nosioci ABCB1 CT genotipa nisu u povećanom riziku u odnosu na *wild type*, dok su nosioci ABCB1 TT genotipa imali smanjen antitrombocitni efekat klopidogrela u odnosu na prasugrel (100,101). Pronađeno je da je kod nosioca ABCB1 TT genotipa smanjena koncentracija klopidogrela i njegovog aktivnog metabolita u poređenju sa nosiocima *wild-type* genotipa (63). Neki autori sugerišu da je C3435T alel povezan sa neželjenim događajima i smanjenom koncentracijom aktivnog metabolita klopidogrela u prisustvu CYP2C19 polimorfizma kog prati smanjen metabolizam leka (58). Nije dokazano da je ABCB1 nezavisni prediktor neželjenih događaja (77).

Gen P2RY12 kodira P2Y12 receptor i identifikovana su dva alela, H1 (G52T) i H2 (T744C), čija je frekvencija 86% odnosno 14% (13). Staritz i saradnici (119) su u svom istraživanju sa zdravim dobrovoljcima koji su tretirani klopidogrelom pokazali da su nosioci H2/H2 genotipa imali povećanu ADP-indukovanu agregaciju trombocita, odnosno loš odgovor na klopidogrel u odnosu na H1/H2 i H1/H1 genotipove. Međutim, skorašnje studije su zaključile da ovaj alel nema uticaja na funkciju trombocita kod bolesnika koji su lečeni klopidogrelom nakon PKI. U genetičkoj analizi FAST-MI koja uključuje bolesnike sa infarktom miokarda, nije dokazana povezanost polimorfizma P2Y12 receptora s povećanim rizikom od neželjenih događaja (117). S njima se slažu i druge studije (88,102), što navodi na zaključak da je efekat pomenutih alela slab i da nije klinički značajan.

G143E mutacija značajno smanjuje katalitičku aktivnost CES1 enzima, pri čemu dovodi do povećanja koncentracije aktivnog metabolita i izraženije inhibicije trombocita klopidogrelom. Usled nedovoljno podataka, još uvek nije poznat uticaj ove mutacije na klinički ishod (52). Zastupljenost ovog alela u populaciji iznosi oko 2% i smatra se da njegov uticaj zavisi od prisustva CYP2C19\*2 alela (86).

Paraoksonaza 1 je esteraza koja se sintetiše u jetri. Bouman i saradnici (120) smatraju da je ovo ključan enzim u metabolizmu klopidogrela. U njihovom istraživanju pronašli da PON1 Q192R varijanta gena dovodi do niskih koncentracija aktivnog metabolita, zbog veoma slabe konverzije 2-okso-klopidogrela i da je mutacija Q192R, koja dovodi do sinteze nefunkcionalnog enzima, odgovorna za oko 70% varijabilnosti u terapijskom odgovoru na

klopidogrel. Međutim, naredne studije nisu pronašle vezu između ove mutacije i antitrombocitnog efekta leka niti povezanost mutacije sa rizikom od razvoja kardiovaskularnih događaja. Smatra se da razlog različitih zaključaka leži u stereochemiji aktivnog metabolita. *Cis*-diastereoizomer tiol metabolita nastaje zahvaljujući CYP enzimima, dok PON1 stvara *trans*-diastereoizomer, koji ispoljava veoma slab antitrombocitni efekat (52, 121).

Do sada, dakle, podaci u literaturi ukazuju na uticaj polimorfizma *CYP2C19* na terapijski odgovor bolesnika na klopidogrel, dok ABCB1, PON1, P2RY12 i drugi CYP geni nisu klinički relevantni, ali nije isključeno da mogu učestvovati na druge do sada nepoznate načine na dejstvo klopidogrela (86).

#### **1.4.2.3. Značaj genetičkih istraživanja**

Istraživanja genoma, između ostalog, imaju veliki značaj u pogledu mogućnosti predviđanja terapijskog odgovora na neki lek. Jedan od obećavajućih ishoda ovakvih istraživanja je mogućnost individualnog prilagođavanja terapije na osnovu informacija dobijenih analizom DNK bolesnika. Smatra se da individualizacija terapije na osnovu genetičkog ispitivanja smanjuje troškove laboratorijskog praćenja, posete lekarima i troškove hospitalizacije. Ovaj pristup bi mogao imati prognostički značaj pre uvođenja terapije ili dijagnostički u korekciji rezistencije na lek. Cilj personalizovane medicine jeste da optimizira odnos rizik/korist i odnos troškovi/korist, identifikujući najbolji mogući tretman za svakog bolesnika. Tretman prilagođen bolesniku zasnovan na rezultatima laboratorijskih testova i poznavanju genetičkog statusa može omogućiti prilagođavanje doze leka sa nepredvidljivom i varijabilnom biološkom raspoloživosti ili primenu alternativne terapije (54).

Genetička ispitivanja u slučaju klopidogrela mogu da ukažu na nemogućnost metabolizma ovog leka, kao i njegove aktivacije (112). *CYP2C19* genetička testiranja imaju relativno nisku pozitivnu prediktivnu vrednost za visoku reaktivnost trombocita prilikom terapije klopidogrelom (oko 20%). Osetljivost i specifičnost *CYP2C19\*2* testiranja za predikciju visoke reaktivnosti trombocita iznosi 38% i 80%. Isto tako, literaturni podaci

pokazuju da značajan procenat bolesnika koji nisu nosioci pomenutog alela mogu da imaju visoku reaktivnost trombocita tokom terapije klopidogrelom i ne mogu se detektovati prateći samo negativni genetički nalaz. To ukazuje da bi podatke o *CYP2C19* genotipu, dostupan fenotip i kliničke podatke trebalo uključiti u algoritam određivanja antitrombocitne terapije (51).

### 1.4.3. Metode određivanja reaktivnosti trombocita

*In vivo* funkcija trombocita može se pratiti vremenom krvarenja, dok se za *in vitro* proučavanje reaktivnosti trombocita koristi nekoliko testova (Tabela 2).

**Tabela 2.** Laboratorijske metode određivanja reaktivnosti trombocita

	Naziv testa	Princip testa
Testovi zasnovani na praćenju agregacije trombocita	LTA (light transmission aggregometry)	Optičko praćenje povećanja transmitovane svetlosti usled agregacije trombocita delovanjem agoniste.
	Impedantna agregacija trombocita	Praćenje povećanja električne impedance usled agregacije trombocita delovanjem agoniste.
	VerifyNow sistem	Praćenje agregacije trombocita u punoj krvi usled delovanja agoniste.
	Plateletworks	Brojanje trombocita pre i posle aktiviranja trombocita u punoj krvi.
Testovi zasnovani na adheziji trombocita	PFA-100 sistem	Merenje vremena formiranja trombocitnog koaguluma prilikom protoka krvi kroz uzani prostor.
	ImpactCone sistem	Viskozimetar prati adheziju i agregaciju trombocita.
Funkcionalni testovi	Tromboelastografija i tromboelastometrija	Praćenje brzine formiranja koaguluma do koga dolazi usled delovanja agoniste.
	Flow citometrija	Detekcija fluorescentno obeleženih trombocita pomoću lasera.
	Praćenje metabolita TXA2	Merenje koncentracije TXA2 metabolita radio-imunološkim ili enzimsko - imunološkim testovima.

Tabela modifikovana prema: Marcucci R, Grifoni E, Giusti B. On-treatment platelet reactivity: State of the art and perspectives. *Vascular Pharmacology*. 2016;77:8-18.

Vreme krvarenja po Dukeu je invazivna tehnika i koristi se za procenu sposobnosti trombocita da stvaraju koagulum. Ovaj test je slabo reproducibilan pošto na njega utiču mnogi faktori: broj trombocita, faktori koagulacije, eritrociti, stanje zida krvnog suda. Iz navedenih razloga, ova metoda nije dovoljno osetljiva na stečene i nasledne defekte funkcije trombocita i ne bi trebalo da se koristi za praćenje efekta antitrombocitnih lekova (122).

- Testovi zasnovani na praćenju agregacije trombocita

Agregometrija predstavlja funkcionalan test koji se zasniva na stimulaciji agregacije trombocita različitim agonistima i može da se koristi za praćenje efekta antitrombocitne terapije (123). ADP dovodi do amplifikacije aktivacije trombocita i esencijalan je za proces agregacije. Očekivano, inhibicija uloge ADP-a, kao agoniste, utiče ne samo na formiranje koaguluma *in vivo* već i na *in vitro* aktivaciju trombocita. Zato su u mnogim studijama upotrebljivane različite tehnike, koje su koristile ADP za praćenje trombocitne aktivnosti *in vitro* kako bi istraživači pratili stepen inhibicije antitrombocitnim lekovima i predvideli rizik od aterotrombotičkih događaja (124).

LTA (light transmittance aggregometry) predstavlja jedan od prvih testova i smatra se zlatnim standardom za praćenje antiagregacionog efekta lekova (125). Ovaj test je Born G. opisao 1962. godine. Antiagregacijski efekat antitrombocitnih lekova određuje se merenjem transmisije svetlosti kroz plazmu bogatu trombocitima posle izlaganja agonisti, pri čemu se, kao standard, koristi plazma siromašna trombocitima (126). LTA prati povećanje transmisije svetlosti kroz suspenziju trombocita, do kojeg dolazi usled nastanka agregata (122). Antiagregacijski efekat se izražava kao apsolutna ili relativna promena agregabilnosti pre i posle delovanja leka ili kao reaktivnost trombocita, koja zahteva samo jedno merenje posle primene leka (126). Međutim, ovaj test nije pogodan za praćenje efekta terapije iz nekoliko razloga. LTA nije standardizovan test pošto postoji varijabilnost u primenjenim agonistima, njihovim koncentracijama, izražavanju rezultata i definiciji *cut-off* vrednosti. Tačnost i reproducibilnost testa je veoma mala pošto mnogi faktori utiču na izvođenje testa. Nedostatak standardizacije onemogućava pređenje rezultata dobijenih u različitim laboratorijama. Dok su pojedini autori ukazali na značajnu kliničku korist ovog

testa, postoje studije koje su ukazivale na to da on može da preceni incidencu rezistencije na klopidogrel (124).

Verify Now System (Accumetrics Inc. San Diego, California, USA) prati agregaciju trombocita preko aglutinacije zrnaca obloženih humanim fibrinogenom, do koje dovode aktivirani trombociti stimulisani agonistima u citratnoj punoj krvi (122). Ovaj sistem meri indukovanu agregaciju trombocita ADP-om i prostaglandinom E1, prateći povećanje transmisije svetlosti (P2Y12 test). On koristi i izo-trombin receptor aktivirajući peptid (iso-TRAP) koji aktivira trombocite bez obzira na delovanje klopidogrela. Rezultati se izražavaju u PRU (platelet reactivity unit) jedinicama pokazujući stepen agregacije posredovane P2Y12 receptorima. Drugi način izražavanja rezultata je procenat inhibicije i predstavlja promenu vrednosti bazične agregabilnosti. P2Y12 test je pokazao dobru korelaciju sa LTA testom (125).

Multipla elektrodna agregometrija (MEA) ili impedantna agregometrija meri promenu električne impedance prilikom formiranja trombocitnih agregata, na bakarnoj elektrodi, koja je obložena tankim slojem srebra i uronjena u uzorak razblažene pune krvi. Kod ovog testa prati se električna impedanca kod dva nezavisna para elektroda, na čijoj površini dolazi do adhezije trombocita i agregacije, nakon dodatka agoniste aktivacije trombocita. Rezultati koji pokazuju da bolesnik nije adekvatno odgovorio na terapiju mogu da ukažu na rezistenciju ukoliko je prethodno isključena mogućnost neuzimanja leka. Kod MEA testa eliminisani su potencijalni nedostaci LTA (centrifugiranje, varijabilna reproducibilnost, velika zapremina uzorka, vreme do rezultata) (123). Puna krv se smatra uzorkom izbora, čime se izbegava centrifugiranje, koje može da ošteti trombocite, i omogućava praćenje funkcije trombocita u prisustvu ostalih krvnih ćelija (127). Pošto nije potrebno centrifugiranje uzorka, kod MEA se dobijaju podaci o agregaciji trombocita za 10 minuta. MEA je standardizovan test i rezultati iz različitih laboratorija mogu međusobno da se porede dokle god se laboratorije pridržavaju preporuka proizvođača (70). Dobra reproducibilnost ovog testa je već utvrđena (manje od 6% varijabilnosti) (123).

Lumiagregometrija predstavlja test koji prati oslobođeni ATP iz aktiviranih trombocita. Delovanjem različitih agonista, ADP se oslobađa iz granula trombocita, koji se zatim



konvertuje u ATP. Ovaj test omogućava istovremeno praćenje agregacije trombocita i određivanje koncentracije oslobođenog ATP; on reaguje sa luciferin-luciferazom dovodeći do emitovanja svetlosti koju kvantifikuje lumiagregometar. Lumiagregometrija predstavlja skrining test kod bolesnika sa sumnjom na poremećaje funkcije trombocita ili sekrecije sadržaja granula (122).

Agregometrija koja se zasniva na brojanju trombocita pre i nakon dodatka agoniste izuzetno je osetljiva i jednostavna metoda praćenja agregabilnosti trombocita. Dodatkom agoniste broj trombocita se smanjuje u odnosu na bazalne vrednosti ovih krvnih ćelija kod bolesnika. Na ovaj način mogu da se detektuju i izuzetno mali agregati koje čine dva do tri trombocita, što nije moguće sa LTA testom. Međutim, podaci o proceni terapijskog efekta klopidogrela sa ovim testom veoma su oskudni u literaturi (124).

Plateletworks (Helena Laboratories, Beaumont, Texas, USA) određuje procenat agregacije trombocita u svežoj punoj krvi. Prvo se određuje bazični broj trombocita brojačem. Zatim se ćelije broje uz dodatak 20  $\mu\text{mol/L}$  ADP, koji će aktivirati neinhibirane trombocite lekom. Dodatkom agoniste nastaju agregati veći od trombocita, koji se neće izbrojati kao individualne ćelije. Odnos između ova dva brojanja predstavlja procenat inhibicije. Test je pokazao dobru korelaciju sa LTA. Nedostatak ovog testa je što mora da se izvede par minuta nakon uzorkovanja (126).

- Testovi zasnovani na adheziji trombocita

Platelet Function Assay-100 (PFA-100 system, Dade Behring, Miami, Florida, USA) smatra se *in vitro* određivanjem vremena krvarenja. Uzorak pune krvi aspirira se kroz kapilaru, koja igra ulogu male arterije i aperturu sa membranom, koja imitira povređeni deo krvnog suda. Membrana je obložena kolagenom u kombinaciji sa ADP ili epinefrinom. Formirani trombocitni koagulum zatvara aperturu i ometa kretanje krvi, a sistem prati vreme u kom se dešava ovaj proces. Osetljivost ove tehnike na efekat lekova je mala, što se objašnjava varijablama koje utiču na samu metodu: broj trombocita i eritrocita, vWf, hematokrit (122). Nekoliko studija je pokazalo da ova metoda ne može da detektuje varijabilni efekat klopidogrela (126).

Cona and platelet analizator - Impact-R analyzer predstavlja viskozimetar koji meri adheziju trombocita i agregaciju. Primarno se koristi za detekciju von Willebrandove bolesti i za praćenje tretmana GPIIb/IIIa antagonistima (124). Ova tehnika nije standardizovana i reproducibilnost zavisi od operatera (70).

- Funkcionalni testovi

Tromboelastografija i tromboelastometrija su metode koje omogućavaju procenu celokupnog hemostatskog procesa, praćenjem promena koje se dešavaju tokom formiranja koaguluma u punoj krvi. Kod ovih metoda trombociti učestvuju u svim procesima hemostaze i zato na rezultate mogu uticati, pored funkcionalnosti trombocita, faktori koagulacije, inhibitori koagulacije i proces fibrinolize. Tromboelastografija i tromboelastometrija mere fizička svojstva formiranog koaguluma koristeći oscilirajuću čašicu sa uzorkom pune krvi u kojoj se nalazi igla. Magnituda kretanja igle direktno je povezana sa jačinom veze između fibrina i trombocita. Dodatkom ADP, ove metode se mogu koristiti i za praćenje terapije klopidogrelom. Do sada postoji veoma malo podataka o kliničkoj primeni ovih metoda u praćenju antitrombocitne terapije (122).

Flow citometrija omogućava *in vitro* proučavanje reaktivnosti trombocita i detekciju cirkulišućih aktivnih trombocita, agregata trombocita i leukocita i mikropartikula trombocita. VASP test meri inhibiciju fosforilacije VASP proteina i primenjuje se za direktnu procenu inhibicije P2Y12 receptora. Zbog toga je ovaj test izuzetno specifičan za praćenje efekta tienopiridina. Rezultati VASP testa mogu se porediti iz različitih ustanova. Iako postoji globalno slaganje između metoda koje se zasnivaju na ADP-indukovanoj agregaciji trombocita i VASP testa, postoje osobe koje na osnovu rezultata LTA testom imaju loš odgovor na terapiju dok VASP test ukazuje na to da imaju dobar odgovor na tretman (124). Pokazano je da VASP test ne uključuje ulogu P2Y1 receptora, za razliku od agregometrijskih metoda (73). Siller-Matula i saradnici (123) pokazali su da detektovana hiperreaktivnost trombocita MEA metodom ima prediktivnu vrednost za predikciju tromboze stenta u odnosu na VASP test.

Najčešće metode koje se danas koriste za procenu funkcije trombocita je LTA, MEA i Verify Now, koje se zasnivaju na praćenju ADP-indukovane agregacije trombocita. LTA

metoda, zbog dugotrajnog izvođenja, zahteva obučeno osoblje i nije praktična za kliničku rutinsku upotrebu. MEA i Verify Now koriste punu krv i omogućavaju brzu i jednostavnu procenu funkcije trombocita sa mogućnošću donošenja brze odluke u vezi sa tretmanom pacijenta. Zato se Multiplate, sistem koji koristi MEA metodu, i Verify Now smatraju point-of-care sistemima. Za razliku od LTA i Verify Now, koji prate agregabilnost trombocita u tečnoj sredini nakon ADP stimulacije, kod MEA metode agregacija se dešava na čvrstoj površini, što je najbližije *in vivo* uslovima, gde se agregacija trombocita dešava na površini rupturiranja plaka, na mestu oštećenja vaskularnog endotela ili na stentu. Korelacija između Verify Now i MEA, odnosno MEA i LTA testova postoji, ali ipak ne daju identične rezultate (128). Zapaženo je da osobe ženskog pola imaju češće loš odgovor na terapiju klopidogrelom ako se prate sa LTA i Verify Now, dok MEA metoda ukazuje na to da muškarci češće pokazuju rezistenciju na klopidogrel (70). Gremmel i saradnici (129) su poredili različite testove za praćenje antitrombocitnog efekta klopidogrela (LTA, VASP, Verify Now, MEA i Impact-R) kod bolesnika posle PKI i ugradnje stenta. Najbolje slaganje između rezultata su pokazali LTA i Verify Now. Međutim, kada se govori o klasifikaciji bolesnika sa dobrim i lošim terapijskim odgovorom na klopidogrel, sva četiri testa su pokazala loše slaganje sa LTA. Sa ovim zaključkom se slaže i studija Paniccia i saradnika (130).

Dakle, postoji slabo slaganje među laboratorijskim testovima u identifikaciji bolesnika koji imaju loš terapijski odgovor na klopidogrel, odnosno procena odgovora na lek je test-specifična. (12). U zavisnosti od tipa testa i od načina odabira *cut-off* vrednosti, prevalenca rezistencije na antitrombocitnu terapiju razlikuje se od studije do studije. U literaturi prevalenca smanjenog odgovora na klopidogrel varira od 4,8% do 51%. Ova varijabilnost rezultata se objašnjava različitim dizajnom studija i slabim slaganjem rezultata dobijenih različitim testovima. Prevalenca rezistencije na klopidogrel zabeležena LTA metodom je 13%, 39% VASP testom, 33% Verify Now metodom (61). Prevalenca rezistencije na klopidogrel varira u odnosu na odabranu *cut-off* vrednost. Na Verify Now sistemu sa *cut-off* vrednošću od 15% inhibicije agregacije, zastupljenost rezistencije na klopidogrel u ispitivanoj populaciji je 21%, dok je sa *cut-off* vrednošću od 20% inhibicije agregacije na istom sistemu prevalenca rezistencije 40% (69).

Kod testova koji se koriste za praćenje efekta antitrombocitnih lekova moraju se uzeti u obzir faktori koji utiču na vrednost dobijenog rezultata: niska biološka dostupnost leka (neadekvatna doza, nedovoljna apsorpcija, interferencija sa drugim lekovima), povećana funkcija trombocita, genetički faktori, interakcija trombocita sa drugim krvnim ćelijama.

Otkrivanje visoke reaktivnosti trombocita *in vitro* kod bolesnika koji primaju antitrombocitnu terapiju ne mora da ukaže da su ovi bolesnici rezistentni na terapiju. Samo specifični testovi za koje je dokazano da mere farmakološki efekat antitrombocitnog leka mogu razjasniti da li se hiperreaktivnost trombocita javlja zbog nedovoljnog farmakološkog efekta leka ili je razlog druge prirode (124).

#### **1.4.3.1. Klinički značaj funkcionalnih testova**

Različite grupe autora pokazale su da je određivanje doze leka na osnovu rezultata funkcionalnih testova značajno smanjilo rizik od razvoja ishemijskih događaja. Po nekim autorima, rizik kod bolesnika sa visokom reaktivnošću trombocita tokom terapije sveden je kao kod bolesnika koji su pokazali dobar terapijski odgovor na klopidogrel (131, 132). Arad i saradnici (133) su u svojoj metaanalizi pokazali da je kod bolesnika kod kojih je terapija određena na osnovu vrednosti ADP specifičnih testova agregacije trombocita značajno smanjena incidenca smrtnosti, tromboze stenta i infarkt miokarda.

Kod bolesnika kod kojih je izvršena PKI, praćenje efekta leka funkcionalnim testovima omogućilo je definisanje terapijskog prozora u okviru kog je najmanji rizik za bolesnika od razvoja tromboze i krvarenja (50).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog naučnog istraživanja bio je da se ispita povezanost terapijskog odgovora na antitrombocitni lek klopidogrel i prisustva *CYP2C19\*2* varijante gena kod bolesnika sa dijagnostikovanom stenozom karotidnih arterija, kod kojih je izvršena endarterektomija i postoperativno uveden klopidogrel u dozi od 75 mg dnevno.

U tom smislu bilo je potrebno da se:

- ispita učestalost *CYP2C19\*2* varijante gena u ispitivanoj populaciji,
- prati promena agregabilnosti trombocita i uticaj *CYP2C19\*2* varijante gena na vrednosti ADP-indukovane agregacije prilikom terapije klopidogrelom tokom perioda praćenja,
- utvrdi *cut-off* vrednost ADP-indukovane agregacije trombocita (odnosno ADP-TRAP odnosa) radi procene terapijskog odgovora bolesnika (dobar/loš odgovor) i povezanost *CYP2C19\*2* alela sa terapijskim odgovorom na postoperativno uvedeni klopidogrel,
- ispita da li povećana bazična agregabilnost trombocita, odnosno agregabilnost trombocita pre uvođenja terapije predstavlja prediktor lošeg odgovora na uveden antitrombocitni lek,
- utvrdi da li odnos ADP-TRAP testova bolje reflektuje stepen inhibicije agregabilnosti trombocita P2Y12 antagonistima u odnosu na sam ADP test,
- ispita uticaj genetskih i negenetskih faktora na terapijski odgovor bolesnika, kao i uticaj drugih lekova na vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita,
- ispita povezanost kliničkog stanja bolesnika (njegovog poboljšanja ili pogoršanja) i odgovora na antitrombocitnu terapiju, tokom jednogodišnjeg praćenja nakon intervencije.

## 3. METODE

### 3.1. Vreme i mesto istraživanja

U periodu od juna 2012. godine do oktobra 2013. godine sprovedena je prospektivna studija na Klinici za vaskularnu hirurgiju Instituta za kardiovaskularne bolesti „Dedinje” u Beogradu.

### 3.2. Dizajn studije i bolesnici

U studiji je bilo uključeno 112 bolesnika hospitalizovanih radi operativnog lečenja karotidnih arterija. Step eno stenoz e pojedinačnih arterija ili obe karotidne arterije prethodno je utvrđen na osnovu nalaza ultrazvučnog pregleda, MSCT (Multislice Computed Tomography) arkografije ili CDS (Color Doppler ultrasonografija) arterije vrata, na osnovu čega je indikovano operativno lečenje.

Bolesnicima je po prijemu na Institut uzeta kompletna anamneza i obavljen je fizikalni pregled. Tokom pregleda, definisani su faktori rizika za kardiovaskularne bolesti (hipertenzija, hiperlipidemija, pušenje) i uzeti podaci o ranijim operacijama i ostalim patološkim stanjima. Zabeleženi su sledeći demografski podaci: pol, starost, trenutna terapija, porodično prisutne kardiovaskularne bolesti, faktori rizika (gojaznost, smanjena fizička aktivnost, nepravilna ishrana). Svakom bolesniku su uzete antropometrijske mere, telesna visina (TV) i telesna masa (TM), i na osnovu njih izračunat je indeks telesne mase (ITM) po formuli:  $ITM = TM \text{ (kg)} / (TV)^2 \text{ (cm)}$ . Sistolni i dijastolni krvni pritisak mereni su u miru, pola sata nakon dolaska u bolnicu, u sedećem položaju. U sklopu preoperativne dijagnostike urađen je ehokardiografski pregled. Kriterijumi za uključ enje bolesnika u studiju bili su:

- dijagnostikovana stenoza karotidne arterije veća od 50%,
- indikovana karotidna endarterektomija i
- uzimanje terapije klopidogrela (75 mg dnevno), najmanje 30 dana nakon intervencije.

Uključivanje bolesnika u studiju podrazumeva i popunjavanje upitnika i dobijanje pismene saglasnosti bolesnika za učešće u studiji. Kriterijumi za isključenje bolesnika iz studije bili su:

- preoperativni broj trombocita manji od  $150 \times 10^9/L$ ,
- bazična vrednost TRAP (thrombin receptor activating peptide) testa manja od 500 AU\*min,
- primena antiagregacijske terapije (osim aspirina ili klopidogrela),
- diabetes mellitus,
- poremećaji funkcije jetre i/ili bubrega,
- poremećaji hemostaze.

Bolesnicima koji su pre prijema primali terapiju klopidogrelom terapija je bila prekinuta 7 dana pre zakazane intervencije. Bolesnici koji su pre prijema primali statine, blokatore  $\beta$ -adrenergičkih receptora, ACE inhibitore, blokatore kalcijumovih kanala i antagoniste receptora angiotenzina II nastavili su sa terapijom tokom boravka u bolnici.

Ispitivanja pre hirurške intervencije podrazumevala su analizu krvne slike, osnovnih biohemijskih parametara i osnovnih testova za procenu hemostaze kod bolesnika. Takođe, u periodu pre intervencije, svakom bolesniku je uzet uzorak krvi za genetičko ispitivanje prisustva CYP2C19\*2 alela. Dvadeset četiri časa pre zakazane hirurške intervencije, određena je bazalna vrednost testova za ispitivanje funkcije trombocita.

Posle odgovarajuće pripreme bolesnika, urađena je karotidna endarterektomija. Nakon hirurške intervencije, započeta je dvojna terapija aspirinom (100 mg dnevno) i klopidogrelom u dozi od 75 mg dnevno, najmanje 30 dana od intervencije. Bolesnicima su uzeti uzorci venske krvi dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze leka, potom sedmog i tridesetog dana od uvođenja terapije radi agregometrijskog testiranja, kako bi se pratio efekat terapije klopidogrelom.

Nakon otpusta, tokom redovnih kontrola ili putem telefonskog razgovora praćeno je stanje bolesnika (pogoršanje ili poboljšanje). Kad je reč o pogoršanju praćeni su moždani udar, TIA i smrt. Praćenje bolesnika je trajalo godinu dana od intervencije.

Od 150 bolesnika na početku studije, 121 bolesnik uzimao je terapiju minimum 30 dana nakon KE. Tokom narednih 11 meseci, 112 bolesnika je i dalje uzimalo terapiju

klopidogrelom, a to je ujedno i konačan broj bolesnika koji su bili uključeni u istraživanje. Međutim, ne može se isključiti mogućnost da se određeni broj bolesnika od konačnog broja uključenih bolesnika nije pridržavao saveta lekara oko uzimanja terapije.

Rutinske analize (biohemijske i hematološke) urađene su u laboratorijskoj službi, dok su koagulometrijski i agregometrijski testovi obavljani u Službi transfuzije i patologije krvi Instituta za kardiovaskularne bolesti „Dedinje” u Beogradu. Genetička ispitivanja su vršena na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

Studija je sprovedena u skladu sa etičkim načelima Helsinške deklaracije i načelima Etičkog komiteta Instituta za kardiovaskularne bolesti „Dedinje” (broj rešenja: 2205 od 3.5.2012. godine) Svim bolesnicima je objašnjeno o kakvom istraživanju je reč, koja količina krvi se uzima i u koje svrhe će biti sprovedeno ispitivanje. U studiji su uključeni samo bolesnici koji su potpisali informativni pristanak.

### **3.3. Uzorkovanje krvi**

Za svakog bolesnika sakupljeni su uzorci krvi za rutinska laboratorijska ispitivanja, za ispitivanje funkcije trombocita i za genetičko testiranje. Uzorci venske krvi uzimani su u jutarnjim časovima (7-9h).

Za agregometrijska ispitivanja, uzorak krvi vađen je u vakuum epruvetu sa antikoagulansom litijum-heparinom (4 mL; Becton Dickinson, Swingdon, UK). Sadržaj svake epruvete, neposredno nakon vađenja krvi, pažljivo je promešan 3 do 5 puta u skladu sa preporukama proizvođača epruveta i transportovan u laboratoriju. Uzorci pune krvi odstojali su na sobnoj temperaturi oko 30 minuta i testirani su nakon minimalno 30 minuta do maksimalno 3 sata od vađenja krvi, po preporuci proizvođača testova. Svi uzorci koji su bili ikterični, hemolizovani ili lipemični nisu testirani.

Za hematološke i biohemijske analize, uzorak krvi uziman je posle 12 sati gladovanja. Krv je vađena u vakuum epruvete bez aditiva za biohemijske analize (4 mL; Becton Dickinson, Swingdon, UK), sa antikoagulansom K2-EDTA za određivanje krvne slike sa diferencijacijom leukocita (3 mL; Becton Dickinson, Swingdon, UK) i sa 3,2% natrijum-citratom za koagulometrijske testove (4,5 mL; Becton Dickinson, Swingdon, UK). Svaki



uzorak je promešan pažljivo nekoliko puta nakon vađenja i transpotovan u laboratoriju gde je analiziran u periodu od 2 sata nakon uzorkovanja. Uzorci seruma su dobijeni centrifugiranjem krvi na 1200xg (obrtaja u minuti) tokom 10 minuta, a uzorci plazme izdvajani su centrifugiranjem na 3000xg (obrtaja u minuti) tokom 15 minuta.

Za genetičko ispitivanje, uzorak krvi uziman je u vakuum epruvetu sa antikoagulansom 3,2% natrijum-citratom (4,5 mL; Becton Dickinson, Swingdon, UK) i čuvan je na -80 °C do trenutka testiranja.

### **3.4. Metode određivanja krvne slike sa diferencijacijom leukocita**

Određivanje krvne slike sa diferencijacijom leukocita (ukupan broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, ukupan broj leukocita i leukocitarna formula i ukupan broj trombocita) rađeno je na hematološkom analizatoru HmX AL (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) kod kog se brojanje ćelija vrši pomoću Coulter-ovog principa. Diferencijacija leukocita obavlja se pomoću VCS metode (*V-volumen, C-conductivity, S-Scatter*). Na osnovu provodljivosti ćelija i intenziteta rasute svetlosti, dobijaju se informacije o zapremini ćelije, o zapremini i obliku jedra, odnosu jedra i citoplazme, kao i granularnosti. Ova tri merenja daju sve potrebne informacije o svakoj pojedinačnoj ćeliji i na taj način omogućavaju diferencijaciju leukocita u pojedinačne subpopulacije.

### **3.5. Metode određivanja koagulometrijskih parametara**

Testovi za procenu hemostaznog statusa bolesnika: protrombinsko vreme (PT), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme (APTT) i koncentracija fibrinogena određivani su koagulometrijskim metodama na automatskom koagulomteru ACL Elite Pro (Instrumentation Laboratory, USA).

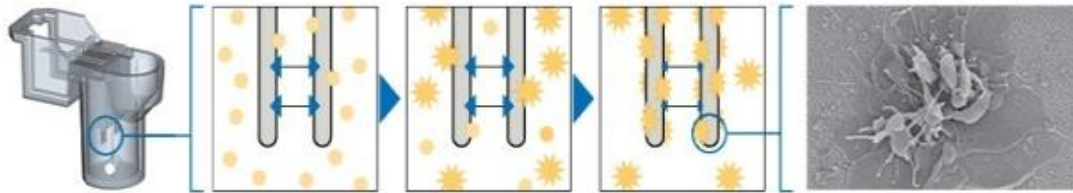
### 3.6. Metode određivanja biohemijskih parametara

Biohemijski parametri su određeni primenom rutinskih metoda na automatskom biohemijskom analizatoru UniCel DxC600 (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) korišćenjem testova istog proizvođača:

- koncentracija glukoze određena je na osnovu potrošnje kiseonika delovanjem glukoza-oksidge;
- koncentracija ukupnog bilirubina određena je diazo metodom;
- koncentracija kreatinina određena je modifikovanom Jaffe metodom;
- koncentracija uree određena je enzimskom metodom primenom ureaze;
- aktivnost enzima alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) određena je kinetičkom metodom uz primenu piridoksal-5-fosfata kao kofaktora;
- koncentracija ukupnog holesterola određena je primenom holesterol oksidge;
- koncentracija triglicerida određena je enzimskom metodom.

### 3.7. Metoda određivanja reaktivnosti trombocita

Za merenje reaktivnosti trombocita, u istraživanju je korišćen analizator Multiplate® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Princip na kome se zasniva merenje agregabilnosti trombocita baziran je na električnoj impedanci. Agregacija trombocita se prati u test ćeliji sa magnetom u koju su uronjena dva para bakarnih elektroda obloženih srebrom dužine 3,2 mm. Analizator prati promenu otpora na elektrodama koje su uronjene u uzorak pune krvi nakon dodatka fiziološkog rastvora i odgovarajućeg agoniste agregacije trombocita. Nakon aktivacije trombocita, ćelije adheriraju i stvaraju agregate na površini elektroda. Dva para elektroda, koje se nalaze u svakoj test ćeliji, omogućavaju dvostruko merenje agregacije trombocita u uzorku krvi, što test čini preciznijim, a konačni rezultat prikazuje se kao srednja vrednost oba merenja (134) (Slika 10).



**Slika 10.** Princip rada Multiplate® analizatora (Preuzeto iz : HaemoviewDiagnostics website)

Multiplate® je jednostavan aparat za upotrebu. Koristi malu količinu uzorka i, u zavisnosti od tipa agoniste koji se dodaje uzorku, može se pratiti aktivacija trombocita preko različitih signalnih puteva. Na taj način moguće je pratiti efekat različitih antitrombocitnih lekova (acetilsalicilna kiselina, klopidogrel i antagonisti GPIIb/IIIa receptora). Analizator ima pet kanala za merenje što omogućava paralelno izvođenje pet testova.

- ASPI test – dodatkom arahidonske kiseline, ciklooksigenaza stvara agonistu agregacije trombocita TXA<sub>2</sub>. ASPI test je osetljiv isključivo na aspirin i nesteroidne antiinflamatorne lekove.
- COL test – eksterno dodat kolagen aktivira receptor za kolagen koji dovodi do oslobađanja endogene arahidonske kiseline i stvaranja TXA<sub>2</sub>. COL test je osetljiv na acetilsalicilnu kiselinu.
- TRAP test – TRAP-6 (thrombin receptor activating peptide) stimuliše trombinski receptor na površini trombocita, dovodeći do njihove aktivacije. TRAP test pokazuje bazalnu agregabilnost trombocita. Neosetljiv je na acetilsalicilnu kiselinu i na ADP antagoniste.
- RISTO test – ristocetin gradi kompleks sa vWf, koji se vezuje za trombocite dovodeći do agregacije. Test se koristi za detekciju nedostatka GPIb receptora ili odsustvo vWF i diferencijaciju von Willebrandove bolesti.
- ADP test – dodatkom ADP-a, stimuliše se agregacija trombocita preko ADP receptora, dovodeći do smanjenja cAMP, odnosno do oslobađanja jona kalcijuma

unutar trombocita. ADP agonista ne aktivira samo P2Y12 receptore na površini trombocita već i ostale ADP receptore, koji nisu ciljni receptori za antitrombocitne lekove. Prostaglandin E1 (PGE1) predstavlja fiziološki inhibitor trombocita. PGE1 povećava koncentraciju cAMP stimulacijom adenilat-ciklaze, što smanjuje mobilizaciju jona kalcijuma iz depoa i inhibira agregaciju trombocita. PGE1 svoj efekat ostvaruje vezujući se za P2Y1 receptore i deluje sinergistički sa P2Y12 antagonistima. Dodatkom PGE1, ADP test postaje osetljiviji za praćenje P2Y12 antagonista (ADPHS test), ali dovodi i do povećanja broja uzoraka koji su rezistentni na klopidogrel svrstavajući u ovu grupu i bolesnike koji nisu na terapiji, a pokazuju slabu agregaciju trombocita (manja specifičnost u odnosu na ADP test) (134).

Preporuka je da se za monitoring aspirina koriste ASPI i TRAP test, dok su za praćenje klopidogrela preporučeni ADP HS i TRAP testovi. Svi testovi su osetljivi na prisustvo antagonista GPIIb/IIIa receptora (134).

U ovom istraživanju, ADP HS test korišćen je za praćenje terapijskog efekta klopidogrela. Kod ADP HS testa koristi se agonista ADP u finalnoj koncentraciji od 6,5  $\mu\text{M}$  i PGE1 u finalnoj koncentraciji 9,4 nmol/L. Za praćenje bazalne agregabilnosti trombocita korišćen je TRAP test. Smatra se da odnos ADP-TRAP testova bolje reflektuje stepen inhibicije agregabilnosti trombocita P2Y12 antagonistima u odnosu na sam ADP test (135).

Aktivnost trombocita je određivana dvadeset četiri časa pre hirurške intervencije. Nakon karotidne endarterektomije, ADP i TRAP testovi određivani su dvadeset četiri časa od primenjene prve doze leka, sedmog i tridesetog dana uzimanja terapije. Rezultati reaktivnosti trombocita izraženi su kao vrednost ADP testa u AU\*min jedinicama i kao odnos ADP-TRAP testova (%) U skladu s publikovanim radovima (19, 136), odlučeno je da se prvo merenje obavi dvadeset četiri časa od uzete prve doze klopidogrela, kako bi se utvrdilo da li niska doza klopidogrela (75 mg) utiče na agregaciju trombocita dovoljno da bi se utvrdila razlika u odnosu na CYP2C19\*2 status bolesnika.

Prospektivno je određena *cut-off* vrednost koja je korišćena za definisanje visoke reaktivnosti trombocita prilikom terapije klopidogrela. Za *cut-off* vrednost uzet je 75-ti percentil ADP-indukovane agregacije trombocita tridesetog dana uzimanja terapije. Kod

75% ispitivane populacije, vrednost ADP-indukovane agregacije trombocita bila je ispod 575 AU\*min, odnosno ispod 52% za ADP-TRAP odnosa, i te vrednosti uzete su za *cut-off*. Navedene vrednosti su korišćene u proceni terapijskog odgovora bolesnika na terapiju klopidogrelom kod sva tri merenja testova agregacije trombocita.

### 3.7.1. Način rada

Uzorak krvi za analizu uzet je u epruvete sa antikoagulansom litijum-heparinom. Kod MEA metode, antikoagulans izbora je hirudin ili heparin. Citratna krv nije preporučena zato što citrat vezuje jone kalcijuma iz uzorka i na taj način ometa koagulaciju uzorka (134). Potrebna zapremina pune krvi je 300  $\mu$ L za izvođenje jednog testa.

Test ćelija s magnetom postavlja se na poziciju za merenje i povezuje se sa senzornim kablom. U test ćeliju se dodaje 300  $\mu$ L fiziološkog rastvora, koji je pre testiranja pripremljen i zagrejan na 37 °C u analizatoru, i 300  $\mu$ L uzorka pune krvi. Nakon tri minuta inkubacije, zvučnim signalom aparat signalizira da je potrebno da se doda 20  $\mu$ L PGE1 i 20  $\mu$ L ADP-a kod izvođenja ADP testa, odnosno 20  $\mu$ L TRAP-6 za izvođenje TRAP testa. Nakon dodavanja aktivatora, automatski počinje merenje. Za precizno merenje zapremine uzorka i reagenasa koristi se automatska pipeta prilagođena radu aparata i aplikaciji testa (137).

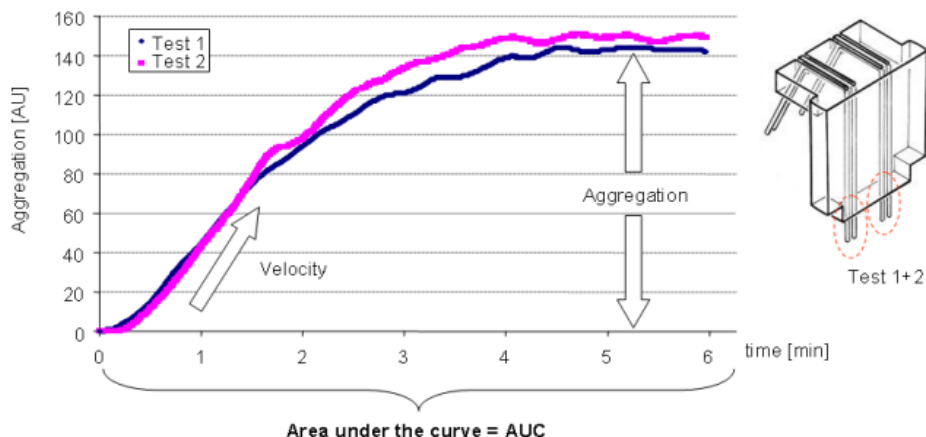
Test ćelija u kojoj se dešava reakcija sadrži dva para elektroda spojenih tokom izvođenja testa u strujno kolo i analizator meri promenu otpora na elektrodama; do njega dolazi usled stvaranja agregata trombocita na njihovoj površini. Što je agregabilnost trombocita veća, veći je i otpor na elektrodama. Tokom šest minuta, aparat iscrtava krivu promene otpora, odnosno krivu agregacije trombocita (Slika 11). Analizator izračunava tri parametra iz izmerenih podataka:

- površinu ispod krive agregacije (AUC), koja ukazuje na aktivnost trombocita,
- agregaciju (AU), koja predstavlja visinu krive i
- brzinu (AU/min), koja predstavlja maksimalan nagib krive.

Površina ispod krive agregacije trombocita izražava se u U (engl. *Units*) ili AU\*min (engl. *arbitrary aggregation unit*) jedinicama (10 AU x min odgovara 1 U).

Pearsonov koeficijent korelacije koristi se prilikom poređenja podataka dobijenih sa oba para elektroda. Preporuka proizvođača je da se testiranje uzorka ponovi ako je

navedeni koeficijent manji od 0,98. Takođe, testiranje je potrebno ponoviti i ako je razlika između površina ispod pojedinačnih kriva veća od 20% u odnosu na srednju vrednost površine ispod obe krive (134).



**Slika 11.** Kriva agregacije (Preuzeto iz: HaemoviewDiagnostics website)

### 3.7.2. Korišćeni reagensi

ADP, PGE1 i TRAP liofilizovani reagensi čuvaju se na 2-8 °C i stabilni su do datuma isteka roka deklarisanog na pakovanju. Reagensi su rekonstituisani sa 1 mL dejonizovane vode, blago promešani i čuvani na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta, reagensi su spremni za upotrebu. Neposredno pre upotrebe, blago je promešan sadržaj u bočici.

Rekonstituisan reagens je stabilan 7 dana na 2-8°C u originalnim bočicama. Reagens je potrebno izvaditi iz frižidera neposredno pre korišćenja. Sadržaj originalne bočice može se podeliti u 5 porcija u za to predviđene posude. Čuvanjem reagenasa na -20°C stabilnost se produžava do 4 nedelje.

Ispravnost uređaja kontrolisana je svakodnevno prema propisanom protokolu.

### 3.8. Genetičke analize

#### 3.8.1. Ekstrakcija DNK

Kao izvor DNK (dezoksiribonukleinska kiselina) korišćena je puna krv bolesnika koja je prethodno uzorkovana sa natrijum-citratom kao antikoagulansom i čuvana na  $-80^{\circ}\text{C}$  do momenta ekstrakcije DNK. Ekstrakcija DNK vršena je korišćenjem kita QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), prema sledećem protokolu. U 200  $\mu\text{L}$  pune krvi dodaje se 20  $\mu\text{L}$  proteinaze K i 200  $\mu\text{L}$  AL pufera za lizu. Epruveta sa ovim komponentama se snažno promeša, zatim inkubira 10 minuta na  $55^{\circ}\text{C}$ , nakon čega se u smešu dodaje 200  $\mu\text{L}$  apsolutnog etanola. Sadržaj epruvete ponovo se intenzivno promeša, pa se prebacuje na *QIAamp Mini* kolonu. Vezivanje DNK za matriks kolone postiže se centrifugiranjem na 8000 obr/min u trajanju od 60 sekundi. Ispiranje kolone i za nju vezanog sadržaja vrši se nanošenjem 500  $\mu\text{L}$  pufera AW1 i centrifugiranjem na 8000 obr/min tokom 60 sekundi. Drugo ispiranje kolone vrši se pomoću pufera AW2 i centrifugiranjem na maksimalnoj brzini u trajanju od 3 minuta. Eluiranje DNK vezane za kolonu vrši se sa 200  $\mu\text{L}$  sterilne vode. DNK u vodenom rastvoru čuva se do testiranja sa TaqMan testom na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

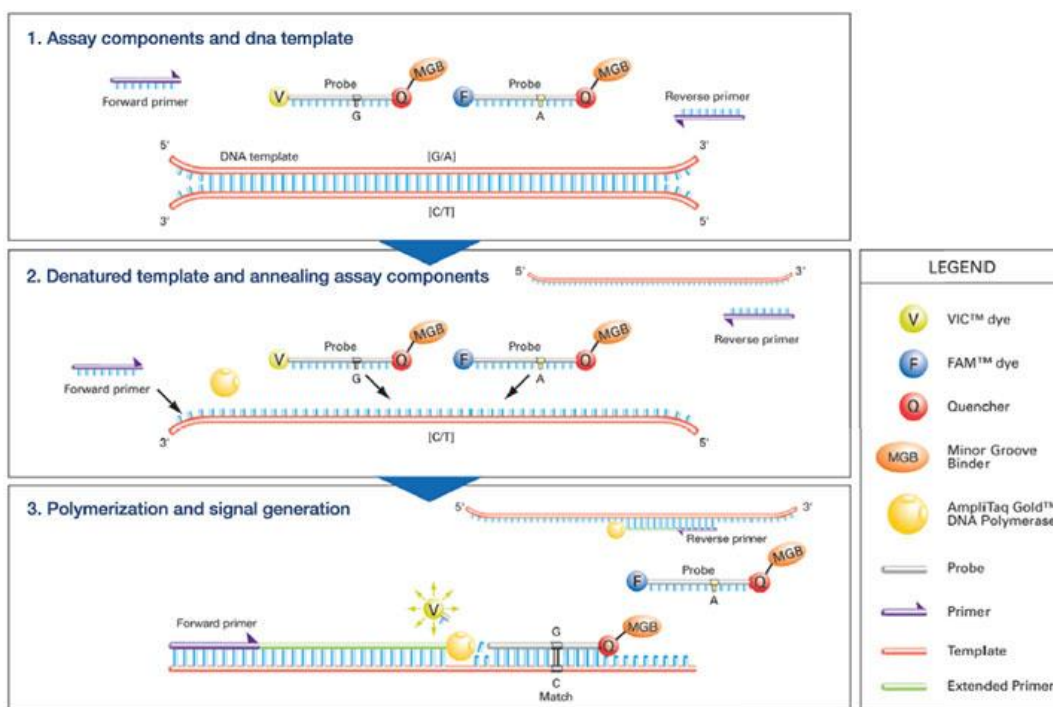
#### 3.8.2. Merenje koncentracije DNK

Za merenje koncentracije DNK, spektrofotometrijskom metodom, na talasnoj dužini od 260 nm, korišćen je aparat NanoVue (GE Healthcare, Life Sciences).

#### 3.8.3. Detekcija CYP2C19\*2 alela

Detekcija *CYP2C19\*2* alela vršena je posredstvom detekcije (ili isključenja) nukleotidne zamene *CYP2C19* 681 G >A koja predstavlja marker alela *CYP2C19\*2*. Za ovu svrhu korišćen je TaqMan test koji se zasniva na egzonukleaznoj ( $5' \rightarrow 3'$ ) aktivnosti Taq polimeraze tokom procesa lančanog umnožavanja polimerazom (PCR) kao i FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) mehanizmom. Primena TaqMan metode pored specifičnih prajmera, podrazumeva korišćenje i TaqMan probe. TaqMan proba je oligonukleotid komplementaran sekvenci u okviru ciljane sekvence DNK; na 5' kraju TaqMan probe nalazi se fluorescentna, reporterska boja (najčešće FAM, VIC ili JOE), a na 3' kraju "kvenčer" (najčešće TAMRA). Sve dok se reporter i *kvenčer* nalaze blizu jedan drugom, tj.

dok je TaqMan proba intaktna, nema emitovanja fluorescencije jer fluorescencija koju emituje reporter biva apsorbovana od strane *kvenčera*. Međutim, u toku PCR amplifikacije 5'→3' egzonukleazna aktivnost Taq polimeraze razgrađuje probu vezanu za ciljnu DNK, što rezultira emitovanjem fluorescencije od strane reporterske boje. Razaranje probe od strane Taq polimeraze i oslobađanje reporterske boje može se desiti samo ako je pre toga došlo do potpune hibridizacije probe sa ciljanim segmentom DNK, što znači da se boja emituje samo ukoliko u okviru ciljane (analizirane) sekvence DNK postoji određena sekvenca za koju je TaqMan proba karakteristična (Slika 12).



**Slika 12.** Princip TaqMan testa

Za potrebe ove studije korišćen je TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay, SNP rs4244285 (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), koji sadrži specijalno dizajnirane prajmere i TaqMan probe za detekciju nukleotidne varijante *CYP2C19* 681G odnosno varijante *CYP2C19* 681A. Za svaku od TaqMan proba vezane su različite reporterske boje (VIC odnosno FAM), tako da se na osnovu fluorescencije koju emituje aktivirana reporterska boja, zaključuje da li se u ciljnoj DNK sekvenci na mestu 681



nalazi guanin ili adenin. Reakciona smeša upotpunjena je sa TaqMan Universal PCR MasterMix; No AmEerase UNG (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) i 20 ng analizirane DNK. Sastav jedinične reakcione smeše prikazan je u Tabeli 3, a dizajn primenjenog programa prikazan je u Tabeli 4. Tokom svakog izvođenja TaqMan testa uključene su i po dve negativne kontrole koje su sadržale kompletnu reakcionu smešu bez uzorka DNK. Lančana reakcija polimeraze i detekcija signala odvijala se korišćenjem aparata 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Rezultati su analizirani korišćenjem softvera Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System Sequence Detection Software v1.4.1.

**Tabela 3.** Sastav reakcione smeše za izvođenje TaqMan testa

Komponenta u reakcionoj smeši	Količina u $\mu\text{L}$
TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay	1,25
TaqMan Universal PCR MasterMix; No AmEerase UNG	12,5
DNK u vodenom rastvoru	11,25*
Ukupno	25

\*u predviđenom volumenu od 11,25  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O rasvoreno je 20 ng DNK

**Tabela 4.** Dizajn programa primenjen tokom TaqMan testa

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Trajanje (min: sec)	Broj ciklusa
95	10 : 00	1
92	00 : 15	50
60	01 : 30	

### 3.9. Statistička analiza podataka

Ispitivanje raspodele podataka i slaganje sa Gauss-ovom raspodelom procenjen je primenom Kolmogorov-Smirnov testa. Svi prikupljeni podaci obrađeni su metodama deskriptivne statistike. Za prikazivanje normalno distribuiranih kontinuiranih promenljivih

korišćena je srednja vrednost i standardna greška određivanja. U zavisnosti od normalnosti statističke raspodele podataka, koristili su se parametarski ili neparametarski testovi (Studentov t test za dva nezavisna uzorka ili Mann-Whitney test). Za analizu rezultata ADP i TRAP testova dobijenih pre i nakon intervencije i tokom perioda oporavka, kod dve grupe bolesnika (nosioci *wild type* i *CYP2C19\*2* alela) korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) uz upotrebu Boniferoni *post hoc* testa za višestruka poređenja. Kategoričke promenljive su prikazane kao apsolutni i relativni brojevi (n, %). Statistička značajnost razlike između kategoričkih promenljivih utvrđene su upotrebom Pearson chi-square testa (tablice kontigencije).

Bivarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza korišćena je za ispitivanje odnosa između genotipa i fenotipa (terapijski odgovor bolesnika na klopidogrel), kao i za ispitivanje uticaja negenetskih promenljivih na fenotip. Logistička regresiona analiza upotrebljena je za procenu prediktora za loš terapijski odgovor. Odluka o odabiru faktora koji su bili uključeni u modelima zasnivaju se na literaturnim podacima o ispitivanim faktorima rizika lošeg odgovora na terapiju klopidogrelom (demografski podaci, terapija različitim lekovima, prisustvo *CYP2C19\*2* alela, laboratorijski parametri). Logistička regresiona analiza poslužila je i za formiranje nove promenljive, odnosno modela za procenu terapijskog odgovora bolesnika na klopidogrel. Promenljive koje su se pokazale kao značajni prediktori ( $P \leq 0,05$ ) bivarijantnom analizom, bili su uključeni u multivarijantne logističke regresione modele. U svakoj analizi računat je količnik šansi (engl. Odds Ratio) sa 95% intervalom poverenja. Prediktivni kvalitet promenljivih procenjen je pomoću ROC (Receiver Operating Characteristic) analize. Svi testovi su smatrani statistički značajnim za  $P < 0,05$ .

Statistička obrada podataka izvedena je korišćenjem računarskih programa Microsoft Excel (verzija 2013; Microsoft, SAD), Medcalc (verzija 11.4; MedCalc software, Belgium) i IBM SPSS Statistics (verzija 20; IBM, SAD).

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Demografske i biohemijske karakteristike ispitivane populacije**

U istraživanje je uključeno 112 bolesnika sa stenozom karotidne arterije, kod kojih je izvršena endarterektomija. Među uključenim bolesnicima ukupno je bilo 66 osoba muškog pola (58,9%), a prosečna starost iznosila je 66,2 godine. Stenoza karotidne arterije veća od 70% dijagnostikovana je kod 93 osobe (83%), a kod 71 bolesnika (63,4%) utvrđeno je prisustvo stenoze obe karotidne arterije. U Tabeli 5 prikazane su demografske karakteristike ispitivane populacije, faktori rizika i terapija koju su bolesnici uzimali prilikom prijema u bolnicu.

**Tabela 5.** Demografske karakteristike i faktori rizika ispitivane populacije

<b>Demografski parametri</b>	<b>N=112</b>
<b>Starost (srednja vrednost±SD)</b>	66,2±8,1
<b>Pol, n (%)</b>	
<b>Muški</b>	66 (58,9)
<b>Ženski</b>	46 (41,1)
<b>ITM, n (%)</b>	
<b>&lt; 30 kg/m<sup>2</sup></b>	91 (81,3)
<b>&gt; 30 kg/m<sup>2</sup></b>	21 (18,8)
<b>Prisutvo stenozе obe karotidne arterije, n (%)</b>	71 (63,4)
<b>Suženje karotidnih arterija &gt;70%, n (%)</b>	93 (83)
<b>Faktori rizika, n (%)</b>	
<b>Pušenje / da</b>	84 (75,0)
<b>Hiperholesterolemija / da</b>	40 (35,7)
<b>Hipertrigliceridemija / da</b>	26 (23,2)
<b>Pozitivna porodična istorija kardiovaskularnih bolesti, n (%)</b>	41 (36,6)
<b>Prethodni cerebrovaskularni događaj, n (%)</b>	
<b>CVI / da</b>	33 (29,5)
<b>TIA / da</b>	7 (6,2)
<b>Terapija, n (%)</b>	
<b>Acetil salicilna kiselina</b>	112 (100)
<b>Blokatori β-adrenergičkih receptora</b>	41 (36,6)
<b>ACE inhibitori</b>	64 (57,1)
<b>Blokatori kalcijumovih kanala</b>	35 (31,3)
<b>Antagonisti receptora angiotenzina II</b>	4 (3,6)
<b>Statini</b>	53 (47,3)

ITM-index telesne mase; CVI-cerebrovaskularni insult; TIA-tranzitorni ishemijski atak; ACE- angiotenzin konvertujućii enzim.

U Tabeli 6 prikazane su vrednosti biohemijskih i hematoloških parametara u ispitivanoj populaciji.

**Tabela 6.** Laboratorijski parametri u ispitivanoj populaciji (N=112)

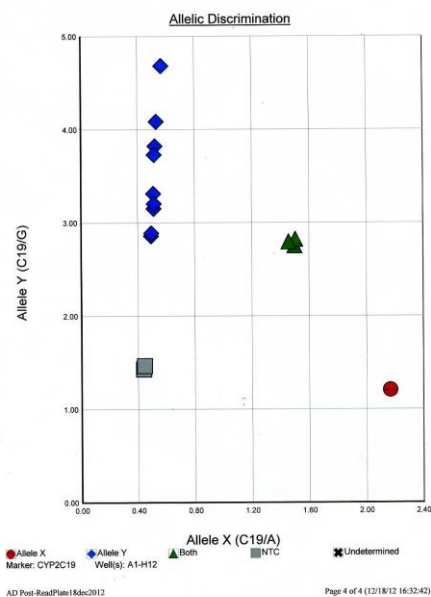
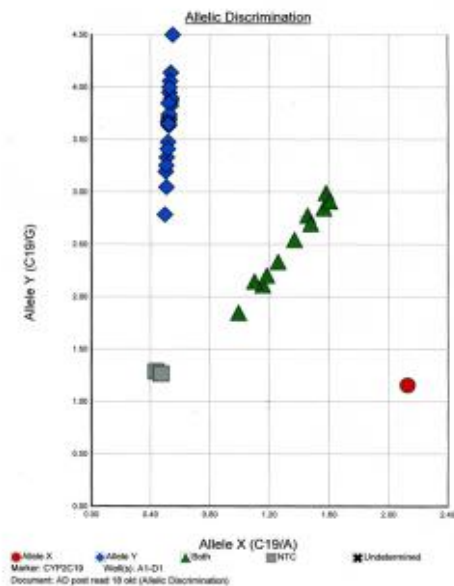
Hematološki i biohemijski parametri	Srednja vrednost ± SD
Leukociti, 10 <sup>9</sup> /L	7,0±1,9
Eritrociti, 10 <sup>12</sup> /L	4,5±0,4
Trombociti, 10 <sup>9</sup> /L	219±57
Hemoglobin, g/L	136,5±12,3
Hematokrit	0,41±0,04
Fibrinogen, g/L	4,6±1,1
Protrombinsko vreme, sec	14,2±2,4
Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme, sec	29,9±3,7
Kreatinin, µmol/L	83,4±26,9
Ukupni bilirubin, µmol/L	11,1±4,1
Ureja, mmol/L	6,0±1,9
AST, U/L	23,7±9,7
ALT, U/L	26,2±17,3
Glukoza, mmol/L	6,0±1,3
Trigliceridi, mmol/L	1,6±0,8
Ukupan holesterol, mmol/L	5,2±1,2

AST-aspartat aminotransferaza; ALT-alanin aminotransferaza

#### 4.2. Farmakogenetički profil (CYP2C19\*2) ispitivane populacije

Kod ispitivane populacije, farmakogenetičkim ispitivanjem (Slika 13) pokazano je da su 82 (73,2%) bolesnika nosioci CYP2C19\*1/\*1 genotipa (*wild type*), dvadeset devet bolesnika (25,9%) su heterozigoti CYP2C19\*2 varijante gena i 1 (0,9%) bolesnik je

homozigot za CYP2C19\*2 alel. Dakle, zastupljenost CYP2C19\*1/\*1 genotipa u ispitivanoj populaciji je 73,2%, nasuprot 26,8% nosioca CYP2C19\*2 alela (Tabela 7).



**Slika 13.** Vizuelni prikaz rezultata nakon urađene Taq Man reakcije i upotrebe programa na RT-PCR aparatu: *wild type* (plavo), CYP2C19\*1/\*2 (zeleno), CYP2C19\*2/\*2 (crveno), NTC -blank kontrola bez DNK.

**Tabela 7.** Učestalost CYP2C19 genotipa u ispitivanoj populaciji

Genotip	n(%)
Wild Type (CYP2C19*1/*1)	82 (73,2)
Heterozigot CYP2C19*2 varijante gena	29 (25,9)
Homozigot CYP2C19*2 varijante gena	1 (0,9)

#### 4.3. Promena agregabilnosti trombocita prilikom terapije klopidogrela tokom perioda praćenja

U Tabeli 8. prikazane su vrednosti parametara agregabilnosti trombocita (ADP i TRAP) dobijene pre hirurške intervencije (pre op), dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze klopidogrela (75 mg), sedmog i tridesetog dana od uvođenja terapije.

**Tabela 8.** Vrednosti ADP i TRAP testova tokom perioda praćenja

	ADP, AU*min (srednja vrednost± SD)	TRAP, AU*min (srednja vrednost± SD)
pre op	767,09±146,54	1000,38±192,75
24h	696,58±187,12	1088,74±202,33
7. dan	507,89±209,38	1084,41±175,52
30. dan	434,89±218,10	1067,55±186,31

Poređenje vrednosti ADP testa dobijenih tokom tri merenja prikazano je u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Poređenje vrednosti ADP testa dobijenih tokom perioda praćenja

Parovi varijabli	t	P
ADP 24h - ADP 7. dan	9,079	0,000*
ADP 7.dan - ADP 30. dan	3,999	0,000*
ADP 24h - ADP 30. dan	10,22	0,000*

\*P<0,0005

Razlika srednjih vrednosti ADP testa dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze leka i nakon sedmog dana uzimanja terapije klopidogrelom statistički je značajna ( $P < 0,0005$ ). Prosečna vrednost ADP testa dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze leka je  $696,58 \pm 187,12$  AU\*min, a nakon sedmog dana uzimanja leka vrednost ADP test je  $507,79 \pm 209,38$  AU\*min.

Razlika srednjih vrednosti ADP testa nakon sedmog dana i tridesetog dana uzimanja leka je, takođe, statistički značajna ( $P < 0,0005$ ). Prosečna vrednost ADP testa nakon sedmog dana uzimanja leka je  $507,79 \pm 209,38$  AU\*min, a nakon tridesetog dana vrednost ADP testa je  $434,89 \pm 218,10$  AU\*min.

Razlika srednjih vrednosti ADP testa dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze leka i nakon tridesetog dana uzimanja klopidogrela je, očekivano, statistički značajna ( $P < 0,0005$ ). Prosečna vrednost ADP testa nakon dvadeset četiri časa uzimanja leka je  $696,58 \pm 187,12$  AU\*min, a nakon trideset dana vrednost je  $434,89 \pm 218,10$  AU\*min.

Poređenje vrednosti TRAP testa dobijenih tokom tri merenja je prikazano u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Poređenje vrednosti TRAP testa dobijenih tokom perioda praćenja

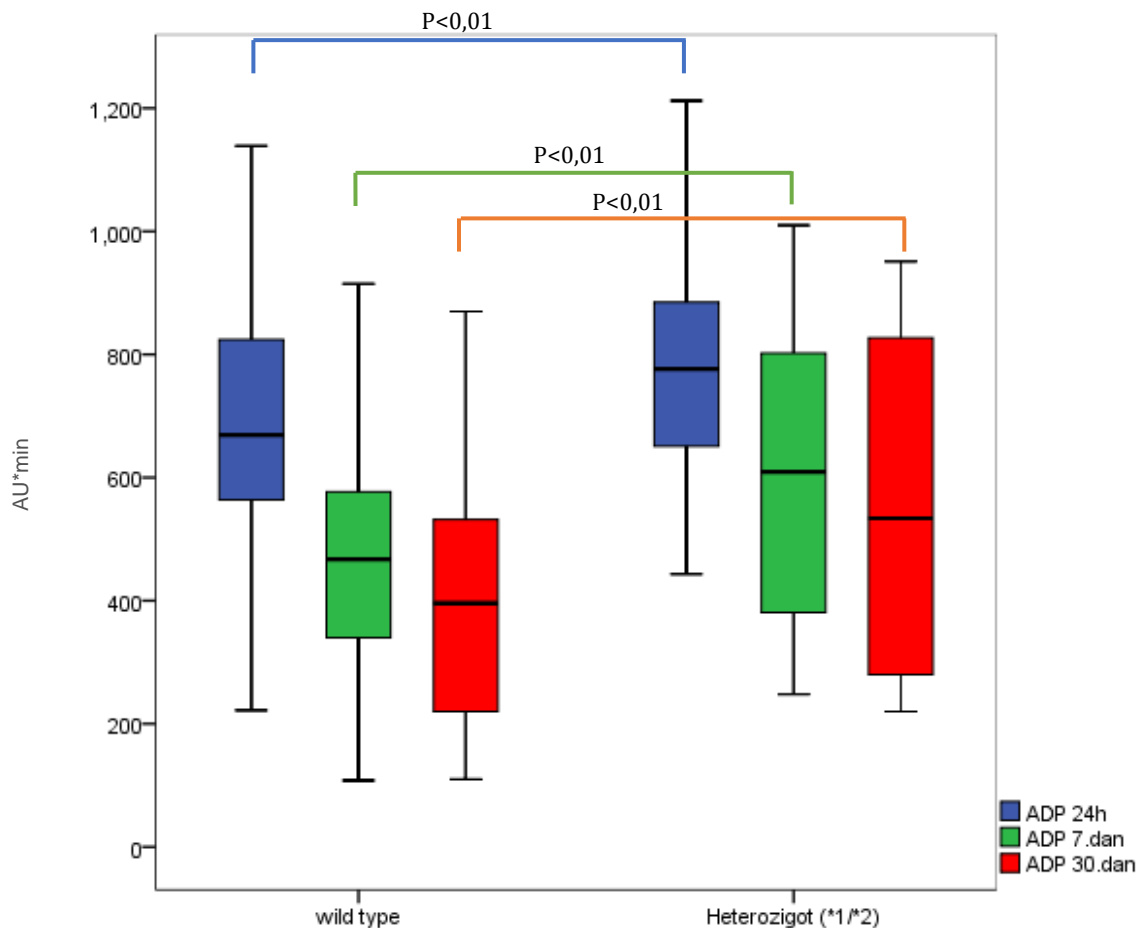
Parovi varijabli		Srednja vrednost, AU*min	Standardna devijacija, AU*min	P
Par 1	TRAP 24h	1088,74	202,33	0,829
	TRAP 7. dan	1084,41	175,52	
Par 2	TRAP 24h	1088,74	202,33	0,394
	TRAP 30. dan	1067,55	186,31	
Par 3	TRAP 7. dan	1084,41	175,52	0,369
	TRAP 30. dan	1067,55	186,31	

Očekivano, razlike srednjih vrednosti između TRAP testa dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze leka, nakon sedmog i tridesetog dana uzimanja klopidogrela, nisu statistički značajne.



### 4.3.1 Promena agregabilnosti trombocita tokom primene klopidogrela u odnosu na prisustvo CYP2C19\*2 alela

Vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita dobijene tokom tri merenja kod grupe bolesnika koji su nosioci CYP2C19\*2 alela i bolesnika koji nisu nosioci pomenutog alela tokom perioda praćenja prikazane su na Slici 14.



**Slika 14.** Vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita kod nosioca *wild type* genotipa i kod nosioca CYP2C19\*2 varijante gena tokom perioda praćenja. Donja ivica box plota predstavlja 25. percentil, dok gornja ivica predstavlja 75. percentil. Srednja linija box plota označava 50. percentil. Donja i gornja granica vertikalnih linija predstavljaju 5. i 95. percentil vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita.

Vrednosti agregabilnosti trombocita statistički se značajno razlikuju između dve grupe bolesnika ( $P < 0,01$ ). Vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita dobijenih kod sva tri merenja značajno su veće kod grupe bolesnika koji su nosioci CYP2C19\*2 alela u odnosu na grupu bolesnika koji nisu nosioci pomenutog alela.

Očekivano, nisu uočene statistički značajne razlike između vrednosti TRAP testa tokom perioda praćenja između grupe bolesnika koji su nosioci CYP2C19\*2 alela i bolesnika koji nisu nosioci pomenutog alela (Tabela 11).

**Tabela 11.** Vrednosti TRAP testa kod nosioca *wild type* genotipa i kod nosioca CYP2C19\*2 varijante gena tokom perioda praćenja

		Srednja vrednost (AU*min)	Standardna devijacija (AU*min)	P
TRAP 24h	<i>Wild type (CYP2C19*1/*1)</i>	1088,87	204,437	0,991
	Heterozigot CYP2C19*2 varijante gena	1088,40	199,882	
TRAP 7. dan	<i>Wild type (CYP2C19*1/*1)</i>	1075,37	182,237	0,370
	Heterozigot CYP2C19*2 varijante gena	1109,13	155,846	
TRAP 30. dan	<i>Wild type (CYP2C19*1/*1)</i>	1059,90	174,210	0,475
	Heterozigot CYP2C19*2 varijante gena	1088,47	217,879	

U Tabeli 12 prikazana su poređenja vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita unutar grupe nosioca *wild type* genotipa i grupe nosioca CYP2C19\*2 varijante gena tokom perioda praćenja.

Kod nosioca CYP2C19\*1/\*1 genotipa, vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita pokazuju tendenciju pada u toku vremena. Pokazana je statistički značajna razlika između srednjih vrednosti ADP testa dvadeset četiri časa posle uzimanja prve doze

leka i nakon sedmog dana uzimanja leka ( $P < 0,001$ ). Prosečna vrednost ADP testa nakon dvadeset četiri časa je  $672,28 \pm 189,71$  AU\*min, a nakon sedmog dana uzimanja klopidogrela je  $474,63 \pm 191,30$  AU\*min. Razlika srednjih vrednosti ADP testa nakon sedmog i tridesetog dana uzimanja klopidogrela je, takođe, statistički značajna ( $P < 0,001$ ). Prosečna vrednost ADP testa nakon sedmog dana je  $474,63 \pm 191,30$  AU\*min, a nakon tridesetog dana je  $389,10 \pm 183,47$  AU\*min. Razlika srednjih vrednosti ADP testa nakon dvadeset četiri časa i nakon tridesetog dana uzimanja leka u grupi bolesnika koji su nosioci *wild type* genotipa je, očekivano, statistički značajna ( $P < 0,001$ ).

Kod nosioca CYP2C19\*2 varijante gena, zapaženo je opadanje agregabilnosti trombocita tokom prvih sedam dana uzimanja terapije klopidogrela (Tabela 12). Pokazana je statistički značajna razlika srednjih vrednosti ADP testa nakon dvadeset četiri časa i sedmog dana uzimanja klopidogrela ( $P = 0,001$ ). Prosečna vrednost ADP testa nakon dvadeset četiri časa je  $763,00 \pm 165,08$  AU\*min, a nakon sedmog dana uzimanja leka je  $598,80 \pm 232,18$  AU\*min. Poređenjem rezultata dobijenih sedmog i tridesetog dana uzimanja terapije nije zapažena promena agregabilnosti trombocita, tj. nije dokazana statistički značajna razlika između srednjih vrednosti ADP testa ( $P = 0,241$ ). Prosečna vrednost ADP testa nakon sedmog dana je  $798,80 \pm 232,18$  AU\*min, a nakon tridesetog dana uzimanja leka je  $560,50 \pm 257,06$  AU\*min. Očekivano, razlika srednjih vrednosti ADP testa nakon dvadeset četiri časa i nakon tridesetog dana uzimanja klopidogrela u grupi bolesnika koji su nosioci CYP2C19\*2 varijante gena statistički je značajna ( $P < 0,001$ ) (Tabela 12).

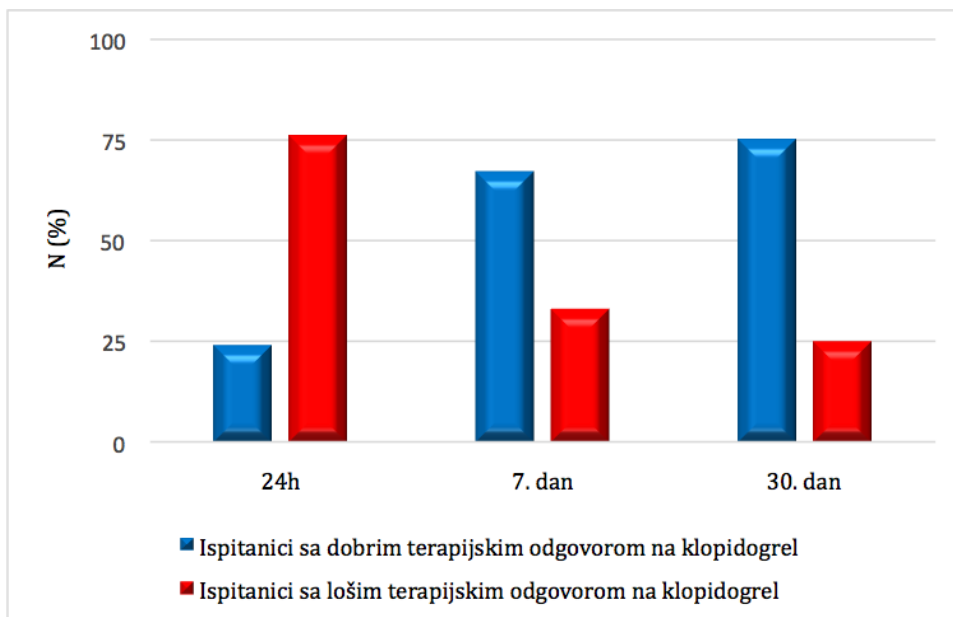
**Tabela 12.** Poređenje vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita unutar grupe nosioca *wild type* genotipa i grupe nosioca CYP2C19\*2 varijante gena tokom perioda praćenja

	ADP 24h, AU*min (srednja vrednost (SD))	ADP 7. dan, AU*min (srednja vrednost (SD))	<i>P</i>
<i>Wild type</i> (CYP2C19*1/*1)	672,28 (189,71)	474,63 (191,30)	<0,001
Heterozigot CYP2C19*2 varijante gena	763,00 (165,08)	598,80 (232,18)	0,001
	ADP 7. dan, AU*min (srednja vrednost (SD))	ADP 30. dan, AU*min (srednja vrednost (SD))	<i>P</i>
<i>Wild type</i> (CYP2C19*1/*1)	474,63 (191,30)	389,10 (183,47)	<0,001
Heterozigot CYP2C19*2 varijante gena	598,80 (232,18)	560,50 (257,06)	0,241
	ADP 24h, AU*min (srednja vrednost (SD))	ADP 30. dan, AU*min (srednja vrednost (SD))	<i>P</i>
<i>Wild type</i> (CYP2C19*1/*1)	672,28 (189,71)	389,10 (183,47)	<0,001
Heterozigot CYP2C19*2 varijante gena	763,00 (165,08)	560,50 (257,06)	<0,001

#### 4.4. Povezanost CYP2C19\*2 alela sa terapijskim odgovorom na antiagregacijski lek klopidogrel

##### 4.4.1. Procena terapijskog odgovora na klopidogrel na osnovu vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita u ispitivanoj populaciji

Procena terapijskog odgovora na klopidogrel urađena je na osnovu definisane *cut-off* vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita, koja iznosi 575 AU\*min. Definisana *cut-off* vrednost specifična je za ispitivanu populaciju. Bolesnici koji su imali vrednost ADP-indukovane agregacije trombocita veću od 575 AU\*min pripali su grupi bolesnika s povećanom reaktivnošću trombocita, tj. grupi bolesnika sa lošim terapijskim odgovorom na lek. Na Slici 15 prikazan je terapijski odgovor bolesnika na klopidogrel tokom perioda praćenja.



**Slika 15.** Odgovor bolesnika na terapiju klopidogrelom tokom perioda praćenja

Posle dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze klopidogrela, povećana reaktivnost trombocita utvrđena je kod 75,9%. Sedmog dana uzimanja terapije, zabeležen je pad broja bolesnika sa lošim terapijskim odgovorom na 33%. Poslednje određivanje ADP-

indukovane agregacije trombocita pokazalo je da je tridesetog dana uzimanja terapije 25% ispitivane populacije i dalje imalo loš terapijski odgovor na klopidogrel (Slika 15).

U periodu od mesec dana praćenja terapije klopidogrelom, 72 (64,3%) bolesnika promenila su odgovor na terapiju. Dvadeset tri (20,5%) bolesnika koja su imala loš terapijski odgovor na klopidogrel sedmog dana pokazala su dobar odgovor na terapiju tridesetog dana uzimanja leka.

U Tabeli 13 prikazana je povezanost između CYP2C19 genotipa i terapijskog odgovora bolesnika na klopidogrel. Na osnovu definisane *cut-off* vrednosti, posle dvadeset četiri časa od uzimanja prve doze leka, 90,0% bolesnika u grupi nosioca CYP2C19\*2 varijante gena pokazalo je loš terapijski odgovor na klopidogrel, odnosno 70,7% bolesnika u grupi nosioca *wild type* genotipa ( $P=0,036$ ). Sedmog dana uzimanja terapije, u grupi nosioca *wild type* genotipa zapažen je pad broja bolesnika sa lošim terapijskim odgovorom na 25,6%, odnosno na 53,3% bolesnika u grupi nosioca CYP2C19\*2 alela ( $P=0,006$ ). Rezultati poslednjeg testiranja, tridesetog dana uzimanja terapije, pokazali su da kod grupe bolesnika koji su nosioci CYP2C19\*2 varijante gena 46,7% bolesnika nema dobar terapijski odgovor na klopidogrel, dok je broj bolesnika sa *wild type* genotipom bio statistički značajno manji, 17,1% ( $P=0,001$ ).

**Tabela 13.** Povezanost između CYP2C19 genotipa i terapijskog odgovora na klopidogrel

24h nakon uzimanja prve doze klopidogrela			
	Wild type (CYP2C19*1/*1)	Heterozigot CYP2C19*2 varijante gena	P
Bolesnici sa dobrim terapijskim odgovorom na klopidogrel, n (%)	24 (29,3)	3 (10,0)	0,036
Bolesnici sa lošim terapijskim odgovorom na klopidogrel, n (%)	58 (70,7)	27 (90,0)	
7. dan od uvođenja terapije klopidogrelom			
	Wild type (CYP2C19*1/*1)	Heterozigot CYP2C19*2 varijante gena	P
Bolesnici sa dobrim terapijskim odgovorom na klopidogrel, n (%)	61 (74,4)	14 (46,7)	0,006
Bolesnici sa lošim terapijskim odgovorom na klopidogrel, n (%)	21 (25,6)	16 (53,3)	
30. dan od uvođenja terapije klopidogrelom			
	Wild type (CYP2C19*1/*1)	Heterozigot CYP2C19*2 varijante gena	P
Bolesnici sa dobrim terapijskim odgovorom na klopidogrel, n (%)	68 (82,9)	16 (53,3)	0,001
Bolesnici sa lošim terapijskim odgovorom na klopidogrel, n (%)	14 (17,1)	14 (46,7)	

#### 4.4.1.1. Povezanost vrednosti ADP testa dobijene pre hirurške intervencije i terapijskog odgovora na klopidogrel

U ispitivanoj populaciji merena je i ADP-indukovana agregacija trombocita pre endarterektomije, tj. pre uvođenja terapije klopidogrelom. Srednja vrednost ADP testa dobijena preoperativno iznosi  $767,09 \pm 146,54$  AU\*min (Tabela 8). Rezultati bolesnika u četvrtom kvartilu ukazuju na visoku reaktivnost trombocita. *Cut-off* vrednost iznosi 856 AU\*min. Bolesnici koji su imali vrednost ADP testa preoperativno veću od 856 AU\*min pripali su grupi bolesnika s povećanom preoperativnom reaktivnošću trombocita.

Broj bolesnika s povećanom reaktivnošću trombocita pre uvođenja terapije klopidogrelom je 28 (25%).

U Tabeli 14 prikazane su vrednosti ADP testa, dobijene nakon dvadeset četiri časa, sedmog dana i tridesetog dana uzimanja leka, u odnosu na klasifikaciju bolesnika na osnovu ADP vrednosti dobijene pre hirurške intervencije, koja je bila manja ili veća od definisane *cut-off* vrednosti (865 AU\*min).

**Tabela 14.** Vrednosti ADP testa tokom perioda praćenja kod bolesnika s povećanom i normalnom reaktivnošću trombocita pre uvođenja klopidorela

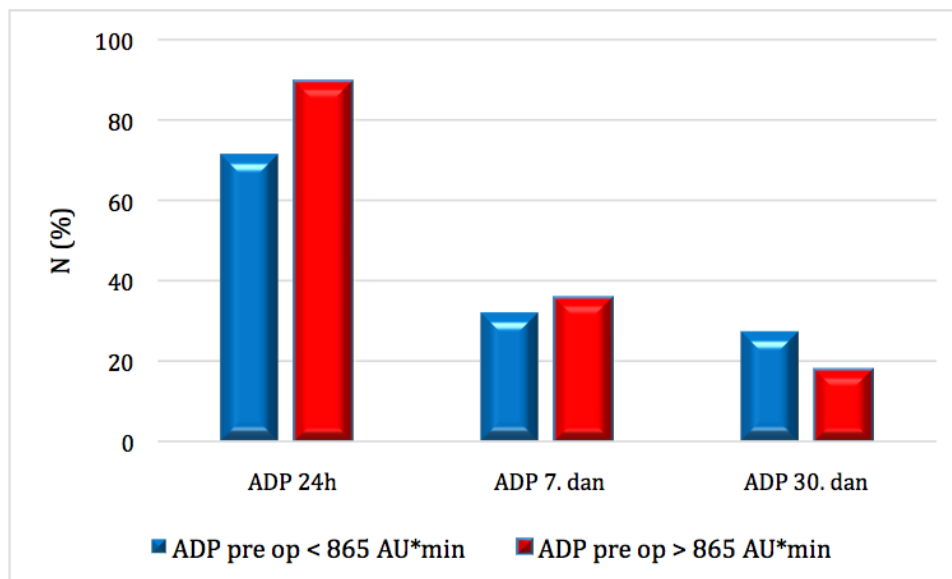
		Srednja vrednost (AU*min)	Standardna devijacija (AU*min)	P
ADP 24h	ADP pre op < 865	660,96	165,404	<0,001
	ADP pre op > 865	803,43	209,891	
ADP 7. dan	ADP pre op < 865	502,08	197,394	0,613
	ADP pre op > 865	525,32	245,032	
ADP 30. dan	ADP pre op < 865	439,54	219,963	0,698
	ADP pre op > 865	420,96	215,759	

Razlika srednjih vrednosti ADP testa dvadeset četiri časa posle prve doze leka statistički je značajna ( $P < 0,001$ ). Posle dvadeset četiri časa, prosečna vrednost ADP testa u grupi bolesnika s preoperativnim vrednostima ADP-a u očekivanom opsegu iznosi



660,96±165,404 AU\*min, a u grupi bolesnika sa povećanom preoperativnom reaktivnošću trombocita je 803,43±209,891 AU\*min. Razlike srednjih vrednosti ADP testa između ove dve grupe bolesnika nakon sedmog dana (P=0,613) i nakon tridesetog dana (P=0,698) uzimanja terapije nisu statistički značajne.

Ukupno 89,3% bolesnika sa povišenim preoperativnim ADP vrednostima je imalo loš odgovor na terapiju dvadeset četiri časa posle prve doze klopidogrela u odnosu na 71,4% bolesnika sa ADP vrednostima manjim od 856 AU\*min (P=0,074) (Slika 16). Međutim, značajan broj bolesnika koji nisu imali dobar odgovor na lek dvadeset četiri časa posle prve doze klopidogrela, nakon sedmog dana uzimanja leka imali su dobar terapijski odgovor. Ukupno 35,7% bolesnika s povišenim preoperativnim ADP vrednostima imalo je loš terapijski odgovor nakon sedmog dana uzimanja leka u odnosu na 32,7% bolesnika s preoperativnim ADP vrednostima ispod definisanog *cut-off*-a (P=0,908). Svega 17,9% bolesnika s povišenim preoperativnim ADP vrednostima imalo je loš odgovor na terapiju nakon tridesetog dana u odnosu na 27,4% bolesnika sa preoperativnim ADP vrednostima manjim od 865 AU\*min (P=0,450) (Slika 16).



**Slika 16.** Bolesnici sa lošim terapijskim odgovorom na klopidogrel u odnosu na vrednosti ADP testa preoperativno tokom perioda praćenja

Procena terapijskog odgovora na klopidogrel urađena je na osnovu prethodno definisane *cut-off* vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita (575 AU\*min), koja je korišćena prilikom analize rezultata u prethodnim poglavljima.

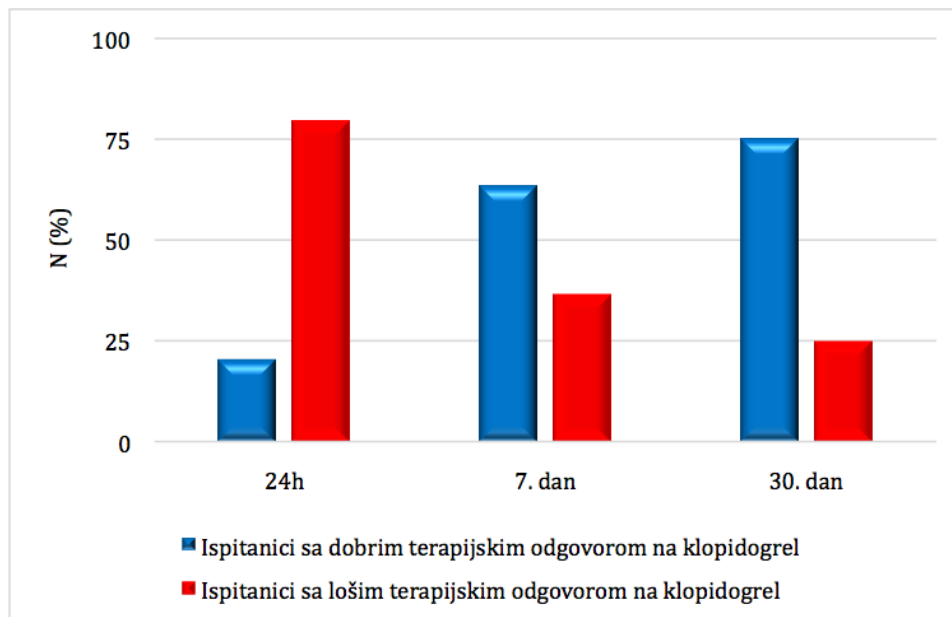
#### 4.4.2. Procena terapijskog odgovora bolesnika na klopidogrel na osnovu vrednosti ADP-TRAP odnosa u ispitivanoj populaciji

Procena terapijskog odgovora bolesnika na klopidogrel urađena je i na osnovu vrednosti odnosa ADP-TRAP testova agregacije trombocita (Tabela 15).

**Tabela 15.** Vrednosti ADP-TRAP odnosa tokom perioda praćenja

	ADP-TRAP odnos, % (srednja vrednost±SD)
pre op	78,42±16,83
24h	64,51±16,98
7. dan	46,82±18,81
30. dan	41,46±22,48

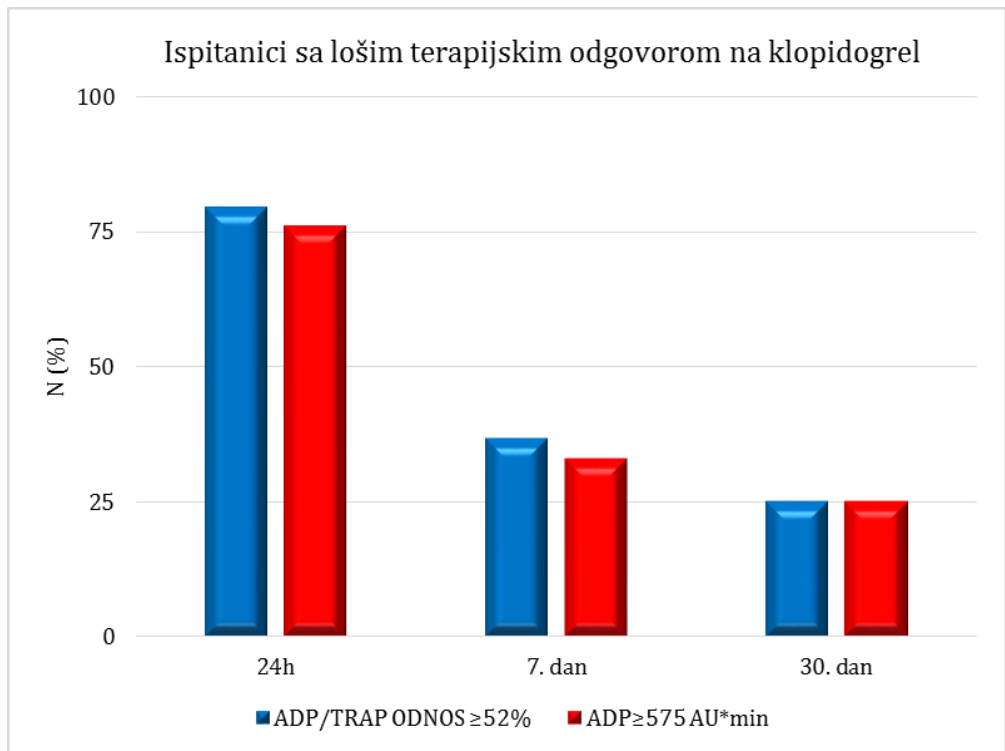
Definisana je *cut-off* vrednost ADP-TRAP odnosa, specifična za ispitivanu populaciju, i ona iznosi 52%. Bolesnici koji su imali vrednost ADP-TRAP odnosa jednaku ili veću od 52% pripali su grupi bolesnika s povećanom reaktivnošću trombocita, tj. grupi bolesnika sa lošim terapijskim odgovorom na lek. Na Slici 17 prikazan je terapijski odgovor bolesnika na klopidogrel tokom perioda praćenja procenjen na osnovu *cut-off* vrednosti ADP-TRAP odnosa.



**Slika 17.** Odgovor bolesnika na terapiju klopidogrelom tokom perioda praćenja u odnosu na *cut-off* vrednost ADP-TRAP odnosa

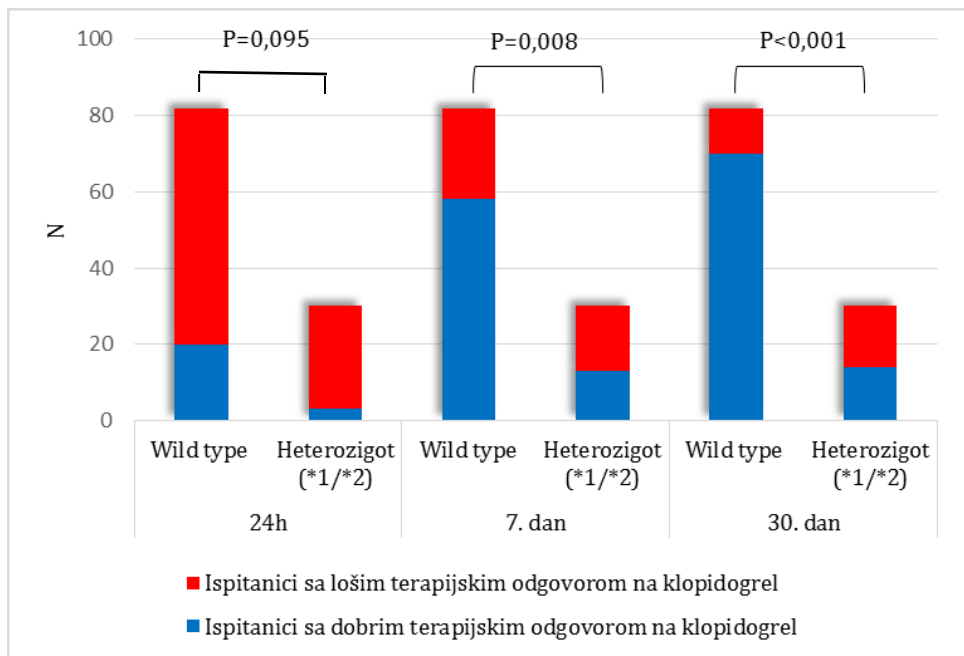
Posle dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze klopidogrela, povećana reaktivnost trombocita utvrđena je kod 79,5% bolesnika, a sedmog dana uzimanja terapije kod 36,6% bolesnika. Poslednje određivanje ADP-indukovane agregacije trombocita pokazalo je da je, tridesetog dana uzimanja terapije, 25% ispitivane populacije i dalje imalo loš terapijski odgovor na klopidogrel (Slika 17).

Chi-square testom poredili smo rezultate terapijskog odgovora bolesnika na klopidogrel dobijene korišćenjem dva načina izražanja rezultata i dve različite *cut-off* vrednosti ( $ADP \geq 575 \text{ AU} \cdot \text{min}$  i  $ADP\text{-TRAP} \geq 52\%$ ). Između rezultata dobijenih prilikom procene terapijskog odgovora bolesnika na klopidogrel nije pokazana statistički značajna razlika ( $P > 0,05$ ). Na osnovu obe *cut-off* vrednosti, bilo da smo pratili vrednosti ADP testa bilo odnos ADP-TRAP, utvrđeno je da 25% ispitivane populacije ima loš terapijski odgovor na klopidogrel tridesetog dana uzimanja terapije (Slika 18).



**Slika 18.** Poređenje vrednosti ADP testa i ADP/TRAP odnosa

Korelacija između *CYP2C19* genotipa i terapijskog odgovora na klopidogrel, definisan na osnovu *cut-off* vrednosti ADP-TRAP odnosa prikazana je na Slici 19.



**Slika 19.** Povezanost *CYP2C19\*2* genotipa i terapijskog odgovora na klopidogrel tokom perioda praćenja

Posle dvadeset četiri časa od uzimanja prve doze leka, 90% bolesnika u grupi nosioca CYP2C19\*2 varijante gena pokazalo je loš terapijski odgovor na klopidogrel, odnosno 75,6% bolesnika u grupi nosioca *wild type* genotipa. Sedmog dana uzimanja terapije, kod grupe bolesnika koji su nosioci *wild type* genotipa zapažen je pad broja bolesnika sa lošim terapijskim odgovorom na 29,3%, odnosno na 14,6% bolesnika tridesetog dana uzimanja terapije. Međutim, u grupi nosioca CYP2C19\*2 varijante gena, sedmog dana uzimanja terapije 56,7% bolesnika su pokazali loš terapijski odgovor, odnosno 53,3% bolesnika tridesetog dana uzimanja terapije. Dakle, rezultati poslednjeg merenja ADP i TRAP-indukovane agregacije trombocita pokazali su da su 16/30 bolesnika koji su nosioci CYP2C19\*2 varijante gena imali loš terapijski odgovor nasuprot 12/82 bolesnika koji nisu nosioci pomenutog alela ( $P < 0,001$ ).

Farmakogenetičkim ispitivanjem utvrđeno je prisustvo CYP2C19\*2/\*2 genotipa kod jednog bolesnika, čije su vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita bile visoke, tj. bolesnik je pokazao loš terapijski odgovor na klopidogrel kod sva tri određivanja agregacije trombocita (Tabela 16).

**Tabela 16.** Reaktivnost trombocita kod nosilaca CYP2C19\*2/\*2 genotipa tokom perioda praćenja

	24h	7. dan	30. dan
ADP, AU*min	948	913	878
ADP-TRAP odnos (%)	78	74	73

#### 4.5. Uticaj genetskih i negenetski faktora na terapijski odgovor na klopidogrel u ispitivanoj populaciji

Koristeći binarnu logističku regresionu analizu, univarijantnom analizom utvrđeno je da je prisustvo CYP2C19\*2 varijante gena kod bolesnika statistički značajan faktor rizika za loš terapijski odgovor na klopidogrel (OR = 6,667; 95% CI: 2,596-17,120;  $P < 0,001$ ). Bolesnici koji su nosioci CYP2C19\*2 varijante gena imaju skoro 6,5 puta veći rizik od toga da će tridesetog dana uzimanja klopidogrela ADP-TRAP odnos biti veći od 52% u odnosu na

bolesnike sa *wild type* genotipom. Povećan nivo ukupnog holesterola (OR = 2,016; 95% CI: 1,265-3,214; P=0,003) i broj eritrocita (OR = 3,286; 95% CI: 1,027-10,513; P=0,045) predstavljaju stečene faktore rizika za loš terapijski odgovor na klopidogrel (Tabela 17).

**Tabela 17.** Univarijantna logistička regresiona analiza faktora rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel (genetski i negenetski faktori)

Varijable	P	OR	95% CI
Starost	0,661	0,988	0,938-1,042
Pol	0,270	1,625	0,686-3,847
ITM	0,218	0,440	0,119-1,624
Prethodni cerebrovaskularni događaj (CVI ili TIA)	1,000	1,000	0,410-2,441
Pozitivna porodična istorija kardiovaskularnih bolesti	0,734	1,165	0,483-2,808
Pušenje	1,000	1,000	0,372-2,685
Lekovi			
Blokatori β-adrenergičkih receptora	0,572	0,770	0,311-1,907
ACE inhibitori	1,000	1,000	0,421-2,373
Blokatori kalcijumovih kanala	0,724	0,844	0,330-2,160
Statini	0,327	0,647	0,271-1,546
Laboratorijski parametri			
Leukociti, 10 <sup>-9</sup> /L	0,420	1,099	0,873-1,384
Eritrociti, 10 <sup>-12</sup> /L	<b>0,045</b>	<b>3,286</b>	<b>1,027-10,513</b>
Trombociti, 10 <sup>-9</sup> /L	0,149	1,006	0,998-1,013
Fibrinogen, g/L	0,408	1,187	0,791-1,780
Kreatinin, μmol/L	0,173	0,986	0,967-1,006
Glukoza, mmol/L	0,408	1,146	0,830-1,581
Trigliceridi, mmol/L	0,859	1,059	0,562-1,997
Ukupan holesterol, mmol/L	<b>0,003</b>	<b>2,016</b>	<b>1,265-3,214</b>
CYP2C19*2 varijanta gena	<b>&lt;0,001</b>	<b>6,667</b>	<b>2,596-17,120</b>

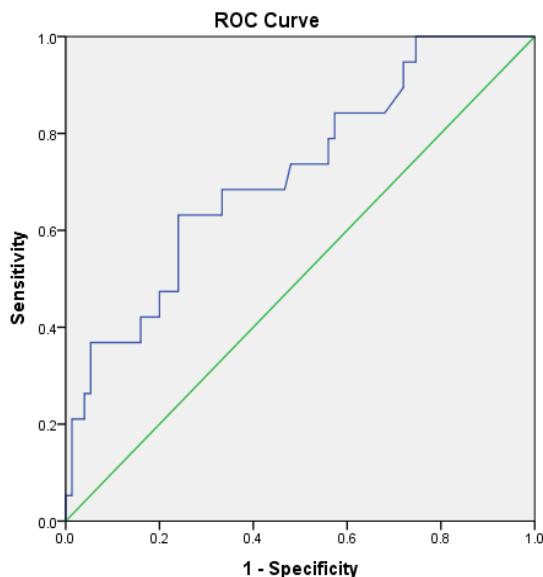
Prilikom dobijanja prikazanih rezultata binarnom logističkom regresionom analizom korišćen je terapijski odgovor na klopidogrel, definisan na osnovu *cut-off* vrednosti ADP-TRAP odnosa, kao zavisna varijabla. Kada se terapijski odgovor na klopidogrel, definisan na osnovu *cut-off* vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita

(AU\*min), koristi kao zavisna varijabla, univarijantnom analizom iznova je utvrđeno da je prisustvo CYP2C19\*2 varijanta gena kod bolesnika statistički značajan faktor rizika za loš terapijski odgovor na klopidogrel (OR 4.250; 95% CI: 1.695-10.658, P<0.01).

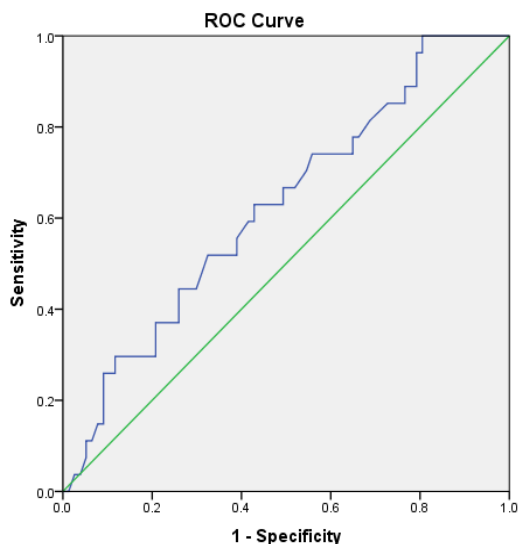
#### 4.5.1. Uticaj stečenih faktora rizika za loš terapijski odgovor na klopidogrel u ispitivanoj populaciji

Koristeći binarnu logističku regresionu analizu, univarijantnom analizom utvrđeno je da povećan nivo ukupnog holesterola (OR = 2,016; 95% CI: 1,265-3,214; P=0,003) i broj eritrocita (OR = 3,286; 95% CI: 1,027-10,513; P=0,045) predstavljaju stečene faktore rizika za loš terapijski odgovor na klopidogrel (Tabela 17).

ROC analizom je ispitivan dijagnostički značaj povećanog nivoa holesterola (Slika 20) i broja eritrocita (Slika 21).



**Slika 20.** ROC kriva za procenu sposobnosti povećanog nivoa holesterola za predikciju lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel



**Slika 21.** ROC kriva za procenu sposobnosti broja eritrocita za predikciju lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel

Analizom ROC krive (Tabela 18) utvrđeno je da povećan nivo holesterola može biti prediktor za pojavu lošeg odgovora na terapiju klopidogrela (površina ispod krive = 0,717;  $P=0,004$ ), što nije pokazano za eritrocite.

**Tabela 18.** Karakteristike ROC krive

Varijabla	Površina ispod krive (AUC)	95% CI	P
Ukupan holesterol	0,717	0,588-0,847	0,004
Eritrociti	0,625	0,506-0,744	0,054

Multivarijantnom logističkom regresionom analizom utvrđeno je da su prisustvo CYP2C19\*2 varijanta gena kod bolesnika (OR = 4.384, 95% CI 1,296-14,833,  $P=0,017$ ) i visok nivo ukupnog holesterola (OR = 2,090, 95% CI 1,263-3,459,  $P=0,004$ ) jedini nezavisni faktori rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel (Tabela 19). Koristeći model 1, pokazano je da bolesnici koji su nosioci CYP2C19\*2 varijante gena imaju skoro 4,5 puta veći rizik da će nakon trideset dana uzimanja klopidogrela imati loš odgovor na lek u odnosu na



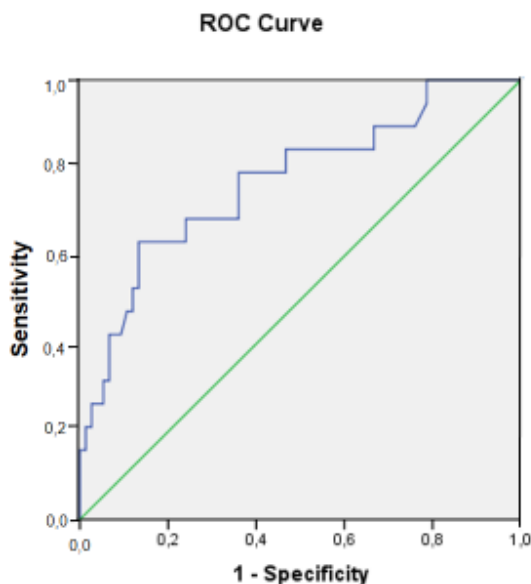
bolesnike sa *wild type* genotipom. Povećanje ukupnog holesterola za jedan povećava rizik od pojave lošeg odgovora na terapiju klopidogrelom nakon tridesetog dana uzimanja leka za dva puta. Daljom analizom, isključivanjem eritrocita kao nezavisne varijable, u modelu 2 nezavisne varijable CYP2C19\*2 alel i nivo ukupnog holesterola nisu izgubili svoju statističku značajnost i zato su uključene u model predikcije lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel.

**Tabela 19.** Multivarijanta logistička regresiona analiza faktora rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel

	Varijable	P	OR	95% CI
Model 1	Eritrociti, 10 <sup>-12</sup> /L	0,689	1,355	0,305-6,013
	Ukupan holesterol, mmol/L	0,004	2,090	1,263-3,459
	CYP2C19*2 varijanta gena	0,017	4,384	1,296-14,833
Model 2	Ukupan holesterol, mmol/L	0,004	2,088	1,270-3,433
	CYP2C19*2 varijanta gena	0,009	4,812	1,468-15,773

Model za predikciju lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel:

**suma = -5,857+ 0,736\*(nivo ukupnog holesterola) + 1,571\*(prisustvo CYP2C19\*2 alela)**



**Slika 22.** ROC kriva modela za predikciju lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel

Analizom ROC krive (Slika 22) utvrđeno je da model koji uključuje nivo ukupnog holesterola i prisustvo *CYP2C19\*2* varijante gena može biti prediktor lošeg odgovora na klopidogrel 30 dana nakon uzimanja leka. *Cut-off* vrednost modela je 22,95 sa osetljivošću od 68,4% i specifičnošću 76%. Površina ispod ROC krive je 0,770 (95% CI 0,644-0,896,  $P < 0,001$ ).

Prisustvo *CYP2C19\*2* varijante gena objasnilo je povećanu reaktivnost trombocita kod 8,2% bolesnika nakon 7 dana uzimanja terapije klopidogrelom ( $P=0,009$ ). Povišena koncentracija ukupnog holesterola odgovorna je za 15,5% interindividualne varijabilnosti reaktivnosti trombocita nakon 30 dana uzimanja terapije klopidogrelom ( $P=0,003$ ).

Prisustvo *CYP2C19\*2* varijante gena objasnilo je 20% interindividualne varijabilnosti reaktivnosti trombocita nakon 30 dana uzimanja terapije klopidogrelom, dok je 25,4% povećane reaktivnosti trombocita tokom terapije klopidogrelom objašnjeno koncentracijom ukupnog holesterola i prisustvom pomenutog alela (Tabela 20).

**Tabela 20.** Varijabilnost reaktivnosti trombocita

	ADP-TRAP 24h		ADP-TRAP nakon 7. dana		ADP-TRAP nakon 30. dana	
	R <sup>2</sup>	P value	R <sup>2</sup>	p value	R <sup>2</sup>	p value
Ukupni holesterol	2,8%	0,189	0,5%	0,570	15,5%	0,003
CYP2C19*2 alel	4,3%	0,107	8,2%	0,009	20%	< 0,0005
Ukupni holesterol + CYP2C19*2 alel	0,5%	0,600	3,5%	0,126	25,4%	< 0,0005

#### 4.5.2. Uticaj drugih lekova na odgovor bolesnika na terapiju klopidogrelom

Nije uočena statistički značajna razlika između vrednosti ADP testa posle dvadeset četiri časa, sedmog dana i tridesetog dana uzimanja klopidogrela između bolesnika koji su uzimali terapiju ACE inhibitora (Tabela 21), blokatora β-adrenergičkih receptora (Tabela 22), blokatora kalcijumovih kanala (Tabela 23) ili statina (Tabela 24) i bolesnika koji nisu uzimali pomenute lekove.

**Tabela 21.** Uticaj statina na ADP-indukovanu agregaciju trombocita

Statini	Primena terapije statinima (da/ne)	Srednja vrednost (%)	Standardna devijacija	P
ADP-TRAP 24h	da	62,9	17,5	0,369
	ne	65,9	16,5	
ADP-TRAP 7. dan	da	45,7	18,1	0,565
	ne	47,8	19,6	
ADP-TRAP 30. dan	da	39,7	23,6	0,428
	ne	43,1	21,4	

**Tabela 22.** Uticaj ACE inhibitora na ADP-indukovanu agregaciju trombocita

ACE Inhibitori	Primena terapije ACE inhibitora (da/ne)	Srednja vrednost (%)	Standardna devijacija	P
ADP-TRAP 24h	da	64,7	15,4	0,907
	ne	64,3	19,1	
ADP-TRAP 7. dan	da	47,0	16,3	0,908
	ne	46,6	21,9	
ADP-TRAP 30. dan	da	42,3	21,6	0,641
	ne	40,3	23,8	

**Tabela 23.** Uticaj blokatora  $\beta$ -adrenergičkih receptora na ADP-indukovanu agregaciju trombocita

Blokatori $\beta$ -adrenergičkih receptora	Primena terapije beta blokatora (da/ne)	Srednja vrednost (%)	Standardna devijacija	P
ADP-TRAP 24h	da	64,5	15,2	0,992
	ne	64,5	18,0	
ADP-TRAP 7. dan	da	46,7	17,1	0,953
	ne	46,9	19,8	
ADP-TRAP 30. dan	da	40,2	19,7	0,664
	ne	42,2	24,1	

**Tabela 24.** Uticaj blokatora kalcijumovih kanala na ADP-indukovanu agregaciju trombocita

Ca blokatori	Primena terapije Ca blokatora (da/ne)	Srednja vrednost (%)	Standardna devijacija	P
ADP-TRAP 24h	da	66,6	14,9	0,389
	ne	63,6	17,9	
ADP-TRAP 7. dan	da	46,5	17,7	0,908
	ne	46,9	19,4	
ADP-TRAP 30. dan	da	41,5	25,1	0,998
	ne	41,5	21,3	

Razlike srednjih vrednosti ADP-TRAP testa nisu statistički značajne između bolesnika koji su uzimali statine tipa atorvastatin i onih koji su uzimali druge tipove statina posle dvadeset četiri časa (P=0,183) od uzimanja prve doze, sedmog dana (P=0,577) i tridesetog dana (P=0,931) uzimanja klopidogrela.

Isto tako, nije dobijena statistička značajnost između srednjih vrednosti ADP-TRAP testa između bolesnika koji su pili diltiazem i onih koji su pili amlodipine posle dvadeset četiri časa nakon uzete prve doze leka (P=0,967), sedmog (P=0,871) i tridesetog dana uzimanja klopidogrel (P=0,167).

Univarijantnom logističkom regresijom nije pokazana povezanost lekova (blokatori  $\beta$ -adrenergičkih receptora, blokatori kalcijumovih kanala, ACE-inhibitori, statini) i odgovora na terapiju klopidogrelom. (Tabela 17).

#### 4.6. Povezanost neželjenih događaja i terapijskog odgovora na klopidogrel

Kliničko stanje bolesnika (pogoršanje ili poboljšanje) praćeno je godinu dana nakon intervencije. U smislu pogoršanja, praćeni su moždani udar, tranzitorni ishemijski događaj i smrtni ishod. Tokom perioda praćenja bolesnika, zabeležen je moždani udar kod 2 (1,8%) bolesnika. Oba bolesnika su nosioci CYP2C19\*2 varijante gena i imali su povećanu reaktivnost trombocita praćenu ADP-indukovanom agregacijom trombocita, tj. loš

terapijski odgovor na klopidogrel tokom perioda praćenja. S obzirom na mali broj bolesnika kod kojih je zabeleženo pogoršanje kliničkog stanja, nijedna statistička metoda nije mogla da utvrdi uticaj prisustva *CYP2C19\*2* varijante gena, niti ostalih faktora rizika na razvoj moždanog udara.

## 5. DISKUSIJA

Na osnovi naših saznanja, ovo je prvo istraživanje u kome je ispitivana povezanost terapijskog odgovora na antitrombocitni lek klopidogrel, koji je praćen laboratorijskim ispitivanjem agregacije trombocita, i prisustva CYP2C19\*2 varijante gena kod bolesnika sa stenozom karotidnih arterija, kod kojih je izvršena endarterektomija i postoperativno uveden klopidogrel.

Na osnovu literaturnih podataka, prevalenca CYP2C19\*2 alela se razlikuje među različitim etničkim grupama. Zastupljenost ovog alela je najveća kod naroda Istočne Azije (50% - 65%), kod afričko-američke populacije je 30% - 45%, a kod bele rase kreće se od 20% do 30% (65). U našem istraživanju (Tabela 7), farmakogenetičkim ispitivanjem pokazano je da su 25,9% bolesnika nosioci heterozigotne CYP2C19\*2 varijante gena, a da je jedan (0,9%) bolesnik nosilac homozigotne CYP2C19\*2 varijante gena. Dakle, zastupljenost nosioca CYP2C19\*2 alela u ispitivanoj populaciji je 26,8%. Ovaj podatak je u skladu s prethodno publikovanim radovima kod kojih su oko 20% - 35% bolesnika bili nosioci najmanje jedne CYP2C19\*2 varijante gena (138-143). Naši podaci predstavljaju prve rezultati o učestalosti CYP2C19\*2 alela u srpskoj populaciji.

U našem istraživanju, efekat antiagregacijskog leka klopidogrela praćen je laboratorijskim testom, ADP-indukovanom agregacijom trombocita. Vrednosti testa su očekivano opadale tokom prvih mesec dana primene klopidogrela i pokazana je statistički značajna razlika između vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita dobijene pre hirurške intervencije, dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze klopidogrela (75 mg), sedmog i tridesetog dana od uvođenja terapije ( $P < 0,0005$ ) (Tabela 9). Pad reaktivnosti trombocita u prvih meseca dana terapije zabeležen je, takođe, i u studiji (144) kojom su ispitivani bolesnici na terapiji održavanja klopidogrelom (75 mg) godinu dana nakon PKI; praćena je promena agregabilnosti trombocita mesec dana i šest meseci nakon intervencije. Rezultati su pokazali značajno smanjenje reaktivnosti trombocita tokom prvog meseca terapije, bez dalje promene šest meseci nakon intervencije. Kubica i saradnici (57) pratili su terapiju klopidogrela u dužem vremenskom period: tri, šest i devet meseci od uvođenja klopidogrela (75 mg) kod bolesnika kod kojih je izvršena PKI nakon akutnog infarkta

miokarda. Pokazali su da ADP-indukovana agregacija trombocita opada u prvih šest meseci, značajnije u prva tri meseca, da bi se vrednost poslednjeg određivanja povećala devet meseci od uvođenja leka, što su autori objasnili neredovnim uzimanjem terapije. Ukoliko se u ispitivanoj grupi manje od 76,1% bolesnika pridržava upustava lekara kada je reč o terapiji, neredovno uzimanje leka predstavlja nezavisni prediktor visokih vrednosti agregacije trombocita (57).

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da su bolesnici koji su nosioci CYP2C19\*2 varijante gena imali statistički značajno veće vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita u odnosu na bolesnike koji nisu nosioci pomenutog alela tokom perioda praćenja (Slika 14). Ovaj podatak je u saglasnosti s rezultatima prethodno publikovanih studija, koje su pokazale povezanost CYP2C19\*2 varijante gena i smanjene koncentracije aktivnog metabolita klopidogrela u plazmi (140), kao i smanjene inhibicije agregacije trombocita (140–148). Studije koje su izučavale uticaj CYP2C19\*2 varijante gena na farmakokinetiku i farmakodinamiku klopidogrela kod zdravih dobrovoljaca, odnosno kod bolesnika sa stabilnom koronarnom arterijskom bolešću, pokazale su da je antitrombocitni efekat klopidogrela *in vivo* povezan s raspoloživom koncentracijom aktivnog metabolita. Mega i saradnici (89) objavili su da je kod zdravih dobrovoljaca koji su nosioci CYP2C19\*2 varijante gena koncentracija aktivnog metabolita u plazmi za 34% manja i da je za 25% smanjena inhibicija agregacije trombocita u odnosu na bolesnike koji nisu nosioci pomenute varijante gena. U našem istraživanju nismo određivali koncentraciju aktivnog metabolita klopidogrela u plazmi bolesnika, tako da ne možemo dati jasan dokaz povezanosti smanjene koncentracije metabolita i smanjenog antitrombocitnog efekta klopidogrela kod nosioca CYP2C19\*2 alela.

U našem istraživanju (Tabela 12), kod nosioca CYP2C19\*1/\*1 genotipa (*wild type*) vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita pokazuju tendenciju pada u toku vremena. Kod nosioca CYP2C19\*2 varijante gena, zapaženo je opadanje agregabilnosti trombocita tokom prvih sedam dana uzimanja terapije. Međutim, u periodu od sedmog do tridesetog dana uzimanja klopidogrela nije zapažena promena agregabilnosti trombocita (P=0,241).

Veliki je izazov definisati visoku reaktivnost trombocita tokom antitrombocitne terapije. Dobijeni nalazi bolesnika su često bili upoređivani sa zdravom kontrolnom



grupom. Ovaj pristup nije pogodan zbog ateroskleroze koja može da bude prisutna, čak i bez kliničkog dokaza bolesti, kod zdravih dobrovoljaca. Zatim, fiziologija trombocita kod zdravih osoba se može razlikovati od trombocita bolesnika. U zavisnosti od načina definisanja visoke reaktivnosti trombocita u toku terapije, u literaturi se navodi različita učestalost bolesnika sa lošim terapijskim odgovorom na klopidogrel. Reaktivnost trombocita ispod definisane *cut-off* vrednosti ukazuje na dobar terapijski odgovor bolesnika na primenjenu terapiju. Istraživači koriste gornji kvartil ili kvintil svojih podataka za definisanje *cut-off* vrednosti. Međutim, verovatno je najbolji način određivanja *cut-off* vrednosti na osnovu kliničkih ishoda koriscenjem ROC analize (70).

*Cut-off* vrednosti testova za praćenje agregabilnosti trombocita kojom se definiše loš terapijski odgovor na lek uglavnom su ustanovljene kod bolesnika s koronarnom bolešću kod kojih je izvršena perkutana koronarna intervencija. Sibbing i saradnici (128) su kod bolesnika kod kojih je izvršena PKI definisali *cut-off* vrednost od 468 AU\*min primenom MEA metode i tu vrednost su naredne studije koristile za procenu terapijskog odgovora na klopidogrel (154, 155). *Cut-off* vrednost od 468 AU\*min povezana je s pojavom tromboze stenta tridesetog dana uzimanja terapije. Siller-Matulla i saradnici (108) su kod iste grupe bolesnika istom metodom dobili *cut-off* vrednost od 480 AU\*min, koja je u skladu s prethodno pomenutom vrednošću. Međutim, *cut-off* vrednost ADP testa kod bolesnika sa akutnim infarktom miokarda iznosila je 298 AU\*min (156). Koristeći istu metodu za praćenje reaktivnosti trombocita, u literaturi je dokumentovano da se bazična reaktivnost trombocita razlikuje kod različitih kliničkih stanja. Vrednost agregacije trombocita izmerena pre uvođenja terapije veća je kod bolesnika sa infarktom miokarda u odnosu na vrednosti kod bolesnika sa stabilnom anginom pektoris (157).

Dakle, različite *cut-off* vrednosti dobijene su kod različitih patoloških stanja. Na primer, bolesnici kod kojih je izvršena PKI, bolesnici sa dijabetesom lečeni PKI i bolesnici sa AKS mogu da imaju različite *cut-off* vrednosti za procenu visoke reaktivnosti trombocita. Sibbing i saradnici su, koristeći MEA metodu, definisali "therapeutic window" (189 do 470 AU\*min), opseg agregacija trombocita u okviru koga je najmanja incidenca neželjenih događaja, tj. najmanji rizik od pojave krvarenja i tromboze stenta (158). Međutim, pošto nivo reaktivnosti trombocita može imati različit prognostički značaj u odnosu na populaciju

bolesnika koja se posmatra, potrebno je i terapijski opseg identifikovati za svaku populaciju ponaosob (159).

Zapažena je velika raznolikost rezultata prilikom identifikacije lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel među etničkim grupama i zemljama (152), primenom različitih testova (75,160), različitih agonista koji se koriste prilikom praćenja agregabilnosti trombocita i testiranjem u različito vreme u odnosu na vreme kada je uzeta terapija (111). U zavisnosti od tipa korišćenog testa, koncentracije agonista, primenjene doze leka i *cut-off* vrednosti, prevalenca lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel varira od 4% do 30% (161), a kod pacijenata sa moždanim udarom i do 40,8% (162). Dakle, različiti rezultati prikazani u publikovanim studijama najverovatnije su posledica nedostatka standardizacije funkcionalnih testova za procenu reaktivnosti trombocita koji se koriste za detekciju bolesnika sa lošim terapijskim odgovorom na klopidogrel, kao i nedostatka univerzalno prihvaćene i validovane *cut-off* vrednosti funkcionalnih testova. Trebalo bi istaći i da na vrednosti agregabilnosti trombocita može uticati vreme uzorkovanja krvi i vreme testiranja od trenutka uzimanja poslednje doze leka (54). Kozinsky i saradnici (163) pokazali su da je najveća prevalenca lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel bila u 10h ujutru poredeći sa praćenjem u 06h, 14h i 19h kod bolesnika koji su uzeli dozu odžavanja leka (75 mg) u 8h ujutru.

U našem istraživanju, procena terapijskog odgovora na klopidogrel urađena je na osnovu definisane *cut-off* vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita merene MEA metodom tridesetog dana nakon uvođenja terapije klopidogrelom. *Cut-off* vrednost iznosi 575 AU\*min i specifična je za ispitivanu populaciju. Bolesnici koji su imali vrednost ADP-indukovane agregacije trombocita veću od 575 AU\*min pripali su grupi bolesnika s povećanom reaktivnošću trombocita. Ovaj pristup omogućio je precizniju identifikaciju bolesnika s lošim odgovorom na terapiju klopidogrelom.

Veoma je važno istaći da dobijene *cut-off* vrednosti imaju visoku negativnu prediktivnu vrednost za pojavu trombotičkih i ishemijskih događaja, ali veoma nisku pozitivnu prediktivnu vrednost, što ukazuje da povećana agregabilnost trombocita nije jedini odgovoran faktor ovih događaja (73). U našem istraživanju, *cut-off* vrednost ima dijagnostički značaj koji ukazuje na ispoljavanje efekta klopidogrela. To je veoma značajno kod lečenja pacijenata kod kojih efekat leka nije poželjan, npr. kod hitne hirurške

intervencije (164). Pošto nismo imali kliničkih ishoda, nismo mogli da validiramo prognostičku vrednost naše dijagnostičke *cut-off* vrednosti.

Bolesnici koji su imali reaktivnost trombocita preko 575 AU\*min predstavljaju 25% ispitivane populacije u našem istraživanju (Slika 15) i ovaj podatak o prevalenci lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel u skladu je s literaturnim podacima o zastupljenosti povećane agregabilnosti trombocita (135).

Kao što smo prethodno napomenuli, većina istraživanja su ispitivala bolesnike s koronarnom arterijskom bolešću, koji su lečeni PKI i tretirani klopidogrelom. Kod većine tih studija, agregacije trombocita praćene su pre ili neposredno posle intervencije, tako da postoji mali broj podataka o promeni odgovora na klopidogrel u toku vremena. Literaturni podaci ukazuju na to da oko 50% ispitivane populacije promeni status od bolesnika sa „lošim terapijskim odgovorom” u bolesnika sa „dobrim terapijskim odgovorom” tokom primene terapije klopidogrela (54). Ovaj podatak ukazuje na to da je nivo aktivnosti trombocita nepredvidiv tokom terapije i da su potrebna ponovna testiranja tokom tretmana klopidogrelom (76). U našem istraživanju (Slika 15), dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze klopidogrela, povećana reaktivnost trombocita detektovana je kod 75,9% bolesnika, da bi broj bolesnika koji ima loš terapijski odgovor na klopidogrel pao na četvrtinu ispitivane populacije posle tridesetog dana uzimanja terapije. Prema rezultatima poslednja dva merenja, 20,5% bolesnika koji su imali loš terapijski odgovor na klopidogrel sedmog dana, pokazali su dobar odgovor na terapiju tridesetog dana uzimanja leka. Naši rezultati su u skladu s publikovanim rezultatima Gurbela i saradnika (165); oni su pokazali da je kod bolesnika, koji primaju dozu održavanja klopidogrela nakon PKI, nivo inhibicije trombocita vremenski zavistan. Prevalenca rezistencije na klopidogrel koja je petog dana iznosila 31% opala je tridesetog dana tretmana na 15%. Campo i saradnici (144) pokazali su, takođe, kod iste grupe bolesnika da je 27% ispitivane grupe promenilo odgovor na terapiju u toku prvog meseca tretmana klopidogrelom. U odnosu na vrednosti dobijene neposredno pre intervencije, broj bolesnika sa lošim odgovorom na klopidogrel smanjen je u toku prvog meseca sa 36% na 13% i ostao je nepromenjen na sledećem merenju, šest meseci nakon intervencije. Bolesnici koji su na hroničnoj terapiji klopidogrelom u dozi od 75 mg praćeni su tri nedelje jednom nedeljno i u tom periodu je MEA metodom zabeleženo

da su 93,5% bolesnika imali nepromenjen fenotip, a 6,5% promenilo je odgovor na terapiju (166).

U literaturi može da se nađu različiti podaci o povezanosti CYP2C19 genotipa s terapijskim odgovorom na klopidogrel. Hulot i saradnici (99) među prvima su publikovali rezultate o terapijskom odgovoru zdravih dobrovoljaca na klopidogrel i povezanošću prisustva CYP2C19 genotipa sa odgovorom na lek. Pokazali su da nosioci CYP2C19\*1/\*2 genotipa imaju slabiji odgovor u odnosu na nosioce *wild type* genotipa. Trenk i saradnici (167) ispitivali su 797 bolesnika nakon PKI. Pre intervencije, bolesnici su primili 600 mg klopidogrela da bi nakon intervencije terapija nastavljena sa 75 mg klopidogrela i 100 mg aspirina dnevno. LTA metodom utvrdili su da su nakon uključivanja doze održavanja 41,3% bolesnika koji su nosioci CYP2C19\*2 alela imali povećanu agregabilnost trombocita nasuprot 22,5% bolesnika sa *wild type* genotipom. Drugim rečima, broj bolesnika s povećanom reaktivnošću trombocita je 18,8% veći kod nosioca CYP2C19\*2 alela nego kod nosioca *wild type* genotipa. Razlike u agregabilnosti trombocita pre uvođenja klopidogrela između genetičkih grupa nisu zapažene. Trenk i saradnici su prethodne rezultate potvrdili i praćenjem ekspresije proteina na površini aktiviranih trombocita flow citometrijom (CD62P, PAC-1, CD40L, CD41, CD63).

Prema rezultatima naše studije (Tabela 13) koja je uključila manji broj bolesnika sa stenozom karotidnih arterija koji su primali niske doze klopidogrela (75 mg), 46,7% bolesnika među nosiocima CYP2C19\*2 alela imalo je loš terapijski odgovor na klopidogrel trideset dana terapije klopidogrelom, odnosno 17,1% bolesnika u grupi nosioca *wild type* genotipa (P=0,001). Naši podaci pokazuju da broj bolesnika s lošim odgovorom na lek u grupi nosioca CYP2C19\*1/\*1 genotipa opada u toku vremena. U grupi nosioca CYP2C19\*2 alela, broj bolesnika s lošim odgovorom na lek smanjen je tokom sedam dana od uvođenja terapije i ostao je nepromenjen do kraja perioda praćenja (trideset dana). U našem istraživanju, prevalenca lošeg terapijskog odgovora na lek kod nosioca CYP2C19 genotipa veća je u odnosu na podatke iz studije autora Sibbing i saradnika (149), koji su kod bolesnika sa stabilnom arterijskom bolešću pokazali da 19,4% bolesnika ima loš odgovor na terapiju; među njima je bilo 26 % nosioca CYP2C19\*2 alela. Prevalenca CYP2C19\*2 alela u ispitivanoj populaciji bila je 25%. U pomenutoj studiji praćeni su bolesnici sedam meseci nakon PKI pri hroničnoj terapiji klopidogrelom za razliku od većine studija koje su pratile

agregabilnost trombocita prilikom terapije klopidogrelom ubrzo posle davanja udarne doze klopidogrela ili nakon prve doze održavanja. Na taj način eliminisan je faktor vremena uzimanja leka na laboratorijsko testiranje. PEGASUS-PCI studija (108) uključila je 416 bolesnika s koronarnom artrejskom bolešću koji su lečeni PKI. Pacijenti su primili udarnu dozu klopidogrela od 600 mg najmanje dva sata posle PKI nakon koje je uvedena dnevna doza od 75 mg. Upotreba blokatora  $\beta$ -adrenergičkih receptora, inhibitora protonskih pumpi i statina kod bolesnika bila je velika. Studija je takođe uključila i pacijente sa dijabetesom. Dvadeset sedam procenata bolesnika sa CYP2C19\*2 varijantom gena nije imalo adekvatan terapijski odgovor na klopidogrel. Hochholzer i saradnici (168) su kod bolesnika kod kojih je izvršena PKI i uvedena doza održavanja klopidogrela pokazali da 58,7% nosioca CYP2C19\*1/\*2 genotipa nije imalo adekvatan odgovor na terapiju. Pervalenca CYP2C19\*2 alela bila je 31%.

Na prevalencu lošeg odgovora na lek utiče odabir ispitivane populacije, dizajn studije, odabir testa kojim se prati agregabilnost trombocita, način definisanja *cut-off* vrednosti. Takođe, mogući razlog različitih rezultata je i prethodno pomenuto različito vreme uzorkovanja krvi od trenutka uzimanja leka. Na primer, u PEGASUS-PCI studiji određivala se agregabilnost trombocita odmah nakon intervencije ugradnje stenta. PKI dovodi do oslobađanja mnogobrojnih medijatora koagulacije koji dodatno aktiviraju trombocite, tako da je moguće da merenje agregabilnosti trombocita odmah nakon PKI intervencije ne reflektuje odgovor na klopidogrel (108). Nakata i saradnici (152) su primenom različitih testova došli do saznanja da je približno 74% bolesnika, nosioca CYP2C19\*2 alela, imalo loš terapijski odgovor na klopidogrel u grupi bolesnika kod kojih je izvršena PKI. Agregabilnost trombocita testirana je u proseku 20 dana nakon intervencije. Ovaj podatak sugeriše da je potrebno ponavljati testiranja tokom perioda praćenja. Meves i saradnici (161) dobili su visoku prevalencu lošeg terapijskog odgovora kod pacijenata s moždanim udarom. Nakon 48h od uvođenja terapije klopidogrelom, 44% pacijenata imalo je povećanu agregabilnost trombocita. Dakle, inhibicija agregacije trombocita klopidogrelom vremenski je zavisna. Kad se primenjuje doza održavanja (75 mg dnevno), maksimalan efekat klopidogrela očekuje se 3 do 5 dana (161) i praćenje leka se ne preporučuje pre petog dana (76).

U našem istraživanju određivali smo i ADP-indukovanu agregaciju trombocita pre hirurške intervencije, odnosno pre uvođenja terapije klopidogrelom. Dobili smo da je 25% bolesnika imalo povišene vrednosti ADP testa pre uvođenja terapije klopidogrela. U literaturi se nalaze podaci o povećanoj agregabilnosti trombocita pre uvođenja terapije kao prediktoru lošeg odgovora na antitrombocitnu terapiju (70). Naši rezultati (Tabela 14) su pokazali da su vrednosti ADP testa dvadeset četiri časa posle prve doze leka veće kod bolesnika s povišenom bazičnom agregabilnošću trombocita u odnosu na ostatak ispitivane grupe ( $P < 0,001$ ), dok statistički značajna razlika vrednosti nije zapažena prilikom merenja sedmog dana ( $P = 0,613$ ) i tridesetog dana ( $P = 0,698$ ) uzimanja terapije. Značajan broj bolesnika koji nisu imali dobar odgovor na lek dvadeset četiri časa posle prve doze klopidogrela, nakon sedmog dana uzimanja leka imali su dobar terapijski odgovor. Osamdeset dva procenata bolesnika s povišenim preoperativnim ADP vrednostima imalo je dobar odgovor na terapiju nakon tridesetog dana u odnosu na 72,6% bolesnika sa preoperativnim ADP vrednostima ispod definisanog *cut-off*-a. Naši podaci su u skladu sa rezultatima studije autora Gurbel PA i saradnika (165), koji su pokazali da su pacijenti s najvećom bazičnom agregabilnošću trombocita, kod kojih je izvršena PKI, imali najmanju antitrombocitnu zaštitu u prvih pet dana tretmana, pogotovo u okviru prvih dvadeset četiri časa od uvođenja terapije. Payne i saradnici (169) pokazali su povezanost između bazičnih vrednosti ADP testa i inhibitornog efekta klopidogrela. Efekat niskih doza kod pacijenata lečenih KE je u velikoj meri zapažen kod bolesnika sa trombocitima koji su osetljivi na ADP, odnosno koji imaju visoke bazične ADP vrednosti. Dobar terapijski odgovor na klopidogrel bio je dominantan kod bolesnika čiji su trombociti pokazali najveći odgovor na ADP pre primene leka što se slaže i s našim rezultatima. Nije pokazana povezanost prisustva CYP2C19\*2 varijante gena sa bazičnom reaktivnošću, odnosno agregacijom trombocita pre uvođenja terapije, što ukazuje na to da je CYP2C19 polimorfizam glavni genetski faktor koji utiče na reaktivnost trombocita prilikom terapije klopidogrelom (151).

Pošto je praćenje reaktivnosti trombocita kompleksno i zavisno od mnogih parametara, velika je verovatnoća da ADP test ne pruža kompletnu sliku inhibicije agregacije trombocita *in vivo* (135). Podaci iz literature pokazuju da aktivacija drugih trombocitnih receptora može preciznije da reflektuje nivo inhibicije trombocita (170). Trombin je najjači aktivator trombocita koji deluje preko PAR-1 receptora i on je očuvan

kod većine bolesnika koji primaju klopidogrel. Stimulacija trombocita peptidom koji aktivira trombinski receptor (thrombin receptor activating peptide-TRAP) reflektuje maksimalnu agregaciju trombocita detektovanu agregometrijom. Zato TRAP test može da ukaže na opšti kapacitet agregabilnosti trombocita i u toku terapije klopidogrelom (135). Zbog toga, očekivano, u našem istraživanju nismo dobili statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti TRAP testa dvadeset četiri časa nakon uzimanja prve doze leka, nakon sedmog i tridesetog dana uzimanja klopidogrela, kao ni između vrednosti TRAP testa tokom perioda praćenja između grupe bolesnika koji su nosioci CYP2C19\*2 alela i bolesnika koji nisu nosioci pomenutog alela.

Uzimajući u obzir prethodno navedene probleme prilikom definisanja *cut-off* vrednosti, odlučili smo da rezultate MEA testa izrazimo i kao odnos ADP-TRAP indukovane agregacija trombocita. Koristeći MEA metodu za praćenje agregabilnosti trombocita i ADP-TRAP odnos, kao način izražavanja rezultata, autori Mrdović i saradnici (136) su kod 44,4% bolesnika kod kojih je izvršena PKI, a koji su uzimali klopidogrel, pronašli visoku reaktivnost trombocita. Međutim, u našem istraživanju, u kojem su rezultati izraženi na dva načina upotrebom dve različite *cut-off* vrednosti (ADP $\geq$ 575 AU\*min i ADP-TRAP $\geq$ 52%) nije ustanovljena statistički značajna razlika između dobijenih rezultata (P>0,05). Na osnovu obe *cut-off* vrednosti bilo da smo pratili vrednosti ADP testa, bilo odnos ADP-TRAP, dobijeno je da 25% ispitivane populacije ima loš terapijski odgovor na klopidogrel tridesetog dana uzimanja terapije (Slika 18). Isto tako, nismo utvrdili statistički značajnu razliku u prevalenci lošeg terapijskog odgovora kod nosioca CYP2C19\*1/\*2 genotipa dobijenih koristeći dve različite *cut-off* vrednosti (46,7% nasuprot 53,3%) (Tabela 13 i Slika 19).

U našoj ispitivanoj grupi, jedan bolesnik je nosilac CYP2C19\*2/\*2 genotipa. Vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita bile su visoke i nisu se menjale tokom vremena, tj. bolesnik je pokazao odsustvo terapijskog odgovora na klopidogrel tokom posmatranog vremena (Tabela 16). Ovaj rezultat se slaže sa literaturnim podacima, gde su vrednosti testova agregacije trombocita kod CYP2C19\*2/\*2 bolesnika statistički značajno veće u odnosu na vrednosti dobijenih kod bolesnika koji su nosioci CYP2C19\*1/\*2 i CYP2C19\*1/\*1 genotipa (144). Međutim, neke studije nisu pokazale značajnu razliku u odgovoru na lek između nosioca homozigotne i heterozigotne forme CYP2C19\*2 (151).

Na osnovu naših saznanja, naša studija je prva u kojoj je laboratorijsko praćenje efekta klopidogrela korišćeno za procenu uticaja genetičkih i negenetičkih faktora na reaktivnost trombocita kod bolesnika sa stenozom karotidnih arterija i izvršenom endarterektomijom. Statistička analiza naših rezultata pokazala je da je prisustvo CYP2C19\*2 varijante gena kod bolesnika nezavisni faktor rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel. Bolesnici koji su nosioci CYP2C19\*2 varijante gena imaju skoro 4,5 puta veći rizik da će nakon trideset dana uzimanja klopidogrela imati loš odgovor na lek u odnosu na bolesnike sa *wild type* genotipom (Tabela 19). Slični rezultati su prikazani u prethodno publikovanim studijama (146,152,171). Međutim, moramo napomenuti da postoje kontroverzni podaci u literaturi o prediktivnoj vrednosti CYP2C19\*2 varijante gena. Al-Azzam i saradnici (153) zaključili su da je prisustvo CYP2C19\*2 alela povezano sa rezistencijom na klopidogrel ( $P < 0,001$ ), dok drugi autori nisu pokazali korelaciju između prisustva CYP2C19\*2 alela i reaktivnosti trombocita.

Do sada publikovane studije pokazale su da je odgovor bolesnika na terapiju najverovatnije multifaktorske prirode, tako da sam rezultat genotipa ne može da objasni odgovor bolesnika na taj lek (58). Različiti negenetički faktori mogu dovesti do varijacije u odgovoru na klopidogrel među bolesnicima: godine, pol, ITM, način ishrane, fizički i mentalni stres, interakcija sa drugim lekovima, oštećenje bubrežne funkcije, ograničena interstinalna apsorpcija, pušenje, dijabetes, nivo triglicerida i HDL čestica (high density lipoprotein) (19,123,144,172,173). Većina studija proučavala je iste faktore rizika, što može dovesti do precenjenosti uloge pojedinih faktora (70). Većina publikovanih podataka o faktorima koji utiču na antitrombocitni efekat klopidogrela dobijeni su u studijama koje su pratile akutnu fazu oboljenja. Međutim, tokom dugotrajne primene leka, moguće je da se značaj pojedinih faktora menja (57). Mehanizmi odgovorni za visoku reaktivnost trombocita u toku terapije antitrombocitnim lekovima trebalo bi da se potraže i među promenljivim koje utiču na funkcionalne testove agregacije trombocita, povećanu reaktivnost na kolagen i visoke vrednosti vWF u plazmi (124). Sibbing i saradnici (149) su multivarijantom logističkom regresionom analizom pokazali da je prisustvo najmanje jednog CYP2C19\*2 alela nezavisni prediktor lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel. Ostali prediktori su bili dijabetes, visok ITM, ženski pol, visok nivo kreatinina, fibrinogena i primena omeprazole. Različite studije su isticale uticaj pola i starosti na efekat leka kod



bolesnika. Upotrebom MEA metode pokazano je da su muškarci imali lošiji terapijski odgovor na klopidogrel (123). Objašnjenje za loš terapijski odgovor na lek kod starijih osoba potencijalno leži u povećanim vrednostima C-reaktivnog proteina, odnosno u prisustvu inflamacije i smanjenoj renalnoj funkciji (135). Različite populacije krvnih ćelija utiču na agregabilnost trombocita, naročito broj trombocita (174). Rubak i saradnici (175) našli su povezanost broja trombocita i leukocita i agregacije trombocita kod zdravih osoba, ali ne i sa hematokritom i eritrocitima. Neki autori tvrde da niže vrednosti hematokrita mogu da budu nezavisni prediktor visoke reaktivnosti trombocita na klopidogrel kod bolesnika sa AKS (176). Međutim, agregacija trombocita praćena MEA metodom nije pokazala povezanost agregabilnosti trombocita sa hematokritom ili eritrocitima, što može ukazati da je ova metoda nedovoljno osetljiva da identifikuje tu povezanost (175). Po nekim autorima, povećane vrednosti leukocita, C-reaktivnog proteina i fibrinogena povezani su s visokom reaktivnošću trombocita kod bolesnika koji su na hroničnoj terapiji klopidogrelom (177). Morel i saradnici (178) pokazali su vezu između terapijskog odgovora na klopidogrel i inflamatornog statusa praćeni broj leukocita kod AKS bolesnika sa dijabetesom, dok Osmancik i saradnici ukazuju da povišene vrednosti leukocita i koncentracije interleukina 10 predstavljaju faktore rizika za rezistenciju na klopidogrel (179).

Naši rezultati nisu pokazali značajnu korelaciju u pogledu godina, pola, ITM, pušenja, prethodnih cerebrovaskularnih događaja (moždani udar ili TIA), lekova (statini, ACE inhibitori, blokatori  $\beta$ -adrenergičkih receptora ili blokatori kalcijumovih kanala) sa agregabilnošću trombocita, tj. terapijskim odgovorom na lek (Tabela 17). Od laboratorijskih parametara utvrđeno je da je visok nivo ukupnog holesterola jedini stečeni nezavisni faktor rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel. Povećanje ukupnog holesterola za 1 povećava rizik od pojave lošeg odgovora na terapiju klopidogrelom nakon tridesetog dana uzimanja leka za dva puta (Tabela 19). Kod bolesnika sa moždanim udarima ili visokim rizikom od razvoja moždanog udara pokazano je da su dijabetes, visok ukupan holesterol, prethodni TIA i hronična terapija blokatora kalcijumovih kanala nezavisni faktori rizika za rezistenciju na klopidogrel (76). Suprotno, Tatarunas i saradnici (150) nisu dokazali uticaj starosti, težine, ITM, nivoa kreatinina i primene statina na terapijski efekat klopidogrela. Isto tako nisu pokazali uticaj blokatora receptora

angiotenzina II i blokatora  $\beta$ -adrenergičkih receptora na nivo agregabilnosti trombocita, što je u skladu sa našim rezultatima (Tabela 22 i 23).

Suprotno, u Pharmacogenomics of Antiplatelet Intervention (PAPI) studiji, gde je 429 osoba američke populacije dobijalo klopidogrel sedam dana, pokazano je da je starost, povećanje ITM, visoka koncentracija triglicerida i nizak nivo HDL molekula povezani s lošim odgovorom na klopidogrel. Međutim, kombinacija tih faktora bila je odgovorna za manje od 10% interindividualne varijabilnosti, dok su *CYP2C19\*2* genotipovi odgovorni za 12% varijabilnosti odgovora na klopidogrel. Dakle, autori su razjasnili 22% varijabilnosti u odgovoru na lek, dok je većina varijabilnost u terapijskom odgovoru na klopidogrel ostala nepoznanica (151). Campo i saradnici (144) pokazali su da su starost, klirens kreatinina i dijabetes nezavisni prediktori povećane reaktivnosti trombocita tokom vremena, dok je *CYP2C19\*2* alel bio odgovoran za samo 6,6% varijabilnosti odgovora na lek. U ovoj studiji, prevalenca *CYP2C19\*2* varijante gena bila je 29%. Hochholzer je objasnio samo 11,5% varijabilnosti reaktivnosti trombocita (168). U našem istraživanju (Tabela 20), 25,4% interindividualne varijabilnosti u terapijskom odgovoru na lek objašnjeno je prisustvom visokih koncentracija holesterola i prisustvom pomenutog alela. Prisustvo *CYP2C19\*2* varijante gena objasnilo je 20% interindividualne varijabilnosti reaktivnosti trombocita. Dakle, značajan deo varijabilnosti ostao je neobjašnjen, tj. faktori rizika ostali su nepoznati.

Praćenje terapije bolesnika na osnovu podatka dobijenih odmah nakon uvođenja terapije nije dovoljno pouzdano u proceni terapijskog odgovora na klopidogrel s obzirom na broj bolesnika koji tokom prvih mesec dana terapije nema adekvatan odgovor na lek. Međutim, isto tako i praćenje agregabilnosti trombocita mesec dana nakon uvođenja terapije ima svoja ograničenja. Jedno od njih je neadekvatan tretman bolesnika, koji i posle mesec dana imaju loš terapijski odgovor na lek i povećan rizik od razvoja neželjenih događaja. Zato je preporučeno korišćenje kombinacija genetičkih i bazičnih (laboratorijskih i demografskih) podataka i pravljenje skor modela za procenu rizika od lošeg odgovora. Campo i saradnici koristili su ABCB1 i *CYP2C19\*2* alele, prve vrednosti agregacije trombocita i klirens kreatinina (144). U našem istraživanju, analizom ROC krive, utvrđeno je da model koji uključuje nivo ukupnog holesterola i prisustvo *CYP2C19\*2* varijante gena

može da bude prediktor lošeg odgovora na klopidogrel 30 dana nakon uzimanja leka (Slika 22).

Među svim kliničkim stanjima, dijabetes je najčešće identifikovan uzročnik neadekvatnog terapijskog odgovora na klopidogrel. Osim dijabetesa kod bolesnika sa moždanim udarom nije pronađen uticaj drugih faktora (godine, pol, hipertenzija, pušenje, nivo triglicerida) na odgovor bolesnika na klopidogrel. Pokazano je da bolesnici sa dijabetesom imaju niske vrednosti cirkulišućeg aktivnog metabolita klopidogrela što rezultira slabim odgovorom na klopidogrel (61). Takođe, Meves i saradnici (161) ukazali su na to da je dijabetes faktor rizika za povećanu agregabilnost trombocita. Patofiziologija hiperreaktivnosti trombocita kod ovog oboljenja je multifaktorska: izmenjena membrana trombocita usled hipoglikemije, aktivacija agonista agregacije, izmena receptora trombocita, aktivacija prokoagulantnih procesa, povećan oksidativni stres i inflamacija. Poznato je da insulin smanjuje agregaciju trombocita preko P2Y<sub>12</sub> receptora. Izmene na membrani trombocita zbog hipoglikemije i nedostatak insulina dovode do pojačane signalizacije na trombocitima preko P2Y<sub>12</sub> trombocitnog receptora, što uzrokuje povećanu reaktivnost trombocita na ADP (180). Usporen metabolizam klopidogrela, takođe, može biti posledica opšteg izmenjenog metabolizma kod dijabetesa. MEA metoda, koju smo koristili u našem istraživanju, pokazala je povezanost dijabetesa i odgovora bolesnika na klopidogrel. Ovom metodom identifikovano je da bolesnici sa dijabetesom imaju slabiji terapijski odgovor na klopidogrel, zbog čega su u povećanom riziku od razvoja ishemijskih događaja (181). Da bismo dobili što preciznije i tačnije podatke o uticaju CYP2C19\*2 varijante gena na terapijski odgovor na klopidogrel, bolesnici sa dijabetesom bili su isključeni iz našeg istraživanja.

Kod bolesnika kod kojih je izvršena KAS (karotidna angioplastika sa ugradnjom stenta) i CE (coil embolisation) pokazano je da su dijabetes i pušenje nezavisni prediktori lošeg odgovora na klopidogrel (180). Međutim, u drugim publikovanim studijama zapažena je smanjena incidenca kardiovaskularnih događaja tokom terapije klopidogrelom kod pušača u odnosu na nepušače i taj fenomen nazvan je „pušački paradoks”. Nepušači imaju lošiji odgovor na klopidogrel u poređenju sa pušačima. Paradox studija je prva koja je pokazala da nepušači koji su uzimali klopidogrel imaju smanjen farmakodinamski i

farmakokinetički odgovor naspram pušača. Indukcija enzima CYP1A2 i CYP2B6 pušenjem cigareta rezultira povećanim stvaranjem aktivnog metabolita klopidogrela (182). Reed i saradnici (183) pokazali su u okviru GRAVITAS studije, koja je uključivala bolesnike s koronarnom arterijskom bolešću, da je pušenje nezavisni prediktor povećanog antitrombocitnog efekta klopidogrela posle PKI. Pušači ispoljavaju veći antitrombocitni efekat prilikom primene standardne doze, dok sa duplom dozom klopidogrela pušači i nepušači ispoljavaju isti nivo reaktivnosti trombocita. Autori smatraju da je ovaj fenomen vezan za prisustvo nosioca CYP1A2 163C>A alela. Prevalenca ovog alela varira među etničkim grupama i do 24% pušača ne mora da ispolji ovaj efekat (183). Mi nismo ispitivali prisustvo ovog alela tako da nemamo podatak o njegovoj prevalenci u našoj ispitivanoj grupi. Ovim podatkom se objašnjavaju i rezultati studija koje nisu pokazale taj fenomen, tj. povezanost pušenja, odgovora na klopidogrel i kliničkog ishoda (184–186), među kojima je i naše istraživanje (Tabela 17). Literaturni podaci „pušački paradox” objašnjavaju i nikotinom koji dovodi do povećane ekspresije receptora P2Y12 povećavajući reaktivnost trombocita i inhibiciju P2Y12 receptora od strane klopidogrela (183).

Takođe, trebalo bi istaći mogući efekat drugih lekova na terapijski odgovor na klopidogrel. Do sada, nije pokazana povezanost između lekova koji potencijalno interferiraju sa metabolizmom klopidogrela i kliničkog ishoda prilikom terapije klopidogrela, već samo povezanost tih lekova sa farmakodinamskim odgovorom bolesnika na klopidogrel (54). Međutim, poslednja istraživanja su i tu povezanost dovela u pitanje. Podaci o interakciji između statina i klopidogrela su protivrečne. Statini inhibiraju indukovanu agregaciju trombocita ADPom I trombinom kod zdravih osoba i kod bolesnika sa koronarnom arterijskom bolešću. Iako je interakcija između klopidogrela i CYP3A4 statina pokazana pri standardnim dozama leka, većina studija nije uspela da dokaže isti fenomen (171). Atorvastatin pripada grupi statina koji su supstrati CYP3A4 enzima i često se prepisuju bolesnicima koji su na dvojnjoj antitrombocitnoj terapiji. *In vitro* studije su pokazale da je konverzija klopidogrela u aktivni metabolit inhibirana atorvastatinom, ali *in vivo* studije kod zdravih volontera nisu potvrdile interakciju između ovog statina i klopidogrela. Takođe, to nisu pokazala ni istraživanja u okviru kojih su bolesnici primali dozu održavanja (75 mg) ili udarnu dozu od 600 mg klopidogrela (173). Dodatno, kod

ACHIDO studije, istraživači su pokazali da visoke doze atorvastatina (80 mg) primenjene trideset dana i dupla doza klopidogrela (150 mg) smanjuju reaktivnost trombocita značajnije nego primena samo duple doze klopidogrela kod bolesnika sa koronarnom arterijskom bolešću. Antitrombocitni efekat visokih doza atorvastatina ispoljava se rano i ne korelira sa stepenom smanjenja lipida tokom perioda praćenja (171). Ovi rezultati ukazuju na to da je kod bolesnika s visokom reaktivnošću trombocita prilikom primene standardne doze klopidogrela i hronične terapije niskim dozama atorvastatina, upotreba statina koji se ne metabolišu preko CYP3A4 ili upotreba visokih doza atorvastatina predstavljaju dve alternativne strategije. Na taj način bi se izbegle moguće interakcije među lekovima i unapredio odgovor bolesnika na klopidogrel (187). Naši rezultati (Tabela 21) nisu pokazali povezanost korišćenja statina i visoke reaktivnosti trombocita, što je u skladu sa studijom koja je uključila bolesnike s perifernom arterijskom bolešću i izvršenom angioplastikom ili ugradnjom stenta; većina njih primala je terapiju statinima (76%) (188).

Blokatori kalcijumovih kanala su inhibitori CYP3A4 enzima, koji je uključen u metabolizam klopidogrela. Neki blokatori kalcijumovih kanala imaju jak inhibitorni efekat na transportni P-glikoprotein (189). Harmsze i saradnici (188) proučavali su uticaj tih lekova na reaktivnost trombocita kod bolesnika koji primaju dvojnju antitrombocitnu terapiju (aspirin i klopidogrel) nakon PKI. Studija je ispitala dve grupe blokatora kalcijumovih kanala: one koje inhibiraju P-glikoprotein (verapamil, nifedipin, diltiazem, barnidipine) i koje ne utiču na P-glikoprotein (amlodipin). Na osnovu njihovih rezultata, blokatori kalcijumovih kanala su povećavali reaktivnost trombocita, ali samo je amlodipin bio povezan sa visokim rizikom od lošeg odgovora na terapiju klopidogrelom. Siller-Matulla i saradnici pokazali su da primena te grupe lekova dovodi do smanjenja efekta klopidogrela na reaktivnost trombocita i povećanog rizika od neželjenih kardiovaskularnih događaja (190). Međutim, studija koja je koristila MEA metodu za praćenje agregacije trombocita nije pokazala povezanost upotrebe blokatora kalcijumovih kanala sa lošim odgovorom na klopidogrel (191), što se potvrdilo i u našoj studiji (Tabela 24). TRITOM-TIMI 38 studija, koja je uključila bolesnike sa akutnim koronarnim sindromom lečenih PKI, pokazala je da je upotreba CYP3A4-metaboliziranih statina ili blokatora kalcijumovih kanala nije povezana sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih neželjenih događaja kod bolesnika koji su

tretirani klopidogrelom. Do ovog zaključka došli su primenjujući lekove pojedinačno ili zajedno ili u kombinaciji sa inhibitorima protonske pumpe (192).

Prevalenca visoke reaktivnosti trombocita tokom terapije klopidogrelom je, na osnovu literaturnih podataka, od 20% do 40% (193), a studije su, koristeći MEA metodu, demonstrirale da je povećana reaktivnost trombocita nezavisan faktor rizika za razvoj ishemijskih događaja posle PKI (73). Publikovane studije koje su izučavale i genetičke faktore rizika za visoku reaktivnost trombocita pokazale su povećan rizik od pojave neželjenih događaja kod nosioca *CYP2C19\*2* alela (105,194,195). Nosioci bar jednog alela kod kojih je izvršena PKI i koji su tretirani klopidogrelom imaju oko 3 do 4 puta veći rizik od tromboze stenta (193). Hulot i saradnici pokazali su da nosioci bar jednog *CYP2C19\*2* alela imaju 30% povećan rizik od neželjenih događaja u odnosu na nosioce *wild type* genotipa i da je kod heterozigota i homozigota nezavisni prediktor kardiovaskularnog rizika (196). Kod bolesnika sa moždanim udarom dokazana je povezanost lošeg odgovora na klopidogrel i pojave ishemijskih vaskularnih događaja, uključujući i ponovni moždani udar (61). Dokazano je takođe da je prisustvo *CYP2C19\*2* alela nezavisni prediktor razvoja neželjenih događaja (smrt, moždani udar, ponovljeni infarkt miokarda) (162). Po nekim autorima *CYP2C19\*2* i *CYP2C19\*3* aleli predstavljaju faktore rizika i imaju prognostički značaj kod bolesnika kod kojih je izvršena KAS i koji su na terapiji klopidogrelom. Ovi bolesnici imaju povećan rizik od razvoja ishemijskih događaja tokom tretmana klopidogrelom (24). Međutim, publikovani su i rezultati genetičkih studija koje nisu pokazale vezu *CYP2C19\*2* alela sa smanjenom funkcijom trombocita i pojavom neželjenih događaja (101, 143), iako je pokazana direktna uključenost *CYP2C19* enzima u bioaktivaciji klopidogrela. Genetičke studije s velikim brojem bolesnika publikovane posle 2010. godine nisu pokazale jaku povezanost alela s kardiovaskularnim ishodima. Čak i rezultati biohemijskih istraživanja dovode u pitanje mehanizam koji uključuje *CYP2C19* enzim u bioaktivaciju klopidogrela. Metaanaliza Bauera i saradnika (138) pokazala je da *CYP2C19* polimorfizam nema uticaj na kliničku efikasnost klopidogrela kad se koristi u prevenciji tromboembolijskih događaja kod bolesnika sa ishemijskim kardiovaskularnim bolestima. Po autorima nema dovoljno jakih dokaza da je *CYP2C19* gen koji dovodi do promene kliničke efikasnosti ovog leka i njihov zaključak nije u skladu s metaanalizama koji su

pokazale visok rizik od razvoja neželjenih kardiovaskularnih bolesti kod nosioca *CYP2C19\*2* alela. Bouman HJ smatra da se klopidogrel primarno metabolizira preko CYP3A4 izoenzima do 2-okso-klopidogrela; on se transformiše u aktivan metabolit procesima hidrolize koja ne uključuje enzime CYP450 (153,197). CYP2C19 oksiduje samo malu količinu klopidogrela do 2-okso-klopidogrela u jetri. Smatra se da se klopidogrel primarno metaboliše pomoću CYP3A4 u enterocitima, u kojima se izoenzim CYP2C19 ne nalazi (66). U našem istraživanju, tokom perioda praćenja bolesnika, zabeležen je moždani udar kod dva (1,8%) bolesnika koji su nosioci *CYP2C19\*2* varijante gena i imali su loš terapijski odgovor na klopidogrel. Ovo nije bio dovoljan broj neželjenih događaja za statističku obradu podataka kojom bi se utvrdio uticaj prisustva *CYP2C19\*2* varijante gena i/ili povećane reaktivnosti trombocita niti ostalih faktora rizika na razvoj moždanog udara.

Do sada, ne postoji jasna preporuka o standardizovanoj terapiji kod bolesnika s visokom reaktivnošću trombocita prilikom terapije klopidogrelom. Smatra se da povećanje doze klopidogrela može da spreči pojavu kardiovaskularnih događaja (61). Međutim, kod bolesnika kod kojih je izvršena vaskularna hirurška intervencija povećanje doze leka može da dovode do povećanog rizika od hemoragijskih komplikacija (169). Bonello i saradnici (198) pokazali su da prilagođavanje doze na osnovu praćenja agregabilnosti trombocita može prevazići rezistenciju na klopidogrel kod 88% pacijenata sa *CYP2C19\*2* alelom. Hazarbasnov i saradnici (199) prilagođavali su dozu leka koristeći Multiplate analizator i zaključili da korekcija doze leka može da smanji razvoj ishemijskih događaja kod bolesnika posle PKI. Visoka reaktivnost trombocita, po nekim studijama, može se smanjiti i zamenom klopidogrela s prasugrelom ili tikagrelom ili dodavanjem GPIIb/IIIa inhibitora ili citazola (73).

Testiranje agregabilnosti trombocita i genetičke analize pokazali su da mogu pomoći u stratifikaciji rizika kod bolesnika kojima je potrebna dvojnna antitrombocitna terapija. Reaktivnost trombocita tokom terapije ukazuje na terapijsku aktivnost P2Y12 antagonista, korelira sa aktivnim metabolitima klopidogrela i ima prediktivnu vrednost u proceni kliničke koristi ovog leka. Angiolillo i saradnici (200) smatraju da testiranje funkcije trombocita i genetička analiza mogu doprineti pravilnom izboru antitrombocitnog leka i omogućiti individualizaciju pristupa terapiji svakog bolesnika. Xingyang i saradnici

(162) ističu da su genetičke analize superiornije u odnosu na ponovljena određivanja agregabilnosti trombocita prilikom identifikacije bolesnika koji su u povećanom riziku od ishemijskih događaja. Lala i saradnici (201) bavili su se isplativošću genetičkih ispitivanja prilikom uvođenja i praćenja terapije klopidogrelom. Došli su do zaključka da su troškovi strategije genetičkog ispitivanja približni troškovima strategije koja nije obuhvatala testiranja već empirijsko praćenje terapije klopidogrelom ili prasugrelom. Takođe, ustanovljeno je da kod bolesnika sa AKS kod kojih je izvršena PKI strategija genetičkog istraživanja poboljšava kvalitet života i omogućava kliničaru odabir optimalnog antitrombocitnog leka. Suprotno, metaanalizom publikovanih studija koje su se bavile *CYP2C19* genetičkim ispitivanjem nisu dobijeni ubedljivi rezultati koji podržavaju genetička ispitivanja prilikom individualizacije tretmana u kliničkoj praksi. Međutim, autori smatraju da pristup koji obuhvata informacije o fenotipu, genotipu i kliničke podatke o bolesniku može da doprinese individualizaciji terapije klopidogrelom (202).



## 6. ZAKLJUČAK

Do sada publikovane studije pokazale su da je varijabilnost terapijskog odgovora bolesnika na klopidogrel multifaktorske prirode. Cilj ovog istraživanja bio je da ispita uticaj prisustva *CYP2C19\*2* varijante gena i negenetskih faktora na terapijski odgovor na antitrombocitni lek klopidogrel kod bolesnika sa stenozom karotidnih arterija, kod kojih je izvršena endarterektomija.

Na osnovu rezultata našeg istraživanja zaključili smo sledeće:

- Zastupljenost *CYP2C19\*2* alela u ispitivanoj populaciji je 26,8%.
- Nosioци *CYP2C19\*2* varijante gena imaju značajno veće vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita u odnosu na bolesnike koji nisu nosioци pomenutog alela (naročito nosioци *CYP2C19\*2/\*2* genotipa).
- Nivo aktivnosti trombocita nepredvidljiv je tokom terapije klopidogrelom i zato je potrebno ponavljati funkcionalna testiranja. Broj bolesnika sa lošim odgovorom na klopidogrel opada u prvih mesec dana primenjene terapije kod nosioca *CYP2C19\*1/\*1* genotipa. U grupi nosioca *CYP2C19\*2* alela, broj bolesnika sa lošim odgovorom na lek opada u toku prvih sedam dana primene terapije i dalje, tokom tretmana, ostaje nepromenjen.
- Bolesnici s najvećom bazičnom agregabilnošću trombocita, imaju najmanju antitrombocitnu zaštitu u prvih sedam dana tretmana, pogotovo u okviru prvih dvadeset četiri časa od uvođenja terapije. Prisustvo *CYP2C19\*2* varijante gena ne utiče na bazičnu reaktivnost trombocita, što ukazuje da je *CYP2C19* polimorfizam glavni genetski faktor koji utiče na reaktivnost trombocita prilikom terapije klopidogrelom.
- Nije pokazano da odnos ADP-TRAP testova bolje reflektuje stepen inhibicije agregabilnosti trombocita P2Y12 antagonistima u odnosu na sam ADP test.
- Prisustvo *CYP2C19\*2* varijante gena predstavlja nezavisan faktor rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel. Prisustvo *CYP2C19\*2* varijante gena objasnilo

je 20% interindividualne varijabilnosti reaktivnosti trombocita. Naši rezultati nisu pokazali značajnu korelaciju između primene lekova (statini, ACE inhibitori, blokatori  $\beta$ -adrenergičkih receptora ili blokatori kalcijumovih kanala) i agregabilnosti trombocita, tj. terapijskog odgovora na lek.

- Visok nivo ukupnog holesterola predstavlja jedini stečeni nezavisni faktor rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel. Model koji uključuje nivo ukupnog holesterola i prisustvo CYP2C19\*2 varijante gena može da bude prediktor lošeg odgovora na klopidogrel trideset dana nakon uzimanja leka. Dvadeset i pet procenata interindividualne varijabilnosti u terapijskom odgovoru na lek objašnjeno je visokom koncentracijom holesterola i prisustvom pomenutog alela. Dakle, značajan deo varijabilnosti ostao je neobjašnjen, a faktori rizika nepoznati.

## **7. LITERATURA**

1. Kern WF. Cells and composition of the peripheral blood. In: PQD hematology. Hamilton, London: BC Decker Inc; 2002. p. 10–1.
2. Zapata JC, Cox D, Salvato MS. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. Powers AM, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:2858.
3. Petrović M V. Trombocitna loza. In: Dopsaj V, Rajić M, editors. Laboratorijska hematologija. Beograd; 2002. p. 195–9.
4. Lefrançais E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. Nature. 2017;544:105–9.
5. Kroll MH, Afshar-kharghan V. Platelets in pulmonary vascular physiology and pathology. Pulm Circ. 2012;2:291–308.
6. James G, Colman R. Platelet structure and function. In: Colman R, Clowes A, Goldhaber S, Marder V, George J, editors. Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006. p. 437–41.
7. Bermudez P, Beushausen M, Horan MP. Management of inherited, acquired, and iatrogenically induced coagulopathies in oral surgery. In: A textbook of advanced oral and maxillofacial surgery Volume 3. InTech 2016.
8. Siller-Matula JM, Trenk D, Schrör K, Gawaz M, Kristensen SD, Storey RF, et al. Response variability to P2Y<sub>12</sub> receptor inhibitors expectations and reality accreditation and designation statement. JACC Cardiovasc Interv. 2013;6:1111–28.
9. Fontenay M, Cramer E. Platelet structure and function. In: Colman R, Clowes A, Goldhaber S, Marder V, George J, editors. Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006. p.

463–82.

10. Kunapuli S. Platelet structure and function. In: Colman R, Clowes A, Goldhaber S, Marder V, George J, editors. Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006. p. 547–54.
11. Angiolillo DJ, Luis Ferreiro J. Platelet adenosine diphosphate P2Y12 receptor antagonism: benefits and limitations of current treatment strategies and future directions. *Rev Esp Cardiol.* 2010;63:60–76.
12. Cattaneo M. The platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood.* 2011;117:2102–12.
13. Zuern CS, Schwab M, Gawaz M, Geisler T. Platelet pharmacogenomics. *J Thromb Haemost.* 2010;8:1147–58.
14. Đurđević P. Poremećaji lokalne cirkulacije. In: Živančević-Simonović S, editor. Opšta patološka fiziologija. Kragujevac: Medicinski Fakultet u Kragujevcu; 2002. p. 280–4.
15. Spasojević-Kalimanovska V. Lipidi. In: Spasić S, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V, editors. Medicinska biohemija. Beograd; 2003. p. 22–6.
16. Lobby P, Simon D, Ridker P. Vascular biology, embryogenesis, development nad disorders. In: Colman R, Marder V, Clowes A, George J, Goldhaber S, editors. Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 795–812.
17. Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. Hemostaza i tromboza. In: Zoran T, editor. Farmakologija, prvo srpsko izdanje. 5th ed. Beograd: Data Status; 2005. p. 314–29.
18. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:29–38.
19. Chirumamilla AP, Maehara A, Mintz GS, Mehran R, Kanwal S, Weisz G, et al. High platelet reactivity on clopidogrel therapy correlates with increased coronary atherosclerosis and calcification: a volumetric intravascular ultrasound study. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2012;5:540–9.

20. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2002;9:61–7.
21. Vodič za dijagnostikovanje i lečenje oboljenja karotidnih arterija. Available from: <http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2012/Novembar/VodicZaDijagnostikovanjeiLečenjeOboljenjaKarotidnihArterija.pdf>
22. Paciaroni M, Bogousslavsky J. Antithrombotic therapy in carotid artery stenosis: an update. *Eur Neurol.* 2015;73:51–6.
23. Padalino DJ, Deshaies EM. Management of atherosclerotic carotid artery stenosis. In: *Carotid artery disease - from bench to bedside and beyond.* InTech 2014.
24. Zhu W-Y, Zhao T, Xiong X-Y, Li J, Wang L, Zhou Y, et al. Association of CYP2C19 polymorphisms with the clinical efficacy of clopidogrel therapy in patients undergoing carotid artery stenting in Asia. *Sci Rep.* 2016;6:254-78.
25. Bazan HA, Smith TA, Donovan MJ, Sternbergh WC. Future management of carotid stenosis: role of urgent carotid interventions in the acutely symptomatic carotid patient and best medical therapy for asymptomatic carotid disease. *Ochsner J.* 2014;14:608–15.
26. Ritter JC, Tyrrell MR. The current management of carotid atherosclerotic disease: who, when and how? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2013;16:339–46.
27. Radak Đ. Karotidna hirurgija. Beograd: Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2012. p. 31-111
28. Touze E. Treatment of carotid stenosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012;10:734–8.
29. Vavra AK, Eskandari MK. Treatment options for symptomatic carotid stenosis: timing and approach. *Surg.* 2015;13:44–51.
30. Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: A guideline for healthcare professionals from the American Heart

- Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014;45:2160-236.
31. Ricotta JJ, AbuRahma A, Ascher E, Eskandari M, Faries P, Lal BK. Updated Society for Vascular Surgery guidelines for management of extracranial carotid disease: Executive summary. *J Vasc Surg*. 2011;54:832–6.
  32. Chaturvedi S, Bruno A, Feasby T, Holloway R, Benavente O, Cohen SN, et al. Carotid endarterectomy - an evidence-based review: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2005;65:794–801.
  33. Kang JL, Chung TK, Lancaster RT, LaMuraglia GM, Conrad MF, Cambria RP, et al. Outcomes after carotid endarterectomy: Is there a high-risk population? A national surgical quality improvement program report. *J Vasc Surg*. 2009;49:331–9.
  34. Rogers RK, Bishu K. Optimal treatment of extracranial carotid artery disease: carotid endarterectomy, carotid stenting, or optimal medical therapy. *Curr Cardiol Rep*. 2015;17:84.
  35. Radak D, Ilijevski N, Djukic N. Carotid surgery today: An update after 14,000 carotid endarterectomy procedures. *Vojnosanit Pregl*. 2016;73:472–9.
  36. Markus HS, Droste DW, Kaps M, Larrue V, Lees KR, Siebler M, et al. Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin in symptomatic carotid stenosis evaluated using doppler embolic signal detection: the clopidogrel and aspirin for reduction of emboli in symptomatic carotid stenosis (CARESS) trial. *Circulation*. 2005;111:2233–40.
  37. Payne DA, Jones CI, Hayes PD, Thompson MM, London NJ, Bell PR, et al. Clinical investigation and reports beneficial effects of clopidogrel combined with aspirin in reducing cerebral emboli in patients undergoing carotid endarterectomy. *Circulation*. 2004;109:1476–81.
  38. Adams RJ, Albers G, Alberts MJ, Benavente O, Furie K, Goldstein LB, et al. Update to the AHA/ASA recommendations for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack. *Stroke*. 2008;39:1647–52.

39. European Stroke Initiative Executive Committee, EUSI Writing Committee, Olsen TS, Langhorne P, Diener HC, Hennerici M, et al. European stroke initiative recommendations for stroke management-update 2003. *Cerebrovasc Dis.* 2003;16:311-37.
40. Rothwell PM, Eliasziw M, Gutnikov SA, Warlow CP, Barnett HJM. Carotid endarterectomy trialists collaboration, the NASCET trial. Endarterectomy for symptomatic carotid stenosis in relation to clinical subgroups and timing of surgery. *Lancet.* 2004;363:915-24.
41. Barnett HJM, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, et al. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. *N Engl J Med.* 1998;339:1415-25.
42. Streifler J, Eliasziw M, Benavente R, et al. Warlow C, group for the ECSTC. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet.* 1998;351:1379-87.
43. Mayberg MR, Wilson SE, Yatsu F, Weiss DG, Messina L, Hershey LA, et al. Carotid endarterectomy and prevention of cerebral ischemia in symptomatic carotid stenosis. *JAMA.* 1991;266:3289-94.
44. Collaborators\* NASCET. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med.* 1991;325:445-53.
45. Engelter S, Lyrer P. Antiplatelet therapy for preventing stroke and other vascular events after carotid endarterectomy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003.
46. Naylor AR, Sayers RD, McCarthy MJ, Bown MJ, Nasim A, Dennis MJ, et al. Closing the loop: a 21-year audit of strategies for preventing stroke and death following carotid endarterectomy. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2013;46:161-70.
47. Payne DA, Jones CI, Hayes PD, Thompson MM, London NJ, Bell PR, et al. Beneficial effects of clopidogrel combined with aspirin in reducing cerebral emboli in patients undergoing carotid endarterectomy. *Circulation.* 2004;109:1476-81.

48. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost.* 2007;5:230–7.
49. Yeung J, Holinstat M. Newer agents in antiplatelet therapy: a review. *J Blood Med.* 2012;3:33–42.
50. Marcucci R, Grifoni E, Giusti B. On-treatment platelet reactivity: state of the art and perspectives. *Vascul Pharmacol.* 2016;77:8–18.
51. Yang Y, Lewis JP, Hulot J-S, Scott SA. The pharmacogenetic control of antiplatelet response: candidate genes and CYP2C19. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015;11:1599–617.
52. Trenk D, Hochholzer W. Genetics of platelet inhibitor treatment. *Br J Clin Pharmacol.* 2014;77:642–53.
53. Alberts MJ, Bergman DL, Molner E, Jovanovic BD, Ushiwata I, Teruya J. Antiplatelet effect of aspirin in patients with cerebrovascular disease. *Stroke.* 2004;35:175–8.
54. Cattaneo M. Response variability to clopidogrel: is tailored treatment, based on laboratory testing, the right solution? *J Thromb Haemost.* 2012;10:327–36.
55. Cattaneo M. New P2Y12 Inhibitors. *Circulation.* 2010;121:171–9.
56. Wang Z-Y, Chen M, Zhu L-L, Yu L-S, Zeng S, Xiang M-X, et al. Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: updated review and risk management in combination therapy. *Ther Clin Risk Manag.* 2015;11:449–67.
57. Kubica A, Kasprzak M, Siller-Matula J, Koziński M, Pio Navarese E, Obońska K, et al. Time-related changes in determinants of antiplatelet effect of clopidogrel in patients after myocardial infarction. *Eur J Pharmacol.* 2014;742:47–54.
58. Fernando H, Dart AM, Peter K, Shaw JA. Proton pump inhibitors, genetic polymorphisms and response to clopidogrel therapy. *Thromb Haemost.* 2011;105:933–44.
59. Sažetak karakteristika leka. Available from: <http://www.alims.gov.rs/ciril/files/>



lekovi/smpc/515-01-2220-10-001.pdf

60. Yin T, Miyata T. Pharmacogenomics of clopidogrel: evidence and perspectives. *Thromb Res.* 2011;128:307–16.
61. Yi X, Lin J, Zhou Q, Wu L, Cheng W, Wang C. Clopidogrel resistance increases rate of recurrent stroke and other vascular events in Chinese population. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016;25:1222–8.
62. Smith SC, Benjamin EJ, Bonow RO, Braun LT, Creager MA, Franklin BA, et al. AHA/ACC secondary prevention and risk reduction therapy for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2011 update. A guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation. *Circulation.* 2011;124:2458–73.
63. Würtz M, Lordkipanidzé M, Grove EL. Pharmacogenomics in cardiovascular disease: Focus on aspirin and ADP receptor antagonists. *J Thromb Haemost.* 2013;11:1627–39.
64. Trenk D, Kristensen SD, Hochholzer W, Neumann F-J. High on-treatment platelet reactivity and P2Y12 antagonists in clinical trials. *Thromb Haemost.* 2013;109:834–45.
65. Ahmad T, Voora D, Becker RC. The pharmacogenetics of antiplatelet agents: towards personalized therapy? *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:560–71.
66. Ford NF. The Metabolism of clopidogrel: CYP2C19 is a minor pathway. *J Clin Pharmacol.* 2016;56:1474–83.
67. Ancrenaz V, Daali Y, Fontana P, Besson M, Samer C, Dayer P, et al. Impact of genetic polymorphisms and drug – drug interactions on clopidogrel and prasugrel response variability. *Curr Drug Metab.* 2010;11:667–77.
68. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost.* 2000;84:891–6.

69. Maruyama H, Takeda H, Dembo T, Nagoya H, Kato Y, Fukuoka T, et al. Clopidogrel resistance and the effect of combination cilostazol in patients with ischemic stroke or carotid artery stenting using the VerifyNow P2Y12 assay. *Intern Med.* 2011;50:695–8.
70. Gremmel T, Panzer S. Clinical, genetic and confounding factors determine the dynamics of the in vitro response/non response to clopidogrel. *Thromb Haemost.* 2011;106:211–8.
71. O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE, Chung MK, de Lemos JA, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2013;127:362–425.
72. Choi H, Ryu J, Seo H, Kang M, Kim E. Is a high maintenance dose of clopidogrel suitable for overcoming clopidogrel resistance in patients? *Int J Clin Pharm.* 2015;37:758–61.
73. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:919–33.
74. Sofi F, Marcucci R, Gori AM, Giusti B, Abbate R, Gensini GF. Clopidogrel non-responsiveness and risk of cardiovascular morbidity. *Thromb Haemost.* 2010;103:841–8.
75. Fukuoka T, Furuya D, Takeda H, Dembo T, Nagoya H, Kato Y, et al. Evaluation of clopidogrel resistance in ischemic stroke patients. *Intern Med.* 2011;50:31–5.
76. Zhou BR, Shi HT, Wang R, Zhang M, Guan HT, Liu ZF, et al. Dynamic changes and associated factors of clopidogrel resistance in patients after cerebral infarction. *J Neurol.* 2013;260:2928–37.
77. Kubica A, Kozinski M, Grzesk G, Fabiszak T, Navarese EP, Goch A. Genetic determinants of platelet response to clopidogrel. *J Thromb Thrombolysis.* 2011;32:459–66.

78. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA*. 2009;302:849–57.
79. Ingelman-Sundberg M, Daly AK ND. Human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature committee. Available from: <http://www.cypalleles.ki.se>.
80. Lee S-J. Clinical application of CYP2C19 pharmacogenetics toward more personalized medicine. *Front Genet*. 2013;3:318.
81. Niu X, Mao L, Huang Y, Baral S, Li J, Gao Y, et al. CYP2C19 polymorphism and clinical outcomes among patients of different races treated with clopidogrel: a systematic review and meta-analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2015;35:147–56.
82. Mao L, Jian C, Changzhi L, Dan H, Suihua H, Wenyi T, et al. Cytochrome CYP2C19 polymorphism and risk of adverse clinical events in clopidogrel-treated patients: a meta-analysis based on 23,035 subjects. *Arch Cardiovasc Dis*. 2013;106:517–27.
83. Blaisdell J, Mohrenweiser H, Jackson J, Ferguson S, Coulter S, Chanas B, et al. Identification and functional characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19. *Pharmacogenetics*. 2002;12:703–11.
84. Weeke P, Roden DM. Pharmacogenomics and cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rep*. 2013;15:376.
85. Gurbel PA, Tantry US, Shuldiner AR. Letter by Gurbel et al regarding article "Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement." *Circulation*. 2010;122:478
86. Fisch AS, Perry CG, Stephens SH, Horenstein RB, Shuldiner AR. Pharmacogenomics of anti-platelet and anti-coagulation therapy. *Curr Cardiol Rep*. 2013;15:381.
87. Fontana P, Hulot J-S, De Moerloose P, Gaussem P. Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J Thromb Haemost*. 2007;5:2153–5.

88. Simon T, Bhatt DL, Bergougnan L, Farenc C, Pearson K, Perrin L, et al. 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;90:287–95.
89. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome P-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med.* 2009;360:354–62.
90. Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS, et al. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost.* 2007;5:2429–36.
91. Collet J-P, Hulot J-S, Pena A, Villard E, Esteve J-B, Silvain J, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet.* 2009;373:309–17.
92. Harmsze AM, Werkum JW van, Bouman HJ, Ruven HJ t., Breet NJ, Berg JM Ten, et al. 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;20:18–25.
93. Collet JP, Hulot JS, Anzaha G, Pena A, Chastre T, Caron C, et al. High doses of clopidogrel to overcome genetic resistance: the randomized crossover CLOVIS-2 (clopidogrel and response variability investigation study 2). *JACC Cardiovasc Interv.* 2011;4:392–402.
94. Mega JL, Hochholzer W, Frelinger AL, Kluk MJ, Angiolillo DJ, Kereiakes DJ, et al. Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *JAMA.* 2011;306:2221–8.
95. Hokimoto S, Mizobe M, Akasaka T, Arima Y, Kaikita K, Nakagawa K, et al. Impact of CYP2C19 polymorphism and proton pump inhibitors on platelet reactivity to clopidogrel and clinical outcomes following stent implantation. *Thromb Res.* 2014;133:599–605.

96. Price MJ, Murray SS, Angiolillo DJ, Lillie E, Smith EN, Tisch RL, et al. 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;59:1928–37.
97. Erlinge D, James S, Duvvuru S, Jakubowski JA, Wagner H, Varenhorst C, et al. Clopidogrel metaboliser status based on point-of-care CYP2C19 genetic testing in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2014;111:943–50.
98. Stimpfle F, Karathanos A, Droppa M, Metzger J, Rath D, Müller K, et al. Impact of point-of-care testing for CYP2C19 on platelet inhibition in patients with acute coronary syndrome and early dual antiplatelet therapy in the emergency setting. *Thromb Res.* 2014;134:105–10.
99. Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood.* 2006;108:2244–7.
100. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker J, Simone T, et al. Genetic variants in ABCB1, CYP2C19, and cardiovascular outcomes following treatment with clopidogrel and prasugrel. *Lancet.* 2010;376:1312–9.
101. Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, et al. 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;376:1320–8.
102. Sibbing D, Stegherr J, Latz W, Koch W, Mehilli J, Dorrlers K, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2009;30:916–22.
103. Kim HS, Chang K, Koh YS, Park MW, Choi YS, Park CS, et al. CYP2C19 poor metabolizer is associated with clinical outcome of clopidogrel therapy in acute myocardial infarction but not stable angina. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6:514–21.
104. Sorich MJ, Rowland A, McKinnon RA, Wiese MD. CYP2C19 genotype has a greater

- effect on adverse cardiovascular outcomes following percutaneous coronary intervention and in Asian populations treated with clopidogrel: a meta-analysis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7:895–902.
105. Mega JL, Simon T, Collet J-P, Anderson JL, Antman EM, Bliden K, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA.* 2010;304:1821–30.
  106. Paré G, Mehta SR, Yusuf S, Phil D, Anand SS, Connolly SJ, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *Hamilt Heal Sci Med N Engl J Med.* 2010;363:1704–14.
  107. Bhatt DL, Paré G, Eikelboom JW, Simonsen KL, Emison ES, Fox KAA, et al. The relationship between CYP2C19 polymorphisms and ischaemic and bleeding outcomes in stable outpatients: the CHARISMA genetics study. *Eur Heart J.* 2012;33:2143–50.
  108. Siller-Matula JM, Delle-Karth G, Lang IM, Neunteufl T, Kozinski M, Kubica J, et al. Phenotyping vs. genotyping for prediction of clopidogrel efficacy and safety: the PEGASUS-PCI study. *J Thromb Haemost.* 2012;10:529–42.
  109. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Chialda L-E, Pahl A, Valina CM, et al. Cytochrome P450 2C19 681G<A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:1925–34.
  110. Johnson JA, Roden DM, Lesko LJ, Ashley E, Klein TE, Shuldiner AR. Clopidogrel: a case for indication-specific pharmacogenetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;91:774–6.
  111. Holmes M V., Perel P, Shah T, Hingorani AD, Casas JP. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events. *JAMA.* 2011;306:2704–14.
  112. Seip RL, Duconge J, Rúaño G. Implementing genotype-guided antithrombotic therapy. *Future Cardiol.* 2010;6:409–24.

113. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, et al. 2012 ACCF/AHA focused update incorporated into the ACCF/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:179–347.
114. Jia DM, Chen Z Bin, Zhang MJ, Yang WJ, Jin JL, Xia YQ, et al. CYP2C19 polymorphisms and antiplatelet effects of clopidogrel in acute ischemic stroke in China. *Stroke.* 2013;44:1717–9.
115. Sun W, Li Y, Li J, Zhang Z, Zhu W, Liu W, et al. Variant recurrent risk among stroke patients with different *CYP2C19* phenotypes and treated with clopidogrel. *Platelets.* 2015;26:558–62.
116. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, et al. Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation.* 2010;121:512–8.
117. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events for the french registry of acute ST-elevation and non-ST-elevation myocardial infarction (FAST-MI) investigators. *N Engl J Med.* 2009;360:363–75.
118. Luo M, Li J, Xu X, Sun X, Sheng W. ABCB1 C3435T polymorphism and risk of adverse clinical events in clopidogrel treated patients: a meta-analysis. *Thromb Res.* 2012;129:754–9.
119. Staritz P, Kurz K, Stoll M, Giannitsis E, Katus HA, Ivandic BT. Platelet reactivity and clopidogrel resistance are associated with the H2 haplotype of the P2Y12-ADP receptor gene. *Int J Cardiol.* 2009;133:341–5.
120. Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhäuser C, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med.* 2011;17:110–6.
121. Dansette PM, Rosi J, Bertho G, Mansuy D. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. *Nat*

- Med. 2011;17:1040-41.
122. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:133–48.
  123. Siller-Matula JM, Christ G, Lang IM, Delle-Karth G, Huber K, Jilma B. Multiple electrode aggregometry predicts stent thrombosis better than the vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay. *J Thromb Haemost.* 2010;8:351–9.
  124. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost.* 2007;5:230–7.
  125. Oxley TJ, Dowling RJ, Mitchell PJ, Davis S, Yan B. Antiplatelet resistance and thromboembolic complications in neurointerventional procedures. *Front Neurol.* 2011;2:83.
  126. Price MJ. Bedside evaluation of thienopyridine antiplatelet therapy. *Circulation.* 2009;119:2625–32.
  127. Ulehlova J, Slavik L, Krcova V, Hutyra M, Galuszka J, Indrak K. The assessment of aspirin resistance by using light transmission and multiple electrode aggregometry. *Int J Lab Hematol.* 2011;33:305–9.
  128. Sibbing D, Braun S, Morath T, Mehilli J, Vogt W, Schömig A, et al. Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:849–56.
  129. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Comparison of methods to evaluate clopidogrel-mediated platelet inhibition after percutaneous intervention with stent implantation. *Thromb Haemost.* 2009;101:333–9.
  130. Paniccia R, Antonucci E, Gori AM, Marcucci R, Giglioli C, Antonucci D, et al. Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1839–47.
  131. Cecchi E, Marcucci R, Chiostrì M, Mecarocci V, Spini V, Innocenti L, et al. Dual



- antiplatelet therapy tailored on platelet function test after coronary stent implantation: a real-world experience. *Intern Emerg Med*. 2015;10:805–14.
132. Mayer K, Schulz S, Bernlochner I, Morath T, Braun S, Hausleiter J, et al. A comparative cohort study on personalised antiplatelet therapy in PCI-treated patients with high on-clopidogrel platelet reactivity. *Thromb Haemost*. 2014;112:342–51.
133. Aradi D, Komócsi A, Price MJ, Cuisset T, Ari H, Hazarbasanov D, et al. 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;167:2140–8.
134. Calatzis A, Loreth R, Spannagl M. Multiplate ® platelet function analysis - application and interpretation. Available from: [http://www.ecomed.ru/data/files/catalog/1.Compendium Multiplate final V2.0\\_07.2007.pdf](http://www.ecomed.ru/data/files/catalog/1.Compendium%20Multiplate%20final%20V2.0_07.2007.pdf)
135. Olivier CB, Schnabel K, Brandt C, Weik P, Olschewski M, Zhou Q, et al. A high ratio of ADP-TRAP induced platelet aggregation is associated more strongly with increased mortality after coronary stent implantation than high conventional ADP induced aggregation alone. *Clin Res Cardiol*. 2014;103:968–75.
136. Mrdovic I, Savic L, Krljanac G, Asanin M, Perunicic J, Antonijevic N, et al. Impact of high post-loading platelet aggregation on 30-day clinical outcomes after primary percutaneous coronary intervention. The antiplatelet regimen tailoring after primary PCI (ART-PCI) trial. *Int J Cardiol*. 2013;167:1632–7.
137. Roche Diagnostics International Ltd. Multiplate analyzer Operator's Manuel SW Version 2.04. 2013.
138. Bauer T, Bouman HJ, van Werkum JW, Ford NF, ten Berg JM, Taubert D. Impact of CYP2C19 variant genotypes on clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2011;343:d4588.
139. Mărginean A, Bănescu C, Moldovan V, Scridon A, Mărginean M, Bălașa R, et al. The impact of CYP2C19 loss-of-function polymorphisms, clinical, and demographic variables on platelet response to clopidogrel evaluated using impedance

- aggregometry. *Clin Appl Thromb*. 2017;23:255–65.
140. Bokeriya OL, Kudzoeva ZF, Shvarts VA, Koasari AK, Donakanyan SA. The possibility of selecting optimal antiplatelet therapy in patients with coronary heart disease in terms of CYP2C19 polymorphism. *Ter Arkh*. 2016;88:47–54.
  141. Harmsze AM, van Werkum JW, ten Berg JM, Zwart B, Bouman HJ, Breet NJ, et al. CYP2C19\*2 and CYP2C9\*3 alleles are associated with stent thrombosis: a case-control study. *Eur Heart J*. 2010;31:3046–53.
  142. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccia R, et al. Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis. *Am J Cardiol*. 2009;103:806–11.
  143. Paré G, Mehta SR, Yusuf S, Phil D, Anand SS, Connolly SJ, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *Hamilt Heal Sci Med N Engl J Med*. 2010;363:1704–14.
  144. Campo G, Parrinello G, Ferraresi P, Lunghi B, Tebaldi M, Miccoli M, et al. Prospective evaluation of on-clopidogrel platelet reactivity over time in patients treated with percutaneous coronary intervention relationship with gene polymorphisms and clinical outcome. *JACC*. 2011;57:2474–83.
  145. Varenhorst C, James S, Erlinge D, Brandt JT, Braun OÖ, Man M, et al. 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;30:1744–52.
  146. Zhang L, Chen Y, Jin Y, Qu F, Li J, Ma C, et al. Genetic determinants of high on-treatment platelet reactivity in clopidogrel treated Chinese patients. *Thromb Res*. 2013;132:81–7.
  147. Olivier CB, Diehl P, Schnabel K, Weik P, Zhou Q, Bode C, et al. Third generation P2Y12 antagonists inhibit platelet aggregation more effectively than clopidogrel in a myocardial infarction registry. *Thromb Haemost*. 2014;111:266–72.

148. Ignjatovic V, Pavlovic S, Miloradovic V, Andjelkovic N, Davidovic G, Djurdjevic P, et al. influence of different  $\beta$ -blockers on platelet aggregation in patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2016;21:44–52.
149. Sibbing D, Gebhard D, Koch W, Braun S, Stegherr J, Morath T, et al. Isolated and interactive impact of common CYP2C19 genetic variants on the antiplatelet effect of chronic clopidogrel therapy. *J Thromb Haemost.* 2010;8:1685–93.
150. Tatarunas V, Jankauskiene L, Kupstyte N, Skipskis V, Gustiene O, Grybauskas P, et al. The role of clinical parameters and of CYP2C19 G681 and CYP4F2 G1347A polymorphisms on platelet reactivity during dual antiplatelet therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2014;25:369–74.
151. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA.* 2009;302:849–58.
152. Nakata T, Miyahara M, Nakatani K, Wada H, Tanigawa T, Komada F, et al. Relationship between CYP2C19 loss-of-function polymorphism and platelet reactivities with clopidogrel treatment in Japanese patients undergoing coronary stent implantation. *Circ J.* 2013;77:1436–44.
153. Al-Azzam SI, Alzoubi KH, Khabour OF, Nusair MB, Al-Hadidi H, Awidi A, et al. Factors that contribute to clopidogrel resistance in cardiovascular disease patients: environmental and genetic approach. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2013;51:179–86.
154. Oran I, Cinar C, Bozkaya H, Korkmaz M. Tailoring platelet inhibition according to multiple electrode aggregometry decreases the rate of thrombotic complications after intracranial flow-diverting stent implantation. *J Neurointerv Surg.* 2015;7:357–62.
155. Krüger J-C, Meves SH, Kara K, Mügge A, Neubauer H. Monitoring ASA and P2Y12-specific platelet inhibition - comparison of conventional (single) and multiple electrode aggregometry. *Scand J Clin Lab Invest.* 2014;74:568–74.

156. Ulehlova J, Slavik L, Kucerova J, Krcova V, Vaclavik J, Indrak K. Genetic polymorphisms of platelet receptors in patients with acute myocardial infarction and resistance to antiplatelet therapy. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014;18:599–604.
157. Campo G, Fileti L, de Cesare N, Meliga E, Furgieri A, Filippo Russo T, et al. Long-term clinical outcome based on aspirin and clopidogrel responsiveness status after elective percutaneous coronary intervention. A 3T/2R (tailoring treatment with tirofiban in patients showing resistance to aspirin and/or resistance to clopidogrel) Trial. *JACC*. 2010;56:1447–55.
158. Sibbing D, Steinhubl SR, Schulz S, Schömig A, Kastrati A. Platelet aggregation and its association with stent thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients: initial evidence of a therapeutic window. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:317–20.
159. Angiolillo DJ, Ferreiro JL, Price MJ, Kirtane AJ, Stone GW. Platelet function and genetic testing. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:S21–31.
160. Leunissen TC, Peeters Weem SMO, Urbanus RT, den Ruijter HM, Moll FL, Asselbergs FW, et al. High on-treatment platelet reactivity in peripheral arterial disease: a pilot study to find the optimal test and cut off values. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2016;52:198–204.
161. Meves SH, Schröder KD, Endres HG, Krogias C, Krüger JC, Neubauer H. Clopidogrel high-on-treatment platelet reactivity in acute ischemic stroke patients. *Thromb Res*. 2014;133:396–401.
162. Yi X, Lin J, Wang Y, Zhou Q, Wang C, Cheng W, et al. Association of cytochrome P450 genetic variants with clopidogrel resistance and outcomes in acute ischemic stroke. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23:1188–200.
163. Kozinski M, Bielis L, Wisniewska-Szmyt J, Boinska J, Stolarek W, Marciniak A, et al. Diurnal variation in platelet inhibition by clopidogrel. *Platelets*. 2011;22:579–87.
164. Price MJ, Baker BA, Jakubowski JA, Li W, Heiselman DE, Angiolillo DJ. Detecting a thienopyridine effect by platelet reactivity assessment and its implications for risk stratification. *J Thromb Haemost*. 2014;12:560–3.

165. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation*. 2003;107:2908–13.
166. Jaitner J, Stegherr J, Morath T, Braun S, Bernlochner I, Schömig A, et al. Stability of the high on-treatment platelet reactivity phenotype over time in clopidogrel-treated patients. *Thromb Haemost*. 2010;105:107–12.
167. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Chialda L-E, Pahl A, Valina CM, et al. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1925–34.
168. Hochholzer W, Trenk D, Fromm MF, Valina CM, Stratz C, Bestehorn H-P, et al. Impact of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and of major demographic characteristics on residual platelet function after loading and maintenance treatment with clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *JACC*. 2010;55:2427–34.
169. Payne DA, Jones CI, Hayes PD, Naylor AR, Goodall AH. Therapeutic benefit of low-dose clopidogrel in patients undergoing carotid surgery is linked to variability in the platelet adenosine diphosphate response and patients' weight. *Stroke*. 2007;38:2464–9.
170. Gremmel T, Calatzis A, Steiner S, Kaider A, Seidinger D, Koppensteiner R, et al. Is TRAP-6 suitable as a positive control for platelet reactivity when assessing response to clopidogrel? *Platelets*. 2010;21:515–21.
171. Leoncini M, Toso A, Maioli M, Angiolillo DJ, Giusti B, Marcucci R, et al. High-dose atorvastatin on the pharmacodynamic effects of double-dose clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary interventions. The ACHIDO (Atorvastatin and Clopidogrel High DOse in stable patients with residual high platelet activity) Study. *JCIN*. 2013;6:169–79.

172. Pavlović S, Zukić B, Stojiljković Petrović M. Molecular genetic markers as a basis for personalized medicine. *J Med Biochem.* 2014;33:8–21.
173. Siller-Matula JM, Trenk D, Krähenbühl S, Michelson AD, Delle-Karth G. Clinical implications of drug-drug interactions with P2Y12 receptor inhibitors. *J Thromb Haemost.* 2014;12:2–13.
174. Würtz M, Hvas A-M, Kristensen SD, Grove EL, Violi F, Burignat-Bonello C, et al. Platelet aggregation is dependent on platelet count in patients with coronary artery disease. *Thromb Res.* 2012;129:56–61.
175. Rubak P, Villadsen K, Hvas A-M. Reference intervals for platelet aggregation assessed by multiple electrode platelet aggregometry. *Thromb Res.* 2012;130:420–3.
176. Cecchi E, Marcucci R, Paniccia R, Bandinelli B, Valente S, Giglioli C, et al. Effect of blood hematocrit and erythrocyte deformability on adenosine 5'-diphosphate platelet reactivity in patients with acute coronary syndromes on dual antiplatelet therapy. *Am J Cardiol.* 2009;104:764–8.
177. Bernlochner I, Steinhubl SR, Braun S, Morath T, Jaitner J, Stegherr J, et al. Association between inflammatory biomarkers and platelet aggregation in patients under chronic clopidogrel treatment. *Thromb Haemost.* 2010;104:1193–200.
178. Morel O, El Ghannudi S, Hess S, Reydel A, Crimizade U, Jesel L, et al. The extent of P2Y12 inhibition by clopidogrel in diabetes mellitus patients with acute coronary syndrome is not related to glykemic control: roles of white blood cell count and body weight. *Thromb Haemost.* 2012;108:338–48.
179. Osmancik P, Paulu P, Tousek P, Kocka V, Widimsky P. High leukocyte count and interleukin-10 predict high on-treatment platelet reactivity in patients treated with clopidogrel. *J Thromb Thrombolysis.* 2012;33:349–54.
180. Nakagawa I, Park HS, Yokoyama S, Wada T, Hironaka Y, Motoyama Y, et al. Influence of diabetes mellitus and cigarette smoking on variability of the clopidogrel-induced antiplatelet effect and efficacy of active management of the target P2Y12 reaction unit range in patients undergoing neurointerventional procedures. *J Stroke*

- Cerebrovasc Dis. 2016;25:163–71.
181. Sibbing D, Morath T, Braun S, Stegherr J, Mehilli J, Vogt W, et al. Clopidogrel response status assessed with Multiplate point-of-care analysis and the incidence and timing of stent thrombosis over six months following coronary stenting. *Thromb Haemost.* 2010;103:151–9.
  182. Gurbel PA, Bliden KP, Logan DK, Kereiakes DJ, Lasseter KC, White A, et al. The influence of smoking status on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel and prasugrel: The paradox study. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:505–12.
  183. Reed GW, Cannon CP, Waalen J, Teirstein PS, Tanguay J-F, Berger PB, et al. Influence of smoking on the antiplatelet effect of clopidogrel differs according to clopidogrel dose: insights from the GRAVITAS trial. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2017;89:190–8.
  184. Sibbing D, Bernlochner I, Schulz S, Massberg S, Schumig A, Mehilli J, et al. The impact of smoking on the antiplatelet action of clopidogrel in non-ST-elevation myocardial infarction patients: results from the ISAR-REACT 4 platelet substudy. *J Thromb Haemost.* 2012;10:2199–202.
  185. Sibbald M, Yan AT, Huang W, Fox KAA, Gore JM, Steg PG, et al. Association between smoking, outcomes, and early clopidogrel use in patients with acute coronary syndrome: insights from the global registry of acute coronary events. *Am Heart J.* 2010;160:855–61.
  186. Hochholzer W, Trenk D, Mega JL, Morath T, Stratz C, Valina CM, et al. Impact of smoking on antiplatelet effect of clopidogrel and prasugrel after loading dose and on maintenance therapy. *Am Heart J.* 2011;162:518–26.
  187. Leoncini M, Toso A, Maioli M, Bellandi F. Statin and clopidogrel pharmacological interaction. *G Ital Cardiol.* 2013;14:574–84.
  188. Spiliopoulos S, Pastromas G, Katsanos K, Kitrou P, Karnabatidis D, Siablis D. Platelet responsiveness to clopidogrel treatment after peripheral endovascular procedures The PRECLOP study: clinical impact and optimal cutoff value of on-treatment high platelet reactivity. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:2428–34.

189. Zhou Q, Chen M, Zhu L, Yu L, Zeng S, Xiang M, et al. Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: updated review and risk management in combination therapy. *Ther Clin Risk Manag.* 2015;11:449–67.
190. Siller-Matula JM, Lang I, Christ G, Jilma B. Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1557–63.
191. Siller-Matula JM, Christ G, Lang IM, Delle-Karth G, Huber K, Jilma B. Multiple electrode aggregometry predicts stent thrombosis better than the vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay. *J Thromb Haemost.* 2010;8:351–9.
192. Ojeifo O, Wiviott SD, Antman EM, Murphy SA, Udell JA, Bates ER, et al. Concomitant administration of clopidogrel with statins or calcium-channel blockers. *JACC Cardiovasc Interv.* 2013;6:1275–81.
193. Agewall S, Cattaneo M, Collet JP, Andreotti F, Lip GYH, Verheugt FWA, et al. Expert position paper on the use of proton pump inhibitors in patients with cardiovascular disease and antithrombotic therapy. *Eur Heart J.* 2013;34:1708–13.
194. Sofi F, Giusti B, Marcucci R, Gori AM, Abbate R, Gensini GF. Cytochrome P450 2C19\*2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* 2011;11:199–206.
195. Collet J-P, Hulot J-S, Pena A, Villard E, Esteve J-B, Silvain J, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet.* 2009;373:309–17.
196. Hulot J-S, Collet J-P, Silvain J, Pena A, Bellemain-Appaix A, Barthélémy O, et al. Cardiovascular risk in clopidogrel-treated patients according to cytochrome P450 2C19\*2 loss-of-function allele or proton pump inhibitor coadministration. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:134–43.
197. Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhäuser C, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med.* 2011;17:110–6.



198. Bonello L, Armero S, Ait Mokhtar O, Mancini J, Aldebert P, Saut N, et al. Clopidogrel loading dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients carrying the 2C19\*2 loss of function polymorphism. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56:1630–6.
199. Hazarbasanov D, Velchev V, Finkov B, Postadjian A, Kostov E, Rifai N, et al. Tailoring clopidogrel dose according to multiple electrode aggregometry decreases the rate of ischemic complications after percutaneous coronary intervention. *J Thromb Thrombolysis.* 2012;34:85–90.
200. Angiolillo DJ, Ferreiro JL, Price MJ, Kirtane AJ, Stone GW. Platelet function and genetic testing perspective: platelet and genetic testing for clopidogrel hyporesponsiveness use as a research tool. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:s21–31.
201. Lala A, Berger JS, Sharma G, Hochman JS, Scott Braithwaite R, Ladapo JA. Genetic testing in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention: a cost-effectiveness analysis. *J Thromb Haemost.* 2013;11:81–91.
202. Fontana P, Cattaneo M, Combescure C, Reny J-L. Tailored thienopyridine therapy: no urgency for CYP2C19 genotyping. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000131.

## **BIOGRAFIJA**

Dragana Bačković rođena je 16. maja 1981. godine u Beogradu. Osnovnu školu završila je 1996. godine u Beogradu kao nosilac diplome "Vuk Karadžić", a 2000. godine maturirala je u VI beogradskoj gimnaziji, prirodno-matematički smer. Upisala je osnovne studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, profil diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar, školske 2000/01. godine, a diplomirala 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,38. Jednogodišnji pripravnički staž završila je u okviru Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije. Po obavljenom stažu položila je stručni ispit 2007. godine. Na doktorske akademske studije – izborni modul medicinska biohemija na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisala se školske 2010/2011. godine. Od juna 2007. godine, zaposlena je u firmi Makler d.o.o., gde i danas radi kao stručni saradnik za oblast hemostaze, hematologije i biohemije – gasne analize, u Sektoru za aplikacije i registracije. Član je Društva medicinskih biohemičara Srbije (DMBS) i Internacionalnog društva za trombozu i hemostazu (ISTH).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а: Драгана Бачковић

број индекса: 3/10

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај СУР2С19\*2 варијанте гена на терапијски одговор у току примене клопидогрела код болесника са стенозом каротидних артерија

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 16.10.2017.



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Драгана Бачковић

Број индекса: 3/10

Студијски програм: медицинска биохемија

Наслов рада: Утицај CYP2C19\*2 варијанте гена на терапијски одговор у току примене клопидогрела код болесника са стенозом каротидних артерија

Ментор: Проф др Светлана Игњатовић

Потписани/а Драгана Бачковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 16.10.2017.

  
\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај CYP2C19\*2 варијанте гена на терапијски одговор у току примене клопидогрела код болесника са стенозом каротидних артерија

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 16.10.2017.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.