

# Farmakogenetika klopidozola

---

**Plečko, Andrea**

**Professional thesis / Završni specijalistički**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:569129>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Andrea Plečko  
FARMAKOGENETIKA KLOPIDOGRELA  
Specijalistički rad

Zagreb, 2018.

PSS studij: Poslijediplomski specijalistički studij Klinička farmacija

Mentor rada: Prof. dr. sc. Nada Božina, dr. med

Specijalistički rad obranjen je dana 07.12.2018. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Karmela Barišić

2. Prof. dr. sc. Vesna Bačić-Vrca

3. Prof. dr. sc. Nada Božina, dr. med

Rad ima 59 listova.

Rad je izrađen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu poslijediplomskog specijalističkog studija Klinička farmacija pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Nade Božine.

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Nadi Božini na cijenjenom mentorstvu i pomoći u izradi ovog specijalističkog rada.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji na strpljenju i pruženoj podršci.*

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj rada je pregledno prikazati genetičke čimbenike koji utječu na učinkovitost i sigurnost terapije klopidogetrelom, a koji mogu omogućiti ljekarnicima lakše savjetovanje i individualizaciju terapije.

**Materijali i metode:** U tu svrhu pretražena je znanstvena literatura, terapijske smjernice i publikacije stručnih institucija i drugi izvori. Opisan je utjecaj genetičke varijabilnosti na apsorpciju (gen *ABCB1*), metabolizam i aktivaciju (geni *CYP2C19*, *CES1*), mjesto djelovanja (gen za receptor  $P2Y_{12}$ ) klopidogetrela te utjecaj različitih varijanti ovih gena na ishod liječenja.

**Rezultati:** Studije pokazuju da nositelji neaktivnih alela *CYP2C19* (\*2 i \*3) liječeni klopidogetrelom imaju manju koncentraciju aktivnog metabolita u plazmi i veću agregaciju trombocita od homozigota za divlje alele gena *CYP2C19*. Intermedijarni i spori metabolizatori putem enzima *CYP2C19* liječeni klopidogetrelom zbog akutnog koronarnog sindroma imaju značajno veći rizik smrti, razvoja infarkta miokarda, moždanog udara i tromboze stenta od brzih metabolizatora. Fenotip aktivnosti enzima *CYP2C19* nezavisni je prediktor uspješnosti terapije klopidogetrelom u pacijenata s akutnim koronarnim sindromom i provedenom perkutanom koronarnom intervencijom.

**Zaključak:** Rezistencija na klopidogetrel jedan je od uzroka neuspješnog liječenja aterotrombotičkih oboljenja. Genotipizacija *CYP2C19*, uz ostale faktore rizika, može pomoći u predviđanju odgovora na terapiju klopidogetrelom, povećati uspješnost terapije i smanjiti smrtnost.

**Ključne riječi:** klopidogetrel, farmakogenetika, rezistencija, *CYP2C19*, *ABCB1*

## SUMMARY

**Objectives:** The goal of this thesis is to give an overview on the genetic factors that can affect the efficiency and safety of clopidogrel therapy for the purpose of improving pharmacists counseling and therapy individualization.

**Materials and methods:** To that end, scientific literature, therapy guidelines and publications from relevant organizations and other sources has been reviewed. The impact of genetic variability on absorption (*ABCB1* gene), metabolism and activation (*CYP2C19*, *CES1* gene) and biological activity (*P2Y<sub>12</sub>* gene) of clopidogrel has been described. The relation between these genetic variations and clinical outcome has also been described.

**Results:** Studies have shown that carriers of inactive *CYP2C19* alleles (\*2 and \*3) have lower plasma concentrations of active clopidogrel metabolite and higher on treatment platelet aggregation compared to noncarriers of these alleles. Intermediate and poor *CYP2C19* metabolizers treated with clopidogrel after acute coronary syndrome have significantly higher risk of death, myocardial infarction, stroke and stent thrombosis. *CYP2C19* phenotype is an independent predictor of clopidogrel treatment outcome in patient with acute coronary syndrome who underwent PCI.

**Conclusion:** Clopidogrel resistance is one of the causes of antithrombotic treatment failure. *CYP2C19* genotyping can help predict clopidogrel response, improve clinical outcome and reduce mortality.

**Keywords:** clopidogrel, pharmacogenetics, resistance, *CYP2C19*, *ABCB1*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>1</b>
1.1. AKTIVACIJA I AGREGACIJA TROMBOCITA .....	1
1.2. FARMOKODINAMIKA KLOPIDOGRELA .....	6
1.2.1. TERAPIJSKE INDIKACIJE .....	6
1.2.2. SIGURNOST PRIMJENE .....	8
1.3. FARMAKOKINETIKA KLOPIDOGRELA .....	8
1.3.1. APSORPCIJA .....	8
1.3.2. DISTRIBUCIJA .....	9
1.3.3. METABOLIZAM .....	9
1.3.4. ELIMINACIJA .....	10
1.4. FARMAKOGENETIKA U SUVREMENOJ KLINIČKOJ PRAKSI .....	13
1.4.1. POLIMORFIZAM TRANSPORTNIH SUSTAVA .....	14
1.4.2. POLIMORFIZAM METABOLIČKIH ENZIMA .....	19
1.4.3. POLIMORFIZAM RECEPTORA P2Y <sub>12</sub> .....	23
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI .....</b>	<b>25</b>
3.1. UTJECAJ POLIMORFIZMA GENA <i>ABCB1</i> NA TERAPIJU KLOPIDOGRELOM .....	25
3.2. UTJECAJ POLIMORFIZMA ENZIMA CYP450 NA TERAPIJU KLOPIDOGRELOM .....	28
3.3. UTJECAJ POLIMORFIZMA RECEPTORA P2Y <sub>12</sub> NA TERAPIJU KLOPIDOGRELOM .....	32
3.4. UTJECAJ OSTALIH GENETIČKIH ČIMBENIKA NA TERAPIJU KLOPIDOGRELOM .....	33

3.5 SMJERNICE REGULATORNIH TIJELA I STRUČNIH DRUŠTAVA O PRIMJENI FARMAKOGENETIČKOG TESTIRANJA U LIJEČENJU KLOPIDOGRELOM .....	35
4. RASPRAVA.....	<b>38</b>
5. ZAKLJUČAK.....	<b>42</b>
6. LITERATURA .....	<b>43</b>
7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA .....	<b>50</b>
8. ŽIVOTOPIS.....	<b>51</b>



# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Ishemijska bolest srca i cerebrovaskularne bolesti bili su vodeći uzroci smrti u Hrvatskoj u 2016. godini (1). Hiperagregacija trombocita i stvaranje krvnog ugruška predstavljaju glavni uzrok komplikacija kardiovaskularnih oboljenja. Prevencija aterotrombotičkih i tromboembolijskih događaja provodi se primjenom antiagregacijskih lijekova među kojima je nakon acetilsalicilne kiseline i dalje najčešće korišten lijek klopido­gre­l. Klopido­gre­l je ireverzibilni inhibitor agregacije trombocita posredovane ADP-om i pred­stavlja zlatni standard u liječenju stanja nakon akutnog infarkta miokarda, ishemijskog moždanog udara i perkutane koronarne intervencije kod akutnog koronarnog sindroma. U pacijenata na terapiji klopido­gre­lom uočena je velika varijabilnost u odgovoru na terapiju te oko 4-30% pacijenata ne postiže očekivani klinički učinak lijeka (2). Varijabilnost odgovora dijelom je posljedica genetičkog ustroja pojedinca, a to znači da se učinak klopido­gre­la može predvidjeti prije početka terapije.

## 1.1. AKTIVACIJA I AGREGACIJA TROMBOCITA

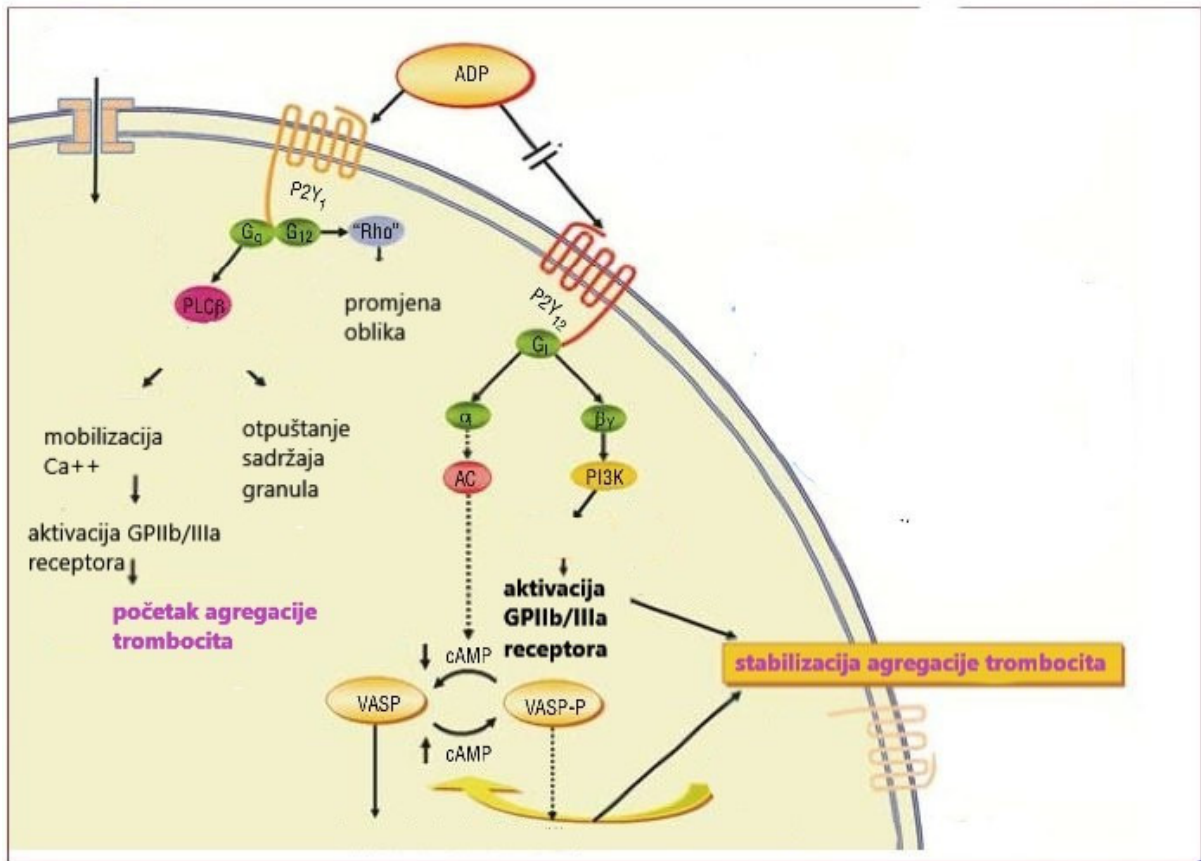
Trombociti su acelarne krvne pločice koje nastaju u koštanoj srži usitnjavanjem megakariocita. Kako nemaju mogućnost dijeljenja njihov životni vijek u cirkulirajućoj krvi je 8 do 12 dana, nakon čega se uklanjaju fagocitozom. Glavna uloga trombocita je održavanje cjelovitosti krvnih žila i hemostaza u kojoj sudjeluju stvaranjem trombocitnog čepa na mjestu ozljede koji kasnije prelazi u krvni ugrušak. Brojni biološki aktivni spojevi i enzimi pohranjeni u citoplazmi trombocita uključeni su i u patofiziologiju upale, ateroskleroze i tumorogeneze. Aktivnost trombocita regulirana je receptorima na njihovoj površini. U tablici 1 prikazani su

najvažniji receptori uključeni u aktivaciju i agregaciju trombocita (3). Neoštećene endotelne stanice krvnih žila onemogućavaju adheziju trombocita na stijenku krvne žile sintezom i izlučivanjem antikoagulacijskih spojeva te ekspresijom receptora CD39 koji cijepa ATP i ADP na AMP čime se onemogućava aktivacija trombocita. Prostaciklin i NO preko receptora na površini trombocita aktiviraju enzim adenil-ciklazu i na taj način sprječavaju aktivaciju receptora GPIIb/IIIa zaduženog za unakrsno povezivanje i aktivaciju trombocita u plazmi. Ozljeda ili oštećenje endotela krvne žile izlaže subendotelne strukture cirkulirajućoj krvi što pokreće kaskadu zgrušavanja krvi. Ovisno o razini oštećenja tkiva i proteinima koji pritom bivaju izloženi krvi aktiviraju se različiti receptori na površini trombocita. Ozljedom krvnih žila mikrocirkulacije uslijed aterosklerotskih promjena endotela dolazi do izlaganja kolagena i von Willebrandova faktora (vWf) receptorima na površini trombocita. Preko kompleksa receptora GPIb-IX-V trombociti adheriraju na površinu oštećenog endotela. Vezanje receptora GPIb-IX-V i vWf dovodi do promjene oblika trombocita i pokreće kaskadu reakcija koje će privući još trombocita na mjesto ozljede. Jedna od reakcija je sinteza tromboksana  $A_2$  iz arahidonske kiseline oslobođene iz fosfolipida membrane. Tromboksan  $A_2$  se tada veže na receptore na površini trombocita, aktivira fosfolipazu C i tako podiže koncentraciju kalcijevih iona što dovodi do promjene oblika trombocita. Dolazi do konformacijske promjene receptora GPIIb/IIIa u aktivni oblik koji se veže na fibrinogen u plazmi. Kontrakcija aktina, miozina i trombostenina u citoplazmi trombocita potiče otpuštanje sadržaja granula bogatih prokoagulacijskim faktorima.  $\alpha$ -granule otpuštaju fibrinogen, vWf, upalne citokine i čimbenike rasta čime se aktiviraju trombociti u neposrednoj blizini. Guste granule trombocita sadrže ADP, ATP, kalcij, katekolamine i serotonin čije je otpuštanje bitno za daljnju aktivaciju i agregaciju trombocita (4). Ključan aktivator agregacije je ADP. Postoje dvije vrste receptora za purinske baze na membrani trombocita, P2X i P2Y. Receptor P2X<sub>1</sub> je kationski kanal koji se

otvara nakon vezanja ATP-a otpuštenog iz gustih granula pri čemu u citoplazmu trombocita ulaze kalcijevi ioni. Kalcij je bitan za stezanje kontraktilnih bjelančevina i promjenu oblika trombocita. Receptori P2Y su G-protein vezani receptori. Aktiviraju se ADP-om otpuštenim iz gustih granula. Aktivacijom receptora P2Y<sub>1</sub> aktivira se fosfolipaza C koja potiče otpuštanje kalcijevih iona iz endoplazmatske mrežice i Golgijevog aparata. Receptor P2Y<sub>1</sub> je bitan za pokretanje agregacije trombocita, dok je za održavanje agregacije i nastanak tromba najbitna aktivacija receptora P2Y<sub>12</sub>. Njegovom aktivacijom ADP-om dolazi do inhibicije aktivnosti adenil-ciklaze i pada unutarstanične razine cAMP-a. Niska razina cAMP-a smanjuje fosforilaciju vazodilatatorima stimuliranog fosfoproteina (VASP) čime se smanjuje njegov učinak na inhibiciju receptora GPIIb/IIIa. To za posljedicu ima aktivaciju receptora GPIIb/IIIa i povezivanje trombocita. Aktivacija receptora P2Y<sub>12</sub> dovodi i do aktivacije protein-kinaza i direktne aktivacije GPIIb/IIIa, ali i do otpuštanja sadržaja gustih granula iz citoplazme trombocita u krv. Time se dodatno pojačava aktivacija cirkulirajućih trombocita koji se preko fibrinogena i aktiviranog GPIIb/IIIa vežu u nestabilan tromb. Daljnji rast i stabilizacija tromba ovisi o ravnoteži protrombotičkih i antitrombotičkih faktora (5).

**Tablica 1. Receptori trombocita, njihova funkcija u stvaranju ugruška i mehanizam djelovanja antiagregacijskih lijekova (3)**

<b>Receptor</b>	<b>Mjesto</b>	<b>Ligandi</b>	<b>Uloga</b>	<b>Lijek</b>
<b>GPIb-IX-V kompleks</b>	Površina trombocita	vWf, trombin, faktor XI, P-selektin	Adherencija na oštećena tkiva	-
<b>GPVI</b>	Površina trombocita	Kolagen	Adherencija na oštećena tkiva	-
<b>PAR-1</b>	Membrana trombocita	Trombin	Aktivacija cirkulirajućih trombocita	-
<b>TP<math>\alpha</math></b>	Membrana trombocita	Tromboksan A <sub>2</sub>	Aktivacija cirkulirajućih trombocita	Acetilsalicilna kiselina blokira stvaranje tromboksana A <sub>2</sub>
<b>P2X<sub>1</sub></b>	Membrana trombocita	ATP	Agregacija trombocita	-
<b>P2Y<sub>1</sub></b>	Membrana trombocita	ADP	Agregacija trombocita	-
<b>P2Y<sub>12</sub></b>	Membrana trombocita	ADP	Agregacija trombocita	Klopidogrel, prasugrel, tikagrelor
<b>GPIIb/IIIa</b>	Membrana trombocita	Fibrinogen	Agregacija trombocita	Abciximab, tirofiban, eptifibatid



**Slika 1.** Aktivacija trombocita putem receptora P2Y (6). Vezanjem ADP-a na receptor P2Y<sub>1</sub> aktivira se fosfolipaza C (PLC $\beta$ ), otpuštanje kalcijevih iona i promjena oblika trombocita. Aktivacijom receptora P2Y<sub>12</sub> smanjuje se djelovanje adenil-ciklaze, pada razina unutarstaničnog cAMP-a i smanjuje se razina fosforiliranog vazodilatatorima stimuliranog fosfoproteina (VASP-P). Niska razina VASP-P aktivira receptor GPIIb/IIIa i pokreće daljnju agregaciju trombocita. P2Y<sub>12</sub> također aktivira protein fosfoinozitol-kinazu 3 (PI3K) što dovodi do direktne aktivacije GPIIb/IIIa. Preuzeto i prilagođeno iz Geiger J i sur (6).

## 1.2 FARMOKODINAMIKA KLOPIDOGRELA

Klopidogrel je inhibitor agregacije trombocita posredovane ADP-om. Nakon aktivacije putem enzima citokroma P450 (CYP), klopidogrel se kovalentno veže na receptor P2Y<sub>12</sub> trombocita i ireverzibilno inhibira aktivaciju ovog receptora ADP-om. Posljedično to dovodi do smanjenja aktivnosti adenil-ciklaze, porasta unutarstanične razine cAMP-a i pojačane fosforilacije VASP-a čime se sprječava aktivacija kompleksa GPIIa/IIIb i agregacija trombocita. Klopidogrel ne utječe na unutarstaničnu razinu kalcija niti na promjenu oblika trombocita (6). Potpuni učinak na smanjenje agregacije nakon ponovljenih doza od 75 mg klopidogrela postiže se nakon 3 do 7 dana terapije. U stanju dinamičke ravnoteže razina inhibicija trombocita iznosi 40-60% (7). Zbog ireverzibilne inhibicije receptora potrebno je 5 do 7 dana za potpuni gubitak učinka lijeka i povratak agregacije trombocita i vremena krvarenja na normalne vrijednosti.

### 1.2.1. TERAPIJSKE INDIKACIJE

Europska agencija za lijekove odobrila je klopidogrel za prevenciju aterotrombotičkih događaja nakon preboljelog infarkta miokarda, ishemijskog moždang udara i kod bolesti perifernih arterija. U kombinaciji s acetilsalicilnom kiselinom (ASK) klopidogrel je odobren za prevenciju aterotrombotičkih događaja u bolesnika s akutnih koronarnim sindromom s ili bez elevacije ST-segmenta te u bolesnika s fibrilacijom atriya koji nisu podobni za terapiju antagonistima vitamina K i imaju barem jedan rizični faktor za razvoj trombotičkog incidenta (7). Korist terapije klopidogrelom u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom bez elevacije ST-segmenta dokazana je u CURE studiji gdje je utvrđeno 20% -tno smanjenje relativnog rizika kardiovaskularne smrti, infarkta miokarda ili moždanog udara u skupini pacijenata koja je uz

ASK uzimala 75 mg klopidogrela dnevno u odnosu na kontrolnu skupinu (terapija samo ASK). Najveća korist terapije primijećena je nakon 3 mjeseca primjene lijeka, a nije utvrđena korist terapije u trajanju duljem od 12 mjeseci. Studija CLARITY uključivala je pacijente s akutnim koronarnim sindrom s elevacijom ST-segmenta gdje se uspoređivao učinak dodatka klopidogrela standardnoj terapiji (ASK, fibrinolitici i heparin) na smanjenje rizika razvoja ponovnog infarkta miokarda, okluzije arterije potvrđene angiografijom ili smrti. Skupina koja je uzimala klopidogrel imala je za 6,7% manji rizik okluzije arterije povezane s infarktom miokarda u odnosu na kontrolnu skupinu (7). Osim klopidogrela, za prevenciju trombotičkih incidenata kod akutnog koronarnog sindroma u kliničkoj praksi se koriste još dva oralna antiagregacijska lijeka – prasugrel i tikagrelor. I prasugrel i tikagrelor pokazuju superiornost nad klopidogrelom u smanjenju rizika kardiovaskularnih događaja kod akutnog koronarnog sindroma, ali i drugačije sigurnosne profile. TRITON studija uspoređivala je učinak prasugrela i klopidogrela u liječenju akutnog koronarnog sindroma nakon provedene perkutane koronarne intervencije. Prasugrel je bio učinkovitiji od klopidogrela u smanjivanju rizika kardiovaskularnih događaja u svih 12 mjeseci terapije. Učestalost krvarenja, uključujući po život opasna krvarenja, bila je veća u pacijenata liječenih prasugrelom. Ukupna smrtnost u obje skupine pacijenata bila je jednaka (8). U studiji PLATO uspoređivana je učinkovitost tikagrelora i klopidogrela u smanjenju rizika kardiovaskularne smrti, infarkta miokarda ili moždanog udara u pacijenata s akutnim koronarnim sindromom, sa ili bez ST-elevacije. Tikagrelor se pokazao učinkovitiji od klopidogrela u smanjenju rizika za navedene ishode bez povećanja rizika velikih krvarenja, ali uz povećanje rizika neprocedularnih krvarenja (9).

### 1.2.2. SIGURNOST PRIMJENE

Najčešća nuspojava primjene klopidogrela je povećan rizik krvarenja i to najčešće u prvom mjesecu korištenja terapije. Često prijavljivane nuspojave ( $\geq 1/100$ ,  $< 1/10$ ) su pojava hematoma, gastrointestinalno krvarenje, proljev, bol u trbuhu i dispepsija, dok su manje često prijavljivane ( $\geq 1/1000$ ,  $< 1/100$ ) intrakranijalno krvarenje, glavobolje i parestezije, krvarenje u oku, ulkus želuca i dvanesnika. Vrlo rijetke i po život opasne nuspojave su trombotična trombocitopenična purpura, gastrointestinalno i retroperitonealno krvarenje, pankreatitis, kolitis, akutno zatajenje jetre i druge. U većini kliničkih ispitivanja nije primijećena češća incidencija velikih krvarenja kada se klopidogrel kombinirao s ASK. Antidot klopidogrelu u slučaju pojave komplikacija pojačanog krvarenja nije poznat. Vrijeme krvarenja u slučaju predoziranja može se skratiti transfuzijom trombocita (7).

### 1.3. FARMAKOKINETIKA KLOPIDOGRELA

#### 1.3.1 APSORPCIJA

Klopidogrel se brzo apsorbira nakon jednokratne i ponovljene doze. Vršne koncentracije u plazmi postižu se nakon 45 minuta od oralne primjene lijeka (7). Otprilike oko 50% doze lijeka se apsorbira u potpunosti. Povećanjem doze proporcionalno se povećava koncentracija aktivnog i neaktivnog metabolita klopidogrela u krvi sve do doze od 600 mg. Povećanjem udarne doze na 900 mg ne dolazi do značajnog povećanja koncentracije klopidogrela, aktivnih i neaktivnih metabolita u krvi što upućuje na ograničenje u apsorpciji (10). U transport klopidogrela kroz apikalnu membranu uključen je P-glikoprotein tako da



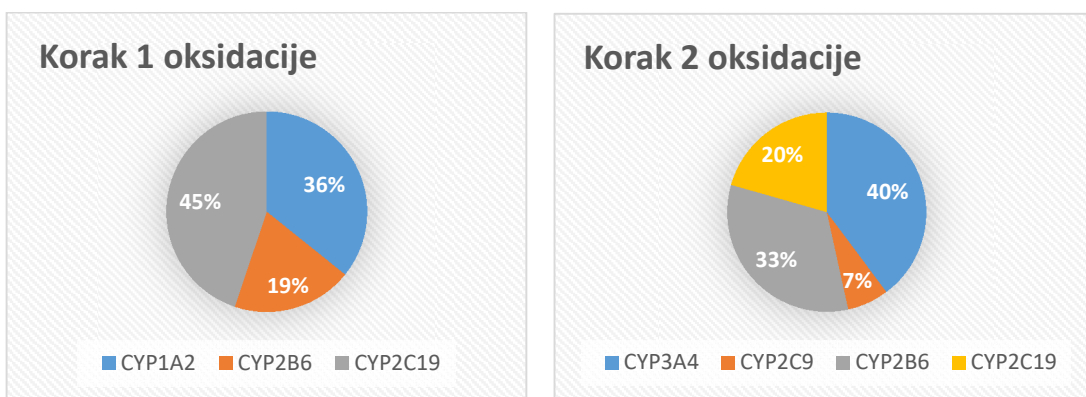
izbacuje klopidogrel iz epitelnih stanica natrag u lumen crijeva. Dugotrajna izloženost crijevnih stanica klopidogrelu smanjuje ekspresiju gena *ABCB1* i sintezu P-glikoproteina čime se povećava apsorpcija klopidogrela (11).

### 1.3.2. DISTRIBUCIJA

Klopidogrel i njegovi metaboliti se vežu na proteine plazme i tako cirkuliraju krvotokom. Nakon metabolizma u jetri, 98% neaktivnog i aktivnog metabolita se veže na proteine plazme (12). Povećanje koncentracije neaktivnog oblika može potisnuti aktivni metabolit sa zajedničkih mjesta vezanja i povećati učinkovitost klopidogrela.

### 1.3.3. METABOLIZAM

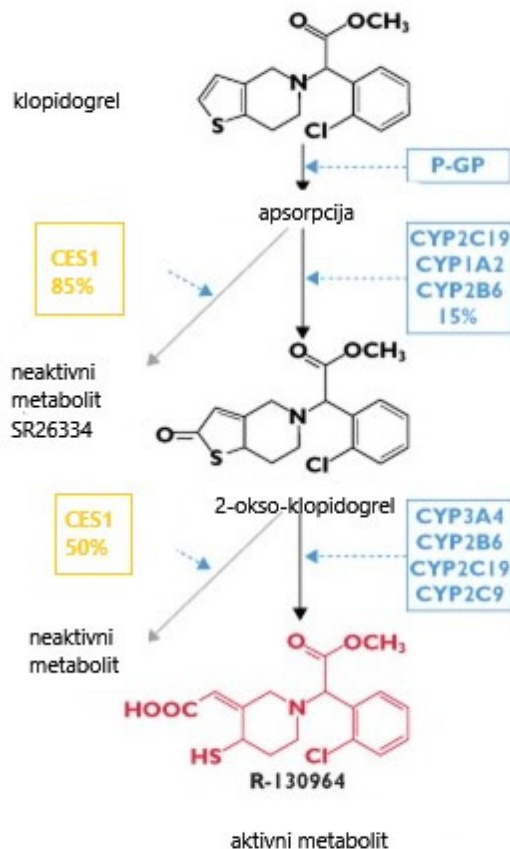
Najveći dio apsorbiranog klopidogrela (85%) hidrolizira se u jetri putem karboksilesteraze 1 (CES1) pri čemu nastane neaktivni metabolit. Ostalih 15% apsorbirane doze se metabolizira u aktivni oblik kroz dva koraka. U prvom koraku djelovanjem enzima CYP2C19, CYP1A2 i CYP2B6 nastaje 2-okso-klopidogrel. On se dalje metabolizira preko enzima CYP3A4, CYP2B6, CYP2C19 i CYP2C9 u aktivni oblik R-130964 koji se veže na receptor P2Y<sub>12</sub> i ostvaruje učinak lijeka. Udio pojedinih enzima u oksigenaciji klopidogrela prikazan je na slici 2. *In vitro* studije pokazuju da je za stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela najbitnija aktivnost enzima CYP2C19 (13).



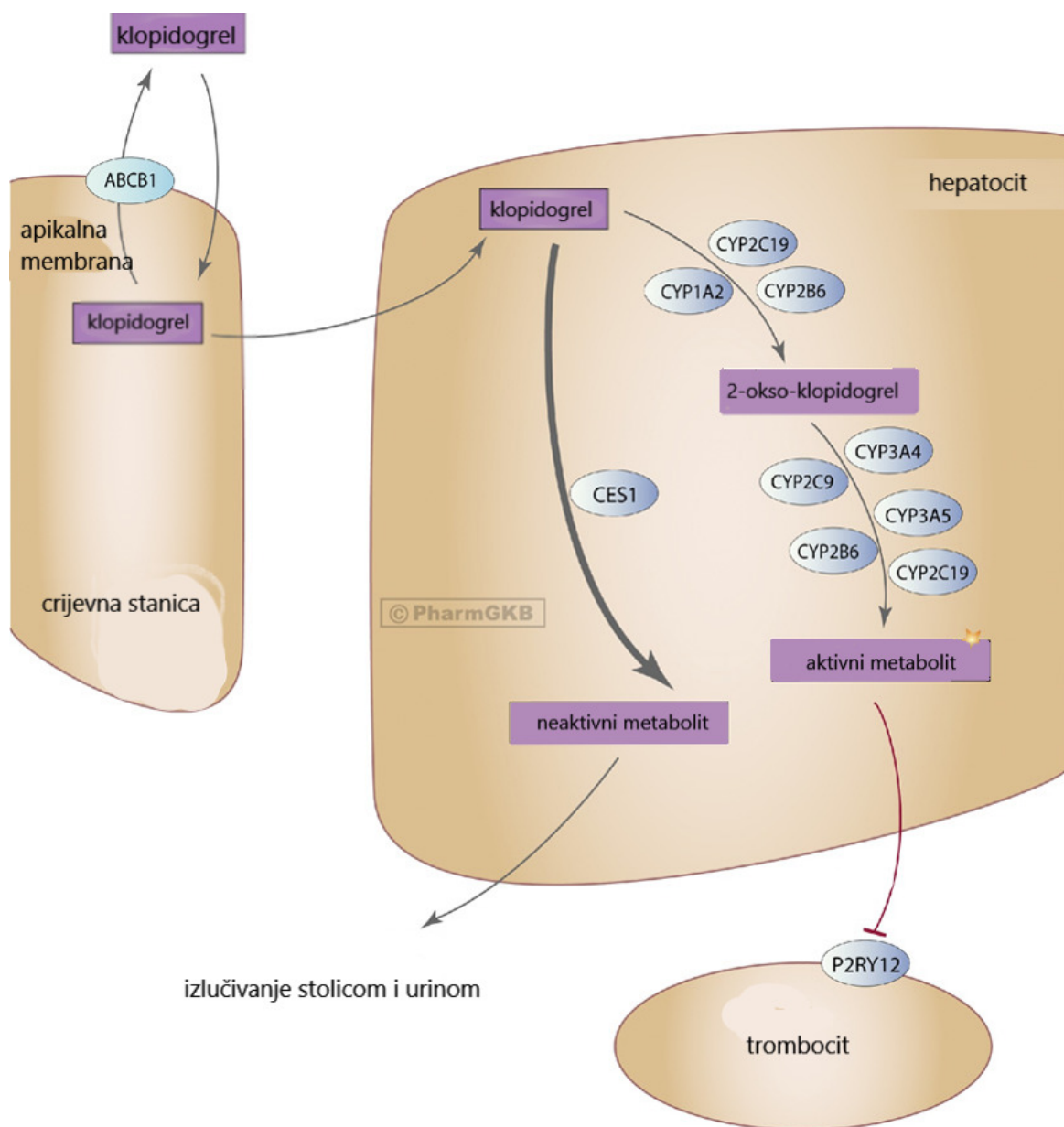
**Slika 2.** Zastupljenost sudjelovanja pojedinih enzima citokroma P450 u oksidaciji i stvaranju aktivnog metabolita klopidogrela. U prvom koraku oksidacije nastaje 2-okso-klopidogrel većinom djelovanjem enzima CYP2C19, dok u drugom koraku oksidacije nastaje aktivni metabolit (13).

#### 1.3.4. ELIMINACIJA

Klopidogrel se podjednako izlučuje urinom (50%) i stolicom (46%). Poluvrijeme eliminacije aktivnog oblika je 8 sati (7). Klopidogrel i njegovi metaboliti supstrati su P-glikoproteina stoga je on uključen u izlučivanje klopidogrela iz stanica jetre u žučne kanaliće i za filtraciju klopidogrela u proksimalnom tubulu bubrega.



**Slika 3.** Apsorpcija i metabolizam klopidogrela. Apsorpciju klopidogrela iz lumena crijeva ograničava P-glikoprotein (P-GP). Nakon apsorpcije, 85% klopidogrela karboksilesteraza 1 (CES1) u jetri pretvara u neaktivni metabolit. Preostalih 15% se metabolizira u 2-okso-klopidogrel prvenstveno putem enzima CYP2C19. 50% 2-okso-klopidogrela enzim CES1 hidrolizira u neaktivni oblik, a preostalih 50% oksidacijom prikazanim enzimima CYP pretvara se u aktivni oblik klopidogrela. Preuzeto i prilagođeno iz Trenk D, Hochholzer W (14).



**Slika 4.** Farmakokinetika i farmakodinamika klopidogrela (15). *ABCB1* – gen za efluksni transporter P-glikoprotein, *CES1* – karboksilesteraza 1, *P2RY<sub>12</sub>* – ADP-receptor na membrani trombocita, *CYP*- enzimi sustava citokroma P450. Preuzeto i prilagođeno s PharmGKB. Dostupno na <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA154424674>

## 1.4 FARMAKOGENETIKA U SUVREMENOJ KLINIČKOJ PRAKSI

Razlika u učinkovitosti farmakoterapije među pojedincima čest je problem u kliničkoj praksi. Na učinkovitost i sigurnost primijenjene terapije utječu različiti čimbenici kao što su dob, spol, težina osnovne bolesti i prisutnost komorbiditeta, ali i razlike pojedinaca u apsorpciji, metabolizmu i izlučivanju određenog lijeka. Ciljno mjesto djelovanja lijeka također se može razlikovati među pojedincima i tako utjecati na farmakodinamiku lijeka. Različite genetičke varijante transportnih sustava, metaboličkih enzima i ciljanih proteinskih struktura djelovanja utječu na uspješnost terapije. Uspješnije metode sekvenciranja genoma i sve veća dostupnost genetičkih testova dovode do nove ere u odabiru terapije. Genetički ustroj pojedinca polako postaje jedan od ključnih faktora u odabiru lijeka i individualizaciji farmakoterapije. Farmakogenetika kao znanstvena disciplina istražuje genetičke različitosti koje utječu na učinkovitost i sigurnost farmakoterapije. Cilj joj je identificirati u populaciji one varijante gena koje dovode do klinički značajnih razlika u odgovoru na terapiju i razvoju nuspojava te pronaći jednostavne metode određivanja farmakogenetičkog profila pojedinca. Na temelju tog profila može se procijeniti odgovor pojedinca na terapiju te uz pomoć smjernica odabrati najsigurnija i najučinkovitija terapija. Predmet istraživanja farmakogenetike većinom su geni koji kodiraju metaboličke enzime aktivacije i deaktivacije lijekova, geni koji kodiraju transportne sustave te geni koji kodiraju receptore - mete djelovanja lijeka. Vidljiv je napredak kako u korištenju saznanja dobivenih farmakogenetičkim istraživanjima u kliničkoj praksi, tako i u objavljivanju jasnih smjernica kako pristupiti liječenju osoba određenog genetičkog profila. Smjernice objavljuju radne skupine i društva, a neke su od smjernica regulatorna tijela uključila u upute o lijeku. Najveće međunarodno društvo posvećeno kliničkoj primjeni farmakogenetike je CPIC (*Clinical Pharmacogenetics*

*Implementation Consortium*) i njegova zadaća je osigurati lako dostupne klinički validirane i ažurirane smjernice o primjeni farmakogenetičkih testova u odabiru terapije (15). Na razini Europske agencije za lijekove (EMA) djeluje Radna skupina za farmakogenomiku (*Pharmacogenomics working party*) koja savjetuje Povjerenstvo za humane lijekove o implementiranju genetičkih testova u upute o lijeku. Tako je prije primjene antivirusnog lijeka abakavira EMA odredila obavezno utvrđivanje odsutnosti određenog alela gena HLA (HLA-B\*5701) zbog opasnosti od razvoja reakcija preosjetljivosti u nositelja (16). Sve više lijekova u svojoj uputi sadrži informacije o mogućim promjenama učinkovitosti i sigurnosti lijeka ovisno o farmakogenetičkom profilu korisnika, a s daljnjim napretkom kliničkih dokaza i dostupnosti genetičkog testiranja određivanje farmakogenetičkog statusa bolesnika postati će standard u odabiru terapije.

#### 1.4.1. POLIMORFIZAM TRANSPORTNIH SUSTAVA

Transportni proteini su membranski sustavi koji kontroliraju ulazak molekula u stanice i izbacivanje molekula iz stanica. Prijenos molekula kroz stanične membrane utječe na apsorpciju, raspodjelu i izlučivanje lijekova stoga će aktivnost transportnih sustava uvelike utjecati na farmakokinetiku lijeka. U prijenosu lijekova kroz membrane najveću ulogu imaju dvije natporodice proteina – prijenosnici ABC (*ATP Binding Cassette*) i prijenosnici SLC (*Solute Carrier*). Transportni sustavi ABC aktivni su prijenosnici, za svoju aktivnost troše energiju u obliku ATP-a i većinom su zaduženi za izbacivanje molekula iz stanice suprotno difuzijskom gradijentu. Porodica gena *SLC* kodira transportere za olakšani prijenos koji za svoju aktivnost ne troše energiju, a osim lijekova prenose i druge supstrate poput neurotransmitora kao što su dopamin i serotonin (17). Natporodica *ABC* sastoji se od 49 različitih gena. Najistraživaniji

i klinički najvažniji transporter iz ove natporodice zadužen za prijenos lijekova je P-glikoprotein. Rasprostranjen je u različitim tkivima, a u najvećoj mjeri na apikalnoj strani crijevnog epitela, žučnim kanalima, tubularnim stanicama bubrega i luminalnoj površini kapilarnih endotelih stanica mozga i testisa. Posebno je izražen u stanicama određenih tumora gdje njegova povećana ekspresija uzrokuje smanjenje učinkovitosti kemoterapeutika. Glavna zadaća P-glikoproteina je zaštita stanica izbacivanjem štetnih ksenobiotika iz stanice. Tako njegovi supstrati mogu biti različite vrste molekule male i velike molekularne mase. P-glikoprotein sudjeluje u transportu citostatika, makrolidnih antibiotika, inhibitora proteaza, statina, inhibitora protonske pumpe, antiepileptika, antidepresiva i mnogih drugih lijekova. Kako je njegova zadaća ograničiti raspodjelu lijekova u tkiva, promjene u ekspresiji i aktivnosti P-glikoproteina utjecat će na apsorpciju lijekova iz crijeva, na izlučivanje lijekova putem žuči ili putem bubrega i na prelazak krvno-moždane barijere. P-glikoprotein tako može biti mjesto klinički značajnih interakcija lijekova koji su supstrati, inhibitori ili induktori ovog transportnog sustava. Povećana ekspresija P-glikoproteina je u 30-40% slučajeva uzrok rezistencije pojedinca na terapiju antiepilepticima, a u liječenju doksorubicinom, paklitakselom i vinkristinom dobar prediktor izostanka odgovora na terapiju. P-glikoprotein je kodiran genom *ABCB1*. Poznate su 62 točkaste mutacije u kodirajućoj regiji gena, a tri najčešće su rs1128503 (1236T > C), rs2032582 (2677T>G/A) i rs1045642 (3435T > C) (18). Dosadašnje studije daju nejasne rezultate o utjecaju pojedinih polimorfizama gena *ABCB1* na ekspresiju P-glikoproteina i učinkovitost lijekova supstrata. Gen *ABCB1* je dobro konzerviran i ne podliježe rekombinaciji te je uočeno da se mutacije na pozicijama 1236, 2677 i 3435 nasljeđuju zajedno kao jedan haplotip istog gena. Prema prisutnim mutacijama na pozicijama 1236, 2677 i 3435 možemo govoriti o dva najčešća haplotipa *ABCB1*. Divlji haplotip gena *ABCB1*\*1 (genotip 1236C-2677G-3435C) najzastupljeniji je među crnom rasom, dok je haplotip *ABCB1*\*2 (genotip

1236T-2677T-3435T) najzastupljeniji među bijelom rasom i Azijatima. Haplotip *ABCB1*\*2 povezan je s promjenom u strukturi P-glikoproteina što ga čini manje aktivnim u prijenosu određenih supstrata kroz membrane stanica u odnosu na haplotip *ABCB1*\*1 (19). Učinak polimorfizma *ABCB1* na farmakokinetiku lijekova prvo je primijećen za digoksin. Nositelji genotipa 3435TT tako imaju veću koncentraciju digoksina u krvi u odnosu na nositelje genotipa 3435CC ili 3435CT, najvjerojatnije zbog smanjene aktivnosti P-glikoproteina na crijevnim epitelnim stanicama (20). S druge strane, očekivani učinak polimorfizama *ABCB1* na farmakokinetiku i farmakodinamiku drugih lijekova supstrata P-glikoproteina (inhibitori proteaze, statini, antidepresivi) nije još potvrđen u kliničkim studijama. Jedan od razloga je što u prijenosu lijekova kroz membrane sudjeluju brojni drugi transporteri, a i sama ekspresija P-glikoproteina podložna je brojnim induktorima i inhibitorima. Polimorfizmi 3435TT i 1236TT tihe su mutacije gena i ne dovode do promjene u aminokiselinskom sastavu proteina. Manje konformacijske promjene do kojih dolazi ne moraju utjecati na mogućnost transporta svih vrsta molekula na jednak način (20).



**Tablica 2.** Frekvencija alela i genotipova ABCB1 (1236C>T, 2677T>G/A, 3435C>T) u etničkim skupinama (18).

Autor	Godina	Etnička skupina	Uzorak	Genotip		
				CGC (ABCB1*1)	TTT (ABCB1*2)	ostali
<b>Afrikanci</b>						
Kim RB	2001	Afrički Amerikanci	23	69,50%	6,50%	24,00%
Krotz DL	2003	Afrički Amerikanci	99	43,60%	8,70%	47,70%
Tang K	2004	Afrički Amerikanci	39	71,96%	6,49%	21,55%
<b>Azijati</b>						
Krotz DL	2003	Azijski Amerikanci	60	21,60%	28,20%	50,20%
Tang K	2002	Kinezi	104	23,16%	38,92%	37,91%
Tang K	2004	Kinezi	48	25,93%	35,05%	39,02%
Xu P	2008	Kinezi	207	16,80%	35,70%	47,50%

<b>Li D</b>	2007	Kinezi (Han)	165	20,10%	33,30%	46,60%
<b>Li D</b>	2007	Kinezi (Kazakh)	108	21,90%	34,50%	43,60%
<b>Li D</b>	2007	Kinezi (Uygur)	161	30,10%	45,30%	24,60%
<b>Yi SY</b>	2004	Koreanci	232	18,60%	32,20%	49,20%
<b>Choi JH</b>	2007	Koreanci	29	20,70%	41,40%	37,90%
<b>Bijelci</b>						
<b>Jeannesson E</b>	2007	Francuzi	222	44,00%	35,30%	20,70%
<b>Kim RB</b>	2001	bijelci	37	43,30%	40,60%	16,10%
<b>Krotz DL</b>	2003	bijelci	100	32,50%	42,00%	25,50%
<b>Potonik U</b>	2008	bijelci	355	45,00%	37,00%	18,00%
<b>Tang K</b>	2004	bijelci	38	37,69%	42,19%	20,12%
<b>Wasilewska A</b>	2007	Poljaci	135	42,80%	41,70%	15,50%
<b>Potonik U</b>	2004	Slovenci	355	40,10%	23,10%	36,80%

#### 1.4.2. POLIMORFIZAM METABOLIČKIH ENZIMA

Nakon apsorpcije, lijekovi se pod utjecaj različiti enzima u organizmu metaboliziraju u spojeve niske toksičnosti i aktivnosti s ciljem što lakšeg izlučivanja. Enzime koji metaboliziraju lijekove možemo podijeliti u enzime faze I (oksidacija) i enzime faze II (konjugacija). Među enzimima faze I najvažniji je sustav citokroma P450 (CYP). Enzimi CYP najčešće kataliziraju reakcije oksidacije djelujući kao monooksigenaze, oksidaze i peroksidaze, a mogu sudjelovati i redukcijskim reakcijama. Enzimi CYP prisutni su u gotovo svim tkivima organizma, a najveću aktivnost pokazuju u jetri, točnije u endoplazmatskoj mrežici hepatocita. Za metabolizam lijekova ključno je nekoliko enzima CYP. Tako se oko 50% lijekova metabolizira putem enzima CYP3A4, 20% putem enzima CYP2D6, 15% putem enzima CYP2C9 i CYP2C19, a ostatak uz pomoć enzima CYP2E1, CYP2A6, CYP1A2. Aktivnost ovih enzima ovisi o brojnim vanjskim čimbenicima (ostali ksenobiotici, okoliš itd.), ali i o mutacijama prisutnim u genima koji ih kodiraju. Tako određeni polimorfizmi gena *CYP* mogu dovesti do gubitka aktivnosti enzima (nul aleli), do smanjenja aktivnosti enzima (inaktivirajući aleli) ili pak dovesti po pojačane aktivnosti enzima (udvostručenje gena). S obzirom na prisutnost određenog alela u genotipu razlikujemo 4 različita fenotipa aktivnosti metaboličkih enzima – spori, intermedijarni, brzi i vrlo brzi metabolizatori. Spori metabolizatori (engl. PM=*poor metabolizer*) nemaju aktivnih alela (homozigoti su za neaktivne alele) i pokazuju jako nisku ili odsutnu aktivnost određenog enzima. Intermedijarni metabolizatori mogu biti homozigoti za alele smanjene aktivnosti ili heterozigoti za neaktivni alel i aktivni alel. Oni pokazuju smanjenu aktivnost enzima u odnosu na divlji tip enzima. Brzi metabolizatori su homozigoti za potpuno aktivne alele i pokazuju

prosječnu aktivnost enzima. Vrlo brzi metabolizatori imaju više od dvije kopije aktivnog gena i pokazuju pojačanu aktivnost enzima (21).

Glavni enzim CYP uključen u metabolizam klopogrela je CYP2C19 (13). Dosada je poznato 35 alela gena *CYP2C19* i 5 različitih fenotipova aktivnosti enzima CYP2C19 (22). Alel *CYP2C19\*1* povezan je s normalnom aktivnosti enzima i najčešći je alel u populaciji. Alel *CYP2C19\*2* je neaktivni alel i dovodi do gubitka aktivnosti enzima. U populaciji istočne Azije njegova učestalost je oko 30%, dok je u populaciji europskih bijelaca i Afrikanaca učestalost malo manja od 15%. Alel *CYP2C19\*17* povezan je s povećanom aktivnosti enzima. *CYP2C19\*17* najzastupljeniji je među bijelcima (21%). Fenotip pojedinca ovisiti će o kombinaciji alela prisutnoj u diplotipu gena *CYP2C19*. U tablici 4 prikazana je učestalost različitih fenotipova aktivnosti enzima CYP2C19 i njihova učestalost među rasama (22). Učestalost različitih fenotipova enzima CYP2C19 u hrvatskoj populaciji prikazana je u tablici 6 (24).

**Tablica 3.** Polimorfizam *CYP2C19*. Prikazani su najzastupljeniji aleli gena *CYP2C19*, utjecaj prisutnosti alela na aktivnost enzima te učestalost alela među bijelcima (Europa i Amerika), Afrikancima i Azijatima (22).

<b>Alel</b>	<b>Funkcionalnost enzima</b>	<b>Udio alela Europljani</b>	<b>Udio alela Afrikanci</b>	<b>Udio alela Azijati</b>
1*	Normalna funkcija	0,624	0,29	0,561
2*	Gubitak funkcije	0,146	0,145	0,29
3*	Gubitak funkcije	0,006	0,007	0,083
17*	Povećana aktivnost	0,213	0,154	0,013

**Tablica 4. Učestalost fenotipa aktivnosti enzima CYP2C19 u različitim etničkim skupinama**(22).

<b>Fenotip</b>	<b>Genotip</b>	<b>Učestalost Europljani</b>	<b>Učestalost Afrikanci</b>	<b>Učestalost Azijati</b>
<b>Vrlo brzi metabolizatori</b>	Homozigoti za alel *17	0,05	0,03	<0,01
<b>Brzi metabolizatori</b>	Heterozigoti za alel 17* i aktivni alel (npr. 1*/17*)	0,28	0,29	0,04
<b>Normalni metabolizatori</b>	Homozigoti za aktivni alel (*1/*1)	0,39	0,33	0,38
<b>Intermedijarni metabolizatori</b>	Heterozigoti za aktivni i neaktivni alel (npr. *1/*2, *1/*3) ili heterozigoti za neaktivni alel i alel *17 (npr. 2*/17*)	0,25	0,30	0,45
<b>Spori metabolizatori</b>	Homozigoti ili miješani heterozigoti za neaktivne alele (npr. *2/*2, *2/*3)	0,03	0,04	0,12

**Tablica 5.** Pretpostavljeni fenotipovi prema mogućim genotipovima CYP2C19 i njihova frekvencija u populaciji (23). PM=spori metabolizatori, IM=intermedijarni metabolizatori, NM=normalni metabolizatori, RM=brzi metabolizatori, UM=vrlo brzi metabolizatori.

Alel	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	17*
1*	NM 35-50%	IM 17-35%	IM 1-11%	IM <1%	IM <1%	IM <1%	IM <1%	IM <1%	RM 3-27%
2*		PM 2-8%	PM 0-5%	PM <1%	PM <1%	PM <1%	PM <1%	PM <1%	IM 1-6%
3*			PM <1%	PM <1%	PM <1%	PM <1%	PM <1%	PM <1%	IM <1%
4*				PM <1%	PM <1%	PM <1%	PM <1%	PM <1%	IM <1%
5*					PM <1%	PM <1%	PM <1%	PM <1%	IM <1%
6*						PM <1%	PM <1%	PM <1%	IM <1%
7*							PM <1%	PM <1%	IM <1%
8*								PM <1%	IM <1%
17*									UM 1-5%

**Tablica 6.** Frekvencija fenotipova enzima CYP2C19 u hrvatskoj populaciji (24).

FENOTIP	GENOTIP	FREKVENCIJA
Vrlo brzi metabolizatori	*17/*17	6,76%
Brzi metabolizatori	*1/*17	30,15%
Normalni metabolizatori	*1/*1	34,46%
Intermedijarni metabolizatori	*1/*2	20,30%
Spori metabolizatori	*2/*2	3,07%

### 1.4.3. POLIMORFIZAM RECEPTORA P2Y<sub>12</sub>

Receptor P2Y<sub>12</sub> na površini trombocita ima ključnu ulogu u aktivaciji i agregaciji trombocita. Uočene su velike interindividualne razlike u odgovoru pojedinaca na *ex vivo* ADP-om induciranu agregaciju trombocita što može, između ostaloga, biti posljedica polimorfizma gena P2Y<sub>12</sub> i različite aktivnosti receptora. Identificirana su dva haplotipa P2Y<sub>12</sub> – H1 i H2. Frekvencija haplotipa H1 među općom populacijom je 86%, a haplotipa H2 14%. Prisutnost haplotipa H2 povezana je s povećanom agregacijom trombocita induciranom ADP-om u odnosu na pojedince nositelje haplotipa H1 (25). Tako nositelji haplotipa H2 mogu imati povećani rizik razvoja aterosklerotskih događaja te imati veći rizik neuspješnosti liječenja antitromboticima koji djeluju preko receptora P2Y<sub>12</sub>. U studiji koja je istraživala vezu haplotipa H2 i razvoja periferne arterijske bolesti uočena je veća učestalost haplotipa H2 u skupini pacijenata koji boluje od periferne arterijske bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu (26).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je provesti detaljan pregled dosadašnjih istraživanja utjecaja genetičkih polimorfizama enzima citokroma P450, transportera P-glikoproteina, receptora P2Y<sub>12</sub> i drugih genetičkih čimbenika na učinkovitost i sigurnost terapije klopidogrelom.

Hipoteza: Terapija klopidogrelom u određenih pacijenata ne dovodi do zadovoljavajuće inhibicije agregacije trombocita. Farmakogenetičko testiranje može poslužiti kao prediktor odgovora na terapiju, pogotovo u pacijenata s povećanim rizikom razvoja trombotičkih događaja (ostali komorbiditeti i farmakoterapija). Određivanje farmakogenetičkog statusa bolesnika pomaže u identificiranju pojedinaca kojima prva terapija izbora neće biti klopidogrel, već novije generacije antitrombotika (tikagrelor ili prasugrel). Ova saznanja omogućiti će ljekarnicima pravilno savjetovanje i individualizaciju terapije klopidogrelom.



### 3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Pretražena je relevantna znanstvena i stručna literatura, publikacije stručnih udruga i institucija (CPIC i PharmGKB), baza lijekova Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Europske agencije za lijekove (EMA), te drugi raspoloživi izvori. Ključne riječi za pretraživanje baza podataka (PubMed, ScienceDirect, Mendeley) uključivale su sljedeće pojmove: klopidogetrel, farmakogenetika, polimorfizam, CYP2C19, ABCB1, P2Y<sub>12</sub>, ITGB3, CES1.

Pregledom literature istražen je utjecaj polimorfizma enzima CYP2C19, transportera P-glikoproteina i receptora P2Y<sub>12</sub> na uspješnost terapije klopidogetrelom, te su saznanja i rezultati prikazani u obliku preglednog rada.

#### 3.1 UTJECAJ POLIMORFIZMA GENA ABCB1 NA TERAPIJU KLOPIDOGETRELOM

P-glikoprotein uključen je prvenstveno u prijenos klopidogetrela iz lumena crijeva u cirkulaciju tako da će pojačana aktivnost ovog transportera utjecati na smanjenje koncentracije klopidogetrela i njegovog aktivnog metabolita u krvi. Provedena su istraživanja utjecaja polimorfizma ABCB1 3435C>T na koncentraciju klopidogetrela u krvi. 60 pacijenata koji su podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji bilo je uključeno u ispitivanje gdje su određivane koncentracija (C<sub>max</sub>) i AUC klopidogetrela i aktivnog metabolita u plazmi nakon udarnih doza od 300 mg, 600 mg i 900 mg klopidogetrela. Utvrđeno je da nositelji genotipa T3435T imaju značajno niže koncentracije klopidogetrela i aktivnog metabolita u plazmi (C<sub>max</sub> i AUC) u odnosu na nositelje genotipa C3435T i C3435C. Ova razlika uočena je nakon udarne doza od 300 mg i od 600 mg, no ne i nakon udarne doze od 900 mg (27). Rezultati utjecaja

polimorfizma gena *ABCB1* na farmakodinamiku klopidogrela razlikuju se među studijama. Mega i suradnici u nastavku TRITON-TIMI 38 studije nalaze razliku u smanjenju agregacije trombocita kod zdravih pojedinaca nositelja genotipa T3435T (za 7,3% manje smanjenje agregacije trombocita posredovane ADP-om) u odnosu na nositelje genotipova C3435C i C3435T. Ova razlika uočena je samo nakon udarnih doza od 300 mg i 600 mg, ali nije uočena nakon primjene doza održavanja od 75 mg (28). Studija iz 2015. godine koja je uključivala 42 pacijenta nakon provedene perkutane koronarne intervencije na terapiji klopidogrelom pokazala je suprotne rezultate. Nositelji genotipa TT imali su značajno niže koncentracije klopidogrela i aktivnog metabolita u plazmi u odnosu na nositelje genotipova CT i CC, no nije uočena korelacija između agregacije trombocita i genotipa *ABCB1* (29). Klinički utjecaj polimorfizma *ABCB1* na ishod liječenja klopidogrelom istražen je u nekoliko velikih studija. Francuska studija (30) uključivala je pacijente s akutnim infarktom miokarda liječenih klopidogrelom i pratila ishod terapije godinu dana (smanjenje rizika smrti, nefatalnog infarkta miokarda i moždanog udara). Pacijenti su genotipizirani, između ostalog, za gen *ABCB1*. Rizik od smrti, nefatalnog infarkta miokarda i moždanog udara bio je veći u pojedinaca nositelja genotipa TT (omjer ugroženosti 1,72 u odnosu na genotip CC) i u nositelja genotipa CT (omjer ugroženosti 1,51 u odnosu na genotip CC). U ovoj studiji nije uočena povezanost polimorfizama *ABCB1* i rizika razvoja kardiovaskularnih incidenata u pacijenata koji su podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji (30).

Na uzorku pacijenata iz TRITON-TIMI 38 studije provedeno je farmakogenetičko ispitivanje utjecaja polimorfizma *ABCB1* na učinkovitost terapije klopidogrelom i prasugrelom. Pacijentima s akutnim koronarnim sindromom i planiranom perkutanom koronarnom intervencijom primijenjena je terapija klopidogrelom (300 mg udarna doza i 75 mg doza održavanja) ili terapija prasugrelom te su praćeni 15 mjeseci. Primarni ishod studije bila je

kardiovaskularna smrt, nefatalni infarkt miokarda i nefatalni moždani udar. Sekundarni ishod bila je tromboza stenta. Homozigoti *ABCB1* T3435T imali su za 72% veći rizik razvoja primarnog ishoda u odnosu na nositelje genotipa CC i CT. Pojedinci nositelji genotipova CT i CC imali su jednak rizik razvoja primarnog ishoda (omjer ugroženosti 0,94 za genotip CT u odnosu na genotip CC). Povećan rizik kardiovaskularne smrti, nefatalnog infarkta miokarda i nefatalnog moždanog udara kod nositelja genotipa TT bio je vidljiv u prvih 30 dana terapije. U tom period nositelji genotipa TT imali su dvostruko veći rizik razvoja primarnog ishoda u odnosu na nositelje CT i CC (omjer ugroženosti 1,96). Nije uočena statistički značajna veza rizika razvoja tromboze stenta i polimorfizma gena *ABCB1*. Incidencija krvarenje bila je jednaka među nositeljima genotipova CT, CC ili TT. Osim polimorfizma C3435T, istražena su druga dva najčešća polimorfizma *ABCB1* - G2677T/A i C1236T. Polimorfizmi G2677T/A i C1236T nisu povezani s povećanim rizikom razvoja kardiovaskularnih komplikacija (28).

U suprotnosti s navedenom studijama, rezultati studije provedene na 1034 pacijenta s ugrađenim stentom koji otpušta lijek pokazali su da je polimorfizam 3435C povezan s većim brojem slučajeva infarkta miokarda, tromboze stenta ili smrti unutar godine dana terapije klopido-grelom, no nije dokazan statistički značajan utjecaj polimorfizma *ABCB1* na ishod terapije. Kada se promatrao zajednički učinak polimorfizama *CYP2C19* i *ABCB1* na uspješnost liječenja, uočeno je da nositelji alela *CYP2C19*\*2 i *ABCB1* 3435C imaju najveći rizik neželjenog ishoda (31).

Na temelju dosadašnjih istraživanja, polimorfizam C3435T je jedini polimorfizam gena *ABCB1* koji utječe na farmakokinetiku klopido-grela, ali potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se utvrdio klinički značaj i utjecaj na uspješnost liječenja klopido-grelom.

### 3.2 UTJECAJ POLIMORFIZMA ENZIMA CYP450 NA TERAPIJU KLOPIDOGRELOM

U bioaktivaciju klopidogrela uključeno je nekoliko enzima CYP (CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2, CYP2B6). Polimorfizmi koji dovode do smanjenja aktivnosti ovih enzima imati će za posljedicu smanjenu pretvorbu lijeka u aktivni oblik i slabiji farmakodinamički učinak klopidogrela. Polimorfizmi koji dovode do povećanja aktivnosti metaboličkih enzima mogu rezultirati povećanim rizikom nuspojava klopidogrela, prvenstveno krvarenja. Studije pokazuju da među nabrojenim enzimima CYP samo polimorfizmi gena *CYP2C19* imaju značajan utjecaj na farmakokinetiku i farmakodinamiku klopidogrela te ishod liječenja (11). Nositelji barem jednog neaktivnog alela *CYP2C19* (npr. alel 2\* ili 3\*) imali su za 32% niže koncentracije aktivnog metabolita klopidogrela u plazmi u odnosu na pojedince homozigote za funkcionalne alele. Također, učinak klopidogrela na smanjenje agregacije trombocita bio je manji u skupini pojedinaca nositelja barem jednog neaktivnog alela (za 25% manja inhibicija agregacije trombocita inducirane ADP-om) (32). Utjecaj polimorfizama na koncentraciju klopidogrela u plazmi i postignuto smanjenje agregacije trombocita bio je različit ovisno o fenotipu pojedinca. Tako su brzi i vrlo brzi metabolizatori (genotip 1\*/17\* ili 17\*/17\*) imali najviše koncentracije aktivnog metabolita u plazmi i najveće smanjenje agregacije trombocita nakon udarnih doza i doza održavanja, dok su spori metabolizatori (genotip 2\*/2\*) imali najniže koncentracije i najmanje smanjenje agregacije trombocita nakon primjene klopidogrela (33). Utjecaj neaktivnih alela na farmakokinetiku i farmakodinamiku klopidogrela bio je jednak nakon udarnih doza od 300 mg i 600 mg. Ispitivanje provedeno među bijelom populacijom u skladu je s ispitivanjima provedenim među populacijom u Aziji. Alel *CYP2C19*\*2 najzastupljeniji je neaktivni alel među bijelcima (15% populacije), dok je među Azijatima, osim alela \*2 (30% populacije) zastupljen i neaktivni alel *CYP2C19*\*3 (8% populacije). U ispitivanju

provedenom u Aziji, pacijenti s akutnim koronarnim sindromom s ili bez elevacije ST-segmenta genotipizirani su za *CYP2C19* te im je određen stupanj agregacije trombocita 3 ili 5 dana nakon udarne doze od 600 mg klopidogrela i doze održavanja od 75 mg. Krajnja točka ispitivanja bilo je određivanje visoke reaktivnosti trombocita nakon terapije koja se definira kao smanjenje maksimalne agregacije trombocita inducirane ADP-om za manje od 50%. Visoka reaktivnost trombocita bila je češća među heterozigotima nositeljima jednog aktivnog i jednog neaktivnog alela (46% u odnosu na 28% u homozigota za divlji tipa alela), a još češća u homozigota za neaktivne alele (60% u odnosu na 28% u homozigota za divlji tipa alela) (34). Osim neaktivnih alela, u populaciji su prisutni i aleli koji zbog povećane ekspresije gena pojačavaju aktivnost enzima *CYP2C19*. Sibbing i suradnici istražili su utjecaj alela *CYP2C19\*17* na ishod terapije klopidogrelom nakon perkutane koronarne intervencije. Uključivala je 1524 pacijenta koji su praćeni 30 dana na pojavu TIMI velikog i malog krvarenja ili tromboze stenta. Pacijenti su na temelju genotipa podijeljeni u 3 skupine – homozigoti za divlji tip gena, homozigoti za alel \*17 i heterozigoti za divlji tip i alel \*17. Očekivano najnižu agregaciju trombocita induciranu ADP-om imali su upravo nositelji dva alela *CYP2C19\*17* dok su najvišu imali nositelji dva divlja alela. Sukladno tome, incidencija TIMI krvarenja bila je najveća kod homozigota za alel \*17, nešto manja kod heterozigota za divlji tip i alel \*17 i najmanja kod homozigota za divlji alel. Učestalost TIMI krvarenja u homozigota za alel \*17 bila je gotovo 4 puta veća u odnosu na homozigote za divlji tip alela (omjer rizika 3,41) u prvih 30 dana terapije. Među praćenim pacijentima registrirana su dva fatalna TIMI krvarenja, a u oba slučaja pacijenti su bili nositelji alela \*17 – jedan heterozigot i jedan homozigot. U studiji nije nađena razlika u incidenciji tromboze stenta, infarkta miokarda i smrti među nositeljima i nenositeljima alela \*17 (33). To nije slučaj ako govorimo o polimorfizmima koji smanjuju aktivnost enzima *CYP2C19*. Više studija pokazalo je da je učinkovitosti klopidogrela u prevenciji aterotrombotičkih događaja u

nositelja neaktivnih alela *CYP2C19* manja u odnosu na nositelje divljih alela. Tako je utvrđeno da homozigoti za neaktivne alele imaju veći rizik kardiovaskularne smrti, infarkta miokarda i moždanog udara unutar godinu dana terapije klopidogetrelom nakon akutnog infarkta miokarda. Taj rizik povećava se dodatno u pacijenata koji su podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji. Studija koja je pratila pacijente s akutnim infarktnom miokarda pokazala je jednak rizik kardiovaskularne smrti, infarkta miokarda i moždanog udara za homozigote divljeg alela i heterozigote za jedan neaktivni alel, dok je u homozigota za neaktivni alel taj rizik bio 2 puta veći (30). Farmakogenetičko ispitivanje provedeno na uzorku pacijenata iz TRITON-TIMI 38 studije pokazalo je pak da su i heterozigoti za divlji i neaktivni alel u većem riziku razvoja trombotičkih komplikacija nakon infarkta miokarda (smrt, infarkt miokarda, moždani udar, tromboza stenta) u odnosu na nenasitelje neaktivnih alela (32). U skladu s time, studija na pacijentima podvrgnutim perkutanoj koronarnoj intervenciji i ugradnji stenta pokazala je da je incidencija tromboze stenta 3,8 puta veća u nositelja neaktivnog alela (1\*/2\* ili \*2/\*2) u odnosu na nositelje divljeg alela (\*1/\*1) u prvih 30 dana terapije (35).

Collet i suradnici su u svojoj studiji pokazali da je polimorfizam *CYP2C19* glavni nezavisni prediktor uspješnosti terapije klopidogetrelom u mlađih pacijenata (<45 godina) s preboljelim infarktom miokarda (36). Nositelji alela *CYP2C19*\*2 imali su 5 puta veći rizik smrti, ponovnog infarkta miokarda i hitne revaskularizacije u odnosu na nenasitelje alela \*2. Grupe pacijenata nositelja i nenasitelja neaktivnog alela nisu se razlikovale u ostalim rizičnim faktorima kao što su vrsta infarkta, korištena farmakoterapija, indeks tjelesne mase, obiteljska anamneza, pušenje i biološki markeri (D-dimer, LDL-kolesterol, fibrinogen itd.). Učinak polimorfizma *CYP2C19* na ishod liječenja primijećen je neovisno o tome je li klopidogetrel uveden u terapiju zbog inicijalnog infarkta miokarda ili kasnije zbog ugovorene revaskularizacije.

Većina studija koje su pratile utjecaj polimorfizma *CYP2C19* na klinički ishod liječenja klopidogrelom uključivale su pacijente s akutnim koronarnim sindromom. Utjecaj na klinički ishod drugih indikacija liječenja klopidogrelom ispitan je u mnogo manjem broju studija i na manjem broju bolesnika. Povezanost genotipa *CYP2C19* i rizika novog cerebrovaskularnog incidenta ispitana je u skupini od 2900 Kineza. U studiju su uključeni pacijenti s blažim ishemijskim moždanim udarom i tranzitornom ishemijskom atakom. Jedna skupina pacijenata dobivala je kombinaciju klopidogrela i ASK, a druga skupina samo ASK. Praćeni su 90 dana, a kao primarni ishod pratila se incidencija novog moždang udara i kao sekundarni ishod incidencija moždanog udara, infarkta miokarda ili vaskularne smrt. Obje skupine genotipizirane su za alele \*2, \*3 i \*17 gena *CYP2C19*. Nositelji alela \*2 i \*3 imali su jednak rizik primarnog i sekundarnog ishoda u jednoj i drugoj skupini pacijenata. Nenositelji alela \*2 i \*3 u skupini na terapiji klopidogrelom i ASK-om imali su dvostruko manji rizik primarnog i sekundarnog ishoda u odnosu na nenositelje u skupini pacijenata samo na terapiji ASK (37).

Dostupne studije potvrdile su utjecaj genotipa *CYP2C19* na koncentraciju aktivnog metabolita klopidogrela u plazmi i razinu postignutog smanjenja agregacije trombocita. Učinak polimorfizma *CYP2C19* na ishod liječenja najizraženiji je u pacijenata s akutnim koronarnim sindromom, pogotovo u onih koji su podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji.

### 3.3 UTJECAJ POLIMORFIZMA RECEPTORA P2Y<sub>12</sub> NA TERAPIJU KLOPIDOGRELOM

Haplotip H2 gena *P2Y12* povezan je s pojačanom ekspresijom receptora P2Y<sub>12</sub> i mogućim povećanim rizikom periferne arterijske bolesti i koronarne bolesti srca (25, 38). Studije pokazuju oprečne rezultate utjecaja haplotipa H2 na učinkovitost klopidozrela u smanjivanju agregacije trombocita. Pronađena je veza haplotipa H2 i povećane agregacije trombocita na terapiji klopidozrelom u zdravih pojedinaca i pacijenata s akutnim koronarnim sindromom na terapiji klopidozrelom i ASK-om u nekim studijama (39), dok druge nisu detektirale razliku u agregaciji trombocita u nositelja različitih haplotipova gena *P2Y12* na terapiji klopidozrelom (40). Farmakogenetičke studije provedene na većem broju ispitanika nisu identificirale polimorfizam receptora P2Y<sub>12</sub> kao faktor rizika za smanjenje učinkovitosti klopidozrela nakon akutnog infarkta miokarda u prevenciji kardiovaskularne smrti, infarkta miokarda i moždanog udara (30). Novija studija provedena na 453 pacijenta s akutnih koronarnim sindromom i provedenom perkutanom koronarnom intervencijom pokazala je utjecaj dva polimorfizma gena *P2Y12* na rezistenciju na klopidozrel i rizik kardiovaskularnih incidenata unutar godine dana terapije. Nositelji polimorfizma C34T i G52T gena *P2Y12* imali su značajno slabiji odgovor na terapiju klopidozrelom i veći rizik smrti, razvoja infarkta miokarda, tromboze stenta i hitne revaskularizacije (41). Dodatna istraživanja su potrebna kako bih se utvrdila točna uloga polimorfizma *P2Y12* u rezistenciji na klopidozrel, no zasigurno u kombinaciji s ostalim polimorfizmima koji utječu na metabolizam i apsorpciju klopidozrela može imati utjecaj na uspješnost terapije.



### 3.4 UTJECAJ OSTALIH GENETIČKIH ČIMBENIKA NA TERAPIJU KLOPIDOGRELOM

Agregacija trombocita visoko je varijabilna među pojedincima i ovisit će o polimorfizmima koji utječu na aktivnost receptora uključenih u aktivaciju trombocita. Genetički status odredit će brzinu i način na koji pojedinac fiziološki reagira na aktivaciju i inhibiciju trombocita. Stoga na učinkovitost liječenja klopidogrelom ne moraju utjecati samo oni receptori i enzimi direktno uključenu u njegovu farmakokinetiku i farmakodinamiku. Motovska i suradnici istražili su utjecaj polimorfizama 8 gena koji kodiraju receptore i enzime uključene u agregaciju trombocita (GPIa, GPVI, GPIIIa, PAR-1, P2Y12, COX-1, faktor V i faktor II) na postignuto smanjenje agregacije nakon jednokratne doze od 600 mg klopidogrela. Agregacija trombocita prije administracije lijeka nije se razlikovala među nositeljima različitih polimorfizama proučavanih gena. 28 sati nakon primjene klopidogrela nositelji polimorfizma PIA2 gena *ITGB3* za receptor GPIIIa imali su značajno manje smanjenje agregacije trombocita i veću incidenciju rezistencije na klopidogrel nego homozigoti za polimorfizam PIA1 (42, 43). Polimorfizam PIA2 povezan je također s većom incidencijom tromboze stenta nakon perkutane koronarne intervencije, međutim nije utvrđeno je li uzrok slabiji učinak klopidogrela ili učinak polimorfizma na aktivirane trombocite.

Najveći dio apsorbiranog klopidogrela deaktivira se djelovanjem karboksietilesteraze 1 (CES1). Povećana aktivnost CES1 koja može biti posljedica polimorfizma gena *CES1*, dovest će do brže razgradnje klopidogrela i smanjene pretvorbe u aktivni oblik. Proučavani su polimorfizmi *CES1* (*CES1A2* A(-816)C i *CES1* rs2307240,C>T) i njihov utjecaj na učinkovitost klopidogrela u nekoliko manjih studija. Polimorfizam *CES1A2* A(-816)G u pacijenata s koronarnom bolesti srca na terapiji klopidogrelom bio je povezan s povećanom agregacijom trombocita nositelja ove mutacije, no nije uočen utjecaj na rizik tromboze stenta (44). Homozigoti za mutaciju *CES1*

rs2307240,C>T (genotip CC) imali su značajno veći rizik razvoja infarkta miokarda, moždanog udara i nestabilne angine pectoris u odnosu na nositelje genotipa CT i TT (45). Identificirani su i polimorfizmi gena *CES1* koji dovode do smanjenja ili potpunog gubitka mogućnosti enzima *CES1* da hidroksilira klopidogrel. Primjer je SNP polimorfizam G143E koji dovodi do promjene aminokiselinskog sastava katalitičkog mjesta *CES1* (zamjena glicina glutaminskom kiselinom na poziciji 143). Zdravi nositelji mutacije 143E imali su više koncentracije aktivnog metabolita te manju agregaciju trombocita induciranu ADP-om nakon uzimanja 300 mg klopidogrela i doze održavanje od 75 mg u odnosu na nositelje divljeg tipa gena 143G (46). Da li učinak polimorfizma G143E na metabolizam klopidogrela utječe i na smanjenje trombotičkih incidenata u kardiovaskularnih pacijenata ili na povećanje rizika krvarenja nije još potvrđeno na dovoljno velikom uzorku pacijenata. Iako istraživanja pokazuju da bi polimorfizam *CES1* također mogao utjecati na odgovor na terapiju klopidogrelom, potrebna su dodatna ispitivanja u ovom području.

### 3.5 SMJERNICE REGULATORNIH TIJELA I STRUČNIH DRUŠTAVA O PRIMJENI FARMAKOGENETIČKOG TESTIRANJA U LIJEČENJU KLOPIDOGRELOM

Na temelju dostupnih dokaza o utjecaju različitih fenotipova enzima CYP2C19 na uspješnost terapije klopidogrelom regulatorna tijela zadužena za sigurnost primjene lijekova uključila su informacije o farmakogenetici klopidogrela u Sažetak opisa svojstava lijeka. Regulatorna tijela ne preporučuju genetičko testiranje *CYP2C19* prije primjene klopidogrela, ali navode promjene u efikasnosti lijeka u sporih metabolizatora.

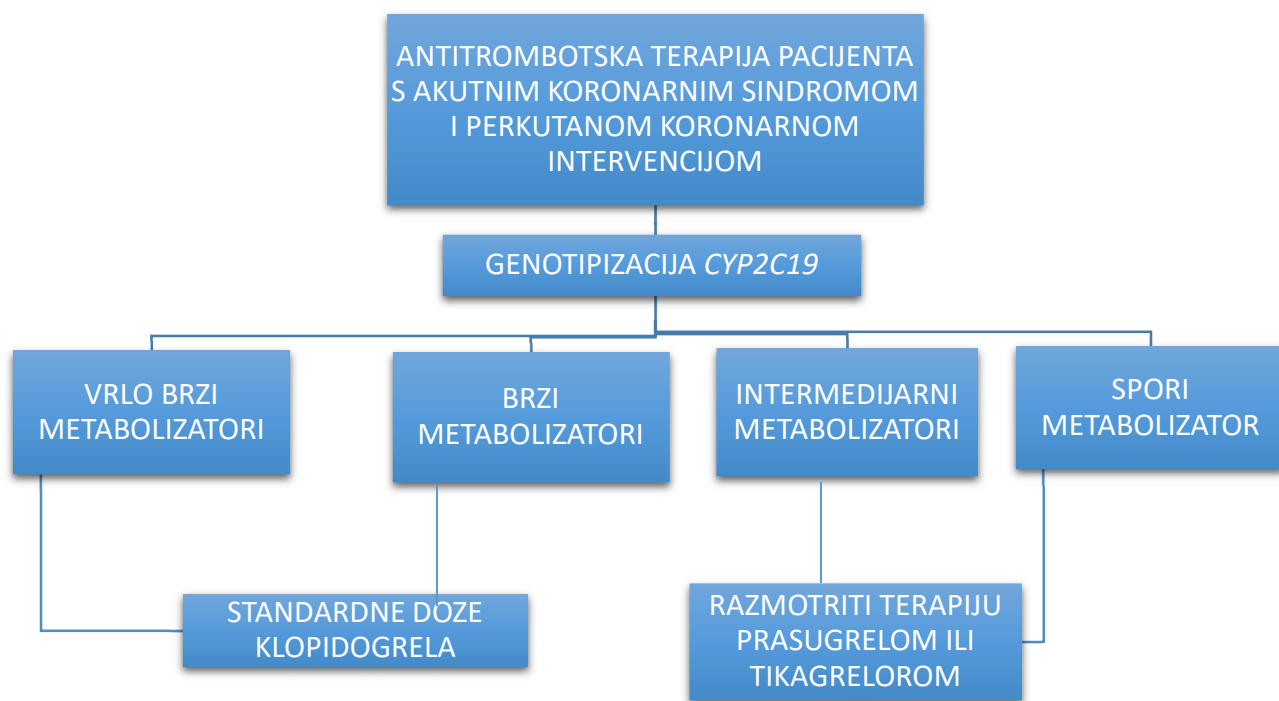
Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration-FDA*) podatke o smanjenom učinku klopidogrela u sporih metabolizatora putem enzima CYP2C19 uključila je u sažetak svojstava klopidogrela kao *black box warning*. *Black box warning* je način prikazivanja upozorenja o posebno bitnim svojstvima lijeka koja mogu značajno utjecati na sigurnost korisnika i predstavlja najviši stupanj upozorenja koji FDA može izdati. Tako se u sažetku svojstava klopidogrela odobrenim za američko tržište navodi da klopidogrel u preporučenim dozama ima manji učinak na smanjenje agregacije trombocita u pacijenata koji su homozigoti za neaktivne alele gena *CYP2C19* tj. sporih metabolizatora putem enzima CYP2C19. FDA ne zahtjeva niti ne preporuča genetičko testiranje prije primjene klopidogrela, no navodi da su takvi testovi dostupni. Preporučuje razmatranje upotrebe druge antiagregacijske terapije (prasugrel ili tikagrelor) u sporih metabolizatora putem enzima CYP2C19 (47).

Europska agencija za lijekove i medicinske proizvode (EMA) u odobrenom sažetku svojstava klopidogrela navodi informacije o farmakogenetici u poglavlju Posebna upozorenja i mjere opreza. Za razliku od FDA, EMA navodi da klopidogrel u sporih metabolizatora putem enzima

CYP2C19 ima manji učinak na funkciju trombocita, ali ne preporučuje razmatranje promjene terapije niti potrebu genetičkog testiranja prije primjene lijeka (7).

CPIC (*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) izdao je 2013. godine posljednje smjernice za primjenu genetičkih ispitivanja kod primjene klopidogrela. U njima navodi da određivanje genetičke varijante *CYP2C19* neće imati klinički značaj za sve pacijente na terapiji klopidogrelom, već samo za pacijente s akutnim koronarnim sindromom (AKS) koji su podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji. U ovih pacijenata informacije dobivene genetičkim testovima mogu biti korisne za individualizaciju terapije i uspješnost liječenja. Za intermedijarne i spore metabolizatore putem enzima *CYP2C19* i planiranom perkutanom koronarnom intervencijom CPIC preporuča primjenu antitrombotika novije generacije (prasugrel i tikagrelor), ako ne postoje kontraindikacije za primjenu istog. Za vrlo brze i brze metabolizatore preporuča standardne propisane doze klopidogrela. Algoritam preporučenog djelovanja prikazan je na slici 5. Genotipizacija *CYP2C19* ne preporučuje se svim pacijentima prije primjene klopidogrela, ali može pomoći kliničarima u odabiru terapije za rizične skupine pacijenata (23).

DPWG (*Dutch Pharmacogenetics Working Group*) radna je skupina unutar *Royal Dutch Pharmacists Association* koja izdaje smjernice i upute o primjeni farmakogenetičkih informacija u kliničkoj praksi. DPWG također upozorava na smanjeni učinak klopidogrela na agregaciju trombocita u sporih i intermedijarnih metabolizatora putem enzima *CYP2C19* i preporučuje primjenu prasugrela u ovih pacijenata neovisno o indikaciji za terapiju klopidogrelom. Za vrlo brze metabolizatore putem enzima *CYP2C19* ove smjernice ne preporučuju promjenu terapije niti promjenu doze klopidogrela (48).



**Slika 5.** Smjernice CPIC-a za primjenu antitrombotske terapije prema fenotipu enzima CYP2C19 (23). Odluku o potrebi genotipizacije donosi kliničar nakon razmatranja svih rizičkih čimbenika uspješnosti terapije klopidogetrom.

## 4. RASPRAVA

Ishemijska bolest srca i cerebrovaskularne bolesti najčešći su uzroci smrti u Republici Hrvatskoj i razvijenom svijetu. Nakon prevencije aterosklerotskih promjena koje dovode do ovih oboljenja, najvažnija farmakološka zadaća u liječenju kardiovaskularnih bolesti je prevencija nastanka novog trombotičkog incidenta. Klopidogrel uz ASK osnova je liječenja akutnog infarkta miokarda i ishemijskog moždanog udara te smanjenja stope smrtnosti oboljelih. Klopidogrel u 3-40% pojedinaca ne ostvaruje očekivani farmakološki učinak na smanjenje agregacije trombocita što ostavlja pacijenta u većem riziku smrtnog ishoda (2). Uzrok lošijeg odgovora na terapiju djelomično leži u genetičkom ustrojstvu pojedinca. Dosadašnja istraživanja pokazuju da polimorfizam *CYP2C19* značajno utječe na djelovanje klopidogrela i ishod liječenja. Stupanj aktivacije klopidogrela ovisi o kombinaciji alela *CYP2C19*. Nositelji neaktivnih alela *CYP2C19* (\*2 i \*3) imaju za 32% nižu koncentraciju aktivnog metabolita u plazmi i za 25% manji odgovor na smanjenje agregacije trombocita u odnosu na homozigote za aktivni alel (49). Nositelji alela *CYP2C19*\*17 pak imaju veću koncentraciju aktivnog metabolita i manju agregaciju trombocita u odnosu na nositelje divljeg tipa alela (33). Meta analize pokazuju da heterozigoti i homozigoti neaktivnih alela imaju dvostruko veći rizik kardiovaskularnog incidenta nakon akutnog koronarnog incidenta s provedenom perkutanom koronarnom intervencijom (PCI) i tri puta veći rizik tromboze stenta (23). Ovi rezultati ograničeni su samo na pacijente s akutnim koronarnim sindromom s PCI, no oni čine većinu populacije liječene klopidogrelom. Utjecaj polimorfizma *CYP2C19* na farmakokinetiku klopidogrela jasno je dokazan u mnogim studijama, stoga iako nema većih kliničkih studija na pacijentima liječenim klopidogrelom zbog ishemijskog moždanog udara ili periferne arterijske bolesti možemo pretpostaviti da su spori i intermedijarni metabolizatori putem enzima

CYP2C19 i kod ovih indikacija u većem riziku neuspješnog liječenja klopidogetrelom. CPIC ne preporuča promjenu lijeka ili doze klopidogetrela u pacijenata koji su vrlo brzi metabolizatori putem enzima CYP2C19. Sibbing i suradnici su pokazali da homozigoti za alel *CYP2C19\*17* imaju tri puta veću incidenciju krvarenja u prvih 30 dana terapije klopidogetrelom nakon ugradnje stenta koji izlučuje lijek u odnosu na nositelje divljeg genotipa. Većina ostalih studija nije našla jasnu povezanost alela \*17 i povećanog rizika krvarenja, najvjerojatnije zbog niske frekvencije ovog alela u ispitivanoj populaciji i male incidencije krvarenja. Iako ne postoje smjernice za postupanje u nositelja alela *CYP2C19\*17*, prilikom odabira najsigurnije terapije treba uključiti povećan rizik krvarenja u ovih pojedinaca, pogotovo ako se radi o pacijentima starije životne dobi i onima koji koriste dodatnu antiagregacijsku ili antikoagulantnu terapiju.

Studije utjecaja polimorfizma gena *ABCB1* na ishod liječenja klopidogetrelom pokazale su oprječne rezultate. Meta analize pokazuje da nositelji alela 3435T s koronarnom bolesti srca imaju veći rizik ranih i kasnih velikih neželjenih kardioloških događaja (MACE) ako su liječeni udarnom dozom od 300 mg klopidogetrela. Većina pacijenata iz analiziranih studija bila je podvrgnuta perkutanoj koronarnoj intervenciji (50). Iako je 300 mg preporučena udarna doza za liječenje akutnog koronarnog sindroma, prema smjericama Hrvatskog kardiološkog društva za liječenje akutnog infarkta miokarda koristi se udarna doza od 600 mg klopidogetrela (51). U slučaju udarne doze od 600 mg nije dokazan značajan utjecaj polimorfizma *ABCB1* na ishod liječenja (50). Prema dosad dostupnim dokazima, polimorfizam gena *ABCB1* nije se pokazao kao značajan nezavisni prediktor uspjeha terapije, ali svakako doprinosi varijabilnosti odgovora na klopidogetrel. Studije potvrđuju da nositelji dva neaktivna alela *CYP2C19* i jednog alela 3435T (CT ili TT) *ABCB1*, imaju najveći rizik kardiovaskularnih incidenata nakon akutnog infarkta miokarda, čak 5 puta veći u odnosu na homozigote za divlje alele ovih gena (30).

Kako ove informacije i saznanja mogu pomoći hrvatskom pacijentu? Prema statističkim podacima Zavoda za javno zdravstvo značajan udio populacije ima visoki rizik razvoja kardiovaskularnih bolesti, a stopa smrtnosti zbog akutnog infarkta miokarda i dalje je vrlo visoka. Većina kardiovaskularnih pacijenata ima povećanu tjelesnu težinu, starija je od 65 godina, boluje od šećerne bolesti te uzima kroničnu terapiju koja često uključuje inhibitore protonske pumpe. Sve nabrojeno čimbenici su koji utječu na smanjenje učinkovitosti klopidozola i stavljaju pacijenta u veći rizik novog kardiovaskularnog incidenta (11). Uzmemo li u obzir i činjenicu da je 23% hrvatske populacije nositelj barem jednog neaktivnog alela *CYP2C19* dolazimo do zaključka da bi gotovo četvrtina pacijenata s akutnim infarktom miokarda primila učinkovitiju terapiju ako bi u trenutku propisivanja bio poznat njihov genotip/fenotip *CYP2C19*. Incidencija novog trombotičkog događaja i tromboze stenta najveća je unutar 30 dana od akutnog infarkta miokarda (28), stoga individualizirani odabir antiagregacijske terapije ima najveći utjecaj na ishod liječenja ako se provodi od samog početka terapije. Vrijeme potrebno za genetičku analizu ograničava uporabu farmakogenetičkog savjetovanja u akutnim stanjima poput infarkta miokarda ili moždanog udara. U tim slučajevima preventivno određivanje farmakogenetičkog profila pojedinaca s visokim kardiovaskularnim rizikom bi moglo omogućiti odabir najučinkovitije dostupne terapije u trenutku kada je to potrebno. Retrospektiva studija pokazala je da je 29% ispitanih pacijenata s dogovorenim angiografijom bilo kandidat za usklađivanje propisane terapije prema dostupnim farmakogenetičkim smjernicama (52). Nedostatak kliničkih studija o utjecaju korištenja farmakogenetičkih smjernica na liječenje akutnog infarkta miokarda predstavlja zapreku široj primjeni genetičkog testiranja prilikom propisivanja klopidozola. Europski projekt *Ubiquitous Pharmacogenomics* započet 2017. godine ima za cilj ispitati kako preventivno određivanje farmakogenetičkog statusa i korištenje dostupnih smjernica CPIC-a i



DWPG-a utječe na ishod i troškove terapije. U projekt je uključeno 7 europskih zemalja i 8000 pacijenata, a među ispitivanim lijekovima je i klopidogrel. Rezultati ovog projekta pokazati će koliko farmakogenetički vođene antitrombotske terapije mogu poboljšati klinički ishod i kvalitetu života pacijenata. Za uspješnu implementaciju farmakogenetike u kliničku praksu najbitnije je podići znanje liječnika i farmaceuta o mogućnostima iskorištavanja informacija dobivenih genetičkim testiranjem. Proširivanjem istraživanja u budućnosti očekujemo još više klinički validiranih smjernica za odabir terapije na temelju genetike pojedinca. Određivanje farmakogenetičkog statusa bolesnika pretraga je koja se provodi samo jednom uz sve nižu cijenu, a dobivene informacije mogu omogućiti pacijentu doživotnu optimizaciju svake farmakoterapije koja mu je propisana. Farmaceuti su i dalje najdostupniji zdravstveni radnici. U većini zdravstvenih sustava upravo su oni zaduženi za sigurno provođenje i optimizaciju kronične terapije. Uloga ljekarnika u implementaciji saznanja o farmakogenetici klopidogrela nije zanemariva. Među pacijentima koji prvi puta uzimaju klopidogrel nakon otpusta iz bolnice mogu prepoznati one koji, zbog ostalih faktora rizika neuspješnosti terapije kao što su šećerna bolest, životna dob, muški spol ili terapija inhibitorima enzima CYP2C19, mogu imati najveću korist od farmakogenetičkog savjetovanja i poznavanja svog metaboličkog profila aktivnosti enzima CYP2C19. Alternativna terapija klopidogrelu dostupna hrvatskim pacijentima je tikagrelor (54). Iako je tikagrelor pokazao superiornost nad klopidogrelom u prevenciji kardiovaskularnih incidenata kod akutnog koronarnog sindroma, uporaba tikagrelora u Hrvatskoj je znatno manja u odnosu na klopidogrel (55). Viša cijena liječenja tikagrelorom jedan je od mogućih uzroka slabe uporabe tikagrelora. Identifikacijom onih pacijenata koji će imati najveću korist zamjene klopidogrela tikagrelorom, a to su spori ili intermedijarni metabolizatori putem enzima CYP2C19, omogućili smo najučinkovitiju terapiju za sve pacijente uz minimalne troškove za zdravstveni sustav.

## 5. ZAKLJUČAK

Klopidogrel je ireverzibilni inhibitor agregacije trombocita koji se koristi za sprječavanje trombotičkih događaja nakon akutnog infarkta miokarda, ishemijskog moždanog udara i kod bolesti perifernih arterija. Razina odgovora na terapiju klopidogrelom razlikuje se među pojedincima što utječe i na ishod terapije. Uzroci varijabilnosti odgovora leže u genetičkom ustrojstvu pacijenta. Polimorfizam gena *CYP2C19* pokazao se kao glavni genetički prediktor razine odgovora na klopidogrel. Intermedijarni i spori metabolizatori putem metaboličkog enzima *CYP2C19* imaju dvostruko veći rizik kardiovaskularnog incidenta nakon akutnog koronarnog incidenta s provedenom perkutanom koronarnom intervencijom i tri puta veći rizik tromboze stenta. Polimorfizmi gena *ABCB1* i *P2Y<sub>12</sub>* nisu se pokazali kao nezavisni prediktori odgovora na klopidogrel, ali doprinose varijabilnosti odgovora na liječenje. Nositelji dva neaktivna alela *CYP2C19* i jednog polimorfizma 3435T (CT ili TT) *ABCB1* imaju najveći rizik kardiovaskularnih incidenata nakon akutnog infarkta miokarda čak 5 puta veći od nositelja divljih alela ovih gena. Uzimajući u obzir zastupljenost neaktivnog alela *CYP2C19*\*2 u hrvatskoj populaciji (oko 23%) i zastupljenost polimorfizma 3435TT gena *ABCB1* među bijelcima (35-40%) možemo zaključiti da farmakogenetičko savjetovanje prilikom odabira antitrombotičke terapije može imati značajan utjecaj na poboljšanje ishoda liječenja. Veliki potencijal za implementaciju farmakogenetičkog savjetovanja u kliničku praksu leži i u javnom ljekarništvu. Ljekarnik kroz svakodnevni kontakt s kardiovaskularnim bolesnicima može iskoristiti dostupna saznanja o utjecaju fenotipa enzima *CYP2C19* na ishod liječenja klopidogrelom i poboljšati kvalitetu života pacijenata uz minimalni trošak za zdravstveni sustav.

## 6. LITERATURA

1. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2016. godini. *Dostupno na [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/08/Bilten\\_\\_Umrli-\\_2016-3.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/08/Bilten__Umrli-_2016-3.pdf). Pristupljeno: 21.05.2018.*
2. Oqueli E, Hiscock M, Dick R. Clopidogrel Resistance. *Heart, Lung and Circulation* 2007;16: 17-28
3. Freedman JE. Molecular Regulation of Platelet-Dependent Thrombosis. *Circulation* 2005; 112: 2725-2734.
4. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2003;1:1602–12.
5. Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J. Clin. Invest* 2004;113:340–345
6. Geiger J, Brich J, Hönig-Liedl P i sur. Specific Impairment of Human Platelet P2Y ADP Receptor–Mediated Signaling by the Antiplatelet Drug Clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2007-11
7. European Medicines Agency. Plavix. Sažetak opisa svojstava lijeka. *Dostupno na [http://www.ema.europa.eu/docs/hr\\_HR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000174/WC500042189.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000174/WC500042189.pdf). Pristupljeno: 20.05.2018.*
8. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH i sur. Prasugrel versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med* 2007;357:2001-2015
9. Wallentin L, Becker RC, Budaj A i sur. Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med* 2009;361:1045-1057

10. Von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G, Schömig E, Kastrati A, Schömig A. Absorption, Metabolization and Antiplatelet Effects of 300-, 600-, and 900-mg Loading Doses of Clopidogrel. *Circulation* 2005;112:2946-2950
11. Xie H, Zou J, Hu Z, Zhang J, Ye F, Chen S. Individual variability in response to clopidogrel: Pharmacogenetics and beyond. *Pharmacology&Therapeutics* 2011;29: 267-289
12. Ganesan S, Williams C, Maslen CL, Cherala G. Clopidogrel variability: role of plasma protein binding alterations. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75: 1468–1477.
13. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T i sur. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Met Dispos* 2010;38:92-99.
14. Trenk D, Hochholzer W. Genetics of platelet inhibitor treatment. *Br J Clin Pharmacol* 2013;77:642–653
15. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. *Dostupno na <https://cpicpgx.org/>. Pristupljeno: 04.06.2018.*
16. Europska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Ziagen. Sažetak opisa svojstava lijeka. *Dostupno na [http://www.ema.europa.eu/docs/hr\\_HR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000252/WC500050343.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000252/WC500050343.pdf). Pristupljeno: 04.06.2018.*
17. Lovrić M. Uloga farmakogenetički varijacija u prijenosu lijekova preko različitih membrana. U: Božina N, Macolić Šarinić V. ur. Farmakogenomika i farmakovigilacija – sprječavanje nuspojava u individualizaciji terapije – upute i smjernice. Medicinska naklada; 2013, str. 39-48.
18. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW i sur. Very important pharmacogene summary: *ABCB1* (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* 2011;21:152–161.

19. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 2009;1794: 860–871.
20. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. *ABCB1* genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *The Pharmacogenomics Journal* 2007;7:154-179
21. Božina N, Pejnović L. Osnove farmakogenomike. U: Božina N, Macolić Šarinić V. ur. Farmakogenomika i farmakovigilacija – sprječavanje nuspojava u individualizaciji terapije – upute i smjernice. Medicinska naklada; 2013, str. 1-22
22. Cavallari LH. Personalizing antiplatelet prescribing using genetics for patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2017; 15:581–589.
23. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2013 Update. *Clin Pharmacology&Therapeutics* 2013;3:317-323
24. Mezak Herceg M, Mirković Z , Božina N. Učestalost polimorfizma metaboličkog enzima CYP2C19 u hrvatskoj populaciji. *Dostupno na <http://mld.com.hr/wp-content/uploads/2018/03/Knjiga-sa%C5%BEetaka-2.-kongres-HKZR-SR-MLD.pdf>*.  
*Pristupljeno: 18.06.2018.*
25. Fontana P, Dupont A, Gandrille S i sur. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003;108:989-95.
26. Fontana P, Gaussem P, Aiach M, Fiessinger JN, Emmerich J, Reny JL. P2Y12 H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case-control study. *Circulation* 2003;108:2971-3.

27. Taubert D, Von Beckerath N, Grimberg G i sur. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:486-501.
28. Mega J, Close S, Wiviott S i sur. Genetic variants in *ABCB1* and *CYP2C19* and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: A pharmacogenetic analysis. *The Lancet* 2010;376:1312–19
29. Karaźniewicz-Łada M, Danielak D, Rubiś B, Burchardt P, Komosa A, Lesiak M, Głowska F. Impact of common *ABCB1* polymorphism on pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel and its metabolites. *J Clin Pharm Ther* 2015;40:226-3
30. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M i sur. Genetic Determinants of Response to Clopidogrel and Cardiovascular Events. *N Engl J Med* 2009;360:363-75.
31. Carlquist JF, Knight S, Horne BD, Huntinghouse J i sur. Cardiovascular risk among patients on clopidogrel anti-platelet therapy after placement of drug-eluting stents is modified by genetic variants in both the *CYP2C19* and *ABCB1* genes. *Thrombosis and Haemostasis* 2013;109:744-54
32. Mega J, Close S, Wiviott S. Cytochrome P-450 Polymorphisms and Response to Clopidogrel. *N Engl J Med* 2009;360:354-62
33. Sibbing D, Koch W, Gebhard D i sur. Cytochrome 2C19\*17 Allelic Variant, Platelet Aggregation, Bleeding Events, and Stent Thrombosis in Clopidogrel-Treated Patients With Coronary Stent Placement. *Circulation* 2010;121:512-518
34. Kim IS, Choi B, Jeong YH, Kwak CH, Kim S. The *CYP2C19\*2* and *CYP2C19\*3* polymorphisms are associated with high post-treatment platelet reactivity in Asian patients with acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost* 2009;7:897-9.

35. Sibbing D, Stegherr J, Latz W i sur, Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *European Heart Journal* 2009;30:916–922
36. Collet JP, Hulot JS, Pena A i sur. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet* 2009;373:309–17
37. Wang Y, Zhao X, Lin J i sur. Association between CYP2C19 loss-of-function allele status and efficacy of clopidogrel for risk reduction among patients with minor stroke or transient ischemic attack. *Journal of the American Medical Association* 2016;316:70-78
38. Yi H, Yan C, Chuan-Yu G. Associations of *P2Y12* gene polymorphisms with susceptibility to coronary heart disease and clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel. *Cardiovascular therapeutics* 2016;34:460-467
39. Staritz P, Kurz K, Stoll M i sur. Platelet reactivity and clopidogrel resistance are associated with the H2 haplotype of the *P2Y12*-ADP receptor gene. *International Journal of Cardiology* 2009;133:341 – 345
40. Von Beckerath N, Von Beckerath O, Koch W, Eichinger M, Schömig A, Kastrati A. *P2Y12* gene H2 haplotype is not associated with increased adenosine diphosphate-induced platelet aggregation after initiation of clopidogrel therapy with a high loading dose. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:199-204.
41. Li M, Wang H, Xuan L, Shi X, Zhou T, Zhang N, Huang Y. Associations between *P2RY12* gene polymorphisms and risks of clopidogrel resistance and adverse cardiovascular events after PCI in patients with acute coronary syndrome. *Medicine* 2017;96:e6553
42. Motovska Z, Widimsky P, Kvasnicka J i sur. High loading dose of clopidogrel is unable to satisfactorily inhibit platelet reactivity in patients with glycoprotein IIIA gene

- polymorphism: a genetic substudy of PRAGUE-8 trial. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009;20:257-62.
43. Xiang Q, Ji S-D, Zhang Z, Zhao X, Cui Y-M. Identification of *ITGA2B* and *ITGB3* Single-Nucleotide Polymorphisms and Their Influences on the Platelet Function. *BioMed Research International*. 2016;2016:5675084. doi:10.1155/2016/5675084.
44. Yi X, Wang Y, Lin J, Cheng W, Zhou Q, Wang C. Interaction of CYP2C19, P2Y12, and GPIIb Variants Associates With Efficacy of Clopidogrel and Adverse Events on Patients With Ischemic Stroke. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2017; 23:761-768
45. Xie C, Ding X, Gao J i sur. The effects of *CES1A2* A(-816)C and *CYP2C19* loss-of-function polymorphisms on clopidogrel response variability among Chinese patients with coronary heart disease. *Pharmacogenet Genomics* 2014;24:204-10
46. Lewis JP, Horenstein RB, Ryan K i sur. The functional G143E variant of carboxylesterase 1 is associated with increased clopidogrel active metabolite levels and greater clopidogrel response. *Pharmacogeneti Genomics* 2013;23:1-8
47. Plavix. Prescribing information. *Dostupno na*  
[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2016/020839s062s064lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/020839s062s064lbl.pdf)  
*. Pristupljeno: 12.07.2018.*
48. Swen J, Nijenhuis M, De Boer A. Pharmacogenetics: From Bench to Byte— An Update of Guidelines. *Nature* 2011;5:662-673
49. Cairns JA, Eikelboom J. Clopidogrel Resistance: More Grist For The Mill. *Journal od American College of Cardiology* 2008; 51:1935-37
50. Su J, Xu J, Li X, et al. *ABCB1* C3435T Polymorphism and Response to Clopidogrel Treatment in Coronary Artery Disease (CAD) Patients: A Meta-Analysis. *Plos One* 2012;7:e46366. doi:10.1371/journal.pone.0046366.



51. Hrvatsko kardiološko društvo. Postupnik dijagnostike i liječenja akutnog infarkta miokarda. Dostupno na [http://www.kardio.hr/pdf/Postupnik\\_za\\_web.pdf](http://www.kardio.hr/pdf/Postupnik_za_web.pdf).  
Pristupljeno: 19.07.2018.
52. Dong OM, Li A, Suzuki A i sur. Projected impact of a multigene pharmacogenetic test to optimize medication prescribing in cardiovascular patients. *Pharmacogenomics* 2018;19:771-782
53. Cecchin E, Roncato R, Guchelaar HJ, Toffoli G. Ubiquitous Pharmacogenomics (U-PGx): The Time for Implementation is Now. An Horizon2020 Program to Drive Pharmacogenomics into Clinical Practice. *Curr Pharm Biotechnol* 2017;18:204-209
54. Europska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Brilique. Sažetak opisa svojstava lijeka. Dostupno na [http://www.ema.europa.eu/docs/hr\\_HR/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/001241/WC500100494.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001241/WC500100494.pdf).  
Pristupljeno: 24.07.2018.
55. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode. Izvješće o potrošnji lijekova u 2016. godini. Dostupno na <http://www.halmed.hr/Promet-proizvodnja-i-inspekcija/Promet/Potrosnja-lijekova/Izvjescia-o-prometu-lijekova/>.  
Pristupljeno: 24.07.2018.

## 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ABC – eng. *ATP-binding cassette*= ATP-vezujuće kazete

ADP – adenzin difosfat

AMP – adenzin monofosfat

ASK – acetisalicilna kiselina

ATP – adenzin trifosfat

AUC - eng. *area under curve* = površina ispod krivulje

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

C<sub>max</sub> – vršna koncentracija

CES1 – karboksilesteraza 1

COX-1 – ciklooksigenaza 1

CPIC – eng. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

CYP450- sustav enzima citokroma P450

DPWG – eng. *Dutch Pharmacogenomics Working Group*

EMA – Europska agencija za lijekove i medicinske proizvode

HALMED –Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode

MACE – eng. *major adverse cardiac events* =veliki neželjeni kardiovaskularni događaji

NO – dušikov oksid

PAR-1 –receptor aktiviran proteazom 1

PCI – eng. *percutaneous coronary intervention*=perkutana koronarna intervencija

PharmGKB – eng. *Pharmacogenomics Knowledge Base*

SNP – eng. *single nucleotide polymorphism* = polimorfizam jednog nukleotida

TIMI – eng. *thrombolysis in myocardial infarction* = tromboliza u infarktu miokarda

vWF – Von Willebrandov faktor

VASP – vazodilatatorom-stimuliran fosfoprotein