

РОЛЯ НА ГЕНЕТИЧНИТЕ ФАКТОРИ ПРИ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА КЛИНИЧНАТА ЕФИКАСНОСТ НА КЛОПИДОГРЕЛ

Р. ЦВЕОВА^{1,2}, А. МИТКОВА^{1,2}, И. ПАСКАЛЕВА³ Р. КЪНЕВА^{1,2} И В. МИТЕВ^{1,2}

¹Център по молекулярна медицина, Медицински университет – София

²Катедра “Медицинска химия и биохимия”, Медицински университет – София

³Национална кардиологична болница – София

THE ROLE OF GENETIC FACTORS IN DETERMINING THE CLINICAL EFFICACY OF CLOPIDOGREL

R. TZVEOVA^{1,2}, A. MITKOVA^{1,2}, I. PASKALEVA³, R. KANEVA^{1,2} AND V. MITEV^{1,2}

¹Molecular Medicine Center, Medical University – Sofia

²Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical University – Sofia

³National Cardiological Hospital – Sofia

Резюме. Клопидогрел (КЛД) представлява второ поколение тиенопиридин, който възпрепятства тромбоцитната агрегация чрез инхибиране на рецептора за аденозин дифосфат, намиращ се на повърхността на тромбоцитите. Използването на КЛД в комбинация с аспирин е стандартно лечение при пациенти с остри коронарни синдроми и инплантиран коронарен стент. Данните до този момент сочат, че около 4 до 30% от пациентите, лекувани с конвенционални дози клопидогрел, не показват адекватен антитромботичен отговор. Механизмът на клопидогреловата резистентност се дължи на множество фактори и включва генетични полиморфизми, както и негенетични фактори (като лекарствени взаимодействия, съпътстващи заболявания, възраст). Широката интериндивидуална вариабилност по отношение на този медикамент е свързана с наличието на генетичен полиморфизъм в гена, кодиращ чернодробния цитохром P450 2C19 (CYP2C19*2). Липсата на отговор към терапията с антитромбоцитния агент е свързана с трикратно увеличение на риска от нежелани странични ефекти от терапията. Оксидативният метаболизъм на предлекарството представлява двустъпален процес и се извършва с участието на чернодробни цитохром P450 (CYP) ензими. Възможността за прилагане на генетични тестове, с цел да се идентифицират полиморфни алели в гени, кодиращи ензими, участващи в метаболизма на лекарството, към настоящия момент е в процес на разработка. Към този момент прилагането на генетични тестове в рутинната клинична практика не се препоръчва поради недостиг на достатъчно данни в тази насока. Въпреки това значителен брой изследвания показват ролята на генетичните полиморфизми при определяне на клиничната ефикасност на клопидогрел. Това би могло да се използва в комбинация с анализ на тромбоцитната функция при пациенти с остри коронарни синдроми, подложени на стентирание.

Ключови думи: клопидогрел, резистентност, фармакогеномика, генетични полиморфизми, CYP2C19, генетичен тест

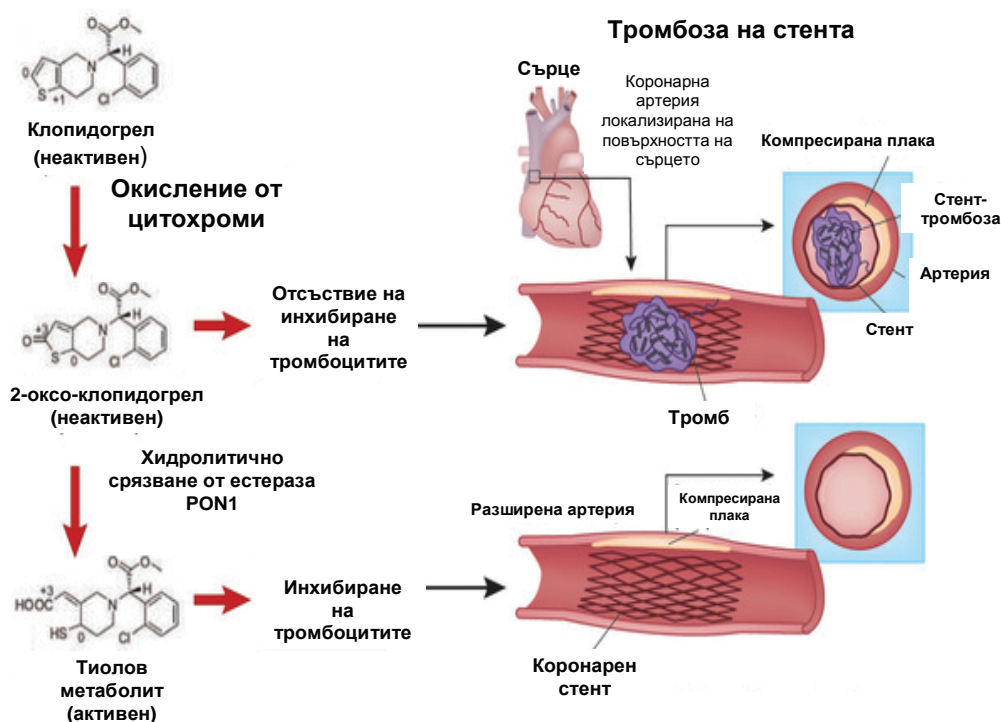
Summary. Clopidogrel (CLP) is a second-generation thienopyridine that prevents platelet aggregation by inhibiting the adenosine diphosphate receptor located on the platelet surface. The use of CLP in combination with aspirin has become standard treatment in patients with acute coronary syndromes and stent implantation. Current available data show that about 4% to 30% of the patients treated with conventional doses of clopidogrel do not display an adequate antiplatelet response. The mechanism underlying CLP resistance is multifactorial and includes genetic polymorphisms and non-genetic causes (such as drug-drug interactions, co-morbidities, age). The large interindividual variability in clopidogrel responsiveness is related to the genetic polymorphism of hepatic cytochrome P450 2C19 (CYP2C19*2). This non-responsiveness is associated with a threefold increase in adverse outcomes. The two-step hepatic cytochrome P450 (CYP)-dependant oxidative metabolism of the prodrug appears to be of particular importance. Rapid and accurate point-of-care genetic tests to identify these alleles are currently

in development. At present, genetic testing cannot be recommended in routine clinical practice due to insufficient prospective data. However, the significant body of research published to date suggests a likely role when used in combination with platelet function analysis in patients with acute coronary syndrome undergoing stenting.

Key words: clopidogrel, resistance, pharmacogenomic, genetic polymorphisms, CYP2C19, genetic testing

Клопидогрел (КЛД) представлява мощен антитромбоцитен медикамент, който започва да се прилага в близкото минало за про-

филактика на съдови, тромботични събития при пациенти в риск (фиг. 1) [2, 6, 21, 57, 72, 75, 95].



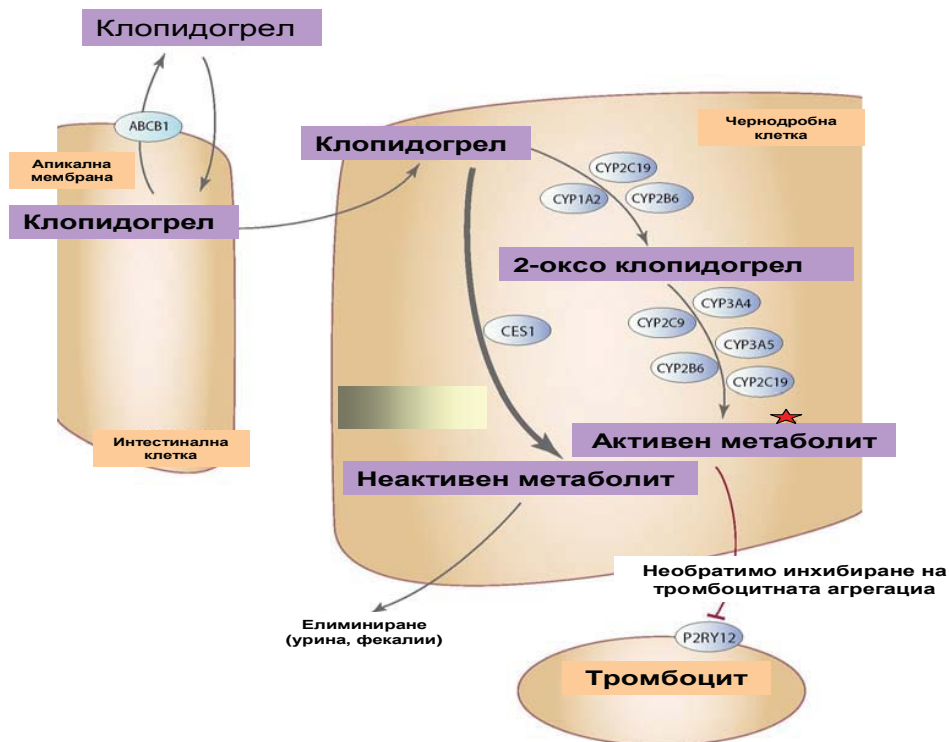
Фиг. 1. Приложение на клопидогрел при превенция на стент-тромбози. Широко разпространен медикамент за потискане на тромбоцитната агрегация и предотвратяване на формирането на тромби след поставяне на коронарен стент в засегнатата артерия е антитромбоцитният медикамент клопидогрел. Той се приема след поставяне на стена, за различна продължителност от време – между един месец и една година [91]

Клопидогрел представлява аденозин дифосфат (АДФ) антагонист, който възпрепятства директно свързването на АДФ с тромбоцитите, блокирайки селективно P2Y₁₂ рецепторите върху тромбоцитната мембрана. Медикаментът има двойно действие върху тромбоцитната функция – от една страна, пряко и трайно инхибира АДФ зависимия път на активиране на тромбоцитите, а от друга – индиректно блокира АДФ медираната експресия на GP IIb/IIIa рецепторите за свързване с фибриногена и последващата тромбоцитна агрегация [37, 46, 58, 80].

Клопидогрел бисулфат се метаболизира до активен тиолов дериват в черния дроб чрез оксидация и хидролиза [42, 45]. Оксидативното стъпало се регулира главно от изоензими 2B6 и 3A4 на цитохром CYP 450 и в по-малка степен от 1A1, 1A2 и 2C19. Общият път на метаболизиране на КЛД и други медикаменти от CYP450 е в основата на лекарствените им взаимодействия. Едно наскоро проведено изследване предполага, че параoxonase 1 (PON1) също е включен в трансформацията на КЛД до активен метаболит [12, 18, 19, 22, 23, 52, 68, 93].

Оксидативният метаболизъм на КЛД включва два основни етапа. Първата стъпка е окисление на тиофеновия пръстен на предлекарството, с цел формиране на 2-оксо-КЛД. Втората стъпка включва окислението на 2-оксо-клопидогрел и последваща хидролиза до активен метаболит, който се свързва с рецептора P2Y12, при което протича инхибиране на АДФ стиму-

лираната агрегацията на тромбоцитите. Ензими, които участват в първата стъпка на метаболизма на КЛД, са CYP1A2, CYP2B6 и CYP2C19. Втората стъпка позволява окисление чрез CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9 и CYP2C19, последвана от хидролитично разцепване от paraoxonase 1 (PON1) на активния метаболит (фиг. 2) [6, 32, 37, 90, 93].



Фиг. 2. Основни ензими, участващи в метаболизма на клопидогрел до неговия активен метаболит [16]

Единичните нуклеотидни замени (SNPs) в гените, кодиращи тези ензими, водят до получаването на варианти, които са по-малко функционални в процеса на активация и може значително да променят нивата на активния метаболит на КЛД [6, 19, 30, 44, 67, 90].

Ензимът CYP2C19 участва и в двете стъпки на метаболизма на КЛД, като допринася за около 45% от първия цикъл на окисление и 21% при втория етап, което води до получаване на активен метаболит [65]. Алелните варианти CYP2C19*2 и *3 в гена, кодиращ синтеза на този ензим, допринасят за повече от 90% от случаите на бавен метаболизъм [65].

Последните изследвания показват, че фармакодинамичният отговор на КЛД е променлива величина. Между 20-40% от пациентите са класифицирани като резистентни към терапията с КЛД поради ниската инхибираща активност на тромбоцитите, в резултат на липсата на метаболизиране на неактивното съединение до активен метаболит [30, 58, 80-82]. Негенетичните фактори, които влияят на реакцията на КЛД, включват възраст, диабет, бъбречна недостатъчност и др.

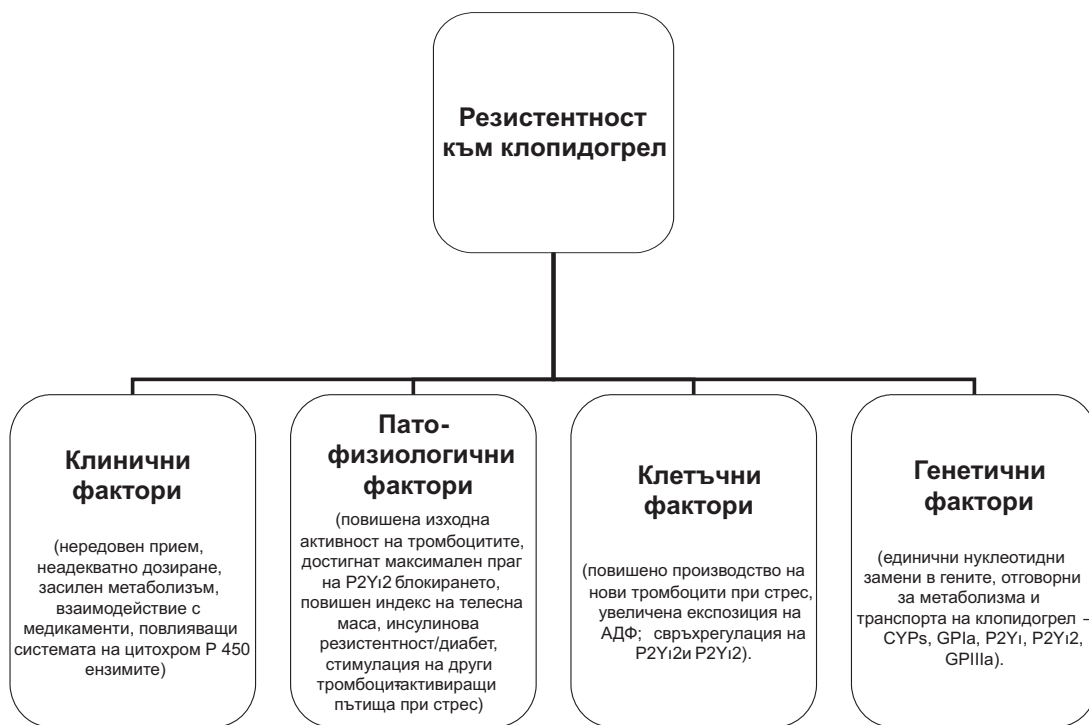
Не всички пациенти имат еднакъв отговор към фиксирана доза антиагрегант [25]. Изследването на тромбоцитната агрегация при перкутанна коронарна интервенция (ПКИ) за определяне на дозата е препоръчи-

телно особено при високорискови пациенти и ОКС [71]. Увеличаването на дозата на КЛД до 150 mg дневно е ефективно и безопасно при пациенти, при които има слаб отговор към терапията с медикамента [1, 8, 25, 35, 59, 70].

В клиничната практика липсата на отговор към терапията с КЛД се назовава като “резистентост към КЛД” [25]. Приблизително 5-10% от пациентите на терапия с този медикамент показват резистентност към неговите

ефекти, изследвани чрез стандартни тромбоцитни тестове, и около 25% от пациентите показват частичен отговор към терапията. При различните популации процентите по отношение на резистентността към медикамента КЛД са между 4 и 44% [1].

Причините, обуславящи индивидуалния отговор към КЛД, са много и могат да се систематизират в следните групи: генетични, клетъчни, патофизиологични и клинични фактори (фиг. 3) [60, 77].



Фиг. 3. Класификация на основните причини, обуславящи различен отговор към клопидогрел при отделните индивиди [13]

Генетичните полиморфизми могат да повлияват фармакокинетиката на лекарствата, прицелните молекули на лекарствено действие или изявата на болестно състояние. Многобройни гени кодират ензими, които участват в усвояването и метаболизма на КЛД. Промяна в някой от тези етапи, поради вариации в ензимната активност може да повлияе ефекта от приема на КЛД [9, 43].

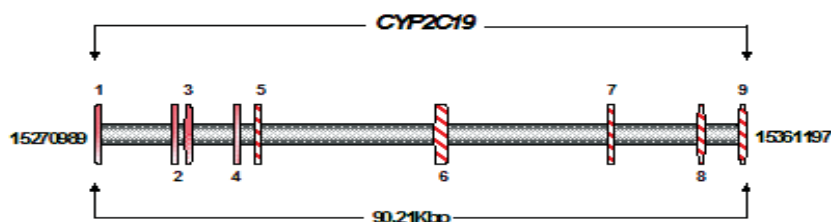
Интериндивидуалната вариабилност в отговора към терапията с КЛД се дължи основно на полиморфни варианти, открити в гени от групата на цитохром P450, които кодират ензими, участващи в метаболизма на антитромбоцитния медикамент. Установено

е, че полиморфни са първите три семейства от тази група, които участват в метаболизма на голям брой екзогенни съединения: токсини от околната среда, лекарствени вещества и карциногени [15, 43].

CYP2C19 е един от най-важните ензими, който взема участие в метаболизма на около 5% от лекарствените препарати, използвани в клиничната практика [34, 96]. Субстрати на този ензим са инхибитори на протонната помпа (ИПП), антидепресанти, антиконвулсанти, седативи, мускулни релаксанти, диазепам, инхибитори на обратното захващане на серотонина (ИОЗС), циталопрам и есциталопрам, КЛД [87], а също

така и препарати, прилагани при лечение на малария [24]. Тези субстрати представляват предимно amidни съединения и слаби бази [53].

Генът *CYP2C19* е локализиран върху късото рамо на 10-а хромозома и е с големина 90.21 килобази (кб). Притежава 9 екзона, експресиращи се до 1475 базови двойки (вр) мРНК (фиг. 4) [87].



Фиг. 4. Структура на гена *CYP2C19*

Намира се в един и същ клъстер от гени с *CYP2C9*, *CYP2C8* и *CYP2C18* и кодира ензим, наречен S-мефенитоин–4–хидроксилаза.

S-мефенитоин–4–хидроксилазата е един от чернодробните цитохром P450 ензими, участващи в образуването на активни мета-

болити на КЛД. Генът, кодиращ неговия синтез, е високо полиморфен [20, 41].

Генетичните полиморфизми в *CYP2C19* са асоциирани с нарушения в метаболизма на КЛД както при здрави доброволци, така и при пациенти (табл. 1) [4].

Таблица 1. Типове алели на гена *CYP2C19* и свързаната с тях ензимна активност [4]

CYP2C19		
Анел:	Нуклеотидна замяна:	Ензими:
*1	Див тип	Нормална ензимна активност
*2	681G>A	Неактивен
*3	636G>A	Неактивен
*4	1A>G	Неактивен
*5	1297C>T	Неактивен
*7	19294T>A	Неактивен
*8	358T>C	Неактивен
*17	-806C>T	Повишена ензимна активност

Само някои от тези генотипи са често срещани в европейската популация. Най-често срещаният генотип е *CYP2C19*1*, който има нормална ензимна активност. Генотипите *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* и *CYP2C19*4* също се срещат с висока честота и всички водят до загуба на ензимна активност [27]. Междуетническата вариабилност в разпределението на тези алели е сравнително висока, варираща от около 2,8% при хора от европейската раса до 23% при азиатци [27].

Полиморфните варианти *CYP2C19*2* и *CYP2C19*3* в гена за S-мефенитоин–4–хидроксилазата са отговорни за по-голямата част от *CYP2C19* свързания фенотип на бавните метаболизатори в различните популации [10]. *CYP2C19*2* алелът, съдържащ мутация в сплайсинг мястото в екзон 5 (681G>A), е най-честият алелен вариант във всички етнически групи. Той води до появата на ранен стоп кодон и оттам до продукцията на нефункционален протеин, с липсващ хем-свързващ район [31].

Генетичният вариант *CYP2C19*2*, представляващ замяна на гуанин с аденин в 681 позиция (681 G>A; rs4244285), е бил идентифициран като основна детерминанта на прогнозата при млади пациенти, които приемат КЛД след прекаран инфаркт на миокарда [64]. Този тип вариация в гена определя слабо метаболизиращ фенотип, свързан с повишен риск от сърдечно-съдови събития. Наблюдават се широки междуетнически различия в честотата на разпространение на бавния метаболизиращ фенотип: 2-5% при популации с кавказки произход [10, 31], 13-23% сред азиатски популации [31, 49] и 4-8% при африкански популации [36]. В кавказката популация бавните метаболитизатори (БМ) се срещат по-малко от 2-5%. *CYP2C19*2* и *CYP2C19*3* генотипите са отговорни за 99% от БМ в азиатската популация и за 87% от БМ в кавказката популация [17].

Друг често изследван алел е *CYP2C19*3* (636G>A), определящ появата на стоп кодон в аминокиселинна позиция 212 в екзон 4, но той е рядко срещан сред популациите от кавказки произход, а при азиатските и афроамериканските популации обяснява около 20-25% от БМ [26]. Освен това индивиди, носители на два алела със загуба на функцията в *CYP2C19* (*2, *3 (rs4986893), *4 (rs28399504) или *5 (rs56337013), показват повишен риск от усложнения в резултат на терапията с КЛД [3].

През 2004 г. са идентифицирани два нови генетични варианта в *CYP2C19* [87]. Тези варианти са в пълна равновесна скаченост и са локализиращи в 5'-съпътстващия регион на гена в позиция -806 и в позиция -3402, като взети заедно, тези варианти представляват *CYP2C19*17* полиморфизъм. Установено е, че алелната честота на *CYP2C19*17* е 18% при шведи и етиопци в сравнение с едва 4% при китайски и 1,3% при японски лица. Този полиморфен вариант се асоциира с ултрабърз метаболитизъм на ксенобиотици [29, 54, 87].

Индивидите могат да бъдат класифицирани според техния *CYP2C19* генотип и свързаната с *CYP2C19* ензимна активност [64, 87]. По този начин пациентите, приемащи КЛД, могат да бъдат разделени на следните групи:

- Ултрабързи метаболитизатори (УБМ, носители на два мутантни алела *CYP2C19*17*)
- Бързи метаболитизатори (БМ, носители на един мутантен алел *CYP2C19*17* и един див тип алел),
- Нормални метаболитизатори (НМ, носители на два див тип алела),
- Нормални/междинни метаболитизатори (НМ/ММ, носители на един мутантен алел *CYP2C19*17* и един неактивен алел *CYP2C19*2*),
- Междинни метаболитизатори (ММ; носители на един мутантен алел, отговорен за бавен метаболизиращ фенотип – *CYP2C19*2* или *CYP2C19*3*, и един див тип алел),
- Бавни метаболитизатори (БМ, носители на два мутантни алела, отговорни за бавен метаболизиращ фенотип, *CYP2C19*2* или *CYP2C19*3*).

В сравнение с НМ БМ в по-малка степен могат да метаболитизират *CYP2C19* субстрати, както е показано при голям брой *in vivo* проучвания, свързани с прилагането на класически лекарства като S-мефенитоин, омепразол и клопидогрел [79].

Доказано е, че БМ проявяват три до тринадесет пъти по-висока експозиция на КЛД от НМ. В УБМ бионаличността на антитромбоцитния агент е от два до четири пъти по-висока в сравнение с НМ. В немалък брой проучвания е доказано, че БМ имат значително по-високи ползи от терапия с КЛД в сравнение с НМ [69].

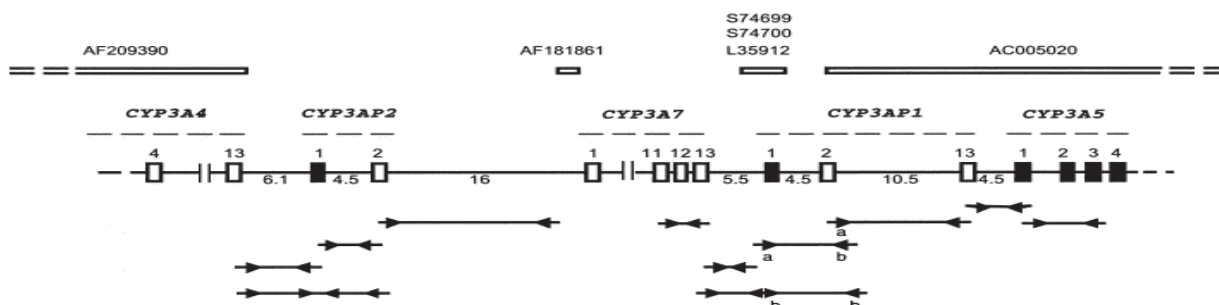
От друга страна, БМ страдат по-често от нежелани реакции, предизвикани от употребата на КЛД. Пациенти, носители на алел за намалена функция на *CYP2C19*, са с много по-ниски нива на активния метаболит, приложен след ПКИ, което води до намалена тромбоцитна инхибиция и по-висока честота на значими нежелани сърдечно-съдови инциденти, включително стент-тромбоза [56, 69].

CYP3A5

Ензимите от *CYP3A* подсемейството имат широка субстратна специфичност и са отговорни за окислението на над 50% от всички предлагани в клиничната практика лекарствени средства и структурно разнообразни химични съединения, като стероиди, мастни киселини и разнообразни ксенобиотици от околната среда [17]. Те имат най-го-

лям принос в метаболизма на лекарствени вещества от всички биотрансформационни ензими. Това подсемейство обхваща най-широко експресираните P450 ензими в човешкия черен дроб (около 30% от цялото CYP съдържание) и тънките черва [66, 78].

Подсемейството CYP3A включва четири основни форми: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* и *CYP3AP*, от които *CYP3A4* и *CYP3A5* са с най-голямо значение за лекарствения метаболизъм на КЛД при възрастни пациенти (фиг. 5) [51, 55, 97].



Фиг. 5. Локализация и структура на основните CYP3A гени, кодиращи CYP3A – метаболизиращи ензими [28]

Съществуващата интериндивидуална вариабилност в активността на *CYP3A4* и *CYP3A5* ензимите се дължи основно на значителен брой полиморфни варианти, открити в техните гени [4]. Един от най-често и задълбочено изследваните полиморфизми в *CYP3A4* гена е $-392A>G$ замяната (*CYP3A4*1B*). Тя се намира в 5'-фланкиращия домен на гена (в предполагаемия нифедипин-отговорен елемент) [73].

Въпреки че първоначално $-392G$ замяната е била асоциирана с повишение в транскрипционната активност на гена, както и с повишение в каталитичната активност на ензима [11], тази корелация е противоречива [14]. Предполага се, че най-вероятно *CYP3A4*1B* и *CYP3A5*1* алелите се унаследяват заедно и *CYP3A* активността към ендогенни и екзогенни субстрати се повлиява от присъствието на *CYP3A5*1* алела [50]. Установено е, че съществува скаченоост между двата алела [50].

Генът *CYP3A5* е по-хетерогенен. Съществува бимодално разпределение в *CYP3A5* активността. Най-честият във всички етнически групи и функционално важен алелен вариант е $6986A>G$ (*CYP3A5*3*), намиращ се в интрон 3. Тази не кодираща замяна създава алтернативно място на сплайсинг в пре-мРНК, водещо до продукция на аномална мРНК, съдържаща 131 бази от интрон 3. Това от своя страна води до промяна в рамката

на четене и формирането на стоп кодон. Експресира се протеин, чийто синтез е прекъснат при 102-я аминокиселинен остатък и е с липсваща ензимна активност [50, 51]. Честотата на *CYP3A5*3* алела сред популациите с кавказки произход е много висока: около 89-95% [40, 48, 74]. Това обяснява и факта защо нивото на *CYP3A5* ензима в черния дроб на много голяма част от индивидите от тази раса липсва или е много ниско (80-90%) [50].

Клинични проучвания, свързани с вариабилността в отговора към терапията с клопидогрел

В стремежа към по-добро разбиране на влиянието на генетичните фактори върху клиничните резултати вече съществуват прогнозни проучвания, целящи да докажат връзката между носителството на полиморфни варианти в определени гени и индивидуализираната анти тромбоцитна терапия.

Клопидогрел е най-проучваният тиенопирин. Медикаментът е изследван при повече от 100 000 пациенти в голям брой проучвания. Анализирани са при целия спектър на атеротромбозни заболявания – от коронарната и мозъчносъдова болест до периферната артериална недостатъчност – още от 1996 г. [33]. Всички проучвания са проведени с оригиналния продукт Plavix® на Sanofi-Aventis. Широко навлезлите на лекарствения пазар генерици следва да бъдат тествани за

бионаличност на КЛД. Клинично изпитване при 70 здрави доброволци установява, че Trombex® (Zentiva) е биоеквивалентен на референтния Plavix® в дози от 75 mg без значими разлики в профила на безопасност [33].

Проведени са няколко големи, рандомизирани клинични проучвания с КЛД: CURE и PCI-CURE (2001), CREDO (2002), COMMIT (2005), CLARITY и PCI-CLARITY (2005) [6-11]. Доказателствата от CURE и PCI-CURE обосновават индикацията на КЛД при ОКС без ST-сегмент елевация от 2002 г., а тези от COMMIT и CLARITY – индикацията при STEMI от 2006 г. В проучването CAPRIE, и понастоящем – резултатите на CURRENT-OASIS 7, са докладвани през 2009 г., а тези на ARMYDA-5 PRELOAD са публикувани през 2010 г. [33].

Ефектът на *CYP2C19* генотипа върху фармакокинетиката на активния метаболит на КЛД е оценен в голям брой проучвания. Данните от проведените анализи показват, че носителството на алел *CYP2C19*1* отговаря на нормална активност на ензима, а алелите *CYP2C19*2* и *CYP2C19*3* са свързани с намалена функция. Понижената активност на *CYP2C19* намалява максималната концентрация на активния метаболит КЛД с 30 до 50% след натоварваща доза от 300 или 600 mg и поддържаща доза от 75 mg. По-ниските нива на активен метаболит водят до намалена тромбоцитна инхибиция и повишена остатъчна тромбоцитна активност [84-86].

Двойносляпото, рандомизирано и плацебо-контролирано проучване CLARITY-TIMI 28 (Clopidogrel as Adjunctive Reperfusion Therapy – Thrombolysis in Myocardial Infarction Study) включва 3500 пациенти на възраст от 18 до 75 години с миокарден инфаркт със ST-елевация през последните 12 часа. При проведените анализи не е установена съществена разлика в честотата на сърдечно-съдовите събития при отделните генотипове [76].

В проучването TRITON-TIMI 38 (Trials to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel–Thrombolysis in Myocardial Infarction 38), лекуваните с КЛД пациенти, носители на алел за намалена активност *CYP2C19*2*, са показали 53% по-висок риск за смърт поради

сърдечно-съдови усложнения, миокарден инфаркт или инсулт, както и три пъти по-висок риск за тромбоза на стента [61, 62].

Проучването GIFT (Genotype Information and Functional Testing) представлява генетично подпроучване на GRAVITAS (Gauging Responsiveness with A Verify Now assay—Impact on Thrombosis And Safety trial). В това подпроучване, общо 1152 кръвни проби са генотипизирани за различни вариации, включително и тези, които са свързани с ензима *CYP2C19*. Резултатите показват, че носителите на един или два *CYP2C19*2* нефункционални алела не са имали по-добра реакция към по-висока дневна доза (150 mg) на КЛД. По-конкретно, 11-кратно повишен риск от постоянно високо ниво на тромбоцитна реактивност е открит при пациенти, които са хомозиготни за *CYP2C19*2* алел, в сравнение с пациентите, носители на див тип алел. В допълнение, 62% повишен риск се наблюдава при тези пациенти, които притежават само едно копие на *CYP2C19*2*, в сравнение с пациентите с див тип алел. Тези открития показват, че по-високите дози на КЛД не могат да бъдат полезна стратегия при лечение на пациенти, носители на *CYP2C19*2* [86].

Проучването ELEVATE-TIMI 56 (Escalating Clopidogrel by Involving A Genetic Strategy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 56) анализира ефикасността на по-високите дневни дози на КЛД (150-300 mg дневно) при 86 пациенти със сърдечно-съдови заболявания, които са носители на *CYP2C19*2* алел, в сравнение с 247 пациенти, които не са носители на полиморфен вариант. Сред 80 хетерозиготи с един **2* алел, увеличаването на дневната доза на КЛД до 220 mg или 300 mg веднъж дневно е довело до нива на инхибиране на тромбоцитите, сравними с наблюдаваните при прием на 75 mg веднъж дневно в неносителите на нефункционален алел. При носителите 150 mg дневно КЛД потискат тромбоцитната активация повече от 75 mg дневно, но не и до равнище, сравнимо с наблюдаваното при дневна доза от 75 mg в неносителите. За разлика от това, хомозиготите по полиморфния алел демонстрират относително висока тромбоцитна реактивност в отговор на всички дози на КЛД. Това проучване предлага: утрояването на днев-

ната доза на КЛД до 225 mg веднъж дневно може да бъде ефективна терапевтична опция при пациенти с един полиморфен алел *CYP2C19*2*, но не и при пациенти, носители на два такива алела [56-58].

Подпроучване на CHARISMA (Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance) цели провеждането на генетичен анализ, за да се оцени въздействието на полиморфизмите в гена *CYP2C19* върху сърдечно-съдовата смърт, инфаркт на миокарда и инсулт при 4862-ма пациенти, разпределени на случаен принцип за прием на КЛД или плацебо. Около 20% от тези пациенти са били носители на едно копие на алел *CYP2C19*2*, а 2% от тях са имали по две копия на същия този алел. Сред пациентите, приемащи КЛД, носителите само на едно копие *CYP2C19*2* не показват увеличение на сърдечно-съдовите събития в сравнение с пациентите, притежаващи по две копия на дивия тип алел (OR = 1,112, 95% CI, 0.72-1.71; P = 0.63). Въпреки това пациентите с две копия на полиморфния вариант (**2/*2*) са показали повишен риск от сърдечно-съдова смърт, инфаркт на миокарда и инсулт, в сравнение с носителите на две копия на дивия тип алел *CYP2C19*1* (OR = 2,383, 95% CI, 1.14-5.00, p = 0,022). Получените резултати от това проучване са в съответствие с докладваните от Sibbing и сътр., което показва, че пациенти с две копия на *CYP2C19*2* алел показват по-голям риск от исхемични инциденти в сравнение с пациенти с едно копие на алел *CYP2C19*2*. Макар и незначителен, повишен риск от сърдечно-съдови събития (OR = 1,852; 95% CI, 0.74-4.65, P = 0.19) се наблюдава също така и при пациенти с две копия на полиморфния алел *CYP2C19*2* в сравнение с пациентите, носители на две копия на дивия тип алел в групата, приемаща плацебо. Тези наблюдения показват, че хомозиготният генотип **2/*2* може да доведе до повишен риск от сърдечно-съдови събития, дори и при пациенти, получаващи плацебо [7].

Подпроучване на FAST-MI (French registry of Acute ST elevation or non-ST-elevation Myocardial Infarction) анализира 2208 високорискови пациенти на терапия с КЛД, за които е характерно, че са преживели един

остър миокарден инфаркт. При провеждане на генетичен анализ на тези пациенти е установено, че носителите на два полиморфни алела в *CYP2C19*, характеризиращи се със загуба на функцията (**2, *3, *4* или **5*), показват повишени нива на нежелани сърдечно-съдови събития, в сравнение с носителите на див тип алели (21,5% срещу 13,3%; OR, 1.98; 95% CI, 1.10-3.58). Сред 1535 пациенти, подложени на ПКИ по време на хоспитализация, разликата в сърдечно-съдовите събития между носителите на два алела със загуба на функция в *CYP2C19* и неносителите на такива алели е 3.58 пъти (95% CI, 1.71-7.51). Тези резултати предполагат, че наличието на два алела *CYP2C19*2* оказва по-голямо отрицателно въздействие върху пациенти, подложени на ПКИ при остър миокарден инфаркт [88].

В клиничното подпроучване PLATO (Platelet Inhibition and Patient Outcomes), което сравнява тикагрелол с КЛД, участват 10 285 пациенти, подложени на генетичен анализ. Пациентите в проучването са преживели сърдечно-съдова смърт, миокарден инфаркт или инсулт. Резултатите показват повишени нива на исхемични събития през първите 30 дни от проучването сред пациенти, носители на *CYP2C19* полиморфен вариант (**2, *3, *4, *5, *6, *7, *8*), приемащи КЛД, в сравнение с неносителите (5,7% срещу 3,8%, P=0.028). Въпреки това не се наблюдава значителна разлика през целия последващ едногодишен период [94].

Няколко метаанализа са изследвали връзката между *CYP2C19*2* алела с намалена функция и неблагоприятните клинични резултати.

Мега и сътр. [56] анализират данни от девет независими проучвания, за да проследят риска от големи нежелани сърдечно-съдови събития (сърдечно-съдова смърт, ОМИ или инсулт) при носители на един или два алела с намалена функция в гена *CYP2C19*, като повечето изследвания са с акцент върху полиморфния вариант *CYP2C19*2*. Сред 9685 оценявани пациенти, 91,3% са подложени на ПКИ, докато 54,5% са били пациенти с ОКС. След генотипизирането се установява, че 26,3% от пациентите са носители на един *CYP2C19*2* вариантен алел, а само

2,2% са носители на два алела с намалена функция. Анализът от проведеното проучване обобщава, че пациенти, носители на един или два *CYP2C19*2* вариантни алела, имат значително повишен риск от сърдечно-съдови събития в сравнение с неносителите (OR 1,57; 95% CI, 1.13-2.16; P = 0,006). По-нататъшният анализ показва, че значително увеличаване на риска се наблюдава както при хетерозиготните носители (OR 1,55; 95% CI, 1.11-2.17; P = 0.01), така и при хомозиготите по полиморфния алел (OR, 1,76, 95% CI, 1.24-2.50; P = 0,002) в сравнение с неносителите на нефункционален алел. Авторите на настоящото изследване заключават, че пациенти, лекувани с КЛД след ПКИ, са изложени на значително повишен риск от неблагоприятни сърдечно-съдови инциденти, особено стент-тромбоза, ако те са носители на дори един алел с намалена функция *CYP2C19*2*.

В метаанализ [38, 39], включващ десет проучвания, които обхващат 11 959 участници, Hulot и сътр. изследват ефектите от *CYP2C19*2* вариант върху клиничните резултати при пациенти, лекувани с КЛД. От тези пациенти 28% са носители на алел със загуба на функция *CYP2C19*2*, а 41% са претърпели инплантиране на стент. Ефективността от терапията е била оценявана на базата на възникване на основните нежелани сърдечно-съдови усложнения (НССУ), стент-тромбози и смърт. Резултатите показват, че при носителите на *CYP2C19*2* полиморфен вариант значително се ускорява НССУ в сравнение с неносителите (9,7% срещу 7,8%, P < 0.001). При последващо изследване на носителите на полиморфни алели от 4 проучвания (5694 пациенти) хетерозиготите с един нефункционален алел показват 1.59-кратно увеличение на риска от НССУ, докато хомозиготите с два нефункционални алела показват 2,05-кратно увеличение на този риск. Рискът от възникване на стент-тромбоза е над 3 пъти по-висок при хетерозиготите [2,94% срещу 0,87%, (OR), 3,34, 95% CI, 1.84-5.93] и над 4 пъти по-висок при хомозиготите с 2 нефункционални алела (4.87% в сравнение с 0,87%, 4,68, 95% CI, 1.55-14.11) в сравнение с неносителите. На последно място, този метаанализ установява, че един-

ствено полиморфният вариант *CYP2C19*2* е свързан с повишаване на смъртността при пациентите в сравнение с носителите на див тип алел на гена (1,8% спрямо 1,0%, OR 1,79; 95% CI, 1.10-2.91, p= 0,019).

За разлика от предходните два метаанализа, при метаанализа на Bauer и сътр. [15] не се открива значително увеличение на НССУ, дължащи се на *CYP2C19*2* вариант. Този обобщен анализ включва 15 проучвания и анализира 18 529 пациенти за връзката между алела със загуба на функция *CYP2C19*2* и НССУ, както и 19 328 пациенти за влиянието на полиморфния вариант *CYP2C19*2* върху усложненията от стент-тромбоза. Алелният вариант *CYP2C19*2* е съобщен при 11-19% пациенти в анализирания клинични изпитвания. Резултатите от този анализ не подкрепят връзката между *CYP2C19*2* и НССУ (OR 1,11, 95% CI, 0.89-1.39; P = 0.36). Въпреки това е установена връзка между този алел и тромбоза на стената (OR 1,77, 95% CI, 1.31-2.40; P < 0.001).

Друго изследване на Sibbing и сътр. [86] анализира 2485 ниско- до среднорискови пациенти, подложени на ПКИ след третиране с 600 mg КЛД. Приблизително 25% от изследваните пациенти са били хетерозиготи и 2% хомозиготи за алел *2 на *CYP2C19*. Процентът на стент-тромбози през първите 30 дни от лечението е значително по-висок при пациенти с *CYP2C19*2* алела (хетерозиготи или хомозиготи) в сравнение с носителите на див тип алел (1,5% спрямо 0,4%; OR, 3.81; 95%CI, 1.45-10.02; P = 0 .007). При оценяване на кумулативния риск от възникване на стент-тромбоза този риск е най-висок (2,1%) при хомозиготи, носители на *CYP2C19*2* алел (P = 0.002), което означава, че честотите на STEMI и исхемичен инсулт са също значително по-високи при носителите на *CYP2C19*2* вариант в сравнение с *CYP2C19* див тип хомозиготи (1,5% срещу 0,5%, P = 0.02 и 0,6% срещу 0%; P = 0.001). Въпреки това не е установена значителна разлика в смъртния изход в резултат на миокарден инфаркт между носителите на *CYP2C19*2* полиморфен алел и див тип хомозиготи (7,6% срещу 6,7% P = 0.42).

В генетичното подпроучване на Pare и сътр. [5] са анализирани усложненията от

сърдечно-съдови инциденти при нискорискови пациенти от 2 големи рандомизирани проучвания. Проведено е генотипизиране при 5059 пациенти с ОКС от проучването CURE (Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Ischemic Events) и 1156 пациенти с ПМ от проучването ACTIVE-A (Atrial Fibrillation Clopidogrel Trial With Irbesartan for Prevention of Vascular Events). Приблизително 18% от пациентите в CURE и 14,5% от тези в ACTIVE-A са претърпели ПКИ. В двете изследвани кохорти протективната полза от КЛД е била сходна при пациентите, независимо от носителството на *CYP2C19**2 или *CYP2C19**3 алели, което показва, че хетерозиготното или хомозиготното носителство на *2 или *3 варианти не е свързано с повишен риск от големи сърдечно-съдови събития.

Проучване на Trenk и сътр. [92] от 2008 г. показва, че носителите на най-малко един *2 алел на *CYP2C19* са склонни към по-висока тромбоцитна реактивност при лечение с КЛД, което може да води до по-неблагоприятни резултати при имплантиране на коронарни стентове. Според авторите намалената функция на *CYP2C19* води до по-висока (> 14%) остатъчна тромбоцитна агрегация (RPA) при терапия с КЛД. Пациентите с RPA > 14% имат три пъти по-висока честота на смъртност и ОМИ до края на първата година след инвазивната интервенция. От изследваната популация – 69.3% са били хомозиготни носители на *CYP2C19**1 алел и 30.7% – носители на поне един *2 алел (*1/*2 или *2/*2 генотип). Носителите на поне един *CYP2C19**2 алел са показали значително пониско ниво на активен метаболит на медикамента, понижена тромбоцитна инхибиция и по-голяма честота на значими НССУ, включително и стент-тромбози.

Проучванията по отношение на алелния вариант *CYP2C19**17 и отговора към анти-тромбоцитната терапия с КЛД все още са твърде малко. Този полиморфизъм в гена *CYP2C19* е открит и проучван едва през последните няколко години и е необходимо провеждането на допълнителни анализи в тази насока.

В своето проучване Frege и сътр. [29] за първи път предполагат, че полиморфният алел *CYP2C19**17 оказва съществено

влияние върху тромбоцитния отговор към КЛД независимо от *CYP2C19**2 алел. Резултатите от тяхното изследване показват, че *CYP2C19**17 алела допринася за променливостта в тромбоцитния отговор към КЛД при пациенти с NSTEMI, лекувани с висока доза медикамент.

Две други изследвания, които анализират ролята на *CYP2C19**17 в тромбоцитния отговор при лечението с КЛД, показват, че *CYP2C19**17 алела има значително въздействие върху анти-тромбоцитния ефект на КЛД, който е свързан с повишен риск от кървене поради увеличаване на активацията на предлекарството [83].

Данните от шест клинични изпитвания демонстрират, че носители на *CYP2C19**17 вариант имат значително понижен риск от повтарящи се сърдечно-съдови инциденти в сравнение с неносителите (16% намаляване на честотата на НССУ). От друга страна, носителите на *CYP2C19**17 са показали повишен риск от кървене поради засилване на отговора към медикамента, в резултат на повишена активация на активния метаболит [54].

Zabalza и сътр. също докладват, че носителството на *CYP2C19**17 алел е свързано с по-нисък риск от сърдечно-съдови инциденти (OR = 0,75, 95% CI 0.66-0.87) и по-висок риск от сериозно кървене (OR = 1,26, 95% CI 1,05-1,50) [98].

По отношение на влиянието на полиморфизмите в *CYP3A5* гена върху тромбоцитния отговор към КЛД също са проведени голям брой проучвания.

В свое изследване Kim и сътр. [47] оценяват въздействието на генотип *CYP3A5* върху фармакокинетиката и антиагрегантния ефект на КЛД при 22-ма здрави доброволци. Разпределението на генотиповете е, както следва: *CYP3A5* *1/*1, N = 6; *CYP3A5* *1/*3, N = 8; *CYP3A5* *3/*3, N = 8). След прилагане на натоварваща доза от 300 mg КЛД, последвана от 75 mg веднъж дневно в продължение на 6 дни, са измерени плазмените концентрации на КЛД и неактивния метаболит SR26334, в рамките на 24 часа. Антиагрегантният ефект на КЛД е измерен чрез определяне на инхибирането на АДФ индуцираната тромбоцитна агрегация за 168 часа, според генотипа на *CYP3A5*. Не е установена разлика в профи-

лите на плазмените концентрации на активния и неактивния метаболит на медикамента при отделните генотипове. В допълнение, генотипът на *CYP3A5* не повлиява фармакокинетиката на КЛД и не модулира инхибиторния му ефект върху тромбоцитната агрегация при здрави индивиди.

В два други анализа на Namazi и сътр. [63] и Smith и сътр. [89] не се установяват значими корелации между отговора към КЛД и полиморфизми в *CYP3A5* гена.

Поведението при хората с намалена биотрансформация на КЛД не е уточнено. Единият вариант е да се увеличи дозата на КЛД, а другият – да се използва алтернативен медикамент (празугрел).

Библиография

1. Пехливанова, М., Б. Георгиев и Н. Гочева. Клопидогрел дисулфат: приложение при остър коронарен синдром. – Наука Кардиология, 2010, № 5, 239-244.
2. Постаджиян, А. Непосредни нужди в антитромбоцитна терапия при лечението на остър коронарен синдром. – Мед. Инфо, 2011, № 1, 56-61.
3. www.laegemiddelstyrelsen.dk.
4. www.cypalleles.ki.se
5. Agewall, S. et C. Lowbeer The new definition of myocardial infarction--can we use it? – Clin. Cardiol., **28**, 2005, 77-80.
6. Ahmad, T., D. Voora et R. C. Becker. The pharmacogenetics of antiplatelet agents: towards personalized therapy? – Nat. Rev. Cardiol., **8**, 2011, 560-571.
7. Alberts, M. J. CHARISMA revisited: is the glass half full or just empty? – Int. J. Stroke., **3**, 2008, 16-19.
8. Aleil, B. et al. CYP2C19*2 polymorphism is not the sole determinant of the response to clopidogrel: implications for its monitoring. – J. Thromb. Haemost., **7**, 2009, 1747-1749.
9. Alexopoulos, D. et I. Xanthopoulos. Clopidogrel dosing based on genotype. – Jama, **307**, 2012, author reply 1024-1025.
10. Allabi, A. C. et al. Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations. – Br. J. Clin. Pharmacol., **56**, 2003, 653-657.
11. Amirani, B. et al. RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. – J. Natl. Cancer Inst., **91**, 1999, 1588-1590.
12. Ancrenaz, V. et al. Paraoxonase-1 pathway is not a major bioactivation pathway of clopidogrel in vitro. – Br. J. Pharmacol., 2012.
13. Angiolillo, D. J. et F. Alfonso. Clopidogrel-statin interaction: myth or reality? – J. Am. Coll. Cardiol., **50**, 2007, 296-298.
14. Ball, S. E. et al. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. – Clin. Pharmacol. Ther., **66**, 1999, 288-294.
15. Bauer, T. et al. Impact of CYP2C19 variant genotypes on clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel: systematic review and meta-analysis. – BMJ, **343**, 2011, d4588.
16. Beitelshes, A. L. et al. Pharmacogenetics and clopidogrel response in patients undergoing percutaneous coronary interventions. – Clin. Pharmacol. Ther., **89**, 2011, 455-459.
17. Brackbill, M. L. et al. Frequency of CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, and CYP2C19 variant alleles in patients receiving clopidogrel that experience repeat acute coronary syndrome. – Heart Vessels, **24**, 2009, 73-78.
18. Camps, J. et al. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. – Nat. Med., **17**, 2011, 1041-1042, author reply 1042-1044.
19. Chan, M. Y. et al. CYP2C19 and PON1 polymorphisms regulating clopidogrel bioactivation in Chinese, Malay and Indian subjects. – Pharmacogenomics, **13**, 2012, 533-542.
20. Chen, J. J., G. S. Chen et N. J. Bunce. Inhibition of CYP1A2-dependent MROD activity in rat liver microsomes: an explanation of the hepatic sequestration of a limited subset of halogenated aromatic hydrocarbons. – Environ Toxicol., **18**, 2003, 115-119.
21. Committee, C. S. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). – Lancet, **348**, 1996, 1329-1339.
22. Cuisset, T. et al. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. – Nat. Med., **17**, 2011, 1039, author reply 1042-1034.
23. Dansette, P. M. et al. Paraoxonase-1 and clopidogrel efficacy. – Nat. Med., **17**, 2011, 1040-1041, author reply 1042-1044.
24. Desta, Z. et al. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. – Clin. Pharmacokinet., **41**, 2002, 913-958.
25. Dupont, A. G., D. A. Gabriel et M. G. Cohen. Antiplatelet therapies and the role of antiplatelet resistance in acute coronary syndrome. – Thromb. Res., **124**, 2009, 6-13.
26. Edeki, T. I. et al. Genetic polymorphism of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in African-Americans. – Pharmacogenetics, **6**, 1996, 357-360.
27. Ferguson, R. J. et al. 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**, 1998, 356-361.
28. Finta, C. et P. G. Zaphiropoulos. The human cytochrome P450 3A locus. Gene evolution by capture of downstream exons. – Gene., **260**, 2000, 13-23.
29. Frere, C. et al. The CYP2C19*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome. – J. Thromb. Haemost., **7**, 2009, 1409-1411.
30. Geisler, T., B. Bigalke et M. Schwab. CYP2C19 genotype and outcomes of clopidogrel treatment. – N. Engl. J. Med., **364**, 2011, 481, author reply 482.
31. Goldstein, J. A. et al. Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. – Pharmacogenetics, **7**, 1997, 59-64.
32. Gong, I. Y. et al. Clarifying the importance of CYP2C19 and PON1 in the mechanism of clopidogrel bioactivation and in vivo antiplatelet response. – Eur. Heart J., **33**, 2012, № 22, 2856-2864.
33. Goswami, S., A. Cheng-Lai et J. Nawarskas. Clopidogrel and genetic testing: is it necessary for everyone? – Cardiol. Rev., **20**, 2012, 96-100.
34. Hasler, J. A. et al. Human cytochromes P450. Molecular Aspects of Medicine. – In: **20**, 1999, 1-137.
35. Hazarbasanov. Variability of response to clopidogrel in patients with coronary artery disease after percutaneous coronary intervention: A review: Bulgarian cardiology Book **15**, 2009, № 1, 10-17.

36. Herrlin, K. et al. Bantu Tanzanians have a decreased capacity to metabolize omeprazole and mephenytoin in relation to their CYP2C19 genotype. – *Clin. Pharmacol. Ther.*, **64**, 1998, 391-401.
37. Hulot, J. S. et al. CYP2C19 but not PON1 genetic variants influence clopidogrel pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical efficacy in post-myocardial infarction patients. – *Circ. Cardiovasc. Interv.*, **4**, 2011, 422-428.
38. Hulot, J. S. et al. 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**, 2010, 134-143.
39. Hulot, J. S., R. Hajjar et G. Montalescot. Clopidogrel and CYP2C19 testing: ready for clinical prime time? – *Clin. Chem.*, **58**, 2012, 154-157.
40. Huster, E. et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. – *Pharmacogenetics*, **11**, 2001, 773-779.
41. Ingelman-Sundberg, M. et C. Rodriguez-Antona. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. – *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **360**, 2005, 1563-1570.
42. Jarvis, B. et K. Simpson. Clopidogrel: a review of its use in the prevention of atherothrombosis. – *Drugs*, **60**, 2000, 347-377.
43. Jinnaï, T. et al. Impact of CYP2C19 polymorphisms on the antiplatelet effect of clopidogrel in an actual clinical setting in Japan. – *Circ. J.*, **73**, 2009, 1498-1503.
44. Johnson, J. A. et al. Pharmacogenomics: application to the management of cardiovascular disease. – *Clin. Pharmacol. Ther.*, **90**, 2011, 519-531.
45. Kam, P. C. et C. M. Nethery. The thienopyridine derivatives (platelet adenosine diphosphate receptor antagonists), pharmacology and clinical developments. – *Anaesthesia*, **58**, 2003, 28-35.
46. Kassimis, G. et al. CYP2C19*2 and other genetic variants affecting platelet response to clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention. – *Thromb. Res.*, **129**, 2012, 441-446.
47. Kim, K. A., P. W. Park et J. Y. Park. Effect of CYP3A5*3 genotype on the pharmacokinetics and antiplatelet effect of clopidogrel in healthy subjects. – *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **64**, 2008, 589-597.
48. King, B. P. et al. CYP3A5 phenotype-genotype correlations in a British population. – *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **55**, 2003, 625-629.
49. Kubota, T., K. Chiba et T. Ishizaki. Genotyping of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in an extended Japanese population. – *Clin. Pharmacol. Ther.*, **60**, 1996, 661-666.
50. Kuehl, P. et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. – *Nat. Genet.*, **27**, 2001, 383-391.
51. Lamba, J. K. et al. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. – *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 2002, 1271-1294.
52. Lewis, J. P. et al. Paraoxonase 1 (PON1) gene variants are not associated with clopidogrel response. – *Clin. Pharmacol. Ther.*, **90**, 2011, 568-574.
53. Lewis, N., T. D. Williams et K. Chipman. Functional analysis of xenobiotic response elements (XREs) in CYP 1A of the European Flounder (*Platichthys flesus*). – *Mar. Environ. Res.*, **58**, 2004, 101-105.
54. Li, Y. et al. The gain-of-function variant allele CYP2C19*17: a double-edged sword between thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients. – *J. Thromb. Haemost.*, **10**, 2012, 199-206.
55. Lin, Y. S. et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. – *Mol. Pharmacol.*, **62**, 2002, 162-172.
56. Mega, J. L. et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. – *N. Engl. J. Med.*, **360**, 2009, 354-362.
57. Mega, J. L. et al. Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. – *Jama*, **306**, 2011, 2221-2228.
58. Mega, J. L., E. J. Topol et M. S. Sabatine. CYP2C19 genotype and cardiovascular events. – *Jama*, **307**, 2012, 1482-1483, author reply 1484-1485.
59. Michelson, A. D. Platelet function testing in cardiovascular diseases. – *Hematology*, **10**, 2005, Suppl. 1, 132-137.
60. Mobley, J. E. et al. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. – *Am. J. Cardiol.*, **93**, 2004, 456-458.
61. Montalescot, G. et al. STEMI and NSTEMI: are they so different? 1 year outcomes in acute myocardial infarction as defined by the ESC/ACC definition (the OPERA registry). – *Eur. Heart J.*, **28**, 2007, 1409-1417.
62. Montalescot, G. et al. Prasugrel compared with clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction (TRI-TON-TIMI 38): double-blind, randomised controlled trial. – *Lancet*, **373**, 2009, 723-731.
63. Namazi, S. et al. The impact of genetic polymorphisms of P2Y12, CYP3A5 and CYP2C19 on clopidogrel response variability in Iranian patients. – *Biochem. Pharmacol.*, **83**, 2012, 903-908.
64. Oh, I. Y. et al. Association of cytochrome P450 2C19*2 polymorphism with clopidogrel response variability and cardiovascular events in Koreans treated with drug-eluting stents. – *Heart*, **98**, 2012, 139-144.
65. Osnabrugge, R. L., A. P. Kappetein et A. C. Janssens. Carriage of reduced-function CYP2C19 allele among patients treated with clopidogrel. – *Jama*, **305**, 2011, 467-468, author reply 468.
66. Paine, M. F. et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. – *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**, 1997, 1552-1562.
67. Pare, G. et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. – *N. Engl. J. Med.*, **363**, 2010, 1704-1714.
68. Pare, G. et al. Effect of PON1 Q192R Genetic Polymorphism on Clopidogrel Efficacy and Cardiovascular Events in the Clopidogrel in the Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial and the Atrial Fibrillation Clopidogrel Trial With Irbesartan for Prevention of Vascular Events. – *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **5**, 2012, 250-256.
69. Park, J. Backtracking on CYP2C19 genotyping in clopidogrel therapy? – *Biomark. Med.*, **4**, 2010, 791.
70. Petrov, I. K. K. Contemporary antithrombotic treatment of peripheral arterial diseases: Sofia Bulgarian Cardiology Book XVI, Supplementary, **2**, 2010, 16-20.
71. Qureshi, Z. et A. R. Hobson. Clopidogrel „Resistance“: Where are We Now? – *Cardiovasc. Ther.*, **10**, 2011, 1755-1762.
72. Randall, M. D. et E. Karen. Disease management, **159**, 2004, neLPP.
73. Rebeck, T. R. et al. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. – *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**, 1998, 1225-1229.

74. Ron, H. N. et al. CYP3A5 Variant Allele Frequencies in Dutch Caucasians. – *Clin. Chem.*, **48**, 2002, № 10, 1668-1671.
75. Rossi Adelaide: Australian Medicines Handbook, 2006.
76. Sabatine, M. S. et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. – *N. Engl. J. Med.*, **352**, 2005, 1179-1189.
77. Serebruany, V. L. et al. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. – *J. Am. Coll. Cardiol.*, **45**, 2005, 246-251.
78. Shimada, T. et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. – *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 1994, 414-423.
79. Shuldiner, A. R. et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. – *Jama*, **302**, 2009, 849-857.
80. Shuldiner, A. R., M. R. Vesely et A. Fisch. CYP2C19 genotype and cardiovascular events. – *Jama*, **307**, 2012, 1482, author reply 1484-1485.
81. Siasos, G., D. Tousoulis et C. Stefanadis. CYP2C19 genotype and cardiovascular events. – *Jama*, **307**, 2012, 1483-1484, author reply 1484-1485.
82. Siasos, G., D. Tousoulis et C. Stefanadis. CYP2C19 genotype and outcomes of clopidogrel treatment. – *N. Engl. J. Med.*, **364**, 2011, 481-482.
83. Sibbing, D. et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. – *Circulation*, **121**, 2010, 512-518.
84. Sibbing, D. et al. Clopidogrel response status assessed with Multiplate point-of-care analysis and the incidence and timing of stent thrombosis over six months following coronary stenting. – *Thromb. Haemost.*, **103**, 2010, 151-159.
85. Sibbing, D. et al. Antiplatelet effects of clopidogrel and bleeding in patients undergoing coronary stent placement. – *J. Thromb. Haemost.*, **8**, 2010, 250-256.
86. Sibbing, D. et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. – *Eur. Heart J.*, **30**, 2009, 916-922.
87. Sim, S. C. et al. 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**, 2006, 103-113.
88. Simon, T. et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. – *N. Engl. J. Med.*, **360**, 2009, 363-375.
89. Smith, S. M. et al. Common sequence variations in the P2Y12 and CYP3A5 genes do not explain the variability in the inhibitory effects of clopidogrel therapy. – *Platelets*, **17**, 2006, 250-258.
90. Steinhubl, S. R. Genotyping, clopidogrel metabolism, and the search for the therapeutic window of thienopyridines. – *Circulation*, **121**, 2010, 481-483.
91. Topol, E. J. S. et J. Nicholas. Catapulting clopidogrel pharmacogenomics forward. – *Nature Medicine*, **17**, 2011, № 1, 40-41.
92. Trenk, D. et al. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. – *J. Am. Coll. Cardiol.*, **51**, 2008, 1925-1934.
93. Trenk, D. et al. Paraoxonase-1 Q192R polymorphism and antiplatelet effects of clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. – *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **4**, 2011, 429-436.
94. Wallentin, L. et al. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. – *Lancet*, **376**, 2010, 1320-1328.
95. Wang, T. Y, et C. B. Granger. ACP Journal Club. Review: Reduced function CYP2C19 genotypes may increase risk for stent clots in patients receiving clopidogrel. – *Ann. Intern. Med.* **155**, 2011, JC6-13.
96. Werck-Reichhart, D. et R. Feyereisen. Cytochromes P450: a success story. – *Genome. Biol.*, **1**, 2000, REVIEWS 3003.
97. Williams, J. A. et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. – *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 2002, 883-891.
98. Zabalza, M. et al. 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**, 2012, 100-108.

✉ Адрес за кореспонденция:

Рени Стойова Цвеова
 Катедра „Медицинска химия и биохимия“
 Център по молекулна медицина
 Медицински университет – София
 ул. Здраве № 2
 1431 София
 0886182511
 e-mail: renitzveova@mmcbg.org

✉ Address for correspondence:

Reni Stoyova Tzveova
 Department of Medical Chemistry and Biochemistry
 Molecular Medicine Center
 Medical University – Sofia
 2 Zdrave Str.
 1431 Sofia
 0886182511
 e-mail: renitzveova@mmcbg.org