

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU
KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, održanoj 14.09.2017. godine imenovana je Komisija u sastavu:

1. Dr Svetlana Ignjatović - redovni profesor, Univerzitet u Beogradu = Farmaceutski fakultet, mentor rada
2. Dr Mirjana Kovač - naučni saradnik, Institut za transfuziju krvi, Beograd
3. Dr Dragoslav Nenezić - redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet
4. Dr Ljiljana Rakićević - viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije koja je prijavljena pod naslovom **“Uticaj CYP2C19*2 varijante gena na terapijski odgovor u toku primene klopidogrela kod bolesnika sa stenozom karotidnih arterija“**, kandidata diplomiranog farmaceuta-medicinskog biohemičara Dragane Bačković.

Nakon pregledane doktorske disertacije podnosimo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija kandidata Dragane Bačković pod naslovom **“Uticaj CYP2C19*2 varijante gena na terapijski odgovor u toku primene klopidogrela kod bolesnika sa stenozom karotidnih arterija“** napisana je jasnim i preglednim stilom na 123 strane, ima 24 tabele, 22 slike i 202 literaturna navoda. Sadržaj doktorske disertacije je izložen u sledećim poglavljima: Uvod, Ciljevi istraživanja, Metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura.

Uvod je podeljen u četiri veće celine. U okviru prve celine opisana je građa i funkcija trombocita sa posebnim osvrtom na P2Y12 receptore i agonistu agregacije trombocita, adenosin difosfat (ADP). U drugoj celini opisana su dosadašnja saznanja o razvoju aterosklerotskog plaka i o faktorima rizika koji dovode do razvoja ateroskleroze. Posebna celina posvećena je patogenezi, dijagnostici i lečenju karotidne bolesti. U okviru te celine bilo je reči o efikasnosti karotidne endarterektomije i upotrebi medikamentozne terapije nakon te hirurške intervencije. Četvrto poglavlje posvećeno je antitrombocitnim lekovima, inhibitorima P2Y12 receptora. U tom poglavlju opisana je struktura, farmakokinetika i farmakodinamika klopidogrela. Posebna pažnja posvećena je rezistenciji na klopidogrel i genetičkoj osnovi lošeg odgovora na terapiju klopidogrelom. U manjoj celini četvrtog poglavlja opisane su metode određivanja reaktivnosti trombocita koje se danas koriste u

proceni efikasnosti antitrombocitne terapije. Na osnovu svega što je navedeno u uvodu, postavilo se pitanje da li prisustvo *CYP2C19*2* alela utiče na efikasnost terapije klopidogetrom, praćena testovima agregacije trombocita, kod bolesnika sa stenozom karotidnih arterija.

U poglavlju **Ciljevi istraživanja** jasno i koncizno su izneti ciljevi doktorske disertacije. Cilj rada bio je da se ispita povezanost terapijskog odgovora na klopidogetrom i prisustva *CYP2C19*2* varijante gena kod ispitivane populacije. U tom smislu bilo je potrebno da se prati promena agregabilnosti trombocita i uticaj *CYP2C19*2* varijante gena i negenetskih faktora na vrednosti ADP-indukovane agregacije prilikom terapije klopidogetrom tokom perioda praćenja bolesnika.

U poglavlju **Metode** precizno su navedeni korišćeni materijali i reagensi, i detaljno opisana metodologija korišćena u istraživanju. U istraživanju bilo je uključeno 112 bolesnika sa dijagnostikovanom stenozom karotidne arterije većom od 50% i kod kojih je indikovana karotidna endarterektomija. 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. Bolesnici koji su pre prijema primali statine, blokatore β -adrenergićkih receptora, ACE inhibitore, blokatore kalcijumovih kanala i antagoniste receptora angiotenzina II nastavili su sa terapijom tokom boravka u bolnici. Nakon karotidne endarterektomije, započeta je dvojna terapija aspirinom (100 mg dnevno) i klopidogetrom u dozi od 75 mg dnevno, najmanje trideset dana od intervencije. Uzorci venske krvi uzeti su 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 klopidogetrom. Nakon otpusta, tokom redovnih kontrola ili putem telefonskog razgovora praćeno je stanje bolesnika (pogoršanje ili poboljšanje) godinu dana od intervencije.

Za merenje reaktivnosti trombocita, u istraživanju je korišćena metoda koja se bazira na električnoj impedanci (MEA). Detekcija *CYP2C19*2* alela vršena je posredstvom detekcije (ili iskljućenja) nukleotidne zamene *CYP2C19* 681 G >A koja predstavlja marker alela *CYP2C19*2* TaqMan testom prema taćno definisanom protokolu. Testovi za procenu hemostaznog statusa bolesnika određivani su koagulometrijskim metodama, dok je krvna slika određivana na hematološkom brojaću, primenom metode impedanci i VCS tehnologije. Biohemijski parametri su određeni primenom rutinskih metoda na automatskom biohemijskom analizatoru. Karakteristike tih metoda, kao i vrsta i naćin uzimanja uzoraka, detaljno su opisane u ovoj celini rada. 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 Bonferroni *post hoc* testa za višestruka poređenja. Statistićka znaćajnost razlike izmeću kategorićkih promenljivih utvrđene su upotrebom Pearson chi-square testa. Bivarijatna i multivarijatna logistićka regresiona analiza korišćena je za ispitivanje odnosa izmeću genotipa i fenotipa (terapijski odgovor bolesnika na klopidogetrom), kao i za ispitivanje uticaja negenetskih faktora na fenotip. Logistićka regresiona analiza upotrebljena je za procenu prediktora za loš terapijski odgovor, kao i za formiranje nove promenljive, odnosno modela za procenu terapijskog odgovora bolesnika na klopidogetrom. Svi testovi su smatrani statistićki znaćajnim za $P < 0,05$.

B. Opis dobijenih rezultata

U poglavlju **Rezultati** dat je pregled rezultata dobijenih na osnovu sprovedenih istraživanja. Rezultati su prikazani u vidu grafika ili tabela i grupisani su u 6 većih celina. U prve dve celine date su demografske i biohemijske karakteristike ispitivane populacije, kao farmakogenetski profil bolesnika. U trećoj celini je prikazana promena agregabilnosti trombocita prilikom terapije klopidogrela tokom perioda praćenja bolesnika u odnosu na prisustvo *CYP2C19*2* varijante gena. Pokazano je da su vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita dobijene tokom perioda praćenja statistički značajno veće kod grupe bolesnika koji su nosioci *CYP2C19*2* alela u odnosu na grupu bolesnika koji nisu nosioci pomenutog alela. Rezultati ispitivanja povezanosti *CYP2C19*2* alela sa terapijskim odgovorom na antiagregacijski lek klopidogrel prikazani su kroz nekoliko manjih celina. Procena terapijskog odgovora na klopidogrel urađena je na osnovu definisane *cut-off* vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita koja je specifična za ispitivanu populaciju. Rezultati doktorske disertacije pokazali su da je četvrtina ispitivane populacije imala loš terapijski odgovor na klopidogrel tridesetog dana uzimanja klopidogrela. Petina ispitivane populacije koja je imala loš terapijski odgovor na klopidogrel sedmog dana uzimanja klopidogrela pokazala je dobar odgovor na terapiju tridesetog dana uzimanja leka. Rezultati testiranja tridesetog dana uzimanja terapije pokazali su da kod grupe sa *wild type* genotipom broj bolesnika koji nema dobar terapijski odgovor na klopidogrel je statistički značajno manji u odnosu na broj bolesnika sa lošim terapijskim odgovorom u okviru grupe koji su nosioci *CYP2C19*2* varijante gena. U posebnoj celini prikazan je uticaj genetičkih i negenetičkih faktora na terapijski odgovor na klopidogrel. Utvrđeno je da su prisustvo *CYP2C19*2* varijanta gena kod bolesnika i visok nivo ukupnog holesterola jedini nezavisni faktori rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel. Nije pokazana značajna korelacija između primene lekova (statini, ACE inhibitori, blokatori β -adrenergičkih receptora ili blokatori kalcijumovih kanala) i agregabilnosti trombocita, tj. terapijskog odgovora na lek.

U okviru poslednje celine, prikazana je povezanost neželjenih događaja i terapijskog odgovora na klopidogrel. 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.

C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa podacima iz literature

U poglavlju **Diskusija** dobijeni rezultati detaljno su analizirani i sagledani u svetlu podataka iz literature. U doktorskoj disertaciji predstavljeni su prvi rezultati o učestalosti *CYP2C19*2* alela u srpskoj populaciji, koji su u skladu sa prevalencom *CYP2C19*2* varijante gena u prethodno publikovanim radovima (1-3). Efekat antiagregacijskog leka klopidogrela praćen je laboratorijskim testom, ADP-indukovanom agregacijom trombocita. Vrednosti testa su opadale tokom prvih mesec dana primene klopidogrela. Pad reaktivnosti trombocita u prvih meseca dana terapije zabeležen je takođe i u studiji koja je ispitivala bolesnike koji su primali terapiju klopidogrela (75 mg) godinu dana nakon perkutane koronarne intervencije

(PKI). Autori su pokazali značajno smanjenje reaktivnosti trombocita tokom prvog meseca terapije, bez dalje promene šest meseci nakon intervencije (4).

Analiza dobijenih vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita pokazala je statistički značajnu razliku ADP-indukovanih agregacija u odnosu na genotip. 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 samo tokom prvih 7 dana uzimanja terapije. Rezultati istraživanja pokazali su da 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. Ovaj podatak je u saglasnosti sa rezultatima prethodno publikovanih studija koje su pokazale povezanost *CYP2C19*2* varijante gena i smanjene koncentracije aktivnog metabolita klopidogrela u plazmi (3) i smanjene inhibicije agregacije trombocita (5-7).

U zavisnosti od načina definisanja visoke reaktivnosti trombocita u toku terapije, u literaturi navodi se različita učestalost bolesnika sa lošim terapijskim odgovorom na klopidogrel. Različiti rezultati prikazani u publikovanim studijama su najverovatnije posledica i 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 validirane *cut-off* vrednosti funkcionalnih testova. U doktorskoj disertaciji 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 *cut-off* vrednosti pripali su grupi bolesnika sa povećanom reaktivnošću trombocita. Ovaj pristup je omogućio precizniju identifikaciju bolesnika sa lošim odgovorom na terapiju klopidogrelom. U istraživanju četvrtina ispitivane populacije imala je povećanu reaktivnost trombocita. Taj podatak o prevalenci lošeg terapijskog odgovora na klopidogrel je u skladu sa literaturnim podacima o zastupljenosti povećane agregabilnosti trombocita (8). Kod većine studija agregabilnost trombocita praćena je pre ili neposredno posle intervencije, tako da mali broj podataka postoji o promeni odgovora na klopidogrel u toku vremena. Literaturni podaci ukazuju da oko 50% ispitivane populacije promeni status bolesnika sa „lošim terapijskim odgovorom“ u bolesnika sa „dobrim terapijskim odgovorom“ tokom primene terapije klopidogrela (9). U doktorskoj disertaciji rezultati poslednja dva merenja pokazali su da petina bolesnika koji su imali loš terapijski odgovor na klopidogrel sedmog dana, pokazali su dobar odgovor na terapiju tridesetog dana uzimanja leka. Rezultati su u skladu sa publikovanim rezultatima Gurbel i saradnika koji su pokazali da je kod bolesnika, koji primaju dozu održavanja klopidogrela nakon PKI, nivo inhibicije trombocita vremenski zavistan (10). Campo i saradnici (4) su kod iste grupe bolesnika pokazali 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 je smanjen u toku prvog meseca i ostao je nepromenjen na sledećem merenju, 6 meseci od intervencije.

U literaturi se nalaze različiti podaci o povezanosti *CYP2C19* genotipa sa terapijskim odgovorom na klopidogrel. Prema rezultatima doktorske disertacije 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. Rezultati pokazuju da broj bolesnika sa lošim odgovorom na lek u grupi nosioca *CYP2C19*1/*1* genotipa opada u toku vremena. U grupi nosioca *CYP2C19*2* alela, broj bolesnika sa lošim odgovorom na lek je smanjen tokom sedam dana od uvođenja terapije i ostao je nepromenjen do kraja perioda praćenja. U doktorskoj disertaciji prevalenca lošeg terapijskog odgovora na lek kod nosioca *CYP2C19* genotipa je veća u odnosu na podatke iz studije autora Sibbing i saradnika (11), u kojoj je 19,4% bolesnika sa stabilnom arterijskom bolešću imalo loš odgovor na terapiju, među kojima je bilo 26% nosioca *CYP2C19*2* alela. Suprotno, Trenk i saradnici (12) pokazali su da su 41,3% bolesnika nakon PKI, koji su nosioci *CYP2C19*2* alela, imali povećanu agregabilnost trombocita nasuprot 22,5% bolesnika sa *wild type* genotipom.

U doktorskoj disertaciji određivana je i ADP-indukovana agregacija trombocita pre hirurške intervencije, odnosno pre uvođenja terapije klopidogetrom. Rezultati 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. Dobijeni podaci su u skladu sa rezultatima studije autora Gurbel PA i saradnika (10). Pacijenti s najvećom bazičnom agregabilnošću trombocita kod kojih je izvršena PKI imali su najmanju antitrombocitnu zaštitu u prvih 5 dana tretmana, pogotovo u okviru prvih dvadeset četiri časa od uvođenja terapije..

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*. Smatra se da TRAP (thrombin receptor activating peptide) test predstavlja opšti kapacitet agregabilnosti trombocita i u toku terapije klopidogetrom (8). Zato su rezultati MEA testa u doktorskoj disertaciji izraženi i kao odnos ADP-TRAP indukovane agregacija trombocita. Međutim, u istraživanju nije dobijena statistički značajna razlika između rezultata procene terapijskog odgovora bolesnika na klopidogetrol dobijenih koristeći dva načina izražavanja rezultata i dve različite *cut-off* vrednosti.

Statistička analiza dobijenih rezultata je pokazala da je prisustvo *CYP2C19*2* varijante gena kod bolesnika nezavisni faktor rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogetrol. Bolesnici koji su nosioci *CYP2C19*2* varijante gena imaju skoro 4,5 puta veći rizik da će nakon trideset dana uzimanja klopidogetrola imati loš odgovor na lek u odnosu na bolesnike sa *wild type* genotipom. Slični rezultati su prikazani u prethodno publikovanim studijama (5,13,14).

Do sada, studije su pokazale da je odgovor bolesnika na terapiju najverovatnije multifaktorske prirode, tako sam rezultat genotipa ne može da objasni odgovor bolesnika na klopidogetrol (15). Različiti negenetički faktori mogu dovesti do varijacije u odgovoru na taj lek među bolesnicima. Sibbing i saradnici (11) su multivarijantom logističkom regresionom analizom pokazali da je prisustvo najmanje jednog *CYP2C19*2* alela nezavisni prediktor lošeg terapijskog odgovora na klopidogetrol. Ostali prediktori bili su dijabetes, visok indeks telesne mase (ITM), ženski pol, visok nivo kreatinina, fibrinogena i primena omeprazole. Rezultati doktorske disertacije nisu pokazali značajnu korelaciju u pogledu godina, pola, ITM, pušenja, prethodnih cerebrovaskularnih događaja (moždani udar ili tranzitorni ishemijski atak), lekova (statini, ACE inhibitori, blokatori β -adrenergičkih receptora i blokatori kalcijumovih kanala) sa agregabilnošću trombocita, odnosno terapijskim odgovorom na lek. Od laboratorijskih parametara, utvrđeno je da je visoka koncentracija holesterola jedini stečeni nezavisni faktor rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogetrol. Povećanje ukupnog holesterola za jedan povećava rizik od pojave lošeg odgovora na terapiju klopidogetrom nakon tridesetog dana uzimanja

leka za dva puta. Slično dobijenim rezultatima, Tatarunas i saradnici (16) nisu dokazali uticaj starosti, težine, ITM, nivoa kreatinina, primene statina, blokatora receptora angiotenzina II i blokatora β -adrenergičkih receptora na nivo agregabilnosti trombocita. Suprotno, u Pharmacogenomics of Antiplatelet Intervention (PAPI) studiji, je pokazano da su prisustvo CYP2C19*2 genotip, starost, povećanje ITM, visoka koncentracija triglicerida i nizak nivo HDL molekula povezani sa lošim odgovorom na klopidogrel. Međutim, autori su razjasnili 22% varijabilnosti u odgovoru na lek kombinacijom ovih faktora dok je većina varijabilnost u terapijskom odgovoru na klopidogrel ostala nepoznanica (17). U doktorskoj disertaciji, 25,4% interindividualne varijabilnosti u terapijskom odgovoru na lek objašnjeno je visokim koncentracijama holesterola i prisustvom pomenutog alela. Prisustvo CYP2C19*2 varijante gena objasnilo je 20% interindividualne varijabilnosti u reaktivnosti trombocita.

Praćenje terapije bolesnika na osnovu podatka dobijenih odmah nakon uvođenja terapije nije dovoljno pouzdano u proceni terapijskog odgovora na klopidogrel 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 kao prediktor lošeg odgovora nakon mesec dana uzimanja terapije i pravljenje skor modela za procenu rizika od lošeg odgovora. Campo i saradnici su u te svrhe koristili ABCB1 i CYP2C19*2 alele, prve vrednosti agregacije trombocita i klirens kreatinina (18). U doktorskoj disertaciji, 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 trideset dana nakon uzimanja leka.

D. Objavljeni i saopšteni rezultati

Radovi koji čine deo doktorske disertacije sa SCI liste

1. **Bačković D**, Ignjatović S, Rakićević L, Novković M, Kušić-Tišma J, Radojković D, Strugarević E, Čalića B, Radak Đ, Kovač M. Clopidogrel High On-Treatment Platelet Reactivity in Patients with Carotid Artery Stenosis Undergoing Endarterectomy. A Pilot Study. *Curr Vasc Pharmacol*. 2016;14(6):563-569

Tip rada: Original article (originalan naučno istraživački rad)

IF: 2,391 (2016); ISSN: 1570-1611 (M22)

Rang časopisa 131/256 u kategoriji Pharmacology and Pharmacy

2. **Backovic D**, Ignjatovic S, Rakicevic L, Kusic-Tisma J, Radojkovic D, Calija B, Strugarevic E, Radak Dj, Kovac M. Influence of CYP2C19*2 Gene Variant

on Therapeutic Response During Clopidogrel Treatment in Patients with Carotid Artery Stenosis. *J Med Biochem* 2016; 35: 26-33.

Tip rada: Original article (originalan naučno istraživački rad)

IF: 1,148 (2016); ISSN: 1452-8258 (M23)

Rang časopisa 252/286 u kategoriji Biochemistry & Molecular Biology

Saopštenja sa međunarodnih skupova

Backovic D, Ignjatovic S, Rakicevic L, Novkovic M, Kusic-Tisma J, Radojkovic D, Strugarevic E, Calija B, Radak D, Kovac M. Risk factors for clopidogrel high on-treatment platelet reactivity in patients with carotid artery stenosis undergoing endarterectomy. *ISTH 62nd Annual SSC Meeting of the ISTH, Montpellier, France. J Thromb Haemost.* 2016; 14 Suppl 1:110-110

Backovic D, Kovac M, Calija B, Strugarevic E, Radak D, Rakicevic L, Kusic-Tisma, Radojkovic D, Ignjatovic S. Genotype CYP2C19 effects on therapeutic response during clopidogrel treatment in patients with carotid artery stenosis. *23rd Biennial International Congress on Thrombosis – MLTD Congress, Valencia, Spain. Thromb Res.* 2014;133 Suppl 3:S79 (C0221).

Rakicevic Lj, Novkovic M, Kovac M, Matic D, **Backovic D**, Kusic-Tisma J, Antonijevic N, Ignjatovic S, Calija B, Strugarevic E, Radak D, Radojkovic D. Pharmacogenetics of antiplatelets and anticoagulants: experience in Serbia. *11th Balkan Congress of human genetics, Belgrade, Serbia*

E. Zaključak

Podaci prezentovani ovom tezom pružaju originalan doprinos boljem razumevanju uticaja 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 iznetih rezultata i diskusije doneti su sledeći zaključci.

Zastupljenost *CYP2C19*2* alela u ispitivanoj populaciji je 26,8%. Pokazano je da nosioci *CYP2C19*2* varijante gena imaju značajno veće vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita u odnosu na bolesnike koji nisu nosioci pomenutog alela (naročito nosioci *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 primene terapije ostaje nepromenjen. Bolesnici sa 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 klopidogetrom.

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 klopidogetrom. Prisustvo *CYP2C19**2 varijante gena objasnilo je 20% interindividualne varijabilnosti reaktivnosti trombocita. Visok nivo ukupnog holesterola predstavlja jedini stečeni nezavisni faktor rizika lošeg terapijskog odgovora na klopidogetrom. Model koji uključuje nivo ukupnog holesterola i prisustvo *CYP2C19**2 varijante gena može da bude prediktor lošeg odgovora na klopidogetrom trideset dana od uvođenja terapije. Dvadeset pet procenata interindividualne varijabilnosti u terapijskom odgovoru na lek objašnjeno je visokom koncentracijom holesterola i prisustvom pomenutog alela. Nije pokazana značajna korelacija između primene lekova (statini, ACE inhibitori, blokatori β -adrenergičkih receptora ili blokatori kalcijumovih kanala) i agregabilnosti trombocita, tj. terapijskog odgovora na lek. Dakle, značajan deo varijabilnosti ostao je neobjašnjen, a faktori rizika nepoznati.

Citirana literatura

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Ignjatovic V, Pavlovic S, Miloradovic V, Andjelkovic N, Davidovic G, Djurdjevic P, et al. Influence of different β -blockers on platelet aggregation in patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2016;21:44–52.

8. 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.
9. Cattaneo M. Response variability to clopidogrel: is tailored treatment, based on laboratory testing, the right solution? *J Thromb Haemost.* 2012;10:327–36.
10. 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.
11. 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.
12. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Chialda LE, 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.
13. 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.
14. 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.
15. Fernando H, Dart AM, Peter K, Shaw JA. Proton pump inhibitors, genetic polymorphisms and response to clopidogrel therapy. *Thromb Haemost.* 2011;105:933–44.
16. 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.
17. 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.
18. 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.

F. Mišljenje i predlog komisije

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je kandidat u svom istraživanju opravdao postavljene ciljeve istraživanja i zato predlažemo Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivnu ocenu doktorske disertacije pod naslovom „**Uticaj CYP2C19*2 varijante gena na terapijski odgovor u toku primene klopidogrela kod bolesnika sa stenozom karotidnih arterija**” i omogući kandidatu da pristupi javnoj odbrani iste.

ČLANOVI KOMISIJE:

1. _____
Dr Svetlana Ignjatović, mentor
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

2. _____
Dr Mirjana Kovač
naučni saradnik, Institut za transfuziju krvi, Beograd

3. _____
Dr Dragoslav Nenezić
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

4. _____
Dr Ljiljana Rakićević
viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko
inženjerstvo, Beograd

U Beogradu, 13.10.2016. godine