

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Mirjana M. Novković

Analiza promotorskih varijanti gena *CYP2C19* i
njihova uloga u predviđanju terapijskog odgovora na
lek klopidogrel kod pacijenata sa infarktom
miokarda i stenozom karotida

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Mirjana M. Novkovic

Analysis of variants in the promoter region of
CYP2C19 gene and their role in prediction of
clopidogrel response in patients with myocardial
infarction and carotid stenosis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTORI:

dr **Ljiljana Rakićević**, viši naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu
dr **Dužanka Savić-Pavićević**, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA:

dr **Ljiljana Rakićević**, viši naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr **Dužanka Savić-Pavićević**, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr **Dragica Radojković**, naučni savetnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr **Goran Brajušković**, vanredni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr sci. Med. **Nebojša Antonijević**, docent
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
Klinika za kardiologiju, Klinički centar Srbije, Beograd

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Želim da izrazim zahvalnost svim svojim kolegama koji su mi direktno i indirektno pomogli pri izradi ove teze.

Najpre želim da se zahvalim svojim mentorima i članovima komisije:

Dr Ljiljani Rakićević, koja je bila moj neposredni mentor i pratila me tokom realizacije eksperimentalnog dela teze kao i nesebično pomogla i savetovala me tokom njenog pisanja;

Dr Duški Savić-Pavićević, koju smatram svojim molekularno-biloškim roditeljem, bez koje verovatno nikada ne bih uplovila u vode molekularne biologije koje su toliko inspirativne i iznova i iznova očaravaju. Hvala Vam što ste mi pokazali šta znači zeđ za znanjem, upornost i strast prema nauci. Hvala za svu nesebičnu i iskrenu podršku tokom proteklih godina;

Dr Dragici Radojković želim da zahvalim što mi je omogućila da postanem deo Laboratorije za molekularnu biologiju i u njoj uradim svoj doktorat, kao i na kritičkoj analizi i recenziji ove teze;

Dr Goranu Brajuškoviću zahvaljujem na kritičkoj oceni teze, kao i na savetima i podršci još iz vremena studentskih dana;

Dr Nebojši Antonijeviću dugujem zahvalnost za kritičku ocenu ove teze.

Posebno bih zahvalila:

Dr Draganu Matiću i dr Dragani Bačković uz čiju pomoć smo obezbedili neophodne uzorke za ispitivanja u okviru teze;

Dr Nebojši Saviću za duge, plodne i korisne diskusije na temu praćenja efikasnosti antiagregacione terapije;

Dr Milanu Kojiću za sve savete i tajne kloniranja koje je nesebično podelio sa mnom.

Veliko hvala dugujem svim saradnicima iz Laboratorije za molekularnu biologiju.

Milkici za odgovore na sva moja pitanja i potpitanja tokom eksperimentalnog i umnog rada.

Dr Sneži Kojić veliko hvala na nesebičnoj pomoći u planiranju funkcijskih eksperimenata, tumačenju i interpretaciji čudnovatih rezultata.

Veliko hvala Kušić za sve naučne diskusije i mozganja o novim rešenjima starih problema. KoLektoru (Alex) hvala za sve konsultacije, savete i dodatne aktivnosti u koje me je uključivala, kao i na 'leđnoj' podršci. Vanjici na lepim rečima i podršci posebno kada je energije ponestajalo. Hvala Saški za svu zvaničnu i nezvaničnu pomoć i razumevanje tokom doktorandskih dana. Brankiću i Đolu se zahvaljujem za razrešavanje softverskih muka na koje sam nailazila. Srđanu i Nemanji hvala za svu duhovitost i otkaćenost kojom su vedrili radne dane. Hvala Jovani, Tamari, Mariji, Sofiji i divnim vrednim masterima i volonterima (posebno Neveni i Jeleni) na pomoći u obavljanju svih laboratorijskih zadataka.

A sad posebno i veliko hvala dugujem 'radnoj grupi' laboratorije i priključenom članu iliti najmlađim doktorima Jovani, Maji i Sandri i Pruner na svim savetima, podršci, pažljivom slušanju i razumevanju doktorandskih muka ali i ludom smehu našim pričama :D

Hvala Nikoli i Bici na svim statističkim od/dogovorima, sjajnom društvu i podršci, kao i na svim podeljenim ručkovima od mame Jelke i Tome (: A Nikiju posebno i za kršenje ličnih pravila o ponašanju na radnom mestu da bi udovoljio mojim zahtevima ;)

*Hvala ekipi nikotinskih zavisnika na zanimljivim i opuštajućim puš-pauzama, a posebno Lepom Nikoli (06) za sve suze prolivene isključivo od smeha njegovim genijalnim forama, ti si kralj i duša :**

Hvala ekipi lab04 koja je uvek bila tu za pozajmice svega što zafali od prajmera, medijuma do hleba i soli, ali i na važnoj moralnoj podršci i pomalo plesa (:

Ne sme se preskočiti ni tehnička i majstorska podrška Mlađe i Nikole i svi produžni kablovi, klešta, ključevi i čekići koji su mi bili na raspolaganju kad god nešto 'crkne'.

Veliko hvala mojim prijateljima bez kojih moj život ne bi bio toliko vredan, bogat, prepun zagrljaja i avantura. Marijani i Pešiću koji su moji integralni delovi i znam da su uvek i svuda sa mnom i uz mene. Maji, Anđi i Lipidiji hvala za sva uživanja, razumevanje, podršku i lepotu. Miciki i Šomiliju hvala za sve zagrljaje, sve neozbiljnosti i ozbiljnosti koje smo prošli zajedno još od dolaska na Fakultet, kako smo samo porasli! Hvala Žici, Rulu i Mimici što bili tu za mene i obogaćuju moj život.

Hvala i onima koji su otišli ranije ali nastavili da mi daju puno, babama: Veci, Doki, Staroj, Nadi, Cveti; tetki Milunki i teča Srbi. Hvala! ♥

Veliko, veliko, ogromsko hvala mojoj široj i užoj porodici Velji, Vulji, tetka Mari, Sanji, Golu i naravno mojim ma i ta kao i Comiji koji me vole, grle i trpe ovako savršenu :D

Beograd,

Avgust 2018.

Ovu tezu posvećujem mojim roditeljima i sestri, i mojim milicama Eleni i Oskaru.

REZIME

Klopidogrel je antiagregacioni lek koji je sa aspirinom, u sklopu dvojne antiagregacione terapije, indikovana u stanjima koja nose rizik od ishemijskih događaja i tromboembolijskih komplikacija.

Postoji velika interindividualna varijabilnost u odgovoru na klopidogrel. Značajan broj pacijenata kao posledicu neadekvatnog odgovora na terapiju može iskusiti različita neželjena dejstva. Kod oko 9% pacijenata koji su na terapiji klopidogrelom javlja se krvarenje kao neželjeni efekat. Ono samo po sebi može biti životno ugrožavajuće, a sekundarno može biti povezano sa pojavom ishemijskih događaja.

Uzroci varijabilnosti u odgovoru na terapiju klopidogrelom, mogu biti kako stečeni, tako i posledica genetičkih faktora. Među genetičkim faktorima najznačajniji doprinos ima gen za enzim CYP2C19 koji je neophodan u procesu konverzije klopidogrela u aktivnu formu leka. Zbog toga su varijante *CYP2C19* gena najčešće razmatrane u okviru farmakogenetike klopidogrela. Od posebnog kliničkog značaja su varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) i rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*), koje su povezane sa oslabljenim odgovorom na klopidogrel. Promotorska varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) se dovodi u vezu sa pojačanim stepenom inhibicije trombocita i povišenim rizikom od krvarenja kod pacijenata na terapiji klopidogrelom.

U fokusu ove studije bilo je ispitivanje uticaja *CYP2C19* gena na pojavu pojačanog odgovora na klopidogrel koje vodi povišenom riziku od krvarenja.

Istraživanje je sprovedeno u grupi pacijenata koji su pretrpeli infarkt miokarda i bili podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji (PCI), kao i grupi pacijenata sa stenozom karotida koji su podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji (CEA).

U studiji su analizirane promotorske varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) za koje su literaturni podaci i naši preliminarni rezultati pokazali da mogu biti povezane sa pojačanim odgovorom na klopidogrel. Dodatno su analizirane egzonske varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) i rs4986893 (c.636G>A, *CYP2C19*3*) zbog mogućeg uticaja na efekte promotorskih varijanti. Zbog oskudnosti podataka koji se odnose na promotorsku varijantu rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*), jedan od ciljeva studije bio je da

se u *in vitro* uslovima ispita njen funkcijski značaj. Takođe, jedan od ciljeva studije bio je da se analiza varijanti gena *CYP2C19*, koje su pokazale značaj u pogledu terapije klopidogetrelom iskoristi u svrhu racionalizacije postojećeg protokola za primenu antiagregacione terapije u Srbiji.

Analiza varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) nije pokazala povezanost sa krvarenjem kod pacijenata podvrgnutih PCI nakon infarkta miokarda, koji su bili na terapiji klopidogetrelom. Takođe, ova varijanta nije bila povezana sa agregacijom trombocita indukovanom adenzin difosfatom (ADP) kod pacijenata sa stenozom karotide koji su nakon karotidne endarterektomije bili na terapiji klopidogetrelom. Varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) nije bila povezana ni sa pojačanim odgovorom na klopidogetrel definisanim na osnovu različitih graničnih vrednosti ADP-indukovane agregacije.

Varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) je pokazala značajnu povezanost sa krvarenjem kod pacijenata sa akutnim infarktomiokarda podvrgnutih PCI. Prisustvo alela G povećava mogućnost krvarenja 3,7 puta. Međutim, varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) nije bila povezana sa ADP-indukovanim agregacijom kod pacijenata koji su nakon karotidne endarterektomije bili na terapiji klopidogetrelom. Takođe, ova varijanta nije pokazala značajnu povezanost sa pojačanim odgovorom na klopidogetrel procenjenim na osnovu različitih graničnih vrednosti ADP-indukovane agregacije. Sekvenciranjem egzona 4 gena *CYP2C19* pokazano je da se alal G varijante rs11568732(c.-889T>G, *CYP2C19**20) u populaciji Srbije javlja potpuno nezavisno od alela A varijante rs4986893 (c.636G>A, *CYP2C19**3) sa kojim je svrstan u haplotip *CYP2C19**3B.

Funkcijska analiza varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) pokazala je da prisustvo nukleotida G dovodi do smanjenja aktivnosti promotora za 20%. Takođe, pokazano je da progesteronski receptor utiče na povećanje promotorske aktivnosti gena *CYP2C19* nezavisno od varijante rs11568732. Glukokortikoidni receptor po aktivaciji deksametazonom dovodi do manjeg povećanja aktivnosti promotora ako se na poziciji c.-889, nalazi nukleotid G, nego *wt* nukleotid T.

Analiza farmakogenetički vođene terapije klopidogetrelom u odnosu na genotip varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2) pokazala se kao strategija uštede u Srbiji.

Rezultati ove studije pokazuju da varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) ne predstavlja pouzdan prognostički faktor za procenu rizika od krvarenja. Što se tiče varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) neophodna su dalja istraživanja da bi se rasvetlio njen mehanizam delovanja i pouzdano utvrdila njena uloga u krvarenju kod PCI pacijenata na terapiji klopidogrelom.

KLJUČNE REČI: genske varijante , *CYP2C19*, klopidogrel, krvarenje, ADP-indukovana agregacija trombocita, infarkt miokarda, stenoza karotida, farmakogenetika

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLČAST: Molekularna biologija

UDK BROJ: 575.113.2:[615.21/26+[615.273+611.018.52]](043.3)

ABSTRACT

Clopidogrel is antiplatelet drug which, along with aspirin represent dual antiplatelet therapy, indicated in patients with risk of ischemic events and thromboembolic complications.

Wide inter-individual variability in clopidogrel response has been reported. Significant number of patients with inadequate response to clopidogrel experience different adverse effects. Bleeding as an adverse event occurs in about 9% of patients on clopidogrel therapy. It can be life threatening and secondarily, related to higher risk of ischemic events.

Variability in clopidogrel response may be explained by different non-genetic and genetic factors. Among genetic factors, the most important role has *CYP2C19* gene encoding enzyme responsible for conversion of clopidogrel to its active form. Hence, *CYP2C19* gene variants are the most commonly investigated genetic variants related to clopidogrel pharmacogenetics.

Clinically, the most relevant variants are rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2) and rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19**3) which lead to clopidogrel poor response. Additionally, promoter variant rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) is associated with elevated platelet inhibition and increased risk of bleeding in patients on clopidogrel.

This study was focused on investigating role of *CYP2C19* gene in clopidogrel hyper-responsiveness which increases the risk of bleeding.

This study was conducted in a group of patients with acute myocardial infarction who underwent percutaneous coronary intervention (PCI) as well as in patients with carotid stenosis who underwent carotid endarterectomy (CEA).

In this study we examined two promoter rs12248560 (*CYP2C19**17) and rs11568732 (*CYP2C19**20) variants, for which literature and our preliminary results showed to be associated with elevated clopidogrel response. Additionally, we analyzed exonic variants rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2) and rs4986893 (c.636G>A, *CYP2C19**3) considering their potential influence on the promoter variants' effects. Since literature data on rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) variant is scarce, we aimed to investigate its functional significance. Further, one of our aims was the analysis of the relevant *CYP2C19* variants regarding clopidogrel therapy, which can be used to rationalize current protocols for antiplatelet therapy in Serbia.

Analysis of rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) variant showed no association with bleeding events in patients who underwent PCI after myocardial infarction and were on clopidogrel therapy. Next, we showed that this variant is not associated with ADP induced platelet aggregation in patients with carotid stenosis who underwent CEA. Additionally, rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) variant was not associated with clopidogrel hyperresponse defined by three different cut-offs based on ADP induced platelet aggregation.

Our results showed that rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) variant is associated with bleeding events in patients with acute myocardial infarction who underwent PCI. We found that carriers of allele G of this variant are 3,7 times more likely to experience bleeding. However, rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) variant was not associated with ADP induced platelet aggregation in patients with carotid stenosis who underwent CEA, nor with clopidogrel hyperresponse defined by three different cut-offs based on ADP induced platelet aggregation. Furthermore, we showed that in Serbian patients allele G of rs11568732 variant appears independently of rs4986893 (c.636G>A, *CYP2C19*3*) variant as well as of *CYP2C19*3B* haplotype.

The functional analysis of rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) variant showed that the presence of nucleotid G decreases promoter activity by 20%. Also, we showed that progesterone receptor increases *CYP2C19* promoter activity independently of rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) variant. The glucocorticoid receptor activated by dexamethasone leads to smaller increase of promoter activity if nucleotid G is present at the position c.-889 instead of *wt* nucleotide T.

The analysis of pharmacogenetic-guided clopidogrel therapy based on rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) genotype showed that this would be a cost-saving approach under current conditions in Serbia.

Finally, results of this study show that rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) variant is not a reliable prognostic marker for estimation of bleeding risk. Regarding rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) variant further investigation is needed in order to elucidate mechanism of action and to validate its effect on bleeding in PCI patients on clopidogrel treatment.

KEYWORDS: genetic variants, *CYP2C19*, clopidogrel, bleeding, ADP induced platelet aggregation, myocardial infarction, carotid stenosis, pharmacogenetics

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology

UDC NUMBER: 575.113.2:[615.21/26+[615.273+611.018.52]](043.3)

LISTA KORIŠĆENIH SKRAĆENICA

| | |
|-------|--|
| AA | arahidonska kiselina, eng. <i>arachidonic acid</i> |
| ABCB1 | ATP-vezujući protein subfamilija B član 1 eng. <i>ATP binding cassette subfamily B member 1</i> |
| ACCF | eng. <i>American College of Cardiology Foundation</i> |
| ACE | angotenzin konvertujući enzim eng. <i>Angiotensin Converting Enzyme</i> |
| ACS | akutni koronarni sindrom eng. <i>Acute Coronary Syndrome</i> |
| ADP | adenozin difosfat eng. <i>adenosin diphosphate</i> |
| AHA | eng. <i>American Heart Association</i> |
| AMI | akutni infarkt miokarda eng. <i>Acute Myocardial Infarction</i> |
| AU | arbitrarna agregacija jedinica eng. <i>Arbitrary Aggregation Unit</i> |
| AUC | površina ispod krive eng. <i>Area Under the Curve</i> |
| BARC | akademski konzorcijum za istraživanje krvarenja eng. <i>Bleeding Academic Research Consortium</i> |
| CABG | premoščavanje karotidne arterije eng. <i>Coronary Artery Bypass Grafting</i> |
| CAD | koronarna arterijska bolest eng. <i>Coronary Artery Disease</i> |
| cAMP | ciklični adenzin monofosfat eng. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> |
| CAR | konstitutivni receptor androgena eng. <i>Constitutive Androstane Receptor</i> |
| CAS | karotidna angioplastika sa ugradnjom stenta eng. <i>Carotid Artery Stenting</i> |
| CEA | karotidna endarterektomija eng. <i>Carotid Endarterectomy</i> |
| CES1 | karboksiesteraza 1 eng. <i>carboxylesterase 1</i> |
| CI | interval poverenja eng. <i>Confidence Interval</i> |
| COX | ciklooksigenaza eng. <i>carboxy oxygenase</i> |
| CPIC | konzorcijum za implementaciju kliničke farmakogenetike eng. <i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i> |
| DAPT | dvojna antiagregaciona terapija eng. <i>Dual Antiplatelet Therapy</i> |
| DLR | dvojni luciferazni reporter eng. <i>Dual-Luciferase Reporter</i> |
| DNK | dezoksiribonukleinska kiselina |
| EKG | elektrokardiogram |

| | |
|---------------|---|
| EM | eng. <i>extensive metabolizer</i> |
| EMA | Evropska medicinska agencija eng. <i>European Medicines Agency</i> |
| ER α | estrogeni receptor alfa |
| US FDA | Američka agencija za hranu i lekove eng. <i>US Food and Drug Administration</i> |
| FOXA3 | eng. <i>Forkhead Box A3</i> |
| GATA | familija transkripcionih faktora koja se veže za (A/T)GATA(A/G) DNK sekvencu |
| GP Ia/IIa | glikoprotein Ia/IIa kompleks |
| GPIIb/IIIa | glikoprotein IIb/IIIa kompleks |
| GP VI | glikoprotein VI |
| GPIb-IX-V | glikoprotein Ib-IX-V receptorski kompleks |
| GPIIb/IIIa | glikoprotein IIb/IIIa |
| GR | glukokortikoidni receptor |
| GRE | glukokortikoidni element eng. <i>Glucocorticoid Response Element</i> |
| HCSC | eng. <i>Health Canada (Santé Canada)</i> |
| HNF3 γ | hepatocitni nuklearni factor 3 γ eng. <i>Hepatocyte Nuclear Factor 3 γ</i> |
| IM | eng. <i>intemediate metabolizer</i> |
| iRNK | informaciona ribonukleinska kiselina |
| LDL | lipoprotein male gustine eng. <i>low-density lipoprotein</i> |
| LTA | eng. <i>Light transmission platelet aggregometry</i> |
| MEA | multipla elektrodna agregometrija eng. <i>Multiple electrode aggregometry</i> |
| MI | infarct miokarda eng. <i>Myocardial Infarction</i> |
| NSTE | bez ST elevacije eng. <i>Non-ST Elevation</i> |
| OR | eng. <i>Odds Ratio</i> |
| PCI | perkutana koronarna intervencija eng. <i>Percutaneous Coronary Intervention</i> |
| PCR | lančana reakcija polimerizacije eng. <i>Polimerase Chain Reaction</i> |
| PGE1 | prostaglandin E1 |
| PM | eng. <i>poor metabolizer</i> |
| PMDA | eng. <i>Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japan</i> |
| PON1 | paraoksigenaza eng. <i>Paraoxonase</i> |

| | |
|-------|---|
| PRI | indeks reaktivnosti trombocita eng. <i>Platelet reactivity index</i> |
| PRP | plazma bogata trombocitima eng. <i>platelet rich plasma</i> |
| PRU | jedinice reaktivnosti receptora P2Y ₁₂ eng. <i>P2Y₁₂ Reactivity Units</i> |
| PVD | periferna vaskularna bolest eng. <i>Peripheral Vascular Disease</i> |
| RNK | ribonukleinska kiselina |
| ROC | eng. <i>Receiver Operating Characteristic</i> |
| Rpm | obrtaji u minuti eng. <i>revolutions per minute</i> |
| STEMI | infarkt miokarda sa ST elevacijom eng. <i>ST-Elevation Myocardial Infarction</i> |
| TF | transkripcioni factor |
| TIA | tranzitorni ishemijski napad eng. <i>Transient Ischemic Attack</i> |
| TIMI | eng. <i>Thrombolysis in Myocardial Infarction bleeding</i> |
| TRAP | trombin receptor aktivirajući peptid eng. <i>Thrombin Receptor-Activating Peptide</i> |
| UI | interval merne nesigurnosti eng. <i>uncertainty interval</i> |
| UM | eng. <i>ultrarapid metabolizer</i> |
| UTR | netranslatirajući region eng. <i>Untranslated Region</i> |
| VASP | vazodilatator stimulirajući protein eng. <i>Vasodilatator stimulated protein</i> |
| vWF | von Willebrand faktor |
| wt | eng. <i>wild type</i> |

| | |
|--|----|
| Uvod | 19 |
| 1.1 Farmakogenetika i personalizovana medicina | 2 |
| 1.2 Ateroskleroza..... | 3 |
| 1.2.1 Akutni infarkt miokarda i perkutana koronarna intervencija..... | 4 |
| 1.2.2 Karotidna arterijska bolest i karotinda endarterektomija..... | 5 |
| 1.3 Hemostaza | 6 |
| Trombociti | 6 |
| 1.4 Dvojna antiagregaciona terapija | 9 |
| Inhibitori P2Y ₁₂ receptora..... | 9 |
| Klopidogrel | 9 |
| 1.5 Genetički faktori koji utiču na terapiju klopidogrelom..... | 13 |
| CYP2C19..... | 13 |
| 1.6 Metode za praćenje ADP-zavisne agregacije trombocita..... | 18 |
| Ciljevi | 22 |
| Materijal i metode..... | 24 |
| 3.1 Ispitanici | 25 |
| 3.1.1 Pacijenti sa infarktom miokarda sa ST elevacijom (STEMI) podvrgnuti primarnoj perkutanoj intervenciji..... | 25 |
| 3.1.2 Pacijenti sa stenozom karotidne arterije podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji | 27 |
| 3.2 Materijal | 29 |
| Ćelijske linije | 29 |
| Bakterijski sojevi | 29 |
| Plazmidni vektori | 29 |
| Konstrukti | 30 |
| Dodatni materijal..... | 30 |
| Oligonukleotidi | 31 |
| 3.3 Metode | 32 |
| Određivanje ADP indukovane agregacije trombocita metodom multiple elektrodne agregometrije | 32 |
| Izolacija DNK iz periferne krvi..... | 33 |
| Analiza DNK u agaroznom gelu | 33 |
| Reakcija lančanog umnožavanja DNK polimerazom (PCR)..... | 34 |
| Prečišćavanje PCR produkata | 34 |

| | |
|--|----|
| Sekvenciranje DNK | 35 |
| Izolacija ukupne RNK iz Caco-2 ćelijske linije | 36 |
| Sinteza komplementarne DNK | 37 |
| Kvantifikacija RNK metodom PCR-a u realnom vremenu..... | 37 |
| Kloniranje | 38 |
| Digestija DNK restrikcijom enzimima | 39 |
| Prečišćavanje DNK fragmenata iz agaroznog gela..... | 40 |
| Ligacija | 41 |
| Mutageneza..... | 42 |
| Gajenje bakterija | 43 |
| Priprema kompetentnih ćelija za transformaciju toplotnim šokom | 44 |
| Transformacija bakterija toplotnim šokom | 44 |
| Izolacija plazmidne DNK | 45 |
| Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi | 45 |
| Gajenje Caco-2 ćelijske linije | 46 |
| Tranzijentna transfekcija Caco-2 ćelijske linije..... | 47 |
| Luciferazni eseji | 48 |
| <i>In silico</i> analiza uticaja c.-889T>G varijante na ekspresiju gena <i>CYP2C19</i> | 49 |
| Statistička obrada podataka | 49 |
| Analiza ekonomske isplativosti farmakogenetički vođene terapije klopidogrelom..... | 50 |
| Rezultati..... | 51 |
| 4.1 Analiza povezanosti varijanti <i>CYP2C19</i> gena sa kliničkim ishodima tokom terapije klopidogrelom | 52 |
| 4.1.2 Analiza povezanosti varijanti gena <i>CYP2C19</i> sa pojavom krvarenja kod pacijenata sa infarktom miokarda podvrgnutih PCI i na terapiji klopidogrelom | 53 |
| 4.1.3 Sekvenciranje <i>CYP2C19</i> gena kod nosioca alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19</i> *20) | 59 |
| 4.2 Ispitivanje povezanosti varijanti rs12248560 (c.-806C>T, <i>CYP2C19</i> *17) i rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19</i> *20) sa terapijskim odgovorom na klopidogrel procenjenim na osnovu ADP-indukovane agregacije trombocita | 61 |
| 4.2.1 Agregabilnost trombocita pri terapiji klopidogrelom kod pacijenata sa stenozom karotide podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji | 63 |
| 4.2.2 ADP-zavisna agregacija trombocita kod pacijenata na terapiji klopidogrelom u zavisnosti od <i>CYP2C19</i> genotipa | 64 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.3 Procena rizika za pojavu krvarenja tokom terapije klopidogrelom na osnovu ADP-indukovane agregacije trombocita | 66 |
| Analiza povezanosti <i>CYP2C19</i> varijanti i pojačanog odgovora na klopidogrel | 67 |
| 4.3 Ispitivanje uticaja varijante rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19</i> *20) na aktivnost promotora gena <i>CYP2C19</i> | 75 |
| <i>In silico</i> analiza varijante rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19</i> *20)..... | 75 |
| 4.3.2 Funkcijska analiza promotorske varijante rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19</i> *20) gena <i>CYP2C19</i> | 77 |
| Uticaj alela G varijante rs11568732 na aktivnost promotora <i>CYP2C19</i> gena | 78 |
| Ispitivanje uticaja rekombinantnog progesteronskog i glukokortikoidnog receptora na aktivnost promotora <i>CYP2C19</i> gena u zavisnosti od varijante rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19</i> *20)..... | 79 |
| 4.4 Analiza ekonomske isplativosti genotipizacije varijante gena <i>CYP2C19</i> pacijenata podvrgnutih PCI83 | |
| 4.5 Učestalost alela ispitivanih varijanti u različitim populacijama..... | 86 |
| Diskusija..... | 88 |
| 5.1 Varijante gena <i>CYP2C19</i> i pojava krvarenja kao klinička manifestacija pojačanog delovanja klopidogrela..... | 90 |
| 5.2 Varijante gena <i>CYP2C19</i> i ADP-indukovana agregacija | 94 |
| 5.3 Funkcijska analiza varijante rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19</i> *20) | 102 |
| 5.4 Analiza isplativosti farmakogenetički vođene terapije klopidogrelom kod pacijenata podvrgnutih perkutanoj koronarnoj intervenciji u Srbiji | 106 |
| 5.5 Poređenje učestalosti alela ispitivanih varijanti u različitim svetskim populacijama..... | 108 |
| 5.6 Farmakogenetika u svetu i Srbiji | 109 |
| Zaključci | 113 |
| Literatura | 116 |
| Prilozi | 137 |

Uvod

1.1 Farmakogenetika i personalizovana medicina

Poslednjih decenija u medicini postoji težnja ka individualnom pristupu u lečenju pacijenata, a najznačajniji doprinos personalizovanoj medicini dala je farmakogenetika - disciplina koja povezuje genetički profil pojedinca sa efikasnošću dejstva i pojavom neželjenih efekata određenog farmakoterapeutika. Tradicionalni pristup u lečenju bi se mogao opisati kroz frazu „*one-size-fits-to-all*“ i podrazumeva da svi pacijenti sa određenom kliničkom dijagnozom dobijaju istu ili vrlo sličnu terapiju [1]. Ovakav pristup dovodi u rizik deo pacijenata kod kojih primenjena terapija nije adekvatna, bilo da se radi o tome da pacijent ispoljava rezistenciju ili preosetljivost na primenjeni lek, ili čak iskusi toksične efekte. Informacije koje obezbeđuje farmakogenetika, omogućavaju da se na osnovu genetičkog profila, u kombinaciji sa kliničkim i drugim podacima o pacijentu, blagovremeno prilagodi doza leka ili da se isti zameni po pacijenta bezbednijim terapeutikom [1, 2].

Prilikom proučavanja dejstva lekova, najvažnija su dva aspekta: farmakokinetika i farmakodinamika. Farmakokinetika podrazumeva apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju leka. Farmakodinamika se odnosi na mehanizme delovanja leka, kao i na njegovu efikasnost i potentnost koji dovode kako do željenih tako i neželjenih reakcija na terapiju [3]. Stoga su geni uključeni u farmakokinetiku i farmakodinamiku određenog leka prvi kandidati za farmakogenetička ispitivanja [4].

Uprkos određenom broju jasnih zaključaka koja daju farmakogenetička istraživanja, u ovoj oblasti postoji visok stepen nekonzistentnosti dobijenih rezultata [5]. Neke studije pokazuju da određene genetičke promene imaju značajan uticaj na efikasnost i bezbednost određenih farmakoterapeutika, dok druga istraživanja dolaze do suprotnih zaključaka. Ova neslaganja predstavljaju jedan od najvećih izazova u farmakogenetici i oslikavaju važnost i potrebu za novim istraživanjima koja će razjasniti postojeće nedoumice, ali i voditi otkrivanju novih farmakogenetičkih markera, što bi značajno objasnilo varijabilnost u odgovoru na lekove [5-7]. Savladavanje ovih izazova doneće važne pomake u primeni farmakogenetike u kliničkoj praksi, a time i značajan napredak u personalizovanoj medicini [5].

Ekspanzija farmakogenetičkih istraživanja i uvođenje farmakogenetičkog testiranja u kliničku praksu doveli su i do pojave brojnih studija koje se bave ekonomskim aspektom

genetičkih testiranja i primene farmakogenetike [8]. Ove studije se bave procenom isplativosti ili uštede koja se može ostvariti prilikom primene farmakogenetički-vođene terapije. Pored direktnog benefita za pacijente, ekonomske studije pokazuju da farmakogenetički-vođena terapija donosi uštedu sistemu zdravstvene zaštite i zdravstvenom osiguranju, jer doprinosi povećanju efikasnosti terapije i smanjenju pojave neželjenih reakcija na lek [9, 10], čije bi saniranje podrazumevalo dodatne troškove.

Među najčešće proučavanim lekovima u oblasti farmakogenetike su grupe lekova koje se koriste u lečenju i prevenciji kardiovaskularnih bolesti, što ima izrazito veliki, kako naučni tako i društveni značaj s obzirom na to da je ova grupa bolesti vodeći uzrok oboljevanja i smrtnosti u svetu. U našoj zemlji procenat smrtnosti usled kardiovaskularnih oboljenja je iznad svetskog proseka i iznosi 53% [11], tako da je prevencija ovih oboljenja, a istovremeno optimizacija i unapređenje terapijskih pristupa veliki imperativ kako za nauku, tako i za društvo u celini.

1.2 Ateroskleroza

Ateroskleroza je hronična inflamatorna bolest velikih i srednjih arterija koja dovodi do zadebljanja zida i stenozе lumena krvnih sudova, i glavni je uzročnik infarkta miokarda, moždanog udara, nestabilne angine pektoris i srčane smrti [12]. Bolest započinje oštećenjem i disfunkciom endotela krvnih sudova. Endotelne ćelije eksprimiraju adhezivne molekule na svojoj površini za koje se vezuju monociti koji migriraju u sloj intime, gde se diferenciraju u makrofage i eksprimiraju receptore za modifikovane lipoproteine male gustine (LDL). Ovo dovodi do prodiranja LDL u sloj intime i do oštećenja glatkog mišićnog sloja arterija [12]. U arterijskoj intimi LDL podležu oksidaciji i glikozilaciji [13]. Makrofagi preuzimaju holesterol iz LDL molekula što dovodi do nastanka intracelularnih depoa lipida koji makrofagima daju penast izgled (penaste ćelije) [14]. Daljom akumulacijom holesterola, koji se nakuplja i ekstracelularno, nastaju masne pruge na mestu lezije endotela. Ove lezije su još uvek reverzibilne i ne sužavaju lumen arterija, pa ne dovode do kliničkih simptoma [14]. Dalje, makrofagi se nakon fagocitoze oksidovanih LDL molekula, aktiviraju i počinju da luče citokine i faktore rasta koji stimulišu proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih ćelija u intimu [13]. Ćelije glatkih mišića proizvode ekstraselularni matriks u vidu kolagena što dovodi do stvaranja fibrozne kape [12, 14]. Kao posledica navedenih procesa nastaje aterosklerotski plak koga čine jezgro sa penastim ćelijama od kojih procesom

nekroze ostaju naslage lipida oko kojih se nalazi fibrozna kapa. Stabilnost plaka zavisi od debljine fibrozne kape [14]. Pucanje plaka dovodi do izlivanja lipidnog sadržaja u lumen krvnog suda, distalne embolizacije i lokalne tromboze [14, 15]. Značajnu ulogu u formiranju aterosklerotskog plaka imaju i trombociti jer interaguju sa inflamatornim i vaskularnim ćelijama, a sekretuju i hemokine, što dovodi do pogoršanja aterosklerotske lezije. Stoga je kod pacijenata u visokom riziku od razvoja ateroskleroze osim antihipertenziva i statina indicovano uvođenje antitrombocitne terapije [16, 17].

1.2.1 Akutni infarkt miokarda i perkutana koronarna intervencija

Akutni infarkt miokarda (eng. *Acute Myocardial Infarction-AMI*) je jedan od vidova koronarne arterijske bolesti (eng. *Coronary Artery Disease-CAD*) koja je posledica okluzije koronarne arterije [18]. Okluzija koronarne arterije je obično posledica prisustva ateroskleroze, a ruptura aterosklerotskog plaka vodi akutnom koronarnom sindromu (eng. *Acute Coronary Syndrome-ACS*) ili infarktu miokarda [12]. Akutni infarkt može da ima blagu ili veoma ozbiljnu kliničku sliku, kao i prognozu ishoda. Dijagnostika se sprovodi na osnovu kliničke evaluacije, elektrokardiograma (EKG), biohemijskih testova i koronarografije [18]. Ukoliko je kod pacijenta angiozni bol praćen ST elevacijom na EKG zapisu, kao i povećanjem srčanog troponina, može se dijagnostikovati akutni infarkt miokarda sa ST elevacijom (eng. *ST-Elevation Myocardial Infarction- STEMI*). Kod ovih pacijenata neophodno je primeniti reperfuzionu terapiju u roku od 12h nakon početka simptoma. Preporučena reperfuziona terapija je primarna perkutana koronarna intervencija (eng. *Percutaneous Coronary Intervention – PCI*) [19].

Primarna PCI je nehirurška intervencija koja podrazumeva hitnu balon angioplastiku sa ili bez ugradnje stenta. Sama intervencija podrazumeva provlačenje metalne žice kroz formirani tromb i pozicioniranje balon katetera (sa ili bez stenta) na mesto okluzije. Proširivanjem balon katetera se ponovo uspostavlja protok krvi kroz srčani mišić [20].

Medikamentna terapija koja prati PCI podrazumeva primenu antiagregacionih i antikoagulacionih lekova koji smanjuju učestalost ponovljenih ishemijskih događaja kao i smrtnost [19, 21]. Najčešće se primenjuje kombinacija više lekova i to aspirina i inhibitora trombocitnog receptora P2Y₁₂ za adenzin difosfat (dvojna antiagregaciona terapija-DAPT),

zatim heparina, inhibitora glikoproteinskog receptora GPIIa/IIIa i direktnih inhibitora trombina. Osim očekivanog delovanja ovakva terapija vodi porastu rizika od krvarećih događaja [19, 21].

1.2.2 Karotidna arterijska bolest i karotinda endarterektomija

Karotidna arterijska bolest je posledica aterosklerotske stenozе karotidne arterije koja uzrokuje smanjen i usporen protok krvi kroz ovu arteriju [22]. Stenoza karotidnih arterija može biti simptomatska ili asimptomatska. Simptomatska karotidna bolest je praćena neurološkim događajima i može se manifestovati kroz tranzijentni ishemijski napad (eng. *Transient Ischemic Attack*- TIA), prolazni gubitak vida ili ishemijski moždani udar. Karotidna bolest koja nije praćena ni jednim neurološkim simptomom definisana je kao asimptomatska. Prognoza i lećenje zavise od tipa karotidne bolesti [22, 23].

U dijagnostici stenozе karotida koriste se karotidna angiografija, kao i neinvazivne metode kao što su Dopler ultrazvučno ispitivanje, kompjuterizovana tomografska angiografija i angiografija magnetnom rezonancom. U lećenju karotidne bolesti primenjuje se medikamentna terapija, karotidna endarterektomija (eng. *Carotid Endarterectomy*-CEA) ili karotidna angioplastika sa ugradnjom stenta (eng. *Carotid Artery Stenting*-CAS) [22]. Operativno lećenje stenozе karotidnih arterija je indikovano kod simptomatskih bolesnika sa stenozom većom od 70% i to u roku od dve nedelje nakon neurološkog događaja [22].

Karotidna endarterektomija je hirurški zahvat i podrazumeva odstranjivanje aterosklototskog plaka karotidne arterije koji izaziva kritičnu stenozu. To je danas najčešći operativni zahvat u vaskularnoj hirurgiji za prevenciju moždanog udara [24].

Postoperativna antitrombocitna i antikoagulantna terapija se primenjuje radi sprečavanja stvaranja novih embolusa i tromboze zida operisane arterije, sprečavanja restenozе i drugih neželjenih postoperativnih događaja. Nakon CEA ili CAS indikovana je primena dvojne antitrombocitne terapije - DAPT (aspirin i klopidogrel) najmanje 30 dana nakon zahvata, kao i primena statina i antihipertenzivnih lekova (blokatori beta receptora, blokatori angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE), blokatori kalcijumovih kanala) [25, 26].

1.3 Hemostaza

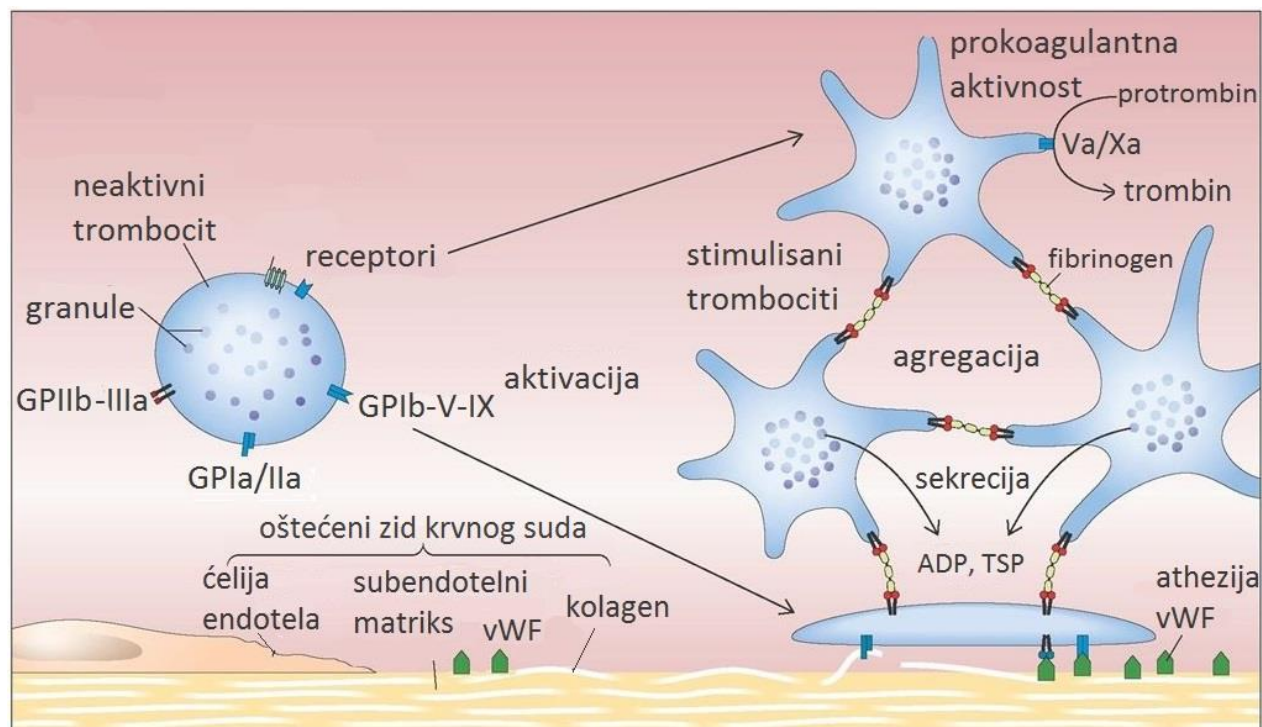
Kardiovaskularne bolesti nastaju kao posledica progresije ateroskleroze koja dovodi do poremećaja normalnih hemostaznih mehanizama; stoga su pojedini učesnici hemostaze veoma često target farmakoterapeutika koji se primenjuju u cilju prevencije i lečenja različitih vidova kardiovaskularnih oboljenja [12, 27]. Hemostaza je fiziološki proces koji ima ulogu u održavanju krvi u tečnom, cirkulišućem stanju, a u slučaju povrede krvnog suda obezbeđuje zaustavljanje krvarenja formiranjem krvnog ugruška na mestu povrede. Glavni elementi hemostaznog sistema su endotel krvnih sudova, trombociti, faktori koagulacione kaskade, inhibitori koagulacije i sistem fibrinolize [28]. Proces hemostaze je veoma precizno regulisan i sastoji se od dve glavne faze - primarne i sekundarne hemostaze. Primarna hemostaza podrazumeva učešće trombocita koji adhezijom i međusobnom agregacijom na mestu povrede krvnog suda dovode do stvaranja trombocitnog čepa. Sekundarna hemostaza podrazumeva aktivaciju koagulacione kaskade. Nakon povrede krvnog suda dolazi do otpuštanja koagulacionog faktora III i aktivacije faktora VII, VIII, IX i XII koji dalje podstiču aktivaciju faktora X. Aktivirani faktor X, tkivni i trombocitni fosfolipidi zajedno sa faktorom V čine kompleks aktivatora protrombina koji biva preveden u trombin. Trombin zatim dovodi do aktivacije fibrinogena, što omogućava formiranje fibrinske mreže koja dodatno biva stabilizovana dejstvom faktora XIII. Tako trombocitni čep i fibrinska mreža zajedno formiraju krvni ugrušak [29].

Trombociti

Trombociti su ćelije koje ne sadrže jedro i nastaju od megakariocita u kostnoj srži i plućima. Normalan broj trombocita se kreće između 150 i 400 milijardi po litru krvi, a životni vek im je oko 10 dana. Iako nemaju jedro, trombociti su metabolički aktivne ćelije koje sadrže informacionu RNK i sintetišu određene proteine, kao i brojne molekule poreklom od megakariocita od kojih su nastali [30]. Trombociti imaju veliki broj površinskih receptora [31], adhezivnih molekula i brojne granule (Slika 1) [32, 33].

Na membrani trombocita nalazi se glikoprotein Ib-IX-V receptorski kompleks (GPIb-IX-V) koji ima ulogu u vezivanju von Willebrand faktora (vWF), α -trombina, nekih integrina leukocita i P-selektina. Glikoprotein VI (GPVI) je kolagenski receptor koji je uključen u kolagenom indukovanu agregaciju i adheziju trombocita, kao i podsticanje njihove prokoagulantne

aktivnosti. Glikoprotein Ia/IIa kompleks (GPIa/IIa) je receptor za kolagen tip I i IV i ima funkciju i u vezivanju vWF [33]. Glikoprotein IIb/IIIa kompleks (GPIIb/IIIa), nakon aktivacije trombocita, trpi konformacionu promenu, što povećava njegov afinitet za vezivanje fibrinogena. Ovaj kompleks takođe vezuje vWF, fibronektin i vitronektin [34].



Slika 1 Prikaz trombocita u različitim fazama aktivnosti. GPIIb-IIIa-grlikoproteinski kompleks IIB-IIIa; GPIa/IIa-grlikoproteinski kompleks Ia/IIa; GPIb-V-IX- glikoproteinski kompleks Ib-V-IX; vWF-von Willebrand faktor ADP-adenozin difosfat; Va/Xa-kompleks aktiviranih koagulacionih faktora V i X; TSP-trombospondin. Preuzeto i modifikovano sa <http://what-when-how.com/acp-medicine/hemostasis-and-its-regulation-part-1/>.

Trombociti sadrže tri glavna tipa granula: alfa i delta (guste) granule i lizosome. Alfa granule sadrže trombocitni faktor rasta, trombocitni faktor 4, GPIb-IX-V kompleks, faktor V, VI, XI i XIII kao i fibrinogen [35]. Guste granule sadrže serotonin, adenzin trifosfat, adenzin difosfat (ADP), P-selektin i jone kalcijuma.

Svoju aktivnost trombociti ostvaruju na mestu povrede krvnog suda prolazeći kroz nekoiko faza: aktivacija, adhezija, agregacija i sekrecija (Slika1). Nakon aktivacije trombocita, koja se odigrava pod uticajem različitih agonista, dolazi do promene njihovog oblika i veličine, kao i do pojave pseudopodija. Takođe, dolazi do povećanja adhezivnog kapaciteta trombocita i

intenziviranja procesa njihove međusobne agregacije. U sekretornoj fazi oslobađa se sadržaj granula koji, pozitivnom povratnom spregom, vodi amplifikaciji aktivacije trombocita, ali i intenziviranju koagulacionih procesa [36]. Postoji veliki broj agonista koji stimuliše adheziju trombocita za endotel, promenu oblika trombocita, oslobađanje sadržaja granula kao i međusobnu agregaciju trombocita. Među tim agonostima najvažniji su kolagen, ADP, tromboksan A2 (TXA2) i trombin [32].

Kolagen se, sa mesta povrede krvnog suda, direktno vezuje za GPIa/IIa i GPVI receptore trombocita. Von Willebrand faktor (vWF) koji se oslobađa iz subendotela formira most između molekula kolagena i GPIb-IX-V kompleksa. Aktivni GPIIb/IIIa receptor ima glavnu ulogu u posredovanju agregacije, jer vezivanjem fibrinogena ili vWF vodi povezivanju trombocita i stabilizaciji krvnog ugruška [32]. Takođe, prilikom interakcije trombocita sa kolagenom subendotela dolazi do stvaranja arahidonske kiseline koja se prevodi u prostaglandin H2 posredstvom enzima ciklooksigenaze. Prostaglandin H2 pod uticajem tromboksan sintetaze prelazi u tromboksan A2, koji dovodi do vazokonstrikcije, kao i do agregacije trombocita i oslobađanje sadržaja gustih granula [32].

Aktivacija trombocita pomoću ADP odvija se preko P2Y₁ i P2Y₁₂ receptora koji pripadaju grupi G protein-kuplovanih receptora. Prenos signala obuhvata povećanje koncentracije jona kalcijuma koje se dešava kao posledica vezivanja ADP za P2Y₁ receptore, što vodi promeni oblika trombocita i njihovoj brzom reverzibilnoj agregaciji [37].

Vezivanje ADP za P2Y₁₂ receptore dovodi do inhibicije adenilat ciklaze i smanjenja koncentracije unutarćelijskog cikličnog adenzin monofosfata (cAMP), što za posledicu ima međusobnu agregaciju trombocita [38]. Aktivirani P2Y₁₂ receptori preko fosfoinozimid-3 kinaznog puta vode aktivaciji receptora GPIIb/IIIa. Aktivacija GPIIb/IIIa receptora dovodi do njegove konformacione promene, tj. izlaganja vezujućeg mesta za fibrinogen na ovom receptoru. Za normalnu agregaciju trombocita neophodna je aktivacija obe vrste P2Y receptora [37].

ADP-indukovana agregacija trombocita osim važne uloge u održavanju normalne hemostaze ima važan uticaj u patofiziološkim procesima kao što su srčana ishemija, moždani udar i ateroskleroza [39]. Kako P2Y₁₂ receptori imaju centralnu ulogu u agregaciji trombocita, ovaj receptor predstavlja ciljni molekul za antiagregacionu terapiju [37].

1.4 Dvojna antiagregaciona terapija

Dvojna antiagregaciona terapija (eng. *Dual Antiplatelet Therapy*) podrazumeva upotrebu aspirina i nekog od inhibitora trombocitnih P2Y₁₂ receptora, i primenuje se sa ciljem da se kod pacijenata smanji rizik za nastanak ishemijskih događaja i tromboembolijskih komplikacija. Ovakva vrsta terapije je indikovana kod pacijenata sa koronarnom arterijskom bolešću kao i perifernom arterijskom bolešću. Kliničke studije su pokazale da dvojna terapija aspirinom i klopidogetrom dovodi do najvećeg smanjenja potrebe za revaskularizacijom, smanjenja učestalosti reinfarkta, moždanog udara, kao i smanjenja smrtnosti od kardiovaskularnih uzroka kod pacijenata sa ACS [40]. Ovakva vrsta terapije je neizostavna kod pacijenata koji su preživeli infarkt miokarda i bili podvrgnuti PCI, kao i kod pacijenata nakon CAS i CEA [25, 41]. Trajanje DAPT se razlikuje od dijagnoze i procedure kojoj su pacijenti bili podvrgnuti [25, 42, 43].

Aspirin putem acetilacije ireverzibilno inhibira enzim ciklooksigenazu 1 (COX1). To dovodi do inhibicije transformacije arahidonske kiseline (AA) u prostaglandine (G₂/H₂), a na taj način i do odsustva tromboksana A₂ (TXA₂) koji je potentni medijator aktivacije i agregacije trombocita [44]. Učestalost pacijenata koji su rezistentni na aspirin varira u zavisnosti od testa koji se koristi za procenu odgovora na terapiju, a preklapanjem rezultata ovih testova procenjuje se na oko 2% [45].

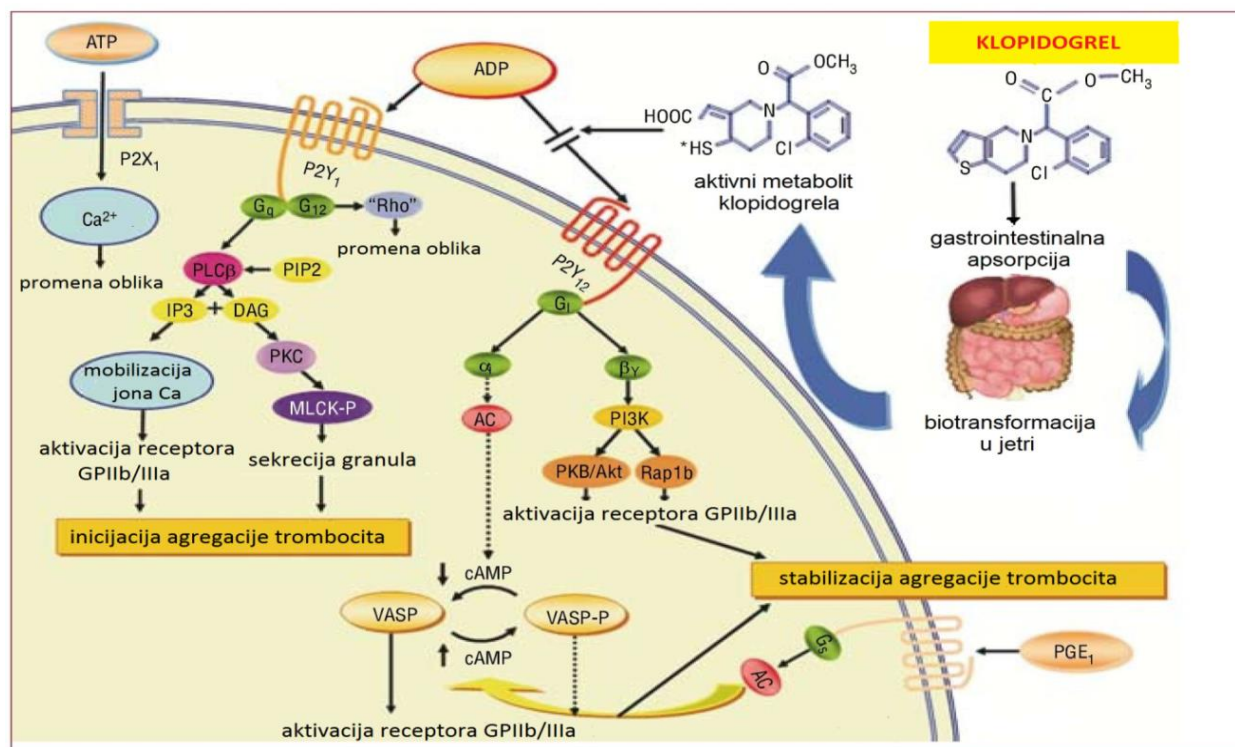
Inhibitori P2Y₁₂ receptora

Receptori P2Y₁₂, su G kuplovani proteini na površini trombocita i njihova interakcija sa ADP je neophodna za procese aktivacije i agregacije trombocita. Zbog izuzetne važnosti ovih procesa u patogenezi i lečenju kardiovaskularnih bolesti, do sada je razvijen veliki broj farmakoterapeutika koji svoje dejstvo ostvaruju preko inhibicije P2Y₁₂ receptora. Među ovom grupom lekova najviše korišćen je klopidogetrel, koji se u okviru dualne antiagregacione terapije, zajedno sa aspirinom, primenjuje više od 20 godina i za to vreme je postao jedan od najčešće prepisivanih lekova [41, 46, 47].

Klopidogetrel

Klopidogetrel je prolek druge generacije tienopiridina, koji svoje inhibitorno dejstvo na agregaciju trombocita može da izvrši tek nakon aktivacije u jetri. Aktivni metabolit preko svoje tiolne grupe formira disulfidni most sa cisteinskim ostatkom (Cys98) na receptorima P2Y₁₂ i na

taj način ireverzibilno onemogućava vezivanje ADP i aktivaciju ovih receptora [48]. Ovo dovodi do povećanja količine cAMP, smanjene aktivacije GPIIb/IIIa receptora i odsustva agregacije trombocita [49] (Slika 2). Utvrđivanjem strukture aktivnog metabolita klopidogrela pokazano je da samo jedan od osam mogućih stereoizomera aktivnog metabolita ima antitrombotičnu ulogu [50, 51].

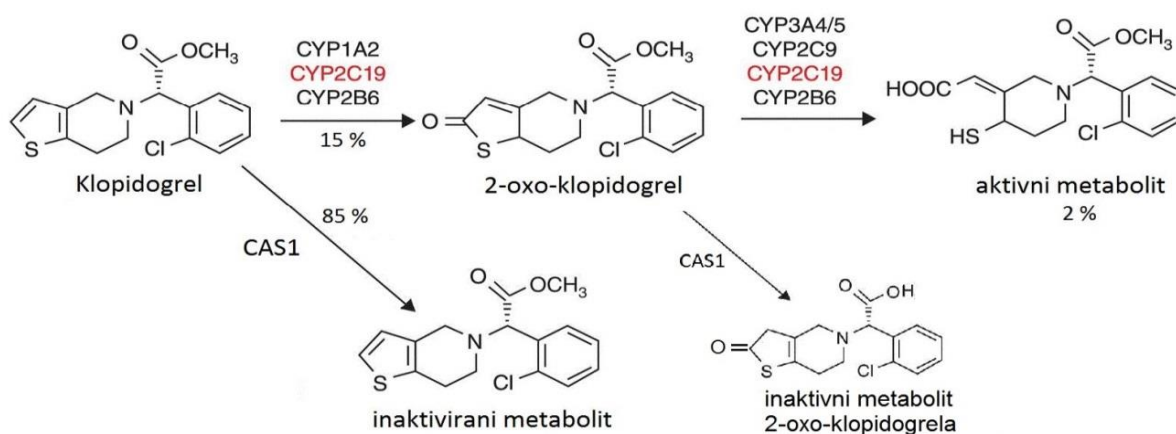


Slika 2 Mehanizam delovanja klopidigrela i purinerški receptori trombocita. PLC-fosfolipaza C; DAG-diacilglicerol; PIP2-fosfatidilinozitol difosfat; IP3-inozitol tri fosfat; PKC-protein kinaza C; MLCK-P-kinaza lakog lanca miozina; α_i i β_γ -subjedinice Gi proteina; AC-adenilat ciklaza; cAMP-ciklični adenzin trifosfat; VASP-vazodilatator-stimulišući protein; VASP-P-fosforilisani vazodilatator-stimulišući protein; GPIIb/IIIa-glikoprotein IIb/IIIa kompleks; PKB/AKT-serin-treoninska protein kinaza B; Rab1-GTP vezujući protein; PGE1-prostaglandin E1; pune strelice označavaju aktivaciju, a isprekidane inhibiciju određenog signala. Preuzeto i modifikovano iz Angiolillo i sar., 2007. [52].

Klopidogrel je indikovano kod pacijenata nakon akutnog infarkta miokarda, ishemijskog moždanog udara i tranzijentnog ishemijskog napada [53, 54]. Kod pacijenata sa stabilnom ili nestabilnom anginom pectoris, perifernom arterijskom okluzivnom bolešću i atrijalnom fibrilacijom, može značajno smanjiti rizik od neželjenih cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih događaja [55-57].

U sekundarnoj prevenciji, klopidogrel se primenjuje u dozi od 75 mg dnevno, što je doza kojom se stabilan efekat postiže u roku od 5-6 dana [58]. Prilikom PCI primenjuje se udarna doza klopidogrela, najčešće 300-600 mg neposredno pre intervencije, čime se postiže maksimalni učinak u roku od 3-5 sati [59]. Zbog ireverzibilne inhibicije P2Y₁₂ receptora, efekat klopidogrela je prisutan tokom celog životnog veka trombocita (oko 10 dana). Oporavak ćelija se očekuje u periodu od 3 do 5 dana, odnosno trombociti postaju potpuno funkcionalni oko 7 dana nakon poslednje uzete doze leka [60].

Nakon oralne primene, klopidogrel se apsorbuje u tankom crevu, a aktivacija se odigrava u jetri [61]. Nakon apsorpcije više od 85% klopidogrela se odmah prevodi u inaktivni oblik pomoću karboksijesteraze 1 (CES1) [62], a ostatak se metaboliše do 2-oxo-klopidogrela od koga se jedan deo takođe inaktivira hidrolizom, a drugi prevodi u aktivni tiolni metabolit [50]. Aktivacija klopidogrela kroz ova dva koraka odvija se pomoću enzima iz citohrom P450 superfamilije. U prvom koraku učestvuju enzimi CYP2C19, CYP1A2 i CYP2B6 i svaki od njih je odgovoran za konverziju 45%, 36% i 19%, redom. Drugi korak aktivacije odvija se posredstvom enzima CYP3A4 (40%), CYP2B6 (33%), CYP2C19 (21%) i CYP2C9 (7%) [63] (Slika 3). Eliminacija klopidogrela iz organizma se odvija preko urina (40%) ili putem fecesa (40-60%) [64].



Slika 3 Metabolizam klopidogrela. Crvenom bojom označen je gen *CYP2C19* izučavan u okviru ovog istraživanja. Preuzeto i modifikovano iz Farid i sar. (2010) [65].

Problemi u terapiji klopidogrelom

Klopidogrel pored pokazanog kliničkog značaja ima i nekoliko veoma važnih nedostataka. Jedno od njegovih ograničenja predstavlja ireverzibilna inhibicija trombocita, koja značajno povećava rizik od krvarenja kod pacijenata kojima je potreban hitan hirurški zahvat a nisu bili u mogućnosti da prekinu terapiju klopidogrelom 5-7 dana pre zahvata. Dalje, kao prolek klopidogrel zahteva metaboličku aktivaciju, što dovodi do odlaganja antitrombocitnog efekta koji je od presudnog značaja za pacijente koji moraju da budu podvrgnuti urgentnoj kateterizaciji.

Poseban problem u terapiji klopidogrelom predstavlja postojanje velikih interindividualnih razlika u terapijskim efektima. Osim pacijenata koji imaju željeni efekat (sprečavanje ishemijskih događaja), postoje i pacijenti kod kojih klopidogrel ima oslabljen efekat, što za posledicu ima povišen rizik od pojave ishemijskih događaja [66-69]. Zavisno od oboljenja i metode za određivanje odgovora na klopidogrel, procenat pacijenata koji imaju oslabljen odgovor na lek iznosi 5-44% [70]. Sa druge strane, deo pacijenata ispoljava pojačan odgovor na klopidogrel (oko 9%), što ih izlaže povišenom riziku od krvarenja. Krvareći događaji, sami po sebi, mogu biti životno ugrožavajući i dovesti do fatalnog ishoda. Sekundarno, krvarenje može biti povezano i sa povećanim rizikom od pojave ishemijskih događaja [71-75].

Procena i klasifikacija krvarećih događaja može se izvršiti na osnovu nekoliko različitih kriterijuma. TIMI kriterijumi (eng. *Thrombolysis in Myocardial Infarction bleeding criteria*) su do skoro bili najčešće korišćeni kriterijumi za klasifikaciju pacijenata u kardiovaskularnim studijama [76]. GUSTO kriterijumi (eng. *Global Use of Strategies to Open Occluded Arteries*) su, takođe, korišćeni u brojnim kliničkim studijama u protekle dve decenije [76]. BARC kriterijumi predstavljaju najnovije i standardizovane kriterijume, ustanovljene od strane Akademskog konzorcijuma za istraživanje krvarenja (eng. *Bleeding Academic Research Consortium-BARC*) [76].

Farmakološke zamene za klopidogrel

Sa ciljem da se prevaziđu nedostaci klopidogrela razvijene su nove generacije inhibitora P2Y₁₂ receptora, među kojima su prasugrel [77-79], tikagrelor [80, 81], kangrelor [77], elinogrel [82]. Novi farmakoterapeutici prevazilaze nedostatke klopidogrela u pogledu smanjenja

interindividualne varijabilnosti u odgovoru na terapiju, brzine delovanja, potrebe za aktivacijom, ali i dalje nisu postali adekvatna zamena za klopidogrel. Za neke od njih je pokazano da značajno povećavaju rizik od krvarenja u odnosu na klopidogrel, a pojedini još uvek nisu dovoljno ispitani u pogledu efikasnosti i pojave neželjenih efekata [77, 78, 82]. Dodatno, jedan od važnih faktora je ekonomski aspekt primene antiagregacionih lekova nove generacije koji su znatno skuplji od klopidogrela [83].

1.5 Genetički faktori koji utiču na terapiju klopidogrelom

Pored negenetičkih faktora kao što su godine starosti, indeks telesne mase, pušenje, dijabetes, bubrežna insuficijencija, oboljenja jetre, broj i stanje trombocita i upotreba drugih lekova [52, 84], na terapiju klopidogrelom utiču i genetički faktori. U okviru farmakogenetičkih istraživanja najčešće izučavani geni su:

ABCB1 koji se eksprimira u enterocitima [85] i kodira P glikoprotein odgovoran za apsorpciju klopidogrela i mnogih drugih lekova [64, 86];

CES1 koji kodira karboksiesterazu 1, enzim odgovoran za inaktivaciju klopidogrela i njegovih metabolita [62, 87, 88];

PON1 koji kodira enzim paraoksigenazu 1 i ima ulogu u prevođenju 2 oxo-klopidogrela u aktivan metabolit [89, 90];

P2Y12 koji kodira receptor $P2Y_{12}$ na trombocitima koji predstavlja farmakološku metu klopidogrela [59];

CYP2C19 koji kodira enzim CYP2C19, najznačajniji za biotransformaciju klopidogrela u aktivnu formu koja ima antiagregacioni efekat [59].

CYP2C19

Enzim CYP2C19 ima najveći udeo u procesu bioaktivacije klopidogrela u jetri. U prvom koraku on doprinosi sa 45% u stvaranju 2-oxo-klopidogrela. U drugom koraku, tokom kojeg nastaje aktivni metabolit, odgovoran je za 21% konverzije. Ovaj enzim se sastoji od 490 aminokiselina i kodiran je od strane gena *CYP2C19* koji se nalazi na hromozomu 10. Primarna biološka funkcija enzima CYP2C19 je učešće u metabolizmu ksenobiotika i endogenih steroidnih hormona [91].

Gen za CYP2C19 je najpolimorfiji gen u okviru podfamilije CYP2C [92] i do sada je u njemu detektovano preko 2000 pojedinačnih nukleotidnih zamena, a u bazi podataka sa varijantama detektovanim u genima iz citohrom P450 superfamilije prijavljeno je preko 35 haplotipova (Prilog A) [93]. Brojna istraživanja pokazuju da neke od detektovanih varijanti utiču na farmakokinetiku, farmakodinamiku, efikasnost i pojavu neželjenih događaja kod pacijenata na terapiji klopidogetrelom [94-97]. Funkcija najvećeg broja varijanti nije ispitana, ali je za varijante rs4244285, rs4986893, rs28399504, rs56337013, rs72552267, rs72558186, rs41291156 koje pripadaju sledećim haplotipovima CYP2C19*2, *3, *4, *5, *6, *7, *8 redom, pokazano da dovode do sinteze nefunkcionalnog enzima [98].

Varijanta rs28399504 (c.1A>G, CYP2C19*4), dovodi do promene u start kodonu ATG→GTG i remeti translaciju iRNK [99]. Varijanta rs56337013 (c.1297C>T, CYP2C19*5) dovodi do zamene arginina na poziciji 433 triptofanom, što narušava mesto vezivanja hem grupe i na taj način i aktivnost enzima prema određenim supstratima [100]. Varijanta rs72552267 (c.395G>A, CYP2C19*6) nalazi se u okviru egzona 3 i dovodi do zamena arginina u glutamin na poziciji 132, što narušava katalitičku aktivnost enzima [101]. Varijanta rs72558186 (c.819+2T>A, CYP2C19*7) narušava mesto iskrajanja introna 5 [102]. Varijanta rs41291156 (c.358T>C, CYP2C19*8) locirana je u egzonu 3 i dovodi do zamene triptofana argininom na poziciji 120, što snižava enzimsku aktivnost čak za 90% [102]. Kako manje učestali aleli pomenutih varijanti (CYP2C19*4-*8) vode nedostatku funkcionalnog enzima njihovi nosioci se svrstavaju u osobe sa oslabljenim metabolizmom CYP2C19 supstrata (PM). Ovi aleli imaju učestalost nižu od 1% tako da je njihova klinička uloga vrlo mala [98, 103] i nema studija o njihovom pojedinačnom uticaju na ADP-indukovanu agregaciju trombocita.

Od posebnog kliničkog značaja su varijante rs4244285 (c.681G>A; CYP2C19*2) i rs4986893 (c.636G>A; CYP2C19*3), koje su povezane sa oslabljenim odgovorom na klopidogetrel, povećanim rizikom od tromboze stenta, ponovnog MI i smrti kod kardiovaskularnih bolesnika koji su na terapiji klopidogetrelom [94, 104]. Varijanta rs12248560 (c.-806 C>T; CYP2C19*17) se dovodi u vezu sa povišenim stepenom inhibicije trombocita i povišenim rizikom od krvarenja kod pacijenata na terapiji klopidogetrelom [105-107]. Studije pokazuju da postoji i značajna razlika u distribuciji alela pomenutih varijanti u različitim populacijama [108-110].

Varijanta rs4244285 (c.681G>A, *CYP2C19*2*) se nalazi u egzonu 5, i dovodi do narušavanja mesta iskrajanja introna i do nastanka nefunkcionalnog enzima [111]. Učestalost nefunkcionalnog alela kod belaca iznosi 10-20%, a kod kod azijata 25-35%. Varijanta rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*) je locirana u egzonu 4 i vodi formiranju prevremenog stop kodona, tako da homozigotni nosioci ove varijante nemaju funkcionalan enzim *CYP2C19* [112]. Učestalost nefunkcionalnog alela varijante *CYP2C19*3* niža je od 1% kod belaca, a u azijskim populacijama može iznositi čak 4 do 13%. Varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) se nalazi u regionu promotora i studije su pokazale da dovodi do povećanja transkripcije gena [105, 113]. Učestalost ređeg alela T kod belaca iznosi 20-30%, dok je kod azijata značajno niža i iznosi 0-4%.

Prema podacima o diplotipu (kombinaciji dva haplotipa) *CYP2C19* gena, Konzorcijum za implementaciju kliničke farmakogenetike (eng. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium-CPIC*) dao je podelu osoba prema kapacitetu za metabolizam klopidogrela koja je prikazana u Tabeli 1 [114].

Tabela 1 Klasifikacija metabolizma klopidogrela prema *CYP2C19* diplotipu.

| Metabolizam klopidogrela | Diplo-tip |
|--------------------------|---------------------|
| ultra brz (UM) | *17/*17, *1/*17 |
| ekstenzivan (EM) | *1/*1 |
| intermedijeran (IM) | *1/*2-*8, *17/*2-*8 |
| oslabljen (PM) | *2-*8//*2-*8 |

UM- eng. *ultrarapid metabolizer*, EM- eng. *extensive metabolizer*,
IM- eng. *intemediate metabolizer*, PM- eng. *poor metabolizer*

Studije koje su pratile uticaj varijante rs4244285 (c.681G>A, *CYP2C19*2*) na nivo aktivnog metaboita klopidogrela kao i na ADP-indukovanu agregaciju trombocita kod zdravih volontera pokazale su da nosioci alela A imaju značajno smanjenu količinu aktivnog metabolita kao i smanjenu inhibiciju agregacije trombocita u odnosu na osobe koje nisu nosioci ovog alela [4, 115-119]. To je pokazano i kod pacijenata sa različitim kardiovaskularnim i cerebrovaskularnim poremećajima [106, 120-122]. Velika klinička studija GRAVITAS-GIFT [123] pokazala je da je alel A varijante *CYP2C19*2* povezan sa povećanom reaktivnošću trombocita kod pacijenata na terapiji klopidogrelom nakon PCI, i to nezavisno od doze leka. Dve velike

kliničke studije TRITON-TIMI 38 i PLATO su pokazale da pacijenti sa akutnim koronarnim sindromom koji su nosioci alela A imaju značajno povećan rizik od srčane smrti, infarkta miokarda i moždanog udara u odnosu na osobe koje nisu nosioci ovog alela [79, 103]. Kod pacijenata sa akutnim tranzitornim ishemijskim napadom pokazano je da pacijenti na DAPT koji su nosioci nefunkcionalnog alela varijante *CYP2C19*2* ili *CYP2C19*3* imaju 1,5 puta veći rizik od moždanog udara i kompozitnog ishoda (ishemijski, hemoragijski šlog, MI i vaskularna smrt) [124]. Zhu i saradnici ispitivali su povezanost ove dve varijante sa efikasnošću klopidozrela kod pacijenata podvrgnutih CAS, i zaključili da nosioci nefunkcionalnih alela neke od ovih varijanti imaju 2,2 puta veći rizik od ishemijskih događaja nego oni koji nisu nosioci. Takođe, pokazali su da, dugoročno gledano, homozigotni nosioci nefunkcionalnog alela imaju čak 6,2 puta veći rizik od ishemijskih događaja u odnosu na heterozigotne nosioce [125].

Međutim, neke kliničke studije nisu našle vezu između genotipa *CYP2C19* i neželjenih događaja kod pacijenata lečenih klopidozrelom. Klinička studija CURE [126] pokazala je da ne postoji razlika u učestalosti ishemijskih događaja između pacijenata koji prema *CYP2C19* genotipu oslabljeno, intermedijerno ili brzo metabolišu klopidozrel i onih koji su primali placebo. U studiji CHARISMA [127] kojom su bili obuhvaćeni pacijenti sa aterotrombotskom bolešću, a na terapiji aspirinom i klopidozrelom ili aspirinom i placebo, pokazano je da nefunkcionalni aleli *CYP2C19*2* i **3* nisu povezani sa ishemijskim događajima, već imaju protektivan efekat od krvarenja. Kao razlog diskrepance sa studijama koje su pokazale vezu između *CYP2C19* genotipa i ishemijskih događaja, autori navode razliku u lečenju pacijenata. Naime, većina studija koja je pokazala povezanost *CYP2C19* varijanti i kliničkih shoda bavila se pacijentima sa akutnim koronarnim sindromom koji su podvrgnuti PCI za razliku od pacijenata u CHARISMA studiji [127]. U PEGASUS-PCI studiji [128] koja je uključivala pacijente podvrgnute PCI, pokazano je da varijanta *CYP2C19*2* nije povezana sa trombozom stenta, a da homozigotni nosioci T alela varijante *CYP2C19*17* imaju veći rizik od krvarenja nego heterozigotni nosioci ili homozigoti *wt* alela ove varijante. Autori takođe zaključuju da je ADP-indukovana agregacija bolji prognostički faktor neželjenih događaja od *CYP2C19* genotipa [128].

Sistematska meta-analiza Hulot i saradnika pokazala je da nosioci alela A varijante *CYP2C19*2* imaju 30% veći rizik od glavnih neželjenih kardiovaskularnih događaja, smrtnosti i

tromboze stenta u poređenju sa homozigotima za *wt* alel i to nezavisno od osnovnog kardiovaskularnog rizika [129]. Na osnovu rezultata ove i ostalih studija, Američka agencija za hranu i lekove (US FDA), u martu 2010. godine, odobrava upozorenje na pakovanju klopidogrela, kojim se informišu lekari i pacijenti da je efikasnost leka smanjena kod pacijenata koji prema *CYP2C19* genotipu imaju oslabljen metabolizmom klopidogrela (PM). U upozorenju se preporučuje genotipizacija varijanti *CYP2C19*2* i *CYP2C19*3*, jer one obuhvataju 85% i 99% pacijenata sa oslabljenim metabolizmom kod belaca odnosno azijata, a lekarima se savetuje da kod ovih pacijenata ili uvedu drugi antiagregacioni lek ili prilagode dozu klopidogrela [130]. Iste godine udruženja ACCF i AHA izražavaju neslaganje sa predlogom FDA o rutinskoj genotipizaciji ističući nedovoljno ispitanu vezu ovih varijanti sa kliničkim ishodima, mali uticaj na procenat varijabilnosti u odgovoru na klopidogrel kao i povećan rizik od krvarenja primenom zamena za klopidogrel. Alternativno, udruženja ACCF i AHA savetuju praćenje instrukcija koje postoje od ranije, s tim što kod pacijenata sa visokim rizikom od neželjenih događaja savetuju razmatranje genetičkog testiranja, i promenu leka, odnosno povećanje doze klopidogrela kod pacijenata sa oslabljenim metabolizmom [131, 132]. Konzorcijum za implementaciju kliničke farmakogenetike 2011. godine objavljuje instrukcije u kojima preporučuje genotipizaciju varijanti *CYP2C19*2* i *CYP2C19*17* kod ACS/PCI pacijenata, kao i primenu terapije prasugrelom kod PM [133]. Dve godine kasnije Konzorcijum objavljuje dopunu u kojoj na listu varijanti za genotipizaciju dodaje varijantu *CYP2C19*3*, a za pacijente koji su PM dodaje i tikagrelor kao moguću terapiju [114].

Za varijantu rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) pokazano je da ređi alel T vodi povećanoj ekspresiji i aktivnosti enzima i to preko stvaranja vezivnog mesta za transkripcioni faktor iz familije GATA [113, 134]. Studije su pokazale da nosioci alela T na terapiji omeprazolom i mefenitoinom koji su supstrati enzima *CYP2C19* imaju brži metabolizam ovih lekova od *wt* pacijenata [113, 135]. Neke studije su pokazale da je alel T povezan sa povećanom inhibicijom agregacije trombocita kod pacijenata na terapiji klopidogrelom [118, 136], da ima protektivni efekat od velikih neželjenih kardiovaskularnih događaja [137], ali da povećava rizik od krvarenja [105, 107, 138]. Međutim, brojne su studije u kojima nije nađena povezanost varijante *CYP2C19*17* sa ADP-indukvanom agregacijom, kao ni sa neželjenim kliničkim ishodima (TIA, MI, moždani udar, smrt) [139-142].

Kako su se varijante u okviru gena *CYP2C19* pokazale kao klinički važne, veliki broj istraživanja usmeren je na analizu ekspresije gena. Različite prediktivne analize pokazale u postojanje velikog broja mesta za vezivanje transkripcionih faktora u okviru promotorskog regiona gena *CYP2C19*. Međutim, do sada je eksperimentalno potvrđeno samo vezivanje ligand aktivirajućih jedarnih receptora ER α (*NR3A1*) [143], CAR (*NR1I3*) i GR (*NR3C1*) [144], kao i transkripcionih faktora HNF3 γ (*FOXA3*) [145] i GATA-4 [146] (Slika 4).



Slika 4 Šematski prikaz transkripcionih faktora i njihovih mesta vezivanja u okviru promotorskog regiona gena *CYP2C19*. CAR- konstitutivni receptor androgena; GR-glukokortikoidni receptor; FOXA3- eng. *Forkhead Box A3* transkripcioni faktor; GATA-4 član familije transkripcionih faktora koja se veže za (A/T)GATA(A/G) DNK sekvencu; ER α -estrogeni receptor alfa. Preuzeto iz Helsby i sar. 2012 [147].

Faktori koji *in trans* regulišu ekspresiju gena *CYP2C19* su retko istraživani, malo se zna o epigenetičkoj regulaciji njegove ekspresije, a CpG ostrvca u okviru ovog gena se ne nalaze u promotorskom regionu. Takođe, neke studije su pokazale da postoje potencijalna mesta za vezivanje pojedinih miRNK u 3' netranslatirajućem regionu ovog gena [147].

1.6 Metode za praćenje ADP-zavisne agregacije trombocita

U poslednjih par decenija intenzivno su se razvijale metode za praćenje odgovora pacijenata na terapiju antiagregacionim lekovima kako bi se mogli odrediti oni pacijenti koji imaju oslabljen/pojačan odgovor na terapiju, a time i povećan rizik od trombotičkih odnosno krvarećih događaja. Najšire korišćene metode za praćenje efekta antitrombocitnih lekova, a na prvom mestu klopidozola i aspirina, su LTA (eng. *Light transmission platelet aggregometry*), Multipla elektrodna agregometrija, VASP fosforilacioni esej, Verify Now esej i Plateletworks sistem [148, 149].

LTA (eng. *Light transmission platelet aggregometry*) podrazumeva korišćenje krvne plazme bogate trombocitima (eng. *platelet rich plasma*, PRP) i još uvek predstavlja zlatni standard za praćenje različitih funkcija trombocita. Ova metoda daje informaciju o međusobnom slepljivanju trombocita zavisnom od GPIIb/IIIa puta. Ograničenja LTA metode odnose se na neophodnost preanalitičkog centrifugiranja pune krvi, nije ni standardizovana za procenu visoke reaktivnosti trombocita i postoji varijabilnost u primeni agonista i njihovih koncentracija, kao i određivanja graničnih vrednosti [150, 151].

Multipla elektrodna agregometrija (eng. *Multiple electrode aggregometry*-MEA) [152, 153] Multiplate® omogućava praćenje aktivacije trombocita pomoću pet različitih agonista: ADP, arahidonska kiselina, kolagen, ristocetin, TRAP-6. Dodatno za specifičnije praćenje inhibicije P2Y₁₂ receptora koristi se test koji pored ADP sadrži i prostaglandin E1 (PGE₁) koji eliminiše nespecifično vezivanje ADP za P2Y₁ receptore [154].

Prednost ove metode je što se za analizu koristi puna krv i agregacija trombocita se odigrava najbližije *in vivo* uslovima [155]. Ova metoda ima visoku senzitivnost za procenu efekta aspirina, klopidogrela i GPIIb/IIIa inhibitora, a pokazala se kao uspešna u proceni rezistencije na klopidogrel, rizika za neželjene kardiovaskularne događaje kao i identifikaciju pacijenata sa povećanim rizikom od krvarenja. Procenjuje se da će MEA zameniti LTA, postajući zlatni standard [156, 157].

VASP fosforilacioni esej zasnovan je na protočnoj citometriji. Ovom metodom moguće je detektovanje cirkulišućih aktiviranih trombocita i praćenje njihove aktivacije *in vitro*. Esej prati fluorescentno obeleženi, protein VASP (eng. *Vasodilator stimulated protein*) čija fosforilacija zavisi od aktivacije P2Y₁₂ receptora [158]. Stepem fosforilacije VASP odražava inhibirane P2Y₁₂ receptore. Rezultat se prikazuje kao indeks reaktivnosti trombocita na ADP (eng. *Platelet reactivity index*, PRI VASP) i može biti od 0-100% gde manji procenat podrazumeva veću inhibiciju P2Y₁₂ receptora [159].

Verify Now esej se bazira na kapacitetu aktiviranih trombocita da se vežu za fibrinogenom obložene kuglice, što je direktno proporcionalno broju aktiviranih GPIIb/IIIa receptora [160]. Ovaj sistem je veoma brz i široko korišćen u kliničkoj praksi. Rezultati testa

izražavaju se u PRU jedinicama (eng. *P2Y₁₂ Reactivity Units*), a moguće je izračunati i procenat inhibicije trombocita [161].

Plateletworks sistem meri finalni stupanj adhezije, aktivacije i agregacije trombocita i pogodan je za rutinsku kliničku upotrebu. U eseju se računa broj trombocita pre i posle izlaganja nekom od agonista trombocita. Razlika u broju trombocita nakon drugog merenja daje informaciju o broju aktiviranih trombocita, a na osnovu oba merenja može se izračunati procenat i stepen inhibicije agregacije [162]. Ova metoda se pokazala kao dobra za brojanje i opštu funkciju trombocita, a njen kapacitet za predviđanje kliničkih ishoda se i dalje razmatra [163].

Sve pomenute metode imaju određene prednosti i ograničenja. Neke od metoda su brze i jeftine, druge zahtevaju specijalizovanu opremu i visoko obučeno osoblje; takođe neke od njih su senzitivne na paralelnu upotrebu različitih medikamanata što je čest slučaj u kardiovaskularnih pacijenata. Međutim, najveći izazov u klasifikaciji pacijenata prema odgovoru na terapiju klopidogrelom predstavlja varijabilan stepen korelacije između različitih metoda pa je procena odgovora na lek test-specifična [164, 165]. U zavisnosti od metode i primenjenih graničnih vrednosti, učestalost pojave rezistencije na antitrombocitnu terapiju, kao i učestalost pojačanog delovanja antiagregacionih lekova, razlikuje se od studije do studije [105, 149, 166, 167]. Ova varijabilnost može se delom objasniti i različitim dizajnom studija. Takođe, jedan od problema, koji se javlja tokom interpretacije rezultata merenja primenom jedne određene metode, je nedostatak podataka o graničnim vrednostima koje su definisane za pojedine kategorije pacijenata. Tako najveći broj podataka postoji za kardiološke pacijente, a posebno one koji su doživeli infarkt miokarda i bili podvrgnuti PCI. Sa druge strane literatura je veoma oskudna podacima o ADP zavisnoj agregaciji i odgovoru na klopidogrel pacijenata sa cerebrovaskularnim oboljenjima [168]. Ekstrapolacija podataka na različite kategorije pacijenata, nije dobar pristup sa obzirom da specifičnosti patofiziološke osnove svake bolesti i tip medicinskog tretmana kome su pacijenti podvrgnuti mogu uticati na konačne ishode lečenja [169].

Sve navedeno ukazuje na potrebu za dodatnim pristupima koji bi samostalno, ili komplementarno sa postojećim metodama, dali bolje mogućnosti za planiranje i primenu antiagregacione terapije klopigidrelom. Velike mogućnosti na tom polju pruža farmakogenetika.

Ciljevi

Enzim CYP2C19 igra najznačajniju ulogu u prevođenju klopidogrela u njegovu aktivnu formu koja ima antiagregacioni efekat. U genu *CYP2C19* opisan je veliki broj pojedinačnih nukleotidnih varijanti, od kojih neke imaju značajnog uticaja na aktivnost enzima i efikasnost antiagregacione terapije klopidogrelom. Najveći broj studija bavi se oslabljenim odgovorom na klopidogrel koji pacijente dovodi u visok rizik od pojave ishemijskih događaja, a značajno manja pažnja posvećena je istraživanju pojačanog odgovora na klopidogrel, koji vodi povećanom riziku od krvarenja. Zbog toga su za istraživanje, u ovoj studiji, odabrane promotorske varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) za koje su literaturni podaci i naši preliminarni rezultati pokazali da mogu biti povezane sa pojačanim odgovorom na klopidogrel.

Ciljevi ove studije bili su:

1. Ispitivanje povezanosti varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) sa krvarenjem, kod pacijenata koji su doživeli infarkt miokarda sa ST elevacijom i bili podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji i terapiji aspirinom i klopidogrelom.
2. Ispitivanje povezanosti promotorskih varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) sa ADP-indukovanom agregacijom trombocita kod pacijenata sa stenozom karotide koji su podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji i bili dvojnoj terapiji aspirinom i klopidogrelom.
3. Ispitivanje mehanizma delovanja varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) na aktivnost promotora gena *CYP2C19* u *in vitro* uslovima.
4. Procena primenljivosti ispitivanih promotorskih varijanti gena *CYP2C19* kao genetičkih faktora za procenu rizika od smanjene agregabilnosti trombocita i krvarenja kod pacijenata na terapiji klopidogrelom.
5. Procena isplativosti farmakogenetički vođene terapije klopidogrelom pacijenata u Srbiji.
6. Analiza učestalosti alela ispitivanih varijanti u populaciji pacijenata iz Srbije.

Materijal i metode

3.1 Ispitanici

U ovu studiju bilo je uključeno ukupno 216 pacijenata koji su bili na terapiji klopidogrelom. Pacijenti su pripadali dvema nezavisnim grupama kod kojih je bila indikovana primena klopidogrela. Prvu grupu činilo je 108 pacijenata koji su imali infarkt miokarda sa ST elevacijom (STEMI) i koji su zbog toga bili podvrgnuti PCI. Drugu grupu činilo je 108 pacijenata sa stenozom karotidnih arterija koji su bili podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji. Za obe pomenute intervencije indikovana je primena dvojne antiagregacione terapije, koja je podrazumevala aspirin i klopidogrel.

3.1.1 Pacijenti sa infarktom miokarda sa ST elevacijom (STEMI) podvrgnuti primarnoj perkutanoj intervenciji

Prvu grupu pacijenata inicijalno je činio 121 pacijent odabran iz grupe od 1059 STEMI pacijenata koji su podvrgnuti primarnoj PCI između juna 2010. i aprila 2011. godine na Klinici za kardiologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. U studiju su uključeni pacijenti za koje su postojali podaci predstavljeni u Tabeli 2 i koji su dali saglasnost za učestvovanje u studiji.

Tabela 2 Grupe podataka prikupljenih o pacijenatima.

| | |
|-----------------------------|--|
| Opšte karakteristike | pol, starost, telesna težina, telesna visina |
| Prethodna oboljenja | dijabetes melitus, hipertenzija, hipoholesterolemija, prethodni infarkt miokarda, prethodna PCI, prethodna aortno-karotidna premošćavanja, prethodni moždani udar |
| Kliničko stanje pri prijemu | prisustvo kardiogenog šoka, vrednost ejeckione frakcije, vrednost kreatinina u serumu, prisustvo anemije, broj leukocita i broj trombocita u perifernoj krvi |
| Proceduralne karakteristike | vreme trajanja koronarografije, primena glikoprotein IIb/IIIa inhibitora, heparina, statina, broj implantiranih stentova po pacijentu, ukupna dužina stentova, koronarna arterija zahvaćena infarktnom lezijom |
| Ishod bolesti | reinfarkt, ponovna revaskularizacija ciljne arterije zbog ishemije, smrt |
| Intrahospitalno krvarenje | prema BARC kriterijumu |

PCI- perkutana koronarna intervencija, BARC- eng. *Bleeding Academic Research Consortium*

MATERIJAL I METODE

Svi pacijenti podvrgnuti su hitnoj koronarnoj angiografiji korišćenjem standardnih perkutanih tehnika sa pristupom putem femoralne arterije, posle koje je sledila primarna PCI. Pacijentima je neposredno pred intervenciju dat intravenozni bolus nefrakcionisanog heparina od 100 IU po kilogramu telesne težine ili 50-60 IU/kg ako su paralelno tretirani glikoprotein IIb/IIIa inhibitorom (GPI). Kao GPI inhibitor korišćen je tirofiban kao intravenski bolus u dozi od 10 µg/kg praćen infuzijom od 0.15 µg/kg/min, korigovano za stepen bubrežnog oštećenja. Svi pacijenti su primili početni dozu aspirina od 300 mg oralno, praćenu sa 100-300 mg aspirina dnevno prvih 30 dana nakon intervencije, a zatim 100 mg dnevno kao trajnu terapiju. Početna doza klopidogrela pre ubacivanja katetera bila je 600 mg, a zatim 75 mg dnevno tokom jedne godine. Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije bili su kontraindikacije na terapiju aspirinom ili klopidogrelom, tretman sa GPI tokom 10 dana pre intervencije, kao i porodična istorija krvarenja. Klinički ishodi praćeni kod pacijenata bili su krvarenje tokom hospitalizacije; retromboza stenta, srčani udar, moždani udar i mortalitet praćeni u prvih 30 dana i u toku prve godine nakon intervencije. Informacije o kliničkim ishodima koji su se odigrali van bolnice prikupljani su na osnovu telefonskih intervjuova sa pacijentima ili članovima njihovih porodica u slučaju smrti pacijenta ili prilikom dolaska pacijenata na ambulantni pregled.

Od ukupno 108 pacijenata koji su ispunjavali uslove za uključivanje u studiju, njih 53 je imalo krvarenje kao komplikaciju nakon PCI, a 55 nije imalo krvarenje i oni su činili kontrolnu grupu. Klasifikacija pacijenata prema krvarenju izvršena je prema BARC kriterijumima (Tabela 3).

Tabela 3 Klasifikacija krvarenja po BARC (eng. *Bleeding Academic Research Consortium*) kriterijumima [76].

| | |
|--------------|--|
| Tip 0 | Bez krvarenja |
| Tip 1 | Malo krvarenje koje ne zahteva intervenciju i zbog koga pacijentu nije potreban pregled, ispitivanje, hospitalizacija ili lečenje. |
| Tip 2 | Svako krvarenje koje ne ispunjava kriterijume krvarenja tipa 3, 4 ili 5, ali ispunjava bar jedan od sledeća tri kriterijuma: <ul style="list-style-type: none"> - Krvarenje koje zahteva nehiruršku medicinsku intervenciju - Krvarenje zbog koga pacijent mora da bude hospitalizovan - Krvarenje zbog koga pacijent mora da bude detaljno nadgledan od strane medicinskog osoblja |
| Tip 3 | a. Vidljivo krvarenje koje dovodi do pada hemoglobina od 3 do <5 g/dL (ukoliko je pad hemoglobin povezan sa krvarenjem); zahteva primenu transfuzije |
| | b. Vidljivo krvarenje koje dovodi do pada hemoglobina ≥ 5 g/dL (ukoliko je pad hemoglobin povezan sa krvarenjem); tamponade srca; krvarenje koje zahteva hiruršku intervenciju; krvarenje koje zahteva primenu vazoaktivnih agenasa |
| | c. Intrakranijalna hemoragija (ne uključuje mikro krvarenja ili hemoragijsku transformaciju, ali uključuje intraspinalno krvarenje); podkategorije potvrđene autopsijom, vizuelizacionim tehnikama ili lumbalnom punkcijom; ili intraokularno krvarenje koje izaziva smetnje sa vidom |
| Tip 4 | Krvarenje povezano sa operacijom premošćenja koronarnih arterija (CABG, eng. <i>Coronary Artery Bypass Grafting</i>) |
| Tip 5 | a. Verovatno fatalno krvarenje, klinički suspektno bez potvrde učinjene autopsijom ili vizuelizacionim tehnikama |
| | b. Potvrđeno fatalno krvarenje, aktivno krvarenje ili potvrđeno autopsijom ili vizuelizacionim tehnikama |

3.1.2 Pacijenti sa stenozom karotidne arterije podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji

Druga grupa pacijenata se inicijalno sastojala od 112 konsekutivnih pacijenata sa stenozom karotidne arterije koji su bili podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji (CEA). Procedura je izvršena u okviru Instituta za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“ u Beogradu u periodu od juna 2012. do oktobra 2013. godine. Step en stenoz e pojedinačnih ili obe karotidne arterije utvrđen je na osnovu nalaza ultrazvučnog pregleda arkografije (MSCT, eng. *Multislice Computed Tomography*) ili kolor dopler ultrasonografije (CDS, eng. *Color Doppler Ultrasonography*) arterije vrata, na osnovu čega je indikovano operativno lečenje. Pacijentima je po prijemu uzeta

kompletna anamneza i obavljen fizikalni pregled. Tokom pregleda uzeti su podaci o polu, starosti, telesnoj visini, telesnoj masi, trenutnoj terapiji, o ranijim operacijama, ostalim patološkim stanjima i definisani su faktori rizika za kardiovaskularne bolesti (hipertenzija, hiperlipidemija, pušenje). Ispitivanja pre hirurške intervencije obuhvatala su analizu krvne slike, osnovnih biohemijskih parametara i osnovnih testova za procenu hemostaze pacijenata. Takođe, 24h pre hirurške intervencije, određena je bazalna vrednost testova za ispitivanje funkcije trombocita.

Pacijenti su na prijemu tretirani sa 75 mg aspirina, a tokom boravka u bolnici nakon procedure, kombinacijom aspirina (100 mg) i klopidogrela (75 mg). Kako bi se pratio efekat terapije klopidogrelom, bolesnicima su uzeti uzorci venske krvi 24h nakon primene prve doze leka, potom sedmog i tridesetog dana od uvođenja terapije radi agregometrijskog testiranja.

Kriterijumi za uključivanje pacijenata u studiju bili su stenoza karotidne arterije veća od 50%, indikovana karotidna endarterektomija i terapija klopidogrelom i aspirinom minimum 30 dana nakon intervencije. Pacijenti sa oboljenjem jetre ili bubrega, dijabetesom, preoperativnim brojem trombocita manjim od $150 \times 10^9/L$, bazalnim vrednostima TRAP-a (TRAP, eng. *Thrombin Receptor Activating Peptide*) ispod 500AU*min i na terapiji dodatnim antitrombocitnim agensima pored aspirina i klopidogrela bili su isključeni iz studije. Nakon selekcije, genetičko testiranje je sprovedeno kod 108 pacijenata koji su podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji.

Klinički ishodi praćeni kod CEA pacijenata bili su moždani udar, tranzijentni ishemijski napad i mortalitet u prvih 30 dana i tokom prve godine nakon intervencije, krvarenje je praćeno prvih 30 dana. Informacije o kliničkim ishodima koji su se odigrali van bolnice prikupljeni su prilikom dolaska pacijenata na ambulantni pregled i na osnovu telefonskih intervjua.

Kao izvor DNK pacijenata u ovoj studiji korišćeni su limfociti periferne krvi. Krv je uzimana sa 3.8% Na-citratom kao antikoagulansom. Izolovana DNK čuvana je na $-20^{\circ}C$.

Ova studija odobrena je strane Etičkog odbora Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (broj odobrenja O-EO-007/2017)

3.2 Materijal

Ćelijske linije

Za analizu funkcije varijante c.-889T>G u promotoru gena *CYP2C19* korišćena je permanentna ćelijska linija Caco-2 (ATCC®HTB-37™). Ova ćelijska linija potiče od kolorektalnog adenokarcinoma poreklom od muškarca starosti 72 godine.

Bakterijski sojevi

Komercijalno dostupni XL10-Gold® (*Agilent Technologies*) soj *E. coli* koji predstavlja ultrakompetentne ćelije korišćen je za reakcije transformacije. Takođe za transformaciju, umnožavanje konstrukata i izolaciju plazmidne DNK, korišćen je DH5α soj *E. coli* kompetentnih ćelija (genotip: *supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1*).

Plazmidni vektori

U studiji su korišćeni sledeći vektori: pGEM®-T Easy vektor sistem (*Promega*), pBluescriptSK (*Stratagene*), ekspresioni vektor pCDNA3.1™ (+) (*Invitrogen*), luciferazni vektori pGL4.10 (*Promega*) i pRL SV40 (*Promega*).

Vektor pGEM-T Easy komercijalno dostupan u vidu pGEM®-T Easy Vector Systems (*Promega*) korišćen je za kloniranje PCR produkata od interesa. Ovaj vektor je u linearizovanoj formi i u okviru multikloning regiona na 3' krajevima sadrži po jedan nesparen dezoksitimidin koji omogućava ligaciju PCR produkata koji imaju nespareni dezoksiadenozin na 3' krajevima. Nakon ligacije postoji veliki broj enzima koji se mogu koristiti da bi se uklonirani fragment subklonirao u drugi željeni vektor. Usled inaktivacije gena za β-galaktozidazu pGEM-T Easy vektor omogućava direktnu identifikaciju rekombinantnih klonova na osnovu plavo-bele selekcije.

Vektor pBluescriptSK je komercijalno dostupan vektor za kloniranje koji sadrži f1 inicijator replikacije poreklom od f1 faga pa spada u fazmide. Kao i pGEM-T Easy vektor sadrži gen za β-galaktozidazu i daje mogućnost plavo-bele selekcije klonova. U ovoj studiji korišćen je u međukoraku za subkloniranje glukokortikoidnog receptora iz pEGFP-GR u pCDNA3.1 vektor, zbog pogodne orijentacije restrikcionih mesta u okviru multikloning regiona.

Vektor pCDNA3.1⁽⁺⁾ sadrži citomegalovirusni promotor/pojačivač koji mu omogućava visok nivo konstitutivne ekspresije u različitim ćelijskim linijama sisara. U ovaj vektor subklonirani su geni za glukokortikoidni (NR3C1) i progesteronski (NR3C3) receptor koji su dalje korišćeni za transfekciju Caco-2 ćelija radi konstitutivne ekspresije pomenutih receptora.

Vektor pGL4.10 je reporterski vektor koji sadrži gen za luciferazu poreklom iz svica (*Photinus pyralis*), dizajniran je za visok nivo ekspresije u sisarskim ćelijama. Ovaj vektor poseduje multikloning region i ne sadrži sopstveni promotor, što zajedno omogućava kloniranje promotorskog regiona od interesa za šta je i korišćen u ovoj studiji.

Vektor pRL-SV40 je kontrolni reporterski luciferazni vektor koji kodira luciferazu poreklom od morskog dupljara *Renilla reniformis*. Služi kao interna kontrola u dualnim reporterskim esejima i može se koristiti zajedno sa različitim eksperimentalnim reporterskim vektorima za kotransfekciju sisarskih ćelija. Ovaj vektor sadrži SV40 pojačivač i ima visok bazalni nivo ekspresije.

Konstrukti

Za potrebe subkloniranja kodirajućeg regiona gena za glukokortikoidni i progesteronski receptor korišćeni su sledeći konstrukti pEGFP-GR (#47504) i pRR-PR-5Z (#23057), redom. Oba konstrukta su preuzeta iz Addgene, neprofitnog repozitorijuma plazmida. Konstrukt pEGFP GR (#47504) deponovan je od strane dr Alice Wong, konstrukt pRR-PR-5Z (#23057) deponovan je od strane dr Charles Miller [170]. Pored toga u ovom radu korišćeni su i konstrukti formirani kloniranjem promotorskog regiona *CYP2C19* gena u reporterski vektor pGL4.1 (2C19-889T, 2C19-889G) i subkloniranjem cDNK za GR i PR u vektor pCDNA3. 1⁽⁺⁾ (pCDNA3-GR i pCDNA3-PR).

Dodatni materijal

Deksametazon (*Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA*) korišćen je za potrebe aktivacije glukokortikoidnog receptora u Caco-2 ćelijama. Rastvoren je u apsolutnom etanolu (*Honeywell*) koji je korišćen kao kontrola u eksperimentima sa deksametazonom.

Ukupna RNK poreklom iz humane jetre (*Thermo Fisher Scientific*) korišćena je kao kalibrator pri kvantifikaciji ekspresije progesteronskog i glukokortikoidnog receptora u ćelijskoj liniji Caco-2.

MATERIJAL I METODE

Oligonukleotidi

Sekvence oligonukleotida koji su korišćeni u okviru ove studije date su u Tabeli 4. Pored sekvenci u tabeli su dati i podaci za koje vrste eksperimenata su pomenuti oligonukleotidi korišćeni kao i temperature hibridizacije sa DNK matricom.

Tabela 4 Nazivi i sekvence korišćenih oligonukleotida.

| Naziv | Sekvenca oligonukleotida 5'-3' | Ekperiment/ upotreba | Temperatura hibridizacije sa DNK matricom |
|----------------------|--|-------------------------|---|
| CYP2C19*17For | GCCCTTAGCACCAAATTCTCT | PCR, sekvenciranje | 60°C |
| CYP2C19*17Rev | CACCTTTACCATTTAACCCCC | PCR, sekvenciranje | 60°C |
| CYP2C195'UTRFor | ATAACAATTCCTGCCTTCACGTG | PCR, sekvenciranje | 58°C |
| CYP2C195'UTRRev | GAAGCAAACATGAGAGACAGAG | PCR, sekvenciranje | 58°C |
| CYP2C195'UTRseqF | GTAATTGTTTTGCATCAGATTG | sekvenciranje | |
| E1cyp2c19For | GAAGGAGAACAAGACCAAAGGAC | PCR | 58°C |
| E1cyp2c19Rev | GTAACATTGTACTCTAGGGATATAC | PCR, sekvenciranje | 58°C |
| CYP2C19INTRON1 Forw | AGAGTGCTGATAAATTTCTCAAGC | PCR, sekvenciranje | 60°C |
| CYP2C19INTRON1 Rev | GAGAGCTAGAAAAGGAGATACAG | PCR, sekvenciranje | 60°C |
| E2_3cyp2c19For | AAATATGAATCTAAGTCAGGCTTAGT | PCR, sekvenciranje | 58°C |
| E2_3cyp2c19Rev | TAACAACCAGGACTCCAAATAAAAG | PCR | 58°C |
| CYP2C19 intr3 For | CTTTTATTTGGAGTCCTGGTTG | PCR, sekvenciranje | 58°C |
| CYP2C19 intr3 Rev2 | CATAGCATATGTTTACTCAAATC | PCR | 58°C |
| E4cyp2c19For | GGGAATTCATAGGTAAGATATTAC | PCR | 58°C |
| E4cyp2c19Rev | CAATATAGAATTTTGGATTTCCC | PCR, sekvenciranje | 58°C |
| CYP2C19*2F | TCATCTTTGATTCTCTTGTC | PCR, sekvenciranje | 58°C |
| CYP2C19 intron 4 For | GTATCAATCAGTTGTGCAAAC | PCR, sekvenciranje | 58°C |
| E5cyp2c19Rev | CCTGTAAACATCCGTAGTAAAC | PCR | 58°C |
| E6cyp2c19For | CTTTGAAAACCTGGACAAGACAGG | PCR | 60°C |
| E6cyp2c19Rev | CTCTAAGAGAAACAGAAAGGAGAAC | PCR, sekvenciranje | 60°C |
| E7cyp2c19For | TGCTAGAACAAATGTTCCATTTT | PCR, sekvenciranje | 60°C |
| E7cyp2c19Rev | TAGAGGGTAAGAATCATACTGTG | PCR | 60°C |
| E8cyp2c19For | ACTTCGTCTATCTGTCTGGAAATG | PCR, sekvenciranje | 60°C |
| E8cyp2c19Rev | GAAGGCACATGTAAGTTCCAACG | PCR | 60°C |
| E9cyp2c19For | CATATTCTGTCTGTGCCAGTTATAG | PCR, sekvenciranje | 60°C |
| E9cyp2c19Rev | TCAGAAGAAGCATCACAGATAGTG | PCR | 60°C |
| CYP2C193'UTRFor | TTCTGTCCC GCCCTTCTATCA | PCR | 60°C |
| CYP2C193'UTRRev | AGCATGGCCTCCTGGAACTC | PCR, sekvenciranje | 60°C |
| C19DFKpn For | TAGGTACC GTCTCAGCTCTAGCACCAGC | kloniranje | 60°C |
| C19DFXho Rev | CAAACCTCGAGAGGATCCATTGAAGCCTTCT | kloniranje | 60°C |
| CYP19MUT | GGTATATATTCAGAATAACTAAGGTTTGGAA GTTGTTTTGTTTTGC | mutagenaza | 55°C |
| RVprimer3 | CTAGCAAAATAGGCTGTCCC | sekvenciranje | |
| RevLucVektori | TTCGAGTGGGTAGAATGGCG | sekvenciranje | |
| GRinnerFor | GGTAAAGAGACGAATGAGAGTC | sekvenciranje | |
| GRinnerRev | CTCCTAACATGTTGAGCGTAG | sekvenciranje | |
| MYC UP | ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA | PCR | 56°C |
| MYC LOW | TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC | PCR | 56°C |

3.3 Metode

Određivanje ADP indukovane agregacije trombocita metodom multiple elektrodne agregometrije

Prema referenci [154]

Multipla elektrodna agregometrija (MEA) ili impedantna agregometrija je metoda za merenje stepena agregacije trombocita u punoj krvi. Za merenje reaktivnosti trombocita u ovoj studiji korišćen je aparat Multiplate® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Multiplate® omogućava da se prati aktivacija trombocita preko različitih signalnih puteva zavisno od testa koji se koristi pri analizi [154]. Analizator beleži promenu otpora na elektrodama koje su uronjene u uzorak razblažene pune krvi i odgovarajućeg agoniste agregacije trombocita koji dovodi do njihove aktivacije, a posledično do lepljenja i agregacije na površinu elektroda. Agregacija trombocita se meri u test ćeliji sa duplim sensorima za detekciju otpora (impedance), koji se sastoje od dve bakarne elektrode presvučene srebrom. Promena u otporu koju detektuje svaki senzor se nezavisno i kontinuirano beleži, a kao konačni rezultat uzima se srednja vrednost oba meranja. Promena u otporu je proporcionalna je količini trombocita zalepljenih na elektrodu.

Za praćenje terapijskog efekta klopidozola kod pacijenata podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji korišćen je ADP HS test, Uzorci pune krvi za ovu analizu uzimani su sa antikoagulansom litijum-heparinom, inkubirani na sobnoj temperaturi oko 30 minuta i testirani minimalno 30 minuta do maksimalno 3 sata nakon vađenja krvi. Prilikom analize u test ćeliju se dodaje 300 µL fiziološkog rastvora, koji je pre testiranja u samom analizatoru zagrejan na 37°C i 300 µL uzorka pune krvi. Nakon tri minuta inkubacije, dodaje se 20 µL prostaglandina E1 (PGE1) i 20 µL ADP-a kod izvođenja ADP HS testa. Nakon dodavanja aktivatora, automatski počinje merenje i aparat tokom šest minuta iscrta krivu promene otpora, odnosno krivu agregacije trombocita [171]. Rezultati se izražavaju u arbitrarnim jedinicama (AU, eng. *Arbitrary Aggregation Units*). Pomoću krive mogu se izračunati sledeći podaci:

- aktivnost trombocita (površina ispod krive agregacije, AUC eng. *Area Under the Curve*) [AU*min]

- agregacija trombocita (visina krive) [AU]
- brzina agregacije trombocita (maksimalni nagib krive) [AU/min]

Za potrebe studije rektivnost trombocita je određivana 24 sata pre karotidne endarterektomije, a nakon intervencije ADP HS test je rađen 24 sata nakon primenjene prve doze leka, sedmog i tridesetog dana uzimanja terapije.

Izolacija DNK iz periferne krvi

[protokol za *QIAamp DNA Mini* Kit-QIAGEN]

Za izolaciju DNK iz limfocita periferne krvi korišćen je komercijalni kit *QIAamp DNA Blood Mini* (Qiagen). Izolacija je vršena iz 200 µL periferne venske krvi uzete sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom. Prema protokolu u krv se dodaje 20 µL QIAGEN proteinaze K i 200 µL pufera AL koji omogućava lizu ćelija. Smeša se zatim izmeša intenzivnim invertovanjem i inkubira 10 min na 56°C, nakon čega se dodaje 200 µL apsolutnog etanola etanola i smeša se nanosi na QIAmp kolonu i centrifugira 1 min na 8000 rpm (eng. *revolution per minute* - obrtaja u minutu). DNK koja je u ovom koraku vezana za kolonu ispira se dodavanjem 500 µL pufera AW1 i centrifugiranjem 1 min na 8000 rpm. U sledećem koraku prečišćavanje se nastavlja dodavanjem pufera AW2 i centrifugiranjem 3 min na 13000 rpm. Nakon toga kolona se prebacuje u sterilnu epruvetu od 1,5mL i na nju se dodaje 150-200 µL sterilne vode. Ovako pripremljena kolona se inkubira 1 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugira 1 min na 8000 rpm, radi spiranja izolovane DNK. Uzorci izolovane DNK su tokom upotrebe čuvani na +4°C.

Analiza DNK u agaroznom gelu

Prema referenci [172]

Analiza prinosa i kvaliteta DNK izolovane iz periferne krvi i analiza prinosa plazmidne DNK izolovane iz bakterijskih kultura vršena je pomoću elektroforeze u agaroznom gelu koncentracije 1%. Provera fragmenata DNK dobijenih reakcijom lančanog umnožavanja (PCR, eng. *Polimerase Chain Reaction*) vršena je elektroforezom u agaroznom gelu koncentracije 2%. Za pripremu gelova i elektroforezu korišćen je 1xTAE pufer (40mM Tris, 20mM Na-acetat, 1mM Na₂EDTA). Elektroforeza je vršena pri naponu 7-10 V/cm. Vizuelizacija DNK vršena je pomoću DNK interkalirajućeg agensa etidijum bromida (EtBr) u koncentraciji 0,5 µg/mL i osvetljavanjem gela

UV svetlošću. Za procenu dužine DNK fragmenata korišćeni su odgovarajući (100bp i 1kB) komercijalno dostupni DNK markeri (*NEBioLabs*).

Reakcija lančanog umnožavanja DNK polimerazom (PCR)

Prema reference [173, 174]

Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR, eng. *Polymerase Chain Reaction*) omogućava *in vitro* umnožavanje segmenta DNK ograničenog oligonukleotidima koji su komplementarni njegovim krajevima. Sastavi reakcionih smeša i uslovi umnožavanja fragmenata korišćenih u ovom istraživanju dati su u Tabeli 5. Sve reakcije odvijale su se u zapremini od 50 µL sa količinom od 100 do 150 ng izolovane DNK ili 1 µL pune venske krvi.

Tabela 5 Sastav reakcionih smeša i uslovi PCR.

| | Sastav reakcione smeše | Temperaturni profil |
|----------------------------|--|---|
| PCR sa puneom venskom krvi | puna venska krv | 1 µL |
| | 10X Reakcioni pufer B (<i>SolisBioDyne</i>) | 5 µL |
| | 25 mM MgCl ₂ | 5 µL |
| | 2 mM dNTP-ovi | 5 µL |
| | 10 pmol oligonukleotid (forward) | 2 µL |
| | 10 pmol oligonukleotid (reverse) | 2 µL |
| | 1U <i>Taq</i> (FIREPol) polimeraza (<i>SolisBioDyne</i>) | 0,3 µL |
| | Sterilna H ₂ O | do 50 µL |
| | | 98°C 3 min } 6X 55°C 3 min } 72°C 10 min dodavanje <i>Taq</i> 94°C 5 min 94°C 30 s 58°C /60° C 30 s (videti tabelu 4) } 30X 72°C 30 s 72°C 4 min |
| PCR sa DNK | 100 do 150 ng izolovane DNK | |
| | 10X PCR pufer A (<i>Qiagen</i>) | 5 µL |
| | 25 mM MgCl ₂ | 5 µL |
| | 2 mM dNTP-ovi | 5 µL |
| | 10 pmol oligonukleotid (forward) | 2 µL |
| | 10 pmol oligonukleotid (reverse) | 2 µL |
| | 1U <i>Taq</i> polimeraze (<i>Qiagen</i>) | 0,3 µL |
| | Sterilna H ₂ O | do 50 µL |
| | | 94°C 5 min 94°C 30 s 58°C /60° C 30 s (videti tabelu 4) } 30X 72°C 30 s 72°C 4 min |

Prečišćavanje PCR produkata

[protokol za *QIAquick PCR Purification Kit-QIAGEN*]

Prečišćavanje produkata umnoženih PCR metodom vršeno je upotrebom komercijalnog kita *QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)*. Kit je namenjen prečišćavanju umnoženih fragmenata DNK od komponenata reakcione smeše PCR-a (oligonukleotida, neugrađenih

MATERIJAL I METODE

nukleotida, enzima, soli, i drugih komponenata) i zasniva se na vezivanju molekula DNK za silikamembranu. Prema protokolu u proizvod PCR reakcije dodaje se 200 μL pufera PB. Smeša se nanosi na QIAmp kolonu koja se nalazi u kolektorskoj epruveti centrifugira 1 min na 13000 rpm. Nakon centrifugiranja tečnost iz kolektorske epruvete se odliva, a na kolonu se nanosi 750 μL pufera PE. Zatim se vrše dva centrifugiranja od po 1 min na 13000 rpm, i nakon svakog se odstrani tečnost iz kolektorske epruvete. Kolona se potom prebaci u sterilnu epruvetu od 1,5 mL i na kolonu se doda 30 μL sterilne vode. Nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi vrši se centrifugiranje 1 min na 13000 rpm čime se prečišćeni fragmenti DNK spiraju sa kolone.

Sekvenciranje DNK

[protokol za *BigDye Terminator Sequencing Ready Reaction-Applied Biosystems*]

U osnovi reakcije sekvenciranja leži sposobnost DNK polimeraze da ugradi 2', 3'-didezoksiribonukleotid trifosfate (ddNTPs) na 3' kraj rastućeg lanca DNK, čime se dalja elongacija prekida usled odsustva 3'-OH grupe u ddNTP-ovima. Svaki od četiri ddNTP-a obeležen je na 3' kraju različitom rodaminskom fluorescentnom bojom. Rezultat reakcije sekvenciranja je mešavina fragmenata DNK različite dužine koji na svom 3' kraju sadrže neki fluorescentno obeležen ddNTP. Reakciona smeša za sekvenciranje pripremana je u zapremini od 8 μL , sastav reakcione smeše i temperaturni profil reakcije dati su u Tabeli 6.

Tabela 6 Sastav reakcione smeše i uslovi reakcije sekvenciranja.

| Sastav reakcione smeše | Temperaturni profil |
|--|---------------------|
| PCR produkta 10-40 ng | 96°C 5 min |
| 3.2 pmol odgovarajućeg oligonukleotida (videti Tabelu 4) | 96°C 10 s |
| <i>BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready</i> | 50°C 5 s |
| Reaction Mix (<i>Applied Biosystems</i>) | 60°C 4min |
| Sterilna H ₂ O | 4°C ∞ |
| 1 μL | } 25X |
| 2 μL | |
| Do 8 μL | |

Pre nego što su produkti reakcije sekvenciranja podvrgnuti analizi kapilarnom elektroforezom, vršena je njihova precipitacija pomoću Na-acetata kako bi se uklonili neugrađeni fluorescentno obeleženi ddNTP-ovi. Prema protokolu u 8 μL reakcione smeše dodaje se 40 μL hladnog 0,1M Na-acetata pH5.2 rastvorenog u etanolu, a zatim se smeša centrifugirana 10 min na 13000 rpm i uklanja supernatant. Talog se zatim ispere dva puta sa po 200 μL hladnog

70% etanola, a nakon svakog ispiranja smeša se centrifugira 10 min na 13000 rpm i uklanja supernatant. Talog se zatim suši nekoliko minuta na sobnoj temperaturi, a potom rastvara u 20 μ L Hi-Di™ Formamida (*Applied Biosystems*), koji obezbeđuje denaturaciju, stabilnost i sprečava degradaciju sintetisanih produkata. Produkti reakcije analizirani su kapilarnom elektroforezom na aparatu 3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) u komercijalnom polimeru POP-7 Polymer (*Applied Biosystems*). Digitalni zapisi automatskog očitavanja sekvenci nakon kapilarne elektroforeze analizirani su korišćenjem softvera Sequencing Analysis v5.3.1 (*Applied Biosystems*) i BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.4. Dobijene sekvence DNK upoređivane su sa odgovarajućom referentnom sekvencom (NCBI Reference Sequence: *CYP2C19* NG_008384.2, *NR3C1* CCDS ID: CCDS4278, *NR3C3* CCDS ID: CCDS8310.1) upotrebom programa BLASTN iz familije programa BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al. 1990).

Izolacija ukupne RNK iz Caco-2 ćelijske linije

[Modifikovani protokol za *TRI Reagent Solution- Ambion*]

Ukupna RNK iz Caco-2 ćelija izolovana je korišćenjem TRIzol® Reagent (*Ambion RNA, Life Technologies*). Za izolaciju RNK zasejano je 2×10^5 Caco-2 ćelija koje su gajene na 5% CO₂/37°C u trajanju od 24 sata. Dalja procedura podrazumevala je homogenizaciju ćelija dodavanjem 1 mL TRIzol® Reagent i intenzivnim pipetiranjem. Nakon homogenizacije uzorci su inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi. Dalje se prema protokolu dodaje 200 μ L hloroforma i smeša se intenzivno promućka i inkubira 10-15 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorci se centrifugiraju 15 min na 13000rpm na 4°C, da bi se razdvojile: vodena faza, interfaza i organska hloroform-fenolna faza. RNK se nalazi u vodenoj fazi, koja se pažljivo prebacuje u nove sterilne epruvete od 1,5 mL. RNK se zatim taloži dodavanjem 500 μ L 100% izopropanola i centrifugiranjem 10 min na 13000rpm na 4°C. Nakon ovog koraka odliva se supernatant i moguće je uočiti talog RNK koji se zatim ispira kratkim mućkanjem uz dodatak 1 mL 75% etanola, nakon čega se vrši ponovno centrifugiranje uzoraka 5 min na 8000 rpm na 4°C i uklanja se supernatant. Talog RNK se zatim suši na vazduhu 10-15 min i rastvara u 30 μ L DEPC H₂O (0,1% dietilpirokarbonat) i radi potpunog rastvaranja inkubira 10 min na 55°C. Prinos i kvalitet izolovane RNK proveravan je merenjem koncentracije spektrofotometrijskom metodom,

korišćenjem aparata NanoVue (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). Uzorci izolovane RNK su do upotrebe čuvani na -80°C.

Sinteza komplementarne DNK

[protokol za *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit- Applied Biosystems*]

Komplementarna DNK (cDNK, eng. *complementary DNK*) se sintetise pomoću enzima reverzne transkriptaze, DNK polimeraze koja kao matricu za sintezu koristi RNK. Ukupna RNK izolovana iz tkiva jetre ili Caco-2 ćelija korišćena je kao matrica za sintezu cDNK. Ukupna cDNK dobijena je reverznom transkripcijom korišćenjem High Capacity cDNA Reverse Transcription kita (*Applied Biosystems*) koji omogućava prevođenje celokupne RNK u cDNK. Sastav i temperaturni uslovi reakcije reverzne transkripcije prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7 Sastav i uslovi reakcije reverzne transkripcije

| Sastav reakcione smeše | Temperaturni uslovi |
|------------------------------------|---------------------|
| RNK (1000 ng) | |
| 10 X RT pufer | 2 µL |
| 25 X dNTP | 0,8 µL |
| 10 X RT Random oligonukleotida | 2 µL |
| MultiScribe reverzna transkriptaza | 1 µL |
| Inhibitor RNase | 0,5 µL |
| H ₂ O bez RNase | do 20 µL |
| | 25°C 10 min |
| | 37°C 120 min |
| | 85°C 5 min |
| | 4°C ∞ |

Dobijena ukupna cDNK iz Caco-2 ćelija korišćena je za kvantifikaciju iRNK glukokortikoidnog i progesteronskog receptora metodom PCR-a u realnom vremenu i do upotrebe je čuvana na -20°C.

Kvantifikacija RNK metodom PCR-a u realnom vremenu

[protokol za *EvaGreen qPCR Mix ROX- Solis BioDyne*]

Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR; eng. *quantitative Real-Time PCR*) je metoda za kvantifikaciju nukleinskih kiselina koja se bazira na detekciji fluorescentnog signala. Ova metoda korišćena je za merenje nivoa ekspresije glukokortikoidnog i progesteronskog receptora u tkivu jetre i Caco-2 ćelijskoj liniji. Za kvantifikaciju je korišćen komercijalni kit 5X

MATERIJAL I METODE

HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne) prema uputstvu proizvođača. Fluorescentna EvaGreen boja se vezuje za cDNK molekule sintetisane tokom PCR reakcije i emituje fluorescenciju dok je vezana za dvolančanu DNK. Sastav i temperaturni uslovi reakcije za kvantitativni PCR u realnom vremenu prikazani su u Tabeli 8.

Tabela 8 Sastav i uslovi reakcije za kvantitativni PCR u realnom vremenu.

| Sastav reakcione smeše | | Temperaturni uslovi |
|---|----------|---------------------|
| cDNK (50 ng) | | 50°C 10 min |
| 10 pmol oligonukleotid (forward) | 0,3 µL | 95°C 12 min |
| 10 pmol oligonukleotid (reverse) | 0,3 µL | 95°C 15 sec |
| 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus | 2 µL | 60°C 1 min |
| H ₂ O | do 10 µL | } 40X |

Ekspresija pomenutih receptora normalizovana je u odnosu na endogenu kontrolu i na kalibrator. Kao endogena kontrola korišćen je nivo ekspresije gena gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH; eng. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), a kao kalibrator korišćen je nivo ekspresije receptora u uzorku cDNK iz tkiva humane jetre. Reakcije qPCR-a u realnom vremenu rađene su na aparatu 7500 *Real-Time* PCR (*Applied Biosystems*). Dobijeni rezultati su obrađeni upotrebom *ABI Prism 7500 software* (*Applied Biosystems*).

Kloniranje

Prema referenci [172]

Konstrukt pGL4.1-2C19-889T sadržao je deo promotorskog regiona gena *CYP2C19* dužine 1708 baznih parova (od -1697 do +10), koji je amplifikovan je metodom PCR-a, korišćenjem oligonukleotida prikazanih u Tabeli 4. Kao matrica u reakciji, korišćena je humana genomska DNK. Umnoženi fragmenti DNK su prečišćeni (QIAquick PCR Purification Kit, *Qiagen*) i uklonirani u pGEM-T-Easy vektor (*Promega*), a iz ovog vektora fragment DNK dužine 1708 baznih parova je dobijen digestijom restrikcionim enzimima *KpnI* i *XhoI*. Dobijeni fragment je elektroforezom na agaroznom gelu razdvojen od linearizovanog plazmida i prečišćen pomoću Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (*ZymoResearch*), a potom ligacijom integrisan u vektor pGL4.1, koji je linearizovan digestijom sa istim restrikcionim enzimima - *KpnI* i *XhoI*.

Konstrukt pGL4.1-2C19-889G dobijen je uvođenjem pojedinačne nukleotidne zamene u pGL4.1-2C19-889T konstrukt, pomoću komercijalnog kita za mutagenezu *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)* i oligonukleotida prikazanog u Tabeli 4. Tom prilikom na relativnoj poziciji 806. u okviru pGL4.1-2C19-889T konstrukta umesto timina inkorporiran guanin. Na ovaj način konstrukt pGL4.1-2C19-889G predstavlja promotorsku sekvencu gena *CYP2C19* koja sadrži manje učestali alel (G) varijante rs11568732 (*CYP2C19*20*, c.-889T>G).

Korišćenje konstrukta pCDNA3-GR omogućilo je konstantnu ekspresiju glikokortikoidnog receptora u Caco-2 ćelijskoj liniji u koju je ovaj konstrukt tranzijentno transfekovan. Komplementarna DNK sekvenca *NR3C1 (GCR)* gena dobijena digestijom pEGFP-GR konstrukta sa *XhoI* i *BamHI* restrikcionim enzimima, subklonirana je u vektor pBluescriptSK iz koga je ponovo izbačena digestijom sa *XhoI* i *KpnI* (*Fermentas*) restrikcionim enzimima. Izbačeni fragment je elektroforezom na agaroznom gelu razdvojen od linearizovanog plazmida i prečišćen Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (*ZymoResearch*), a potom finalno ligiran u vektor pCDNA3.1⁽⁺⁾, koji je prethodno linearizovan digestijom sa istim restrikcionim enzimima - *XhoI* i *KpnI*.

Konstrukt pCDNA3-PR je omogućavao konstantnu ekspresiju progesteronskog receptora u Caco-2 ćelijskoj liniji u koju je tranzijentno transfekovan. Kodirajući fragment gena *NR3C3 (PRG)* dobijen je digestijom pRR-PR-5Z konstrukta sa *EcoRI* restrikcionim enzimom, zatim elektroforezom na agaroznom gelu razdvojen od linearizovanog plazmida i prečišćen Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (*ZymoResearch*), a potom ligacijom ubačen u vektor pCDNA3.1⁽⁺⁾, koji je linearizovan digestijom sa istim restrikcionim enzimom.

Digestija DNK restrikcionim enzimima

Prema referenci [172]

Za potrebe kloniranja i subkloniranja vršena je digestija vektora odgovarajućim restrikcionim enzimima proizvođača *Fermentas Thermo Fisher Scientific*. Detalji o enzimima i vektorima dati su u Tabeli 9. Digestije su rađene u zapremini od 10 µL, a sastav digestione smeše bio je sledeći:

MATERIJAL I METODE

| | |
|--------------------|-----------------------------|
| Vektor/konstrukt | 500-2000 ng |
| Pufer | 1 μ L |
| Restrikcioni enzim | 0,5 μ L (10 U/ μ L) |
| dH ₂ O | do 10 μ L |

Reakcija se odvijala na 37°C u rasponu od 2 do 16h u zavisnosti od količine konstrukta u reakciji i efikasnosti korišćenih restrikcioni enzima.

Tabela 9 Plazmidni vektori i restrikcioni enzimi korišćeni u kloniranju.

| Plazmidni vektori | Enzimi | Pufer | Svrha |
|-------------------------|---|--|--|
| pGEM-T Easy | <i>KpnI</i> i <i>XhoI</i> | Tango | Provera prisustva wt CYP2C19 promotorskog konstrukta |
| pGL4.10 | <i>KpnI</i> i <i>XhoI</i> | Tango | Provera prisustva wt CYP2C19 promotorskog konstrukta |
| pEGFP-GR | <i>XhoI</i> , <i>BamHI</i> | 2X Tango | Izbacivanje GR iz pEGFP-GR |
| pRR-PR-5Z | <i>EcoRI</i> | Pufer 0 | |
| pBluescriptSK | <i>XhoI</i> , <i>BamHI</i> , <i>KpnI</i> | 2X Tango <i>KpnI</i> | Subkloniranje GR iz pEGFP-GR i subkloniranje GR u pCDNA3.1 |
| pCDNA3.1 ⁽⁺⁾ | <i>BamHI</i> , <i>KpnI</i> , <i>EcoRI</i> | <i>BamHI</i> <i>KpnI</i> Pufer 0 | Subkloniranje GR iz pBluescriptSK Subkloniranje PR iz pRR-PR-5Z |

Provera uspešnosti kloniranja i prisustva očekivanih fragmenata u konstruktima preliminarno je vršena digestijom odgovarajućim restrikcioni enzimima, a finalno sekvenciranjem, uz korišćenje odgovarajućih oligonukleotida.

Prečišćavanje DNK fragmenata iz agaroznog gela

[protokol za *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit*- *ZymoResearch*]

Inserti dobijeni digestijom odgovarajućim restrikcioni enzimima iz vektora pGEM-T Easy, pBluescriptSK, pEGFP-GR i pRR-PR-5Z su prečišćavani iz agaroznog gela pomoću komercijalnog kita *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* (*ZymoResearch*). Produkti digestija plazmidnih konstrukata razdvajani su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu u koji je dodat etidijum bromid (0,5 μ g/mL).

Elektroforeza je izvođena u 1xTAE puferu (40mM Tris, 20mM Na-acetat, 1mM Na₂EDTA) pri naponu 7-10 V/cm. Vizuelizacija traka vršena je osvetljavanjem gela UV svetlošću i DNK fragmenti odgovarajuće dužine iskrajani su iz gela, prebacivani u epruvetu od 1,5 mL i merena je masa iskrojanih komada gela u kojima se nalazi željeni fragment. Prema protokolu proizvođača

MATERIJAL I METODE

u epruvete se dodaje 3 zapremine pufera ADB (100 μ L=100 mg), zatim se uzorak inkubira 5-10 min na 55°C dok se gel potpuno ne rastopi. Smeša se zatim prebacije u Zymo-Spin kolonu koja je smeštena u kolektorsku tubu i centrifugira se 1 min na 13000 rpm. Nakon centrifugiranja tečnost iz kolektorske tube se odlije, a DNK fragment koji je vezan za kolonu se ispira dva puta sa po 200 μ L DNA Wash pufera centrifugiranjem na 13000 rpm u trajanju od 1 min. Nakon ispiranja, kolona se prebacuje u sterilnu epruvetu od 1,5 mL i sa nje se DNK spira pomoću 6-15 μ L DNA Elution pufera centrifugiranjem 1 min na 13000 rpm.

Ligacija

Prema referenci [172]

Ligacije prečišćenih fragmenata DNK dobijenih PCR reakcijom ili nakon digestije odgovarajućih konstrukata (pEGFP-GR, pRR-PR-5Z, pBluescriptSK) sa odgovarajućim vektorima (pGEM-T Easy, pBluescriptSK, pCDNA3.1, pGL4.1) vršena je u ukupnoj zapremini od 10 μ L preko noći u vodenom kupatilu na 16°C. Reakciona smeša za ligaciju sadržala je:

| | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Vektor | 100 ng |
| Insert | Odnos 3:1 |
| Pufer za ligaciju T4 (Promega) | 1 μ L |
| Ligaza T4 (Promega) | 0,5 μ L (10 U/ μ L) |
| ATP (10mM) | 1 μ L |
| dH ₂ O | do 10 μ L |

Odnos količina vektora i inserta bio je 3:1, a količina inserta koja odgovara ovom odnosu računata je prema sledećoj formuli:

$$\frac{ng \text{ vektora} * kb \text{ inserta}}{kb \text{ vektora}} * \frac{3}{1} = ng \text{ inserta}$$

Mutageneza

[modifikovani protokol za *Quick Change Multi Site-Directed Mutagenesis Kit-AgilentTechnologies*]

In situ PCR dirigovana mutageneza koristi se za uvođenje promena u DNK sekvenci cirkularnih vektora. U ovoj studiji mutageneza je urađena upotrebom *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit-a (AgilentTechnologies)*. Za reakciju mutagenize potreban je specifičan oligonukleotid, preporuka je da on bude dizajniran tako da sadrži 25-45 nukleotida i da temperatura njegovog topljenja bude $\geq 75^{\circ}\text{C}$. Poželjno je da GC sastav bude najmanje 40% i da se oligonukleotid završava nukleotidom G ili C. Izmenjeni nukleotid koji se uvodi treba da se nalazi u sredini oligonukleotida. Takođe oligonukleotid mora biti fosforilisan i na 5' kraju. U ovoj studiji mutageneza je primenjena da bi se napravio promotorski konstrukt gena *CYP2C19* koji sadrži rs11568732 (*CYP2C19*20*, c.-889G) varijantu, odnosno da bi se nukleotid T zamenio nukleotidom G (na poziciji c.-889 promotora, tj. na poziciji 806 u okviru *wt* konstrukta). Sekvenca oligonukleotida korišćenog za mutagenezu data je u Tabeli 4, a sastav reakcije za njegovu fosforilaciju i temperaturni uslovi dati su u Tabeli 10.

Tabela 10 Uslovi reakcije fosforilacije oligonukleotida za mutagenezu.

| Sastav reakcione smeše | | Temperaturni uslovi |
|---|---------------------|--|
| 100 μM oligonukleotida za mutagenezu | 10 μL | Inkubacija 45min na 37°C |
| 10X T4 Polynucleotide Kinase pufer | 2,5 μL | |
| 10 mM ATP | 2,5 μL | |
| T4 Polynucleotide Kinase (USB, Pharmacia) | 0,1 μL | Inaktivacija 5 min na 65°C |
| sterilna H_2O | do 25 μL | |

U reakciju je nakon inaktivacije reakcije fosforilacije dodato 25 μL dH_2O i smeša je propuštena kroz G50 kolonicu (*GE Healthcare*) kako bi se uklonili ostaci soli.

Dalja procedura dobijanja mutiranog plazmida se sastoji iz tri koraka. Prvi korak obuhvata PCR reakciju u kojoj se vrši ekstenzija mutiranog oligonukleotida pomoću

MATERIJAL I METODE

PfuTurboDNK polimeraze. Kao matrica za umnožavanje koristi se vektor sa sekvencom u koju se uvodi mutacija (pGL4.1-2C19-889T). Dobijaju se dvolančani molekuli DNK, u kojima samo jedan lanac nosi željenu mutaciju i prekide koji se zatvaraju pomoću enzimske smeše. Sastav PCR smeše i uslovi umnožavanja su prikazani u Tabeli 11.

Tabela 11 Uslovi reakcije PCR dirigovane mutageneze.

| Sastav reakcione smeše | | Temperaturni uslovi |
|---|---------------|--|
| 10X QuickChange Multi reactioni pufer | 2,5 µL | 95°C 1 min 95°C 1 min 55°C 1 min 65°C 9min i 30 sek 4°C ∞ } 30X |
| plazmidna DNK | X µL (100 ng) | |
| oligonukleotid za mutagenezu (100 ng/µL) | 1 µL | |
| 25 mM dNTP | 1 µL | |
| QuickChange Multi enzimski mix (<i>PfuTurboDNK</i> polimeraza) | 1 µL | |
| sterilna H ₂ O | do 25 µL | |

Drugi korak mutageneze obuhvata digestiju produkta PCR reakcije endonukleazom *DpnI* koja seče metilovanu i hemimetilovanu DNK (5'Gm6ATC-3') i na taj način odstranjuje se DNK lanac koji je poslužio kao matrica za sintezu vektora koji sadrži željenu nukleotidnu zamenu. Uslovi reakcije su prikazani u Tabeli 12.

Tabela 12 Uklanjanje metilovane DNK.

| Sastav digestione smeše | | Temperaturni uslovi |
|---------------------------------|-------|---------------------|
| <i>DpnI</i> 10U/ µL (Fermentas) | 1 µL | 37°C 1h |
| PCR reakcija | 25 µL | |

Treći korak obuhvata transformaciju ultrakompetentnih *E. Coli* XL 10-Blue ćelija mutiranom zatvorenom jednolančanom DNK koja se *in vivo* prevodi u dvolančanu DNK.

Gajenje bakterija

Prema referenci [172]

Bakterijski sojevi *E. coli* korišćeni u ovom istraživanju (DH5α i XL10-Gold[®] (*Agilent Technologies*)) gajeni su na 37°C u LB (*Laura-Bertani*) hranljivom medijumu u tečnim bakterijskim kulturama uz aeraciju na 180 rpm ili na čvrstoj podlozi. Tečni LB medijum sadrži 1% tripton, 0,5% ekstrakta kvasca i 0,5% NaCl, a čvrst medijum dodatno sadrži i 1.5% agara.

Medijumi se sterilišu autoklaviranjem 20 min na 121°C pri pritisku od 100 kPa. Pre zasejavanja transformisanih bakterija u hranljivi medijum dodavan je i odgovarajući antibiotik (ampicilin (100 µg/mL) ili kanamicin (30 µg/mL)).

Priprema kompetentnih ćelija za transformaciju toplotnim šokom

Prema referenci [172]

Kako bi stekle sposobnost da prime strane molekule DNK, bakterijske ćelije se tretiraju puferima koji povećavaju propustljivost bakterijske membrane. Sa čvrste hranljive podloge se inokuliše nekoliko pojedinačnih kolonija u 10 mL tečnog LB medijuma. Nakon kultivacije preko noći na 37°C, uz aeraciju na 180 rpm, 2-6 mL bakterijske kulture se prebacuje u erlenmajer sa 200 mL LB medijuma. Dnevna kultura se gaji na 37°C uz aeraciju na 180 rpm do dostizanja optičke gustine (OD) od 0,3 do 0,5 OD/mL koja se meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 600 nm. Kultura se potom centrifugira 5 min na 3500 rpm na +4°C. Supernatant se odliva, a ćelijksi talog se resuspenduje u 50 mL sterilnog i ohlađenog 0,1 M CaCl₂, zatim se inkubira na ledu 15 min i centrifugira 5 min na 3500 rpm na +4°C. Supernatant se odlije, a talog se resuspenduje u 4 mL hladnog RF2 rastvora (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂ i 15% glicerol, pH6,8). Nakon toga smeša se inkubira na ledu 15 min, a zatim se po 200 µL razdeli prethodno rashlađenim nastavcima u epruvete od 1,5 mL prethodno rashlađenim na ledu. Ovako pripremljene kompetentne bakterijske ćelije zamrzavaju se prelivanjem tečnim azotom i nakon toga čuvaju na -80°C do upotrebe.

Transformacija bakterija toplotnim šokom

Prema referenci [172]

Metodom transformacije se u bakterije ubacuje željena plazmidna DNK. U 200 µL kompetentnih ćelija koje su otopljene na ledu dodavano je 10 µL odgovarajuće ligacione smeše i ova mešavina je inkubirana 1h na ledu. Nakon inkubacije na ledu smeša je izlagana toplotnom šoku prvo 2 min na 42°C koji omogućava permeabilizaciju bakterijskih membrana da bi mogla da prime plazmidnu DNK, a odmah potom bakterije su inkubirane 5 min na ledu. Oporavak ćelija od toplotnog šoka vršen je dodavanjem 300 µL LB medijuma bez antibiotika i inkubacijom od 30 min na 37°C uz aeraciju. Nakon oporavka, 100-500 µL smeše zasejavano je na čvrstu LB podlogu sa odgovarajućim antibiotikom. Ovako zasejane bakterije inkubirane su preko noći na 37°C.

Nakon inkubacije transformanti se uočavaju kao pojedinačne kolonije koje su dalje proveravane na prisustvo željenog konstrukta. Za trajno čuvanje transformanata na -80°C željene kolonije su zasejavane u tečni LB medijum, inkubirane preko noći na 37°C uz aeraciju na 180 rpm, i u 850 μL ovako dobijene bakterijske kulture dodavano je 150 μL sterilnog glicerola.

Izolacija plazmidne DNK

prema referenci [172]

Pojedinačne bakterijske kolonije zasejavane su u 5 mL tečnog LB medijuma sa odgovarajućim antibiotikom i inkubirane na 37°C preko noći, uz konstantnu aeraciju na 180 rpm. Prekonoćna kultura je centrifugirana 30 sekundi na 13000 rpm, dobijeni talog je resuspendovan u 50 μL supernatanta koji nije odličen, a zatim su bakterijske ćelije lizirane u 300 μL pufera TENS (0,5M EDTA, 10M NaOH, 10% SDS, 1M Tris HCl pH 8,0) i dodavano je 150 μL 3M Na-acetata radi precipitacije ćelijskih ostataka i hromozomalne DNK, nakon čega su epruvete blago invertovane i centrifugirane 2 min na 13000 rpm. Supernatant je prebacivan u čiste epruvete od 1,5 mL, u koji je radi precipitacije plazmidne DNK dodavano 900 μL hladnog apsolutnog etanola. Smeša je centrifugirana 2 min na 13000 rpm. Supernatant je odlivan, a plazmidni talog je naknadno ispiran sa po 1 mL 70% hladnog etanola centrifugiranjem od 1 min na 13000 rpm dva puta. Nakon drugog ispiranja talog je sušen 5-10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim rastvaran u 20-40 μL sterilne H_2O uz dodatak 1 μL RNaze H radi odstranjivanja molekula RNK. Do dalje upotrebe plazmidna DNK čuvana je na -20°C .

Priprema plazmidne DNK za transfekciju ćelija u kulturi

[protokol za *ZymoPURE Plasmid Maxiprep Kit*- *ZymoResearch*]

Za pripremu plazmidne DNK za transfekciju Caco-2 ćelijske linije korišćen je komercijalni *ZymoPURE™ Plasmid Maxiprep Kit* (*ZymoResearch*). Pojedinačne bakterijske kolonije zasejavane su u 5 mL LB medijuma sa ampicilinom (100 mg/mL) i inkubirane 6 sati na 37°C uz aeraciju na 180 rpm. Iz ovako dobijene kulture 100 μL je zasejavano u 150 mL LB medijuma i bakterije su gajene 12-16 h na 37°C uz aeraciju na 180 rpm. Nakon toga bakterijska kultura je centrifugirana 10 min na 4700 rpm na 4°C . Talog je resuspendovan u 14 mL pufera P1, zatim je dodavano 10 mL pufera P2 i smeša je blago mešana. Nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi, dodavano je 10 mL pufera P3 i smeša je blago izmešana invertovanjem. Dobijeni ćelijski lizati su

prebacivani na ZymoPURESyringe filter i inkubirani 5-8 min na sobnoj temperaturi, a potom profiltrirani pomoću klipa u sterilnu epruvetu. U filtrirani lizat dodavano je 14 mL pufera za vezivanje, smeša je promešana obrtanjem i prebačena na Zymo-Spin V-P kolonu povezanu sa vakuum pumpom. Nakon odstranjivanja tečnosti, pomoću vakuuma, na koloni ostaje vezana plazmidna DNK. Za ovim korakom sledi ispiranje pomoću 5 mL pufera Wash 1, koji se odstranjuje pomoću vakuum pumpe, potom se vrši ispiranje sa 5 mL pufera Wash 2 i to dva puta takođe uz pomoć vakuum pumpe. Nakon svih ispiranja Zymo-Spin V-P kolona se prebacuje u kolektorsku tubu i centrifugira 1 min na 13000 rpm da bi se uklonili ostaci pufera korišćenih za ispiranje plazmidne DNK. Kolona se potom prebacuje u sterilnu 1.5 mL epruvetu i na kolonu se dodaje 400 µL ZymoPURE pufera za eluciju, inkubira se 2 min na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugira na 13000 rpm u trajanju od 1 min. Ovako dobijena plazmidna DNK je čuvana na -20°C do upotrebe.

Gajenje Caco-2 ćelijske linije

Prema referenci [175]

Permanentna Caco-2 ćelijska linija gajena je u medijumu DMEM (*Dullbecco's Modified Minimum Essential Medium*) GlutaMAX (*Gibco*) koji sadrži L-glutamin (0,584 g/L), Na-piruvate (3,7g/L) i glukozu (4,5 g/L). Medijum je obogaćen sa 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, eng. *Fetal Bovine Serum*, *Gibco*) uz dodatak 1% rastvora antibiotika penicilin/streptomycin (10.000 U/mL penicilin i 10 mg/mL streptomycin u 0,9% NaCl) (*Sigma-Aldrich*). Uslovi gajenja u inkubatoru podrazumevali su automatski protok 5% CO₂ i temperaturu od 37°C. Caco-2 su adherentne ćelijske linije i gajene su u odgovarajućim sudovima za ćelijski kulturu. Čelije su pasažirane kada dostignu konfluentnost od 80 do 90%. Najpre je uklanjan medijum, a potom su čelije ispirane dva puta PBS puferom (137 mM NaCl; 3,38 mM KCl; 1,76 mM KH₂PO₄; 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,5). Čelije su odvajane od podloge inkubacijom 3-5 min u 1X tripsin-EDTA (*Sigma-Aldrich*) rastvoru, nakon čega je delovanje enzima zaustavljano dodatkom dvostruke zapremine standardnog kompletnog medijuma u odnosu na korišćenu zapreminu tripsina. Broj ćelija nakon pasažiranja određivan je na hemocitometru (*Hirschmann Laborgeräte*). Čelije su za zamrzavanje pripremane centrifugiranjem 5 min na 1200 rpm i resuspendovanjem taloga ćelija u 900 µL FBS uz dodatak 100 µL dimetilsulfoksida (DMSO) (*Serva*) kao krioprotektivnog agensa. Ovako

pripremljene ćelije su deponovane u tečni azot (-196°C). Nakon svake nove kultivacije, ćelije su posle trećeg pasaža testirane na prisustvo kontaminacije bakterijama iz roda *Mycoplasma*. Za dalji rad su korišćene isključivo ćelije koje su bile negativne na prisustvo ovih bakterija.

Tranzijentna transfekcija Caco-2 ćelijske linije

[protokol za *Lipofectamine 2000 Transfection Reagent-Thermo Fisher Scientific*]

Za transfekciju permanentne ćelijske linije Caco-2 korišćen je reagens *Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific)*. *Lipofectamine 2000* je pozitivno naelektrisani lipozom koji formira kompleks sa plazmidnom DNK i sa visokom efikasnošću omogućava njen prolazak iste kroz ćelijsku membranu tokom transfekcije.

Za eksperimente tranzijentne transfekcije zasejavano je $1,5 \times 10^5$ Caco-2 ćelija u mikrotitar ploče sa 12 bunarića i gajeno pod standardnim uslovima u trajanju od 24 h. Da bi se testiralo postoji li razlika između aktivnosti *wt* i izmenjene sekvence promotora *CYP2C19* gena korišćeni su prethodno pripremljeni konstrukti. Vršena je kotransfekcija sa 250 ng/500 ng /1000 ng konstrukta pGL4.1-2C19-889T ili pGL4.1-2C19-889G sa 3 ng vektora pRL-SV40 po bunariću mikrotitar ploče. U eksperimentima za proveru uticaja glukokortikoidnog odnosno progesteronskog receptora na aktivnost *wt* i izmenjene sekvence promotora *CYP2C19* gena ćelije Caco-2 su kotransfekovane sa 500 ng odnosno 250 ng konstrukata pGL4.1-2C19-889T ili pGL4.1-2C19-889G, sa 3 ng vektora pRL-SV40 i rastućim koncentracijama konstrukata pCDNA3-GR i pCDNA3-PR nezavisno. Količina DNK kojom su transfekovane ćelije je održavana konstantnom uz pomoć plazmida pCDNA3.1.

Smeša za transfekciju pripremana je mešanjem odgovarajuće zapremine ciljnih konstrukata sa medijumom *Optimem (Invitrogen)* do finalne zapremine od 150 µL. U odvojenoj epruveti pripremana je smeša *Lipofectamine 2000* (3µL na 1000ng DNK) sa *Optimem*-om i inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, smeša *Optimema* i lipofektamina je pomešana sa smešom koja sadrži odgovarajuću plazmidnu DNK i inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi kako bi se formirao kompleks između reagensa *Lipofectamin 2000* i plazmidne DNK. Ćelijama je uklanjan medijum u kome su gajene prethodna 24 h, ispirane su dva puta puferom PBS i potom im je dodavan 1 mL medijuma DMEM (*Gibco*) bez FBS i antibiotika. U ovako

pripremljene ćelije je dodavano 100 µL transfekcione smeše po bunariću. Ćelije su zatim gajene u takvom medijumu 5 h pri standardnim uslovima. Nakon 5 sati medijum je zamjenjivan sa 1 mL kompletnog medijuma (DMEM+FBS+Ab) i ćelije su gajene narednih 20-24 h u standardnim uslovima. Nakon toga ćelije su ispirane dva puta sa po 500 µL pufera PBS i zatim lizirane sa 200 µL pufera za lizu 1xPLB (eng. *Passive Lysis Buffer, Promega*) inkubiranjem 30 min na +4°C. Dobijeni ćelijski ekstrakti su sa mikrotitar ploča sakupljeni u čiste epruvete od 1,5 mL i centrifugirani 30 s na 13000 rpm. Za merenje luciferaznih aktivnosti odlivano je po 10 µL ćelijskih ekstrakata u nove epruvete, a ostatak je čuvan na -80°C. Eksperimenti su urađeni najmanje tri puta nezavisno i to uvek u tehničkom triplikatu.

Luciferazni eseji

[protokol za *Dual-Luciferase Reporter Assay System-DLR- Promega*]

Luciferazni eseji omogućavaju analizu aktivnosti promotora gena od interesa u bazičnim ili izmenjenim uslovima. U ovoj studiji korišćen je komercijalno dostupan *Dual-Luciferase Reporter® Assay System-DLR™ (Promega)*. Reporterski vektor pGL4.1, koji čini osnovu konstrukata 2 pGL4.1-C19-889T i pGL4.1-2C19-889G, eksprimira gen za luciferazu svica (*Photinus pyralis*) u zavisnosti od aktivnosti ukloniranog promotora. Luciferazni esej DLR™ omogućava detekciju luciferaze svica koja je pokazatelj aktivnosti ispitivanog promotora u datim eksperimentalnim uslovima, a pored toga ovaj esej omogućava internu kontrolu paralelno detektujući aktivnost luciferaze poreklom od morskog dupljara (*Renilla reniformis*) koja se kotransfekuje sa pGL4.1 konstruktom i ima ulogu u normalizaciji rezultata eseja. Normalizacija aktivnosti pGL4.1 konstrukta u odnosu na aktivnost kontrolnog vektora obezbeđuje minimalizaciju razlika poreklom od vijabilnosti ćelija i/ili efikasnosti transfekcije.

Aktivnost pomenutih luciferaznih enzima dovodi do hemijskih reakcija prilikom kojih se emituje svetlost, čiji se intenzitet meren pomoću aparata GloMax 20/20 Luminometer (*Promega*). Prvo se meri aktivnost luciferaze *P. pyralis* dodavanjem reagensa LAR II (*Luciferase Assay Reagent II*), u kome se nalazi luciferin koji luciferaza *P. pyralis* prevodi u oksiluciferin uz emitovanje svetlosti, čime se generiše stabilan luminescentni signal. Ovaj signal se gasi dodavanjem reagensa STOP&Glo Reagent, u kome se dodatno nalazi i celenterazin koji luciferaza *R. reniformis* prevodi u celenteramid uz emitovanje svetlosti, čime se ujedno generiše

signal za merenje aktivnosti luciferaze *R. reniformis* koji se sam postepeno gasi tokom merenja. Analiza je vršena sa 10 μ L ćelijskih ekstrakata (videti poglavlje: Tranzijentna transfekcija Caco-2 ćelijske linije), a za merenje aktivnosti luciferaza korišćeno je po 50 μ L reagenasa LAR II i STOP & Glo Reagent.

In silico* analiza uticaja c.-889T>G varijante na ekspresiju gena *CYP2C19

Prema referenci [176, 177]

Za identifikaciju potencijalnih mesta vezivanja transkripcionih faktora (TFBS, eng. *Transcription Factor Binding Sites*) u regionu varijante rs11568732 (c.-889T>G) korišćen je program *AlgggenPROMO virtual laboratory tool*. Ovaj program vrši predikciju potencijalnih mesta vezivanja transkripcionih faktora (TF) u zadatoj DNK sekvenci. Za konstrukciju matrica težine za specifična mesta vezivanja transkripcionih faktora program koristi podatke iz TRANSFAC baze podataka. U toku ovog istraživanja *AlgggenPROMO* program koristio je verziju TRANSFAC 7.0 baze podataka. Za predikciju je korišćena sekvenca promotora gena *CYP2C19*, dužine 15 nukleotida uzvodno i nizvodno od varijante rs11568732 (c.-889T>G) nakon čega su poređene razlike u verovatnoći vezivanja predikovanih TF u zavisnosti od nukleotida koji je prisutan na datoj poziciji (T ili G).

Statistička obrada podataka

Za ispitivanje distribucije kontinuiranih varijabli korišćen je *One sample Kolmogorov-Smirnov test*. Kontinuirane varijable sa normalnom distribucijom testirane su pomoću *Student t-testa*, a za kontinuirane varijable koje nisu imale normalnu raspodelu korišćen je *Mann Whitney U test*. Razlike u kategoričkim varijablama između grupa pacijenata analizirane su primenom Pirsonovog χ^2 test. Provera Hardi-Vajnbergove ravnoteže vršena je u programu *Hardy-Weinberg equilibrium calculator*. U studiji asocijacije ispitivanih genskih varijanti sa krvarenjem i ADP indukovanom agregacijom kao mera jačine asocijacije korišćen je OR (eng. *Odds Ratio*) sa intervalom poverenja od 95% CI (eng. *Confidence Interval*). Kao mera statističke značajnosti uzimana je p vrednost manja od 0,05. Za statističku obradu podataka korišćen je program *Statistical Package for Social Science SPSS*, verzija 20.0 (IBM SPSS Statistics, Chicago, USA).

Analiza ekonomske isplativosti farmakogenetički vođene terapije klopidogrelom

Analiza ekonomske isplativosti farmakogenetički vođene terapije klopidogrelom zasnovana je na direktnim i pratećim troškovima izvođenja PCIPCI. Sledeći troškovi su uzeti u obzir pri analizi: hospitalizacija, jedna ponovljena PCI, vaskularna operacija, genetičko testiranje i rehabilitacija.

Za anлізу su korišćene kompjuterski simulirani klinički i ekonomski modeli i primenjeni su intervali merne nesigurnosti korigovani za pristrasnost (eng. *Bias-corrected uncertainty intervals UI*) koji su računati korišćenjem metoda percentila za neparametrijske simulacije. U svakoj simulaciji vrednost svakog parametra određivana je nezavisno i nasumice iz predefinisane raspodele i rezultati su ponovo proračunavani. U ovu svrhu korišćena je Monte Karlo simulacija (eng. *Monte Carlo simulation*) koja je pokrenuta hiljadu puta i rezultati probabilističke analize su korišćeni za računanje intervala merne nesigurnosti (*UI*).

Rezultati

4.1 Analiza povezanosti varijanti *CYP2C19* gena sa kliničkim ishodima tokom terapije klopidogetrom

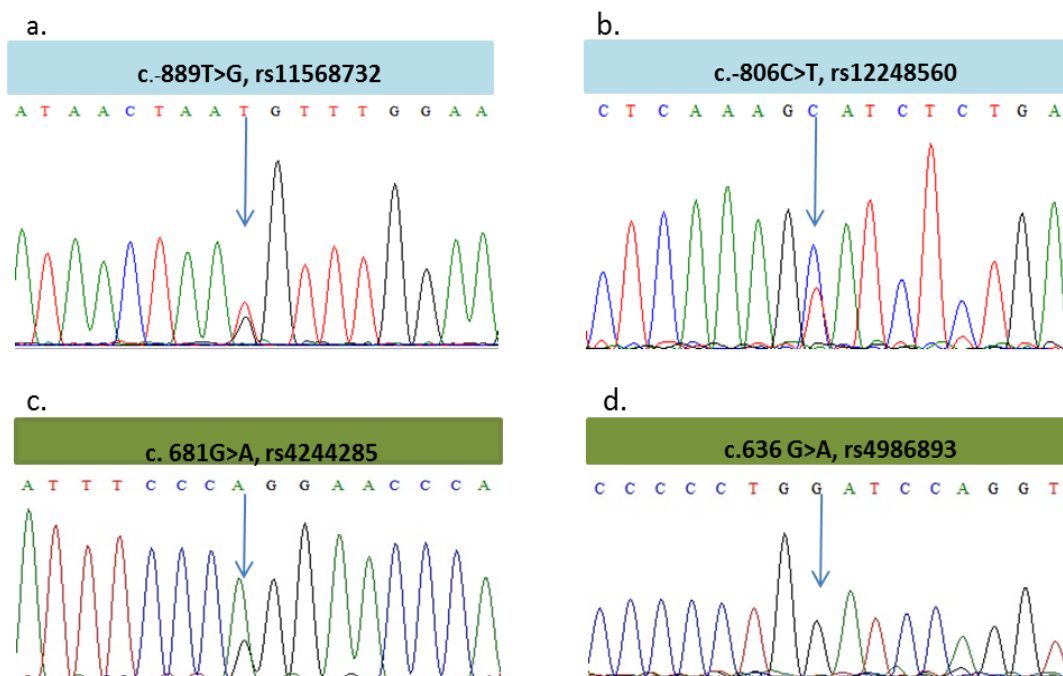
U prvom delu studije analizirana je povezanost odabranih varijanti gena *CYP2C19* sa terapijskim efektima antiagregacionog leka klopidogetra.

Za analizu su odabrane varijante o čijoj učestalosti i efektu ne postoje podaci za pacijente iz Srbije. Reč je o varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*), koja se u literaturi dovodi u vezu sa pojačanim odgovorom na klopidogetr i pojavom krvarenja kod pacijenata na terapiji klopidogetrom [105], kao i o varijanti rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) za koju su naša preliminarna istraživanja pokazala povezanost sa pojavom krvarenja. Varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) i rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*) su razmatrane zbog mogućeg uticaja na efekte promotorskih varijanti.

4.1.1 Detekcija varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*), rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*), rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*), rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*)

Prvi deo ove studije obuhvatao je detekciju pojedinačnih nukleotidnih zamena u genu *CYP2C19* i to varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*), rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*), rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) i rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*) kod STEMI pacijenata podvrgnutih PCI i pacijenata sa stenozom karotidne arterije podvrgnutih CEA.

U cilju detekcije promotorskih varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) umnožavan je region dužine 483 bazna para. Za detekciju varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) koja se nalazi u okviru egzona 5, i čiji manje učestali alel A dovodi do narušavanja mesta iskrajanja introna 5, umnožavan je fragment dužine 474 bp. Za analizu varijante rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*) koja se nalazi u okviru egzona 5 i čiji manje učestali alel A dovodi do nastajanja prevremenog stop kodona umnožavan fragment dugačak 353 bazna para. Sve varijante su detektovane metodom Sangerovog sekvenciranja (Slika 5).



Slika 5 Detekcija varijanti u genu *CYP2C19* **a.** i **b.** deo promotorske sekvence gena kod heterozigotnih nosilaca varijante rs11568732 (**a**) i varijante rs12248560 (**b**), **c.** deo sekvence egzona 5 kod heterozigotnog nosioca varijante rs4244285; **d.** deo sekvence egzona 4 kod homozigota za *wild type* alel varijante rs4986893 .

4.1.2 Analiza povezanosti varijanti gena *CYP2C19* sa pojavom krvarenja kod pacijenata sa infarktom miokarda podvrgnutih PCI i na terapiji klopidogetrom

U ovaj deo studije bilo je uključeno 108 pacijenata koji su podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji nakon infarkta miokarda sa ST elevacijom. Pacijenti su podeljeni u dve grupe u zavisnosti da li i koji tip krvarenja su imali nakon intervencije (Tabela 13). Klasifikacija krvarenja izvršena je na osnovu BARC kriterijuma.

Tabela 13 Raspodela pacijenata prema BARC tipu krvarenja.

| | Tip BARC krvarenja (n) | | | | |
|---------------|------------------------|---------|----|----|----|
| | BARC<2 | BARC≥ 2 | | | |
| | 0+1 | 2 | 3a | 3b | 3c |
| | 55 | 16 | 27 | 9 | 1 |
| Ukupno | 55 | 53 | | | |

n-broj pacijenata u grupi; *nije bilo pacijenata koji su imali tip 4 i tip 5 BARC krvarenja

Prvu grupu činili su pacijenti koji nisu imali ozbiljnije krvarenje i klasifikovani su u tip 0 i 1 prema BARC kriterijumima (BARC<2). U ovoj grupi od 55 pacijenta, 30 (54,5%) su bile žene, a

prosečna starost u ovoj grupi iznosila je 64,85 godina. Drugu grupu je činilo 53 pacijenta sa krvarenjem $BARC \geq 2$ i to 16 sa krvarenjem tip 2 i njih 37 sa krvarenjem tip 3. Od njih 53, 29 (54,7%) su bile žene, a prosečna starost u ovoj grupi pacijenata iznosila je 66,47 godina. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata prema tipu krvarenja date su u Tabeli 14.

Tabela 14 Demografske i kliničke karakteristike pacijenata prema tipu krvarenja.

| Karakteristika | BARC < 2 (n= 55) | BARC ≥ 2 (n=53) | p (BARC < 2 vs. BARC ≥ 2) |
|--|---------------------|--------------------|---------------------------------|
| Demografske karakteristike | | | |
| Starost (god), srednja vrednost ± SD | 64,85± 11,14 | 66,47±13,42 | 0,497 [‡] |
| Pol (ženski), n (%) | 30 (54,55) | 29 (54,7) | 0,989 [*] |
| BMI, srednja vrednost ± SD | 26,19 ± 4,63 | 25,90± 4,13 | 0,715 [‡] |
| Prethodna oboljenja i faktori rizika | | | |
| Diabetes melitus, n (%) | 14 (25,5) | 17 (29,31) | 0,447 [*] |
| Hipertenzija, n (%) | 40 (72,7) | 40 (75,5) | 0,745 [*] |
| Hiperlipidemija, n (%) | 37 (67,3) | 29 (54,7) | 0,181 [*] |
| Pušači, n (%) | 25 (45,5) | 23 (41,4) | 0,830 [*] |
| Prethodni infarkt miokarda, n (%) | 4 (7,3) | 6 (11,3) | 0,468 [#] |
| Prethodna PCI, n (%) | 2 (3,6) | 1 (1,9) | 0,527 [#] |
| Prethodno aortno-karotidno premošćenje, n (%) | 0 (0) | 0 (0) | / |
| Prethodni moždani udar, n (%) | 4 (7,3) | 4 (7,5) | 0,957 [#] |
| Prethodna srčana ishemija, n (%) | 0 (0) | 1 (1,9) | 0,306 [#] |
| Višesudovna bolest, n (%) | 34 (61,8) | 31 (58,5) | 0,724 [*] |
| Laboratorijski parametri pri prijemu | | | |
| Ejekciona frakcija (µmol/L), srednja vrednost ± SD | 45,91 ± 11,50 | 45,70 ± 9,73 | 0,918 [‡] |
| Serumski kreatinin (µmol/l), srednja vrednost ± SD | 81,34± 21,72 | 86,15±38,77 | 0,907 [†] |
| Broj trombocita (*10 ⁻⁹ /L) , srednja vrednost ± SD | 227,29±72,31 | 238,81±84,72 | 0,441 [†] |
| Hemoglobin (g/L), srednja vrednost ± SD | 139,34±14,69 | 134,38±19,78 | 0,276 [‡] |
| Terapija na prijemu | | | |
| Glikoprotein IIb/IIIa inhibitori, n (%) | 14 (25,5) | 22 (41,5) | 0,077 [*] |
| Beta blokatori, n (%) | 18 (32,7) | 14 (26,4) | 0,473 [*] |
| ACE/ARB blokatori, n (%) | 28 (50,9) | 27 (50,9) | 0,997 [*] |
| Kumarinski derivati, n (%) | 3 (5,5) | 7 (13,2) | 0,165 [#] |
| Statini, n (%) | 9 (16,4) | 5 (9,4) | 0,284 [*] |

BARC-tip krvarenja; n- broj pacijenata; SD- standardna devijacija; BMI- indeks telesne mase (eng. *body mass index*); ACE- angiotenzin konvertujući enzim (eng. *angiotensin converting enzyme*); ARB-blokator angiotenzin II receptora (eng. *Angiotensin II Receptor Blocker*); p- statistička značajnost dobijena : ‡ t- testom, * Pirsonovim χ^2 testom, # Fišerovim egzaktnim testom, † Mann-Withney U testom

Svih 108 pacijenata testirano je na prisustvo dve pojedinačne nukleotidne zamene u promotorskom regionu gena *CYP2C19* i to rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*). Učestalost alela T varijante rs12248560 (c.-806C>T) bila je 20,25% a zastupljenost genotipova bila je sledeća: tri pacijanta (2,78%) su bila homozigoti za manje učestali alel (TT), a 40 (37,04%) heterozigotni nosioci ovog alela (CT), dok su njih 65 (60,18%) bili homozigoti za *wild type* alel (CC). Učestalost alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G) bila je

6,61%, a zastupljenost genotipova je bila sledeća: 16 (14,81%) pacijenata bili su heterozigoti (TG), njih 92 (81,19%) bili su homozigoti za *wild type* alel (TT), a homozigotni nosioci manje učestalog alela (G) nisu detektovani. Učestalosti alela varijanti rs12248560 i rs11568732 bile su u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži (Tabela15).

Tabela 15 Zastupljenost manje učestalih alela varijanti rs12248560 (T) i rs11568732 (G) i test Hardi-Vajnbergove ravnoteže.

| Varijanta gena <i>CYP2C19</i> | Učestalost alela | % | p |
|----------------------------------|------------------|-------|--------|
| rs12248560 <i>CYP2C19*17</i> (T) | 49/242 | 20,25 | 0,2697 |
| rs11568732 <i>CYP2C19*20</i> (G) | 16/242 | 6,61 | 0,4361 |

p-statistička značajnost Pirsonovog χ^2 testa

Ispitivanje povezanosti varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) sa pojavom krvarenja pokazalo je da ne postoji značajna razlika u učestalosti alela varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) između pacijenata koji su imali krvarenje BARC<2 i grupe koja je imala krvarenje BARC≥2 (OR=0,53; 95% CI=0,24-1,15; p=0,107) (Tabela 16). Međutim, varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) pokazala je značajnu udruženost sa pojavom krvarenja (BARC≥2). Među pacijentima koji su krvarili (BARC≥2), 12 su nosioci alela G varijante rs11568732, dok se u grupi koja nije imala ozbiljnije krvarenje (BARC<2) našlo samo 4 nosioca pomenutog alela. Kao što je pokazano u Tabeli 16 nosici alela G varijante rs11568732 imaju oko 4 puta veću mogućnost da dožive krvarenje BARC≥2 (OR=3,7; 95% CI=1,12-12,44; p=0,025).

Tabela 16 Udruženost varijanti rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) i rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) gena *CYP2C19* i krvarenja.

| | genotip | BARC<2, n=55 (100%) | BARC≥2, n=53 (100%) | OR (CI 95%) | P |
|---|---------|------------------------|------------------------|----------------------|-------|
| rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19*20</i>) | GG i GT | 4 (7,3) | 12 (22,6) | 3,73 (1,12-12,44) | 0,025 |
| | TT | 51 (92,7) | 41 (77,4) | | |
| rs12248560 (c.-806C>T, <i>CYP2C19*17</i>) | CT i TT | 26 (47,3) | 17 (32,1) | 0,53 (0,24-0,15) | 0,107 |
| | CC | 29 (52,7) | 36 (67,9) | | |

BARC-tip krvarenja; n- broj pacijenata u grupi; OR-Odds Ratio; CI-interval poverenja; p-statistička značajnost Pirsonovog χ^2 testa

Kako bismo dodatno proverili povezanost krvarenja sa varijantom rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) Fišerovim testom smo proverili da li postoje značajne razlike u demografskim i kliničkim karakteristikama pacijenata koji su bili nosioci alela G ispitivane varijante u odnosu na tip krvarenja. Kao što se vidi u Tabeli 17 razlika u demografskim i kliničkim karakteristikama nije postojala.

Tabela 17 Demografske i kliničke karakteristike nosilaca alela G varijante rs11568732 prema tipu krvarenja.

| Karakteristika | BARC < 2, (n=4) | BARC ≥ 2, (n=12) | p (BARC < 2 vs. BARC ≥ 2) |
|---|-----------------|------------------|---------------------------------|
| Demografske karakteristike | | | |
| Starost (god), srednja vrednost ± SD | 67,25 ± 9,71 | 66,25 ± 13,85 | 0,896 [‡] |
| Pol (ženski), n (%) | 1 (25,0) | 6 (50,0) | 0,585 [#] |
| BMI, srednja vrednost ± SD | 26,47 ± 4,67 | 26,00 ± 4,76 | 0,864 [‡] |
| Prethodna oboljenja i faktori rizika | | | |
| Diabetes melitus, n (%) | 0 (0) | 2 (16,7) | 1 [#] |
| Hipertenzija, n (%) | 3 (75,0) | 11 (91,7) | 0,450 [#] |
| Hiperlipidemija, n (%) | 3 (75,0) | 6 (50,0) | 0,585 [#] |
| Pušači, n (%) | 1 (25,0) | 7 (58,3) | 0,569 [#] |
| Prethodni infarkt miokarda, n (%) | 1 (25,0) | 0 (0) | 0,250 [#] |
| Prethodna PCI, n (%) | 0 (0) | 1 (8,33) | 1 [#] |
| Prethodno aortno-karotidno premošćenje, n (%) | 0 (0) | 0 (0) | 1 [#] |
| Prethodni moždani udar, n (%) | 0 (0) | 1 (8,32) | 1 [#] |
| Prethodna srčana ishemija, n (%) | 0 | 0 (0) | 1 [#] |
| Višesudovna bolest, n (%) | 1 (25,0) | 5 (41,7) | 1 [#] |
| Laboratorijski parametri pri prijemu | | | |
| Ejkciona frakcija (μmol/L), srednja vrednost ± SD | 48,50 ± 13,30 | 43,50 ± 14,41 | 0,551 [‡] |
| Serumski kreatinin (μmol/l), srednja vrednost ± SD | 66,00 ± 5,29 | 79,16 ± 20,43 | 0,233 [†] |
| Broj trombocita (*10 ⁻⁹ /L), srednja vrednost ± SD | 230,00 ± 88,71 | 263,16 ± 57,40 | 0,394 [†] |
| Hemoglobin (g/L), srednja vrednost ± SD | 132,00 ± 12,98 | 137,75 ± 18,62 | 0,580 [‡] |
| Terapija na prijemu | | | |
| Glikoprotein IIb/IIIa inhibitori, n (%) | 3 (75,0) | 5 (41,7) | 0,569 [#] |
| Beta blokatori, n (%) | 3 (75,0) | 6 (50,0) | 0,245 [#] |
| ACE/ARB blokatori, n (%) | 3 (75,0) | 7 (58,3) | 1 [#] |
| Kumarinski derivati, n (%) | 0 (0) | 2 (16,7) | 1 [#] |
| Statini, n (%) | 2 (50,0) | 0 (0) | 0,050 [#] |

BARC-tip krvarenja; n-broj pacijenata; SD-standardna devijacija; BMI-indeks telesne mase (eng. *body mass index*); ACE- angiotenzin konvertujući enzim (eng. *angiotensin converting enzyme*); ARB- angiotenzin II receptora (eng. *Angiotensin II Receptor*); p- statistička značajnost dobijena : ‡ t-testom, # Fišerovim egzaktnim testom, † Mann-Withney U testom

Nakon analize varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) koje se nalaze u okviru promotora gena *CYP2C19*, urađena je i genotipizacija ovih pacijenata za egzonske varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*), rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*) čiji manje učestali aleli dovode do sinteze nefunkcionalnog proteina i na taj način mogu da ponište uticaj ispitivanih promotorskih varijanti. Učestalost alela A varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) iznosila je 14,81%, a zastupljenost genotipova je bila sledeća: jedan pacijent (0,9%) bio je homozigotni nosilac (AA), 30 (27,8%) su bili heterozigotni nosioci ovog alela (GA), a 77 (71,3%) su bili homozigoti za *wt* alel (GG). Učestalost alela ove varijante takođe je bila u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži. Što se tiče varijante rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*) manje učestali alel A nije detektovan u ispitivanoj grupi pacijenata (Tabela 18).

Tabela 18 Zastupljenost manje učestalih alela varijanti rs4244285 (A) i rs4986893 (A) i test Hardi-Vajnbergove ravnoteže.

| Varijanta gena <i>CYP2C19</i> | Učestalost alela | % | p |
|--------------------------------|------------------|-------|-------|
| rs4244285 <i>CYP2C19*2</i> (A) | 36/242 | 14,81 | 0,296 |
| rs4986893 <i>CYP2C19*3</i> (A) | 0 | 0 | / |

p- statistička značajnost Pirsonovog χ^2 testa

Kako alel A varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) dovodi do sinteze nefunkcionalnog enzima, logističkom regresijom proveren je njegov potencijalni uticaj na povezanost varijante rs11568732 sa krvarenjem $\text{BARC} \geq 2$. Rezultati regresione analize pokazali su da i nakon korekcije na prisustvo alela A varijante rs4244285, varijanta rs11568732 ostaje povezana sa povećanim rizikom od krvarenja u grupi pacijenata sa $\text{BARC} \geq 2$ (OR, 3,52; 95 %CI, 1,05-11,89; p=0,042).

4.1.3 Sekvenciranje *CYP2C19* gena kod nosioca alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*)

Kako u literaturi ne postoje podaci o povezanosti varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) sa krvarenjima ili drugim kliničkim ishodima kod pacijenata na terapiji klopidogetrelom, proverili smo da li se ona nasleđuje vezano sa nekom do sada funkcijski okarakterisanom pojedinačnom nukleotidnom zamenom u genu *CYP2C19*. U tu svrhu izvršeno je sekvenciranje svih devet egzona, okolnih delova introna, kao i 3' UTR i 5' UTR (za detalje pogledati poglavlje Metode) kod svih 16 heterozigotnih nosilaca alela G varijante rs11568732. Takđe, svi navedeni regioni gena *CYP2C19* su sekvencirani i kod četiri nasumično izabrana homozigotna nosioca alela T (*wt*). Rezultati sekvenciranja prikazani su u Tabeli 19.

Alel G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) je u ranije objavljenim studijama svrstan u haplotip *CYP2C19*3B* (Prilog A) [93]. Međutim, sekvenciranjem gena kod nosilaca alela G varijante rs11568732 ustanovili smo da nijedan od pacijenata ne poseduje manje učestale alele varijanti rs4986893 (c.636G>A, *CYP2C19*3*), rs144036596 (c.1078G>T), rs17886522 (c.1251A>C) i rs17878649 (c.169-47G>A) iz tog haplotipa. Na ovaj način ustanovili smo da alel G varijante rs11568732 pripada haplotipu koji je nezavisan od haplotipa *CYP2C19*3B*.

Dalje, svi heterozigotni nosioci alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*), su istovremeno heterozigotni nosioci manje učestalih alela varijanti rs17884832 (c.169-340T>G), rs7916649 (c.169-231G>A), rs17879992 (c.481+332T>C), rs7088784 (c.643-205A>G), rs3758581 (c.991 A>G) koji su takođe svrstani u haplotip *CYP2C19*3B*.

Tabela 19 Pojedinačne nukleotidne zamene pronađene kod heterozigotnih nosilaca alela G i homozigotnih nosilaca wt alela varijante rs11568732.

| pacijenti | genske varijante | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| | *20 c.-889T>G rs11568732 | *17 c.-806 C>T rs12248560 | *2 c.681 G>A rs4244285 | *3 c.636G>A rs4986893 | c.-98 T>C rs4986894 | c.99C>T rs17885098 | c.990C>T V330V rs3758580 | c.991A>G I331V rs3758581 | c.331+75C>T rs17887022 | *35 c.332-23A>G rs12769205 | c.820-113T>G rs28399511 | c.169-340T>G rs17884832 T>G | c.169-231G>A rs7916649 G>A | c.169-47G>A rs17878649 | c.481+332T>C rs17879992 | c.643-205A>G rs7088784 | c.1078G>C rs144036596 | c.1251A>C p.Gly417= rs17886522 |
| ANC35 | TG | CC | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANC47 | TG | CC | GA | GG | CT | CT | CT | AG | CC | AG | TG | TG | AA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANC48 | TG | CT | GG | GG | TT | TT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANC51 | TG | CC | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK3 | TG | CC | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK18 | TG | CC | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK20 | TG | CC | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK29 | TG | CT | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | AA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK38 | TG | CC | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK39 | TG | CC | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK42 | TG | CT | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CT | AA | TG | TG | AA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK50 | TG | CC | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK55 | TG | CC | GA | GG | CT | CT | CT | AG | CC | AG | TG | TG | AA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK68 | TG | CC | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK70 | TG | CC | GA | GG | CT | CT | CT | AG | CC | AG | TG | TG | AA | GG | TC | AG | GG | AA |
| ANK72 | TG | CC | GG | GG | TT | CT | CC | AG | CC | AA | TG | TG | GA | GG | TC | AG | GG | AA |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ANC4 | TT | CC | GA | GG | CT | TT | CT | GG | CC | AG | TT | TT | GA | GG | TT | AA | GG | AA |
| ANC5 | TT | CC | GG | GG | TT | TT | CC | GG | CC | AA | TT | TT | GG | GG | TT | AA | GG | AA |
| ANC27 | TT | TT | GG | GG | TT | TT | CC | GG | CC | AA | TT | TT | AA | GG | TT | AA | GG | AA |
| ANK19 | TT | CC | GG | GG | TT | TT | CC | GG | CC | AA | TT | TT | GG | GG | TT | AA | GG | AA |

*zatomljena zaglavlja kolona predstavljaju varijante čiji su manje učestali aleli svrstani u haplotip *CYP2C19**3B prema relevantnoj bazi podataka [93]

** ANC4, ANC5, ANC27 i ANK19 su nasumično izabrani pacijenti koji su homozigoti za wt alel varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20)

4.2 Ispitivanje povezanosti varijanti rs12248560 (c.-806C>T, CYP2C19*17) i rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20) sa terapijskim odgovorom na klopidogrel procenjenim na osnovu ADP-indukovane agregacije trombocita

Ovaj deo studije obuhvatao je detekciju promotorskih varijanti gena *CYP2C19* kod 108 pacijenata sa stenozom karotidne arterije kod kojih je izvršena endarterektomija. U ovoj grupi bilo je 45 žena (41,7%), a prosečna starost u grupi je iznosila 66,31 godina. Suženje karotidnih arterija veće od 70% bilo je prisutno kod 91 (84,3%) pacijenata, a kod njih 70 (64,8%) bila je prisutna stenozna obe karotide. U Tabeli 20 prikazani su demografski i klinički podaci o pacijentima prikupljeni na prijemu u bolnicu.

Tabela 20 Demografski i klinički podaci pacijenta podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji.

| Karakteristika | n=108 |
|---|----------------|
| Demografske karakteristike | |
| Starost (god), srednja vrednost ± SD | 66,31 ± 8,22 |
| Pol (ženski), n (%) | 45 (41,7) |
| BMI, srednja vrednost ± SD | 26,55 ± 3,45 |
| Prisutvo stenozne obe karotidne arterije, n (%) | 70 (64,8) |
| Suženje karotidnih arterija >70%, n (%) | 91 (84,3) |
| Prethodna oboljenja i faktori rizika | |
| Hiperholesterolemija (%) | 38 (35,2) |
| Hipertrigliceridemija (%) | 25 (23,1) |
| Pušači, n (%) | 81 (75,0) |
| Prehodni TIA, n (%) | 7 (6,5) |
| Prehodni moždani udar, n (%) | 33 (30,5) |
| Pozitivna porodična istorija kardiovaskularnih bolesti, n (%) | 40 (37,0) |
| Laboratorijski parametri pri prijemu | |
| Serumski kreatinin (μmol/l), srednja vrednost ± SD | 83,63 ± 27,00 |
| Broj trombocita (*10 ⁹ /L), srednja vrednost ± SD | 219,50 ± 57,35 |
| Hemoglobin (g/L), srednja vrednost ± SD | 136,04 ± 12,10 |
| Terapija na prijemu | |
| Beta blokatori, n (%) | 40 (37,0) |
| ACE/ARB blokatori, n (%) | 65 (60,2) |
| Blokatori kalcijumovih kanala, n (%) | 34 (31,5) |
| Statini, n (%) | 52 (48,1) |

n-broj pacijenata; SD- standardna devijacija; BMI- indeks telesne mase (eng. *Body Mass Index*); TIA- tranzijentni ishemijski napad (eng. *Transient Ischemic Attack*); ACE-angiotenzin konvertujući enzim (eng. *Angiotensin Converting Enzyme*); ARB- angiotenzin II receptora (eng. *Angiotensin II Receptor*)

Učestalost varijanti rs12248560 (c.-806C>T, CYP2C19*17) i rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20) kod pacijenata sa stenozom karotidne arterije kod kojih je izvršena endarterektomija

Pacijenti podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji genotipizirani su na dve varijante u okviru promotorskog regiona gena CYP2C19, rs12248560 (c.-806C>T, CYP2C19*17) i rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20).

Učestalost alela T varijante rs12248560 bila je 28,24%; a zastupljenost genotipova je bila sledeća: pet pacijenata (4,63%) su bili homozigotni nosioci alela T (TT), 51 (47,22%) pacijent je bio heterozigotni nosilac ovog alela (CT), a njih 52 (48,15%) su bili homozigoti za *wild type* alel (CC) (Tabela 21). Učestalost alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G) bila je 7,41%. Zastupljenost genotipova je bila sledeća: samo jedan pacijent (0,93%) je bio homozigotni nosilac alela G, 14 (12,96%) pacijenata su bili heterozigotni nosioci (TG), a njih 93 (86,11%) bili su homozigoti za *wild type* alel (TT) (Tabela 21). Učestalosti alela varijanti rs12248560 i rs11568732 bile su u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži (Tabela 22). **Tabela 21** Učestalost genotipova za varijante rs12248560 (c.-806C>T, CYP2C19*17) i rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20) kod pacijenata sa stenozom karotidnih arterija.

| Varijante gena CYP2C19 | Učestalost genotipova n (%) | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------|----------|
| | CC | CT | TT |
| rs12248560 CYP2C19*17 c. -806 C>T | 52 (48,15) | 51 (47,22) | 5 (4,63) |
| rs11568732 CYP2C19*20 c.-889 T>G | 93 (86,11) | 14 (12,96) | 1 (0,93) |

n-broj pacijenata

Tabela 22 Zastupljenost manje učestalih alela varijanti rs12248560 (T) i rs11568732 (G) i test Hardi-Vajnbergove ravnoteže.

| Varijante gena CYP2C19 | Učestalost alela | % | p |
|---------------------------|------------------|-------|--------|
| rs12248560 CYP2C19*17 (T) | 61/216 | 28,24 | 0,0862 |
| rs11568732 CYP2C19*20 (G) | 16/216 | 7,41 | 0,5676 |

p- statistička značajnost Pirsonovog χ^2 testa

4.2.1 Agregabilnost trombocita pri terapiji klopidogrelom kod pacijenata sa stenozom karotide podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji

Agregabilnost trombocita kod pacijenata podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji praćena je metodom multiple elektrodne agregometrije pomoću ADP HS testa. Merenja su izvršena u četiri vremenske tačke: pre hirurške intervencije, a zatim 24 sata, sedmog i tridesetog dana terapije i prikazana je preko srednjih vrednosti i standardne devijacije u Tabeli 23.

Tabela 23. Vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita tokom terapije klopidogrelom kod pacijenata podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji u četiri vremenske tačke.

| Vreme merenja | ADPag [AU*min] (SV±SD) |
|---------------|---------------------------|
| Pre operacije | 765,47 ± 142,00 |
| 24 h | 698,05 ± 188,97 |
| 7 dan | 512,06 ± 211,02 |
| 30 dan | 439,57 ± 218,79 |

ADPag- ADP-indukovana agregacija trombocita;
SV-srednja vrednost; SD-standardna devijacija

Poređenje vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita u različitim vremenskim tačkama prikazano je u Tabeli 24.

Tabela 24 Poređenje promene vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita tokom terapije klopidogrelom kod pacijenata podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji.

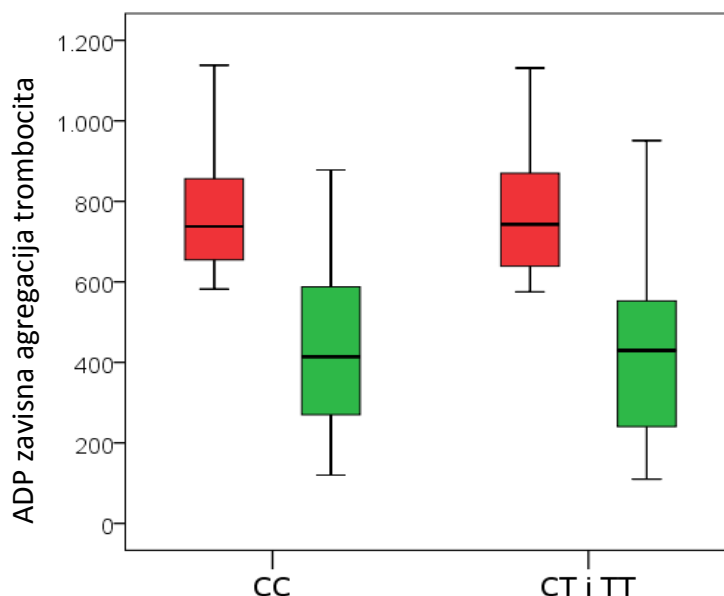
| Poređivane vrednosti | Prosečno smanjenje | Interval poverenja 95 % | | t | p |
|----------------------|--------------------|-------------------------|----------------|--------|--------|
| | | Donja granica | Gornja granica | | |
| ADPpreop - ADP24h | 67,426 | 31,203 | 103,649 | 3,690 | <0,001 |
| ADPpreop - ADP7dan | 253,407 | 207,581 | 299,234 | 10,962 | <0,001 |
| ADPpreop - ADP30dan | 325,898 | 276,194 | 375,602 | 12,998 | <0,001 |
| ADP24h - ADP7dan | 185,981 | 143,606 | 228,357 | 8,701 | <0,001 |
| ADP24h - ADP30dan | 258,472 | 206,246 | 310,699 | 9,811 | <0,001 |
| ADP7dan - ADP30dan | 72,491 | 35,019 | 109,963 | 3,835 | <0,001 |

ADPpreop – ADP-indukovana agregacija pre operacije; ADP24h- ADP-indukovana agregacija 24h nakon početka terapije klopidogrelom, ADP7dan- ADP-indukovana agregacija 7. dana nakon početka terapije klopidogrelom; ADP30 dan- ADP-indukovana agregacija 30. dana nakon početka terapije klopidogrelom, t-mera razlike između grupa uzoraka u odnosu na varijaciju, p-statistička značajnost t-testa.

T testom uparenih uzoraka procenjen je uticaj terapije klopidogrelom na ADP zavisnu agregaciju trombocita. Utvrđeno je značajno smanjenje aktivnosti trombocita između svih vremenskih tačaka merenja (Tabela 24). Prosečno smanjanje vrednosti ADP agregacije između merenja pre terapije klopidogrelom ($765,47 \pm 142,00$ AU*min) i 24h nakon prve doze ($698,05 \pm 188,97$ AU*min) iznosilo je $67,43$ AU*min, $t=3,69$, $p<0,0005$. Dalje, prosečno smanjanje vrednosti ADP agregacije između merenja 24h nakon prve doze ($698,05 \pm 188,97$ AU*min) i sedmog dana terapije ($512,06 \pm 211,02$ AU*min) iznosilo je $185,98$ AU*min, $t=8,70$, $p<0,0005$. Smanjenje aktivnosti trombocita se nastavilo i dalje tokom terapije, pa je prosečno smanjanje vrednosti ADP agregacije između merenja sedmog dana terapije ($512,06 \pm 211,02$ AU*min) i tridesetog dana iznosilo je $109,96$ AU*min, $t=3,83$, $p<0,0005$. Razlika između ADP agregacije pre operacije i 30 dana nakon terapije iznosila je $325,89$, $t=13$, $p<0,0005$.

4.2.2 ADP-zavisna agregacija trombocita kod pacijenata na terapiji klopidogrelom u zavisnosti od *CYP2C19* genotipa

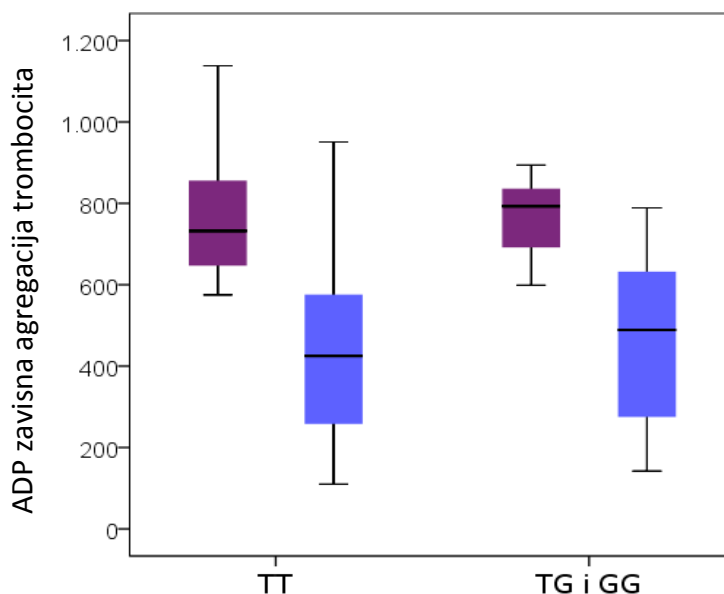
Vrednosti ADP testa nije se značajno razlikovala u zavisnosti od varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) kod pacijenata pre operacije ($p=0,946$) i 30. dana terapije ($p=0,379$) (Grafik 1). Medijana ADP-zavisne agregacije kod homozigotnih nosilaca alela C varijante rs12248560 pre operacije iznosila je $737,5$ [654,2-856,5] AU*min dok je za nosioce alela T bila $743,0$ AU*min [635,5-877,0]. Tridesetog dana terapije klopidogrelom medijana kod *wt* homozigota iznosila je $414,0$ [270,0- 591,7] AU*min, a za homozigotne i heterozigotne nosioce alela T ona je bila $429,5$ [235,7-554,2] AU*min.



Grafik 1 Vrednost ADP-zavisne agregacije trombocita u zavisnosti od genotipa varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) pre terapije i 30. dana terapije klopidogrelom.

- ADP zavisna agregacija trombocita merena pre operacije (ADPpreop)
- ADP zavisna agregacija trombocita merena 30. dana posle operacije (ADP30dan)

Vrednost ADP-zavisne agregacije trombocita kod homozigotnih i heterozigotnih nosilaca alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) nije se razlikovala u odnosu na vrednosti kod homozigotnih nosilaca *wt* alela (TT), ni u trenutku merenja pre operacije ($p=0,469$) što je očekivano, ali ni pri merenju tridesetog dana nakon terapije klopidogrelom (0,790) (Grafik 2). Kod homozigotnih nosilaca *wt* alela (TT) varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) medijana ADP-zavisne agregacije trombocita pre operacije iznosila je 732 [646,50-861,50] AU*min dok je za nosioce alela G (TG i GG) ove varijante bila 793 [684,00-857,00] AU*min. Tridesetog dana terapije klopidogrelom kod homozigotnih nosilaca alela T medijana je iznosila 425 [257,00-577,50] AU*min, a za nosioce alela G ona je bila 489 [270,00-695,00] AU*min.



Grafik 2 Vrednost ADP-zavisne agregacije trombocita u zavisnosti od genotipa varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) pre terapije klopidogrelom i 30. dana terapije.

- ADP zavisna agregacija trombocita merena pre operacije (ADPpreop)
- ADP zavisna agregacija trombocita merena 30. dana posle operacije (ADP30dan)

4.2.3 Procena rizika za pojavu krvarenja tokom terapije klopidogrelom na osnovu ADP-indukovane agregacije trombocita

Na osnovu ADP-zavisne agregacije trombocita, pristupili smo proceni odgovora na terapiju klopidogrelom. Definisane su granične vrednosti ADP-indukovane agregacije koje ukazuju na pacijente sa pojačanim odgovorom na terapiju, a to su takođe i pacijenti koji mogu imati povećan rizik od krvarenja. Granične vrednosti definisane su na tri različita načina:

1. Prva granična vrednost definisana je kao 25. percentil vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita 30. dana terapije klopidogrelom (260,25 AU*min).
2. Druga granična vrednost bila je stepen inhibicije trombocita od 70% koji je izračunat prema sledećoj formuli:

$$1 - \frac{\text{ADP indukovana agregacija 30 dan}}{\text{ADP indukovana agregacija pre operacije}} * 100\% = \text{stepen inhibicije trombocita}$$

3. Treća granična vrednost iznosila je 188 AU*min, data je od strane Sibbing i saradnika [166], a preporučena od strane proizvođača ADP HS testa korišćenog u našoj studiji

Analiza povezanosti *CYP2C19* varijanti i pojačanog odgovora na klopidogrel

Prva granična vrednost

Kako je prva granična vrednost definisana kao vrednost 25. percentila ADP-indukovane agregacije trombocita 30. dana terapije klopidogrelom, svi pacijenti koji su imali vrednost ADP-agregacije manju ili jednaku od 260,25 AU*min 30. dana terapije klopidogrelom, smatrani su pacijentima sa pojačanim odgovorom na klopidogrel, a time i povećanim rizikom od krvarenja i bilo ih je 27 (25%).

Među pacijentima koji su prema ovoj graničnoj vrednosti imali pojačan odgovor na klopidogrel njih 15 (55,6%) su bili nosioci alela T varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17), a 12 (44,4%) homozigotni nosioci alela C (Tabela 25).

Što se tiče varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20), samo tri nosioca (11,1%) alela G ove varijante pripadala su grupi pacijenata sa povećanim rizikom od krvarenja, dok 12 pacijenata (14,8%) nije imalo povećan rizik od krvarenja prema ovoj graničnoj vrednosti (Tabela 25).

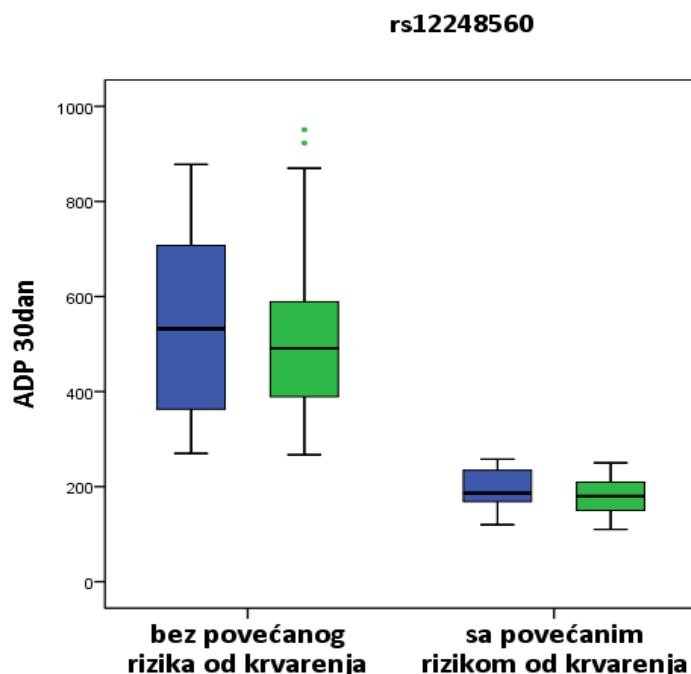
Tabela 25 Povezanost varijanti rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) i rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) gena *CYP2C19* sa povećanim rizikom od krvarenja.

| Varijante gena <i>CYP2C19</i> | Genotip | ADP-indukovana agregacija [#] | | OR (CI 95%) | p |
|--|---------|--|-----------------------------|---------------------|-------|
| | | ≤260,25 AU*min, n=27 (100%) | >260,25 AU*min, n=81 (100%) | | |
| rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19</i> *20) | GG i GT | 3 (11,1) | 12 (14,8) | 0,72 (0,19-2,77) | 0,630 |
| | TT | 24 (88,9) | 69 (85,2) | | |
| rs12248560 (c.-806C>T, <i>CYP2C19</i> *17) | TT i CT | 15 (55,6) | 41 (50,6) | 1,22 (0,51-2,93) | 0,657 |
| | CC | 12 (44,4) | 40 (49,4) | | |

n- broj pacijenata u grupi; OR-Odds Ratio; CI-interval poverenja; p-statistička značajnost; # ADP-indukovanu agregacija ≤ 260,25 AU*min indikovala je povećan rizik od krvarenja; p-statistička značajnost Pirsonovog χ^2 testa

U grupi pacijenata sa povećanim rizikom od krvarenja medijana ADP-zavisne agregacije tridesetog dana terapije klopidogrelom kod homozigotnih nosilaca alela C varijante rs12248560 iznosila je 180,0 [150,0-220,0] AU*min, dok je za nosioce alela T ove varijante bila 186,5 [167,7-

236,7] AU*min. Medijana kod pacijenata koji pripadaju grupi bez povećanog rizika za krvarenje i bili nosioci alela T varijante rs12248560 je iznosila 491,0 [382,5-594,5] AU*min, a kod homozigotnih nosilaca wt alela (C) ona je bila 532,0 [359,5-713,7] AU*min (Grafik 3).

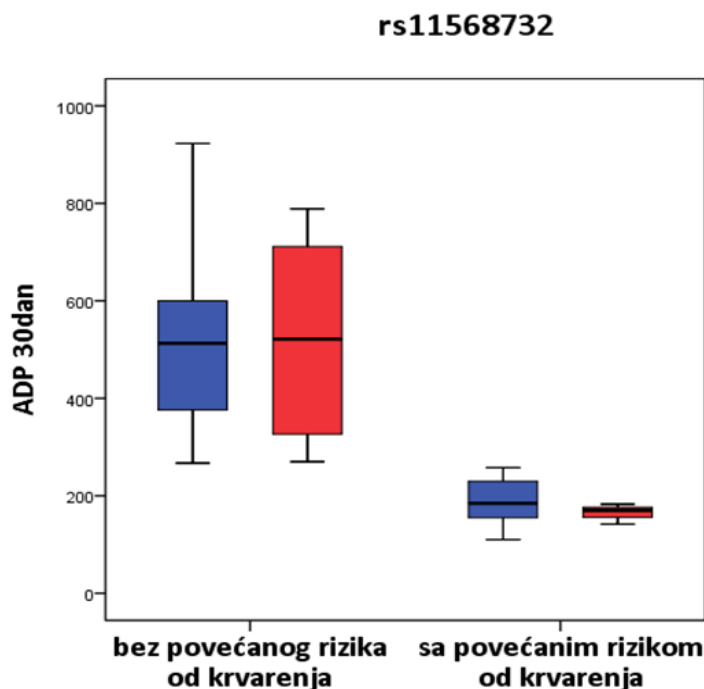


Grafik 3 ADP-zavisna agregacija trombocita tridesetog dana terapije klopidogrelom prema riziku od krvarenja u zavisnosti od varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*). Rizik predstavlja ADP-indukovanu agregaciju $\leq 260,25$ AU*min.

■ nosioci genotipa CC

■ nosioci genotipa CT i TT

Tridesetog dana terapije klopidogrelom kod nosilaca alela T varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) koji pripadaju grupi sa povećanim rizikom za krvarenje medijana ADP zavisne agregacije iznosila je 184,5 [152,5-230,0] AU*min dok je za nosioce alela G ove varijante bila 170,0 [142,0-183,0] AU*min. Medijana kod pacijenata koji su pripadali grupi bez povećanog rizika za krvarenje i bili nosioci G alela varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) je iznosila 521,5 [304,7-719,79] AU*min, a za homozigotne nosioce wt alela (T) ona je bila 513,0 [373,0-605,0] AU*min (Grafik 4).



Grafik 4 ADP-zavisna agregacija trombocita tridesetog dana terapije klopidogrelom prema riziku od krvarenja u zavisnosti od varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*). Rizik predstavlja ADP-indukovanu agregaciju $\leq 260,25$ AU*min.

■ nosioci genotipa TT

■ nosioci genotipa TT i GG

Primenom prve granične vrednosti nije uočena povezanost varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) sa povećanim rizikom od krvarenja.

Druga granična vrednost

Druga granična vrednost predstavljala je stepen inhibicije trombocita od 70%. Pacijenti koji su tridesetog dana terapije imali inhibiciju trombocita veću od 70% smatrani su grupom pacijenata sa pojačanim odgovorom na klopidogrel tj. povišenim rizikom od krvarenja i bilo ih je ukupno 25 (23.15%).

U ovoj grupi pacijenata alel T varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) bio je prisutan kod 14 (56%) pacijenata i njegova učestalost u ovoj grupi se nije značajno razlikovala od učestalosti u grupi pacijenata sa stepenom inhibicije trombocita <70% u kojoj su bila 42 (50,6%) homozigotna i heterozigotna nosioca alela T (Tabela 26).

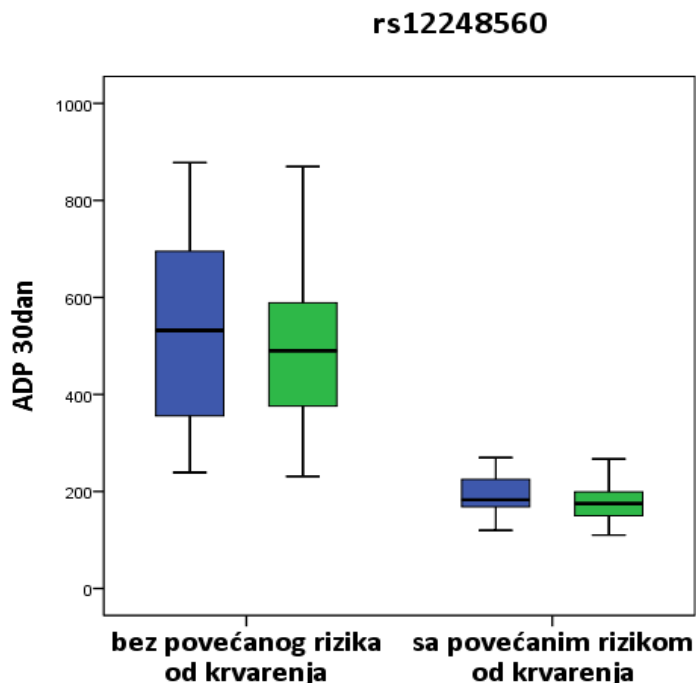
Kada se radi o varijanti rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*), u grupi pacijenata sa stepenom inhibicije trombocita $\geq 70\%$ bilo je svega 3 (12%) nosioca manje učestalog alela G. U grupi koja nema povišen rizik od krvarenja bilo ih je 12 (14,5%) što nije predstavljalo statistički značajnu razliku u učestalosti homozigotnih i heterozigotnih nosilaca alela G među pomenutim grupama (Tabela 26).

Tabela 26 Povezanost varijanti rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) i rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) sa povećanim rizikom od krvarenja na osnovu stepena inhibicije trombocita $\geq 70\%$.

| Varijante gena <i>CYP2C19</i> | Genotip | Stepen inhibicije trombocita [#] | | OR (CI 95%) | p |
|--|---------|---|---------------------------|---------------------|-------|
| | | $\geq 70\%$, n=25 (100%) | $< 70\%$, n=83 (100%) | | |
| rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19*20</i>) | TG i GG | 3 (12,0) | 12 (14,5) | 0,81 (0,21-3,12) | 0,755 |
| | TT | 22 (88,0) | 71 (85,5) | | |
| rs12248560 (c.-806C>T, <i>CYP2C19*17</i>) | CT i TT | 14 (56,0) | 42 (50,6) | 1,24 (0,51-3,05) | 0,636 |
| | CC | 11 (44,0) | 41 (49,4) | | |

n- broj pacijenata u grupi; OR-*Odds Ratio*; CI-interval poverenja; # stepen inhibicije trombocita veći od 70% indikovo je povećan rizik od krvarenja; p-statistička značajnost Pirsonovog χ^2 testa

Medijana ADP-zavisne agregacije 30. dana terapije klopidogrelom kod homozigotnih nosioca *wt* alela (C) varijante rs12248560 i koji pripadaju grupi sa povećanim rizikom za krvarenje (stepen inhibicije trombocita $\geq 70\%$) iznosila je 183,0 [167,0-230,0] AU*min, dok je za homozigotne i heterozigotne nosioce alela T medijana bila 175,0 [142,50-204,25] AU*min. Kod pacijenata koji su bili u grupi bez povećanog rizika za krvarenje i bili nosioci alela T medijana je iznosila 490,0 [371,50-591,75] AU*min, a za nosioce *wt* alela (C) je bila 532,0 [352,0-707,50] AU*min (Grafik 5).

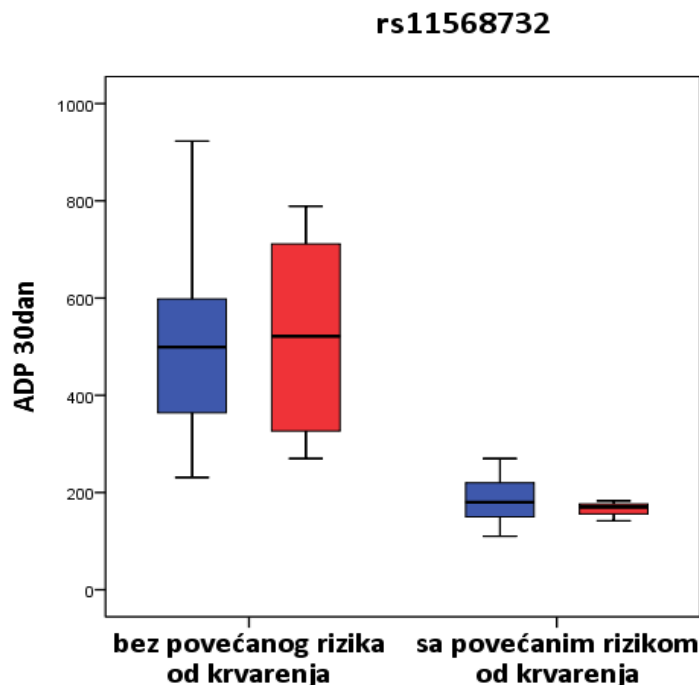


Grafik 5 ADP zavisna agregacija tridesetog dana terapije klopidogrelom prema riziku od krvarenja u zavisnosti od varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*). Rizik predstavlja stepen inhibicije trombocita $\geq 70\%$.

■ nosioци genotipa CC

■ nosioци genotipa CT i TT

Medijana ADP-zavisne agregacije 30. dana terapije klopidogrelom kod homozigotnih nosilaca *wt* alela (T) varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) koji pripadaju grupi sa povećanim rizikom za krvarenje iznosila je 180,0 [150,0-223,50] AU*min, dok je za homozigotne i heterozigotne nosioce alela G bila 170,0 [142,0-183,0] AU*min. Medijana kod pacijenata koji su bili u grupi bez povećanog rizika od krvarenja i bili nosioци T alela varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) je iznosila 521,5 [304,75-719,75] AU*min, a za homozigotne nosioce *wt* alela (T) ona je bila 499,0 [358,0-600,0] AU*min (Grafik 6).



Grafik 6 ADP zavisna agregacija tridesetog dana terapije klopidogrelom prema riziku od krvarenja u zavisnosti od varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*). Rizik predstavlja stepena inhibicije trombocita $\geq 70\%$.

■ nosioci genotipa TT

■ nosioci genotipa TT i GG

Primenom druge granične vrednosti nije uočena povezanost varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) sa povećanim rizikom od krvarenja.

Treća granična vrednost

Poslednja granična vrednost primenjena na ADP-indukovanu agregaciju kod pacijenata podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji preuzeta je od proizvođača Multiplate® aparata, a primarno je ustanovljena od strane Sibbing i saradnika [166]. Granična vrednost za ADP HS test za pacijente koji imaju povećan rizik od krvarenja je ADP-indukovana agregacija trombocita manja ili jednaka od 188 AU*min. U grupi pacijenata koji su podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji bilo je 15 (13,9%) pacijenata čija je ADP zavisna agregacija trombocita bila ≤ 188 AU*min.

Među ovih 15 pacijenata, 9 (60%) su bili homozigotni ili heterozigotni nosioci alela T varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*). Učestalost alela T u ovoj grupi se nije značajno razlikovala od učestalosti u grupi pacijenata sa ADP-indukovanom agregacijom trombocita većom od 188 AU*min u kojoj je bilo 47 (50,5%) homozigotnih i heterozigotnih nosilaca alela T (Tabela 27).

Kada je u pitanju varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*), u grupi pacijenata sa ADP-indukovanom agregacijom trombocita manjom ili jednakom od 188 AU*min, 3 (20%) pacijenta su bili homozigotni ili heterozigotni nosioci alela G. U grupi koja je imala ADP-indukovanu agregaciju trombocita veću od 188 AU*min i prema tome nije imala povećan rizik od krvarenja bilo je 12 (12,9%) nosilaca alela G što nije predstavljalo statistički značajnu razliku u učestalosti homozigotnih i heterozigotnih nosilaca alela (G) među grupama definisanim prema ovoj graničnoj vrednosti (Tabela 27).

Tabela 27 Udruženost varijanti rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) i rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) sa povećanim rizikom od krvarenja na osnovu ADP indukovane agregacije (≤ 188 AU*min).

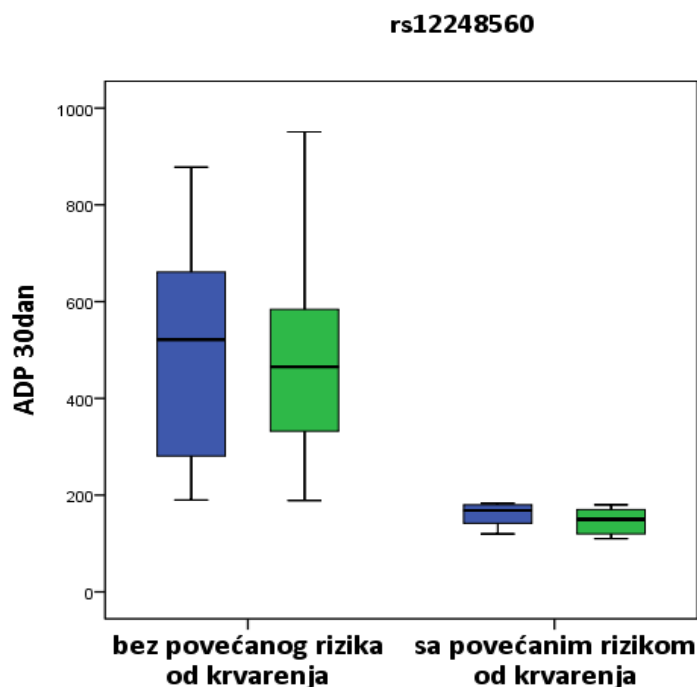
| Varijante gena <i>CYP2C19</i> | Genotip | ADP indukovana agregacija [#] | | OR (CI 95%) | p |
|--|---------|--|-------------------------------|---------------------|-------|
| | | ≤ 188 AU*min n=15 (100%) | > 188 AU*min n=15 (100%) | | |
| rs11568732 (c.-889T>G, <i>CYP2C19*20</i>) | TG i GG | 3 (20) | 12 (12,9) | 1,68 (0,41-6,86) | 0,461 |
| | TT | 12 (80) | 81 (87,1) | | |
| rs12248560 (c.-806C>G, <i>CYP2C19*17</i>) | CT i TT | 9 (60) | 47 (50,5) | 1,47 (0,48-4,45) | 0,496 |
| | CC | 6 (40) | 46 (49,5) | | |

n- broj pacijenata u grupi; OR-Odds Ratio; CI-interval poverenja; #ADP-indukovanu agregacija ≤ 188 AU*min indikovala je povećan rizik od krvarenja; p-statistička značajnost Pirsonovog χ^2 testa

U grupi pacijenata sa ADP-indukovanom agregacijom trombocita ≤ 188 AU*min medijana ADP indukovane agregacije za homozigotne i heterozigotne nosioce alela T varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) iznosila je 150,0 [115,0-175,0] AU*min, a za homozigotne nosioce alela C iznosila je 168,5 [136,50-180,75] AU*min. Dok je medijana za nosioce alela T u grupi

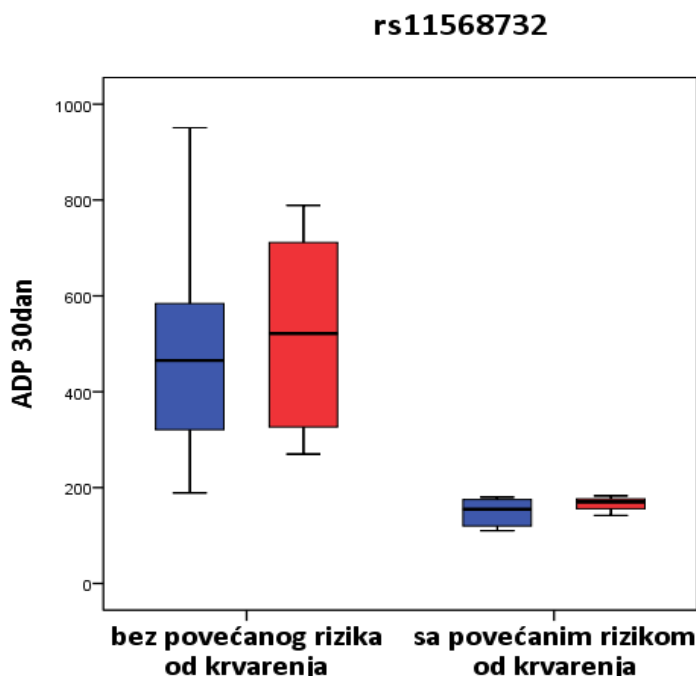
pacijenata sa ADP-indukovanom agregacijom trombocita većom od 188 AU*min iznosila 465,0 [324,00-584,00] AU*min, a za homozigotne nosioce alela C njena vrednost je bila 521,50 [280,75-669,50] AU*min (Grafik 7).

U grupi pacijenata sa ADP-indukovanom agregacijom trombocita ≤ 188 AU*min medijana ADP indukovane agregacije za homozigotne i heterozigotne nosioce alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) iznosila je 170,0 [142,0-183,0] AU*min, a za pacijente koji su bili homozigoti za T alel vrednost medijane je iznosila 155,0 [120,00-177,50] AU*min. Medijana za homozigotne i heterozigotne nosioce alela G u grupi pacijenata sa ADP-indukovanom agregacijom trombocita >188 AU*min iznosila je 521,5 [304,75-719,75] AU*min, a za homozigotne nosioce alela T vrednost medijane je bila 465,0 [301,00-586,50] AU*min (Grafik 8).



Grafik 7 ADP-zavisna agregacija tridesetog dana terapije klopidogrelom prema riziku od krvarenja u zavisnosti od varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*). Rizik predstavlja ADP-indukovana agregacija trombocita ≤ 188 AU*min.

- nosioci genotipa CC
- nosioci genotipa CT i TT



Grafik 8 ADP-zavisna agregacija tridesetog dana terapije klopidogrelom prema riziku od krvarenja u zavisnosti od varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*). Rizik je predstavljala ADP-indukovana agregacija trombocita ≤ 188 AU*min.

■ nosioci genotipa TT

■ nosioci genotipa TT i GG

Primenom treće granične vrednosti nije uočena povezanost varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) sa povećanim rizikom od krvarenja.

4.3 Ispitivanje uticaja varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) na aktivnost promotora gena *CYP2C19*

In silico analiza varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*)

Kako su rezultati studije asocijacije pokazali da je alel G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) povezan sa povećanim rizikom od krvarenja $BARC \geq 2$, pretpostavili smo da potencijalni mehanizam delovanja varijante rs11568732 može biti modifikacija vezivnog mesta za transkripcione faktore što bi dovelo do promene u ekspresiji ispitivanog gena. *In silico* analizom je izvršena predikcija mesta vezivanja transkripcionih faktora u regionu pomenute varijante korišćenjem programa *AlgggenPROMO virtual laboratory tool*. Za predikciju su korišćene sekvence promotora gena *CYP2C19*, dužine 64 nukleotida uzvodno i nizvodno od

varijante rs11568732 (c.-889T>G, , *CYP2C19*20*) nakon čega su poređene razlike u verovatnoći vezivanja predikovanih TF u zavisnosti od nukleotida koji je prisutan na poziciji c.-889 (Tabela 30). Program je predvideo vezivanje velikog broja TF, ali su razlike u verovatnoći vezivanja za sekvence koje se razlikuju u nukleotidu prisutnom u varijanti rs11568732 identifikovane za glukokortikoidni i progesteronski receptor.

Rezultati analize za glukokortikoidni receptor su pokazali da stopa različitosti raste sa 0 na 4.2% ako je na poziciji varinate rs11568732 (c.-889T>G, , *CYP2C19*20*) prisutan nukleotid G umesto nukleotida T. Promena u verovatnoći vezivanja progesteronskog receptora za ispitivani region je još očiglednija, pošto je stopa različitosti za promotorsku sekvencu sa nukleotidom T iznosila 2,81%, a program nije čak ni prikazao mogućnost vezivanja PR u okviru testiranog regiona ako se na poziciji rs11568732 nalazi nukleotid G (Tabela 30). S obzirom da je podrazumevana granična stopa različitosti 15%, znači da je ona u slučaju nukleotida G veća od 15%.

Tabela 30 Stopa različitosti u verovatnoći vezivanja predviđenih TF u zavisnosti od nukleotida na poziciji varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) prema programu *AlgggenPROMO virtual laboratory tool*.

| Stopa različitosti (%) | TF | (+) attcagaataactaaTgtttgaagttgttt (-) taagtcttattgattAcaaaccttcaacaaa | (+) attcagaataactaaGgtttgaagttgttt (-) taagtcttattgattCcaaaccttcaacaaa |
|------------------------|---------|---|---|
| | GR beta | | 0,0 |
| PR | | 2,81 | >15 |

TF- transkripcioni faktor, GR beta- glukokortikoidni receptor beta izoforma, PR- progesteronski receptor

4.3.1 Ispitivanje ekspresije progesteronskog i glukokortikoidnog receptora u Caco-2 ćelijskoj liniji i tkivu jetre

Nakon *in silico* predikcije mesta vezivanja PR i GR u regionu varijante rs11568732 (c.-889T>G, , *CYP2C19**20), metodom qPCR izmerena je ekspresija gena *NR3C3* i *NR3C1*, koji kodiraju pomenute receptore, u Caco-2 ćelijskoj liniji, koja je odabrana kao model sistem za luciferazne eseje. Nivo ekspresije ova dva gena je upoređen sa nivoom u tkivu jetre, u kome se gen *CYP2C19* primarno i najviše eksprimira. Za poređenje korišćen komercijalni uzorak ukupne RNK poreklom iz zdrave humane jetre. Rezultati ekspresione analize su pokazali da je progesteronski receptor eksprimiran u Caco-2 ćelijama u mnogo manjoj meri nego u jetri, te relativna kvantifikacija nije bila moguća. Glukokortikoidni receptor je eksprimiran u Caco-2 ćelijskoj liniji oko 17 puta manje nego u zdravom tkivu jetre koje je služilo kao kalibrator.

4.3.2 Funkcijska analiza promotorske varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) gena *CYP2C19*

Kako su rezultati asocijativne studije pokazali da je alel G promotorske varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) povezan sa povećanim rizikom od pojave krvarenja (BARC \geq 2) kod STEMI pacijenata na terapiji klopido-grelom, pretpostavili smo da alel G utiče na aktivnost promotora, a posledično i na nivo enzima *CYP2C19* što uslovljava pojačan odgovor na klopido-grel i povećava rizik od krvarenja. Ispitivanje uticaja alela G na aktivnost promotora gena *CYP2C19*, obuhvatilo je analizu bazalne aktivnosti, ali i proveru uticaja progesteronskog i glukokortikoidnog receptora na aktivnost promotora dualnim luciferaznim esejom.

Reporterski konstrukti

Da bi se ispitaio uticaj varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) na promotorsku aktivnost gena *CYP2C19* napravljeni su reporterski konstrukti. Konstrukti su obuhvatili deo promotorskog regiona gena *CYP2C19* dužine 1708 baznih parova (od -1697 do +10, Slika 6) integrisanih u plazmid pGL4.1. Konstrukat pGL4.1-2C19-889T je nosio *wt* sekvencu promotora na poziciji varijante rs11568732 (T), dok je konstrukat pGL4.1-2C19-889G dobijen uvođenjem nukleotida G na pomenutu poziciju metodom PCR dirigovane mutageneze.

cgctcagctctagcaccagcagacaccatgttcttggctacagtactgaatcttcaaggctcagcctcctcattcctgagatgggtcaatatttattgtaagc
 aaaggcaattgagagattccaagggatagagggtgagaattctctctaaatggggttagaatccctgttaaaaatgaccagtgaacattgtgcaatt
 gtgtcttaacataactactttttcttaataagagaactggaataacctcattaggaaattagaacaaatcagatgatatctttaaagaaaatggcttgt
 gtaagtattgtcgttagtgatctagtaaatgtatcttctggtgtatttagacctcaactcaaatgacagctcccgttaaggctatacattggtggtttt
 gtgctgtgggtccatttagtatttccctacctccatcctctattagattcacaactgttctgctcccaataattcctatgcttgccttgcattgttacttttt
 ttgaaaatcagaaagcaaatcaataaaagcagccatgtctggaggagaccaggaggcaagaagccttagtttctcaagcccttagcaccaaattct
 ctgagatcagctcttctcagttacactgagcgtttccctctgagtgatggagaagggagaactcttatttttctcatgagcatctctggggctgtttcc
 ttgataaataagtggttctatttaagtgaagcctgtttatgaacaggatgaatgtggtatattcagaataactaaT/gtttgaagttgtttgttt
 gctaaaacaagtttagcaaacgatttttttcaaattgtgtcttctgttctcaagcatctctgatgtaagagataatgccacgatgggcatcagaa
 gacctcagctcaaatcccagttctgacagctatgagctgtgtggcaccaacagggtgctctgttctccagggtctccctttccatttgaataaaaaat
 aacaattcctgcctcagctgttttttagggggttaaaggtaagggtttatatctgctaaggaatttacttgatatagtttggttattgaagatatag
 agttatgttagctattcatgttttaggctgtgtatttttagtaggctataataatagaggatttcattataaaggacaaagtctcctaattctcagatagga
 ttgacatacttttaataatacaagcatagaatagccattccgttaaatcaaaattcccaactggttattaatctaagaattcagaatttgaagtaatt
 gttttgcatcagattgttactcagtgctctcaattatgacgggtgactggaaaccactgggtaacattttttgtttttattaccaatacctaggctcaacc
 tagtacaatgaaaccagaatgtacagagtgggcactgggacgaaggagaacaagaccaaggacattttttttctctatcagtggtgcaagtcct
 ttcagaaggacatagtgggcctagggtattggccactttatccatcaaagaggcacacacacttaattagcatggaggtttataaaaagcttggagtg
 caagctcacggttcttaacaagaggagaaggcttcaatggatcctc

Slika 6 Sekvenca dela promotora gena *CYP2C19* (1708 bp) čija je aktivnost ispitivana dualnim luciferaznim esejom. Na poziciji varijante rs11568732 nukleotid T označen je zelenom bojom, dok nukleotid G obeležen crveno.

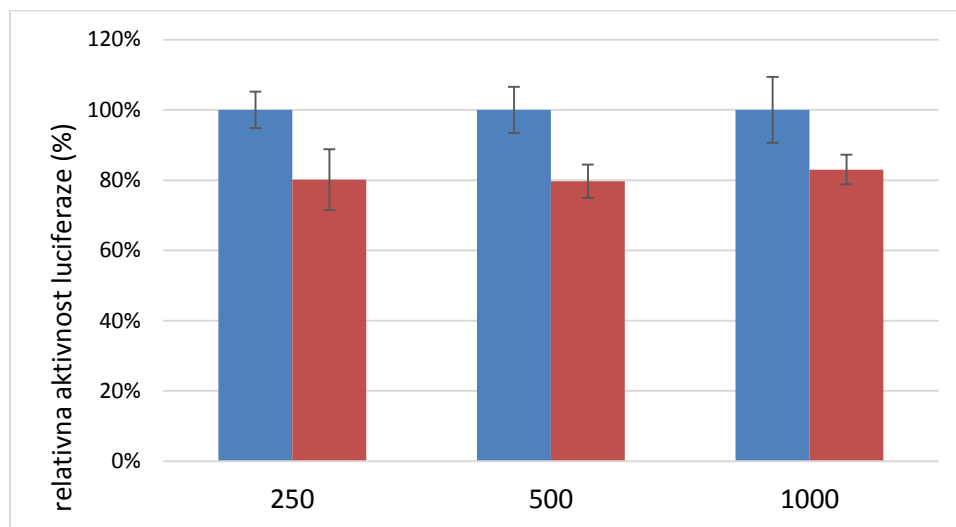
Uticaj alela G varijante rs11568732 na aktivnost promotora *CYP2C19* gena

Da bi se ispitao uticaj manje učestalog alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) na ekspresiju gena *CYP2C19* tranzijentno su transfekovane Caco-2 ćelije konstruktima pGL4.1-2C19-889T ili pGL4.1-2C19-889G.

Caco-2 ćelije su kotransfekovane sa 250, 500 ili 1000 ng reporterskih konstrukata pGL4.1-2C19-889T ili pGL4.1-2C19-889G, i 3 ng pRL-SV40, a 24h nakon transfekcije ćelije su lizirane i merena je aktivnost luciferaza. Aktivnost svičeve luciferaze svakog uzorka je najpre normalizovana prema aktivnosti luciferaze *Renilla reniformis*, eksprimirane sa vektora pRL-SV40, koja odražava efikasnost transfekcije i eliminiše razliku u broju ćelija u uzorcima. Zatim je promotorska aktivnost pGL4.1-2C19-889G konstrukata, pri svakoj količini plazmidne DNK korišćene za transfekciju, normirana u odnosu na aktivnost konstrukta pGL4.1-2C19-889T, koja je uzeta za 100%. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD, eng. *standard deviation*).

Rezultati DLR eseja su pokazali da je promotorska aktivnost konstrukta pGL4.1-2C19-889G smanjena u odnosu na promotorsku aktivnost konstrukta pGL4.1-2C19-889T. Iako je

relativna aktivnost svičeve luciferaze rasla kako je rasla količina reporterskog konstrukta, smanjenje aktivnosti pGL4.1-2C19-889G promotora u odnosu na pGL4.1-2C19-889T (*wt*) je bilo konstantno (oko 20%), i nije bilo dozno zavisno (Grafik 9). U narednim eksperimentima korišćeno je 250 ili 500 ng reporterskih konstrukata.



Grafik 9 Uticaj varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) na aktivnost promotora *CYP2C19* gena u Caco-2 ćelijama.

- relativna luciferazna aktivnost reporterskog konstrukta pGL4.1-2C19-889T (*wt*)
- relativna luciferazna aktivnost reporterskog konstrukta pGL4.1-2C19-889G

Ispitivanje uticaja rekombinantnog progesteronskog i glukokortikoidnog receptora na aktivnost promotora *CYP2C19* gena u zavisnosti od varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*)

Kako je *in silico* analiza pokazala da je verovaroća vezivanja glukokortikoidnog i progesteronskog receptora za promotorski region manja ako se na poziciji c.-889 nalazi nukleotid G, postavili smo hipotezu da će aktivnost promotora pGL4.1-2C19-889G biti manja od aktivnosti pGL4.1-2C19-889T (*wt*) promotora u prisustvu PR i GR. Hipotezu smo proverili *in vitro* uslovima, DLR esejom.

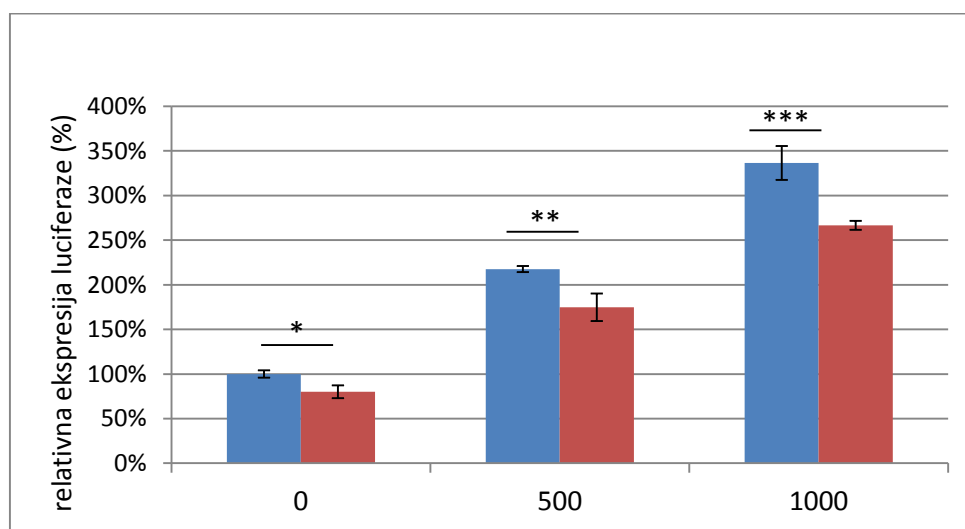
Progesteronski receptor i varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19* *20)

Caco-2 ćelije su kotransfekovane sa 250 ng reporterskog konstrukta, 3 ng pRL-SV40 i rastućim koncentracijama ekspresionog konstrukta pCDNA-PR (250, 500 i 1000ng). Ekspresija rekombinantnog progesteronskog receptora je dovela do dozno zavisnog povećanja promotorske aktivnosti oba reporterska konstrukta (pGL4.1-2C19-889T i pGL4.1-2C19-889G). Razlika u promotorskoj aktivnosti konstrukata je ostala konstantna i iznosila oko 20% (Tabela 31, Grafik 10).

Tabela 31 Relativna luciferazna aktivnost reporterskih konstrukata pGL4.1-2C19-889T i pGL4.1-2C19-889G u zavisnosti od koncentracije progesteronskog receptora (PR).

| Količina PR (ng) | Relativna luciferazna aktivnost reporterskih konstrukata | | p | Procenat smanjenja aktivnosti pGL4.1-2C19-889G konstrukta (%) |
|------------------|--|------------------|-------|---|
| | pGL4.1-2C19-889T | pGL4.1-2C19-889G | | |
| 0 PR | 0,096 | 0,077 | 0,013 | 20 |
| 500 PR | 0,209 | 0,168 | 0,009 | 20 |
| 1000 PR | 0,323 | 0,256 | 0,003 | 21 |

PR- progesteronski receptor; p-statistička značajnost dobijena t testom

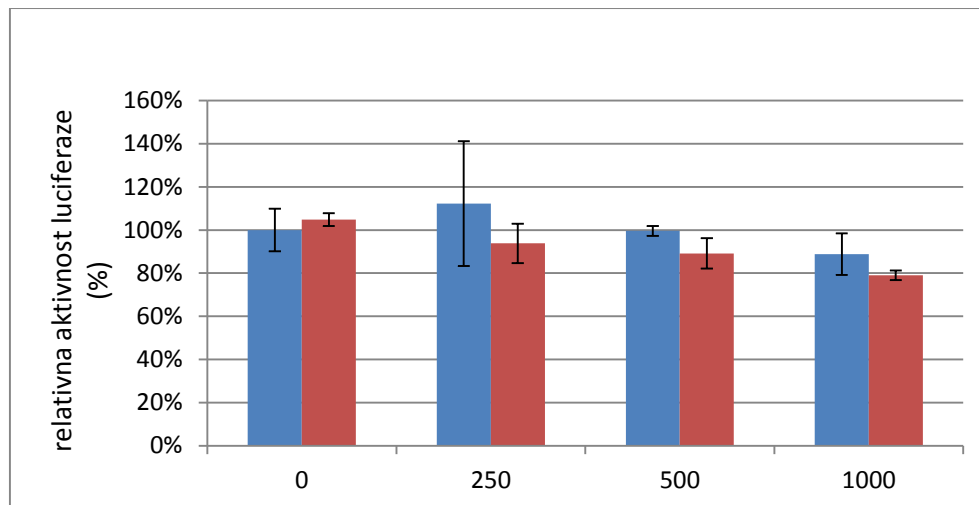


Grafik 10 Uticaj rastuće koncentracije progesteronskog receptora (PR) na aktivnost promotora gena *CYP2C19* u zavisnosti od varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20); *p=0,013; **p=0,009; ***p=0,003.

- relativna luciferazna aktivnost reporterskog konstrukta pGL4.1-2C19-889T (wt)
- relativna luciferazna aktivnost reporterskog konstrukta pGL4.1-2C19-889G

Glukokortikoidni receptor i varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*)

Caco-2 ćelije su kotransfekovane sa 500 ng reporterskih konstrukata (pGL4.1-2C19-889T ili pGL4.1-2C19-889G), 3 ng pRL-SV40 i rastućim količinama (250, 500 i 1000 ng) pCDNA3-GR. Rezultati ovih eksperimenata su pokazali da glukokortikoidni receptor, samostalno, ne menja aktivnost ispitivanog promotorskog regiona (Grafik 11).



Grafik 11 Uticaj rastuće koncentracije glukokortikoidnog receptora (GR) na promotorsku aktivnost gena *CYP2C19* u zavisnosti od varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*).

■ relativna luciferazna aktivnost reporterskog konstrukta pGL4.1-2C19-889T (*wt*)

■ relativna luciferazna aktivnost reporterskog konstrukta pGL4.1-2C19-889G

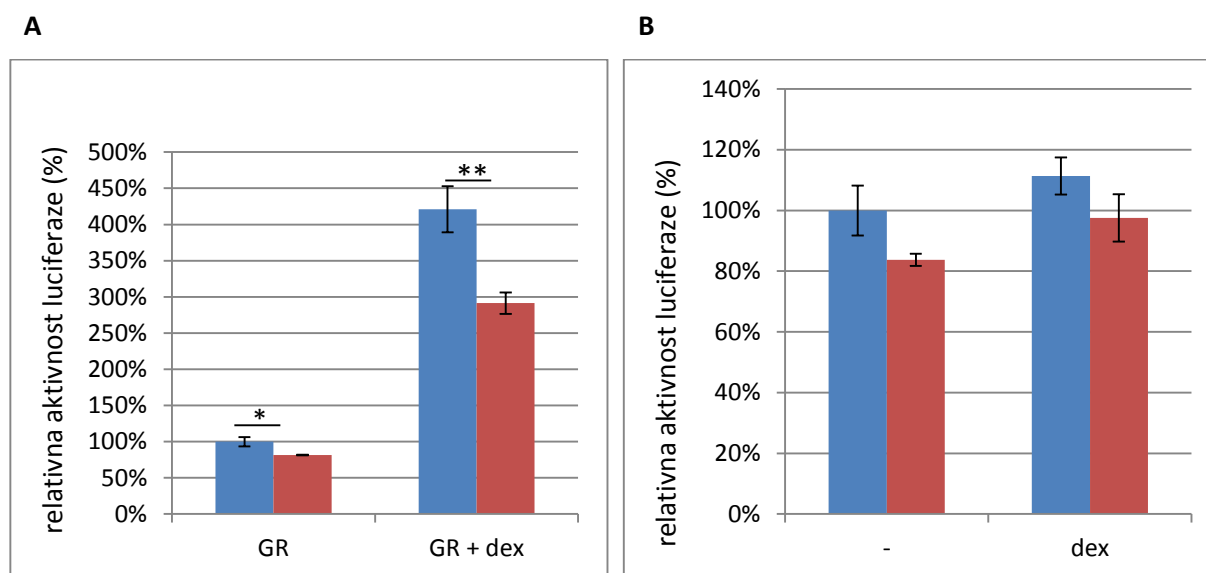
U sledećoj seriji eksperimenata, a u cilju aktivacije GR, Caco-2 ćelije su, nakon kotransfekcije sa 500 ng reporterskih konstrukata (pGL4.1-2C19-889T ili pGL4.1-2C19-889G), 3 ng pRL-SV40 i 500 ng pCDNA-GR, tretirane 100 nM deksametazonom, snažnim agonistom GR, u trajanju od 24h. Deksametazon rastvoren u apsolutnom etanolu je služio kao negativna kontrola. Rezultati ovih eksperimenata su pokazali da GR u kombinaciji sa deksametazonom dovodi do povećanja promotorske aktivnosti reporterskih konstrukata. U prisustvu GR i deksametazona relativna razlika u nivou aktivnosti konstrukta pGL4.1-2C19-889G u odnosu na konstrukt pGL4.1-2C19-889T je dodatno smanjena (31%) u odnosu na razliku koja postoji u ekspresiji reportera u ćelijama u kojima je ekspimiran samo GR (18%) (Tabela 32, Grafik 12A). Povećana aktivnost promotora se može pripisati deksametazonom indukovanoj aktivaciji GR, a

ne samom deksametazonu čije prisustvo nije uticalo na aktivnost ispitivanog promotorskog regiona u kontrolnim uzorcima (Grafik 12B).

Tabela 32 Relativna luciferazna aktivnost promotorskih konstrukata pGL4.1-2C19-889T i pGL4.1-2C19-889G u zavisnosti od prisustva glukokortikoidnog receptora i deksametazona.

| Tretman | Relativna luciferazna aktivnost | | P | Procenat smanjenja aktivnosti 2C19-889G konstrukta (%) |
|----------|---------------------------------|------------------|-------|--|
| | pGL4.1-2C19-889T | pGL4.1-2C19-889G | | |
| GR | 0,094 | 0,077 | 0,003 | 18 |
| GR + dex | 0,396 | 0,274 | 0,038 | 31 |

GR- glukokortikoidni receptor; dex- deksametazon; p-statistička značajnost dobijena t testom



Grafik 12 Uticaj glukokortikoidnog receptora (GR) u kombinaciji sa deksametazonom (dex) *p=0,003; **p=0,038 (A) i deksametazona (B) na aktivnost promotorske sekvence gena *CYP2C19* u zavisnosti od varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*).

- relativna luciferazna aktivnost reporterskog konstrukta pGL4.1-2C19-889T (*wt*)
- relativna luciferazna aktivnost reporterskog konstrukta pGL4.1-2C19-889G

4.4 Analiza ekonomske isplativosti genotipizacije varijante gena *CYP2C19* pacijenata podvrgnutih PCI

Kako je prema protokolima glavnih svetskih regulatornih tela, kao što su Američka agencija za lekove i Evropska medicinska agencija, preporučeno da se izvrši genetičko testiranje gena *CYP2C19* kod pacijenata kojima je neophodno odrediti antiagregacionu terapiju, odlučili smo da u okviru ove studije analiziramo ekonomsku isplativost ovakvih analiza u Srbiji [178].

Analiza je zasnovana na direktnim zdravstvenim troškovima koje pokriva zdravstveno osiguranje u Srbiji. U obzir su uzete cene: genetičkog testiranja varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2), hospitalizacije, jedne ponovljene perkutane koronarne intervencije, vaskularne operacije kao i cena rehabilitacije (Tabela 33).

Ekonomska evaluacija bila je ograničena samo na varijantu rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2) za koju literaturni podaci nedvosmisleno pokazuju neophodnost zamene klopidozrela nekim drugim antiagregacionim lekom (prasugrel, tikagrelor).

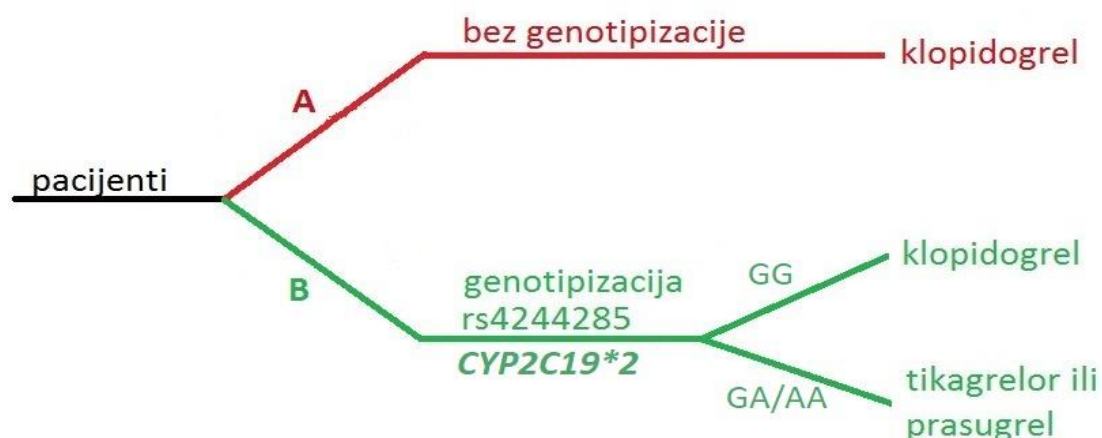
Tabela 33 Cene usluga i zahvata uključene u analizu ekonomske isplativosti farmakogenetički vođene terapije klopidozrelom.

| Usluga/zahvat | Cena (€) |
|---|----------|
| Genetičko testiranje varijante rs4244285 (<i>CYP2C19</i> *2) | 63,0 |
| Hospitalizacija (po danu) | 200,0 |
| Ponovljena PCI usled restenoze | 1.000 |
| Vaskularna operacija | 4.400 |
| Rehabilitacija (po danu) | 12,5 |

Najveći udeo u troškovima PCI intervencije odlazi na hospitalizaciju (79,2%) zatim na rehabilitaciju oko 11%, sam zahvat predstavlja 4,2% ukupnih troškova, ponovna intervencija ima udeo od 2,6%, dok genetičko testiranje čini 2,4% ukupnih troškova.

Na osnovu podataka prikupljenih tokom perioda praćenja od godinu dana, napravljen je jednostavan model za poređenje dve različite strategije za homozigotne nosioce *wt* alela (GG) varijante rs4244285 (*CYP2C19**2) naspram heterozigotnih i homozigotnih nosilaca manje

učestalog alela T. Prva strategija ('A'), podrazumeva da svakom pacijentu terapija klopidogrelom bude određena nezavisno od varijante rs4244285 (*CYP2C19*2*), što vodi uštedi na genetičkom testiranju, a sa druge strane može dovesti do prepisivanja neadekvatne antiagregacione terapije u slučaju homozigotnih i heterozigotnih nosilaca alela T. Druga strategija ('B'), podrazumeva da svaki pacijent dobije adekvatnu terapiju na osnovu genotipizacije varijante rs4244285, ali dodatni trošak predstavlja genetičko testiranje svih pacijenata (Slika 7).



Slika 7 Šema modela koji oslikava dva pristupa u određivanju antiagregacione terapije. Konvencionalna strategija (crveno) koja podrazumeva da će svim pacijentima biti prepisan klopidogrel i alternativna strategija (zeleno) koja podrazumeva određivanje antiagregacione terapije na osnovu rezultata genotipizacije varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*). Slika objavljena na engleskom jeziku u Mitropoulou i sar. (2016.) [178]

Prema modelu prosečan broj dana provedenih u bolnici za pacijente koji su homozigotni nosioci alela G varijante rs4244285 (*CYP2C19*2*) procenjen je na 10,1±6,5 dana, u poređenju sa nosiocima alela A koji su u proseku proveli 11,0 ± 6,9 dana u bolnici. Prosečno zadržavanje u centru za rehabilitaciju procenjeno je na 24,1±8,8 dana za homozigotne nosioce alela G, dok je ovaj broj za nosioce alela A iznosio 24,6±6,2 dana (Tabela 34).

Tabela 34 Prosečna dužina hospitalizacije i rehabilitacije pacijenata u zavisnosti varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*).

| genotip | dužina hospitalizacije * | vreme u rehabilitacionom centru * |
|---------|--------------------------|-----------------------------------|
| GG | 10,1±6,5 | 24,1±8,8 |
| GA i AA | 11,0±6,9 | 24,6±6,2 |

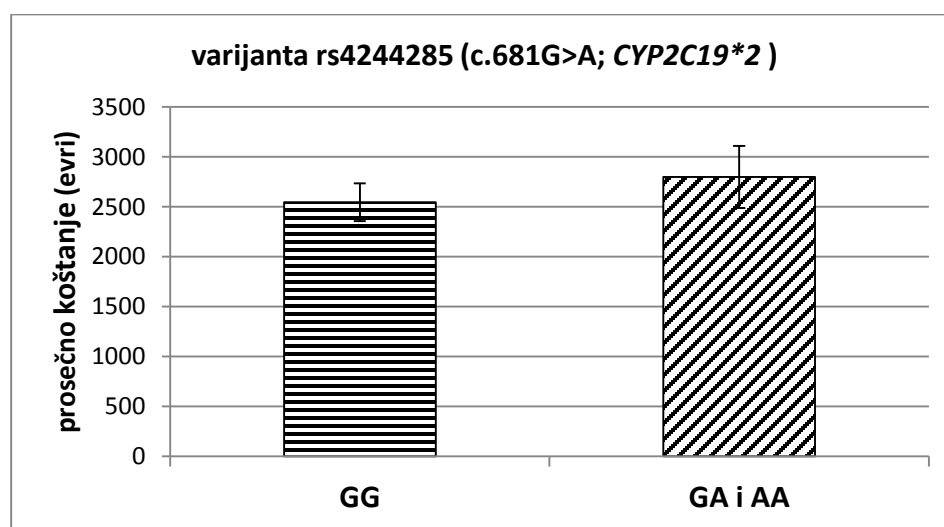
* izraženo u danima

Kada se svi troškovi uključeni u model (Tabela 33) uzmu u obzir prosečna cena perkutane koronarne intervencije i pratećih troškova za homozigotne nosioce alela G varijante rs4244285 (*CYP2C19*2*) procenjena je na 2.547 evra (95%CI, €2.217-2.966), a za nosioce alela A varijante rs4244285 2.799 evra (95%CI, €2.251-3.455) (Tabela 35, Grafik 13).

Tabela 35 Statistika koštanja PCI i pratećih troškova u zavisnosti od rs4244285 (*CYP2C19*2*) genotipa.

| Genotip rs4244285 <i>CYP2C19*2</i> | SV ± SD | Min troškovi | Max troškovi | Medijana | Varijansa | 95% CI | n |
|------------------------------------|------------|--------------|--------------|----------|-----------|-------------|----|
| GG | 2.547± 189 | 1.939 | 3.404 | 2.535 | 35,725 | 2.217-2.966 | 86 |
| GA i AA | 2.799±310 | 1.936 | 4.212 | 2.777 | 96,165 | 2.251-3.455 | 35 |

SV- srednja vrednost; SD-standardna devijacija, min-minimum, max-maksimum, CI-interval poverenja; *svi troškovi su izraženi u evrima



Grafik 13 Prosečna cena perkutane koronarne intervencije i pratećih troškova u zavisnosti od varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*). Grafik objavljen na engleskom jeziku u Mitropoulou i sar. (2016.) [178]

U osnovnoj postavci modela procenjeno je da strategija 'B' koja uključuje genetičko testiranje predstavlja isplativiju strategiju i da u proseku donosi uštedu od 13 € po pacijentu u poređenju sa strategijom 'A'. Analiza prelomne tačke (eng. *break-even point analysis*) pokazala je da strategija 'B' ostaje isplativija sve dok je učestalost homozigotnih i heterozigotnih nosilaca alela A varijante rs4244285 veća od 25%.

4.5 Učestalost alela ispitivanih varijanti u različitim populacijama

Nakon određivanja učestalosti alela varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*), rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) i rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*) u populaciji Srbije, prema dostupnoj literaturi napravljen je pregled i poređenje sa učestalostima alela pomenutih varijanti u drugim populacijama (Tabela 36). Značajne razlike u učestalosti alela svih varijanti uočene su između naše populacije i svih azijskih populacija ($p < 0,05$).

Učestalost alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) data je samo u tri studije i iznosi 6% kod belaca [179], 10,3% u populaciji Južne Indije [180] i 17,4% kod japanaca [109].

Tabela 36 Zastupljenost alela ispitivanih varijanti *CYP2C19* gena u različitim populacijama.

| Populacija | Broj ispitanika | Zastupljenost manje učestalih alela (%) | | | |
|--------------------------|-----------------|---|-------------------------------|-------------------------------|------------|
| | | rs12248560 <i>CYP2C19*17</i> | rs4244285 <i>CYP2C19*2</i> | rs4986893 <i>CYP2C19*3</i> | literatura |
| Srbija | 108 | 20,25 | 14,81 | 0 | [178, 181] |
| Švedska | 185 | 20,0 | 16,0 | NA | [108] |
| Norveška | 309 | 22 | 15,2 | NA | [182] |
| Danska | 276 | 20,1 | 15,0 | NA | [182] |
| Holandija | 765 | | 13,3 | 0,2 | [183] |
| | 678 | 22,0 | 13,3 | NA | [184] |
| Belgija | 121 | NA | 9,1* | 0 | [185] |
| Nemačka | 423 | 25,6 | 15,2 | 0 | [140] |
| Rumunija | 200 | NA | 13,7 | 0 | [186] |
| Italija | 360 | NA | 11,11 | 0 | [187] |
| Grčka | 283 | 19,61 | 13,1 | 0 | [188, 189] |
| Turska | 100 | NA | 13,5 | | [190] |
| | | | | 18 | [191] |
| Rusija | 971 | 27,4 | 14,0 | 0,6 | [192] |
| Slovačka | 112 | NA | 16,0 | NA | [193] |
| Slovenija | 129 | NA | 15,9 | 0,4 | [194] |
| Hrvatska | 200 | NA | 15,0 | NA | [195] |
| Bosna | 81 | NA | 17,0 | NA | [196] |
| Makedonija | 184 | 20,1 | 14,4 | NA | [197] |
| Japan | 265 | 1,3* | 27,9* | 12,8 | [109] |
| Koreja | 150 | 0,3* | 28* | 11 | [108] |
| kineska Dai | 193 | NA | 30,3* | 3,4 | [198] |
| kineska Han | 400 | 1,2* | 24,7* | 3,3 | [199] |
| Fujian Han | 1001 | 0,4* | 32,4* | 5,8 | [200] |
| Tajland | 1051 | 4,0* | 27,0* | 6,0 | [201] |
| Mongolija | 280 | NA | 24* | 4 | [202] |
| Severna Indija | 121 | NA | 30,0* | 0 | [203] |
| Južna Indija | 346 | | 35,1* | 1 | [204] |
| | 58 | 2,6* | | | [180] |
| Tamili | 112 | NA | 37,9* | 2,2 | [205] |
| Saudijska Arabija | 201 | 25,7 | 11,2 | NA | [206] |
| Iran | 180 | 21,6 | 13,05 | 0 | [207] |
| Etiopija | 114 | NA | 14,0 | 2,0 | [208] |
| Egipat | 247 | NA | 11 | 0,2 | [209] |
| Amerindian, indijanci | 183 | 15,8 | 10,4 | NA | [210] |
| Columbija | 189 | NA | 8,7* | 0 | [211] |
| Bolivija | 778 | NA | 7,8* | 0,1 | [212] |

NA- podatak nije dostupan, *značajna razlika u poređenju sa populacijom Srbije p vrednost <0,05

Diskusija

Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti u svetu. Prema procenama svetske zdravstvene organizacije 15,2 miliona ljudi je umrlo od kardiovaskularnih oboljenja tokom 2016. godine, što je 26,7% ukupnih smrtnih slučajeva. Od ovog broja, 7,4 miliona osoba je preminulo kao posledica koronarne srčane bolesti, a 6,7 miliona od moždanog udara. Najčešća terapija za pacijente sa srčanim oboljenjima podrazumeva upotrebu antiagregacione terapije, koja ima za cilj da smanji rizike za nastanak ishemijskih događaja, tromboembolijskih komplikacija i smrti.

Klopidogrel je antiagregacioni lek koji je, zajedno sa aspirinom, u sklopu dvojne antitrombotične terapije, jedan od najčešće propisanih lekova. Iako klopidogrel ima visoku efikasnost, jedan od najvećih nedostataka ovog leka je velika interindividualna varijabilnost u odgovoru pacijenata na terapiju koju je neophodno prevazići. Kod jednog broja pacijenata klopidogrel ispoljava oslabljeno dejstvo, što pacijente izlaže povećanom riziku od ishemijskih događaja, a time i smrti. Sa druge strane, kod nekih pacijenata klopidogrel ispoljava pojačano dejstvo, što pacijente izlaže riziku od krvarenja [19, 40]. Krvareći događaji su neretko životno ugrožavajući, ali mogu voditi i ishemijskim komplikacijama zbog aktivacije hemostaznog sistema kao i prekida antiagregacione terapije koja je neophodna u ovim situacijama [75, 213].

Sve ove činjenice ukazuju na značajnost istraživanja koja omogućavaju poboljšanje protokola za primenu terapije, gde najznačajniji doprinos daje farmakogenetika. Stoga je u fokusu ove studije bilo ispitivanje doprinosa najvažnijeg farmakogenetičkog faktora za terapiju klopidogrelom - gena *CYP2C19* - pojavi krvarenja kao neželjenog efekta klopidogrela.

Prvi deo ove studije obuhvatio je analizu povezanosti promotorskih varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) gena *CYP2C19* sa pojavom krvarenja kao mogućom posledicom pojačanog delovanja klopidogrela. Analiza je sprovedena kod pacijenata koji su doživeli infarkt miokarda sa ST elevacijom i bili podvrgnuti PCI.

Drugi deo studije obuhvatio je ispitivanje uticaja varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) na ADP-indukovanu agregaciju trombocita kojom je praćen efekat terapije klopidogrelom. Ovaj deo istraživanja je sproveden u grupi pacijenata sa stenozom karotidne arterije koji su bili podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji.

Treći deo studije obuhvatao je funkcijsku analizu varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) kroz ispitivanje njenog uticaja na aktivnost promotora gena *CYP2C19* u *in vitro* uslovima.

Četvrti deo ove studije posvećen je ekonomskoj isplativosti farmakogenetički vođene antiagregacione terapije u Srbiji i obuhvatao je analizu troškova i koristi (eng. *cost-benefit analysis*) genetičkog testiranja varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2) kod pacijenata koji su prošli perkutanu koronarnu intervenciju i bili na terapiji klopidogrelom.

5.1 Varijante gena *CYP2C19* i pojava krvarenja kao klinička manifestacija pojačanog delovanja klopidogrela

Prema važećim zdravstvenim propisima i preporukama u Srbiji i svetu, STEMI pacijenti podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji dobijaju dvojni antiagregacionu terapiju koju čine aspirin i klopidogrel [11, 54].

Za aktivaciju klopidogrela najvećim delom odgovoran je enzim *CYP2C19* kodiran od strane istoimenog gena [63]. Različite studije su pokazale da pojedinačne nukleotidne varijante u okviru *CYP2C19* gena imaju uticaj na efikasnost i pojavu neželjenih efekata tokom terapije klopidogrelom [96, 103, 118, 129]. Varijante koje imaju najveći klinički značaj u kontekstu pojave ishemijskih događaja su varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2) i rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19**3) čiji manje učestali aleli vode stvaranju nefunkcionalnog enzima. Postoje i druge varijante koje se dovode u vezu sa pojavom ishemijskih događaja, ali je učestalost njihovih nefunkcionalnih alela niska što značajno smanjuje njihov klinički značaj. Takođe, varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) se dovodi u vezu sa pojačanim odgovorom na klopidogrel.

U našem fokusu bilo je ispitivanje krvarenja, kao jednog od neželjenih efekata terapije klopidogrelom. Istraživanje smo započeli analizom varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17), koja je prema nekim studijama povezana sa povećanim rizikom od krvarenja kod pacijenata na terapiji klopidogrelom [105-107]. Naši rezultati su pokazali da ne postoji povezanost varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) i krvarenja BARC \geq 2 kod pacijenata podvrgnutih PCI koji su bili na dvojnjoj antiagregacionoj terapiji. Ovakav rezultat nije iznenađujući s obzirom da su literaturni podaci koji se odnose na varijantu rs12248560 (c.-

806C>T, *CYP2C19*17*) veoma nekonzistentni. Neke studije pokazuju da je ona povezana sa povećanom ADP-indukovanom agregacijom i rizikom od krvarenja [105, 107, 118, 136], dok druge navode da ova varijanta nema značaja u pomenutim procesima [139, 142, 214-217]. Tako Mega i saradnici [118] u svojoj studiji pokazuju da je alel T ove varijante povezan sa većom koncentracijom aktivnog metabolita klopidogrela i sa povećanom inhibicijom ADP-agregacije trombocita, ali ne i sa krvarenjem. Harmsze i saradnici [106] u svojoj studiji pokazuju da pacijenti sa koronarnom arterijskom bolešću podvrgnuti PCI koji imaju ultra-brz metabolizam klopidogrela (UM), pokazuju smanjenu reaktivnost trombocita i imaju 2,7 puta veći rizik od velikih krvarenja u odnosu na pacijente sa ekstenzivnim metabolizmom (EM). Dalje, oni pokazuju da pacijenti sa intermedijernim (IM) i oslabljenim metabolizmom klopidogrela (PM) imaju povećanu reaktivnost trombocita u odnosu na pacijente sa EM, ali im to ne smanjuje rizik od krvarenja [106]. Iz ovoga možemo zaključiti da pacijenti podvrgnuti PCI imaju rizik od krvarenja koji ne mora biti povezan ni sa klopidogrelom ni sa stepenom ADP-indukovane agregacije [218].

Jedna od najčešće citiranih studija [105] sa ovom tematikom pokazuje da alel T varijante rs12248560 značajno povećava rizik od krvarenja i da je kod homozigotnih nosilaca ovog alela rizik od krvarenja veći skoro 4 puta u odnosu na nosioce *wt* alela. Sibbing i saradnici su u ovoj studiji za definisanje krvarenja kod pacijenata koristili TIMI (eng. *Thrombolysis in Myocardial Infarction bleeding criteria*) kriterijume. TIMI kriterijumi su uvedeni pre oko trideset godina i do skoro su bili najčešće korišćeni kriterijumi za klasifikaciju krvarećih događaja kod pacijenata u kardiovaskularnim studijama. Ova klasifikacija se uglavnom zasniva na laboratorijskim podacima o sniženju hemoglobina i hematokrita i u početku je definisala 'velike' i 'male' krvareće događaje (eng. *major* i *minor* bleeding) kod STEMI pacijenata. Klasifikacija je vremenom proširena i sada sadrži četiri kategorije: veliko, malo, minimalno i odsustvo krvarenja [219, 220]. Sibbing i saradnici su u svojoj studiji fokusirali samo na kategorije velikog i malog krvarenja.

U našem istraživanju za klasifikaciju pacijenata prema krvarenju korišćeni su BARC kriterijumi koji predstavljaju najnovije i standardizovane kriterijume, ustanovljene od strane eksperata koji čine Akademski konzorcijum za istraživanje krvarenja (eng. *Bleeding Academic Research Consortium*-BARC) [76]. Prednost BARC kriterijuma u odnosu na sve ranije klasifikacije

je što uravnoteženo koristi kombinaciju laboratorijskih i kliničkih obeležja za procenu težine krvarenja [76]. Različiti kriterijumi korišćeni pri klasifikaciji pacijenata prema krvarenju mogu biti jedan od glavnih uzroka diskrepance između rezultata naše studije i studije Sibbing i saradnika.

Meta-analize, takođe, izvode različite zaključke po pitanju uticaja varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) na kliničke ishode kod pacijenata na terapiji klopidogrelom [94, 95, 97]. Li-Wan-Po i saradnici ističu da nosioci alela T ove varijante treba da budu svrstani u grupu pacijenata sa ekstenzivnim metabolizmom, a ne ultra-brzim [221]. Lewis i saradnici zaključuju da varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) ima vrlo mali, ili uopšte nema uticaj na terapiju klopidogrelom, a da su do sada pokazane veze posledica toga što se ona nalazi u potpunoj neravnoteži vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*-LD) sa nefunkcionalnim alelom varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) [222]. Sumirajući sve ove studije, i dalje ostaje nerazjašnjeno da li varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) ima nezavisan efekat na agregaciju trombocita pri terapiji klopidogrelom ili je ova veza posledica odustva nefunkcionalnog alela varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) [182, 223, 224]. Takođe, važeća uputstva za određivanje terapije klopidogrelom date od strane Konzorcijuma za implementaciju kliničke farmakogenetike (eng. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) preporučuju upotrebu iste doze klopidogrela za pacijente koji imaju ekstenzivan i ultra-brz metabolizam (*1/*1, *1/*17, *17/*17) [114].

U našem daljem istraživanju izvršena je genotipizacija promotorske varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*). Analiza ove varijante je pokazala da je ona povezana sa povećanom mogućnošću krvarenja BARC \geq 2, i da alel G povećava šansu za krvarenje oko 4 puta (3,7) kod STEMI pacijenata koji su podvrgnuti PCI i bili na terapiji klopidogrelom. Povezanost varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) sa krvarenjem nije narušena ni nakon korekcije za prisustvo alela A varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*), koji dovodi do sinteze nefunkcionalnog proteina.

Literaturni podaci o uticaju varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) na kliničke ishode kod pacijenata na terapiji klopidogrelom ili drugim lekovima čiji metabolizam zavisi od enzima CYP2C19 nisu pronađeni. Alel G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) svrstan

je u haplotip *CYP2C19*3B* sa alelom A varijante rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*), u okviru referentne baze podataka o varijantama u okviru gena iz citohrom P450 superfamilije (Prilog A) [93]. Sekvenciranjem egzona 4 *CYP2C19* gena pokazali smo da u populaciji Srbije nijedan pacijent nije nosilac alela A varijante rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*). Ovaj podatak je veoma značajan s obzirom da alel A varijante rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*) dovodi do sinteze skraćenog, nefunkcionalnog enzima *CYP2C19* i na taj način može potpuno poništiti uticaj bilo koje varijante locirane u promotoru na ekspresiju gena.

Da bismo utvrdili da li je povezanost varijante rs11568732 i krvarenja uzrokovana isključivo ovom pojedinačnom nukleotidnom zamenom proverili smo da li se alel G ove varijante nalazi u haplotipu sa nekom drugom, funkcijski već okarakterisanom varijantom, u okviru gena *CYP2C19*. Nasleđivanje alela ovih varijanti *in cis* bi moglo da objasni izmenjenu aktivnost enzima. Rezultati sekvenciranja svih 9 egzona (uključujući i okolne delove introna) i 5' i 3' netranslatirajućih regiona gena *CYP2C19* kod svih heterozigotnih nosilaca alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) i četiri nasumično izabrana *wt* pacijenata, nije ukazalo na postojanje vezanog nasleđivanja alela G i određenog alela neke druge funkcionalno opisane varijante u sekvenciranim regionima.

Međutim, od ukupno 10 varijanti koje su svrstane u haplotip *CYP2C19*3B*, kod heterozigotnih nosiocilaca alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) nisu prisutni manje učestali aleli 4 varijante iz ovog haplotipa. Međutim, svi ovi pacijenti su heterozigotni nosioci manje učestalih alela ostalih pet varijanti rs17884832 (c.169-340T>G), rs7916649 (c.169-231G>A), rs17879992 (c.481+332T>C), rs7088784 (c.643-205A>G), rs3758581 (c.991 A>G) iz pomenutog haplotipa. Dodatno, nasumično izabrani pacijenti koji su homozigoti sa *wt* alela varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) su takođe homozigoti za *wt* allele varijanti rs17884832 (c.169-340T>G), rs7916649 (c.169-231G>A), rs7088784 (c.643-205A>G). Ovakav rezultat ukazuje da ovih pet alelskih varijanti potencijalno čine nezavisan haplotip, ali za to su neophodna dalja istraživanja i eksperimentalne potvrde. Najveći deo ovih varijanti je lociran u intronima gena *CYP2C19* i o njihovoj funkciji nema objavljenih studija. Jedina egzonska varijanta je rs3758581 (c.991 A>G, I331V) koja ne utiče na aktivnost enzima [225] i pripada gotovo svim do sada prijavljenim haplotipovima, uključujući i *CYP2C19*1A* koji se smatra *wt* haplotipom [93].

Literaturni podaci o varijanti rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) su veoma skromni i ona se pominje u svega tri studije. U dve studije je data samo učestalost alela ove varijante [179, 226], dok dr Satyanarayana pored učestalosti od 10.3% [180] u svojoj drugoj studiji daje procenu da alel G varijante rs11568732 može imati uticaja na aktivnost promotora gena *CYP2C19* [227].

5.2 Varijante gena *CYP2C19* i ADP-indukovana agregacija

Drugi deo studije obuhvatao je ispitivanje uticaja promotorskih varijanti gena *CYP2C19* na ADP-indukovanu agregaciju trombocita kod pacijenata sa stenozom karotida koji su podvrgnuti karotidnoj endarterektomiji i bili na terapiji klopidogrelom. Nakon karotidne endarterektomije pacijenti dobijaju dvojni antiagregacionu terapiju u vidu aspirina i klopidogrela [57, 228].

U ovom delu studije, odgovor na terapiju klopidogrelom praćen je primenom multiple elektrodne agregometrije i specifičnog ADP HS testa koji meri aktivnost trombocita preko ADP-zavisnih P2Y₁₂ receptora. ADP-indukovana agregacija trombocita merena je u četiri vremenske tačke, pre operacije, a zatim 24h, sedmog i tridesetog dana terapije klopidogrelom. Merenja su pokazala da se ADP-indukovana agregacija trombocita značajno smanjuje tokom vremena, što daje informaciju o efikasnosti terapije klopidogrelom.

Poređenje vrednosti ADP-zavisne agregacije trombocita sa genotipom pacijenata, pokazalo je da nema značajne razlike u agregabilnosti trombocita između homozigotnih nosilaca *wt* alela (C) varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) i homozigotnih i heterotizigotnih nosilaca alela T iste varijante.

Gonzales i saradnici [141] su u studiji o uticaju varijanti u genu *CYP2C19* na aktivnost trombocita kod pacijenata na terapiji klopidogrelom, koji su podvrgnuti ugradnji stenta u karotidnu arteriju (eng. *Carotid Artery Stenting*, CAS), pokazali da pacijenti sa ultra-brzim metabolizmom klopidogrela (homozigotni ili heterozigotni nosioci alela T varijante rs12248560 a *wt* za rs4244285, UM) nemaju značajno drugačiju aktivnost trombocita u poređenju sa pacijentima sa ekstenzivnim metabolizmom klopidogrela (EM). Takođe je pokazano da nema značajne razlike ni u procentu inhibicije trombocita između UM i EM pacijenata. Dalje su pokazali da nosioci alela A varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2), tj. IM i PM imaju značajno višu reaktivnost trombocita i značajno smanjen stepen inhibicije u odnosu na

pacijenate sa UM i EM klopidogrela, što je u skladu i sa rezultatima dobijenim za pacijente podvrgnute karotidnoj endarterektomiji na terapiji klopidogrelom [229]. Studija Gonzales i sar., je studija sa kojom možemo porediti rezultate našeg istraživanja, s obzirom da pretragom literature nismo našli nijednu studiju koja se bavi uticajem varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) na terapiju klopidogrelom kod pacijenata podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji. Sa druge strane, pokazano je da su benefiti pacijenata u slučaju obe procedure gotovo identični. Ugradnja stenta u karotidnu arteriju donosi nešto veći rizik od periproceduralnog šloga, dok karotidna endarterektomija vodi nešto većem riziku od periproceduralnog infarkta miokarda, [230, 231].

Vežu između varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i ADP-indukovane agregacije trombocita proučavali su i Sibbing i sar. [105], kod pacijenata podvrgnutih PCI na terapiji klopidogrelom. Njihovi rezultati su pokazali da alel T dovodi do značajne razlike u vrednosti ADP-indukovane agregacije, tako da homozigotni nosioci imaju značajno nižu aktivnost trombocita od heterozigotnih nosilaca ovog alela, kao i od homozigotnih nosilaca *wt* alela C. Oni su takođe uočili značajno niže vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita kod heterozigotnih nosilaca alela T u poređenju sa homozigotnim nosiocima *wt* alela. Na osnovu svoje studije oni zaključuju da je alel T varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) nezavisno od pola, godina, BMI, upotrebe inhibitora protonske pumpe i vrednosti serumskog kreatinina povezan sa ADP-indukovanom agregacijom. Međutim, kao jedno od ograničenja svoje studije navode praćenje samo jedne genetičke varijante *CYP2C19* i pored toga što se zna da postoje i druge varijante koje imaju značajan efekat na metabolizam klopidogrela. Ovo je veoma važno ograničenje s obzirom da postoje studije koje pokazuju da rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) možda nema nezavisan uticaj na terapiju klopidogrelom već je on posledica potpune neravnoteže vezanosti sa alelom A varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) [222, 224].

Kada je u pitanju varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*), rezultati prvog dela istraživanja koji su pokazali značajnu povezanost između rs11568732 i krvarenja (BARC \geq 2), naveli su nas na pretpostavku o postojanju povezanosti ove varijante i ADP-indukovane agregaciji trombocita tokom terapije klopidogrelom. Prema našim saznanjima, podaci o uticaju varijante rs11568732 na ADP-zavisnu agregaciju trombocita kod pacijenata na terapiji

klopidogrelom, za sada ne postoje. Rezultati naše studije su pokazali da ne postoji značajna povezanost varijante rs11568732 sa ADP-zavisnom agregacijom trombocita kod pacijenata podvrgnutih karotidnoj endarterektomiji koji su na terapiji klopidogrelom.

Jedan od najvećih izazova pri proceni odgovora, potencijalnih neželjenih dejstava i ishoda terapije klopidogrelom, predstavlja tumačenje rezultata o aktivnosti trombocita dobijenih različitim metodama, tj. definisanje graničnih vrednosti koje će biti indikatori dobrog, pojačanog ili oslabljenog odgovora na terapiju [128, 218, 232, 233]. U zavisnosti od načina na koji se definiše granična vrednost za visoku reaktivnost trombocita koja nosi povećan rizik od velikih neželjenih kardiovaskularnih događaja, učestalost bolesnika koji imaju oslabljen odgovor na terapiju klopidogrelom značajno varira od 5-44% [70]. Iako krvarenje ima značajan uticaj na smrtnost PCI pacijenata [213] kao i na ishemijske komplikacije [75], studije se u mnogo manjoj meri bave rizikom od krvarenja kod pacijenata na dvojnoj antiagregacionoj terapiji. Učestalost ukupnih krvarenja kod pacijenata na terapiji klopidogrelom iznosi oko 9% [234], a velikih krvarenja od 0,5 – 3,6 % [218, 234]. Iako ovaj procenat može izgledati nizak, kada se uzme u obzir zastupljenost terapije klopidogrelom dolazi se do zaključka da se radi o velikom broju pacijenata. Stoga su neophodna dodatna i opsežnija istraživanja koja se bave ispitivanjem odnosa ADP-indukovane agregacije i rizika od krvarenja. Brojna istraživanja pokazuju da postoji veza između niske reaktivnosti trombocita tj. pojačanog odgovora na terapiju klopidogrelom i krvarenja [71, 166, 235, 236], ali ima studija koje ne pokazuju ovu povezanosti [233, 237]. Osnovne razloge za razliku u zaključcima ovih studija treba tražiti u različitim metodama merenja ADP-indukovane agregacije, definicije krvarećih događaja, kao i određivanju graničnih vrednosti kojima se definišu pacijenti sa niskom reaktivnošću trombocita tj. pojačanim odgovorom na klopidogrel. Do sada su istraživači za određivanje graničnih vrednosti koristili različite strategije i to najčešće određivanje prvog i poslednjeg kvartila/kvintila ADP-zavisne agregacije da bi odredili pacijente sa pojačanim odnosno sniženim odgovorom na klopidogrel [149, 238-240] ili preuzimali vrednosti predložene od strane proizvođača testova [241].

Sibbing i saradnici [238] su, u prvoj od studija koja se bavi određivanjem graničnih vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita pomoću multiple elektrodne agregometrije, uzeli vrednost prvog kvintila kao gornju granicu za određivanje pacijenata koji imaju pojačan

odgovor na klopidogetrel. Za njihovu grupu pacijenata ova vrednost iznosila je 124 AU*min i tom prilikom su pokazali da ne postoji značajna razlika u pojavi velikih, kao ni malih TIMI krvarenja kod pacijenata sa pojačanim odgovorom na klopidogetrel u odnosu na ostale pacijente. Međutim, već u svojoj sledećoj studiji [166] graničnu vrednost za pacijente sa pojačanim odgovorom na klopidogetrel određuju pomoću analize ROC krive. Tom prilikom ova granična vrednost iznosi 188 AU*min i prema ovoj vrednosti MEA ima i senzitivnost i specifičnost od 62%. Primenom ove granične vrednosti na ispitivanu grupu pacijenata, dobijaju značajnu veću učestalost pacijenata sa velikim TIMI krvarenjem u grupi sa pojačanim odgovorom na klopidogetrel u odnosu na ostatak pacijenata. Što se tiče malih TIMI krvarenja, ni prilikom primene ove granične vrednosti nije uočena značajna razlika između pacijenata sa pojačanim odgovorom na klopidogetrel i ostalih pacijenata [166]. Proizvođač Multiplate aparata i ADP testa, daje granične vrednosti za visok rizik od krvarenja i visok rizik od tromboza za PCI direktno preuzete iz studija Sibbing i saradnika [169].

Jednostavno preuzimanje graničnih vrednosti iz drugih studija nije najadekvatniji pristup jer se aktivnost trombocita menja tokom terapije i rezultati čak i ako su dobijeni identičnom metodom, ukoliko je vreme uzorkovanja odnosno trajanje terapije klopidogetrelom bilo različito [241, 242]. Još jedan od važnih faktora koji utiče na određivanje graničnih vrednosti, jeste i procedura tj. intervencija kojoj su podvrgnuti pacijenti. Tako na primer, granična vrednost za povišen rizik od krvarenja kod pacijenata koji su na terapiji klopidogetrelom i podvrgnuti su PCI, prema proizvođaču Multiplate ADP testa jeste ADP-indukovana agregacija od 188 AUxmin, a za pacijente kojima je rađeno karotidno premošćavanje (CABG) iznosi 310 AUxmin [169].

Najpravilniji način određivanja graničnih vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita podrazumevao bi analizu ROC krive [150] uz najveći procenat senzitivnosti i specifičnosti metode korišćene za merenje ADP agregacije trombocita za ispitivanu grupu pacijenata. Klinički ishodi praćeni u našoj grupi pacijenata bili su moždani udar, tranzijentni ishemijski napad, mortalitet i krvarenje tokom prve godine nakon intervencije. Međutim, u okviru ove grupe pacijenata nije došlo do pojave nijednog od pomenutih kliničkih ishoda u periodu praćenja, tako da nije bilo moguće analizirati odgovor na terapiju klopidogetrelom na

osnovu kliničkih ishoda, kao ni primeniti analizu ROC krive da bi se odredila granična vrednost ADP-indukovane agregacije za pacijente sa pojačanim odgovorom na klopidogrel.

Da bismo ispitali potencijalnu povezanost ispitivanih promotorskih varijanti sa povišenim rizikom od krvarenja, koristili smo tri različite granične vrednosti kako bismo selektovali pacijente koji imaju pojačan odgovor na klopidogrel, a prema tome i povećan rizik od krvarenja.

I pored toga što smo imali podatke o ADP-zavisnoj agregaciji trombocita 24 sata kao i sedmog i tridesetog dana u toku terapije klopidogrelom, izabrali smo da sve granične vrednosti odredimo prema vrednostima ADP-indukovane agregacije trombocita dobijenim 30. dana terapije klopidogrelom. Vrednost aktivnosti trombocita značajno se smanjivala tokom trajanja terapije. Za postizanje stabilnog efekta samog klopidogrela neophodno je da prođe minimum 5 do 6 dana od početka terapije [58], tako da korišćenje merenja od 24h za definisanje granične vrednosti nije pogodno. Korišćenje vrednosti ADP testa dobijenih sedmog dana terapije za određivanje graničnih vrednosti takođe nije pogodno zbog inflamacije, kao i promene bazične hemostazne ravnoteže kao posledice hirurške traume [243-245]. Kao reakcija na hiruršku traumu dolazi do inflamacije i porasta vrednosti koagulacionih faktora (vWF, fibrinogen, inhibitor aktivatora plazminogena). Agregacioni potencijal trombocita raste, ali ne zbog njihovog kapaciteta za agregaciju preko P2Y₁₂ receptora, već kao posledica povišenog nivoa koagulacionih faktora nakon hirurškog zahvata [246]. Pokazano je da povišen nivo C reaktivnog proteina, leukocita i fibrinogena vodi povišenoj reaktivnosti trombocita kod pacijenata na hroničnoj terapiji klopidogrelom [247]. Zbog toga čak i ako je koncentracija metabolita klopidogrela ista sedmog i 30. dana, sedmog dana očekujemo slabiji efekat leka, dok je 30. dana trebalo da bude veći, jer se za 30 dana samnjuje inflamacija i organizam se vraća na bazalne vrednosti koagulacionih proteina. Takođe, Campo i saradnici su utvrdili da mera aktivnosti trombocita 30. dana terapije klopidogrelom ima najbolju prediktivnu moć i za ishemijske neželjene događaje i za krvarenje nakon PCI [242].

U našoj studiji, prva granična vrednost je određena prema vrednosti prvog kvartila ADP-indukovane agregacije trombocita tridesetog dana terapije klopidogrelom i iznosila je 260,25 AU*min. Prema ovoj graničnoj vrednosti 27 (25%) pacijenata je svrstano u pacijente sa

pojačanim odgovorom na klopidogrel. Dalja analiza je pokazala da nema značajne razlike u učestalosti alela varijane rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) između pacijenata sa pojačanim odgovorom na klopidogrel i ostalih pacijenata. Takođe, nije uočena ni razlika u učestalosti alela varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) između ove dve grupe pacijenata.

Za drugu graničnu vrednost uzet je stepen inhibicije trombocita od 70%. Izračunavanje stepena inhibicije trombocita metodom MEA podrazumeva raspolaganje podacima o ADP-zavisnoj agregaciji trombocita pre terapije klopidogrelom, što predstavlja bazalnu aktivnost, kao i ADP-zavisne agregacije trombocita nakon određenog perioda na terapiju klopidogrelom [67], a najbolje 30. dana terapije [242], što je u ovoj studiji i korišćeno. Prema graničnoj vrednosti od 70% inhibicije agregacije trombocita 25 (23,1%) pacijenata je imalo pojačan odgovor na klopidogrel. Poređenjem učestalosti alela varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*), nije uočena značajna razlika između pacijenata sa pojačanim odgovorom na klopidogrel i ostalih pacijenata.

Granična vrednost od 70% inhibicije agregacije trombocita, merena metodom MEA, koristi se na Klinici za vaskularnu i endovaskularnu hirurgiju Kliničkog Centra Srbije, Univerziteta u Beogradu u kliničkoj praksi, pa je uzeta kao relevantna za našu populaciju. Na osnovu ove granične vrednosti, inhibicija agregacije trombocita veća od 70% smatra se rizikom za nastanak krvarenja tokom terapije klopidogrelom.

Sličnu graničnu vrednost od 72% inhibicije agregacije trombocita daju Goh i saradnici [71] u svojoj studiji sa pacijentima koji su podvrgnuti različitim endovaskularnim neurointerventnim procedurama i bili na terapiji klopidogrelom i aspirinom. Oni su u ovoj studiji efekat klopidogrela pratili VerifyNow metodom i do granične vrednosti inhibicije trombocita povezane sa pojačanim odgovorom na klopidogrel došli analizom ROC krive. Autori su izračunali, da ako se za određivanje pacijenata sa pojačanim odgovorom na klopidogrel koristi ova granična vrednost, postiže se dijagnostički kapacitet za velika TIMI krvarenja sa senzitivnošću od 100% i specifičnošću od 90.9%. Međutim, kada se u proračune uključe i mala TIMI krvarenja granična vrednost inhibicije trombocita iznosi 53,7%, a prediktivna moć testa značajno opada, pa senzitivnost iznosi 70%, a specifičnost 75,7%. Autori takođe ističu da se sa ekstrapolacijom ovih rezultata mora biti veoma pažljiv zbog malog broja uzoraka i niske učestalosti krvarećih

događaja, kao i da bi u sledeća istraživanja trebalo uvrstiti i genetičko testiranje *CYP2C19* kako bi se došlo do zaključka šta ima veći prediktivni značaj za krvareće događaje.

Za treću graničnu vrednost odabrali smo vrednost od 188 AU*min, koju su odredili Sibbing i saradnici [166]. Takođe, proizvođač Multiplate i ADP HS testa je preporučio ovu vrednost kao vrednost periproceduralne ADP-indukovane agregacije trombocita ispod koje se očekuje da pacijenti podvrgnuti PCI imaju povećan rizik od velikog TIMI krvarenja. Prema ovoj graničnoj vrednosti, u našoj studiji, 15 (13,8%) pacijenata je imalo pojačan odgovor na klopidogetrel. Učestalosti alela varijanti rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) nisu se značajno razlikovale između pacijenata sa pojačanim odgovorom na klopidogetrel i ostalih pacijenata. Sibbing i saradnici, su ovu graničnu vrednost određivali u grupi pacijenata podvrgnutih PCI, koji inače primaju dosta intenzivniju antiagregacionu i antikoagulantnu terapiju nego pacijenti koji se spremaju za CEA. Dalje, ADP-indukovana agregacija, kod pacijenata koje u svojoj studiji opisuje Sibbing, merena je oko 2h nakon udarne doze od 600 mg klopidogetrela i pre same PCI, a pacijenti u našoj studiji su prvu dozu klopidogetrela dobili nakon CEA i to 75 mg/dnevno. Proizvođač ADP HS testa ne daje nikakve granične vrednosti koje bi ukazivale na povišen rizik od krvarenja ili trombotičkih događaja za pacijente koji su podvrgnuti CEA, ili nekoj drugoj proceduri koja nije PCI i CABG [248], uprkos tome što literaturni podaci pokazuju da se bazična, ali i reaktivnost trombocita na terapiji klopidogetrelom razlikuju u različitim kliničkim stanjima [249, 250]. Kako nivo reaktivnosti trombocita ima različit prognostički značaj u odnosu na tip i vrstu oboljenja, granične vrednosti treba identifikovati za svaku vrstu pacijenata posebno ali i prema metodi koja se koristi za određivanje ADP-indukovane agregacije [164, 167, 232, 251].

I pored korišćenja različitih graničnih vrednosti za procenu pojačanog odgovora na terapiju klopidogetrelom na osnovu ADP-zavisne agregacije, dobijeni su jednoznačni rezultati odnosno nije nađena povezanost genotipa *CYP2C19* i pojačanog odgovora na lek, to jest povećanog rizika od krvarenja. Treba imati u vidu da nismo imali mogućnost da odredimo graničnu vrednost na osnovu ROC krive, što predstavlja najbolji pristup.

Ispitivanje uzroka krvarećih događaja je znatno teže od ispitivanja ishemijskih događaja, jer su mehanizmi koji dovode do krvarenja veoma raznovrsni i kompleksni. Etiologije gastrointestinalnog, intrakranijalnog i perioperativnog krvarenja su veoma različite i uloga trombocita u njima može značajno da varira. Sa druge strane, učestalost velikih krvarenja je znatno niža od ishemijskih događaja, pa je za potrebe istraživanja krvarenja potreban veliki broj pacijenata. Donošenje zaključaka na osnovu dosadašnjih istraživanja dodatno komplikuje upotreba različitih definicija krvarećih događaja [218], ali bi to trebalo da bude prevaziđeno primenom najnovijih standardizovanih BARC kriterijuma za klasifikaciju krvarenja [76].

Naša studija je i prvo istraživanje koje se bavi ispitivanjem veze između varijanti gena *CYP2C19* i krvarenja kod STEMI pacijenata podvrgnutih PCI u Srbiji. Takođe, rezultati koji su dobijeni u našem istraživanju predstavljaju prve rezultate o ispitivanju uticaja promotorskih varijanti gena *CYP2C19* na ADP-indukovanu agregaciji trombocita kod pacijenata sa stenozom karotidnih arterija koji su podvrgnuti CEA i bili na terapiji klopidogrelom i aspirinom u Srbiji. Jedan od važnih rezultata naše studije je da smo pokazali da se alel G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) javlja nezavisno od alela A varijante rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19**3), što ostavlja prostora za njegov nezavisni uticaj na ekspresiju *CYP2C19* gena [252]. Takođe ovo je prva studija koja daje informacije o učestalosti alela varijanti rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2), rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19**3), rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17), rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) kod kardiovaskularnih pacijanata u Srbiji.

Treba napomenuti da ova studija ima i nekoliko ograničenja. Prvo ograničenje se odnosi na veličinu ispitivanog uzorka koja može uticati na pouzdanost rezultata. Dalje, kod grupe pacijenata podvrgnutih PCI nije praćena ADP-indukovana agregacija trombocita jer u tom momentu još uvek nije bila rutinski primenjivana u ustanovi u kojoj su selektovani pacijenti, što je onemogućilo ispitivanje povezanosti ADP-agragacije i krvarećih događaja, kao i veze između agragacije i varijanti gena *CYP2C19*. Još jedno od ograničenja je i nepostojanje ijednog od kliničkih ishoda (krvarenje, moždani udar, TIA, smrt) kod pacijenata sa stenozom karotide tokom perioda praćenja od godinu dana. Pored navedenog, treba uzeti u obzir da u ovoj studiji nisu bile razmatrane varijante drugih gena kao što su *ABCB1*, *CES1*, *PON1*, *P2Y12*, *CYP2C9* i *CYP3A4/5*

koje potencijalno mogu uticati na farmakokinetiku i farmakodinamiku, a samim tim i efikasnost terapije klopidogrelom.

5.3 Funkcijska analiza varijante rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20)

Uzevši u obzir rezultate studije slučajeva i kontrola (eng. *case control study*) sprovedene u prvom delu našeg istraživanja koji su ukazali da varijanta rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20) može imati uticaja na ekspresiju gena, sprovedena su funkcijska ispitivanja ove varijante.

Uticaj varijante rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20) na aktivnost promotora gena CYP2C19 je testiran *in vitro* korišćenjem dualnog luciferaznog eseja. Ispitivana je promotorska aktivnost regiona gena CYP2C19 dužine 1708bp u kojoj se nalazi varijanta rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20). Na osnovu literaturnih podataka i preliminarnih eksperimenata, za izvođenje luciferaznog eseja iz laboratorijske kolekcije odabrane su Caco-2 ćelije.

Merenje luciferazne aktivnosti promotorskih konstrukata u Caco-2 ćelijskoj liniji pokazalo je da nukleotid G na poziciji varijante rs11568732 dovodi do smanjenja promotorske aktivnosti i to za oko 20%, što sugeriše na funkcionalni značaj nukleotidne zamene T u G na poziciji rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20). Smanjenje nije bilo dozno zavisno. Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima Satyanarayana i saradnika [227]. Oni su u svojoj studiji pomoću različitih konstrukata koji sadrže sekvence promotora gena CYP2C19 poreklom iz pacijenata, a korišćenjem luciferaznih eseja, određivali uticaj pojedinačnih nukleotidnih zamena na aktivnost promotora. Poredeći aktivnost *wt* konstrukta, konstrukta koji u sebi sadrži nukleotidnu zamenu rs17878739 (c.-1442T>C tj -1439T>C) i rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20) i konstrukta koji u sebi sadrži samo zamenu rs17878739 (c.-1442T>C tj. -1439T>C), višestrukom regresionom analizom, došli su do zaključka da bi nukleotid G varijante rs11568732 mogao da smanji aktivnost promotora gena CYP2C19 s obziroma da je analiza pokazala statistički trend ($p=0,055$). Takođe, prilikom analize mesta vezivanja transkripcionih faktora (TFBS), koristeći Matinspektor bazu podataka, Satyanarayana i saradnici nisu identifikovali nijedan TF koji se vezuje u regionu varijante rs11568732 (c.-889T>G, CYP2C19*20) [227]. Međutim, Arefayene i saradnici [179], analizirajući 1,8 kb promotorski region CYP2C19 gena u regionu varijante -889T>G, predviđaju postojanje vezivnog mesta za Hox 1.3 protein (eng. *homeo box protein*). *In silico* predikcija

mesta za vezivanje transkripcionih faktora u našoj studiji korišćenjem *ALGGEN Promo* programa, predvidela je mesta za vezivanje nekoliko TF u regionu varijante rs11568732. Program je pokazao da za progesteronski (PR) i glukokortikoidni (GR) receptor postoji razlika u afinitetu njihovog vezivanja u zavisnosti koji se nukleotid nalazi na poziciji varijante rs11568732.

Dalja ispitivanja su obuhvatila testiranje uticaja rekombinantnog progesteronskog receptora (PR) na aktivnost ispitivanih promotorskih varijanti dualnim luciferaznim esejom. Ovi eksperimenti su pokazali da rekombinantni PR, na dozno zavisnan način, utiče na povećanje aktivnosti oba konstrukta, ali da razlika u aktivnosti između konstrukata ostaje identična i iznosi oko 20%. Ovaj rezultat ukazuje da progesteronski receptor utiče na povećanje promotorske aktivnosti gena *CYP2C19* nezavisno od ispitivane varijante, odnosno da se PR vezuje u ispitivanom regionu promotora *CYP2C19*, ali ne na poziciji varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*). Ova pretpostavka je u skladu sa rezultatima predikcije Arefayene i saradnika [179] da postoji vezivno mesto za PR u regionu od -1676 do -1658 nt uzvodno od start kodona, koji je obuhvaćen i našim konstruktom (od -1697 do +10). Međutim, još uvek nema studija koje su eksperimentalno potvrdile vezivanje PR za promotor gena *CYP2C19*.

Za razliku od progesteronskog receptora, rekombinantni glukokortikoidni receptor (GR) nije samostalno uticao na aktivnost ispitivanih konstrukata. Međutim, u kombinaciji sa deksametazonom došlo je do povećane aktivnosti oba konstrukta. Dobijeni rezultat je u skladu sa rezultatima Chen i saradnika [144] koji su pokazali da GR dovodi do povećanja aktivnosti promotorskog regiona *CYP2C19* (1,9kb) samo u prisustvu deksametazona koji aktivira egzogeni GR. Takođe, autori su pokazali i da deksametazon ne dovodi do povećanja aktivnosti promotora *CYP2C19* u odsustvu egzogenog GR u HepG2 ćelijama [144], što je u skladu sa našim rezultatima dobijenim u Caco-2 ćelijama.

Osim toga, Chen i saradnici su identifikovali i dokazali postojanje mesta vezivanja GR na poziciji od -1750 do -1736 bp u promotoru gena *CYP2C19*. Ovaj region nije bio obuhvaćen promotorskim konstruktom koji smo mi koristili (od -1697 do +10 bp), tako da naši rezultati ukazuju na postojanje bar još jednog mesta vezivanja GR u regionu nizvodno od -1736 bp. Po predikciji to bi moglo biti GRE mesto koje obuhvata varijantu rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*). Postoji mogućnost da su Chen i saradnici, s obzirom na strategiju koju su koristili ,

nisu identifikovali dodatna mesta za vezivanje GR. Oni su ispitivali uticaj GR i deksametazona na promotorske konstrukte od 1,9 i 1,4 kb i na taj način pokazali da se GRE nalazi u regionu između -1,9 i -1,4 kb. To su zatim potvrdili analizom aktivnosti predviđene GRE sekvence (od -1750 do -1736) u prisustvu GR i deksametazona, pri čemu je ekspresija reporterskog gena bila veoma visoka i gotovo potpuno ugašena dodavanjem antagoniste GR receptora. Takođe, mutirani GR elementi nisu pokazali nikakvu aktivnost što dodatno potvrđuje da deksametazon deluje preko aktivacije GR [144].

Rezultati naše studije pokazuju da se relativna razlika u promotorskoj aktivnosti konstrukata dodatno menja pod uticajem GR i deksametazona. Ta razlika ne iznosi 20% kao u bazalnim uslovima ili pod uticajem PR, raste i iznosi 31%. S obzirom da aktivirani GR u manjoj meri povećava aktivnost promotora sa nukleotidom G na poziciji varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) u odnosu na nukleotid T, može se pretpostaviti da prisustvo alela G smanjuje ekspresiju gena *CYP2C19* indukovanu aktiviranim GR. Dobijeni rezultati u *in vitro* eksperimentima nameću potrebu za daljim analizama ispitivane varijante kojima bi se rasvetlili mehanizmi i obim uticaja varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) na ekspresiju gena *CYP2C19*.

Prema rezultatima analize povezanosti varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) i krvarećih događaja (BARC \geq 2), hipoteza koju smo postavili je da nukleotid G na poziciji varijante rs11568732 dovodi do povećanja ekspresije gena *CYP2C19*. Povećanje ekspresije vodi povećanoj konverziji klopidogrela u aktivni metabolit, što na kraju rezultira povećanoj inhibiciji agregacije trombocita i riziku od krvarenja. Međutim, rezultati *in vitro* eksperimenata pokazuju nukleotid G na poziciji rs11568732 dovodi do smanjenja promotorske aktivnosti gena *CYP2C19* u Caco-2 ćelijama. Postoji više razloga koji mogu biti uzrok ovog neslaganja. Jedan od najvažnijih jeste značajna razlika *in vivo* i *in vitro* eksperimentalnim sistemima. Mi smo proučavali izolovani uticaj jedne nukleotidne zamene na aktivnost promotora u sistemu Caco-2 ćelija, a krvareći događaji su vrlo kompleksni i zavise od niza faktora i opšteg stanja pacijenta [253]. Sa druge strane, kao što je pokazao program za predikciju (*Algen PROMO*), na poziciji varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) se mogu vezati i drugi transkripcioni faktori (HNF3, FOXD3), koji bi mogli voditi drugačijem profilu ekspresije gena. Međutim, njihov uticaj nismo eksperimentalno

ispitali jer program nije predvideo razliku u afinitetu vezivanja u zavisnosti od nukleotida prisustnog na poziciji varijante rs11568732, ali kako je ovo *in silico* analiza rezultati se moraju uzeti sa određenom rezervom. Endogeni nivo iRNK za GR u Caco-2 ćelijskoj liniji je 17 puta niži nego u tkivu jetre, što može ukazati na druge endogene faktora koji su dominantniji od GR u Caco-2 ćelijama, a takođe utiču na aktivnost promotora u zavisnosti od varijante rs11568732. Takođe, postoji mogućnost da je varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) u neravnoteži vezanosti (eng. *linkage disequilibrium*) sa nekom drugom funkcionalnom varijantom u okviru gena koji su odgovorni za metabolizam klopidogrela [139] ili pak u samom genu *CYP2C19*, ali nije bila detektovana korišćenim metodološkim pristupom.

Rezultati dobijeni u asocijativnom delu ove studije kao i u *in vitro* eksperimentima, ukazuju na neophodnost daljih istraživanja usmerenih na analizu i karakterizaciju varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*), kao i utvrđivanje njenog značaja za pacijente na terapiji klopidogrelom. Takođe, dalje funkcijske analize ove varijante mogle bi doprineti rasvetljavanju varijabilnosti u odgovoru na terapiju drugim lekovima čiji metabolizam značajno zavisi od enzima *CYP2C19*. Među njima se nalaze i lekovi sa veoma širokom upotrebom, kao što su citalopram, sertralin i amitriptulin koji se koriste u terapiji različitih depresivnih poremećaja, antifungicidni lek varikonazol, kao i omeprazol i drugi inhibitori protonske pumpe koji se koriste u lečenju čira na želucu [92, 254].

Detaljnija saznanja o regulaciji ekspresije gena *CYP2C19*, imala bi značaj ne samo na polju farmakogenetike već i sa fundamentalnog aspekta. Preciznije informacije o faktorima koji utiču na regulaciju ekspresije, mogli bi da doprinesu boljem sagledavanju uloge gena *CYP2C19* u bazalnim, ali i u izmenjenim fiziološkim uslovima. Ovo je od posebnog značaja, s obzirom da je pokazano da ovaj gen ima važnu funkciju u razvoju i funkcionisanju mozga [255], kao i druge endogene funkcije [91, 256].

5.4 Analiza isplativosti farmakogenetički vođene terapije klopidogrelom kod pacijenata podvrgnutih perkutanoj koronarnoj intervenciji u Srbiji

Osim toga što se veliki broj studija bavi procenom efikasnosti i kliničkog značaja farmakogenetički vođene terapije klopidogrelom [257, 258], poslednjih godina u fokus mnogih studija dolazi i ekonomski aspekt farmakogenetički vođene terapije [9, 10, 259-261]. Iako je primarni fokus naših istraživanja bio na ispitivanjima uticaja promotorskih varijanti *CYP2C19* gena u pogledu pojačanog odgovora na klopidogrel, odlučili smo da u istraživanja uključimo i ekonomskom aspekt farmakogenetički vođene terapije klopidogrelom kod pacijenata podvrgnutih perkutanoj koronarnoj intervenciji u Srbiji, pošto ovi podaci ne postoje za našu populaciju. Ovakvu vrstu analize, veoma je značajno sprovesti u svakoj zemlji, s obzirom na varijacije u učestalosti relevantnih alela u različitim populacijama, lekova koji su dostupni na tržištu, kao i vidova zdravstvenog osiguranja u određenoj zemlji.

Nakon uvođenja nove generacije tienopiridinskih antiagregacionih agenasa kao što su prasugrel i tikagrelor, za koje studije pokazuju da su efikasniji u sprečavanju neželjenih kardiovaskularnih događaja nakon PCI [78, 262, 263] i čija efikasnost ne zavisi od genotipa *CYP2C19* [65, 103, 264], postavlja se pitanje isplativosti terapije klopidogrelom sa i bez genetičkog testiranja, naspram upotrebe antiagregacionih lekova nove generacije.

Pošto su rezultati ove studije pokazali da promotorska varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) nema uticaja na efekte klopidogrela, ona nije uzeta u razmatranje prilikom evaluacije ekonomskog aspekta farmakogenetički vođene terapije. Takođe, u ovom kontekstu, nije razmatran ni varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*), jer procena njenog kliničkog značaja zahteva dodatna istraživanja.

Sa druge strane, najveći broj studija pruža nedvosmislene podatke o povezanosti varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) sa neželjenim kardiovaskularnim događajima kod pacijenata podvrgnutih PCI koji su na terapiji klopidogrelom [96, 265-267]. Takođe, Konzorcijum za implementaciju kliničke farmakogenetike daje preporuku za primenu alternativne terapije (tikagrelor, prasugrel) kod pacijenata koji su PM prema *CYP2C19* genotipu [114]. Zbog toga smo odlučili da u ekonomsku analizu uključimo samo varijantu rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*).

Prilikom ekonomske analize uzete su u obzir cene koštanja hospitalizacije, vaskularne operacije, genetičkog testiranja i rehabilitacija. Osim ovoga, u model je uključena i cena ponovljene PCI, koja je najčešće neophodna nakog neželjenih kardiovaskularnih događaja. Kako su podaci o koštanju terapije najčešće rasuti i nemaju normalnu raspodelu i odstupaju od procene statističkih merenja, u ovoj studiji korisćena je Monte Karlo simulacija. Ova simulacija uzima u obzir probablističku prirodu varijabli, pa stoga rezultati mogu biti neznatno drugačiji kod određenog seta eksperimenata i ne dovode do produkcije 'fiksni rezultata' u svakom slučaju, što je različito od 'fiksni rezultata' koji se dobijaju klasičnim statističkim zaključivanjem.

Prema osnovnoj postavci modela procenjeno je da strategija koja uključuje genetičko testiranje predstavlja isplativiju strategiju i da u proseku donosi uštedu od 13 € po pacijentu u poređenju sa strategijom da svi pacijenti dobiju klopidogetrel nezavisno od genotipa *CYP2C19*2*. Ova postavka modela bazirana na pretpostavci da je procenat homozigotnih i heterozigotnih nosilaca varijante rs4244285 (*CYP2C19*2*), koji je utvrđen ovom studijom (28,9%), identičan i za ostatak populacije Srbije. Da bi se procenila ekonomska isplativost genetičkog testiranja tj. farmakogenetički vođenje terapije klopidogetrelom urađena je i analiza prelomne tačke koja pokazuje tačku u kojoj bi troškovi dveju strategija bili izjednačeni u zavisnosti od promene učestalosti alela varijante rs4244285 (*CYP2C19*2*). Analiza je pokazala da bi se u našem slučaju prelomna tačka dostigla kada bi procenat homozigotnih i heterozigotnih nosilaca alela A varijante rs4244285 bio 25%, a daljim smanjenjem ovog procenta strategija 'A' koja podrazumeva određivanje terapije bez genotipizacije varijante rs4244285 (*CYP2C19*2*) bi postala isplativija.

Alternativna terapija za klopidogetrel kod pacijenata koji su nosioci alela A varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) je tikagrelor ili prasugrel i preko 300% je skuplja od klopidogetrela. Prema grubim procenama, terapija klopidogetrelom na godišnjem nivou iznosi oko 130 €, a tikagrelorom čak 445 €, što čini razliku u troškovima od oko 300 € po pacijantu na godinu dana. Sa druge strane terapija tikagrelorom je značajno jeftinija u poređenju sa saniranjem posledica reinfarkta koji su najčešće posledica neadekvatnog odgovora na terapiju klopidogetrelom. Troškovi posledica reinfarkta obuhvataju ponovnu PCI (1000€), hospitalizaciju (200 €/dan) kao i rehabilitaciju (12,5 €/dan). Kada se sve ovo sagleda, jasno je da je za pacijenta

koji su nosioci alela A varijante rs424428 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) upotreba tikagrelora rezultira uštedom. Sa druge strane, upotreba tikagrelora kod svih pacijenata bila bi loša praksa s obzirom na veliku razliku u ceni i činjenicu da najveći broj pacijenata dobro odgovara na terapiju klopidogetrelom, kao i da je učestalost alela A varijante rs424428 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) oko 15% u populaciji pacijenata iz Srbije. U detaljnu ekonomsku evaluaciju nije bio uključen prasugrel jer ovaj lek nije registrovan u Srbiji od strane Agencije za lekove i medicinska sredstva. Ovaj ekonomski model treba posmatrati isključivo u okviru Srbije i trenutnih uslova i cena lečenja PCI pacijenata na terapiji klopidogetrelom.

Pored toga što je pokazano da varijanta rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) ima značajan uticaj na nivo ADP-zavisne agregacije trombocita i kliničke ishode kod pacijenata na terapiji klopidogetrelom i što je svrstana u različite nacionalne i međunarodne vodiče kao varijanta od koje zavisi izbor antitrombocitne terapije, naš rezultat o finansijskom aspektu ispitivanja ove varijante je još jedan u ovom nizu razloga koji bi trebao da podrži i doprinese ubrzanju uvođenja farmakogenetike i razvoju personalizovane medicine u oblasti kardiovaskularnih oboljenja u Srbiji.

5.5 Poređenje učestalosti alela ispitivanih varijanti u različitim svetskim populacijama

Zastupljenost manje učestalih alela varijanti rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) i rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) u ispitivanoj grupi pacijenata bila je u saglasnosti sa odgovarajućim učestalostima prijavljenim u drugim evropskim (Belgija [185], Švedska [108], Slovenija [194], Italija [187], Grčka [188, 189]), južno-američkim (Kolumbija [211], Bolivija [212]) i afričkim (Etiopija, Egipat) populacijama. Dalje, učestalost pomenutih alela se značajno razlikuje u poređenju sa azijskim populacijama (Kina [198-200], Japan [109, 226], Koreja [108], Tajland [201], Indija [203, 204]) što je u skladu sa rezultatima dosadašnjih studija koje pokazuju prisustvo značajnih razlika u distribuciji i učestalosti pojedinačnih nukleotidnih varijanti između evropskih i azijskih populacija[268].

Varijanta rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*) nije detektovana ni kod jednog pacijenta u našoj grupi, što nije iznenađujuće, s obzirom da se ova varijanta predominantno javlja u azijskim

populacijama, a nije detektovana ni u većini evropskih zemalja [140, 187, 189] ili ima izuzetno nisku učestalost (<1%) [183, 192].

Kao što je već napomenuto, učestalost varijante alela G rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) data je samo u tri studije. Arefayene i saradnici [179] prijavili su učestalost varijante rs11568732 u od 7,3% kod afro-amarikanaca, 6% kod belaca, a Fukushima-Uesaka i saradnici [226] našli su da je učestalost ovog alela 17,4% u japanskoj populaciji. Značajna razlika u učestalosti pomenute varijante očekivano se javlja između naše ispitivane grupe i Japanaca. Međutim, nema razlike u učestalosti varijante rs11568732 u Srbiji i Južnoj Indiji, što je neočekivano s obzirom da je uočena značajna razlika u učestalosti između svih ostalih ispitivanih varijanti (rs4244285, rs4986893 i rs12248560). Ovakav rezultat bi mogao da bude posledica malog uzoraka u studiji Dr Satyanarayana Chakradhara Rao i saradnika koji su ovom prilikom izvršili genotipizaciju pomenute varijante u svega 56 osoba.

Prema našim saznanjima ovo je prva studija koja prikazuje učestalosti alela varijanti rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19*3*), rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19*17*) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19*20*) kod pacijenata podvrgnutih PCI u Srbiji. Zastupljenost alela varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19*2*) su date u ranijoj studiji [229] i u saglasnosti su sa našim rezultatima.

Informacije o učestalosti alela određenih genetičkih varijanti u populaciji Srbije su od velikog značaja za proces implementacije farmakogenetike i pospešivanje personalizovane medicine, jer od njih zavisi koje od varijanti bi trebalo da uđu u osnovne panele genetičkih testova za rutinsku primenu.

5.6 Farmakogenetika u svetu i Srbiji

Tokom poslednje dve decenije, farmakogenetika postaje jako značajno polje istraživanja u svetu koje donosi veliki broj novih saznanja. Takođe se formiraju brojna tela koja za cilj imaju da olakšaju i prate implementaciju farmakogenetike u kliničku praksu. Jedna od prvih grupa koja se bavi sumiranjem istraživanja vezanih za uticaj genetičkih varijanti na efikasnost terapije i razvojem uputstava za farmakogenetički zasnovane preporuke o terapiji, osnovana je 2005. godine i to je Holandska radna grupa za farmakogenetiku (eng. *Dutch Pharmacogenetics Working Group-DPWG*). Ova grupa radi i na razvoju kompjuterizovanog sistema za prepisivanje

lekova koji sadrži integrisane preporuke za farmakogenetički vođenu terapiju i na taj način pomaže lekarima i farmaceutima pri određivanju terapije. DPWG je do 2015. godine dala uputstva za 80 kombinacija lekova i gena, koji su sastavni deo nacionalne baze podataka i dostupne svim lekarima i farmaceutima [269, 270]. Kanadska farmakogenomička mreža za bezbednost lekova (eng. *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety-CPNDS*) je farmakogenomski konzorcijum osnovan 2004. godine sa ciljem da razjasni genetičku i mehaničku osnovu neželjenih dejstava lekova i da razvije kliničke farmakogenomske alate koji će povećati bezbednost i efikasnost lekova koji se koriste u terapiji dece i odraslih. U Japanu je 2009. godine takođe osnovan *Japan pharmacogenetics data science consortium* (JPDSC) koji za cilj ima formiranje DNK baze podataka koja se koristi za ispitivanje genetičkih uzroka neželjenih efekata lekova u japanskoj populaciji, a u skladu sa tim i razvojem novih visoko efikasnih i bezbednih lekova.

Godine 2009. je osnovan Konzorcijum za implementaciju kliničke farmakogenetike (CIPC) koji se sastoji od eksperata iz oblasti farmakogenetike, farmakogenomike i laboratorijske medicine (<https://cpicpgx.org/>) [271]. Zadatak konzorcijuma je da odgovori na potrebu za veoma specifičnim uputstvima za lekare, kako da koriste i interpretiraju farmakogenetičke testove. Konzorcijum je do sada razvio širok okvir za razumevanje tipova i nivoa dokaza koji su potrebni da se farmakogenetika uvede u kliničku praksu. Ovi dokazi se zasnivaju na naučnoj pouzdanosti povezanosti neke genetičke varijante i efekata određenog leka, ozbiljnosti osnovnog oboljenja, dostupnosti alternativnog doziranja ili alternativnih lekova za pacijente koji imaju visokorizične genotipove, zatim dostupnosti laboratorijskih testova za praćenje odgovora na terapiju. CIPC obezbeđuje besplatno dostupna, recenzirana, ažurirana i detaljna uputstva za prevođenje rezultata genetičkih testova i njihovu primenu u kliničkoj praksi prilikom prepisivanja određenih lekova [272].

Svi podaci, rezultati i uputstva dati od strane pomenutih konzorcijuma integrisani su u jedinstvenu bazu podataka pod nazivom Farmakogenomska baza znanja (eng. *Pharmacogenomics Knowledge Base-PharmGKB*) [272]. PharmGKB za sada zadrži podatke o uputstvima za terapije sa preko 600 lekova i genskih varijanti relevantnih za njihovu efikasnost i bezbednost. Baza je dostupna na internetu i omogućava pretraživanje podataka po genima,

lekovima, metaboličkim putevima. Takođe, sadrži uputstva za određivanje doze lekova kao i posebne oznake i upozorenja koja se nalaze na lekovima, a data su od strane relevantnih agencija za odobravanje i bezbednost lekova (FDA, EMA, FMDA, HCSC).

I pored svega navedenog, jedna od osnovnih prepreka za uvođenje farmakogenetičkog testiranja u rutinsku kliničku praksu je prevođenje rezultata genetičkih testova u konkretne odluke o prepisivanju ili doziranju određenog leka [273]. Svi farmakogenetički vodiči daju određene preporuke, ali je konačna odluka uvek na lekarima koji na osnovu genetičkog testa, ali i brojnih drugih kliničkih parametara donose odluku o terapiji [114]. Značajan problem predstavlja i razlika u klasifikaciji, nomenklaturi kao i preporukama o doziranju lekova od strane različitih konzorcijuma koje bi u skorijoj budućnosti trebale da budu sinhronizovane [270]. Još jedan od važnih elemenata jeste i otvorenost lekara za implementaciju farmakogenetike kao i njihova kontinuirana edukacija u ovom polju. Pored problema vezanih za naučno-istraživački aspekt postoje i brojni etički, pravni i ekonomski aspekti koje treba rešiti u procesu implementacije farmakogenetike u kliničku praksu [1, 274, 275].

U Srbiji farmakogenetika je još uvek u povoju, postoji nekoliko naučno-istraživačkih grupa koje se bave farmakogenetikom [181, 229, 276-279], ali kada je u pitanju implementacija u kliničku praksu deluje da smo još uvek daleko od najvećeg broja Evropskih zemalja. Nekoliko bitnih faktora koji usporavaju uvođenje farmakogenetike u rutinsku kliničku praksu jesu nedostatak resursa, nedostatak informisanosti lekara o svim mogućnostima i značaju farmakogenetičkog testiranja u našoj zemlji. Uz ovo dolazi i nedostatak pravne i etičke regulative vezane za implementaciju farmakogenetike kao i pitanja pokrivanja troškova genetičkih testiranja. U Srbiji je u procesu osnivanje Srpskog društva za farmakogenomiku i personalizovanu terapiju (eng. *Serbian Society of Pharmacogenetics and Personalized Therapy*, SSPT) za koje se nadamo da će pomoći u prevazilaženju pomenutih prepreka kao i pisanju i ažuriranju uputstava za farmakogenetički vođenu terapiju koja se jednostavno mogu primeniti od strane lekara u kliničkoj praksi. Dodatno, osnivanje jedinstvenog centra koji bi se bavio genetičkim testiranjima umnogome bi doprinelo smanjenju cene genetičkog testiranja, formiranju jedinstvenog sistema informisanja i baza podataka o lekovima i varijantama u genima

relevantnim za njihovo dejstvo i tako ubrzalo uvođenje farmakogenetike u kliničku praksu u Srbiji [280].

Rezultati naših istraživanja su u skladu sa objavljenim farmakogenetičkim studija [178, 181, 229] za gen *CYP2C19* i ukazuju da je klinički i ekonomski opravdano uvesti genetičko testiranje varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2) kod pacijenata u Srbiji. Sa druge strane, varijanta rs4986893 (c.636G>A; *CYP2C19**3) i pored pokazanog kliničkog i funkcionalnog značaja nije relevantna za genetičko testiranje u populaciji pacijenata iz Srbije jer nije detektovano prisustvo nefunkcionalnog alela. Kada se radi o varijantama rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) i rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) potrebna su dalja i obimnija istraživanja kako bi se rasvetlila njihova uloga i potencijalni klinički značaj.

Zaključci

1. Analiza povezanosti odabranih promotorskih varijanti gena *CYP2C19* sa pojavom krvarenja kod pacijenata podvrgnutih perkutanoj koronarnoj intervenciji na terapiji antiagregacionim lekom klopidogrelom pokazala je da:
 - varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) nije povezana sa krvarenjem BARC \geq 2;
 - varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) jeste povezana sa krvarenjem BARC \geq 2 i da alel G ove varijante povećava mogućnost krvarenja 4 puta.
2. Sekvenciranje svih devet egzona gena *CYP2C19*, okolnih delova introna, kao i 3' UTR i 5' UTR kod nosilaca alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) pokazalo je da:
 - u populaciji Srbije alel G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) nije deo haplotipa *CYP2C19**3B i ne nasleđuje se vezano sa alelom A varijante rs4986893 (c.636G>A, *CYP2C19**3) koja dovodi do formiranja prevremenog stop kodona i tako sinteze nefunkcionalnog enzima *CYP2C19*;
 - alel G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) se ne nasleđuje vezano ni sa jednim alelom neke do sada funkcijski okarakterisane varijante gena *CYP2C19*.
3. Ispitivanje povezanosti promotorskih varijanti gena *CYP2C19* sa terapijskim odgovorom na klopidogrel procenjenim na osnovu ADP-indukovane agregacije trombocita pokazalo je da:
 - nema značajne razlike u vrednostima ADP-indukovane agregacije trombocita među pacijentima koji su nosioci alela T varijante rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) i homozigotnih nosilaca alela C iste varijante;
 - nema razlike vrednosti ADP-indukovane agregacije trombocita između homozigotnih i heterozigotnih nosilaca alela G varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) i homozigotnih nosilaca alela T ove varijante;
 - varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) nije povezana sa povišenim rizikom krvarenja na osnovu tri različite granične vrednosti ADP-indukovane agregacije koje oslikavaju povišen odgovor na klopidogrel, a samim tim i povećan rizik od krvarenja;

- varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) nije povezana sa povišenim rizikom krvarenja na osnovu tri različite granične vrednosti ADP-indukovane agregacije koje oslikavaju povišen odgovor na klopidogrel.
4. *In vitro* analizama varijante rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) u sistemu tranzijentno transfekovane Caco-2 permanentne ćelijske linije pokazano je da:
- nukleotid G ove varijante dovodi do smanjenja aktivnosti promotora *CYP2C19* za 20%;
 - ekspresija rekombinantnog progesteronskog receptora utiče na povećanje promotorske aktivnosti gena *CYP2C19* nezavisno od varijante rs11568732;
 - ekspresija rekombinantnog glukokortikoidnog receptora u Caco-2 ćelijama, nakon aktivacije deksametazonom, dovodi do povećanja razlike između aktivnosti promotora gena *CYP2C19* sa nukleotidom G na poziciji varijante rs11568732 i promotora sa nukleotidom T i to sa 18% na 31%.
 -
5. Analiza isplativosti farmakogenetički vođene terapije klopidogrelom u odnosu na genotip varijante rs4244285 (c.681G>A; *CYP2C19**2) pokazala se kao strategija uštede u datim uslovima u Srbiji.
6. Učestalosti alela svih detektovanih varijanti u okviru gena *CYP2C19* (rs12248560, rs11568732, rs4244285 i rs4986893) su u skladu sa učestalostima koje su prijavljene za različite populacije belaca.
7. Varijanta rs12248560 (c.-806C>T, *CYP2C19**17) nije pouzdan prognostički faktor za procenu rizika od krvarenja niti ADP-indukovanu agregaciju kod pacijenata na terapiji klopidogrelom u Srbiji.
8. Varijanta rs11568732 (c.-889T>G, *CYP2C19**20) zahteva dalja istraživanja da bi se pouzdano mogla utvrditi njena uloga u krvarenju kod PCI pacijenata na terapiji klopidogrelom.

Literatura

- 1 Vogenberg FR, Isaacson Barash C, Pursel M (2010) Personalized medicine: part 1: evolution and development into theranostics. *P T* 35 (10): 560-576
- 2 Pirmohamed M (2001) Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Br J Clin Pharmacol* 52 (4): 345-347
- 3 Pacey S, Workman P, Sarker D (2011) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Drug Development. In: Schwab M. In, *Encyclopedia of Cancer* ed. Springer
- 4 Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS, Lachno DR, Salazar D, Winters KJ (2007) Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost* 5 (12): 2429-2436 DOI 10.1111/j.1538-7836.2007.02775.x
- 5 Mini E, Nobili S (2009) Pharmacogenetics: implementing personalized medicine. *Clin Cases Miner Bone Metab* 6 (1): 17-24
- 6 Johnson JA, Cavallari LH (2013) Pharmacogenetics and cardiovascular disease--implications for personalized medicine. *Pharmacol Rev* 65 (3): 987-1009 DOI 10.1124/pr.112.007252
- 7 Knauer MJ, Diamandis EP, Hulot JS, Kim RB, So DY (2015) Clopidogrel and CYP2C19: pharmacogenetic testing ready for clinical prime time? *Clin Chem* 61 (10): 1235-1240 DOI 10.1373/clinchem.2015.238105
- 8 Berm EJ, Loeff M, Wilffert B, Boersma C, Annemans L, Vegter S, Boven JF, Postma MJ (2016) Economic Evaluations of Pharmacogenetic and Pharmacogenomic Screening Tests: A Systematic Review. Second Update of the Literature. *PLoS One* 11 (1): e0146262 DOI 10.1371/journal.pone.0146262
- 9 Deiman BA, Tonino PA, Kouhestani K, Schrover CE, Scharnhorst V, Dekker LR, Pijls NH (2016) Reduced number of cardiovascular events and increased cost-effectiveness by genotype-guided antiplatelet therapy in patients undergoing percutaneous coronary interventions in the Netherlands. *Neth Heart J* 24 (10): 589-599 DOI 10.1007/s12471-016-0873-z
- 10 Verbelen M, Weale ME, Lewis CM (2017) Cost-effectiveness of pharmacogenetic-guided treatment: are we there yet? *Pharmacogenomics J* 17 (5): 395-402 DOI 10.1038/tpj.2017.21
- 11 Widimsky P, Wijns W, Fajadet J, de Belder M, Knot J, Aaberge L, Andrikopoulos G, Baz JA, Betriu A, Claeys M, Danchin N, Djambazov S, Erne P, Hartikainen J, Huber K, Kala P, Klinecva M, Kristensen SD, Ludman P, Ferre JM, Merkely B, Milicic D, Morais J, Noc M, Opolski G, Ostojic M, Radovanovic D, De Servi S, Stenestrand U, Studencan M, Tubaro M, Vasiljevic Z, Weidinger F, Witkowski A, Zeymer U, Interventions EAfPC (2010) Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries. *Eur Heart J* 31 (8): 943-957 DOI 10.1093/eurheartj/ehp492
- 12 Tabas I, García-Cardeña G, Owens GK (2015) Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* 209 (1): 13-22 DOI 10.1083/jcb.201412052
- 13 Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS (2005) Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (1): 29-38 DOI 10.1161/01.ATV.0000150649.39934.13
- 14 Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407 (6801): 233-241 DOI 10.1038/35025203
- 15 Rothwell PM (2007) Atherothrombosis and ischaemic stroke. *BMJ* 334 (7590): 379-380 DOI 10.1136/bmj.38964.489051.80
- 16 Huo Y, Ley KF (2004) Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 14 (1): 18-22
- 17 Lievens D, von Hundelshausen P (2011) Platelets in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 106 (5): 827-838 DOI 10.1160/TH11-08-0592
- 18 Anderson JL, Morrow DA (2017) Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 376 (21): 2053-2064 DOI 10.1056/NEJMra1606915

- 19 O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE, Chung MK, de Lemos JA, Ettinger SM, Fang JC, Fesmire FM, Franklin BA, Granger CB, Krumholz HM, Linderbaum JA, Morrow DA, Newby LK, Ornato JP, Ou N, Radford MJ, Tamis-Holland JE, Tommaso CL, Tracy CM, Woo YJ, Zhao DX, Anderson JL, Jacobs AK, Halperin JL, Albert NM, Brindis RG, Creager MA, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Stevenson WG, Yancy CW, Guidelines ACoCFAHATFoP (2013) 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* 127 (4): e362-425 DOI 10.1161/CIR.0b013e3182742cf6
- 20 Keeley EC, Hillis LD (2007) Primary PCI for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 356 (1): 47-54 DOI 10.1056/NEJMct063503
- 21 Lip GY, Windecker S, Huber K, Kirchhof P, Marin F, Ten Berg JM, Haeusler KG, Boriani G, Capodanno D, Gilard M, Zeymer U, Lane D, Storey RF, Bueno H, Collet JP, Fauchier L, Halvorsen S, Lettino M, Morais J, Mueller C, Potpara TS, Rasmussen LH, Rubboli A, Tamargo J, Valgimigli M, Zamorano JL, Reviewers D (2014) Management of antithrombotic therapy in atrial fibrillation patients presenting with acute coronary syndrome and/or undergoing percutaneous coronary or valve interventions: a joint consensus document of the European Society of Cardiology Working Group on Thrombosis, European Heart Rhythm Association (EHRA), European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI) and European Association of Acute Cardiac Care (ACCA) endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS) and Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS). *Eur Heart J* 35 (45): 3155-3179 DOI 10.1093/eurheartj/ehu298
- 22 Grotta JC (2013) Clinical practice. Carotid stenosis. *N Engl J Med* 369 (12): 1143-1150 DOI 10.1056/NEJMcpl214999
- 23 Abbott AL, Paraskevas KI, Kakkos SK, Golledge J, Eckstein HH, Diaz-Sandoval LJ, Cao L, Fu Q, Wijeratne T, Leung TW, Montero-Baker M, Lee BC, Pircher S, Bosch M, Dennekamp M, Ringleb P (2015) Systematic Review of Guidelines for the Management of Asymptomatic and Symptomatic Carotid Stenosis. *Stroke* 46 (11): 3288-3301 DOI 10.1161/STROKEAHA.115.003390
- 24 Shah DM, Darling RC, Chang BB, Paty PS, Kreienberg PB, Lloyd WE, Leather RP (1998) Carotid endarterectomy by eversion technique: its safety and durability. *Ann Surg* 228 (4): 471-478
- 25 Brott TG, Halperin JL, Abbara S, Bacharach JM, Barr JD, Bush RL, Cates CU, Creager MA, Fowler SB, Friday G, Hertzberg VS, Mclff EB, Moore WS, Panagos PD, Riles TS, Rosenwasser RH, Taylor AJ, Cardiology ACo, Association AS, Surgeons AAoN, Radiology ACo, Radiology AACo, Surgery SoN, Medicine SfV, Surgery SfV (2011) 2011 ASA/ACCF/AHA/AANN/AANS/ACR/ASNR/CNS/SAIP/SCAI/SIR/SNIS/SVM/SVS guideline on the management of patients with extracranial carotid and vertebral artery disease. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American Stroke Association, American Association of Neuroscience Nurses, American Association of Neurological Surgeons, American College of Radiology, American Society of Neuroradiology, Congress of Neurological Surgeons, Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society of NeuroInterventional Surgery, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. *Circulation* 124 (4): e54-130 DOI 10.1161/CIR.0b013e31820d8c98
- 26 Howell SJ (2007) Carotid endarterectomy. *Br J Anaesth* 99 (1): 119-131 DOI 10.1093/bja/aem137
- 27 Koenig-Oberhuber V, Filipovic M (2016) New antiplatelet drugs and new oral anticoagulants. *Br J Anaesth* 117 Suppl 2: ii74-ii84 DOI 10.1093/bja/aew214
- 28 Colman R, Marder V, Clowes A, George J, Goldhaber S (2006) Hemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- 29 Gale AJ (2011) Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol* 39 (1): 273-280 DOI 10.1177/0192623310389474

- 30 Krishnegowda M, Rajashekaraiiah V (2015) Platelet disorders: an overview. *Blood Coagul Fibrinolysis* 26 (5): 479-491 DOI 10.1097/01.mbc.0000469521.23628.2d
- 31 Saboor M, Ayub Q, Ilyas S, Moinuddin (2013) Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology. *Pak J Med Sci* 29 (3): 891-896
- 32 Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY (2016) Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int* 2016: 9060143 DOI 10.1155/2016/9060143
- 33 Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V (2009) Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 94 (5): 700-711 DOI 10.3324/haematol.2008.003178
- 34 Fullard JF (2004) The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. *Curr Pharm Des* 10 (14): 1567-1576
- 35 Blair P, Flaumenhaft R (2009) Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 23 (4): 177-189 DOI 10.1016/j.blre.2009.04.001
- 36 Sharda A, Flaumenhaft R (2018) The life cycle of platelet granules. *F1000Res* 7: 236 DOI 10.12688/f1000research.13283.1
- 37 Dorsam RT, Kunapuli SP (2004) Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 113 (3): 340-345 DOI 10.1172/JCI20986
- 38 Noé L, Peeters K, Izzi B, Van Geet C, Freson K (2010) Regulators of platelet cAMP levels: clinical and therapeutic implications. *Curr Med Chem* 17 (26): 2897-2905
- 39 Puri RN (1999) ADP-induced platelet aggregation and inhibition of adenylyl cyclase activity stimulated by prostaglandins: signal transduction mechanisms. *Biochem Pharmacol* 57 (8): 851-859
- 40 Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK, Investigators CiUAtPRET (2001) Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 345 (7): 494-502 DOI 10.1056/NEJMoa010746
- 41 Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blömsstrom-Lundqvist C, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, Fernandez-Aviles F, Gershlick AH, Giannuzzi P, Halvorsen S, Huber K, Juni P, Kastrati A, Knuuti J, Lenzen MJ, Mahaffey KW, Valgimigli M, van 't Hof A, Widimsky P, Zahger D, (ESC) TFotmoS-seamiotESoC (2012) ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 33 (20): 2569-2619 DOI 10.1093/eurheartj/ehs215
- 42 Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, Costa F, Jeppsson A, Juni P, Kastrati A, Kolh P, Mauri L, Montalescot G, Neumann FJ, Petricevic M, Roffi M, Steg PG, Windecker S, Zamorano JL, Levine GN, Group ESD, (CPG) ECfPG, Societies ENC (2018) 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J* 39 (3): 213-260 DOI 10.1093/eurheartj/ehx419
- 43 Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK, Goltzarian J, Gornik HL, Halperin JL, Jaff MR, Moneta GL, Olin JW, Stanley JC, White CJ, White JV, Zierler RE, Foundation ACoC, Association AH, Interventions SfCAa, Radiology Sol, Medicine SfV, Surgery SfV (2012) 2011 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with peripheral artery disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. *Catheter Cardiovasc Interv* 79 (4): 501-531 DOI 10.1002/ccd.2337344 Mansour K, Taher AT,

- Musallam KM, Alam S (2009) Aspirin resistance. *Adv Hematol* 2009: 937352 DOI 10.1155/2009/937352
- 45 Harrison P, Segal H, Blasbery K, Furtado C, Silver L, Rothwell PM (2005) Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. *Stroke* 36 (5): 1001-1005 DOI 10.1161/01.STR.0000162719.11058.bd
- 46 Wang ZY, Chen M, Zhu LL, Yu LS, Zeng S, Xiang MX, Zhou Q (2015) Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: updated review and risk management in combination therapy. *Ther Clin Risk Manag* 11: 449-467 DOI 10.2147/TCRM.S80437
- 47 Reaume KT, Regal RE, Dorsch MP (2008) Indications for dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel: evidence-based recommendations for use. *Ann Pharmacother* 42 (4): 550-557 DOI 10.1345/aph.1K433
- 48 Savi P, Zachayus JL, Delesque-Touchard N, Labouret C, Hervé C, Uzabiaga MF, Pereillo JM, Culouscou JM, Bono F, Ferrara P, Herbert JM (2006) The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y₁₂ receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (29): 11069-11074 DOI 10.1073/pnas.0510446103
- 49 Marcucci R, Grifoni E, Giusti B (2016) On-treatment platelet reactivity: State of the art and perspectives. *Vascul Pharmacol* 77: 8-18 DOI 10.1016/j.vph.2015.10.005
- 50 Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM (2000) Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 84 (5): 891-896
- 51 Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert JM, Maffrand JP, Picard C (2002) Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 30 (11): 1288-1295
- 52 Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, Costa MA (2007) Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol* 49 (14): 1505-1516 DOI 10.1016/j.jacc.2006.11.044
- 53 Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, Bailey SR, Bittl JA, Cercek B, Chambers CE, Ellis SG, Guyton RA, Hollenberg SM, Khot UN, Lange RA, Mauri L, Mehran R, Moussa ID, Mukherjee D, Nallamothu BK, Ting HH (2011) 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *Circulation* 124 (23): e574-651 DOI 10.1161/CIR.0b013e31823ba622
- 54 Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, Borger MA, Brotons C, Chew DP, Gencer B, Hasenfuss G, Kjeldsen K, Lancellotti P, Landmesser U, Mehilli J, Mukherjee D, Storey RF, Windecker S, Baumgartner H, Gaemperli O, Achenbach S, Agewall S, Badimon L, Baigent C, Bueno H, Bugiardini R, Carerj S, Casselman F, Cuisset T, Erol Ç, Fitzsimons D, Halle M, Hamm C, Hildick-Smith D, Huber K, Iliodromitis E, James S, Lewis BS, Lip GY, Piepoli MF, Richter D, Rosemann T, Sechtem U, Steg PG, Vrints C, Luis Zamorano J, Cardiology MoACSiPPwPS-SEotESo (2016) 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 37 (3): 267-315 DOI 10.1093/eurheartj/ehv320
- 55 Laura D (2012 Mar 8 [Updated 2018 Apr 18]) Clopidogrel Therapy and CYP2C19 Genotype In: Pratt V, McLeod H, Rubinstein W, et al., editors (Eds.) *Medical Genetics Summaries* [Internet]ed. National Center for Biotechnology Information (US).

- 56 Plavix PRODUCT MONOGRAPH. In: ed. Sanofi-aventis Canada Inc.2905 Place Louis-R. RenaudLaval (Québec) H7V 0A3.
- 57 Ricotta JJ, Aburahma A, Ascher E, Eskandari M, Faries P, Lal BK, Surgery SfV (2011) Updated Society for Vascular Surgery guidelines for management of extracranial carotid disease. *J Vasc Surg* 54 (3): e1-31 DOI 10.1016/j.jvs.2011.07.031
- 58 Comin J, Kallmes D (2011) Clopidogrel (plavix). *AJNR Am J Neuroradiol* 32 (11): 2002-2004 DOI 10.3174/ajnr.A2913
- 59 Cattaneo M (2011) Resistance to anti-platelet agents. *Thromb Res* 127 Suppl 3: S61-63 DOI 10.1016/S0049-3848(11)70017-2
- 60 Price MJ, Coleman JL, Steinhubl SR, Wong GB, Cannon CP, Teirstein PS (2006) Onset and offset of platelet inhibition after high-dose clopidogrel loading and standard daily therapy measured by a point-of-care assay in healthy volunteers. *Am J Cardiol* 98 (5): 681-684 DOI 10.1016/j.amjcard.2006.03.054
- 61 Zahno A, Brecht K, Bodmer M, Bur D, Tsakiris DA, Krähenbühl S (2010) Effects of drug interactions on biotransformation and antiplatelet effect of clopidogrel in vitro. *Br J Pharmacol* 161 (2): 393-404 DOI 10.1111/j.1476-5381.2010.00881.x
- 62 Tang M, Mukundan M, Yang J, Charpentier N, LeCluyse EL, Black C, Yang D, Shi D, Yan B (2006) Antiplatelet agents aspirin and clopidogrel are hydrolyzed by distinct carboxylesterases, and clopidogrel is transesterificated in the presence of ethyl alcohol. *J Pharmacol Exp Ther* 319 (3): 1467-1476 DOI 10.1124/jpet.106.110577
- 63 Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A (2010) Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 38 (1): 92-99 DOI 10.1124/dmd.109.029132
- 64 Lins R, Broekhuysen J, Necciari J, Deroubaix X (1999) Pharmacokinetic profile of 14C-labeled clopidogrel. *Semin Thromb Hemost* 25 Suppl 2: 29-33
- 65 Farid NA, Kurihara A, Wrighton SA (2010) Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans. *J Clin Pharmacol* 50 (2): 126-142 DOI 10.1177/0091270009343005
- 66 Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM (2003) Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 107 (23): 2908-2913 DOI 10.1161/01.CIR.0000072771.11429.83
- 67 Cattaneo M (2004) Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (11): 1980-1987 DOI 10.1161/01.ATV.0000145980.39477.a9
- 68 Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C (2005) Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* 45 (8): 1157-1164 DOI 10.1016/j.jacc.2005.01.034
- 69 Vlachojannis GJ, Dimitropoulos G, Alexopoulos D (2011) Clopidogrel resistance: current aspects and future directions. *Hellenic J Cardiol* 52 (3): 236-245
- 70 Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD (2007) Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 50 (19): 1822-1834 DOI 10.1016/j.jacc.2007.07.051
- 71 Goh C, Churilov L, Mitchell P, Dowling R, Yan B (2013) Clopidogrel hyper-response and bleeding risk in neurointerventional procedures. *AJNR Am J Neuroradiol* 34 (4): 721-726 DOI 10.3174/ajnr.A3418
- 72 Eikelboom JW, Mehta SR, Anand SS, Xie C, Fox KA, Yusuf S (2006) Adverse impact of bleeding on prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 114 (8): 774-782 DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.612812

- 73 Manoukian SV, Feit F, Mehran R, Voeltz MD, Ebrahimi R, Hamon M, Dangas GD, Lincoff AM, White HD, Moses JW, King SB, Ohman EM, Stone GW (2007) Impact of major bleeding on 30-day mortality and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes: an analysis from the ACUITY Trial. *J Am Coll Cardiol* 49 (12): 1362-1368 DOI 10.1016/j.jacc.2007.02.027
- 74 Mehta SK, Frutkin AD, Lindsey JB, House JA, Spertus JA, Rao SV, Ou FS, Roe MT, Peterson ED, Marso SP, Registry NCD (2009) Bleeding in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the development of a clinical risk algorithm from the National Cardiovascular Data Registry. *Circ Cardiovasc Interv* 2 (3): 222-229 DOI 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.108.846741
- 75 van Hattum ES, Algra A, Lawson JA, Eikelboom BC, Moll FL, Tangelder MJ (2009) Bleeding increases the risk of ischemic events in patients with peripheral arterial disease. *Circulation* 120 (16): 1569-1576 DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.858365
- 76 Mehran R, Rao SV, Bhatt DL, Gibson CM, Caixeta A, Eikelboom J, Kaul S, Wiviott SD, Menon V, Nikolsky E, Serebruany V, Valgimigli M, Vranckx P, Taggart D, Sabik JF, Cutlip DE, Krucoff MW, Ohman EM, Steg PG, White H (2011) Standardized bleeding definitions for cardiovascular clinical trials: a consensus report from the Bleeding Academic Research Consortium. *Circulation* 123 (23): 2736-2747 DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.009449
- 77 Angiolillo DJ, Rollini F, Storey RF, Bhatt DL, James S, Schneider DJ, Sibbing D, So DYF, Trenk D, Alexopoulos D, Gurbel PA, Hochholzer W, De Luca L, Bonello L, Aradi D, Cuisset T, Tantry US, Wang TY, Valgimigli M, Waksman R, Mehran R, Montalescot G, Franchi F, Price MJ (2017) International Expert Consensus on Switching Platelet P2Y. *Circulation* 136 (20): 1955-1975 DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031164
- 78 Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann FJ, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA, Riesmeyer J, Weerakkody G, Gibson CM, Antman EM, Investigators T-T (2007) Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 357 (20): 2001-2015 DOI 10.1056/NEJMoa0706482
- 79 Sorich MJ, Vitry A, Ward MB, Horowitz JD, McKinnon RA (2010) Prasugrel vs. clopidogrel for cytochrome P450 2C19-genotyped subgroups: integration of the TRITON-TIMI 38 trial data. *J Thromb Haemost* 8 (8): 1678-1684 DOI 10.1111/j.1538-7836.2010.03923.x
- 80 Dobesh PP, Oestreich JH (2014) Ticagrelor: pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical efficacy, and safety. *Pharmacotherapy* 34 (10): 1077-1090 DOI 10.1002/phar.1477
- 81 Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, Antonino MJ, Wei C, Teng R, Rasmussen L, Storey RF, Nielsen T, Eikelboom JW, Sabe-Affaki G, Husted S, Kereiakes DJ, Henderson D, Patel DV, Tantry US (2010) Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation* 121 (10): 1188-1199 DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.919456
- 82 Oestreich JH (2010) Elinogrel, a reversible P2Y12 receptor antagonist for the treatment of acute coronary syndrome and prevention of secondary thrombotic events. *Curr Opin Investig Drugs* 11 (3): 340-348
- 83 Norgard NB, Dinicolantonio JJ (2013) Clopidogrel, prasugrel, or ticagrelor? a practical guide to use of antiplatelet agents in patients with acute coronary syndromes. *Postgrad Med* 125 (4): 91-102 DOI 10.3810/pgm.2013.07.2682
- 84 Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB (2010) Clopidogrel pathway. *Pharmacogenet Genomics* 20 (7): 463-465 DOI 10.1097/FPC.0b013e3283385420
- 85 Su J, Xu J, Li X, Zhang H, Hu J, Fang R, Chen X (2012) ABCB1 C3435T polymorphism and response to clopidogrel treatment in coronary artery disease (CAD) patients: a meta-analysis. *PLoS One* 7 (10): e46366 DOI 10.1371/journal.pone.0046366
- 86 Caplain H, Donat F, Gaud C, Necciari J (1999) Pharmacokinetics of clopidogrel. *Semin Thromb Hemost* 25 Suppl 2: 25-28

- 87 Hagihara K, Kazui M, Kurihara A, Yoshiike M, Honda K, Okazaki O, Farid NA, Ikeda T (2009) A possible mechanism for the differences in efficiency and variability of active metabolite formation from thienopyridine antiplatelet agents, prasugrel and clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 37 (11): 2145-2152 DOI 10.1124/dmd.109.028498
- 88 Xiao FY, Luo JQ, Liu M, Chen BL, Cao S, Liu ZQ, Zhou HH, Zhou G, Zhang W (2017) Effect of carboxylesterase 1 S75N on clopidogrel therapy among acute coronary syndrome patients. *Sci Rep* 7 (1): 7244 DOI 10.1038/s41598-017-07736-1
- 89 Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhäuser C, Waldmann C, Schmalz HG, ten Berg JM, Taubert D (2011) Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med* 17 (1): 110-116 DOI 10.1038/nm.2281
- 90 Dansette PM, Rosi J, Bertho G, Mansuy D (2012) Cytochromes P450 catalyze both steps of the major pathway of clopidogrel bioactivation, whereas paraoxonase catalyzes the formation of a minor thiol metabolite isomer. *Chem Res Toxicol* 25 (2): 348-356 DOI 10.1021/tx2004085
- 91 Gray IC, Nobile C, Muresu R, Ford S, Spurr NK (1995) A 2.4-megabase physical map spanning the CYP2C gene cluster on chromosome 10q24. *Genomics* 28 (2): 328-332 DOI 10.1006/geno.1995.1149
- 92 Lee SJ (2012) Clinical Application of CYP2C19 Pharmacogenetics Toward More Personalized Medicine. *Front Genet* 3: 318 DOI 10.3389/fgene.2012.00318
- 93 **The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database.** In: Ingelman- Sundberg M, Daly K, Ann, Nebert, Daniel W (Ed.) ed.
- 94 Mao L, Jian C, Changzhi L, Dan H, Suihua H, Wenyi T, Wei W (2013) Cytochrome CYP2C19 polymorphism and risk of adverse clinical events in clopidogrel-treated patients: a meta-analysis based on 23,035 subjects. *Arch Cardiovasc Dis* 106 (10): 517-527 DOI 10.1016/j.acvd.2013.06.055
- 95 Niu X, Mao L, Huang Y, Baral S, Li JY, Gao Y, Xia YP, He QW, Wang MD, Li M, Zou L, Miao XP, Hu B (2015) 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* 35 (2): 147-156 DOI 10.1007/s11596-015-1404-7
- 96 Sofi F, Giusti B, Marcucci R, Gori AM, Abbate R, Gensini GF (2011) Cytochrome P450 2C19*2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 11 (3): 199-206 DOI 10.1038/tpj.2010.21
- 97 Sorich MJ, Polasek TM, Wiese MD (2012) Systematic review and meta-analysis of the association between cytochrome P450 2C19 genotype and bleeding. *Thromb Haemost* 108 (1): 199-200 DOI 10.1160/TH12-02-0095
- 98 Trenk D, Hochholzer W (2014) Genetics of platelet inhibitor treatment. *Br J Clin Pharmacol* 77 (4): 642-653 DOI 10.1111/bcp.12230
- 99 Ferguson RJ, De Morais SM, Benhamou S, Bouchardy C, Blaisdell J, Ibeanu G, Wilkinson GR, Sarich TC, Wright JM, Dayer P, Goldstein JA (1998) A new genetic defect in human CYP2C19: mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 284 (1): 356-361
- 100 Ibeanu GC, Blaisdell J, Ghanayem BI, Beyeler C, Benhamou S, Bouchardy C, Wilkinson GR, Dayer P, Daly AK, Goldstein JA (1998) An additional defective allele, CYP2C19*5, contributes to the S-mephenytoin poor metabolizer phenotype in Caucasians. *Pharmacogenetics* 8 (2): 129-135
- 101 Ibeanu GC, Goldstein JA, Meyer U, Benhamou S, Bouchardy C, Dayer P, Ghanayem BI, Blaisdell J (1998) Identification of new human CYP2C19 alleles (CYP2C19*6 and CYP2C19*2B) in a Caucasian poor metabolizer of mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 286 (3): 1490-1495
- 102 Ibeanu GC, Blaisdell J, Ferguson RJ, Ghanayem BI, Brosen K, Benhamou S, Bouchardy C, Wilkinson GR, Dayer P, Goldstein JA (1999) A novel transversion in the intron 5 donor splice junction of

- CYP2C19 and a sequence polymorphism in exon 3 contribute to the poor metabolizer phenotype for the anticonvulsant drug S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 290 (2): 635-640
- 103 Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, Husted S, Katus H, Steg PG, Shah SH, Becker RC, investigators P (2010) 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* 376 (9749): 1320-1328 DOI 10.1016/S0140-6736(10)61274-3
- 104 Sibbing D, Stegherr J, Latz W, Koch W, Mehilli J, Dörrler K, Morath T, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N (2009) Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 30 (8): 916-922 DOI 10.1093/eurheartj/ehp041
- 105 Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, Morath T, Schömig A, von Beckerath N, Kastrati A (2010) Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 121 (4): 512-518 DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.885194
- 106 Harmsze AM, van Werkum JW, Hackeng CM, Ruven HJ, Kelder JC, Bouman HJ, Breet NJ, Ten Berg JM, Klungel OH, de Boer A, Deneer VH (2012) The influence of CYP2C19*2 and *17 on on-treatment platelet reactivity and bleeding events in patients undergoing elective coronary stenting. *Pharmacogenet Genomics* 22 (3): 169-175 DOI 10.1097/FPC.0b013e32834ff6e3
- 107 Li Y, Tang HL, Hu YF, Xie HG (2012) The gain-of-function variant allele CYP2C19*17: a double-edged sword between thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients. *J Thromb Haemost* 10 (2): 199-206 DOI 10.1111/j.1538-7836.2011.04570.x
- 108 Ramsjö M, Aklillu E, Bohman L, Ingelman-Sundberg M, Roh HK, Bertilsson L (2010) CYP2C19 activity comparison between Swedes and Koreans: effect of genotype, sex, oral contraceptive use, and smoking. *Eur J Clin Pharmacol* 66 (9): 871-877 DOI 10.1007/s00228-010-0835-0
- 109 Sugimoto K, Uno T, Yamazaki H, Tateishi T (2008) Limited frequency of the CYP2C19*17 allele and its minor role in a Japanese population. *Br J Clin Pharmacol* 65 (3): 437-439 DOI 10.1111/j.1365-2125.2007.03057.x
- 110 Strom CM, Goos D, Crossley B, Zhang K, Buller-Burkle A, Jarvis M, Quan F, Peng M, Sun W (2012) Testing for variants in CYP2C19: population frequencies and testing experience in a clinical laboratory. *Genet Med* 14 (1): 95-100 DOI 10.1038/gim.0b013e3182329870
- 111 De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA (1994) Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* 46 (4): 594-598
- 112 de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA (1994) The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem* 269 (22): 15419-15422
- 113 Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M (2006) A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 79 (1): 103-113 DOI 10.1016/j.clpt.2005.10.002
- 114 Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, Klein TE, Sabatine MS, Johnson JA, Shuldiner AR, Consortium CPI (2013) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther* 94 (3): 317-323 DOI 10.1038/clpt.2013.105
- 115 Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P (2006) Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of

- clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 108 (7): 2244-2247 DOI 10.1182/blood-2006-04-013052
- 116 Umemura K, Furuta T, Kondo K (2008) The common gene variants of CYP2C19 affect pharmacokinetics and pharmacodynamics in an active metabolite of clopidogrel in healthy subjects. *J Thromb Haemost* 6 (8): 1439-1441 DOI 10.1111/j.1538-7836.2008.03050.x
- 117 Fontana P, Hulot JS, De Moerloose P, Gaussem P (2007) Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J Thromb Haemost* 5 (10): 2153-2155 DOI 10.1111/j.1538-7836.2007.02722.x
- 118 Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS (2009) Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 360 (4): 354-362 DOI 10.1056/NEJMoa0809171
- 119 Nasyuhana Sani Y, Sheau Chin L, Luen Hui L, Mohd Redhuan Shah Edwin NE, Teck Hwa G, Serebruany VL, Kah Hay Y (2013) The CYP2C19(*1/*)2 Genotype Does Not Adequately Predict Clopidogrel Response in Healthy Malaysian Volunteers. *Cardiol Res Pract* 2013: 128795 DOI 10.1155/2013/128795
- 120 Mega JL, Hochholzer W, Frelinger AL, Kluk MJ, Angiolillo DJ, Kereiakes DJ, Isserman S, Rogers WJ, Ruff CT, Contant C, Pencina MJ, Scirica BM, Longtine JA, Michelson AD, Sabatine MS (2011) Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *JAMA* 306 (20): 2221-2228 DOI 10.1001/jama.2011.1703
- 121 Han Y, Lv HH, Liu X, Dong Q, Yang XL, Li SX, Wu S, Jiang JM, Luo Z, Zhu DS, Zhang Y, Zheng Y, Guan YT, Xu JF (2015) Influence of Genetic Polymorphisms on Clopidogrel Response and Clinical Outcomes in Patients with Acute Ischemic Stroke CYP2C19 Genotype on Clopidogrel Response. *CNS Neurosci Ther* 21 (9): 692-697 DOI 10.1111/cns.12426
- 122 Harmsze A, van Werkum JW, Bouman HJ, Ruven HJ, Breet NJ, Ten Berg JM, Hackeng CM, Tjoeng MM, Klungel OH, de Boer A, Deneer VH (2010) 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* 20 (1): 18-25 DOI 10.1097/FPC.0b013e3283333dafa
- 123 Price MJ, Murray SS, Angiolillo DJ, Lillie E, Smith EN, Tisch RL, Schork NJ, Teirstein PS, Topol EJ, Investigators G (2012) 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* 59 (22): 1928-1937 DOI 10.1016/j.jacc.2011.11.068
- 124 Wang Y, Zhao X, Lin J, Li H, Johnston SC, Lin Y, Pan Y, Liu L, Wang D, Wang C, Meng X, Xu J, investigators C (2016) Association Between CYP2C19 Loss-of-Function Allele Status and Efficacy of Clopidogrel for Risk Reduction Among Patients With Minor Stroke or Transient Ischemic Attack. *JAMA* 316 (1): 70-78 DOI 10.1001/jama.2016.8662
- 125 Zhu WY, Zhao T, Xiong XY, Li J, Wang L, Zhou Y, Gong ZL, Cheng SY, Liu Y, Shuai J, Yang QW (2016) Association of CYP2C19 Polymorphisms with the Clinical Efficacy of Clopidogrel Therapy in Patients Undergoing Carotid Artery Stenting in Asia. *Sci Rep* 6: 25478 DOI 10.1038/srep25478
- 126 Paré G, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, Hirsh J, Simonsen K, Bhatt DL, Fox KA, Eikelboom JW (2010) Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med* 363 (18): 1704-1714 DOI 10.1056/NEJMoa1008410
- 127 Bhatt DL, Paré G, Eikelboom JW, Simonsen KL, Emison ES, Fox KA, Steg PG, Montalescot G, Bhakta N, Hacke W, Flather MD, Mak KH, Cacoub P, Creager MA, Berger PB, Steinhubl SR, Murugesan G, Mehta SR, Kottke-Marchant K, Lincoff AM, Topol EJ, Investigators C (2012) The relationship between CYP2C19 polymorphisms and ischaemic and bleeding outcomes in stable outpatients: the CHARISMA genetics study. *Eur Heart J* 33 (17): 2143-2150 DOI 10.1093/eurheartj/ehs059

- 128 Siller-Matula JM, Delle-Karth G, Lang IM, Neunteufl T, Kozinski M, Kubica J, Maurer G, Linkowska K, Grzybowski T, Huber K, Jilma B (2012) Phenotyping vs. genotyping for prediction of clopidogrel efficacy and safety: the PEGASUS-PCI study. *J Thromb Haemost* 10 (4): 529-542 DOI 10.1111/j.1538-7836.2012.04639.x
- 129 Hulot JS, Collet JP, Silvain J, Pena A, Bellemain-Appaix A, Barthélémy O, Cayla G, Beygui F, Montalescot G (2010) Cardiovascular risk in clopidogrel-treated patients according to cytochrome P450 2C19*2 loss-of-function allele or proton pump inhibitor coadministration: a systematic meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 56 (2): 134-143 DOI 10.1016/j.jacc.2009.12.071
- 130 (2010) FDA Drug Safety Communication: Reduced effectiveness of Plavix (clopidogrel) in patients who are poor metabolizers of the drug. In: ed.
- 131 Holmes DR, Dehmer GJ, Kaul S, Leifer D, O'Gara PT, Stein CM, Interventions SfCAa, Surgeons SoT, Members WC (2010) ACCF/AHA Clopidogrel clinical alert: approaches to the FDA "boxed warning": a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the American Heart Association. *Circulation* 122 (5): 537-557 DOI 10.1161/CIR.0b013e3181ee08ed
- 132 Roden DM, Shuldiner AR (2010) Responding to the clopidogrel warning by the US food and drug administration: real life is complicated. *Circulation* 122 (5): 445-448 DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.973362
- 133 Scott SA, Sangkuhl K, Gardner EE, Stein CM, Hulot JS, Johnson JA, Roden DM, Klein TE, Shuldiner AR, Consortium CPI (2011) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) genotype and clopidogrel therapy. *Clin Pharmacol Ther* 90 (2): 328-332 DOI 10.1038/clpt.2011.132
- 134 Rudberg I, Mohebi B, Hermann M, Refsum H, Molden E (2008) Impact of the ultrarapid CYP2C19*17 allele on serum concentration of escitalopram in psychiatric patients. *Clin Pharmacol Ther* 83 (2): 322-327 DOI 10.1038/sj.clpt.6100291
- 135 Deshpande N, V S, V V RK, H V V M, M S, Banerjee R, Tandan M, D NR (2016) Rapid and ultrarapid metabolizers with CYP2C19*17 polymorphism do not respond to standard therapy with proton pump inhibitors. *Meta Gene* 9: 159-164 DOI 10.1016/j.mgene.2016.06.004
- 136 Sibbing D, Gebhard D, Koch W, Braun S, Stegherr J, Morath T, Von Beckerath N, Mehilli J, Schömig A, Schuster T, Kastrati A (2010) Isolated and interactive impact of common CYP2C19 genetic variants on the antiplatelet effect of chronic clopidogrel therapy. *J Thromb Haemost* 8 (8): 1685-1693 DOI 10.1111/j.1538-7836.2010.03921.x
- 137 Tiroch KA, Sibbing D, Koch W, Roosen-Runge T, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A (2010) Protective effect of the CYP2C19 *17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events. *Am Heart J* 160 (3): 506-512 DOI 10.1016/j.ahj.2010.06.039
- 138 Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomás M, Masiá R, Marrugat J, Brugada R, Elosua R (2012) Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. *Heart* 98 (2): 100-108 DOI 10.1136/hrt.2011.227652
- 139 Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, Damcott CM, Pakyz R, Tantry US, Gibson Q, Pollin TI, Post W, Parsa A, Mitchell BD, Faraday N, Herzog W, Gurbel PA (2009) Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 302 (8): 849-857 DOI 10.1001/jama.2009.1232
- 140 Geisler T, Schaeffeler E, Dippon J, Winter S, Buse V, Bischofs C, Zuern C, Moerike K, Gawaz M, Schwab M (2008) CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. *Pharmacogenomics* 9 (9): 1251-1259 DOI 10.2217/14622416.9.9.1251

- 141 González A, Moniche F, Cayuela A, García-Lozano JR, Torrecillas F, Escudero-Martínez I, Gonzalez-Marcos JR, Mayol A, Montaner J (2016) Effect of CYP2C19 Polymorphisms on the Platelet Response to Clopidogrel and Influence on the Effect of High Versus Standard Dose Clopidogrel in Carotid Artery Stenting. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 51 (2): 175-186 DOI 10.1016/j.ejvs.2015.09.020
- 142 Hoh BL, Gong Y, McDonough CW, Waters MF, Royster AJ, Sheehan TO, Burkley B, Langae TY, Mocco J, Zuckerman SL, Mummareddy N, Stephens ML, Ingram C, Shaffer CM, Denny JC, Brilliant MH, Kitchner TE, Linneman JG, Roden DM, Johnson JA (2016) CYP2C19 and CES1 polymorphisms and efficacy of clopidogrel and aspirin dual antiplatelet therapy in patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease. *J Neurosurg* 124 (6): 1746-1751 DOI 10.3171/2015.6.JNS15795
- 143 Mwinyi J, Cavaco I, Pedersen RS, Persson A, Burkhardt S, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M (2010) Regulation of CYP2C19 expression by estrogen receptor α : implications for estrogen-dependent inhibition of drug metabolism. *Mol Pharmacol* 78 (5): 886-894 DOI 10.1124/mol.110.065540
- 144 Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein JA (2003) Identification of constitutive androstane receptor and glucocorticoid receptor binding sites in the CYP2C19 promoter. *Mol Pharmacol* 64 (2): 316-324 DOI 10.1124/mol.64.2.316
- 145 Bort R, Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Jover R (2004) Role of hepatocyte nuclear factor 3 gamma in the expression of human CYP2C genes. *Arch Biochem Biophys* 426 (1): 63-72 DOI 10.1016/j.abb.2004.03.032
- 146 Mwinyi J, Hofmann Y, Pedersen RS, Nekvindová J, Cavaco I, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M (2010) The transcription factor GATA-4 regulates cytochrome P450C19 gene expression. *Life Sci* 86 (19-20): 699-706 DOI 10.1016/j.lfs.2010.02.021
- 147 Helsby NA, Burns KE (2012) Molecular mechanisms of genetic variation and transcriptional regulation of CYP2C19. *Front Genet* 3: 206 DOI 10.3389/fgene.2012.00206
- 148 Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M (2016) Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J* 37 (42): 3232-3245 DOI 10.1093/eurheartj/ehw334
- 149 Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, Bhatt DL, Cattaneo M, Collet JP, Cuisset T, Gachet C, Montalescot G, Jennings LK, Kereiakes D, Sibbing D, Trenk D, Van Werkum JW, Paganelli F, Price MJ, Waksman R, Gurbel PA, Reactivity WGoHO-TP (2010) Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol* 56 (12): 919-933 DOI 10.1016/j.jacc.2010.04.047
- 150 Gremmel T, Panzer S (2011) Clinical, genetic and confounding factors determine the dynamics of the in vitro response/non response to clopidogrel. *Thromb Haemost* 106 (2): 211-218 DOI 10.1160/TH11-03-0137
- 151 Cattaneo M (2007) Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1: 230-237 DOI 10.1111/j.1538-7836.2007.02498.x
- 152 Cardinal DC, Flower RJ (1980) The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 3 (2): 135-158
- 153 Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W (2006) Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 96 (6): 781-788
- 154 Calatzis A, Loreth R, Spannagl M (2007) Multiplate® platelet function analysis -application and interpretation. In: ed.
- 155 Riess H, Braun G, Brehm G, Hiller E (1986) Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood. *Am J Clin Pathol* 85 (1): 50-56

- 156 Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Romano E, Gori AM, Marcucci R, Prisco D, Abbate R (2009) Assessment of platelet function on whole blood by multiple electrode aggregometry in high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy. *Am J Clin Pathol* 131 (6): 834-842 DOI 10.1309/AJCPT3K1SGAPOIZ
- 157 Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N (2008) Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost* 99 (1): 121-126 DOI 10.1160/TH07-07-0478
- 158 Michelson AD (2006) Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb* 35 (1-2): 67-82 DOI 10.1159/000093547
- 159 Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M (1999) Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 82 (3): 1145-1152
- 160 Gachet C, Aleil B (2008) Testing antiplatelet therapy. In: ed. *European Heart Journal* ppA28–A34.
- 161 van Werkum JW, Harmsze AM, Elsenberg EH, Bouman HJ, ten Berg JM, Hackeng CM (2008) The use of the VerifyNow system to monitor antiplatelet therapy: a review of the current evidence. *Platelets* 19 (7): 479-488 DOI 10.1080/09537100802317918
- 162 Campbell J, Ridgway H, Carville D (2008) Plateletworks: a novel point of care platelet function screen. *Mol Diagn Ther* 12 (4): 253-258
- 163 Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R (2015) Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag* 11: 133-148 DOI 10.2147/VHRM.S44469
- 164 Gajda SN, Kołtowski Ł, Tomaniak M (2015) Most Recent Evidence Behind Aggregometry and Genotyping Methods as Platelet Function Testing for Tailored Anti-Platelet Treatment Among PCI Patients. *Adv Clin Exp Med* 24 (4): 687-693
- 165 Mingant F, Didier R, Gilard M, Martin F, Nicol PP, Ugo V, Lippert E, Galinat H (2018) Comparison of four methods to assess high-on platelet reactivity under P2Y12 receptor inhibitor. *Platelets* 29 (3): 257-264 DOI 10.1080/09537104.2018.1453058
- 166 Sibbing D, Schulz S, Braun S, Morath T, Stegherr J, Mehilli J, Schömig A, von Beckerath N, Kastrati A (2010) Antiplatelet effects of clopidogrel and bleeding in patients undergoing coronary stent placement. *J Thromb Haemost* 8 (2): 250-256 DOI 10.1111/j.1538-7836.2009.03709.x
- 167 Cattaneo M (2013) High on-treatment platelet reactivity--definition and measurement. *Thromb Haemost* 109 (5): 792-798 DOI 10.1160/TH12-10-0758
- 168 Comin J, Kallmes DF (2013) Platelet-function testing in patients undergoing neurovascular procedures: caught between a rock and a hard place. *AJNR Am J Neuroradiol* 34 (4): 730-734 DOI 10.3174/ajnr.A3440
- 169 Rosche, Diagnostics (2013) Multiplate® analyzer Cut-off-values ADPtest and ASPItest. In: *Diagnostics R (Ed.) ed. Rosche Diagnostics*
- 170 Miller CA, Tan X, Wilson M, Bhattacharyya S, Ludwig S (2010) Single plasmids expressing human steroid hormone receptors and a reporter gene for use in yeast signaling assays. *Plasmid* 63 (2): 73-78 DOI 10.1016/j.plasmid.2009.11.003
- 171 Ltd RDI (2013) Multiplate® analyzer SW Version 2.04 Operator's Manual. In: ed. Roche Diagnostics International Ltd.
- 172 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 173 Dieffenbach CW, Dveksler GS (2003) *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- 174 Bartlett JMS, Stirling D (2003) PCR Protocols. Springer.
- 175 (2002) Basic Cell Culture: A Practical Approach. Oxford University Press, Incorporated.
- 176 Farré D, Roset R, Huerta M, Aduara JE, Roselló L, Albà MM, Messeguer X (2003) Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 31 (13): 3651-3653
- 177 Messeguer X, Escudero R, Farré D, Núñez O, Martínez J, Albà MM (2002) PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18 (2): 333-334
- 178 Mitropoulou C, Fragoulakis V, Rakicevic LB, Novkovic MM, Vozikis A, Matic DM, Antonijevic NM, Radojkovic DP, van Schaik RH, Patrinos GP (2016) Economic analysis of pharmacogenomic-guided clopidogrel treatment in Serbian patients with myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Pharmacogenomics* DOI 10.2217/pgs-2016-0052
- 179 Arefayene M, Skaar TC, Zhao X, Rae JM, Tanus-Santos JE, Brinkmann U, Brehm I, Salat U, Nguyen A, Desta Z, Flockhart DA (2003) Sequence diversity and functional characterization of the 5'-regulatory region of human CYP2C19. *Pharmacogenetics* 13 (4): 199-206 DOI 10.1097/01.fpc.0000054069.64000.22
- 180 Satyanarayana CR, Devendran A, Sundaram R, Gopal SD, Rajagopal K, Chandrasekaran A (2009) Genetic variations and haplotypes of the 5' regulatory region of CYP2C19 in South Indian population. *Drug Metab Pharmacokinet* 24 (2): 185-193
- 181 Novkovic M, Matic D, Kusic-Tisma J, Antonijevic N, Radojkovic D, Rakicevic L (2018) Analysis of the CYP2C19 genotype associated with bleeding in Serbian STEMI patients who have undergone primary PCI and treatment with clopidogrel. *Eur J Clin Pharmacol* 74 (4): 443-451 DOI 10.1007/s00228-017-2401-5
- 182 Pedersen RS, Brasch-Andersen C, Sim SC, Bergmann TK, Halling J, Petersen MS, Weihe P, Edvardsen H, Kristensen VN, Brøsen K, Ingelman-Sundberg M (2010) Linkage disequilibrium between the CYP2C19*17 allele and wildtype CYP2C8 and CYP2C9 alleles: identification of CYP2C haplotypes in healthy Nordic populations. *Eur J Clin Pharmacol* 66 (12): 1199-1205 DOI 10.1007/s00228-010-0864-8
- 183 Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, de Zeeuw RA, de Leij LF, Jonkman JH (2001) The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 57 (10): 717-722
- 184 de Vos A, van der Weide J, Looers HM (2011) Association between CYP2C19*17 and metabolism of amitriptyline, citalopram and clomipramine in Dutch hospitalized patients. *Pharmacogenomics J* 11 (5): 359-367 DOI 10.1038/tpj.2010.39
- 185 Allabi AC, Gala JL, Desager JP, Heusterspreute M, Horsmans Y (2003) Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. *Br J Clin Pharmacol* 56 (6): 653-657
- 186 Buzoianu AD, Trifa AP, Popp RA, Militaru MS, Militaru CF, Bocsan CI, Farcas MF, Pop IV (2010) Screening for CYP2C19*2, *3 and *4 Gene Variants in a Romanian Population Study group. *Farmacia* 58 (6): 806-817
- 187 Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E (2004) Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res* 50 (2): 195-200 DOI 10.1016/j.phrs.2004.01.004
- 188 Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A, Manolopoulos VG (2007) Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population. *Fundam Clin Pharmacol* 21 (4): 419-426 DOI 10.1111/j.1472-8206.2007.00510.x

- 189 Ragia G, Arvanitidis KI, Tavridou A, Manolopoulos VG (2009) Need for reassessment of reported CYP2C19 allele frequencies in various populations in view of CYP2C19*17 discovery: the case of Greece. *Pharmacogenomics* 10 (1): 43-49 DOI 10.2217/14622416.10.1.43
- 190 Nassar S, Amro O, Abu-Rmaileh H, Alshaer I, Korachi M, Ayesb S (2014) ABCB1 C3435T and CYP2C19*2 polymorphisms in a Palestinian and Turkish population: A pharmacogenetic perspective to clopidogrel. *Meta Gene* 2: 314-319 DOI 10.1016/j.mgene.2014.01.009
- 191 Uckun Z, Baskak B, Ozel-Kizil ET, Ozdemir H, Devrimci Ozguven H, Suzen HS (2015) The impact of CYP2C19 polymorphisms on citalopram metabolism in patients with major depressive disorder. *J Clin Pharm Ther* 40 (6): 672-679 DOI 10.1111/jcpt.12320
- 192 Sychev DA, Denisenko NP, Sizova ZM, Grachev AV, Velikolug KA (2015) The frequency of CYP2C19 genetic polymorphisms in Russian patients with peptic ulcers treated with proton pump inhibitors. *Pharmgenomics Pers Med* 8: 111-114 DOI 10.2147/PGPM.S78986
- 193 Krajčiová L, Petrovič R, Déžiová L, Chandoga J, Turčáni P (2014) Frequency of selected single nucleotide polymorphisms influencing the warfarin pharmacogenetics in Slovak population. *Eur J Haematol* 93 (4): 320-328 DOI 10.1111/ejh.12348
- 194 Herman D, Dolžan V, Breskvar K (2003) Genetic polymorphism of cytochromes P450 2C9 and 2C19 in Slovenian population *Zdrav Vestn* 72: 347-351
- 195 Bozina N, Granić P, Lalić Z, Tramisak I, Lovrić M, Stavljenić-Rukavina A (2003) Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croat Med J* 44 (4): 425-428
- 196 Semiz S, Dujic T, Ostanek B, Prnjavorac B, Bego T, Malenica M, Marc J, Causevic A (2010) Analysis of CYP2C9*2, CYP2C19*2, and CYP2D6*4 polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus. *Bosn J Basic Med Sci* 10 (4): 287-291
- 197 Kapedanovska Nestorovska A, Jakovski K, Naumovska Z, Hiljadnikova Bajro M, Sterjev Z, Eftimov A, Matevska Geskovska N, Suturkova L, Dimitrovski K, Labacevski N, Dimovski AJ (2014) Distribution of the most Common Genetic Variants Associated with a Variable Drug Response in the Population of the Republic of Macedonia. *Balkan J Med Genet* 17 (2): 5-14 DOI 10.2478/bjmg-2014-0069
- 198 He N, Yan FX, Huang SL, Wang W, Xiao ZS, Liu ZQ, Zhou HH (2002) CYP2C19 genotype and S-mephenytoin 4'-hydroxylation phenotype in a Chinese Dai population. *Eur J Clin Pharmacol* 58 (1): 15-18 DOI 10.1007/s00228-002-0425-x
- 199 Chen L, Qin S, Xie J, Tang J, Yang L, Shen W, Zhao X, Du J, He G, Feng G, He L, Xing Q (2008) Genetic polymorphism analysis of CYP2C19 in Chinese Han populations from different geographic areas of mainland China. *Pharmacogenomics* 9 (6): 691-702 DOI 10.2217/14622416.9.6.691
- 200 Wei W, Fang L, Wang N, Zhang T, Zeng JB, Lin MT (2012) [Prevalence of CYP2C19 polymorphisms involved in clopidogrel metabolism in Fujian Han population]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 29 (4): 420-425 DOI 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2012.04.009
- 201 Sukasem C, Tunthong R, Chamnanphon M, Santon S, Jantararoungtong T, Koomdee N, Prommas S, Puangpetch A, Vathesatogkit P (2013) CYP2C19 polymorphisms in the Thai population and the clinical response to clopidogrel in patients with atherothrombotic-risk factors. *Pharmgenomics Pers Med* 6: 85-91 DOI 10.2147/PGPM.S42332
- 202 Yang ZF, Cui HW, Hasi T, Jia SQ, Gong ML, Su XL (2010) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes 2C9 and 2C19 in a healthy Mongolian population in China. *Genet Mol Res* 9 (3): 1844-1851 DOI 10.4238/vol9-3gmr938
- 203 Lamba JK, Dhiman RK, Kohli KK (2000) CYP2C19 genetic mutations in North Indians. *Clin Pharmacol Ther* 68 (3): 328-335 DOI 10.1067/mcp.2000.109365

- 204 Jose R, Chandrasekaran A, Sam SS, Gerard N, Chanolean S, Abraham BK, Satyanarayanamoorthy K, Peter A, Rajagopal K (2005) CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms: frequencies in the south Indian population. *Fundam Clin Pharmacol* 19 (1): 101-105 DOI 10.1111/j.1472-8206.2004.00307.x
- 205 Adithan C, Gerard N, Vasu S, Rosemary J, Shashindran CH, Krishnamoorthy R (2003) Allele and genotype frequency of CYP2C19 in a Tamilian population. *Br J Clin Pharmacol* 56 (3): 331-333
- 206 Saeed LH, Mayet AY (2013) Genotype-phenotype analysis of CYP2C19 in healthy saudi individuals and its potential clinical implication in drug therapy. *Int J Med Sci* 10 (11): 1497-1502 DOI 10.7150/ijms.6795
- 207 Payan M, Rouini MR, Tajik N, Ghahremani MH, Tahvilian R (2014) Hydroxylation index of omeprazole in relation to CYP2C19 polymorphism and sex in a healthy Iranian population. *Daru* 22: 81 DOI 10.1186/s40199-014-0081-6
- 208 Persson I, Aklillu E, Rodrigues F, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M (1996) S-mephenytoin hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype among Ethiopians. *Pharmacogenetics* 6 (6): 521-526
- 209 Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, El-Enany M, Moursi N, Ahmed MS, Mizugaki M (2002) Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol* 53 (6): 596-603
- 210 Santos PC, Soares RA, Santos DB, Nascimento RM, Coelho GL, Nicolau JC, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC (2011) CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC Med Genet* 12: 13 DOI 10.1186/1471-2350-12-13
- 211 Isaza C, Henao J, Martínez JH, Sepúlveda Arias JC, Beltrán L (2007) Phenotype-genotype analysis of CYP2C19 in Colombian mestizo individuals. *BMC Clin Pharmacol* 7: 6 DOI 10.1186/1472-6904-7-6
- 212 Bravo-Villalta HV, Yamamoto K, Nakamura K, Bayá A, Okada Y, Horiuchi R (2005) Genetic polymorphism of CYP2C9 and CYP2C19 in a Bolivian population: an investigative and comparative study. *Eur J Clin Pharmacol* 61 (3): 179-184 DOI 10.1007/s00228-004-0890-5
- 213 Ndrepepa G, Berger PB, Mehilli J, Seyfarth M, Neumann FJ, Schömig A, Kastrati A (2008) Periprocedural bleeding and 1-year outcome after percutaneous coronary interventions: appropriateness of including bleeding as a component of a quadruple end point. *J Am Coll Cardiol* 51 (7): 690-697 DOI 10.1016/j.jacc.2007.10.040
- 214 Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrières J, Danchin N, Becquemont L, Investigators FRoAS-EaN-S-EMIF-M (2009) Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 360 (4): 363-375 DOI 10.1056/NEJMoa0808227
- 215 Tantry US, Bliden KP, Wei C, Storey RF, Armstrong M, Butler K, Gurbel PA (2010) First analysis of the relation between CYP2C19 genotype and pharmacodynamics in patients treated with ticagrelor versus clopidogrel: the ONSET/OFFSET and RESPOND genotype studies. *Circ Cardiovasc Genet* 3 (6): 556-566 DOI 10.1161/CIRCGENETICS.110.958561
- 216 Price JM, Carson RA, Murray SS, Tierney P, Janel L, Tisch R, Topol E, Levy S (2012) First pharmacogenomic analysis using whole exome sequencing to identify novel genetic determinants of clopidogrel response variability: results of the Genotype Information and Functional Testing (Gift) exome study. In: ed. *Journal of American College of Cardiology*.
- 217 Price JM, Carson RA, Murray SS, Tierney P, Janel L, Tisch R, Topol E, Levy S (2012) First pharmacogenomic analysis using whole exome sequencing to identify novel genetic

- determinants of clopidogrel response variability:results of the Genotype Information and Functional Testing (Gift) exome study. In: ed. Journal of American College of Cardiology.
- 218 Tantry US, Bonello L, Aradi D, Price MJ, Jeong YH, Angiolillo DJ, Stone GW, Curzen N, Geisler T, Ten Berg J, Kirtane A, Siller-Matula J, Mahla E, Becker RC, Bhatt DL, Waksman R, Rao SV, Alexopoulos D, Marcucci R, Reny JL, Trenk D, Sibbing D, Gurbel PA, Reactivity WGoO-TP (2013) Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol* 62 (24): 2261-2273 DOI 10.1016/j.jacc.2013.07.101
- 219 Chesebro JH, Knatterud G, Roberts R, Borer J, Cohen LS, Dalen J, Dodge HT, Francis CK, Hillis D, Ludbrook P (1987) Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, Phase I: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. Clinical findings through hospital discharge. *Circulation* 76 (1): 142-154
- 220 Bovill EG, Terrin ML, Stump DC, Berke AD, Frederick M, Collen D, Feit F, Gore JM, Hillis LD, Lambrew CT (1991) Hemorrhagic events during therapy with recombinant tissue-type plasminogen activator, heparin, and aspirin for acute myocardial infarction. Results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI), Phase II Trial. *Ann Intern Med* 115 (4): 256-265
- 221 Li-Wan-Po A, Girard T, Farndon P, Cooley C, Lithgow J (2010) Pharmacogenetics of CYP2C19: functional and clinical implications of a new variant CYP2C19*17. *Br J Clin Pharmacol* 69 (3): 222-230 DOI 10.1111/j.1365-2125.2009.03578.x
- 222 Lewis JP, Stephens SH, Horenstein RB, O'Connell JR, Ryan K, Peer CJ, Figg WD, Spencer SD, Pacanowski MA, Mitchell BD, Shuldiner AR (2013) The CYP2C19*17 variant is not independently associated with clopidogrel response. *J Thromb Haemost* 11 (9): 1640-1646 DOI 10.1111/jth.12342
- 223 Walton R, Kimber M, Rockett K, Trafford C, Kwiatkowski D, Sirugo G (2005) Haplotype block structure of the cytochrome P450 CYP2C gene cluster on chromosome 10. *Nat Genet* 37 (9): 915-916; author reply 916 DOI 10.1038/ng0905-915
- 224 Gurbel PA, Tantry US, Shuldiner AR (2010) 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* 122 (14): e478; author reply e479 DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.943548
- 225 Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, Raucy JL, Goldstein JA (1991) Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. *Biochemistry* 30 (13): 3247-3255
- 226 Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Maekawa K, Ozawa S, Hasegawa R, Kajio H, Kuzuya N, Yasuda K, Kawamoto M, Kamatani N, Suzuki K, Yanagawa T, Tohkin M, Sawada J (2005) Genetic variations and haplotypes of CYP2C19 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 20 (4): 300-307
- 227 Satyanarayana Chakradhara Rao U, Devendran A, Satyamoorthy K, Shewade DG, Krishnamoorthy R, Chandrasekaran A (2011) Functional characterization of promoter region polymorphisms of human CYP2C19 gene. *Mol Biol Rep* 38 (6): 4171-4179 DOI 10.1007/s11033-010-0537-9
- 228 Huibers A, Halliday A, Bulbulia R, Coppi G, de Borst GJ, Group A-C (2016) Antiplatelet Therapy in Carotid Artery Stenting and Carotid Endarterectomy in the Asymptomatic Carotid Surgery Trial-2. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 51 (3): 336-342 DOI 10.1016/j.ejvs.2015.11.002
- 229 Backovic D, Ignjatovic S, Rakicevic L, Novkovic M, Kusic-Tisma J, Radojkovic D, Strugarevic E, Calija B, Radak D, Kovac M (2016) Clopidogrel High On-Treatment Platelet Reactivity in Patients with Carotid Artery Stenosis Undergoing Endarterectomy. A Pilot Study. *Curr Vasc Pharmacol* 14 (6): 563-569

- 230 Sardar P, Chatterjee S, Aronow HD, Kundu A, Ramchand P, Mukherjee D, Nairooz R, Gray WA, White CJ, Jaff MR, Rosenfield K, Giri J (2017) Carotid Artery Stenting Versus Endarterectomy for Stroke Prevention: A Meta-Analysis of Clinical Trials. *J Am Coll Cardiol* 69 (18): 2266-2275 DOI 10.1016/j.jacc.2017.02.053
- 231 Brott TG, Hobson RW, Howard G, Roubin GS, Clark WM, Brooks W, Mackey A, Hill MD, Leimgruber PP, Sheffet AJ, Howard VJ, Moore WS, Voeks JH, Hopkins LN, Cutlip DE, Cohen DJ, Popma JJ, Ferguson RD, Cohen SN, Blackshear JL, Silver FL, Mohr JP, Lal BK, Meschia JF, Investigators C (2010) Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 363 (1): 11-23 DOI 10.1056/NEJMoa0912321
- 232 Gorog DA, Fuster V (2013) Platelet function tests in clinical cardiology: unfulfilled expectations. *J Am Coll Cardiol* 61 (21): 2115-2129 DOI 10.1016/j.jacc.2012.11.080
- 233 Nishikawa M, Isshiki T, Kimura T, Ogawa H, Yokoi H, Miyazaki S, Ikeda Y, Nakamura M, Takita A, Saito S, Investigators P-APcwcFJpwACSupci (2015) No association between on-treatment platelet reactivity and bleeding events following percutaneous coronary intervention and antiplatelet therapy: A post hoc analysis. *Thromb Res* 136 (5): 947-954 DOI 10.1016/j.thromres.2015.09.014
- 234 Committee CS (1996) A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 348 (9038): 1329-1339
- 235 Cuisset T, Grosdidier C, Loundou AD, Quilici J, Loosveld M, Camoin L, Pankert M, Beguin S, Lambert M, Morange PE, Bonnet JL, Alessi MC (2013) Clinical implications of very low on-treatment platelet reactivity in patients treated with thienopyridine: the POBA study (predictor of bleedings with antiplatelet drugs). *JACC Cardiovasc Interv* 6 (8): 854-863 DOI 10.1016/j.jcin.2013.04.009
- 236 Čolić MD, Čalija BM, Milosavljević BM, Grdinić AG, Angelkov LG, Sagić D, Kruzliak P, Marinković JM, Babić RM, Mrdović IB (2015) Low On-Treatment Platelet Reactivity Predicts Long-Term Risk of Bleeding After Elective PCI. *J Interv Cardiol* 28 (6): 531-543 DOI 10.1111/joic.12251
- 237 Cornel JH, Ohman EM, Neely B, Jakubowski JA, Bhatt DL, White HD, Ardissino D, Fox KA, Prabhakaran D, Armstrong PW, Erlinge D, Tantry US, Gurbel PA, Roe MT (2016) Relationship of Platelet Reactivity With Bleeding Outcomes During Long-Term Treatment With Dual Antiplatelet Therapy for Medically Managed Patients With Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes. *J Am Heart Assoc* 5 (11) DOI 10.1161/JAHA.116.003977
- 238 Sibbing D, Braun S, Morath T, Mehilli J, Vogt W, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N (2009) Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 53 (10): 849-856 DOI 10.1016/j.jacc.2008.11.030
- 239 Cuisset T, Cayla G, Frere C, Quilici J, Poyet R, Gaborit B, Bali L, Morange PE, Alessi MC, Bonnet JL (2009) Predictive value of post-treatment platelet reactivity for occurrence of post-discharge bleeding after non-ST elevation acute coronary syndrome. Shifting from antiplatelet resistance to bleeding risk assessment? *EuroIntervention* 5 (3): 325-329
- 240 Arméro S, Camoin Jau L, Omar Aït Mokhtar O, Mancini J, Burignat-Bonello C, Tahirou I, Arques S, Dignat-George F, Paganelli F, Bonello L (2010) Intra-individual variability in clopidogrel responsiveness in coronary artery disease patients under long term therapy. *Platelets* 21 (7): 503-507 DOI 10.3109/09537104.2010.499483
- 241 Tello-Montoliu A, Rivera J, Hernández D, Silvente A, Jover E, Rodriguez AI, Quintana M, Romero A, Orenes-Piñero E, Rivera-Caravaca JM, Marín F, Veliz A, Valdés M (2018) Temporal Changes in Platelet Response in Acute Coronary Syndrome Patients With Prasugrel and Clopidogrel After Stent Implantation. *Circ J* 82 (2): 353-360 DOI 10.1253/circj.CJ-17-0471
- 242 Campo G, Parrinello G, Ferraresi P, Lunghi B, Tebaldi M, Miccoli M, Marchesini J, Bernardi F, Ferrari R, Valgimigli M (2011) Prospective evaluation of on-clopidogrel platelet reactivity over time in patients treated with percutaneous coronary intervention relationship with gene

- polymorphisms and clinical outcome. *J Am Coll Cardiol* 57 (25): 2474-2483 DOI 10.1016/j.jacc.2010.12.047
- 243 Bazzle LJ, Brainard BM (2015) Postoperative Hemostasis Monitoring and Management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 45 (5): 995-1011 DOI 10.1016/j.cvsm.2015.04.008
- 244 Kohl BA, Deutschman CS (2006) The inflammatory response to surgery and trauma. *Curr Opin Crit Care* 12 (4): 325-332 DOI 10.1097/01.ccx.0000235210.85073.fc
- 245 Aller MA, Arias JL, Nava MP, Arias J (2004) Posttraumatic inflammation is a complex response based on the pathological expression of the nervous, immune, and endocrine functional systems. *Exp Biol Med (Maywood)* 229 (2): 170-181
- 246 Kragsterman B, Bergqvist D, Siegbahn A, Parsson H (2017) Carotid Endarterectomy Induces the Release of Inflammatory Markers and the Activation of Coagulation as Measured in the Jugular Bulb. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 26 (10): 2320-2328 DOI 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.05.020
- 247 Bernlochner I, Steinhubl S, Braun S, Morath T, Jaitner J, Stegherr J, Mehilli J, von Beckerath N, Schömig A, Kastrati A, Sibbing D (2010) Association between inflammatory biomarkers and platelet aggregation in patients under chronic clopidogrel treatment. *Thromb Haemost* 104 (6): 1193-1200 DOI 10.1160/TH10-05-0266
- 248 Rosche, Diagnostics (2013) Multiplate® analyzer Cut-off-values ADPtest and ASPItest. In: *Diagnostics R (Ed.) ed. Rosche Diagnostics*
- 249 Kong R, Trimmings A, Hutchinson N, Gill R, Agarwal S, Davidson S, Arcari M (2015) Consensus recommendations for using the Multiplate(®) for platelet function monitoring before cardiac surgery. *Int J Lab Hematol* 37 (2): 143-147 DOI 10.1111/ijlh.12279
- 250 Ahn SG, Lee SH, Yoon JH, Kim WT, Lee JW, Youn YJ, Ahn MS, Kim JY, Yoo BS, Yoon J, Choe KH (2012) Different prognostic significance of high on-treatment platelet reactivity as assessed by the VerifyNow P2Y12 assay after coronary stenting in patients with and without acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv* 5 (3): 259-267 DOI 10.1016/j.jcin.2011.12.009
- 251 Campo G, Fileti L, de Cesare N, Meliga E, Furgieri A, Russo F, Colangelo S, Brugaletta S, Ferrari R, Valgimigli M, Investigators TR (2010) 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 substudy. *J Am Coll Cardiol* 56 (18): 1447-1455 DOI 10.1016/j.jacc.2010.03.103
- 252 Novkovic M, Matic D, Kusic-Tisma J, Antonijevic N, Radojkovic D, Rakicevic L (2018) Correction to: Analysis of the CYP2C19 genotype associated with bleeding in Serbian STEMI patients who have undergone primary PCI and treatment with clopidogrel. *Eur J Clin Pharmacol* 74 (4): 453 DOI 10.1007/s00228-018-2425-5
- 253 Halvorsen S, Storey RF, Rocca B, Sibbing D, Ten Berg J, Grove EL, Weiss TW, Collet JP, Andreotti F, Gulba DC, Lip GYH, Husted S, Vilahur G, Morais J, Verheugt FWA, Lanos A, Al-Shahi Salman R, Steg PG, Huber K, Thrombosis EWGo (2017) Management of antithrombotic therapy after bleeding in patients with coronary artery disease and/or atrial fibrillation: expert consensus paper of the European Society of Cardiology Working Group on Thrombosis. *Eur Heart J* 38 (19): 1455-1462 DOI 10.1093/eurheartj/ehw454
- 254 Scott SA, Sangkuhl K, Shuldiner AR, Hulot JS, Thorn CF, Altman RB, Klein TE (2012) PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. *Pharmacogenet Genomics* 22 (2): 159-165 DOI 10.1097/FPC.0b013e32834d4962
- 255 Ingelman-Sundberg M, Persson A, Jukic MM (2014) Polymorphic expression of CYP2C19 and CYP2D6 in the developing and adult human brain causing variability in cognition, risk for

- depression and suicide: the search for the endogenous substrates. *Pharmacogenomics* 15 (15): 1841-1844 DOI 10.2217/pgs.14.151
- 256 Persson A, Ingelman-Sundberg M (2014) Pharmacogenomics of Cytochrome P450 Dependent Metabolism of Endogenous Compounds: Implications for Behavior, Psychopathology and Treatment. In: ed.
- 257 Bergmeijer TO, Janssen PW, Schipper JC, Qaderdan K, Ishak M, Ruitenbeek RS, Asselbergs FW, van 't Hof AW, Dewilde WJ, Spanó F, Herrman JP, Kelder JC, Postma MJ, de Boer A, Deneer VH, ten Berg JM (2014) CYP2C19 genotype-guided antiplatelet therapy in ST-segment elevation myocardial infarction patients-Rationale and design of the Patient Outcome after primary PCI (POPular) Genetics study. *Am Heart J* 168 (1): 16-22.e11 DOI 10.1016/j.ahj.2014.03.006
- 258 O'Connor SA, Hulot JS, Silvain J, Cayla G, Montalescot G, Collet JP (2012) Pharmacogenetics of clopidogrel. *Curr Pharm Des* 18 (33): 5309-5327
- 259 Sorich MJ, Horowitz JD, Sorich W, Wiese MD, Pekarsky B, Karnon JD (2013) Cost-effectiveness of using CYP2C19 genotype to guide selection of clopidogrel or ticagrelor in Australia. *Pharmacogenomics* 14 (16): 2013-2021 DOI 10.2217/pgs.13.164
- 260 Kazi DS, Garber AM, Shah RU, Dudley RA, Mell MW, Rhee C, Moshkevich S, Boothroyd DB, Owens DK, Hlatky MA (2014) Cost-effectiveness of genotype-guided and dual antiplatelet therapies in acute coronary syndrome. *Ann Intern Med* 160 (4): 221-232 DOI 10.7326/M13-1999
- 261 Wang Y, Yan BP, Liew D, Lee VWY (2018) Cost-effectiveness of cytochrome P450 2C19 *2 genotype-guided selection of clopidogrel or ticagrelor in Chinese patients with acute coronary syndrome. *Pharmacogenomics J* 18 (1): 113-120 DOI 10.1038/tpj.2016.94
- 262 Watti H, Dahal K, Zabher HG, Katikaneni P, Modi K, Abdulbaki A (2017) Comparison of prasugrel and ticagrelor in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention: A meta-analysis of randomized and non-randomized studies. *Int J Cardiol* 249: 66-72 DOI 10.1016/j.ijcard.2017.07.103
- 263 Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA, Freij A, Thorsén M, Investigators P (2009) Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 361 (11): 1045-1057 DOI 10.1056/NEJMoa0904327
- 264 Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias WL, Braunwald E, Sabatine MS (2009) Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel: relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes. *Circulation* 119 (19): 2553-2560 DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.851949
- 265 Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Jukema JW, Huisman MV (2007) Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 154 (2): 221-231 DOI 10.1016/j.ahj.2007.04.014
- 266 Close SL (2011) Clopidogrel pharmacogenetics: metabolism and drug interactions. *Drug Metabol Drug Interact* 26 (2): 45-51 DOI 10.1515/DMDI.2011.002
- 267 Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker JR, Simon T, Antman EM, Braunwald E, Sabatine MS (2010) Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet* 376 (9749): 1312-1319 DOI 10.1016/S0140-6736(10)61273-1
- 268 Martis S, Peter I, Hulot JS, Kornreich R, Desnick RJ, Scott SA (2013) Multi-ethnic distribution of clinically relevant CYP2C genotypes and haplotypes. *Pharmacogenomics J* 13 (4): 369-377 DOI 10.1038/tpj.2012.10
- 269 Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, Rongen GA, van Schaik RH, Schalekamp T, Touw DJ, van der Weide J, Wilffert B, Deneer VH, Guchelaar HJ (2011)

- Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther* 89 (5): 662-673 DOI 10.1038/clpt.2011.34
- 270 Bank PC, Swen JJ, Guchelaar HJ (2017) A nationwide survey of pharmacists' perception of pharmacogenetics in the context of a clinical decision support system containing pharmacogenetics dosing recommendations. *Pharmacogenomics* 18 (3): 215-225 DOI 10.2217/pgs-2016-0138
- 271 Relling MV, Klein TE (2011) CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clin Pharmacol Ther* 89 (3): 464-467 DOI 10.1038/clpt.2010.279
- 272 Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB, Klein TE (2012) Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther* 92 (4): 414-417 DOI 10.1038/clpt.2012.96
- 273 Moyer AM, Caraballo PJ (2017) The challenges of implementing pharmacogenomic testing in the clinic. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 17 (6): 567-577 DOI 10.1080/14737167.2017.1385395
- 274 Vogenberg FR, Barash CI, Pursel M (2010) Personalized medicine: part 2: ethical, legal, and regulatory issues. *P T* 35 (11): 624-642
- 275 Vogenberg FR, Barash CI, Pursel M (2010) Personalized medicine: part 3: challenges facing health care plans in implementing coverage policies for pharmacogenomic and genetic testing. *P T* 35 (12): 670-675
- 276 Kotur N, Dokmanovic L, Janic D, Stankovic B, Krstovski N, Tosic N, Katsila T, Patrinos GP, Zukic B, Pavlovic S (2015) TPMT gene expression is increased during maintenance therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia patients in a TPMT gene promoter variable number of tandem repeat-dependent manner. *Pharmacogenomics* 16 (15): 1701-1712 DOI 10.2217/pgs.15.109
- 277 Cavic M, Krivokuca A, Boljevic I, Brotto K, Jovanovic K, Tanic M, Filipovic L, Zec M, Malisic E, Jankovic R, Radulovic S (2016) Pharmacogenetics in cancer therapy - 8 years of experience at the Institute for Oncology and Radiology of Serbia. *J BUON* 21 (5): 1287-1295
- 278 Kovac MK, Rakicevic LB, Kusic-Tisma JS, Radojkovic DP (2013) Pharmacogenetic tests could be helpful in predicting of VKA maintenance dose in elderly patients at treatment initiation. *J Thromb Thrombolysis* 35 (1): 90-94 DOI 10.1007/s11239-012-0769-8
- 279 Milovanovic Dragas D, Radosavljevic I, Radovanovic M, Milovanovic J, Obradovic S, Jankovic S, Milovanovic D, Djordjevic N (2015) CYP3A5 Polimorphism in Serbian paediatric Epileptic Patients on Carbamazepine Treatment. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* DOI 10.1515/sjecr-2015-0012
- 280 Arwood MJ, Chumnumwat S, Cavallari LH, Nutescu EA, Duarte JD (2016) Implementing Pharmacogenomics at Your Institution: Establishment and Overcoming Implementation Challenges. *Clin Transl Sci* DOI 10.1111/cts.12404

Prilozi

PRILOG A Nomenklatura alela gena *CYP2C19* (preuzeto i modifikovano sa www.pharmvar.org/htdocs/archive/index_original.htm)

| Alel | rs broj | Nukleotidna zamena | Efekat na protein | Enzimaska aktivnost | |
|--|-------------------------|---|--|---------------------|-----------------|
| | | <i>cDNK</i> [†] (Gen-referenta sekvenca NG_008384.2) | | <i>In vivo</i> | <i>In vitro</i> |
| <i>CYP2C19*1A</i> | - | - | Nema efekta | normalna | normalna |
| <i>CYP2C19*1B</i> | - | 99C>T; 991A>G | I331V | normalna | |
| <i>CYP2C19*1C</i> | - | 991A>G | I331V | normalna | |
| <i>CYP2C19*2A</i> | <u>rs4244285</u> | 99C>T; 636G>A ; 990C>T; 991A>G (12662A>G prisutan u svim *2 alelima) | narušeno mesto iskrajanja RNK; I331V | nema | |
| <i>CYP2C19*2B</i> | <u>rs4244285</u> | 99C>T; 276G>C; 636G>A ; 990C>T; 991A>G (12662A>G prisutan u svim *2 alelima) | E92D; narušeno mesto iskrajanja RNK; I331V | nema | |
| <i>CYP2C19*2C</i> (also called <i>CYP2C19*21</i>) | <u>rs4244285</u> | 99C>T; 481G>C; 636G>A ; 990C>T; 991A>G (-98T>C ; 19520A>G; 57740C>G; 79936T>A; A12122G>A; 12662A>G) | A161P, narušeno mesto iskrajanja RNK, I331V | nema | |
| <i>CYP2C19*2D</i> | <u>rs4244285</u> | 99C>T; 636G>A ; 990C>T; 991A>G; 1213G>A (-98T>C ; 12662A>G; 57740C>G) | narušeno mesto iskrajanja RNK, E405K | nema | |
| <i>CYP2C19*2E</i> | <u>rs4244285</u> | 99C>T; 636G>A ; 813G>A; 990C>T; 991A>G (12662A>G prisutan u svim *2 alelima) | narušeno mesto iskrajanja RNK; M271I; I331V | nema | |
| <i>CYP2C19*2F</i> | <u>rs4244285</u> | 99C>T; 636G>A ; 990C>T; 991A>G; 1021G>A (12662A>G prisutan u svim *2 alelima) | narušeno mesto iskrajanja RNK; I331V; D341N | nema | |
| <i>CYP2C19*2G</i> | <u>rs4244285</u> | 99C>T; 636G>A ; 990C>T; 991A>G; 1079A>T (12662A>G prisutan u svim *2 alelima) | narušeno mesto iskrajanja RNK; I331V; D360V | nema | |
| <i>CYP2C19*2H</i> | <u>rs4244285</u> | 99C>T; 636G>A ; 990C>T; 991A>G; 1186C>G (12662A>G prisutan u svim *2 alelima) | narušeno mesto iskrajanja RNK; I331V; H396D | nema | |
| <i>CYP2C19*2J</i> | <u>rs4244285</u> | 99C>T; 636G>A ; 990C>T; 991A>G; 1261A>C (12662A>G prisutan u svim *2 alelima) | narušeno mesto iskrajanja RNK; I331V; K421Q | nema | |
| <i>CYP2C19*3A</i> | <u>rs4986893</u> | 636G>A 991A>G; 1251A>C | W212X; I331V | nema | |
| <u>CYP2C19*3B</u> (takođe <u>CYP2C19*20</u>) | <u>rs4986893</u> | 636G>A ; 991A>G; 1078G>A; 1251A>C (-889T>G; 12013T>G; 12122G>A; 18911A>G; 12306G>A; 13166T>C) | W212X; D360N; I331V | nema | |

PRILOZI

| | | | | | |
|------------|-------------------|---|--|------------------------|---------------------------|
| CYP2C19*3C | <u>rs4986893</u> | 407T>A; 636G>A ; 991A>G; 1251A>C | M136K, W212X ; I331V | | |
| CYP2C19*4A | <u>rs28399504</u> | 1A>G ; 99C>T, 991A>G | GTG start kodon ; I331V | nema | |
| CYP2C19*4B | <u>rs28399504</u> | 1A>G ; 99C>T, 991A>G | GTG start kodon ; I331V | nema | |
| CYP2C19*5A | <u>rs56337013</u> | 1297C>T | R433W | nema | nema |
| CYP2C19*5B | <u>rs56337013</u> | 99C>T; 991A>G; 1297C>T | I331V; R433W | nema | |
| CYP2C19*6 | <u>rs72552267</u> | 99C>T; 395G>A ; 991A>G | R132Q ; I331V | nema | nema |
| CYP2C19*7 | <u>rs72558186</u> | (19294T>A) | Splicing defect | nema | |
| CYP2C19*8 | <u>rs41291156</u> | 358T>C | W120R | nema | smenjena |
| CYP2C19*9 | | 99C>T; 431G>A ; 991A>G | R144H ; I331V | | smenjena |
| CYP2C19*10 | | 99C>T; 680C>T ; 991A>G | P227L ; I331V | | smenjena |
| CYP2C19*11 | | 99C>T; 449G>A; 991A>G (-98T>C i 12662A>G) 449G>A može biti u vezi sa CYP2C19*'2s' | R150H; I331V | | |
| CYP2C19*12 | | 99C>T; 991A>G; 1473A>C | I331V; X491C ; 26 dodatnih aminokiselina | | nestabilna |
| CYP2C19*13 | | 991A>G; 1228C>T | I331V; R410C | | |
| CYP2C19*14 | | 50T>C; 99C>T; 991A>G | L17P; I331V | | |
| CYP2C19*15 | | 55A>C; 991A>G | I19L; I331V | | |
| CYP2C19*16 | | 1324C>T Prisustvo 681G>A na istom alelu se ne može isključiti | R442C | | |
| CYP2C19*17 | <u>rs12248560</u> | 99C>T; 991A>G (-3402C>T; -806C>T) | I331V | povećana ekspresija | povećana transkripcija |
| CYP2C19*18 | | 99C>T; 986G>A; 991A>G (87106T>C) | R329H; I331V | | |
| CYP2C19*19 | | 99C>T; 151A>G; 991A>G (87106T>C) | S51G; I331V | | |
| CYP2C19*20 | | Pogledati CYP2C19*3B | | | |
| CYP2C19*21 | | Pogledati CYP2C19*2C | | | |

PRILOZI

| | | | | | |
|------------------------------|--|--|--|--|---------------------|
| CYP2C19*22 | | 557G>C; 991A>G | R186P; I331V | | |
| CYP2C19*23 | | 99C>T; 271G>C; 991A>G | G91R; I331V | | |
| CYP2C19*24 | | 99C>T; 991A>G; 1004G>A; 1197A>G | I331V; R335Q | | |
| CYP2C19*25 | | 99C>T; 991A>G; 1344C>G | I331V; F448L | | |
| CYP2C19*26 | | 99C>T; 766G>A; 991A>G | D256N; I331V | | |
| CYP2C19*27 | | 991A>G (-1041G>A); | I331V | | samnjena ekspresija |
| CYP2C19*28 (preliminarno) | | 55A>C; 991A>G; 1120G>A (-2030C>T; -2020C>A; -1439T>C) | I19L; I331V; V374I | | |
| CYP2C19*29 | | 83A>T; 99C>T; 991A>G | K28I; I331V | | |
| CYP2C19*30 | | 217C>T | R73C | | |
| CYP2C19*31 | | 99C>T; 232C>T; 991A>G | H78Y; I331V | | |
| CYP2C19*32 | | 99C>T; 296A>G; 991A>G | H99R; I331V | | |
| CYP2C19*33 | | 99C>T; 562G>A; 991A>G | D188N; I331V | | |
| CYP2C19*34 | | -13G>A; 7C>T; 10T>C | P3S; F4L | | |
| CYP2C19*35 | | 99C>T; 562G>A; 991A>G | narušeno mesto iskrajanja RNK; I331V | | nema |

BIOGRAFIJA

Mirjana M. Novković je rođena 5. jula 1987. godine u Valjevu, Srbija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Bilogija, upisala je 2006. godine, a diplomske studije završila je 2012. godine. Diplomski rad pod nazivom „Genetička studija asocijacije varijanti u promotoru gena za triptofan hidroksilazu sa izvršenjem samoubistva“ uradila je u Centru za humanu molekularnu genetiku, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Godine 2012. upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu, studijski program Molekularna biologija, smer Molekularna biologija eukariota. Iste godine je otpočela izradu eksperimentalnog dela doktorske teze u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Učesnik je nacionalnog projekta “Kompleksne bolesti kao model sistem za proučavanje modulacije fenotipa-strukturalna i funkcionalna analiza molekularnih biomarkera” (MPNTR Republike Srbije, 173008).

Tokom svog rada, bila je učesnik međunarodnog projekta: Diagnosis, Monitoring and Prevention of Exposure-Related Noncommunicable Diseases (DiMoPEX) CA15129 2016- .

Član je Društva genetičara Srbije i Srpskog društva za molekularnu biologiju. U toku dosadašnjeg naučnog rada Mirjana Novković je objavila 3 rada u časopisima međunarodnog značaja i ima 9 kongresnih saopštenja.