

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Dorota Danielak

**Farmakokinetyka kliniczna klopidogrelu i jego
metabolitów z uwzględnieniem polimorfizmu
genetycznego izoenzymu CYP2C19
i glikoproteiny P**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. Franciszek Główka

Poznań 2014

Praca współfinansowana ze środków:

- Narodowego Centrum Nauki: grant nr NN 405 419739: „Ocena farmakogenetycznych czynników ryzyka wystąpienia oporności na kłopidogrel u chorych z cukrzycą typu 2”,
2010-2013

- Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu: grant dla młodych badaczy nr 502-14-03306413-09628: „Opracowanie i walidacja metody HPLC-MS/MS oznaczania kłopidogrelu i jego metabolitów w osoczu ludzkim”,
2012/2013

- Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu: grant dla młodych badaczy nr 502-14-03306413-09628: „Ocena wpływu polimorfizmu genetycznego glikoproteiny P na farmakokinetykę kłopidogrelu i jego metabolitów u pacjentów poddanych interwencyjnym zabiegom kardiologicznym”,
2013/2014

Słowa kluczowe: klopidogrel, farmakokinetyka, farmakodynamika, farmakogenetyka,
HPLC w odwróconym układzie faz

Praca została wykonana we współpracy z:

- Katedrą i Zakładem Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie oznaczania przygotowanych próbek metodą HPLC-MS/MS
- Katedrą i Kliniką Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie rekrutacji pacjentów oraz poboru próbek krwi
- Kliniką Chirurgii Ogólnej i Naczyń Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie rekrutacji pacjentów oraz poboru próbek krwi
- Katedrą i Zakładem Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie oznaczenia polimorfizmu genetycznego CYP2C19 i glikoproteiny P
- I Kliniką Kardiologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie pomiaru reaktywności płytek krwi za pomocą aparatu Multiplate

Panu prof. dr. hab. Franciszkowi Głowce

serdecznie dziękuję

*za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej,
wskazanie interesującego tematu, cenne
wskazówki podczas wykonywania pracy,
życzliwość i wyrozumiałość*

Składam serdeczne podziękowania

Pani dr Marcie Karaźniewicz-Ładzie za nieocenioną pomoc, życzliwość i wyrozumiałość oraz cenne wskazówki

Panu dr. Pawłowi Burchardtowi oraz Panu dr. Łukaszowi Kruszynie za pomoc w zbieraniu materiału biologicznego

Panu dr. hab. Błażejowi Rubisiowi za miłą współpracę i pomoc w wykonaniu badań genetycznych

Pani dr Annie Komosie za pomoc w oznaczeniach agregacji

Panu mgr. Arturowi Teżykowi za życzliwość i pomoc w części analitycznej pracy

Pracownikom Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej i Farmakokinezyki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu za miłą atmosferę podczas wykonywania pracy i wszelką pomoc

Pracę dedykuję Moim Najbliższym

Część pracy została opublikowana:

- Karaźniewicz-Łada M., Danielak D., Głowska F.: Genetic and non-genetic factors affecting the response to clopidogrel therapy. *Expert Opin. Pharmacother.* 2012, 13:663–683 (IF = 2,86, MNiSW = 20)
- Karaźniewicz-Łada M., Danielak D., Teżyk A., Żaba C., Tuffal G., Głowska F.: HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of clopidogrel, its carboxylic acid metabolite and derivatized thiol metabolite isomers in human plasma. *J Chromatogr B.* 2012,911:105-12 (IF = 2,487, MNiSW = 35)
- Karaźniewicz-Łada M., Danielak D., Burchardt P., Kruszyna L., Komosa A., Lesiak M., Głowska F.: Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases. *Clin. Pharmacokinet.* 2014,53:155-64 (IF = 6,109, MNiSW = 40)

Spis treści

Wykaz skrótów	11
1. Wstęp	13
2. Część teoretyczna	14
2.1. Klopidoogrel.....	14
2.1.1 Struktura i właściwości fizykochemiczne.....	14
2.1.2 Farmakokinetyka	14
2.1.3 Mechanizm działania	18
2.1.4 Działania niepożądane	19
2.1.5 Zastosowanie w leczeniu.....	20
2.1.6 Interakcje.....	22
2.2. Oporność na CLP – problem współczesnej terapii przeciwplatekowej	25
2.2.1 Czynniki genetyczne.....	26
2.2.2 Czynniki niegenetyczne	30
2.3. Metody analityczne stosowane w oznaczaniu CLP i jego metabolitów	33
2.4. Metody pomiaru agregacji płytek krwi	35
2.4.1 Techniki agregometryczne	35
2.4.2 Metody „point-of-care”	36
2.4.3 Metody cytometrii przepływowej	37
3. Cel pracy	38
4. Część doświadczalna.....	39
4.1. Aparatura i odczynniki	39
4.1.1 Aparatura i sprzęt laboratoryjny stosowane w metodach HPLC-MS/MS i HPCE.....	39
4.1.2 Aparatura i sprzęt laboratoryjny stosowane w badaniu genotypu.....	40
4.1.3 Odczynniki stosowane w metodach HPLC-MS/MS i HPCE	40
4.1.4 Odczynniki stosowane w badaniu genotypu	41
4.2. Metoda HPLC-MS/MS oznaczania CLP, CLPM i zderywatyzowanych izomerów CLPA w osoczu.....	42
4.2.1 Warunki pracy aparatu HPLC	42
4.2.2 Roztwory podstawowe i wzorcowe.....	43
4.2.3 Przygotowanie próbek do krzywej wzorcowej	44
4.2.4 Walidacja metody HPLC-MS/MS.....	44
4.3. Metoda HPCE oznaczania CLPM w osoczu	47
4.3.1 Warunki pracy aparatu HPCE.....	47

4.3.2 Przygotowanie próbek kontrolnych.....	47
4.3.3 Precyzja i dokładność metody HPCE.....	48
4.4. Oznaczanie CLP i jego metabolitów w osoczu pacjentów ze schorzeniami sercowo-naczyniowymi.....	48
4.4.1 Charakterystyka grupy badanej.....	48
4.4.2 Oznaczanie CLP i jego metabolitów w osoczu pacjentów.....	49
4.5. Obliczenia parametrów farmakokinetycznych.....	50
4.6. Wyznaczanie parametrów farmakodynamicznych.....	51
4.7. Identyfikacja polimorfizmu genów <i>ABCB1</i> i <i>CYP2C19</i>	52
4.7.1 Izolacja DNA z krwi obwodowej.....	52
4.7.2 Identyfikacja polimorfizmów genetycznych.....	52
4.7.3 Sekwencjonowanie amplifikowanych fragmentów DNA.....	56
4.8. Metody statystyczne.....	57
5. Wyniki.....	58
5.1. Wyniki walidacji metody HPLC-MS/MS.....	58
5.1.1 Selektywność.....	58
5.1.2 Liniowość.....	61
5.1.3 LOQ, precyzja i dokładność.....	63
5.1.4 Efekt matrycy.....	64
5.1.5 Stabilność.....	64
5.2. Precyzja i dokładność metody HPCE.....	66
5.3. Wyniki oznaczania stężeń analitów u pacjentów.....	67
5.4. Wyniki obliczeń parametrów farmakokinetycznych.....	71
5.5. Wyniki oznaczeń agregacji płytek krwi metodą Multiplate.....	72
5.6. Analiza polimorfizmu <i>ABCB1</i> i <i>CYP2C19</i>	73
5.6.1 Wyniki analizy polimorfizmu <i>ABCB1</i> 3435C>T.....	73
5.6.2 Wyniki analizy polimorfizmu <i>CYP2C19</i>	74
5.6.3 Wyniki sekwencjonowania.....	76
5.7. Analiza statystyczna.....	77
5.7.1 Korelacja parametrów farmakokinetycznych CLP i jego metabolitów z agregacją płytek krwi.....	77
5.7.2 Wpływ polimorfizmu genetycznego P-gp na parametry farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów oraz agregację płytek krwi.....	78
5.7.3 Wpływ polimorfizmu genetycznego <i>CYP2C19</i> na parametry farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów.....	82
5.7.4 Ocena wpływu fenotypu <i>CYP2C19</i> na parametry farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów oraz agregację płytek krwi.....	85

6. Omówienie i dyskusja wyników	89
7. Wnioski	102
8. Streszczenie	103
9. Abstract.....	105
10. Piśmiennictwo	107
11. Wykaz załączników	122

Wykaz skrótów

- ACCF– American College of Cardiology Foundation
- ACN – acetonitryl
- ACS – ostry zespół wieńcowy (Acute Coronary Syndrome)
- ADP – adenozyndifosforan
- ASA – kwas acetylosalicylowy (AcetylSalicylic Acid)
- AU – jednostki arbitralne (Arbitrary Units)
- AUC – pole powierzchni pod krzywą stężenia od czasu (Area Under Curve)
- BGE – elektrolit podstawowy (BackGround Electrolyte)
- BMI – indeks masy ciała (Body Mass Index)
- CA – cyklaza adenylowa
- cAMP – cykliczny adenozyndifosforan
- CAPRIE – Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events
- CAS – stentowanie tętnic szyjnych (Carotid Artery Stenting)
- CES-1 – karboksyloesteraza 1
- CHARISMA - Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance
- CLP – klopidogrel
- CLPA – aktywny metabolit tiolowy klopidogrelu
- CLPM – nieaktywny, karboksylowy metabolit klopidogrelu
- CRP – białko reaktywne C (C-Reactive Protein)
- CURE - The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events
- CYP450 – cytochrom P450
- DAD – detektor diodowy (Diode Array Detector)
- DAT – podwójna terapia przeciwplatetkowa (Dual Antiplatelet Therapy)
- dATP – deoksyadenozyntrifosforan
- dCTP – deoksycytydynotrifosforan
- ddNTP – dideoksynukleotydy
- dGTP – deoksyguanozyntrifosforan
- DM – cukrzyca (diabetes mellitus)
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
- dNTP – deoksyrybonukleotydy
- dTTP – deoksytymidynotrifosforan
- ESC – Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (European Society of Cardiology)
- ESI – jonizacja przez rozpylanie w polu elektrycznym (Electro-Spray Ionisation)
- EtBr – bromek etydyny
- GSH – glutation
- H1 - H4 – izomery aktywnego tiolowego metabolitu klopidogrelu
- HPLC – wysokosprawną chromatografię cieczową (High Performance Liquid Chromatography)
- HPR – wysoka reaktywność płytek w czasie leczenia (High on-treatment Platelet Reactivity)
- IPA – zahamowanie agregacji płytek krwi (Inhibition of Platelet Aggregation)
- IS - wzorzec wewnętrzny (Internal Standard)
- LOD – wykrywalność (Limit of Detection)
- LOQ – oznaczalność (Limit of Quantitation)
- MF – efekt matrycy (Matrix Factor)

- MP-H1 – MP-H4 – 2'-bromometoksyfenonowe pochodne izomerów tiolowego metabolitu kłopidogrelu
- MPB – 2-bromo-3'-metoksyacetofenon
- MRM – monitorowanie reakcji następczych (Multiple Reaction Mode)
- NSTE ACS – ostry zespół wieńcowy bez uniesienia odcinka ST (No ST-Elevation Acute Coronary Syndromes)
- NSTEMI – zawał mięśnia sercowego bez uniesienia odcinka ST (Non ST Elevation Myocardial Infarction)
- PGE₁ – prostaglandyna E1
- PCI – przezskórna interwencja wieńcowa (Percutaneous Coronary Intervention)
- PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (Polymerase Chain Reaction)
- P-gp – glikoproteina P
- PPI – inhibitory pompy protonowej (Proton Pump Inhibitors)
- PRI – współczynnik reaktywności płytek (Platelet Reactivity Index)
- PRX – pirokсыkam
- RCF – względna siła odśrodkowa (Relative Centrifugal Force)
- RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- SPE – ekstrakcja ciecz-ciało stałe (Solid Phase Extraction)
- STEMI – zawał mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST (ST Elevation Myocardial Infarction)
- T2DM – cukrzyca typu 2 (Type 2 Diabetes Mellitus)
- TBE – bufor o składzie Tris – kwas borowy – wersenian disodowy (Tris-Boric acid – EDTA)
- UA – niestabilna choroba wieńcowa (Unstable Angina)
- VASP/VASP-P – fosfoproteina stymulowana przez związki rozszerzające naczynia (VAsodilator-Stimulated Phosphoprotein)/w postaci ufosforylowanej
- WZ – współczynnik zmienności

1. Wstęp

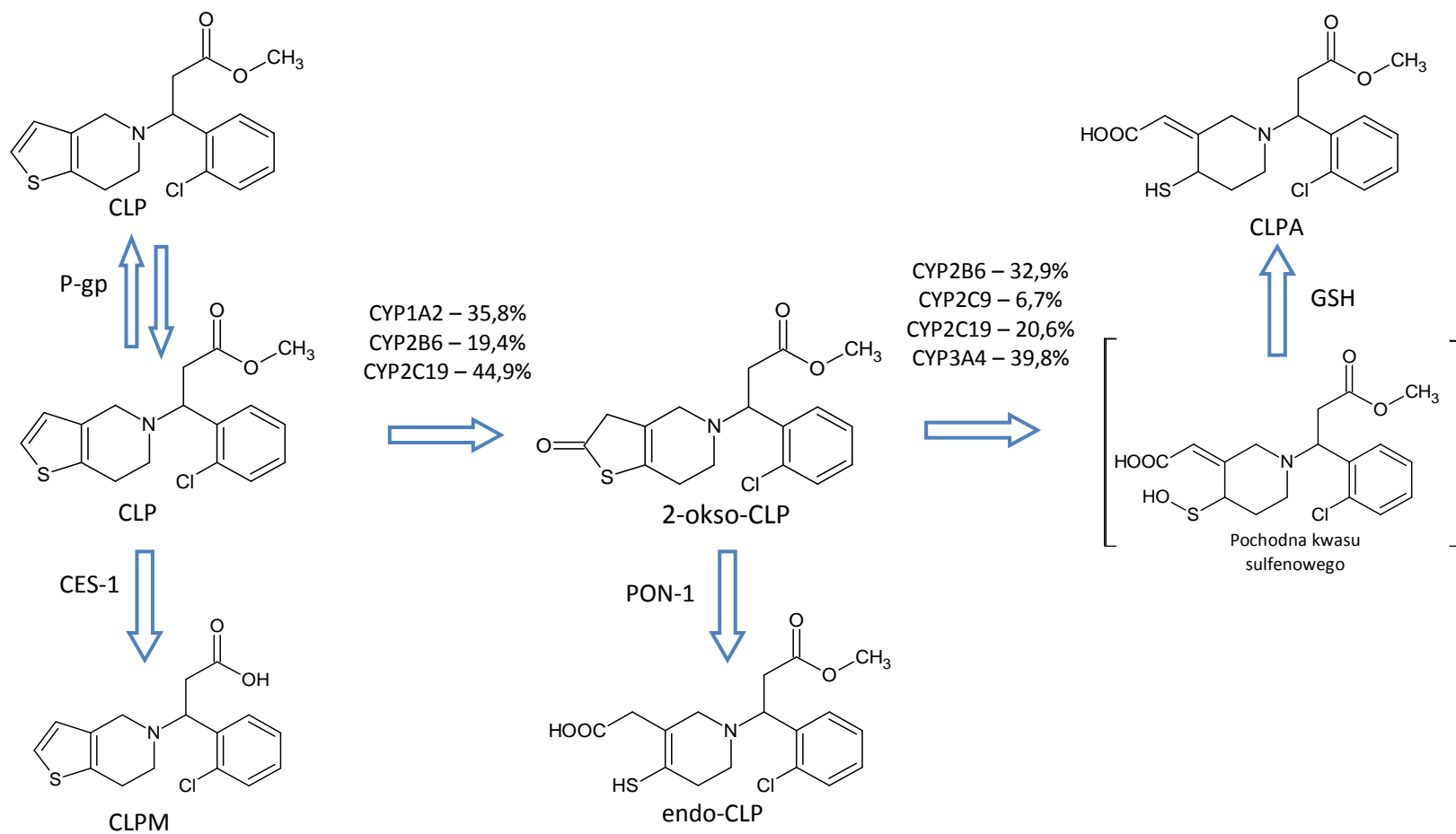
Klopidogrel (CLP) jest powszechnie stosowanym lekiem przeciwzakrzepowym z grupy pochodnych tienopirydyny. Jest on stosowany w schematach leczenia ostrych zespołów wieńcowych oraz chorób tętnic obwodowych. CLP jest prolekiem, który ulega metabolizmowi do postaci aktywnej biologicznie. Efekt farmakologiczny CLP wywierany jest przez metabolit tiolowy, który bezpośrednio oddziałuje z receptorami P2Y₁₂ znajdującymi się na powierzchni płytek krwi. Jednak u około 5-44% pacjentów zahamowanie agregacji płytek jest niedostateczne. Zjawisko to nazywane jest „opornością na klopidogrel” (ang. clopidogrel resistance). Bezpośrednią konsekwencją występowania oporności jest podwyższone ryzyko tworzenia się skrzepów oraz występowania zdarzeń niedokrwienych, takich jak zawał mięśnia sercowego czy udar. W ostateczności poważne zdarzenia sercowo-naczyniowe mogą prowadzić do śmierci pacjenta. Przyczyny występowania oporności na CLP nie są dokładnie znane. Przypuszcza się, że jest ona wynikiem zarówno czynników genetycznych jak i pozagenetycznych. Czynniki genetyczne obejmują polimorfizmy genetyczne białek biorących udział w biotransformacji i mechanizmie działania klopidogrelu. Szczególne znaczenie w etiologii oporności na CLP przypisywane jest polimorfizmowi genetycznemu glikoproteiny P oraz polimorfizmowi w genie kodującym izoenzym CYP2C19. Wśród czynników pozagenetycznych największy wpływ na brak skuteczności leczenia CLP mogą mieć m.in. niewydolność nerek, ostre zespoły wieńcowe, zaawansowany wiek pacjenta oraz jednoczesne przyjmowanie leków będących inhibitorami lub induktorami izoenzymów z grupy CYP450.

W niniejszej pracy podjęto się zbadania farmakokinetyki CLP i jego metabolitów, z uwzględnieniem izomerów H3 i H4 metabolitu tiolowego u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi. Oceniono także efekt farmakodynamiczny poprzez zmierzenie agregacji płytek krwi oraz oznaczono polimorfizm genetyczny izoenzymów CYP2C19 oraz glikoproteiny P. Wyznaczenie zależności farmakokinetyczno-farmakodynamicznych z uwzględnieniem farmakogenetyki może pomóc w wyjaśnieniu przyczyn występowania oporności na CLP. Szczególne znaczenie może mieć to w optymalizacji terapii przeciwplatekowej i zmniejszeniu ryzyka występowania zdarzeń zakrzepowych spowodowanych niedostatecznym zahamowaniem agregacji.

podania [11–13]. W transporcie CLP przez błonę komórkową aktywnie uczestniczy glikoproteina P (P-gp, ABCB1) [14]. P-gp jest białkiem transbłonowym odpowiedzialnym za zależne od ATP usuwanie ksenobiotyków z wnętrza komórek. W wyniku tego P-gp wiązana jest z występowaniem oporności wielolekowej [15]. Z powodu aktywnego usuwania CLP z komórek przez P-gp absorpcji ulega około 50% podanej dawki tego leku [1]. Poza P-gp na wchłanianie CLP może mieć wpływ jednoczesne przyjmowanie pokarmu. Badania wskazują, że podawanie CLP na czczo wiąże się z jego 3-6-krotnie niższym C_{maks} oraz 5-9-krotnie niższym AUC [11,13]. CLP oraz jego główny metabolit występują w osoczu głównie w postaci związanej z białkami. Wiązanie leku z białkami jest wysokie i sięga 98% dla związku macierzystego oraz 94% dla głównego metabolitu [1].

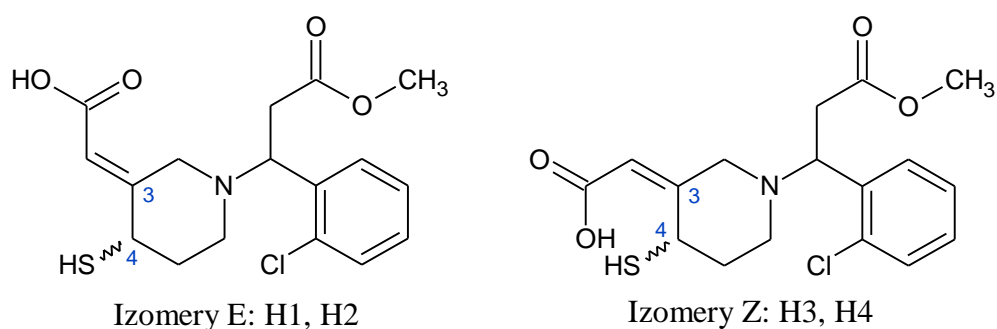
Metabolizm

CLP jest prolekiem i aby wywołać efekt farmakodynamiczny musi być przekształcony do aktywnego metabolitu (CLPA). Metabolizm CLP przebiega dwoma ścieżkami (Rysunek 1). Około 85% zaabsorbowanej dawki CLP ulega hydrolizie do nieaktywnego metabolitu karboksylowego (CLPM) [16]. Etap ten zachodzi w hepatocytach przy udziale karboksyloesterazy 1 (CES-1) [17]. Pozostałe 15% jest utleniane do aktywnego metabolitu w dwustopniowej reakcji katalizowanej przez enzymy z grupy CYP450. W pierwszym etapie, w którym główną rolę odgrywiają izoenzymy CYP1A2, CYP2B6 oraz CYP2C19 powstaje tiolakton - 2-okso-klopidogrel (2-okso-CLP), który nie jest aktywny farmakologicznie [18]. Następnie pierścień tiolaktonowy ulega otwarciu i 2-okso-CLP jest przekształcany do aktywnego metabolitu, posiadającego wolną grupę tiolową. Najnowsze badania wskazują, że najpierw przy udziale CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 i CYP3A4 z tiolaktonu powstaje nietrwała pochodna o charakterze kwasu sulfenowego, która pod wpływem glutationu (GSH) ulega redukcji [19]. Ubocznym produktem metabolizmu 2-okso-CLP jest izomer „endo”, powstały przy udziale paraoksonazy-1 (PON-1), w którym wiązanie podwójne znajduje się wewnątrz pierścienia piperydynowego [19].



Rysunek 1: Wchłanianie i metabolizm CLP. Procentowy udział CYP450 w biotransformacji na podstawie Kazui i wsp. [18]

Powstały w wyniku powyższych reakcji metabolit tiolowy występuje w postaci 4 diastereoizomerów, oznaczanych jako H1 – H4, zależnie od konfiguracji węgli 3 i 4 (Rysunek 2). Związki te, tak jak macierzysty CLP, są izomerami S(+). H1 i H2 są izomerami typu *trans* (E), natomiast H3 i H4 posiadają konfigurację *cis* (Z) [19]. Z uwagi na bardzo dużą labilność tych związków, absolutna konfiguracja węgla 4 do tej pory nie została ustalona [20]. Spośród wszystkich czterech diastereoizomerów jedynie H2 oraz H4 posiadają zdolność do hamowania agregacji płytek krwi, przy czym siła działania H2 jest o około 50% niższa, niż izomeru H4 [21]. W próbkach klinicznych stwierdzono występowanie wyłącznie izomerów o konfiguracji Z [21].



Rysunek 2: Struktura izomerów H1-H4 aktywnego metabolitu CLP

Z uwagi na to, że CLP jest podawany w postaci czystego enancjomeru S(+), natomiast izomer R(-) może wywoływać działania niepożądane, zbadane zostało w jakim stopniu CLP S(+) podlega zjawisku inwersji chiralnej. Doświadczenia te zostały przeprowadzone na modelu zwierzęcym i obejmowały inkubację *in vitro* CLP z hepatocytami oraz oznaczenia farmakokinetyczne. Stwierdzono niewielki (4 – 8%) stopień inwersji enancjomeru S(+) do R(-), który nie miał znaczenia klinicznego [2].

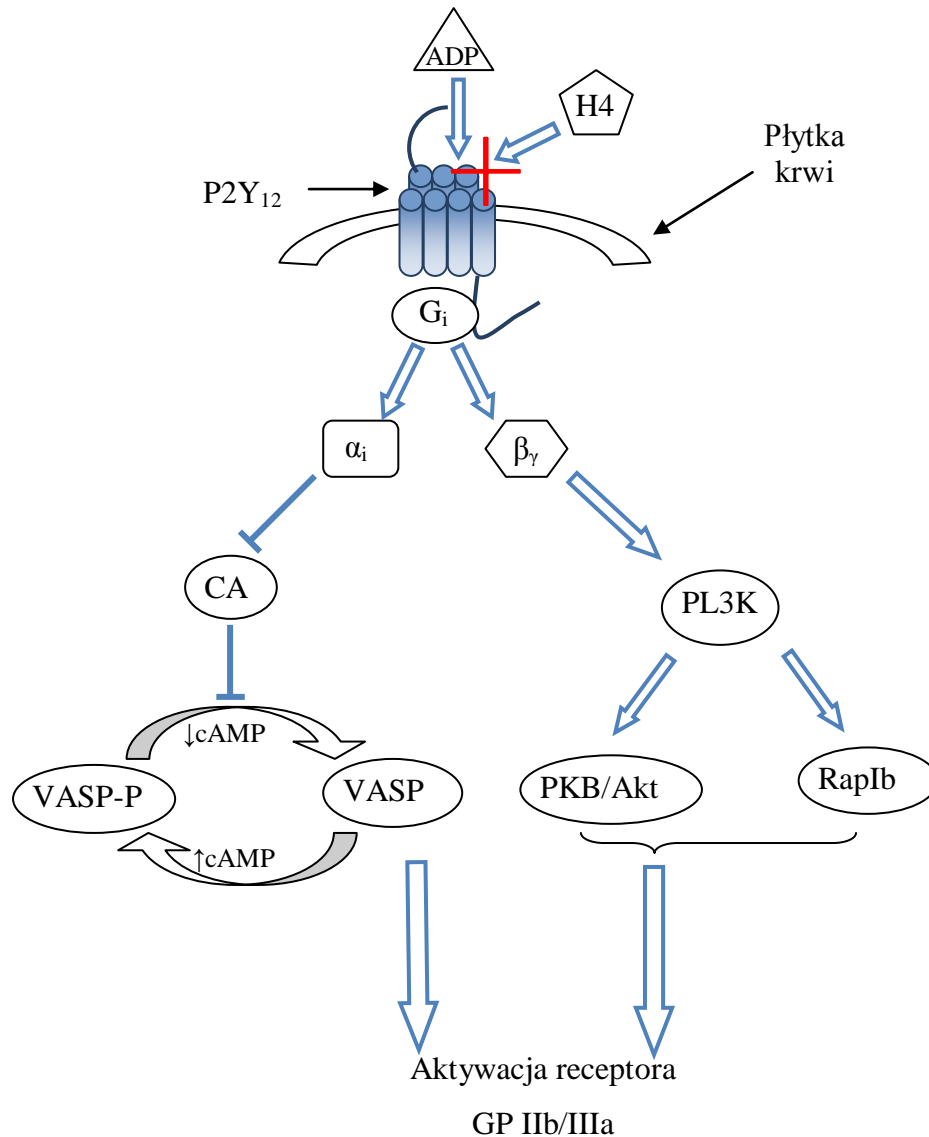
Eliminacja

CLP oraz CLPM ulegają wydalaniu w głównej mierze przez nerki w postaci wolnej oraz związanej jako glukuroniany [16]. Badania z użyciem znakowanego izotopem ^{14}C CLP pokazały, że po upływie 120 godzin od podania dawki 75 mg, wydaleni z moczem uległo 41 - 46% leku, natomiast około 39 – 59% zostało wydalone z kałem [22]. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach stwierdzono, że CLP może być również wydalany razem z mlekiem, ale brak jest danych na ten temat dotyczących ludzi [23]. Najszybciej eliminowany z organizmu jest CLPA, o

biologicznym okresie półtrwania ($t_{0,5}$) równym około 0,5 h [13,24,25]. CLP również eliminowany jest stosunkowo szybko. W większości opublikowanych badań jego $t_{0,5}$ waha się w granicach 0,5 – 3 h [11,12,26,27]. Najdłużej natomiast eliminowany jest główny, nieaktywny metabolit, którego $t_{0,5}$ sięga nawet 9 h [12,28,29].

2.1.3 Mechanizm działania

Dzięki obecności reaktywnej grupy tiolowej, CLPA ma zdolność do nieodwracalnego i selektywnego wiązania się z receptorem P2Y₁₂ [30]. Receptor P2Y₁₂ należy do rodziny receptorów purynergicznyc, umiejscowionych na powierzchni płytek krwi [31]. W warunkach fizjologicznych, do receptora P2Y₁₂ przyłącza się cząsteczka ADP, co powoduje kaskadę przemian prowadzącą do aktywacji receptora glikoproteiny (GP) IIb/IIIa (Rysunek 3). Przyłączenie ADP powoduje oddzielenie się podjednostek α_i oraz β_γ od białka G_i. Podjednostka α_i hamuje aktywność cykazy adenylowej (CA), co skutkuje obniżeniem stężenia cyklicznego AMP (cAMP) w komórce. W efekcie zmniejszona zostaje fosforylacja białka VASP – fosfoproteiny stymulowanej przez związki rozszerzające naczynia (vasodilator-stimulated phosphoprotein), które moduluje aktywność GP IIb/IIIa. Podjednostka β_γ poprzez kinazę fosfatydyloinozytolu oraz kinazę białkową B również wpływa na aktywację GP IIb/IIIa [32]. Aktywna postać GP IIb/IIIa powoduje łączenie się zaktywowanych płytek ze sobą oraz ze ścianami naczyń krwionośnych przy pomocy mostków fibrynogenowych [33]. Dzięki obecności reaktywnej grupy tiolowej CLPA wiąże za pomocą mostka disiarczkowego z receptorem P2Y₁₂, prowadząc do zmian strukturalnych tego białka i tym samym hamuje zależną od ADP aktywację GP IIb/IIIa [30].



Rysunek 3: Mechanizm działania aktywnego metabolitu CLP [34]

2.1.4 Działania niepożądane

Działania niepożądane CLP dotyczą głównie przewodu pokarmowego. W badaniu CAPRIE (Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events) odnotowano pojawienie się biegunk, niestrawności, nudności oraz wymiotów. Stosunkowo często występującym działaniem niepożądanym jest wysypka skórna [35]. Z uwagi na efektywne przeciwzakrzepowe działanie CLP istotnym klinicznie działaniem niepożądanym są krwawienia, które mogą wystąpić w obrębie przewodu pokarmowego oraz krwawienia śródczaszkowe, co stanowi zagrożenie dla życia pacjenta [36,37]. W przypadku wystąpienia epizodów krwotocznych wskazane jest

rozważenie odstawienia CLP [38]. Niebezpieczne powikłania ze strony układu krwiotwórczego obserwowane są rzadko. Podczas leczenia CLP stwierdzono możliwość wystąpienia neutropenii i trombocytopenii oraz bardzo rzadkiej zakrzepowej plamicy małopłytkowej (TTP) [35,39].

2.1.5 Zastosowanie w leczeniu

Według systemu klasyfikacji biofarmaceutycznej (BCS, Biopharmaceutics Classification System) CLP jest opisywany kodem B 01 A C 01 [40] gdzie:

- B: Krew i układ krwionośny
 - 01: Leki przeciwzakrzepowe
 - A: Leki przeciwzakrzepowe
 - C: Leki hamujące agregację płytek z wyłączeniem heparyny
 - 01: Klopidoogrel

CLP, tak jak pozostałe leki z grupy antagonistów receptora P2Y₁₂, znajduje zastosowanie w zapobieganiu powstawania zakrzepów w przebiegu ostrych zespołów wieńcowych, udarów niedokrwiennych, chorobach naczyń obwodowych oraz po zabiegach, takich jak koronarografia (PCI) czy implantacja stentów. W przeciwieństwie do leku starszej generacji – tiklopidyny – CLP jest lepiej tolerowany, a ryzyko wystąpienia niebezpiecznych działań niepożądanych, głównie neutropenii oraz TTP jest niższe [41]. W Polsce zarejestrowanych jest obecnie ponad 20 preparatów zawierających w składzie CLP (Tabela 1).

Przy dawkowaniu 75 mg/dobę maksymalny efekt przeciwapagregacyjny obserwowany jest dopiero 4-5 dni od rozpoczęcia leczenia [42]. Aby przyspieszyć działanie leku, CLP podawany jest w dawce inicjującej 300 mg lub 600 mg. Podawanie wyższych dawek inicjujących np. 900 mg nie wiąże się z silniejszym działaniem przeciwzakrzepowym [43].

CLP skuteczniej niż kwas acetylosalicylowy (ASA) zapobiega następstwom miażdżycy tętnic, takich jak udar niedokrwienny, zawał mięśnia sercowego lub zgon z przyczyn naczyniowych [44]. W badaniu klinicznym CAPRIE, stwierdzono, że podawanie CLP w dawce 75 mg/dobę pacjentom z miażdżycą naczyń obwodowych, po niedawnym udarze niedokrwiennym oraz z chorobami naczyń obwodowych znacząco obniża ryzyko wystąpienia tych powikłań w porównaniu do ASA [35].

Tabela 1. Wykaz wybranych preparatów leczniczych zawierających CLP zarejestrowanych do obrotu w Polsce

Nazwa handlowa	Producent	Skład	Dawka [mg]
Agregex	Actavis	CLP	75
Areplex	Adamed	CLP	75
Carder	Farma-Projekt	CLP	75
Clogrel	Polpharma	CLP	75
Clopidix	Lek-AM	CLP	75
Clopidogrel Apotex	Apotex	CLP	75
Clopidogrel GSK	GlaxoSmithKline	CLP	75
Clopidogrel Krka	Krka	CLP	75
Clopidogrel Mylan	Mylan S.A.S.	CLP	75
Clopidogrel Teva	Teva Pharma B.V.	CLP	75
Clopigamma	Wörwag Pharma	CLP	75
Clopinovo	Arti Farma.	CLP	75
Cloropid	Arrow Poland.	CLP	75
DuoPlavin	Bristol-Myers Squibb Pharma	CLP+ASA	75+75 75+100
Egitromb	EGIS Pharmaceuticals	CLP	75
Grepid	Pharmathen	CLP	75
Nivenol	WZF Polfa	CLP	75
Pegorel	IWA Consulting	CLP	75
Plavix	Sanofi Pharma Bristol-Myers Squibb	CLP	75, 300
Plavocorin	Sandoz	CLP	75
Tessyron	Gedeon Richter	CLP	75
Trogran	Glenmark	CLP	75
Trombex	Zentiva	CLP	75
Vixam	Polfarmex	CLP	75
Zyllt	KRKA	CLP	75

CLP znajduje zastosowanie razem z ASA w schemacie podwójnej terapii przeciwplatekowej (DAT – dual antiplatelet therapy) w leczeniu ostrych zespołów wieńcowych bez uniesienia odcinka ST (NSTE ACS – no ST elevation acute coronary syndromes) oraz z uniesieniem odcinka ST (STEMI – ST elevation myocardial infarction) [38,45–47]. DAT nie jest jednak zalecana w przypadku pacjentów ze stabilną miażdżycą tętnic, będących w grupie ryzyka z powodu takich czynników jak cukrzyca, nefropatia cukrzycowa czy hipercholesterolemia oraz z chorobami układu

krążenia. W badaniu CHARISMA (Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance) nie stwierdzono bowiem większej skuteczności połączenia CLP i ASA w porównaniu z samym ASA w zapobieganiu zawałowi mięśnia sercowego, udarowi lub śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych [48]. Jednocześnie prawdopodobieństwo wystąpienia krwawień w grupie pacjentów przyjmujących CLP było wyższe.

Według American College of Cardiology Foundation (ACCF), CLP powinien być podawany w dawce inicjującej 600 mg przed lub w trakcie zabiegu przezskórnej interwencji wieńcowej (PCI – percutaneous coronary intervention) oraz w dawce podtrzymującej 75 mg/dobę przez 12 miesięcy po przeprowadzeniu zabiegu [38,47]. Podawanie CLP przed zabiegiem PCI znacząco zmniejsza ryzyko poważnych zdarzeń sercowych oraz zawału mięśnia sercowego [49]. W przypadkach STEMI, gdy wiek pacjenta jest zaawansowany (>75 lat) oraz zostało wdrożone leczenie fibrynolityczne, wskazane jest pominięcie dawki inicjującej i podanie jedynie dawki podtrzymującej 75 mg CLP [47]. Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ESC – European Society of Cardiology) zaleca podawanie pacjentom z ACS w pierwszej kolejności inhibitorów P2Y₁₂ nowej generacji – prasugrelu i tikagreloru [45,46]. Zalecenie to zostało sformułowane na podstawie wielośrodkowych badań klinicznych – TRITON-TIMI 38 (Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel—Thrombolysis In Myocardial Infarction) [50] oraz PLATO (Platelet Inhibition and Patient Outcomes) [51], w których leki nowej generacji skuteczniej niż CLP obniżały ryzyko śmierci pacjenta z powodu incydentów niedokrwiennych, takich jak zawał mięśnia sercowego czy udar. Według ESC, CLP w dawce 300 mg powinien być podawany tylko wtedy, gdy tikagrelor i prasugrel nie są dostępne.

2.1.6 Interakcje

Inhibitory pompy protonowej (IPP)

Stosowanie IPP jest zalecane w trakcie leczenia przeciwplatekowego w celu zmniejszenia ryzyka krwawienia z przewodu pokarmowego [52]. W związku z tym interakcje pomiędzy CLP oraz IPP są najszerzej opisane. Ho i wsp. [53] zaobserwowali, że pacjenci ze zdiagnozowanym ACS, którzy jednocześnie przyjmowali CLP i IPP byli częściej rehospitalizowani oraz częściej wykonywano u nich zabiegi

rewaskularyzacyjne. Prawdopodobnie nie jest to wynikiem zmniejszonego wchłaniania CLP z powodu podwyższonego pH żołądka lecz ściśle zależy od siły oddziaływania danego PPI na CYP2C19 [54]. Omeprazol, który podobnie jak CLP, jest w większości metabolizowany przez CYP2C19 jest najczęściej opisywany jako powodujący klinicznie istotne interakcje z CLP [55]. W porównaniu do pozostałych IPP (pantoprazolu, lansoprazolu, dekslansoprazolu i esomeprazolu) omeprazol powoduje największe obniżenie C_{maks} oraz AUC aktywnego metabolitu CLP [54,56]. Ponadto jednoczesne podawanie omeprazolu znacząco zmniejsza pożądany efekt przeciwapagregacyjny CLP [54,56,57]. Negatywny wpływ omeprazolu utrzymuje się nawet, gdy obydwie preparaty podawane są w kilkugodzinnym odstępie [58].

Problem interakcji CLP i IPP jest dość złożony. Część autorów zauważa, że pomimo bardzo wyraźnego związku pomiędzy stosowaniem IPP a obniżonym efektem farmakokinetycznym i farmakodynamicznym, nie jest to jednoznaczne z klinicznym znaczeniem tego zjawiska. Analiza retrospektywna rezultatów uzyskanych w badaniach klinicznych CREDO i CAPRIE wskazała na pewne rozbieżności dotyczące wpływu stosowania IPP na bezpieczeństwo i skuteczność CLP w zapobieganiu poważnych zdarzeń niedokrwienych [59]. W badaniu CAPRIE przyjmowanie CLP łącznie z IPP miało szkodliwy wpływ i podwyższało ryzyko udaru niedokrwienego, zawału mięśnia sercowego oraz śmierci z przyczyn naczyniowych. Natomiast w CREDO nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania punktów końcowych (śmierć, zawał mięśnia sercowego, rewaskularyzacja) pomiędzy pacjentami przyjmującymi jednocześnie IPP i nie stosującymi tych preparatów.

Inne leki modyfikujące pH żołądka

McEwen i wsp. [60] zbadali wpływ Maaloxu - popularnego preparatu z grupy antacida – na absorpcję CLP. Ponieważ po podaniu leku zobojętniającego nie stwierdzono istotnych zmian w parametrach farmakokinetycznych CLPM, można stwierdzić, iż preparaty zobojętniające nie wpływają istotnie na wchłanianie CLP. Antagoniści receptora histaminowego H_2 hamujące wydzielanie kwasu solnego w żołądku (ranitydyna, famotydyna) również nie mają znaczącego wpływu na wchłanianie i działanie CLP [61,62]. Ranitydyna nieznacznie zmniejsza C_{maks} CLPA oraz stopień zahamowania agregacji płytek, jednak nie jest to zależność istotna statystycznie i o potencjalnym znaczeniu klinicznym [62].

Inhibitory CYP450

Lau i wsp. [63] oraz Neubauer i wsp. [64] opisali zależny od dawki wpływ atorwastatyny na zmniejszenie przeciwapagregacyjnego działania CLP. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że atorwastatyna, inhibitor CYP3A4/5, zmniejsza aż o 90% biotransformację CLP [65]. Jednakże duże badania kliniczne nie potwierdziły wpływu atorwastatyny i pozostałych statyn na aktywność płytek krwi oraz wyniki kliniczne [66,67]. Silne inhibitory CYP3A4/5, takie jak ketokonazol oraz itrakonazol, również wpływają na farmakokinetykę oraz farmakodynamikę CLP. W badaniu Farida i wsp. [68] ketokonazol znacząco obniżał C_{maks} oraz AUC aktywnego metabolitu CLP zarówno po podaniu dawki inicjującej, jak i podtrzymującej. Skutkowało to zmniejszeniem antyagregacyjnego działania CLP. U pacjentów zażywających równolegle blokery kanału wapniowego należące do pochodnych dihydropirydyny stwierdzono natomiast gorsze wyniki kliniczne wynikające z niedostatecznego zahamowania agregacji [69,70]. Działanie to jest konsekwencją zdolności brokerów kanału Ca^{2+} do hamowania aktywności CYP3A4. Zarejestrowana w kilku krajach europejskich pochodna kumaryny – fenprokumon (inhibitor CYP3A4 i CYP2C9), stosowana równocześnie z CLP, zmniejsza przeciwapagregacyjne działanie CLP [71]. W niedawno wykonanym badaniu dotyczący wpływu soku grejpfrutowego na farmakokinetykę CLP stwierdzono wyraźnie zmniejszone AUC oraz C_{maks} aktywnego CLPA, przy jednoczesnym zmniejszeniu przeciwpłytkowego działania CLP [72].

Induktory CYP450

Preparaty będące induktorami CYP450 mogą korzystnie wpływać na efekt farmakodynamiczny CLP i tworzenie CLPA. Ziele dziurawca, zawierające indukującą CYP3A4 hyperforynę, przyjmowane przez 14 dni przed podaniem CLP, znacząco obniża reaktywność płytek oraz zwiększa przeciwapagregacyjne działanie CLP [73]. Rifampicyna, inny induktor CYP3A4 oraz CYP2C19, również zwiększa inhibicję agregacji płytek krwi, co wynika bezpośrednio ze zwiększonej biotransformacji CLP do jego aktywnego metabolitu [74].

Pozostałe leki modulujące działanie CLP

Jednym z elementów mechanizmu działania CLP jest zniesienie hamowania CA, zwiększenie stężenia cAMP i powstrzymanie defosforylacji VASP-P (Rysunek 3).

Kofeina, która również podwyższa poziom cAMP w płytkach krwi działa synergistycznie z CLP i wzmaga przeciwagregacyjne działanie tego leku, jednak efekt jest krótkotrwały i utrzymuje się przez 2-4 godziny po podaniu CLP [75]. Wielonienasycone kwasy omega-3, podawane w dawce 1 g/dobę, także zwiększają przeciwplateletowy efekt CLP [76].

2.2. Oporność na CLP – problem współczesnej terapii przeciwplateletowej

Częstość występowania oporności na CLP waha się w granicach 5 – 44 % [77–79]. Zjawisko to może być zdefiniowane jako brak zdolności do zahamowania agregacji płytek krwi w odpowiedzi na ADP, które zwiększa ryzyko wytworzenia się skrzepu i pojawienia się zdarzeń niedokrwienych [80]. Istotne jest więc określenie, czy pacjent dobrze odpowiada na leczenie przeciwplatetowe. Jedną z metod jest porównanie reaktywności płytek krwi przed oraz w trakcie leczenia przeciwagregacyjnego. Na tej podstawie obliczany jest wskaźnik IPA (inhibition of platelet aggregation), który oznacza o ile procent zmniejszyła się agregacja płytek krwi. W zależności od uzyskanego wyniku pacjentów można sklasyfikować jako dobrze odpowiadających na leczenie (IPA>30%) oraz nieodpowiadających na leczenie (IPA<10%) [77]. Osoby o IPA wyższym niż 10%, lecz mniejszym niż 30%, można określić jako częściowo odpowiadające na leczenie. Podział ten nie jest jednak idealny i może prowadzić do błędnego oszacowania ryzyka zdarzeń niedokrwienych. Nie uwzględnia on bowiem przypadków, w których wyjściowa reaktywność płytek jest stosunkowo niska oraz tych w których pomimo wysokiego IPA reaktywność płytek jest nadal wysoka [81]. Stąd, częściej stosowane jest określenie HPR (high on-treatment platelet reactivity – wysoka reaktywność płytek w czasie leczenia), która jest ustalana na podstawie wartości granicznej, charakterystycznej dla danej metody pomiaru agregacji [81]. Wiele badań klinicznych jednoznacznie wiąże HPR z występowaniem ostrego zawału mięśnia sercowego, zakrzepicy stentu, poważnych zdarzeń sercowo-naczyniowych [82–85]. Etiologia HPR jest wieloczynnikowa i składać się na nią mogą czynniki pozagenetyczne, obejmujące stan fizjologiczny pacjenta, przebyte choroby, interakcje lekowe (patrz Rozdział 2.1.6) oraz czynniki genetyczne, które obejmują polimorfizmy i mutacje genów kodujących białka biorące udział we wchłanianiu, metabolicznej aktywacji i działaniu CLP.

2.2.1 Czynniki genetyczne

Polimorfizm genetyczny CYP2C19

CYP2C19 jest zaangażowany w metabolizm wielu leków, między innymi IPP (omeprazol, lansoprazol), leków przeciwpadaczkowych (fenytoina, barbiturany, kwas walproinowy) czy psychotropowych (diazepam, imipramina, sertalina) [86]. Gen kodujący ten enzym znajduje się na chromosomie 10. W jego obrębie wyróżnia się wiele polimorfizmów, które wpływają na zmniejszenie lub amplifikację aktywności enzymatycznej CYP2C19 (Tabela 2).

Tabela 2. Allele *CYP2C19* o znanym wpływie na aktywność enzymu CYP2C19 [87]

Allel	Zmiana sekwencji nukleotydów w cDNA	Zmiana sekwencji aminokwasów	Wpływ na aktywność enzymu
*1 (wt)	-	-	-
*2	681G>A	Błąd w splicingu	Brak aktywności
*3	636G>A	W212X (mutacja nonsensowna)	Brak aktywności
*4	1A>G	M1V	Brak aktywności
*5	1297C>T	R433W	Brak aktywności
*6	395G>A	R132Q	Brak aktywności
*8	358C>T	W120R	Brak aktywności
*9	431G>A	R144H	Zmniejszona
*10	680C>T	P227L	Zmniejszona
*12	1473A>C	X491C	Zmniejszona
*17	-806C>T	-	Zwiększona

A – adenina, C - cysteina (cDNA)/cytozyna (aminokwas), cDNA – komplementarny DNA, G – guanina, H - histydyna, L - leucyna, M - metionina, Q - glutaminian, R - arginina, T – tymina, V - walina, W – tryptofan, X – kodon stop.

Allele, których obecność wiąże się ze zmniejszoną aktywnością enzymatyczną lub całkowitą jej utratą nazywane są niekiedy allelami typu LoF (ang. Loss-of-Function, „utrata funkcji”), natomiast te wpływające na jej zwiększenie określane są mianem GoF (ang. Gain-of-Function, „nabycie funkcji”) [88]. Najczęściej występującymi allelami w populacjach są *2, *3 oraz zwiększający aktywność enzymatyczną *17. W zależności od genotypu można wyróżnić następujące fenotypy CYP2C19: ultra-szybki metabolizer (*17/*17, *1/*17), szybki metabolizer (*1/*1), pośredni metabolizer (*1/LoF) oraz wolny metabolizer (LoF/LoF) [89]. W populacjach pochodzenia kaukaskiego około 2-

5% osób może być zaklasyfikowanych jako wolni metabolizerzy, przy czym w 85% przypadków jest to wynikiem obecności allelu *2 [86]. Znacznie częściej fenotyp ten występuje w populacjach azjatyckich, w których aż 20% osób charakteryzuje się wyraźnie zmniejszoną aktywnością CYP2C19. Z kolei allel *17 występuje stosunkowo rzadko u osób pochodzenia azjatyckiego, przy czym jego częstość w populacjach kaukaskich sięga nawet kilkunastu procent [90,91].

Wpływ genotypu *CYP2C19* na farmakokinetkę, farmakodynamikę oraz skuteczność kliniczną CLP jest dobrze udokumentowany. Ponieważ CYP2C19 jest zaangażowany w obydwa etapy metabolicznej aktywacji CLP, wolni metabolizerzy charakteryzują się zmniejszoną ekspozycją na CLPA [92–95]. Jak wskazują wyniki wielu badań obecność alleli typu LoF oraz fenotyp wolnego metabolizera wiążą się z HPR [92,96–104]. Jedynie Barker i wsp. [105] nie stwierdzili statystycznie istotnej korelacji pomiędzy genotypem a podwyższoną aktywnością płytek. Autorzy zaobserwowali jednak tendencję ku zwiększonej aktywności płytek u pacjentów posiadających dwie kopie LoF *CYP2C19*. Na tej podstawie można przypuszczać, że w wyniku upośledzonej funkcji CYP2C19 przeciwaagregacyjne działanie CLP jest niewystarczające. Niedostateczne zahamowanie agregacji związane z obecnością alleli typu LoF skutkuje częstszym występowaniem działań niepożądanych, takich jak pojawianie się zakrzepów w stentach, zawału mięśnia sercowego czy śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych [92,98,104,106]. Znajduje to potwierdzenie w metaanalizach [102,107,108]. Mega i wsp. [107] obliczyli, że obecność przynajmniej jednego allelu LoF zwiększa 1,55-krotnie ryzyko zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu i śmierci, oraz 2,67-krotnie ryzyko wystąpienia zakrzepicy w stencie. Prawdopodobieństwo wystąpienia powyższych zdarzeń było jeszcze wyższe w przypadku wolnych metabolizerów, odpowiednio 1,76 i 3,97-krotnie. W przypadku populacji azjatyckich, w których allele typu LoF występują znacznie częściej, powikłania spowodowane upośledzoną odpowiedzią na CLP u wolnych metabolizerów są znacznie częstsze [102,108]. Pomimo jednoznacznego związku pomiędzy obecnością alleli LoF a niedostatecznym zahamowaniem aktywności płytek, można znaleźć doniesienia, gdzie nie stwierdzono klinicznego znaczenia genotypu CYP2C19 [109].

Zwiększający aktywność CYP2C19 allel *17 wydaje się posiadać zarówno pozytywny jak i negatywny wpływ na przeciwplatekcyjne działanie CLP. Z jednej strony, ultra-szybcy metabolizerzy charakteryzują się zdecydowanie niższą reaktywnością płytek [97,110,111]. Grosdidier i wsp. [112] zauważyli, że w grupie ultra-szybkich

metabolizerów wyraźnie rzadziej obserwowana jest HPR w porównaniu do pośrednich i wolnych metabolizerów. Li i wsp. [113] oraz Tiroch i wsp. [114] wskazują, że allel *17 może mieć efekt ochronny a u jego nosicieli rzadziej mogą występować takie działania niepożądane jak rewaskularyzacja czy też poważne zdarzenia sercowo naczyniowe. Z drugiej strony, z powodu zwiększonej aktywności CYP2C19, nosiciele allelu *17 są bardziej narażeni na występowanie krwawień [88]. W przypadku homozygot *17/*17 ryzyko wystąpienia krwawienia może wzrastać aż czterokrotnie [115].

Polimorfizm genetyczny pozostałych CYP450

Wpływ polimorfizmu genetycznego pozostałych izoenzymów z rodziny CYP450 biorących udział w metabolizmie CLP nie jest dobrze poznany. Mega i wsp. [92] wskazują, że poza CYP2C19 również mutacje w genie kodującym CYP2B6 mogą zmniejszać skuteczność CLP. U nosicieli alleli *6, *9 oraz *13 zauważono tendencję do niższej ekspozycji na CLPA oraz zmniejszonego zahamowania agregacji, lecz różnice te nie były statystycznie istotne. W przypadku alleli *CYP2C9**2 oraz *3 odnotowano niższe poziomy CLPA oraz zmniejszone wartości jego parametrów farmakokinetycznych ($AUC_{0\rightarrow 24}$ oraz C_{maks}) [93] a także niedostateczne zahamowanie agregacji płytek krwi [93,100]. Według Angiolillo i wsp. [116] mutacja IVS10+12G>A w intronie genu *CYP3A4* powoduje bardziej optymalną odpowiedź na leczenie CLP. Zależności tej nie potwierdzono jednak w innych badaniach klinicznych [98,117–119]. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu polimorfizmu genetycznego *CYP1A2* na efektywność działania CLP [92,93,119,120].

Polimorfizm genetyczny P-gp

Gen kodujący P-gp zlokalizowany jest na chromosomie 7 [121]. W kontekście występowania oporności na CLP najszerszej zbadanym polimorfizmem genu *ABCB1* jest zmiana 3435C>T. Według Tauberta i wsp. [14] genotyp *TT* istotnie wpływa na farmakokinetykę CLP oraz CLPA. Stwierdzono, że wartości AUC oraz C_{maks} leku macierzystego oraz metabolitu miały niższe wartości w porównaniu z homozygotami *CC* oraz heterozygotami. Świadczy to o zmienionym wchłanianiu CLP w przypadku homozygot *TT*. Wynikiem zmniejszonej absorpcji CLP może być zwiększona reaktywność płytek u osób z genotypem *TT* w trakcie leczenia przeciwagregacyjnego [122]. Wyniki badań klinicznych nie są jednak jednoznaczne. Z jednej strony

polimorfizm $3435C>T$ może być jednym z czynników ryzyka śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych, udaru oraz zawału mięśnia sercowego [123,124]. Ponadto w metaanalizie wykonanej przez Su i wsp. [125] stwierdzono niemal dwukrotnie niższe ryzyko krwawień u homozygot TT porównaniu z genotypem CC . Z drugiej strony, powyższa zmiana genetyczna nie może być uważana za samodzielny czynnik prognozujący występowanie poważnych zdarzeń sercowo-naczyniowych. Część badaczy bowiem nie odnotowuje negatywnego wpływu mutacji $3435C>T$ na zmniejszoną skuteczność przeciwzakrzepową CLP i występowanie związanych z tym powikłań [88,92,111,114,126]. Wyniki metaanalizy oceniającej wpływ $3435C>T$ na występowanie zdarzeń niedokrwienych, skrzepów w stentach oraz krwawienia również nie potwierdziły tej zależności [127].

Polimorfizm genetyczny P2Y₁₂ i innych receptorów płytkowych

Gen kodujący receptor P2Y₁₂ znajduje się na chromosomie 3. W jego obrębie można wyróżnić 5 często występujących polimorfizmów, z czego 4 znajdują się w tak zwanej „nierównowadze sprzężeń” (ang. linkage disequilibrium). Na tej podstawie wyodrębnione zostały dwa haplotypy: H1 i H2. W badaniach przeprowadzonych na zdrowych ochotnikach udowodniono, że haplotyp H2 wiąże się z podwyższoną reaktywnością płytek na ADP [128]. Ponadto Staritz i wsp. [129] wykazali, że pacjenci o genotypie H2/H2 znacznie częściej byli oporni na CLP w porównaniu z nosicielami przynajmniej jednego allelu H1. Jednak w pozostałych badaniach klinicznych nie potwierdzono wpływu polimorfizmu genetycznego P2Y₁₂ na agregację płytek i częstość HPR [130–134]. Poza polimorfizmem receptora P2Y₁₂ zbadano również potencjalny wpływ mutacji genetycznych receptora płytkowego GPIIIa, a szczególnie jego mutacji PIA2, na leczenie CLP. Niektórzy autorzy wskazują na tendencję do zwiększonej aktywacji tego receptora u nosicieli PIA2 oraz podwyższoną reaktywność płytek [131,135]. Wyniki te nie znalazły jednak potwierdzenia w najnowszej metaanalizie, w której nie odnotowano znaczącego statystycznie wpływu tego polimorfizmu na występowanie oporności na CLP [136].

Polimorfizm genetyczny PON-1

W 2011 r. Bouman i wsp. [137] opisali wpływ znanych polimorfizmów *PON-1* na bioaktywację CLP. Stwierdzili oni, że u osób posiadających genotyp 192RR

(wiążący się ze zmniejszoną aktywnością enzymu PON-1) ryzyko wystąpienia zakrzepów w stentach było dziesięciokrotnie niższe. Najnowsze badania wskazują jednak, że polimorfizm genetyczny PON-1 nie ma istotnego wpływu na leczenie CLP [138]. Według Hulot i wsp. [95] opisana przez Bouman i wsp. odmiana polimorficzna nie wiąże się ze zmianami w farmakokinetyce izomeru H4 CLPA. Niewątpliwie jest to wynikiem roli PON-1 w metabolizmie CLP (Rozdział 2.1.2). PON-1 katalizuje bowiem poboczną reakcję tworzenia nieaktywnego „endo”-CLP. Nie stwierdzono również wpływu mutacji Q192R na farmakodynamikę CLP [103,139,140].

2.2.2 Czynniki niegenetyczne

Cukrzyca

Cukrzyca (diabetes mellitus, DM), a zwłaszcza cukrzyca typu 2 (T2DM – type 2 diabetes mellitus) jest związana z 2-4 krotnym zwiększeniem ryzyka występowania schorzeń sercowo-naczyniowych [141]. Ze względu na dysfunkcję śródbłonna, stan zapalny charakteryzowany przez takie markery jak interleukina 6 czy białko C-reaktywne (C-reactive proteine, CRP) oraz nadreaktywność płytek, cukrzyca jest określana jako stan prozakrzepowy [142]. Wpływ cukrzycy na odpowiedź na CLP jest szeroko omawiany w piśmiennictwie i dotyczy farmakokinetyki oraz farmakodynamiki a także skuteczności klinicznej. Erlinge i wsp. [143] zauważają, że u pacjentów z cukrzycą stężenia aktywnego metabolitu CLP oznaczone po podaniu dawki 600 mg oraz w trakcie leczenia podtrzymującego, były znacząco niższe niż u pacjentów nieobciążonych tą chorobą. Zmniejszone stężenie CLPA w tej grupie mogło być wynikiem podwyższonej aktywności esterazy hydrolizującej CLP do CLPM. Jednocześnie autorzy zaznaczają, że w badaniach *ex vivo* płytki krwi pacjentów z cukrzycą prawidłowo reagowały na dodanie CLPA. Niemniej podwyższona reaktywność płytek krwi w przebiegu cukrzycy jest odnotowywana w wielu badaniach dotyczących leczenia przeciwplatekowego z użyciem CLP [96,144–147]. Podwyższona reaktywność płytek ma bezpośrednie przełożenie na gorsze wyniki kliniczne. W badaniu PREDICT cukrzyca okazała się być jednym z czynników (obok ostrych zespołów wieńcowych, niewydolności nerek i niewydolności lewokomorowej) które wpływały na aktywność płytek krwi po podaniu dawki 600 mg CLP [85].

Przewlekła niewydolność nerek

U pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (klirens kreatyniny <60 mL/min) po interwencyjnych zabiegach kardiologicznych znacznie częściej występują poważne powikłania takie jak krwawienia oraz zdarzenia niedokrwienne [148]. Keltai i wsp. [149] stwierdzili, że CLP korzystnie wpływa na zmniejszenie ryzyka pojawienia się udaru, zawału mięśnia sercowego oraz śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych u pacjentów w różnych stadiach nefropatii. Jednakże według Best i wsp. [150] w przypadkach łagodnej i umiarkowanej niewydolności nerek skuteczność przeciwplatekowego działania CLP nie różniła się istotnie od placebo. Wyniki badań dotyczące wpływu niewydolności nerek na przeciwplatekową aktywność CLP są niejednoznaczne. Park i wsp. [151] odnotowali, że reaktywność płytek po podaniu CLP jest zwiększona u pacjentów z nefropatiami w porównaniu do osób o prawidłowej funkcji nerek. Ponadto efekt ten nie mógł być przełamany podawaniem wyższej dawki podtrzymującej CLP. Z drugiej strony Motovska i wsp. [152] nie znaleźli korelacji pomiędzy farmakodynamiczną skutecznością CLP a funkcją nerek definiowaną przez stężenie cystatyny C. Należy także zauważyć, że niewydolność nerek jest często skutkiem współwystępowania cukrzycy. Tello-Montoliu i wsp. [153] stwierdzili, że wśród osób z niewydolnością nerek lecz bez cukrzycy, przeciwplatekowa aktywność CLP nie różni się od zmierzonej w grupie osób z prawidłową funkcją nerek. Natomiast u pacjentów z cukrzycą niewydolność nerek znacząco wpływa na podwyższoną agregację płytek krwi i występowanie HPR [154]. Ponadto, w badaniu CHARISMA okazało się, że w przypadku pacjentów z cukrzycą oraz niewydolnością nerek, podawanie CLP może być szkodliwe [155]. Stwierdzono bowiem, że w tej grupie chorych śmiertelność była wyższa w porównaniu do grupy przyjmującej placebo.

Otyłość

Według Bonello i wsp. [156] nadwaga oraz otyłość mogą być jednymi z czynników ryzyka wystąpienia HPR obok cukrzycy i równoczesnego przyjmowania IPP. Ang i wsp. [144] również stwierdzili, że podwyższone BMI było niezależnym predyktorem zmniejszonego zahamowania agregacji. W badaniu Angiolillo i wsp. [157] pacjenci ze wskaźnikiem masy ciała (BMI) >25 kg/m² charakteryzowali się istotnie wyższą reaktywnością płytek w odpowiedzi na ADP. Sibbing i wsp. [158] zauważają, że nawet po podaniu dwukrotnie wyższej dawki inicjującej pacjenci otyli ze STEMI

częściej niedostatecznie reagują na leczenie CLP. Odmienne wyniki przedstawili Gaglia i wsp. [159], którzy stwierdzili brak istotnej korelacji pomiędzy BMI a reaktywnością płytek w trakcie DAT. Paradoksalnie, część badań klinicznych wskazuje, że pomimo potencjalnego związku nadwagi i HPR, u osób z nadwagą oraz otyłych rzadziej występują poważne zdarzenia sercowe po wykonaniu PCI a śmiertelność jest niższa [160]. Ponadto, według Kelly i wsp. [161] u osób otyłych ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$) i bardzo otyłych ($BMI > 40 \text{ kg/m}^2$) rzadziej pojawiały się poważne krwawienia.

Palenie tytoniu

Termin „paradoks palacza” (ang. smoker’s paradox) opisuje zaskakujące zjawisko zmniejszonej śmiertelności po ostrym zawale mięśnia sercowego u osób palących tytoń [162]. Część badaczy uważa, że paradoks dotyczy także przeciwplatekowego działania CLP. Zjawisko to może być związane z indukcją CYP1A2, jednego z enzymów uczestniczących w aktywacji CLP, przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne obecne w dymie tytoniowym [163]. W rezultacie zwiększa się pula CLPA i nasilone zostaje działanie przeciwplatekowe. Badania kliniczne pokazują, że palenie tytoniu wiąże się ze zwiększonym zahamowaniem agregacji płytek krwi a wielkość tego efektu wzrasta z ilością wypalanych na dobę papierosów [164–166]. Ponadto w badaniach farmakokinetycznych obserwowano znacząco niższe AUC nieaktywnego CLPM w grupie palaczy w porównaniu do osób niepalących [167]. Najnowsze wyniki badania PARADOX udowadniają, że palacze mają wyższe stężenia CLPA niż niepalący [168]. Dodatkowo, u osób palących szybciej osiągnana jest odpowiednio niska reaktywność płytek [169]. Modulujący wpływ palenia tytoniu może zależeć w dużym stopniu od polimorfizmu *CYP1A2*. W badaniu przeprowadzonym przez Park i wsp. [170] stwierdzono, że reaktywność płytek była niższa u osób palących, jednak tylko wtedy, gdy pacjent był nosicielem polimorfizmu -163C>A. Co interesujące, po zaprzestaniu palenia tytoniu, jego „dobroczynny” wpływ również ustaje a ryzyko wystąpienia HPR zwiększa się [171]. Pomimo istotnego zmniejszenia reaktywności płytek krwi pod wpływem tytoniu, prawdopodobnie nie skutkuje to obniżeniem częstości występowania zdarzeń sercowo naczyniowych [172]. Ponadto, palacze w większym stopniu narażeni są na ciężkie i umiarkowane krwawienia w czasie leczenia CLP niż osoby niepalące [173].

Fibrynogen i stany zapalne

Fibrynogen, tworzący mostki łączące płytki krwi ze sobą (patrz Rozdział 2.1.3), jest niezbędny do prawidłowego wytworzenia się skrzepu. Podwyższone stężenie fibrynogenu (>375 mg/dL) oraz współwystępująca cukrzyca są czynnikami wiążącymi się z niedostatecznym zahamowaniem agregacji podczas leczenia CLP [144,156,174]. Wytlumaczeniem tego może być stan zapalny często występujący w cukrzycy lub insulinooporność [174]. Tezę o tym, że stan zapalny jest jednym z czynników modulujących odpowiedź na CLP potwierdza badanie Bernlochner i wsp. [175], w którym zmierzoną reaktywność płytek krwi skorelowano ze stężeniem CRP. Zauważono, że stężenie CRP >5 mg/dL, lecz również wyższe poziomy fibrynogenu wpływały na HPR u pacjentów przewlekle leczonych CLP. Najnowsze badania wskazują nawet, że zarówno CRP jak i fibrynogen mogą być lepszymi niż HPR predyktorami występowania oporności na ASA i CLP [176] oraz okołozabiegowego zawału mięśnia sercowego, tworzenia się skrzepów w stentach, udaru oraz śmiertelności [177,178].

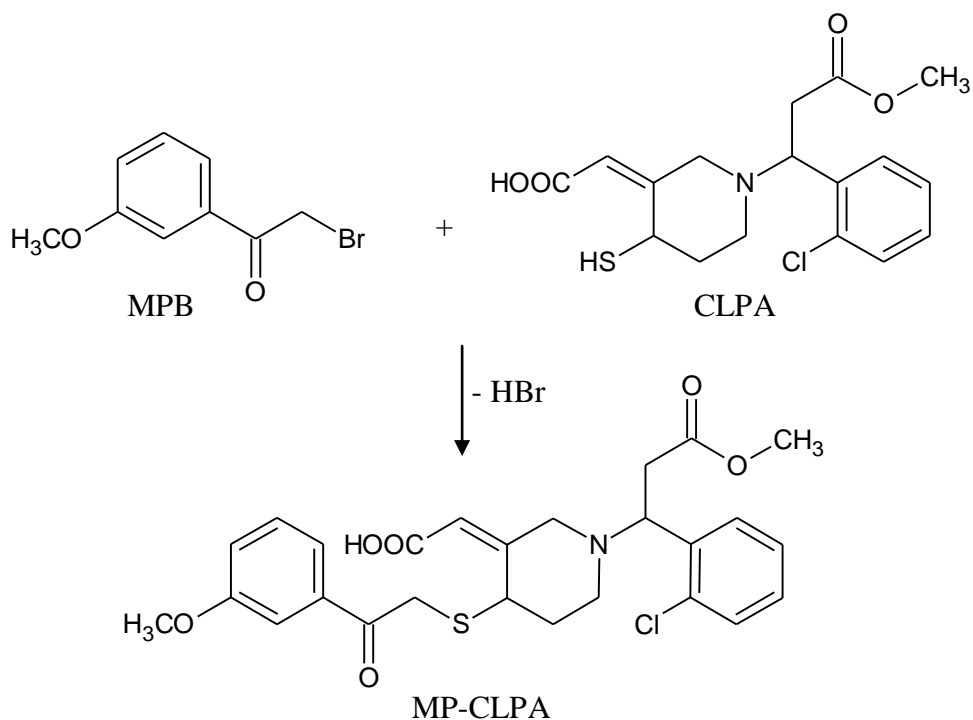
2.3. Metody analityczne stosowane w oznaczaniu CLP i jego metabolitów

Najwyższe stężenia w osoczu, rzędu $\mu\text{g/mL}$, osiąga nieaktywny CLPM, stąd początkowo ten właśnie związek był wykorzystywany do pośredniego wyznaczenia profilu farmakokinetycznego CLP oraz do badania biorównoważności. Bioanalityczne metody oznaczania CLPM obejmowały głównie HPLC oraz HPCE z detektorem UV [29,179–184] oraz GC-MS [185]. Oznaczenie związku macierzystego oraz aktywnego metabolitu, których stężenia w osoczu są niemal tysiąckrotnie niższe niż CLPM, wymaga zastosowania tandemowego detektora mas. Szczegółowy wykaz publikacji opisujących bioanalityczne metody oznaczania CLP i jego metabolitów umieszczono w Tabeli 3. Dodatkową trudność w oznaczaniu CLPA sprawia jego niska stabilność. Ze względu na obecność reaktywnej grupy tiolowej stężenie CLPA w pobranej próbce krwi gwałtownie maleje i po 10 minutach osiąga wartość mniejszą niż 80% wyjściowego stężenia [24]. Niezbędna jest zatem jego stabilizacja, przez dodanie 2-bromo-3'-metoksyacetofenonu (MPB) do pełnej krwi. W tej reakcji powstają pochodne metoksyfenonowe aktywnego metabolitu (MP-CLPA) (Rysunek 4).

Tabela 3. Metody bioanalityczne stosowane do oznaczania CLP i jego metabolitów

Źródło	Anality	Warunki oznaczania	Zakres krzywych wzorcowych
Lagorce i wsp. [185]	CLPM	GC-MS	5 – 250 ng/mL
Bahrami i wsp. [29]	CLPM	HPLC-UV	0,05 – 10 µg/mL
Rouini i wsp. [181]	CLPM	HPLC-UV	0,02 – 3 µg/mL
Singh i wsp. [180]	CLPM	HPLC-UV	0,125 – 32 µg/mL
Souri i wsp. [179]	CLPM	HPLC-UV	0,2 – 10 µg/mL
Karaźniewicz-Łada i wsp. [182]	CLP CLPM*	HPCE-DAD	0,5 – 10 µg/mL (CLP) 0,25 – 20 µg/mL (CLPM)
Serra i wsp. [184]	CLP CLPM	HPCE-DAD	2 – 100 µM
Ksycińska i wsp. [186]	CLP CLPM*	HPLC-MS	0,02 – 3 µg/mL
Lainesse i wsp. [187]	CLP	HPLC-MS/MS	0,02 – 10 ng/mL
Mani i wsp. [188]	CLP CLPM	HPLC-MS/MS	0,25 – 50 ng/mL (CLP) 0,025 – 3 µg/mL (CLPM)
Nirogi i wsp. [11]	CLP	HPLC-MS/MS	0,005 – 6 ng/mL
Robinson i wsp. [189]	CLP	HPLC-MS/MS	0,01 – 12 ng/mL
Silvestro i wsp. [190]	CLP CLPM	HPLC-MS/MS	0,05 – 30 ng/mL (CLP) 0,005 – 3 µg/mL (CLPM)
Taubert i wsp. [27]	CLP CLPM CLPA**	HPLC-MS/MS	0,5 – 100 ng/mL (CLP) 0,5 – 150 µg/mL (CLPM)
Takahashi i wsp. [24]	MP-CLPA	HPLC-MS/MS	1 – 250 ng/mL
Delavenne i wsp. [25]	MP-CLPA	UPLC-MS/MS	0,8 – 100 ng/mL
Peer i wsp. [191]	CLP MP-CLPA	UPLC-MS/MS	0,01 – 50 ng/mL (CLP) 0,1 – 150 ng/mL (MP-CLPA)
Tuffal i wsp. [21]	MP-H1 MP-H2 MP-H3* MP-H4*	UPLC-MS/MS	0,5 – 250 ng/mL

* analit oznaczalny daną metodą w warunkach klinicznych ** - stężenia CLPA oznaczane przy użyciu krzywej wzorcowej dla CLP



Rysunek 4: Reakcja derywatywacji CLPA do pochodnej metoksyfenonowej (MP-CLPA) z wykorzystaniem MPB

2.4. Metody pomiaru agregacji płytek krwi

2.4.1 Techniki agregometryczne

Agregometria świetlna

„Złotym standardem” pomiaru agregacji płytek krwi jest metoda agregometrii świetlnej (optycznej, turbidymetrycznej) (LTA – light transmittance aggregometry). Metoda ta opiera się na pomiarze transmisji światła widzialnego ($\lambda=620$ nm) przez zawiesinę płytek krwi, którą zadaje się odpowiednią ilością ADP (najczęściej w stężeniach 5 – 20 μM), jako czynnika pobudzającego agregację [192]. Uzyskany wynik porównywany jest do absorbancji osocza ubogopłytkowego, która jest uznawana za maksymalną agregację (100%). W chwili obecnej wartością graniczną, która wskazuje na nieefektywne leczenie przeciwplatekcyjne jest 46% maksymalnej agregacji po stymulacji 5 μM ADP [81]. Metoda ta nie jest jednak pozbawiona wad, wymaga bowiem dużych objętości pobieranej krwi i jest czasochłonna. Poza tym niezwykle problematyczny jest brak standaryzacji procedury pomiarowej pomiędzy poszczególnymi laboratoriami np. dotyczące ujednoczenia stężenia płytek krwi w próbce [193].

2.4.2 Metody „point-of-care”

Metody „point-of-care” umożliwiają oznaczenie agregacji „przyłóżkowo”, bezpośrednio po pobraniu próbki krwi. Ich wspólną cechą jest prosta obsługa, brak konieczności specjalistycznego przeszkolenia oraz krótki czas oznaczania, najczęściej nieprzekraczający 10 minut [194].

VerifyNow

Metoda VerifyNow (Accumetrics, USA) opiera się na tej samej zasadzie pomiarowej, co LTA [195]. Do oceny skuteczności przeciwaagregacyjnej CLP oraz pozostałych pochodnych tienopirydyny wykorzystywany jest specjalny zestaw testowy VerifyNow P2Y12. Wynik podawany jest w jednostkach PRU (P2Y12 reaction units), przy czym wartości powyżej 240 PRU wskazują na ryzyko wystąpienia zdarzeń zakrzepowych u pacjenta [81]. Wadą tego systemu jest niestety stosunkowo wysoki koszt oznaczania próbek.

Metoda potencjometrii impedancyjnej

Metoda potencjometrii impedancyjnej polega na pomiarze oporu elektrycznego (impedancji) pomiędzy dwoma elektrodami zanurzonymi w odpowiednio przygotowanej próbce krwi. Pod wpływem dodanego do próbki krwi aktywatora agregacji (w przypadku CLP jest to ADP), płytki krwi osadzają się na elektrodach, zwiększając tym samym mierzoną impedancję [196,197]. Najbardziej znanym systemem umożliwiającym oznaczanie agregacji tym sposobem jest analizator Multiplate® (Roche Diagnostics, Germany). Wynik zobrazowany jest jako pole powierzchni pod krzywą arbitralnych jednostek agregacji (AU) względem czasu. Za wartość progową, powyżej której można stwierdzić występowanie oporności na CLP uznaje się 486 AU·min [81].

Analizator funkcji płytek PFA-100

Analizator PFA-100 (Siemens Healthcare Diagnostics, USA) symuluje naturalne procesy fizjologiczne, którym podlegają płytki krwi podczas uszkodzenia naczynia [198]. Krew przepuszczana jest przez znajdującą się w kasecie pomiarowej kapilarę. Pod wpływem agonistów (kolagen i ADP lub kolagen i epinefryna) oraz naprężenia ścinającego następuje agregacja płytek krwi i zatrzymanie dalszego przepływu. Czas

okluzji (CT) dłuższy niż 106 sekund wskazuje na prawidłową reakcję na leczenie [199]. Wynik testu może być jednak niedokładny, gdy hematokryt osoby badanej oraz liczba płytek krwi i czynnik von Willebranda są podwyższone.

Tromboelastografia

Metoda ta pozwala na ogólną ocenę procesu hemostazy poprzez dynamikę tworzenia skrzepu, jego stabilizacji i proces fibrynolizy [200]. Próbkę krwi do której dodano agonistę (ADP) wprowadzając ją w powolny ruch oscylacyjny, imitujący przepływ krwi w żyłę. Skrzep formuje się na metalowej sondzie, która przekazuje dane dotyczące tworzenia skrzepu do systemu komputerowego. Zastosowanie tromboelastografii do oceny agregacji jest ograniczone a liczba badań dotyczących jej wykorzystania jest niewielka [194].

2.4.3 Metody cytometrii przepływowej

Przy pomocy cytometrii przepływowej możliwa jest ocena fosforylacji białka VASP. Poza ADP czynnikiem stymulującym agregację jest prostaglandyna E₁ (PGE₁), która zwiększa aktywność cykazy adenylowej. Zwiększone stężenie cAMP w komórce powoduje fosforylację białka VASP a także hamuje uwalnianie jonów Ca²⁺ (2.1.3). VASP-P jest znakowane odpowiednimi przeciwciałami IgG. Jest to jedyna metoda pomiarowa, która jest specyficzna dla agregacji wywołanej przez agonistów receptora P2Y₁₂ i nie jest zależna od czynników aktywujących receptor P2Y₁ [81]. Wynik końcowy przedstawiany jest jako współczynnik reaktywności (PRI – platelet reactivity index) będący stosunkiem poziomu fosforylacji VASP po zastosowaniu ADP i PGE₁ oraz poziomu fosforylacji VASP po dodaniu wyłącznie PGE₁. Obecnie uznaje się, że PRI>50% wskazuje na występowanie HPR [81]. Ocena fosforylacji VASP uznawana jest za najlepszą, obok LTE, metodę określenia oporności na CLP. Jednakże skomplikowany proces przygotowywania próbek oraz bardzo wysoki koszt aparatury stanowi poważne ograniczenie w rutynowym stosowaniu tej metody [194].

3. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie korelacji farmakokinetyczno-farmakodynamicznej dla klopidogrelu oraz jego metabolitów, uwzględniając wpływ polimorfizmu genetycznego izoenzymu CYP2C19 oraz glikoproteiny P w kontekście poszukiwania przyczyn występowania oporności na ten lek u pacjentów ze schorzeniami układu sercowo-naczyniowego.

Cel pracy był realizowany przez następujące zadania badawcze:

- Opracowanie metody HPLC-MS/MS oznaczania S-(+)-klopidogrelu, karboksymetabolitu oraz pochodnych izomerów aktywnego metabolitu tiolowego klopidogrelu w osoczu.
- Walidacja metody obejmująca wyznaczenie parametrów określających: liniowość, oznaczalność, precyzję, dokładność, powtarzalność, stabilność.
- Oznaczanie CLP, CLPM i izomerów CLPA w próbkach osocza pobranych od pacjentów po jednorazowym podaniu klopidogrelu w dawce wysycającej 300 mg lub po podaniu dawki podtrzymującej 75 mg.
- Obliczenie parametrów farmakokinetycznych przy pomocy programu WinNonlin.
- Oznaczenie agregacji płytek krwi metodą agregometrii impedancyjnej.
- Oznaczenie genotypu *CYP2C19*2*, *CYP2C19*17* oraz *ABCB1 3435C>T* u pacjentów.
- Ocena wpływu polimorfizmu genetycznego CYP2C19 i glikoproteiny P na farmakokinetykę i efekt farmakodynamiczny klopidogrelu i jego metabolitów.

4. Część doświadczalna

4.1. Aparatura i odczynniki

4.1.1 Aparatura i sprzęt laboratoryjny stosowane w metodach HPLC-MS/MS i HPCE

- chromatograf cieczowy Agilent 1200 z detektorem ESI-MS/MS 6410 B Triple Quad (Agilent Technologies, Niemcy) sterowany za pomocą oprogramowania MassHunter
- kolumna chromatograficzna Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm, 3,5 μ m) (Agilent Technologies, Niemcy)
- aparat do elektroforezy kapilarnej Agilent ^{3D}CE (Agilent Technologies, Niemcy), wyposażony w detektor diodowy (DAD), termostat i hydrodynamiczny system wprowadzania próbek, sterowany za pomocą oprogramowania ChemStation
- kapilary krzemionkowe o średnicy 50 μ m (Agilent Technologies, Niemcy)
- wirówka Centrifuge 5804 (Eppendorf, Niemcy)
- wytrząsarka typ 358s (Elpan, Polska)
- wirówka próżniowa: miVac Duo (Genevac, USA)
- wirówka EBA 12R (Hettich, Szwajcaria)
- filtry bezstrzykawkowe Whatman Mini-Uni Prep, 0,45 μ m RC (Agilent Technologies, Wielka Brytania)
- waga analityczna Sartorius BP 100 S (Sartorius, Niemcy)
- mini wytrząsarka Minishaker MS-2 (IKA-Works Inc, USA)
- aparat do dejonizacji wody Simplicity UV (Millipore, USA)
- zestaw do sączenia (Sartorius, Niemcy)
- sączki celulozowe o średnicy porów 0,45 μ m (Sartorius, Niemcy)
- systemy aspiracyjno-próżniowe do pobierania krwi Monovette-Hematology, zawierające EDTA, o pojemności 7,5 mL (Sarstedt, Niemcy)
- urządzenie do odparowywania rozpuszczalników organicznych pod strumieniem azotu, Sample Concentrator DB3 (Techne, Wielka Brytania)
- kolumny SPE Bakerbond C-18, o pojemności 1 mL, zawierające 100 mg fazy stacjonarnej (J.T. Baker, Holandia)
- pH-metr CyberScan 510 (Eutech Instruments, Singapur)
- próbki typu Easy-cap 1,5 mL (Sarstedt, Niemcy)

- zestaw pipet automatycznych 0,5 – 5000 μ L (Eppendorf, Niemcy)
- zestaw szkła laboratoryjnego

4.1.2 Aparatura i sprzęt laboratoryjny stosowane w badaniu genotypu

- termocykler Mastercycler, EP Gradient S (Eppendorf, Niemcy)
- zestaw do przeprowadzania elektroforezy obejmujący aparat do elektroforezy SUBDNA (Kucharczyk, Polska) oraz zasilacz Elite 300 (Wealtec, USA)
- termomikser Thermomixer Comfort (Eppendorf, Niemcy)
- komora UV do wizualizacji EpiChemi3 Darkroom wraz z oprogramowaniem LabWorks (UPV, USA)
- mikrowirówka MiniSpin (Eppendorf, Niemcy)
- probówki do PCR o pojemności 0,2 mL (Axygen Inc., USA)
- program do odczytu wyników sekwencjonowania: FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc., USA)
- programy do analizy sekwencji kwasów nukleinowych: Sequence Scanner 1.0 (Applied Biosystems, USA), MegAlign 5.05 (DNASTAR, USA)

4.1.3 Odczynniki stosowane w metodach HPLC-MS/MS i HPCE

- wzorzec CLP o czystości 99% (Instytut Farmaceutyczny, Polska)
- wzorzec CLPM o czystości 99,6% (Instytut Farmaceutyczny, Polska)
- wzorce zderywatyzowanych izomerów aktywnego metabolitu tiolowego
 - mieszanina 3'-metoksyacetofenonowych pochodnych stereo izomerów H1 i H2 (MP-H1+MP-H2) (Alsachim, Francja)
 - 3'-metoksyacetofenonowa pochodna stereoizomeru H3 (MP-H3) (Sanofi-Aventis, Francja)
 - 3'-metoksyacetofenonowa pochodna stereoizomeru H4(MP-H4) (Sanofi-Aventis, Francja)
- 2-bromo-3'-metoksyacetofenon o czystości 98% (Sigma Aldrich, Niemcy)
- piroksykam (Jelfa S.A., Polska)
- acetonitryl o czystości gradientowej (Merck, Niemcy)
- metanol o czystości wymaganej do HPLC (Merck, Niemcy)
- woda o czystości do HPCE (Agilent, Niemcy)
- kwas mrówkowy o czystości >95% (Sigma Aldrich, Niemcy)

- osocze wolne od leków (Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu, Polska)
- wodorofosforan disodu Na_2HPO_4 (Fluka Chemie GmbH, Szwajcaria)
- diwodorofosforan potasu KH_2PO_4 (Xenon, Polska)
- azot sprężony (Messer Polska, Polska)
- 1,0 M i 0,1 M wodorotlenek sodu (Agilent Technologies, Niemcy)
- bufor fosforanowy 50 mM do elektroforezy kapilarnej o $\text{pH} = 2,5$ (Agilent Technologies, Niemcy)
- bufor fosforanowy o $\text{pH} = 5$ sporządzony przez zmieszanie 24,76 mL 1/15 M roztworu KH_2PO_4 z 0,24 mL 1/15 M roztworu Na_2HPO_4

4.1.4 Odczynniki stosowane w badaniu genotypu

- zestaw do izolacji genomowego DNA z pełnej krwi AxyPrep Miniprep (Axygen Biosciences, USA)
- zestaw do prowadzenia reakcji PCR AmpliKIT AllegroTaq (Novazym, Polska), w skład którego wchodziły:
 - polimeraza AllegroTaq o stężeniu $5\text{U}/\mu\text{L}$
 - bufor reakcyjny 10-krotnie stężony o składzie: 700 mM Tris-HCl, 166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 mM MgCl_2 , $\text{pH} 8,6$
 - bufor reakcyjny 10-krotnie stężony o składzie: 700 mM Tris-HCl, 166 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{pH} 8,6$
 - MgCl_2 o stężeniu 25 mM
 - mieszanina dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) o stężeniu 25 mM
 - woda jałowa uzyskana w warunkach laboratoryjnych przy pomocy autoklawu
- enzym restrykcyjny Sau3AI wraz z buforem A (Roche Diagnostics GmbH, Niemcy)
- enzym restrykcyjny SmaI wraz z buforem T + 0,1% BSA (TaKaRa, Japonia)
- agaroz (BioShop Canada Inc., Kanada)
- bufor TBE (Tris-Boric Acid-EDTA) o składzie Tris – 89 mmol/l; kwas borowy – 89 mmol/l; EDTA – 2 mmol/l (BioShop Canada Inc., Kanada)
- marker masy DNA 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne, Estonia)
- bufor obciążający Blue Loading Dye Buffer (Solis BioDyne, Estonia)

- bromek etydyny (EtBr) (Sigma, USA)
- startery do PCR dostarczane w postaci liofilizowanej (Oligo, Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN, Polska), rozpuszczone w wodzie jałowej do stężenia 100 μM .

4.2. Metoda HPLC-MS/MS oznaczania CLP, CLPM i zderywatyzowanych izomerów CLPA w osoczu*

4.2.1 Warunki pracy aparatu HPLC

Rozdział analitów przeprowadzono na kolumnie Zorbax Eclipse Plus C18, wypełnionej żelalem krzemionkowym modyfikowanym chemicznie grupami oktadecylowymi. Średnica ziaren żelu wynosiła 3,5 μm . Warunki pracy chromatografu:

- Skład fazy ruchomej: A – woda z dodatkiem kwasu mrówkowego o stężeniu 0,1%, B – ACN z dodatkiem kwasu mrówkowego o stężeniu 0,1%; elucja gradientowa 42 – 90% fazy B od 0 do 7 minuty, następnie 90 – 42% fazy B od 7 do 7,5 minuty
- Szybkość przepływu fazy ruchomej: 0,35 mL/min
- Temperatura kolumny: 40⁰C
- Objętość nastrzyku: 25 μL
- Czas analizy: 7,5 minuty.

Jonizację cząsteczek analitów w detektorze MS/MS uzyskiwano poprzez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI+) z użyciem azotu. Parametry detektora MS/MS:

- temperatura gazu: 300⁰C
- przepływ gazu: 10 L/min
- ciśnienie nebulizera: 40 psi (275,8 kPa)
- napięcie na końcach kapilary: 4000 V.

Dla każdego z analitów monitorowano przejścia jonowe w trybie reakcji następczych (MRM), a identyfikacji dokonywano na podstawie stosunku masy

* Metodyka oznaczania CLP i jego metabolitów oraz wyniki walidacji zostały opublikowane: Karaźniewicz-Lada M., Danielak D., Teżyk A., Żaba C., Tuffal G., Głowska F. HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of clopidogrel, its carboxylic acid metabolite and derivatized thiol metabolite isomers in human plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012,911:105-12

otrzymywanych jonów do ich ładunku. Parametry detekcji dla każdego związku zawarto w Tabeli 4. Do analizy ilościowej wybrano przejścia charakteryzujące się największą intensywnością.

Tabela 4. Parametry detekcji CLP i jego metabolitów

Analit	Jon macierzysty (m/z)	Jon potomny (m/z)	Napięcie fragmentora [V]	Energia kolizji [V]
CLP	322,1	212	96	13
	322,1	184	96	21
	322,1	155	96	37
MP-H1, MP-H2, MP-H3, MP-H4	504,1	354,1	144	17
	504,1	212	144	25
	504,1	155	144	45
CLPM	308,1	198	100	13
	308,1	152	100	21
	308,1	125	100	41
PRX	332,1	121	100	25
	332,1	95	100	17

Przejścia zaznaczone wytłuszczoną czcionką wykorzystano do analizy ilościowej.

4.2.2 Roztwory podstawowe i wzorcowe

Roztwory podstawowe CLP, CLPM, MP-H1 + MP-H2, MP-H3 i MP-H4 oraz wzorca wewnętrznego (IS) - PRX zostały sporządzone przez rozpuszczenie odpowiedniej odważki analitu w bezwodnym acetonitrylu. Stężenie analitów w roztworach podstawowych wynosiło odpowiednio:

- CLP - 500 µg/mL
- CLPM, MP-H1 + MP-H2, MP-H3 i MP-H4 - 200 µg/mL
- IS - 1000 µg/mL.

Następnie przygotowano roztwory wzorcowe poprzez rozcieńczenie roztworów podstawowych bezwodnym acetonitrylem. Stężenia sporządzonych roztworów wzorcowych wynosiły odpowiednio:

- CLP - 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 25,0; 37,5; 50,0 ng/mL
- MP-H3 oraz MP-H4: 2,5; 5,0; 25,0; 50,0; 125,0; 250,0; 500,0 ng/mL
- CLPM - 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 75,0; 100,0 µg/mL
- IS - 1000 ng/mL.

4.2.3 Przygotowanie próbek do krzywej wzorcowej

Do 250 μL osocza wolnego od leków dodawano 25 μL roztworu wzorcowego analitu oraz 25 μL roztworu IS. Uzyskane w ten sposób próbki zawierały wszystkie badane anality w stężeniach:

- CLP - 0,1; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,5; 3,75; 5,0 ng/mL
- MP-H3 oraz MP-H4: 0,25; 0,50; 2,5; 5,0; 12,5; 25,0; 50,0 ng/mL
- CLPM - 50; 100; 500; 1000; 5000; 7500; 10000 ng/mL
- IS - 100 ng/mL.

Następnie wytrącano białka zawarte w osoczu poprzez dodanie 450 μL bezwodnego ACN i intensywne wytrząsanie przez 30 s. Powstały osad odwirowywano przez 10 min przy 22570 \times g w temperaturze 20 $^{\circ}\text{C}$. Supernatant dodatkowo filtrowano przy pomocy systemów bezstrzykawkowych Mini-Uni Prep. Uzyskany filtrat odparowywano w warunkach próżniowych w temperaturze 40 $^{\circ}\text{C}$. Suchą pozostałość rozpuszczano w 200 μL fazy ruchomej (100 μL fazy A oraz 100 μL fazy B) a następnie 25 μL nastrzykiwano do kolumny chromatograficznej. W analogiczny sposób przygotowywano próbkę zerową oraz próbkę ślepą. W przypadku próbki zerowej do 250 μL osocza dodawano 25 μL roztworu IS oraz 475 μL ACN, natomiast próbka ślepa zawierała 250 μL osocza oraz 500 μL ACN.

4.2.4 Walidacja metody HPLC-MS/MS

Wyznaczono następujące parametry walidacyjne opracowanej metody HPLC-MS/MS oznaczania CLP i jego metabolitów w osoczu ludzkim: selektywność, liniowość, precyzję i dokładność, wykrywalność (LOD) oraz oznaczalność (LOQ), stabilność i efekt matrycowy.

Selektywność

Selektywność metody została określona poprzez porównanie chromatogramu uzyskanego po nastrzyknięciu próbki ślepej z chromatogramami otrzymanymi po obciążeniu osocza CLP, CLPM, zderywatyzowanymi izomerami CLPA oraz IS. Interferencje pochodzące od matrycy zbadano wykorzystując próbki przygotowane z użyciem osocza nieobciążonego lekami pochodzącego od 6 różnych probantów. Sprawdzone też możliwość występowania interferencji pochodzących od substancji

lecznicych podawanych w czasie terapii CLP tj. amiodaronu, amlodypiny, atorwastatyny, betahistyny, doksazosyny, furosemidu, hydrochlorotiazidu, kwasu salicylowego, metforminy, metoprololu, omeprazolu, pantoprazolu, perindoprylu, ramiprylu, rosuwastatyny, simwastatyny i telmisartanu.

Liniowość

Krzywe wzorcowe CLP, CLPM, MP-H3 i MP-H4 zostały przedstawione jako zależność stosunku pola powierzchni piku analitów i pola powierzchni piku IS. Zakres krzywych wzorcowych obejmował stężenia: 0,25 - 5,0 ng/mL dla CLP, 0,25 - 50,0 ng/mL dla MP-H3 i MP-H4 oraz 50 - 10000 ng/mL dla CLPM. Metodą najmniejszych kwadratów wyznaczono parametry regresyjne krzywych wzorcowych: współczynnik kierunkowy - a , współczynnik przesunięcia - b oraz współczynnik korelacji - r . Statystyczną istotność współczynnika b określono za pomocą testu t-Studenta. Wartość testową f , obliczano ze wzoru:

$$f = \frac{|b|}{S_b}$$

gdzie: f - wartość testowa, $|b|$ - wartość bezwzględna współczynnika przesunięcia, S_b - błąd standardowy odciętej.

Następnie obliczoną wartość f porównywano z wartością $t_{\alpha,n}$ odczytaną z tabel dla $n-2$ stopni swobody (n - ilość punktów krzywej wzorcowej) przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Liniowość krzywych wzorcowych potwierdzono za pomocą testu Mandela (*Mandel's fitting test*), przy poziomie ufności 95%. O liniowości metody świadczyła wartość testowa $TV < F_{kryt}$ [201].

Oznaczalność (LOQ), precyzja i dokładność

LOQ określono jako najmniejsze stężenie analitu, które można oznaczyć z odpowiednią precyzją (współczynnik zmienności $WZ \leq 20\%$) oraz dokładnością (błąd względny $\leq 20\%$).

Precyzję metody wyrażono jako współczynnik zmienności (WZ):

$$WZ = \frac{SD}{C_{\text{sr}}} \cdot 100 \%$$

gdzie: WZ - współczynnik zmienności [%], SD - odchylenie standardowe oznaczonych stężeń analitu, C_{sr} - średnie oznaczone stężenie analitu.

Dokładność oznaczeń wyrażono jako błąd względny:

$$\text{błąd} = \frac{|C_{\text{sr}} - C_{\text{nom}}|}{C_{\text{nom}}} \cdot 100\%$$

gdzie: błąd - błąd względny [%], C_{sr} - średnie oznaczone stężenie, C_{nom} - stężenie nominalne.

Zarówno precyzję, jak i dokładność metody w ciągu dnia (intraday) obliczono dla czterech różnych stężeń (wysokie, średnie, niskie i LOQ) każdego z analitów, poprzez oznaczenie 5 niezależnych próbek o danym stężeniu przygotowanych zgodnie z wcześniej opisaną procedurą (4.2.3). Precyzję i dokładność metody pomiędzy dniami (interday) wyznaczono natomiast dla wszystkich nominalnych stężeń z krzywych wzorcowych analitów. Metodę uznawano za dostatecznie dokładną i precyzyjną, jeżeli WZ i błąd względny były mniejsze niż 15%, z wyłączeniem LOQ (20%).

Stabilność

Stabilność CLP, CLPM, MP-H3 i MP-H4 określano dla dwóch stężeń (niskiego i wysokiego), przez porównanie stężeń analitów oznaczonych w próbkach przechowywanych w określonych poniżej warunkach, ze stężeniami oznaczanymi w próbkach przygotowanych bezpośrednio przed analizą. Próbkę uznawano za stabilną w warunkach przechowywania, jeżeli ich stężenie nie zmieniło się o więcej niż $\pm 15\%$ w porównaniu do stężenia oznaczonego w próbkach przygotowanych bezpośrednio przed analizą. Analizowano wpływ następujących warunków na trwałość analitów:

- przechowywanie próbki w temperaturze pokojowej przez 24 godziny (short term stability)
- przechowywanie próbki w temperaturze -25°C przez okres 3 miesięcy (long term stability)
- trzykrotny cykl zamrażania i rozmrażania (freeze-thaw stability)

- trwałość przygotowanych próbek w autosamplerze przez 6 godzin w temperaturze pokojowej (autosampler stability).

Efekt matrycy (MF)

MF został obliczony przez porównanie pola powierzchni piku analitu z próbki przygotowanej wg procedury 4.2.3 z polami powierzchni uzyskanymi po nastrzyknięciu próbki, w której matrycą zamiast osocza była woda. Analiza została wykonana dla dwóch poziomów stężeń - niskiego i wysokiego. Obliczony dla każdego analitu MF podzielono następnie przez MF wzorca wewnętrznego. Uzyskany w ten sposób znormalizowany MF porównywano dla próbek przygotowanych z użyciem osocza wolnego od leków pochodzącego od sześciu różnych probantów. WZ znormalizowanego MF nie powinno przekraczać 15% [202].

4.3. Metoda HPCE oznaczania CLPM w osoczu

4.3.1 Warunki pracy aparatu HPCE

Rozdział analitów następował w kapilarze krzemionkowej o średnicy 50 μm i efektywnej długości 26,5 cm, wypełnionej 0,025 mM buforem fosforanowym o pH = 2,5 (BGE). Kapilara w czasie trwania analizy była utrzymywana w temperaturze 25⁰C natomiast przyłożone napięcie wynosiło 25 kV. Oznaczanie analitów prowadzono przy długości fali $\lambda = 220$ nm. Przed każdym nastrzyknięciem próbki kapilara była przepłukiwana przez 2 min - 0,1 M NaOH, a następnie przez 5 min wodą oraz 5 min - BGE. Zakres krzywych wzorcowych obejmował stężenia 0,5 - 10 $\mu\text{g/mL}$ CLP oraz 0,25 - 20 $\mu\text{g/mL}$ CLPM.

4.3.2 Przygotowanie próbek kontrolnych

Do 1 mL osocza dodawano 50 μL metanolowego roztworu IS (PRX o stężeniu 200 $\mu\text{g/mL}$) oraz 50 μL roztworu wzorcowego CLP i CLPM. Roztwory wzorcowe przygotowano w metanolu i obejmowały stężenia 20,0; 50,0 i 100,0 $\mu\text{g/mL}$ CLP i CLPM. Następnie, do osocza obciążonego analitami i IS dodawano 1 mL buforu fosforanowego o pH = 5. Próbkę nanoszono na kolumnienki do ekstrakcji SPE wypełnione krzemionką chemicznie związaną z fazą C₁₈. Kolumnienki były uprzednio

aktywowane 2×1 mL metanolu i 2×1 mL wody. Zanieczyszczenia odmywano przy pomocy 2×1 mL wody, a następnie anality eluowano metanolem (2×0,5 mL). Eluat odparowywano pod strumieniem azotu w temperaturze 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 50 µL metanolu i 50 µL BGE.

4.3.3 Precyzja i dokładność metody HPCE

Precyzję i dokładność w ciągu dnia wyznaczono dla 5 niezależnych powtórzeń próbek kontrolnych. Wyznaczony WZ i błąd względny nie powinny przekraczać 15%.

4.4. Oznaczanie CLP i jego metabolitów w osoczu pacjentów ze schorzeniami sercowo-naczyniowymi

4.4.1 Charakterystyka grupy badanej

W badaniu uczestniczyli pacjenci, poddawani zabiegom planowanej koronarografii, przezskórnej interwencji wieńcowej (PCI), wprowadzania stentów do tętnic szyjnych (CAS) lub interwencjom tętnic obwodowych. Grupa badana obejmowała 17 pacjentów Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, którym podano CLP w dawce inicjującej 300 mg, oraz 45 pacjentów Katedry i Kliniki Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, którzy przyjmowali CLP w dawce podtrzymującej 75 mg/dobę przez co najmniej 1 tydzień przed rozpoczęciem badania. Lek każdorazowo był podawany na czczo. Z badania wykluczono pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego, przyjmujących doustne leki przeciwagregacyjne z grupy pochodnych kumaryny lub inne niż CLP leki przeciwplatekcyjne (z wyłączeniem ASA), zaburzeniami pracy wątroby, zaburzeniem czynności nerek (stężenie kreatyniny w osoczu > 2 mg/dL) oraz o liczbie płytek krwi < 10⁵/µL. Szczegółowy opis grupy badanej zamieszczono w Tabeli 5. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic wieku, masy ciała oraz BMI pomiędzy badanymi grupami. Poza CLP wszyscy zakwalifikowani do badania pacjenci zażywali ASA w dawce przynajmniej 75 mg/dobę. Próbkę krwi były pobierane bezpośrednio przed podaniem oraz 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 12,0 i 24,0 h po podaniu leku. Próbkę krwi każdorazowo pobierano do systemów aspiracyjno-próżniowych

zawierających EDTA. W celu stabilizacji nietrwałego aktywnego metabolitu CLP, do systemów dodawano odczynnik derywatyzujący, którym był 500 mM acetonitrylowy roztwór MPB w ilości 37,5 μ L na 7,5 mL pełnej krwi [24]. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Załącznik 1).

Tabela 5. Charakterystyka pacjentów biorących udział w badaniu

Dawka CLP [mg]	75 (n=45)	300 (n=17)
Wiek* [lata]	63,0 \pm 8,5	64,9 \pm 9,9
Masa ciała* [kg]	81,8 \pm 13,3	80,4 \pm 6,6
BMI* [kg/m ²]	27,8 \pm 5,4	27,8 \pm 3,2
Kobiety	14	0
Nadciśnienie tętnicze	37	8
Hipercholesterolemia	7	2
Cukrzyca lub nietolerancja glukozy	16	6
Dyslipidemia	8	8
PPI	18	4
Statyny	42	14
Beta blokery	37	7
Inhibitory ACE	30	9

*wiek, masę ciała oraz BMI podano jako średnie wraz z odchyleniami standardowymi

4.4.2 Oznaczanie CLP i jego metabolitów w osoczu pacjentów

Do oznaczania CLP i jego metabolitów w próbkach, do których dodany został MPB, stosowano metodę HPLC-MS/MS. próbki osocza pobrane od pacjentów były przygotowywane zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.2.3. Zamiast 25 μ L roztworów wzorcowych analitów, do próbki dodawano 25 μ L ACN. Równolegle z próbkami pochodzącymi od pacjentów przygotowywano krzywą wzorcową, na podstawie której obliczano stężenia analitów. Stężenia MP-H3 i MP-H4 przeliczono na czysty metabolit tiolowy, korzystając z równań:

$$C_{H3} = C_{MPH3} \frac{M_{H3}}{M_{MPH3}}; C_{H4} = C_{MPH4} \frac{M_{H4}}{M_{MPH4}}$$

gdzie: C_{H3} , C_{H4} - stężenie H3 i H4, C_{MPH3} , C_{MPH4} - stężenie MP-H3 i MP-H4, M_{H3} , M_{H4} - masa molowa H3 i H4 (355,5 g/mol), M_{MPH3} , M_{MPH4} - masa molowa MP-H3 i MP-H4 (540,5 g/mol).

Metodą HPCE oznaczano CLPM w osoczu uzyskanym po odwirowaniu próbek pełnej krwi, do których nie dodano odczynnika derywatyzującego. Następnie do 1 mL osocza dodawano 50 μ L metanolowego roztworu IS oraz 50 μ L metanolu i postępowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 4.3.2. Stężenie analitów obliczano wykorzystując równanie średniej krzywej wzorcowej.

4.5. Obliczenia parametrów farmakokinetycznych

Na podstawie oznaczonych stężeń CLP i jego metabolitów w osoczu obliczono następujące parametry farmakokinetyczne: $AUC_{0 \rightarrow t}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, C_{maks} , t_{maks} , k_{el} , $t_{0,5}$, a dla CLP dodatkowo Cl i V_d . Obliczenia wykonano w programie WinNonlin 6.2 korzystając z modułu farmakokinetyki bezmodelowej, przy zastosowaniu metody ważenia $1/y^2$.

C_{maks} - stężenie maksymalne osiągnięte w czasie t_{maks}

k_{el} - stała szybkości eliminacji wyznaczona metodą regresji liniowej dla terminalnego, prostoliniowego odcinka fazy eliminacji leku

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ - całkowite pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku od czasu, obliczone ze wzoru:

$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = AUC_{0 \rightarrow t} + AUC_{reszt.}$$

gdzie: $AUC_{0 \rightarrow t}$ - pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku od czasu obliczone metodą trapezów, $AUC_{reszt.}$ - resztkowe pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku od czasu obliczone ze wzoru:

$$AUC_{reszt.} = \frac{C_n}{k_{el}}$$

gdzie: C_n - ostatni pomiar stężenia w czasie t .

$t_{0,5}$ - biologiczny okres półtrwania, obliczony ze wzoru:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{el}}$$

Cl - klirens, czyli objętość osocza, która jest całkowicie oczyszczana z leku w jednostce czasu, obliczony ze wzoru:

$$Cl = \frac{F \cdot D}{AUC_{0 \rightarrow \infty}}$$

V_d - objętość dystrybucji, obliczona ze wzoru:

$$V_d = \frac{Cl}{k_{el}}$$

4.6. Wyznaczanie parametrów farmakodynamicznych

Efekt farmakodynamiczny CLP u badanych pacjentów określono przez pomiar reaktywności płytek krwi metodą agregometrii impedancyjnej. Oznaczenia zostały wykonane w Pracowni Hemodynamiki Serca Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, z wykorzystaniem aparatu Multiplate (Roche Diagnostics, Niemcy). Ocenę reaktywności płytek krwi wykonano dla 38 pacjentów przyjmujących dawkę 75 mg CLP oraz 3 pacjentów przyjmujących dawkę 300 mg CLP. Próbkę pełnej krwi pobierane były w czasie 2-3 godzin po podaniu leku, do systemów aspiracyjnych S-Monovette zawierających hirudynę (Sarstedt, Niemcy). Po pobraniu krew była inkubowana w temperaturze pokojowej, przez co najmniej 30 minut, lecz nie dłużej niż 2 godziny. Badanie impedancji wykonywano w próbkach krwi rozcieńczonych 0,9% NaCl w stosunku 1:1, do których dodawano ADP. Po 6 minutach uzyskiwano wynik agregacji, wyrażony jako średnie pole powierzchni pod krzywą (AUC_{agr}) [AU·min], obliczone na podstawie dwóch pomiarów dla każdej analizowanej próbki.

4.7. Identyfikacja polimorfizmu genów *ABCB1* i *CYP2C19*

4.7.1 Izolacja DNA z krwi obwodowej

Izolację DNA z pełnej krwi zawierającej antykoagulant (EDTA) przeprowadzano przy użyciu zestawu AxyPrep Miniprep, według protokołu dostarczonego przez producenta [203]. 200 μ L krwi dodano do 500 μ L buforu AP1 i intensywnie wystrząsano przez 10 sekund. Następnie dodano 100 μ L buforu AP2 i ponownie wystrząsano przez 10 sekund. Powyższe etapy zapewniały lizę komórek oraz precypitację białek. Powstały osad odwirowywano przez 10 minut przy 12000 \times g. Klarowny supernatant przenoszono na kolumnę Miniprep umieszczoną w plastikowej probówce o pojemności 2 mL i wirowano przez 1 minutę przy 6000 \times g. Znajdujące się w supernatancie DNA zostaje związane selektywnie ze złożem wypełniającym kolumnę Miniprep. W celu dokładnego oczyszczenia DNA, kolumnę przemywano kolejno 700 μ L buforu W1A, 800 μ L oraz 500 μ L buforu W2, za każdym razem wirując próbki przez 1 minutę przy 12000 \times g i odrzucając filtrat. Ostatnim etapem izolacji DNA, była elucja przy użyciu buforu TE o pH=8,5, zawierającego 5mM Tris-HCl i 0,1 mM EDTA. Bufor o powyższym składzie zwiększa rozpuszczalność wysokocząsteczkowego DNA oraz chroni je przed degradacją wywołaną przez nukleazy. Do elucji DNA użyto 100 μ L buforu TE, podgrzanego do temperatury 65⁰C. Po inkubacji przez 1 minutę w temperaturze pokojowej, próbki wirowano przy 12000 \times g przez 1 minutę a filtrat zawierający wysokocząsteczkowe DNA zbierano do sterylnych probówek plastikowych o pojemności 1,5 mL i przechowywano do czasu analizy w temperaturze 4⁰C.

4.7.2 Identyfikacja polimorfizmów genetycznych

W celu identyfikacji polimorfizmu *ABCB1* 3435C>T (rs1045642) oraz *CYP2C19**2 (c.681G>A) (rs4244285) wykorzystano metodę łańcuchowej reakcji polimerazy połączonej z analizą długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragments Length Polymorphism). Pierwszym etapem była amplifikacja regionu DNA obejmującego dany polimorfizm. Następnie przeprowadzono analizę restrykcyjną z wykorzystaniem odpowiednich enzymów.

Sekwencje starterów użyte do reakcji przedstawiono w Tabeli 6. Dla każdej pary starterów dobrano optymalną temperaturę przyłączania po przeprowadzeniu PCR w

gradiencie temperatur. Do prowadzenia PCR używano komercyjnego zestawu AmpliKIT AllegroTaq (Novazym, Polska).

Tabela 6. Charakterystyka starterów użytych do przeprowadzenia PCR

Gen	Sekwencja startera	Długość produktu PCR [pz]	Temperatura przyłączenia [°C]
ABCB1 3435 C>T	1F:TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG 1R:AAGGCATGTATGTTGGCCTC	197	62
2C19*2	2F:CAGAGCTTGGCATATTGTATC 2R:TAGTAAACACAAAACACTAGTCAATG	321	59
2C19*17	3F:GCCCTTAGCACCAAATTCTC 3R:ATTTAACCCCCTAAAAAACACG	473	52
2C19*17 wt (*1)	4F:TCTGTTCTCAAAGC	199	46
2C19*17 mut (*17)	5F:TCTGTTCTCAAAGT	199	47

*Analiza PCR-RFLP- identyfikacja genotypu ABCB1 i 2C19*2*

W przypadku identyfikacji *ABCB1* 3435C>T PCR prowadzono wg warunków opisanych przez Drożdżika i wsp. [204], natomiast dla *CYP2C19*2* wykorzystano warunki opisane przez Giusti i wsp. [98]. Składy mieszanin reakcyjnych przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Składy mieszanin reakcyjnych do amplifikacji *ABCB1* 3435C>T i *2C19*2*

Reagent	Stężenie początkowe	Objętość [µL]
starter F	5 µM	2,0
starter R	5 µM	2,0
bufor dla polimerazy AllegroTaq z 25 mM MgCl ₂	10x	2,5
mieszanina dNTP	25 mM	0,2
polimeraza AllegroTaq	5 U/µL	0,2
woda	-	17,1
DNA	różne	1

Amplifikację przeprowadzano zgodnie z następującym schematem:

- wstępna denaturacja: 94⁰C - 5 minut
 - denaturacja: 94⁰C - 15 sekund
 - przyłączanie starterów : 62⁰C lub 59⁰C - 15 sekund
 - elongacja: 72⁰C - 15 sekund
 - końcowa elongacja: 72⁰C - 5 minut.
- } 35 cykli

Uzyskane produkty amplifikacji *ABCB1* 3435C>T oraz *2C19*2* poddawano trawieniu z użyciem odpowiednich enzymów restrykcyjnych. Szczegółowe dane dotyczące przeprowadzanych reakcji zamieszczono w Tabeli 8.

Tabela 8. Składy mieszanin reakcyjnych oraz warunki prowadzenia analizy RFLP

Gen	<i>ABCB1</i>	<i>2C19*2</i>
Produkt PCR [μL]	17,75	15
Bufor* [μL]	2	4**
Enzym [U]	1	10
Czas inkubacji [h]	1	1
Temperatura [°C]	37	30

* dla każdego enzymu użyto buforu reakcyjnego dostarczanego przez producenta

** 2 μL buforu T i 2 μL 0,1% BSA

Powstałe fragmenty rozdzielano elektroforetycznie w 3% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydydy (EtBr). Genotyp identyfikowano na podstawie długości uzyskanych w wyniku trawienia fragmentów DNA (Tabela 9).

Tabela 9. Charakterystyka reakcji restrykcji dla polimorfizmu *ABCB1* 3435C>T oraz *2C19*2*

Mutacja	Enzym	Miejsce cięcia enzymu	Długości fragmentów po hydrolizie enzymem restrykcyjnym
<i>ABCB1</i> 3435 C>T	Sau3AI	5'... ▼ GATC...3' 3'...CTAG... ▲ 5'	CC: 158 pz i 39 pz CT: 197 pz, 158 pz i 39 pz TT: 197 pz
<i>2C19*2</i> c.681 G>A	SmaI	5'...CCC ▼ GGG...3' 3'...GGG ▲ CCC...5'	*1/*1: 212 pz i 109 pz *1/*2: 321 pz, 212 pz i 109 pz *2/*2: 321 pz

*Allelo-specyficzny PCR - identyfikacja CYP2C19*17*

Polimorfizm genetyczny *CYP2C19*17* (c.-806C>T) (rs12248560) zbadano według procedury zaproponowanej przez Sim i wsp. [90], z niewielkimi modyfikacjami. Pierwszym etapem była amplifikacja fragmentu regionu flankującego 5'. Skład mieszaniny reakcyjnej opisano w Tabeli 10.

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji *2C19*17*

Reagent	Stężenie początkowe	Objętość [μL]
starter 3F	5 μM	2,0
starter 4R	5 μM	2,0
bufor dla polimerazy AllegroTaq bez MgCl_2	10x	2,5
MgCl_2	25 mM	2,0
mieszanina dNTP	25 mM	0,2
polimeraza AllegroTaq	5 U/ μL	0,2
woda	-	15,1
DNA	różne	1

Reakcję przeprowadzano zgodnie z następującym schematem:

- wstępna denaturacja: 94⁰C - 5 minut
 - denaturacja: 94⁰C - 30 sekund
 - przyłączanie starterów: 52⁰C - 30 sekund
 - elongacja: 72⁰C - 30 sekund
 - końcowa elongacja: 72⁰C - 7 minut.
- } 35 cykli

Wynik reakcji określano jako pozytywny, jeśli po rozdiale elektroforetycznym 5 μL produktu PCR w 2% żelu agarozowym z dodatkiem EtBr obserwowano pojedynczy prążek DNA o długości odpowiadającej oczekiwanemu produktowi (Tabela 6). Produkt amplifikacji powstały w pierwszym etapie wykorzystano w PCR z użyciem allelo-specyficznych starterów. Składy mieszanin reakcyjnych zamieszczono w Tabeli 11.

Tabela 11. Skład mieszanin reakcyjnych do allelo-specyficznego PCR

Reagent	Stężenie początkowe	Objętość [μL]
starter 4F lub 5F	5 μM	2,0
starter 3R	5 μM	2,0
bufor dla polimerazy AllegroTaq bez MgCl_2	10x	2,5
MgCl_2	25 mM	1,5
mieszanina dNTP	25 mM	0,2
polimeraza AllegroTaq	5 U/ μL	0,2
woda	-	16,1
produkt PCR	różne	0,5

Reakcję przeprowadzano zgodnie z następującym schematem:

- wstępna denaturacja: 94⁰C - 1 minuta
 - denaturacja: 94⁰C - 20 sekund
 - przyłączanie starterów: 46⁰C lub 47⁰C (Tabela 6) - 20 sekund
 - elongacja: 72⁰C - 20 sekund
 - końcowa elongacja: 72⁰C - 7 minut.
- } 28 cykli

Uzyskane w reakcji PCR produkty rozdzielano w 3% żelu agarozowym z dodatkiem EtBr. O obecności danego allelu (*1 bądź *17) świadczyło występowanie prążka DNA o długości 199 pz.

4.7.3 Sekwencjonowanie amplifikowanych fragmentów DNA

W celu weryfikacji uzyskanych wyników poddano sekwencjonowaniu reprezentatywną grupę próbek (po jednej dla każdego obecnego w populacji wariantu genetycznego *ABCB1* 3435C>T, *CYP2C19**2 i *CYP2C19**17). Sekwencjonowanie zostało wykonane przez Wydziałową Pracownię Techniki Biologii Molekularnej przy Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu przy użyciu sekwencera 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems HITACHI, USA). Uzyskane w sekwencjonowaniu wyniki analizowano w programie SequenceScanner v1.0 oraz MegAlign v5.05. Sekwencje referencyjne dla badanych polimorfizmów pozyskano z internetowej bazy National Center for Biotechnology Information (NCBI) [205].

4.8. Metody statystyczne

Do oceny statystycznej wyników wykorzystano programy: Excel 2007 (Microsoft Corp., USA) oraz Statistica 10 (StatSoft Inc., USA). Wszystkie testy statystyczne wykonywano przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Dobór odpowiedniego testu statystycznego zależał od normalności rozkładu zmiennej, ilości grup oraz jednorodności wariancji. Normalność rozkładu zmiennych badano testem Shapiro-Wilka. Do porównywania danej zmiennej pomiędzy dwoma grupami zmiennych niezależnych stosowano:

- w przypadku rozkładu normalnego i jednorodności wariancji - test t-Studenta
- w przypadku rozkładu normalnego i braku jednorodności wariancji - test Cochra-Coxa
- w przypadku braku rozkładu normalnego - test Manna - Whitney'a

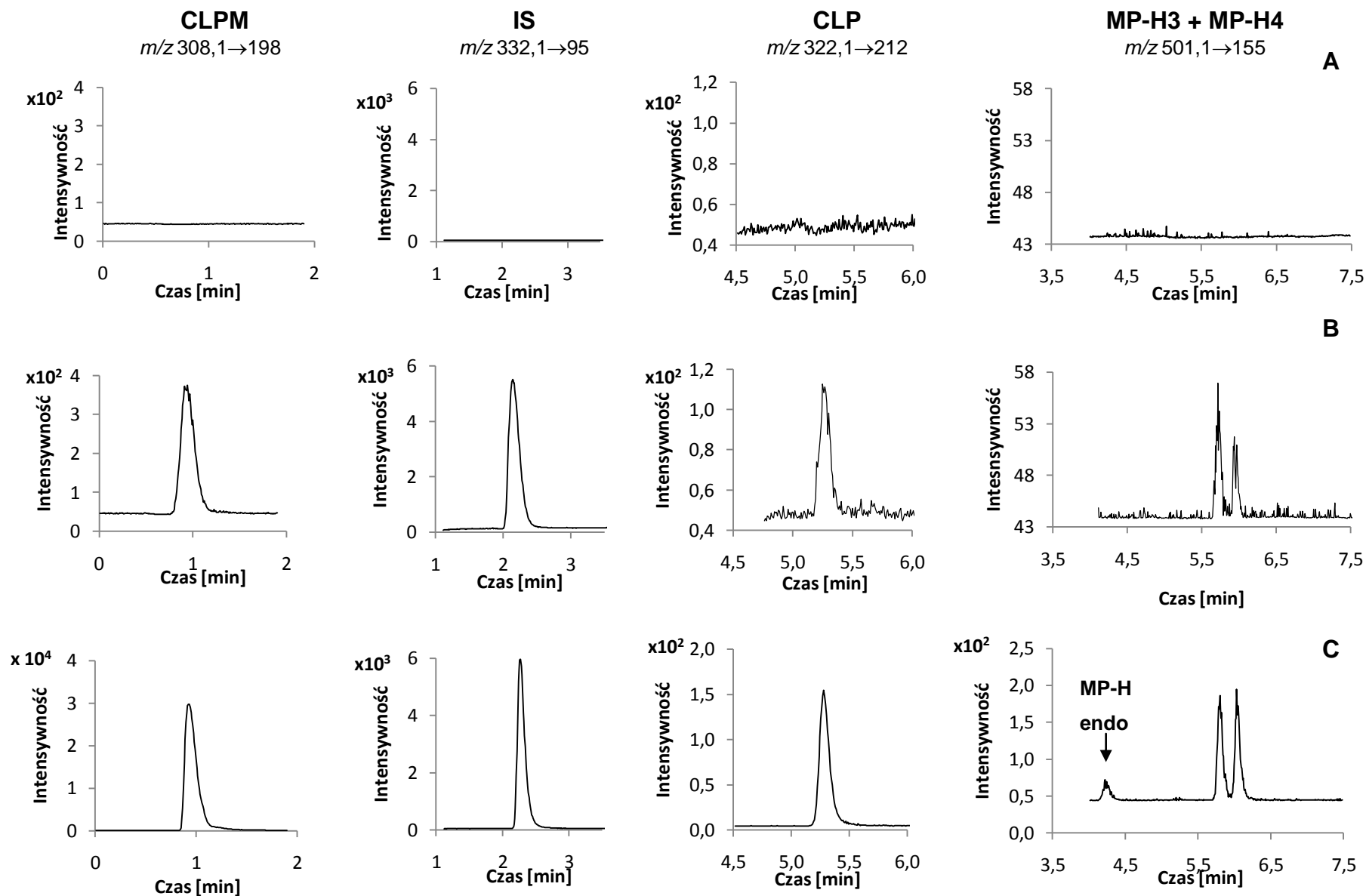
W przypadku analizy zmiennych zależnych używano testu Wilcoxon. Do oceny zmiennej w trzech grupach stosowano nieparametryczny test Kruskalla-Wallisa lub test ANOVA. W przypadku stwierdzenia istotnych statystycznie różnic wykonywano test post-hoc, porównujący wielokrotnie średnie rangi dla wszystkich grup. Korelację pomiędzy zmiennymi ilościowymi oceniano za pomocą nieparametrycznego testu Spearmana. Ocenę, czy populacja znajduje się w równowadze zgodnie z prawem Hardy-Weinberga, przeprowadzono przy pomocy testu χ^2 .

5. Wyniki

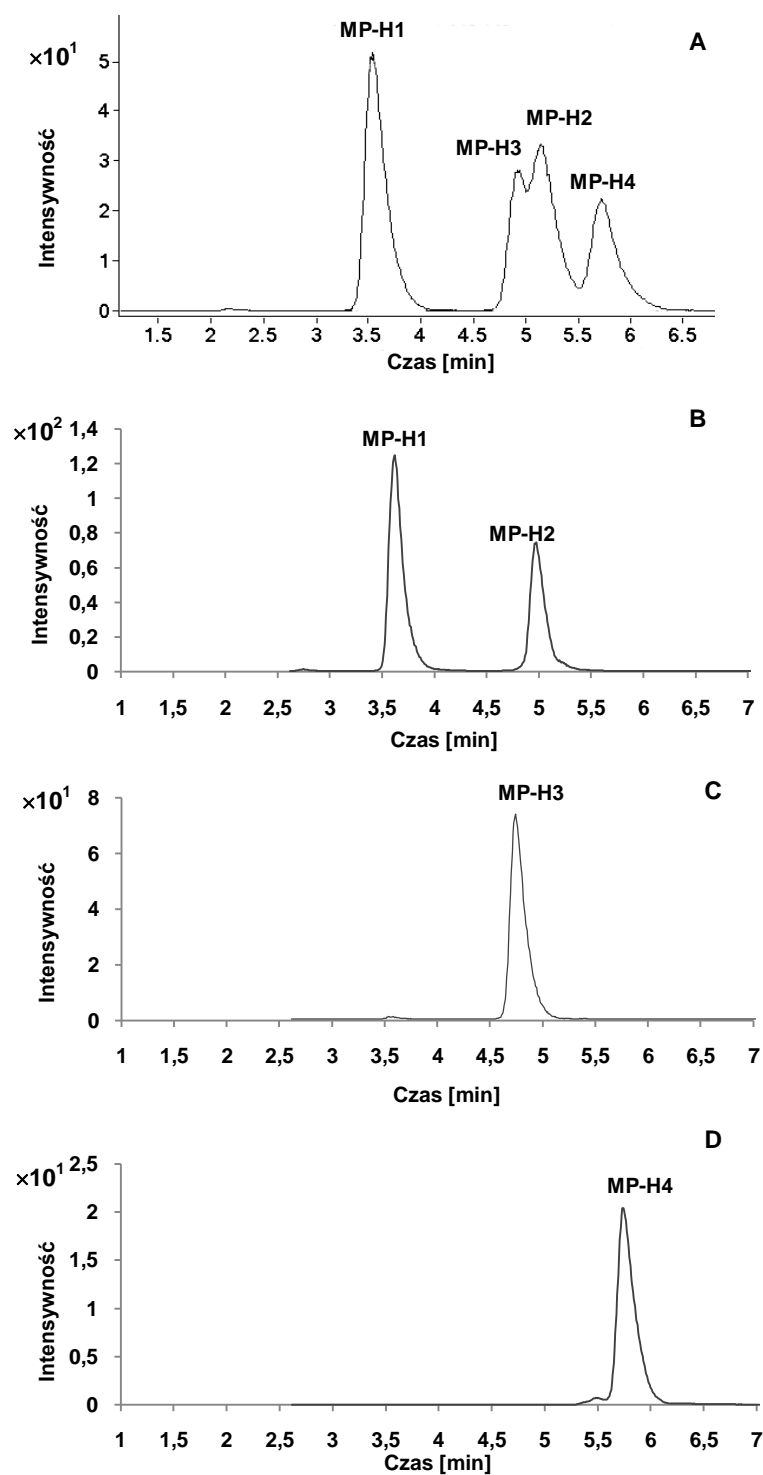
5.1. Wyniki walidacji metody HPLC-MS/MS

5.1.1 Selektowność

Na Rysunku 5 przedstawiono chromatogramy uzyskane w trakcie analizy próbek nieobciążonej analitami (A), próbki zawierającej anality w stężeniach odpowiadających LOQ (B) oraz chromatogram uzyskany po nastrzyknięciu próbki przygotowanej z osocza pacjenta leczonego CLP (C). W zastosowanych warunkach uzyskano zadowalający rozdział wszystkich analitów, natomiast czasy retencji wynosiły odpowiednio: CLPM - 0,95 min, IS - 2,23 min, CLP - 5,30 min, MP-H3 - 5,79 min, MP-H4 - 6,04 min. W stosowanych warunkach rozdziału nie stwierdzono interferencji pochodzących od związków endogennych obecnych w matrycy, bądź substancji leczniczych podawanych podczas terapii CLP. Na Rysunku 6 przedstawiono kolejność elucji MP-H1 – MP-H4. Kolejność elucji MP-H1 oraz MP-H2 określono wykorzystując warunki zaproponowane przez Tuffala i wsp. [21]. Ponadto, w próbkach klinicznych zaobserwowano występowanie przy przejściach m/z 504,1→155 oraz 504,1→212 dodatkowego piku o czasie retencji 4,25 min. Na podstawie danych literaturowych związek ten zidentyfikowano jako MP-H-endo, który jest produktem rozkładu 2-okso-CLP przez paraoksonazę-1 [21,206].



Rysunek 5: Chromatogramy przedstawiające sygnały pochodzące od analitów w próbce ślepej (A), w próbce LOQ (B) oraz w próbce pobranej po 2 h od podania CLP (pacjent 40) (C). Każdy analit został przedstawiony dla przejścia m/z użytego do analizy ilościowej (patrz Tabela 4).



Rysunek 6: Chromatogramy uzyskane po nastrzyknięciu: mieszaniny MP-H1 - MP-H4 (A), mieszaniny MP-H1 + MP-H2 (B), MP-H3 (C) i MP-H4 (D). Chromatogramy zostały przedstawione dla przejścia m/z 501,1 \rightarrow 155.

5.1.2 Liniowość

Liniowość metody została wyznaczona dla poszczególnych analitów dla zakresów stężeń:

- CLP: 0,25 – 5,0 ng/mL
- CLPM: 50 – 10000 ng/mL
- MP-H3 i MP-H4: 0,25 – 50,0 ng/mL

Równania krzywych wzorcowych oraz wyniki testu Mandela, potwierdzającego ich liniowy przebieg i zarazem poprawność przyjętego do obliczeń modelu regresji zamieszczono w Tabeli 12. Dla wszystkich krzywych wzorcowych, poza CLP, test statystyczny wykazał, że wartość współczynnika przecięcia b nie różni się istotnie od zera. Stąd dla CLPM, MP-H3 i MP-H4 równania przyjęły postać $y = ax$, a dla CLP $y = ax + b$.

Tabela 12. Równania krzywych wzorcowych CLP, CLPM, MP-H3 i MP-H4 oraz wyniki testu Mandela

Analit	Zakres stężeń [ng/mL]	Równanie krzywej wzorcowej (n=5)	Współczynnik korelacji r	TV testu Mandela	F _{kryt} testu Mandela
CLP	0,25 – 5,0	$\frac{P_{CLP}}{P_{IS}} = (2,402 \cdot 10^{-2} \pm 0,064 \cdot 10^{-2}) \cdot C_{CLP} + (0,340 \cdot 10^{-2} \pm 0,138 \cdot 10^{-2})$	0,9982	0,039	21,198
CLPM	50 – 10000	$\frac{P_{CLPM}}{P_{IS}} = (5,979 \cdot 10^{-4} \pm 0,045 \cdot 10^{-4}) \cdot C_{CLPM}$	0,9999	0,016	21,198
MP-H3	0,25 – 50,0	$\frac{P_{MP-H3}}{P_{IS}} = (5,498 \cdot 10^{-2} \pm 0,005 \cdot 10^{-2}) \cdot C_{MP-H3}$	0,9997	1,214	21,198
MP-H4	0,25 – 50,0	$\frac{P_{MP-H4}}{P_{IS}} = (4,602 \cdot 10^{-2} \pm 0,011 \cdot 10^{-2}) \cdot C_{MP-H4}$	0,9991	0,087	21,198

5.1.3 LOQ, precyzja i dokładność

Dla badanych analitów LOQ wynosiło odpowiednio: CLP – 0,25 ng/mL, CLPM – 50 ng/mL, MP-H3 i MP-H4 – 0,25 ng/mL. Dla tego parametru wyznaczona precyzja wyrażona przez WZ wynosiła 2,38 – 19,56 %, natomiast dokładność wyrażona przez błąd względny zawierała się w granicach 0,00 – 19,60%. Wyniki badania precyzji i dokładności metody w ciągu dnia oraz pomiędzy dniami dla pozostałych poziomów stężeń mieściły się w granicach 15% (WZ = 3,08 – 14,77 %; błąd = 0,06 – 12,40 %). Szczegółowe dane zamieszczono w Tabeli 13.

Tabela 13. Precyzja i dokładność metody HPLC-MS/MS oznaczania CLP, CLPM, MP-H3 i MP-H4

Analit	Stężenie nominalne [ng/mL]	Średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	Błąd [%]	WZ [%]	Stężenie nominalne [ng/mL]	Średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	Błąd [%]	WZ [%]
CLP	0,25	0,221	11,60	9,12				
	0,5	0,555	11,00	7,60	0,25	0,206	17,60	18,14
	0,75	0,71	5,33	3,86	0,5	0,556	11,20	9,21
	1	0,95	5,00	10,40	2,5	2,38	4,80	6,86
	2,5	2,68	7,20	5,65	5	4,84	3,20	6,50
	3,75	3,58	4,53	5,55				
	5	5,04	0,80	3,60				
CLPM	50	47	6,00	2,38				
	100	97	3,00	9,47	50	50	0,00	15,23
	500	527	5,40	7,62	100	106	6,00	5,09
	1000	1124	12,40	4,68	1000	1009	0,09	11,31
	5000	4922	1,56	4,42	10000	9637	3,63	3,08
	7500	7586	1,14	6,55				
	10000	9961	0,39	2,54				
MP-H3	0,25	0,201	19,60	8,37				
	0,5	0,442	11,60	9,19	0,25	0,228	8,80	5,21
	2,5	2,49	0,40	3,36	0,5	0,522	4,40	8,34
	5	5,48	0,40	7,49	5	4,68	6,40	5,79
	12,5	13,52	8,16	3,93	50	50,03	0,06	7,81
	25	24,87	0,52	14,77				
	50	49,77	0,46	9,59				
MP-H4	0,25	0,229	8,40	19,56				
	0,5	0,472	5,00	7,93	0,25	0,245	2,00	19,50
	2,5	2,51	0,40	12,53	0,5	0,501	0,20	5,80
	5	5,29	5,80	8,55	5	5,03	0,60	14,37
	12,5	13,90	11,20	4,13	50	50,0	0,00	7,63
	25	23,78	4,88	12,94				
	50	50,23	0,46	8,00				

5.1.4 Efekt matrycy

Znormalizowany MF został wyznaczony przy wykorzystaniu sześciu próbek nieobciążonego osocza, pochodzących od różnych probantów. Współczynnik zmienności znormalizowanego MF mieścił się w granicach 9,41 – 14,68 %. Szczegółowe wyniki zamieszczono w Tabeli 14.

Tabela 14. Współczynniki zmienności znormalizowanego MF

Analit	Stężenie [ng/mL]	WZ [%] (n = 6)
CLP	0,5	13,78
	5	14,68
CLPM	100	12,39
	10000	9,41
MP-H3	0,5	13,68
	50	14,43
MP-H4	0,5	12,37
	50	11,32

5.1.5 Stabilność

CLP, CLPM oraz MP-H3 i MP-H4 były stabilne w badanych warunkach, odpowiadających warunkom przechowywania próbek klinicznych (Tabela 15).

Tabela 15. Wyniki badania stabilności analitów w próbkach osocza podczas przechowywania w różnych warunkach (n = 3)

	CLP		CLPM		MP-H3		MP-H4	
Stężenie nominalne [ng/mL]	0,5	5	100	10000	0,5	50	0,5	50
	Stabilność krótkoterminowa (24 godzin w temp. pokojowej)							
Stężenie oznaczone [ng/mL]	0,436	4,94	113	8818	0,455	54,8	0,426	42,9
Błąd [%]	12,8	1,2	13,0	11,8	9,0	9,6	14,8	14,2
	Stabilność długoterminowa (3 miesiące w -25 ⁰ C)							
Stężenie oznaczone [ng/mL]	0,509	5,56	107,2	10456	0,445	47,4	0,458	47,8
Błąd [%]	1,8	11,2	7,2	4,6	11,0	5,2	8,4	4,4
	Stabilność w czasie trzech cykli zamrażania i rozmrażania							
Stężenie oznaczone [ng/mL]	0,475	4,89	91,2	10914	0,447	50,1	0,522	54,4
Błąd [%]	5,0	2,2	8,8	9,1	10,6	0,2	4,4	8,8
	Stabilność podczas przechowywania w autosamplerze (6 godzin w temp. pokojowej)							
Stężenie oznaczone [ng/mL]	0,472	5,53	115	10510	0,455	52,8	0,426	42,9
Błąd [%]	5,6	10,6	15,0	5,1	9,0	5,6	14,8	14,2

5.2. Precyzja i dokładność metody HPCE

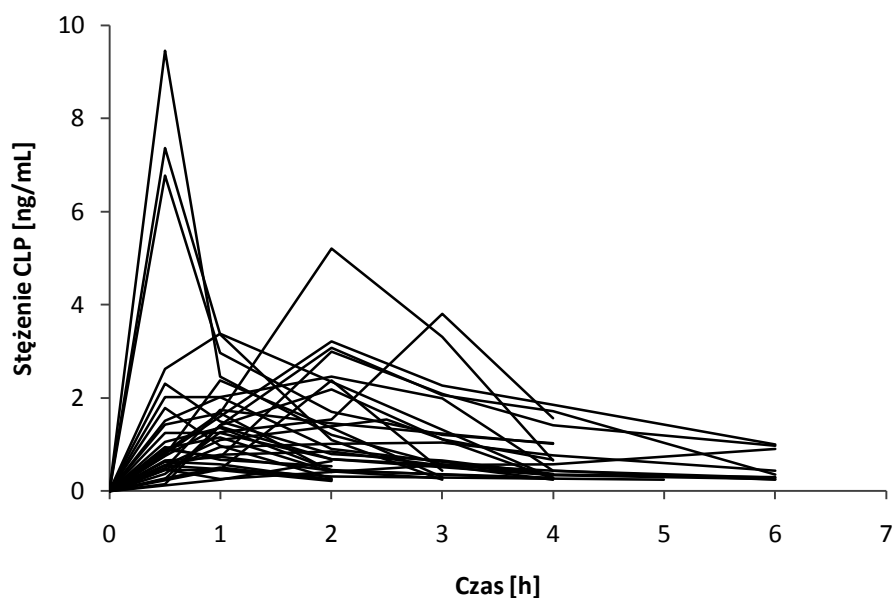
Dokładność metody HPCE oznaczania CLP i CLPM w osoczu określona na podstawie próbek kontrolnych mieściła się w granicach 0,60 % – 13,00 %, natomiast precyzja w granicach 1,84 % - 13,49 % (Tabela 16).

Tabela 16. Precyzja i dokładność w ciągu dnia metody HPCE oznaczania CLP i CLPM w osoczu (n = 5)

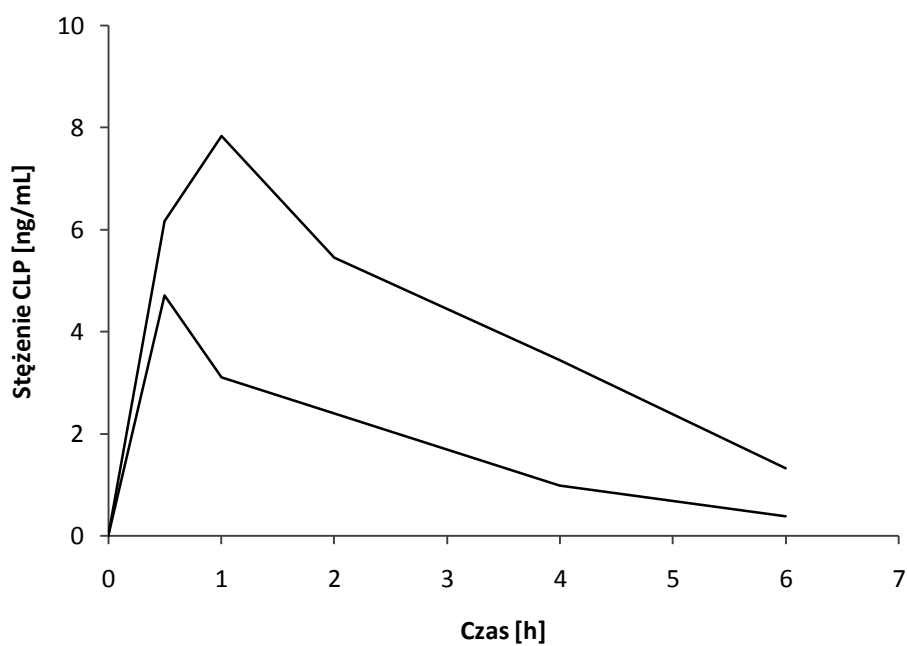
Analit	Stężenie nominalne [ng/mL]	Średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	Błąd [%]	WZ [%]
CLP	1,0	1,13	13,00	9,71
	2,5	2,65	6,00	7,22
	5,0	4,92	1,60	2,52
CLPM	1,0	0,98	2,00	13,49
	2,5	2,46	1,60	5,71
	5,0	5,03	0,60	1,84

5.3. Wyniki oznaczania stężeń analitów u pacjentów

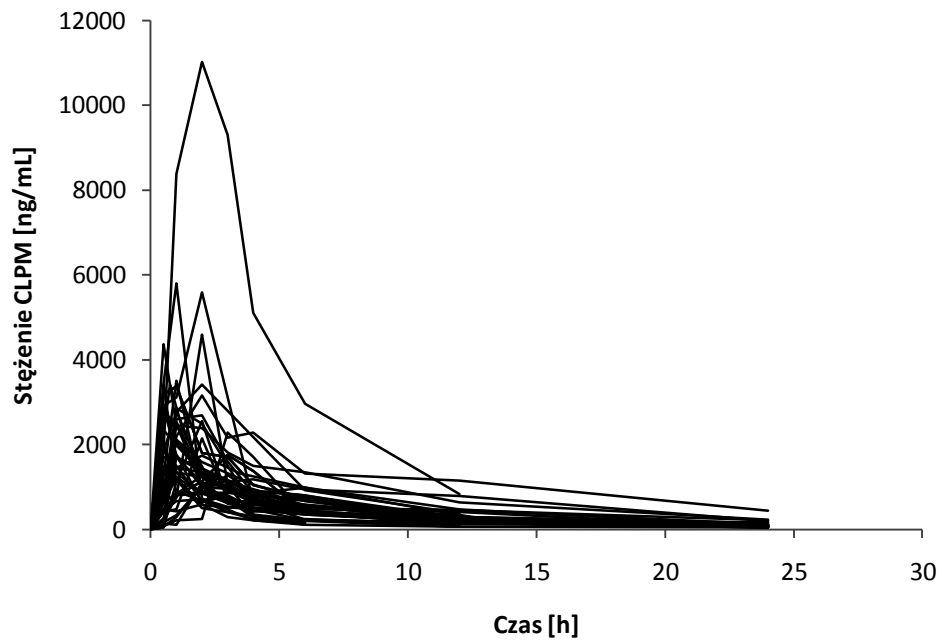
Na Rysunkach 7-14 przedstawiono wyznaczone profile farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów dla poszczególnych pacjentów. Szczegółowe wartości oznaczonych stężeń analitów przedstawiono w Tabelach A1 - B17 (Załącznik 2).



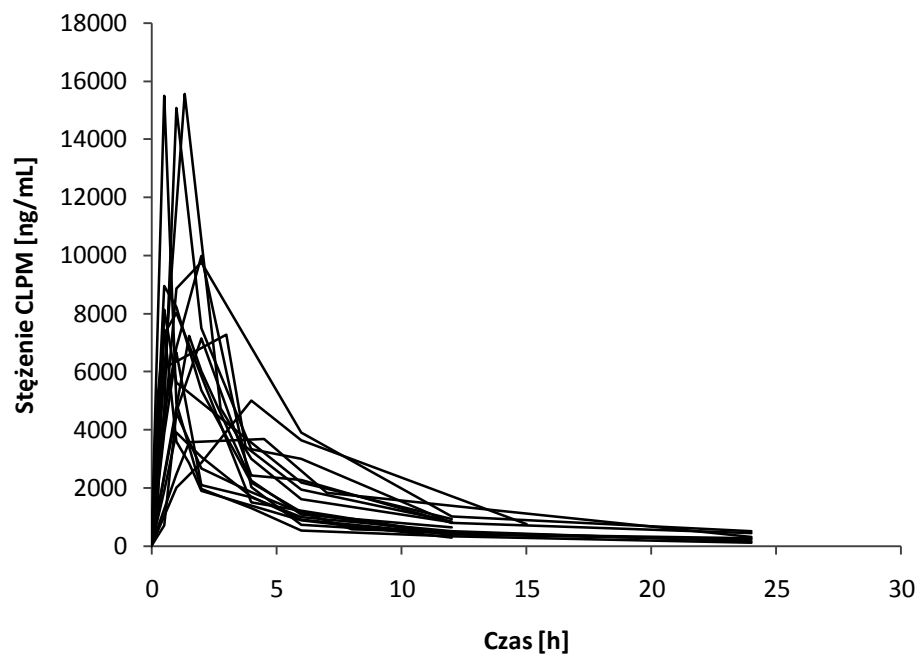
Rysunek 7: Profile farmakokinetyczne CLP u pacjentów po dawce 75 mg CLP.



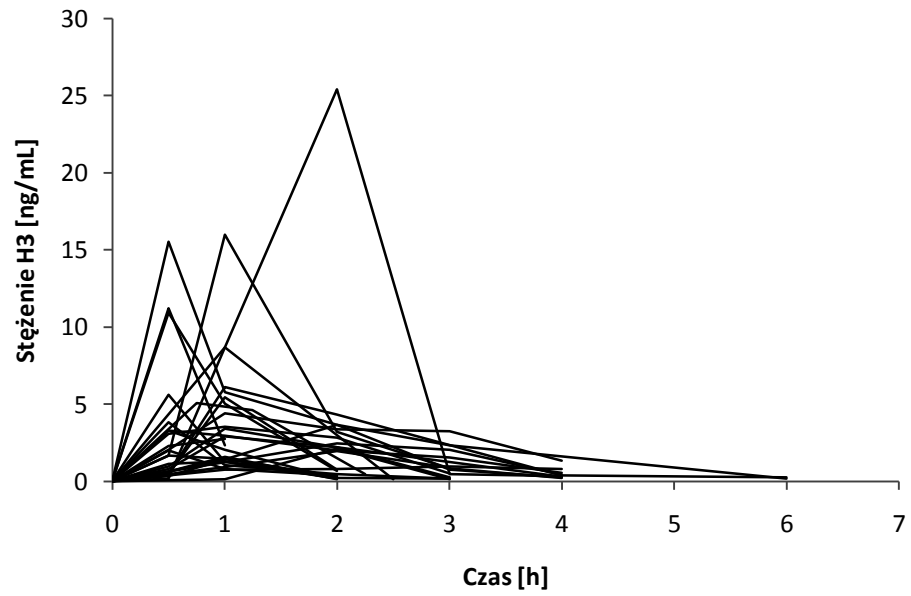
Rysunek 8: Profile farmakokinetyczne CLP u pacjentów po dawce 300 mg CLP.



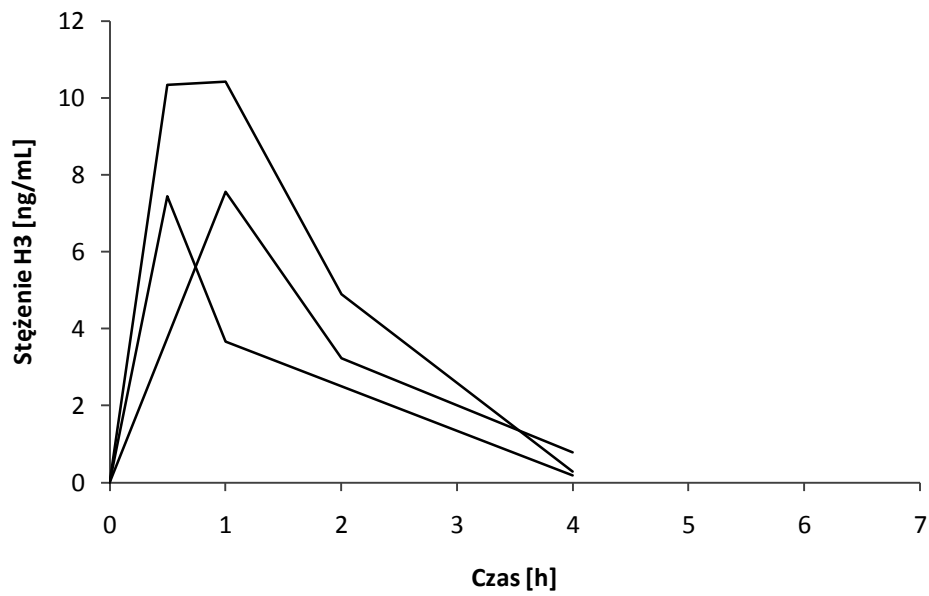
Rysunek 9: Profile farmakokinetyczne CLPM u pacjentów po dawce 75 mg CLP.



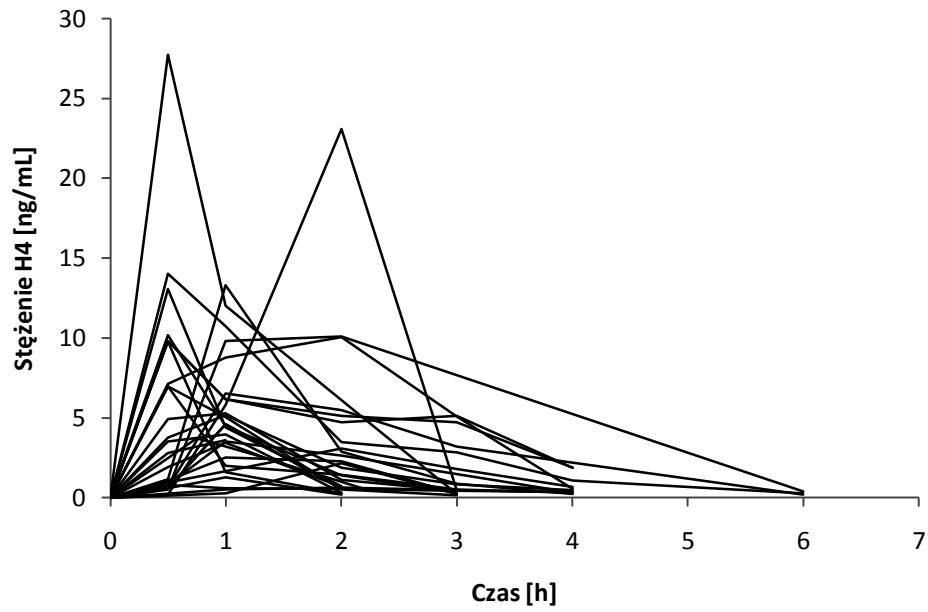
Rysunek 10: Profile farmakokinetyczne CLPM u pacjentów po dawce 300 mg CLP.



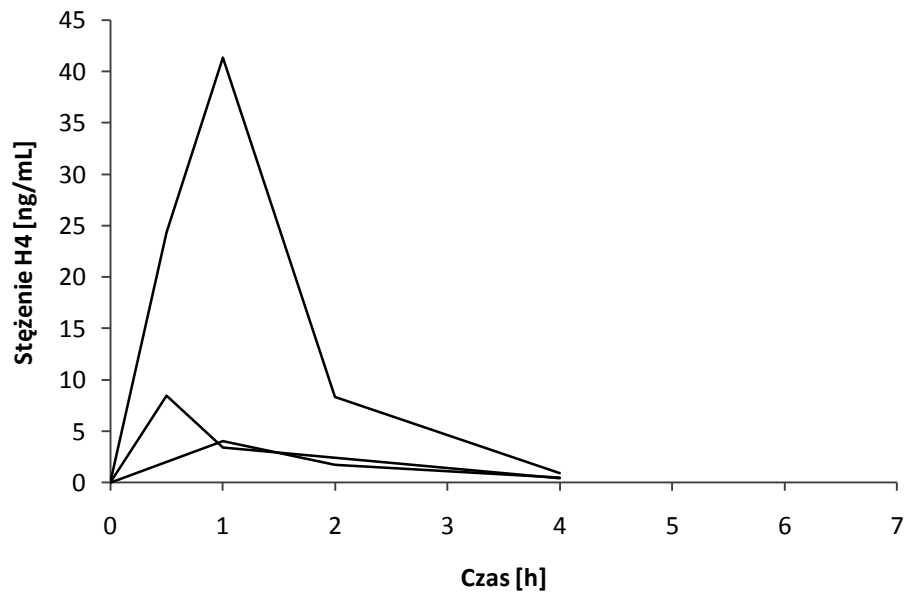
Rysunek 11: Profile farmakokinetyczne H3 u pacjentów po dawce 75 mg CLP.



Rysunek 12: Profile farmakokinetyczne H3 u pacjentów po dawce 300 mg CLP.



Rysunek 13: Profile farmakokinetyczne H4 u pacjentów po dawce 75 mg CLP.



Rysunek 14: Profile farmakokinetyczne H4 u pacjentów po dawce 300 mg CLP.

5.4. Wyniki obliczeń parametrów farmakokinetycznych

Parametry farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów przedstawiono jako mediany z rozstępem kwartylnym (Tabela 17).

Tabela 17. Parametry farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów²

	CLP	H3	H4	CLPM
75 mg CLP	<i>N = 41</i>	<i>N=30</i>	<i>N=30</i>	<i>N=44</i>
C_{maks} [ng/mL]	1,39 (0,64 - 2,38)	3,35 (1,97 - 5,62)	5,22 (3,10 - 10,07)	2066 (1473 - 2862)
t_{maks} [h]	1,00 (0,50 - 2,00)	1,00 (0,50 - 1,00)	1,00 (0,50 - 1,00)	1,00 (0,88 - 2,00)
t_{0,5} [h]	1,18 (0,76 - 2,42)	0,52 (0,34 - 0,85)	0,56 (0,36 - 0,99)	7,17 (5,11 - 8,99)
AUC_{0→t} [ng·h/mL]	4,02 (2,45 - 7,89)	5,99 (2,94 - 9,91)	7,60 (4,58 - 17,36)	9570 (7005 - 11764)
Cl/F [·10³ L/h]	15,05 (8,34 - 23,73)	-	-	-
V_d/F [·10³ L]	30,28 (15,18 - 64,21)	-	-	-
300 mg CLP	<i>N=3</i>	<i>N=3</i>	<i>N=3</i>	<i>N=17</i>
C_{maks} [ng/mL]	4,71 (0,99 - 7,83)	7,56 (7,44 - 10,42)	8,44 (4,01 - 41,32)	7460 (6647 - 9762)
t_{maks} [h]	1,00 (0,50 - 1,00)	1,00 (0,50 - 1,00)	1,00 (0,50 - 1,00)	1,00 (1,00-2,00)
t_{0,5} [h]	1,99 (1,68 - 2,30)	0,68 (0,51 - 0,96)	0,92 (0,61 - 0,99)	6,33 (4,55 - 9,80)
AUC_{0→t} [ng·h/mL]	20,82 (11,38 - 30,26)	13,18 (10,68 - 20,61)	11,50 (7,03 - 56,59)	34613 (22996 - 39228)
Cl/F [·10³ L/h]	16,98 (9,63 - 24,33)	-	-	-
V_d/F [·10³ L]	45,51 (31,95 - 59,07)	-	-	-

² Wyniki obliczeń farmakokinetycznych zostały opublikowane: Karaźniewicz-Łada M, Danielak D, Burchardt P, Kruszyna L, Komosa A, Lesiak M, Głowska F. Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases. Clin. Pharmacokinet. 2014,53:155-64

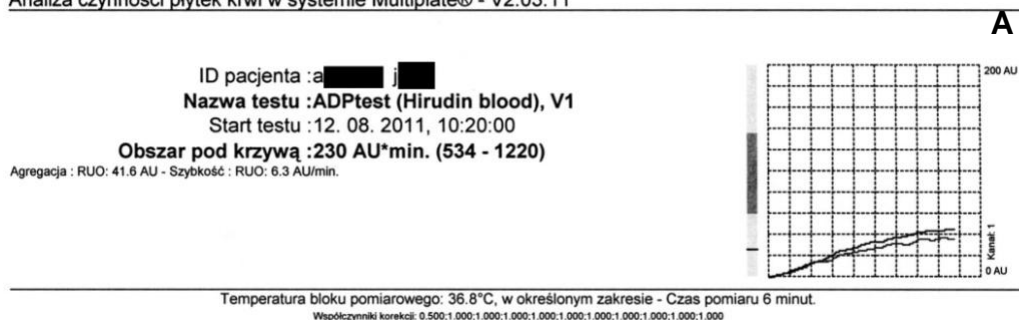
5.5. Wyniki oznaczeń agregacji płytek krwi metodą Multiplate

Pomiar agregacji wykonano dla 38 pacjentów przyjmujących dawkę podtrzymującą 75 mg CLP oraz dla 3 pacjentów po dawce inicjującej 300 mg CLP. Uzyskane wyniki umieszczono w Tabeli 18. Szczegółowe dane zamieszczono w Tabelach A1 - B17 (Załącznik 2). Przykładowe krzywe agregacji przedstawiono na Rysunku 15.

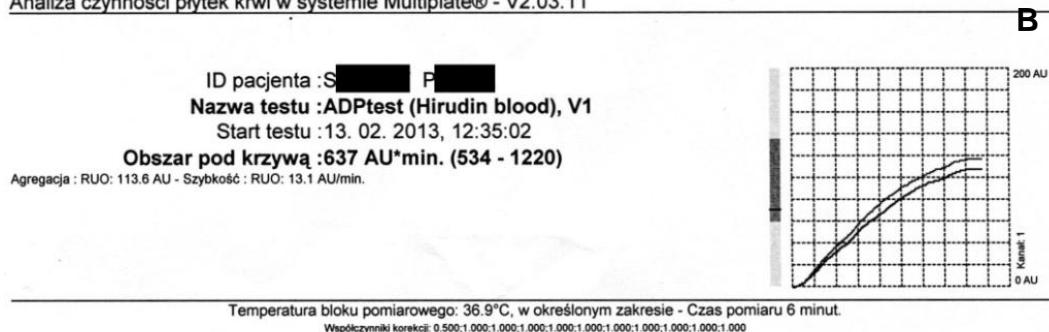
Tabela 18. Wyniki agregacji płytek krwi u pacjentów po podaniu 75 mg CLP i 300 mg CLP. Dane przedstawiono jako mediany z rozstępem kwartylowym.

	75 mg	300 mg
	n = 37	n = 3
AUC_{agr} [AU·min]	141 (77 – 198)	400 (249 – 475)

Analiza czynności płytek krwi w systemie Multiplate® - V2.03.11



Analiza czynności płytek krwi w systemie Multiplate® - V2.03.11

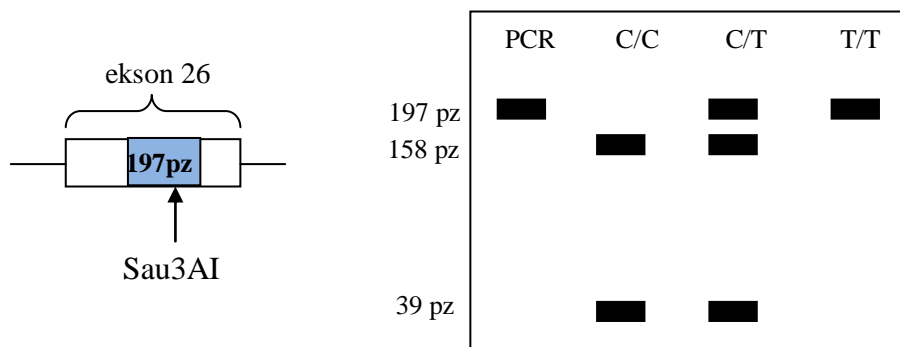


Rysunek 15: Przykładowe krzywe agregacji uzyskane za pomocą metody Multiplate dla pacjenta o niskiej (A) oraz wysokiej reaktywności płytek (B).

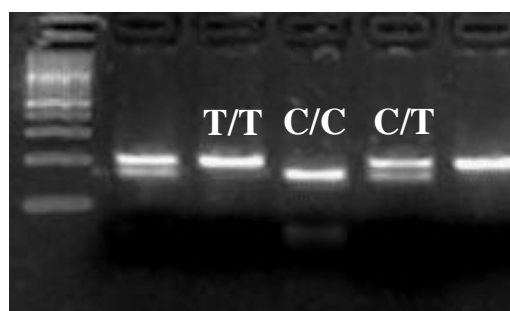
5.6. Analiza polimorfizmu *ABCB1* i *CYP2C19*

5.6.1 Wyniki analizy polimorfizmu *ABCB1* 3435C>T

A)



B)



Rysunek 16: Wynik analizy polimorfizmu *ABCB1* 3435C>T

A – przewidywane długości fragmentów DNA po reakcji PCR oraz po trawieniu enzymem Sau3AI

B - przykładowy obraz po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego.

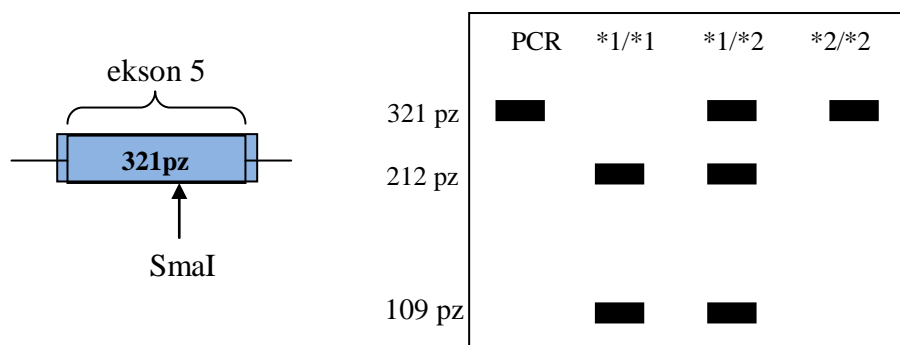
Tabela 19. Częstość występowania genotypów i alleli C i T w badanej populacji oraz wynik testu χ^2

Genotyp	Liczba przypadków $N_{\text{całk}} = 61$	Obserwowana częstość genotypu	Oczekiwana częstość genotypu	Wynik testu χ^2 *	Częstość alleli
CC	11	0,177	0,211	0,91	C = 0,460 T = 0,540
CT	34	0,565	0,497		
TT	16	0,258	0,293		

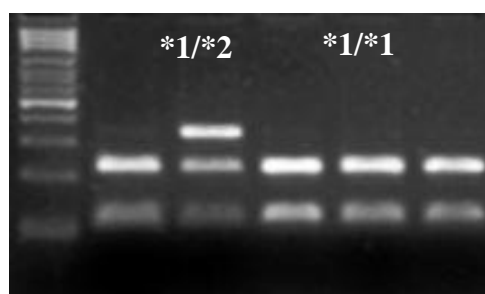
* wartość χ^2 krytyczna odczytana z tablic dla $n=1$ stopni swobody równa 3,84 dla $\alpha=0,05$

5.6.2 Wyniki analizy polimorfizmu *CYP2C19*Badanie obecności allelu *2 *CYP2C19*

A)



B)

Rysunek 17: Wynik analizy polimorfizmu *CYP2C19**2

A – przewidywane długości fragmentów DNA po reakcji PCR oraz po trawieniu enzymem SmaI

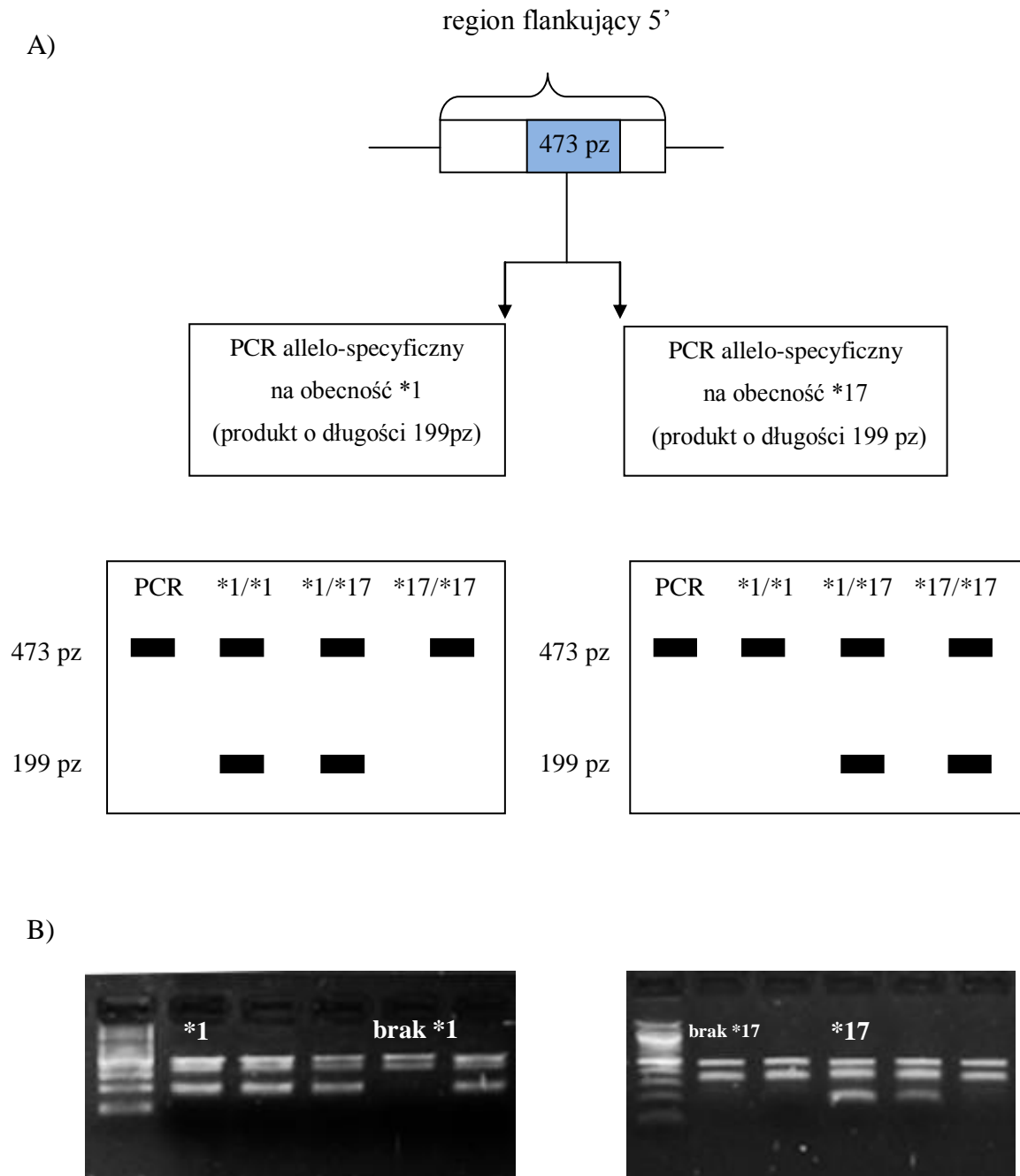
B - przykładowy obraz po przeprowadzeniu rozdzału elektroforetycznego.

Tabela 20. Częstość występowania poszczególnych genotypów oraz allelu *2 w genie *CYP2C19* w badanej populacji

Genotyp	Liczba przypadków $N_{\text{całk}} = 61$	Obserwowana częstość genotypu	Oczekiwana częstość genotypu	Wynik testu χ^2 *	Częstość alleli
*1/*1	43	0,705	0,727	1,83	*1 = 0,852 *2 = 0,148
*1/*2	18	0,295	0,252		
*2/*2	0	-	0,013		

* wartość χ^2 krytyczna odczytana z tablic dla $n=1$ stopni swobody równa 3,84 dla $\alpha=0,05$

Badanie obecności allelu *17 CYP2C19

Rysunek 18: Wynik analizy polimorfizmu *CYP2C19**17

A – przewidywane długości fragmentów DNA po reakcji PCR oraz po allelo-specyficznych reakcjach PCR dla alleli *1 i *17

B - przykładowy obraz po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego.

Tabela 21. Częstość występowania poszczególnych genotypów oraz allelu *17 w genie CYP2C19 w badanej populacji

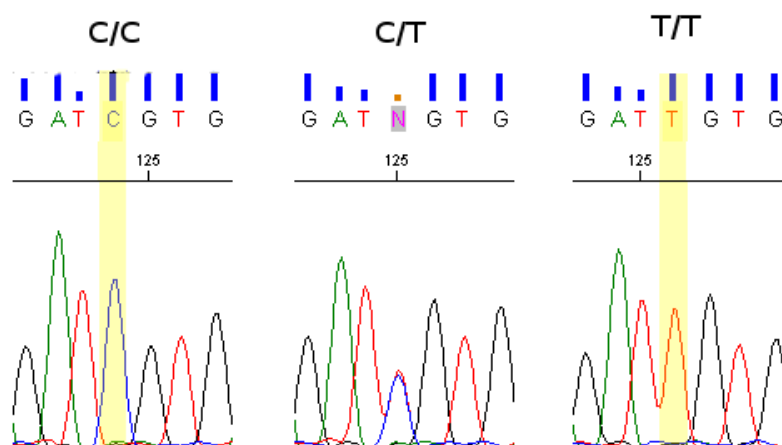
Genotyp	Liczba przypadków $N_{\text{całk}} = 61$	Obserwowana częstość genotypu	Oczekiwana częstość genotypu	Wynik testu χ^2 *	Częstość alleli
*1/*1	32	0,525	0,500	1,08	*1 = 0,705 *17 = 0,295
*1/*17	22	0,361	0,416		
*17/*17	7	0,115	0,087		

* wartość χ^2 krytyczna odczytana z tablic dla $n=1$ stopni swobody równa 3,84 dla $\alpha=0,05$

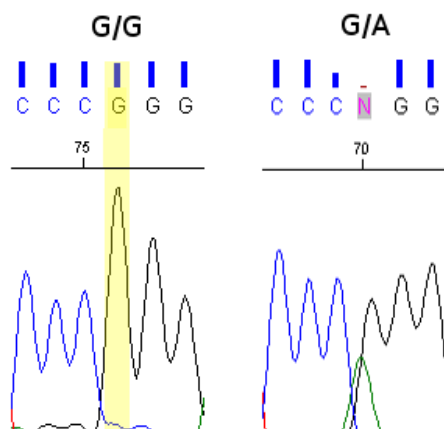
Szczegółowe wyniki dotyczące analizy polimorfizmu genetycznego umieszczono w Tabelach A1 - B17 (Załącznik 2).

5.6.3 Wyniki sekwencjonowania

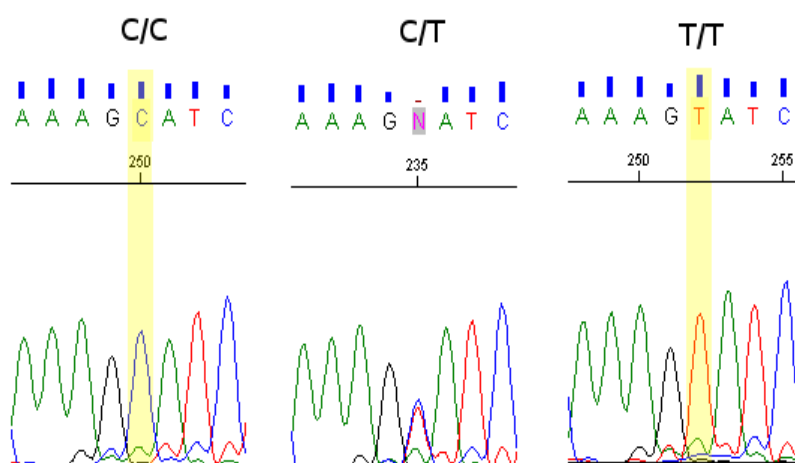
Aby potwierdzić wyniki uzyskane w badaniu z użyciem PRC-RFLP oraz allelo-specyficznego PCR, poddano sekwencjonowaniu 7 próbek, reprezentujących każdy z obecnych w populacji genotypów. Fluorogramy obrazujące substytucje w konkretnych loci, przedstawiono na Rysunkach 19-21.



Rysunek 19: Fluorogramy przedstawiające polimorfizmy *ABCB1* 3435 C>T. Na rysunku pokazano homozygotę C/C (pacjent A21), heterozygotę C/T (pacjent A45) oraz homozygotę T/T (pacjent A22).



Rysunek 20: Fluorogramy przedstawiające polimorfizmy *CYP2C19*2*. Na rysunku pokazano homozygotę G/G (pacjent A2) i heterozygotę G/A (pacjent A33).



Rysunek 21: Fluorogramy przedstawiające polimorfizmy *CYP2C19*17*. Na rysunku pokazano homozygotę C/C (pacjent A4), heterozygotę C/T (pacjent A19) oraz homozygotę T/T (pacjent A37).

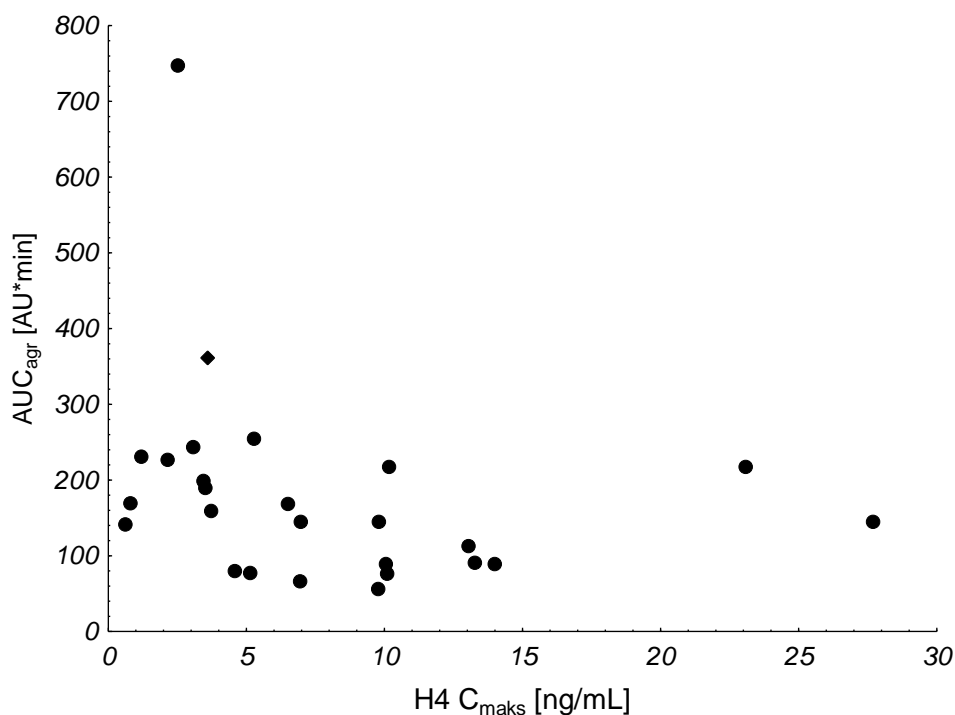
5.7. Analiza statystyczna

5.7.1 Korelacja parametrów farmakokinetycznych CLP i jego metabolitów z agregacją płytek krwi

W celu oszacowania zależności pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi CLP i jego metabolitów a uzyskanym efektem farmakodynamicznym, skorelowano obliczone parametry z wynikami agregacji. Do określenia istotności korelacji użyto nieparametrycznego testu r-Spearmana.

Tabela 22. Ocena korelacji C_{maks} i $AUC_{0 \rightarrow t}$ CLP i jego metabolitów z wynikami reaktywności płytek krwi oznaczonymi metodą Multiplate u pacjentów po dawce 75 mg CLP

Parametr farmakokinetyczny	Analit	Ilość przypadków (n)	Wartość korelacji r-Spearmana	Wartość p
C_{maks}	CLP	34	-0,087	0,624
	CLPM	37	0,056	0,741
	H3	26	-0,370	0,063
	H4	26	-0,439	0,025
$AUC_{0 \rightarrow t}$	CLP	24	0,244	0,250
	CLPM	37	0,005	0,976
	H3	24	-0,113	0,598
	H4	24	-0,235	0,269



Rysunek 22: Wykres zależności agregacji płytek krwi od C_{maks} H4.

5.7.2 Wpływ polimorfizmu genetycznego P-gp na parametry farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów oraz agregację płytek krwi

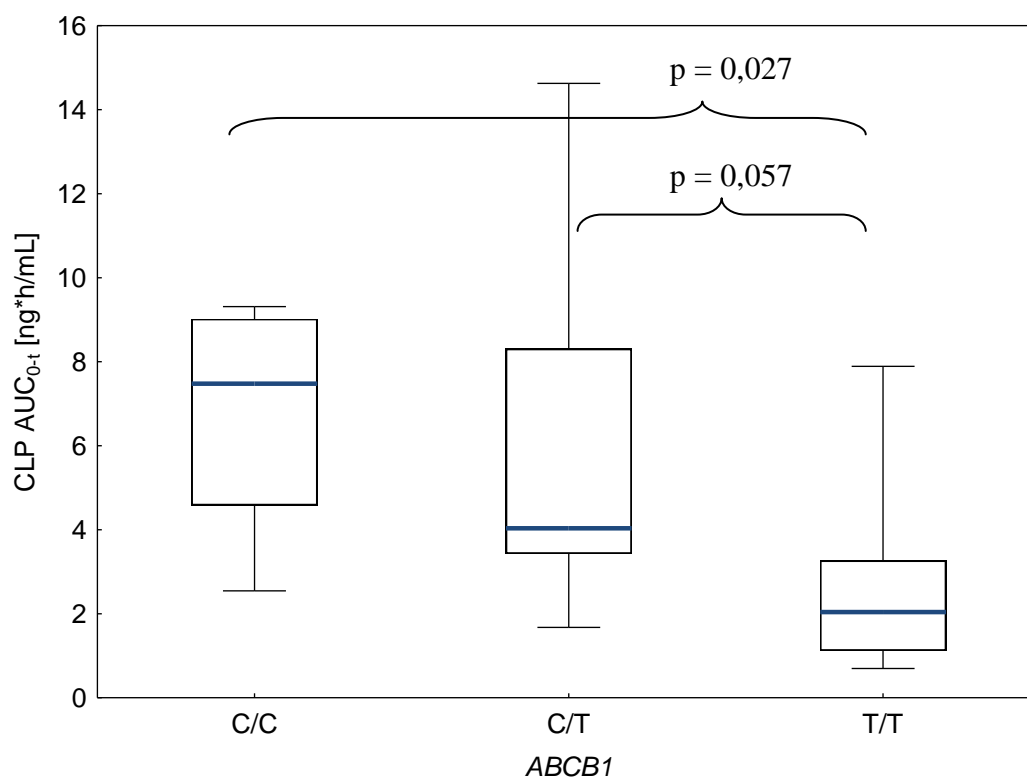
W Tabeli 23 przedstawiono parametry farmakokinetyczne CLP z uwzględnieniem polimorfizmu *ABCB1* 3435C>T. Dane zostały przedstawione jako

mediany z rozstępem kwartylnym. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy pomocy testu ANOVA (dla CLPM C_{maks} , CLPM $t_{0,5}$ obliczonych po dawce 75 mg i CLPM $AUC_{0 \rightarrow t}$ obliczonego po dawce 300 mg) lub testu Kruskalla-Wallisa. Ze względu na małą liczebność w grupie pacjentów po zażyciu dawki 300 mg CLP, porównano u nich jedynie parametry farmakokinetyczne CLPM. W Tabeli 24 przedstawiono porównanie wyników reaktywności płytek krwi w zależności od określonego genotypu P-gp wykonane przy pomocy nieparametrycznego testu Kruskalla-Wallisa. Dane przedstawiono jako mediany wraz z rozstępem kwartylnym. Wyniki zostały przedstawione tylko dla pacjentów przyjmujących dawkę 75 mg CLP.

Tabela 23. Wartości parametrów farmakokinetycznych CLP i jego metabolitów u pacjentów w zależności od polimorfizmu genetycznego P-gp (3435C>T)

Parametr farmakokinetyczny		C/C	C/T	T/T	p
Dawka 75 mg CLP					
CLP		n = 7	n = 21	n = 12	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	7,48 (4,59 – 9,02)	4,04 (3,43 – 8,30)	2,04 (1,13 – 3,26)	0,018
	C _{maks} [ng/mL]	3,07 (1,03 – 3,81)	1,54 (0,89 – 2,37)	0,90 (0,53 – 1,52)	0,110
	t _{0,5} [h]	1,24 (0,80 – 1,96)	1,43 (0,57 – 2,85)	1,07 (0,79 – 1,48)	0,753
	t _{maks} [h]	2,00 (1,00 – 3,00)	1,00 (0,50 – 2,00)	1,00 (0,50 – 2,00)	0,307
	Cl/F [x10 ³ L/h]	8,84 (7,59 – 12,26)	16,12 (8,14 – 19,87)	26,72 (12,63 – 50,49)	0,045
V _d /F [x10 ³ L]	15,02 (10,82 – 42,82)	24,90 (16,55 – 56,54)	55,84 (32,51 – 77,92)	0,102	
CLPM		n = 8	n = 23	n = 13	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	9397 (7555 – 12575)	8875 (6313 – 12134)	10192 (7012 – 10696)	0,976
	C _{maks} [ng/mL]	1751 (1489 – 2382)	2276 (1497 – 3367)	1753 (1354 – 2855)	0,414*
	t _{0,5} [h]	6,21 (3,72 – 10,04)	7,21 (5,13 – 8,67)	7,19 (6,40 – 7,88)	0,967*
t _{maks} [h]	2,00 (1,00 – 2,50)	1,00 (0,5 – 2,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	0,212	
H3		n = 5	n = 16	n = 9	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	5,39 (2,94 – 9,91)	6,22 (3,35 – 10,97)	3,06 (1,62 – 8,64)	0,299
	C _{maks} [ng/mL]	3,41 (1,99 – 3,67)	3,68 (2,30 – 9,95)	2,74 (1,58 – 5,62)	0,390
	t _{0,5} [h]	0,85 (0,66 – 1,50)	0,48 (0,28 – 0,72)	0,41 (0,36 – 0,82)	0,210
t _{maks} [h]	1,00 (1,00 – 2,00)	1,00 (0,62 – 1,50)	1,00 (0,50 – 1,00)	0,227	
H4		n = 5	n = 16	n = 9	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	8,16 (4,89 – 17,37)	7,35 (4,58 – 10,01)	8,21 (4,39 – 24,43)	0,954
	C _{maks} [ng/mL]	5,29 (2,53 – 6,51)	4,87 (2,62 – 8,58)	9,79 (3,60 – 10,11)	0,610
	t _{0,5} [h]	1,18 (0,75 – 1,98)	0,59 (0,39 – 0,99)	0,40 (0,36 – 0,67)	0,166
t _{maks} [h]	1,00 (0,50 – 1,00)	1,00 (0,62 – 1,50)	1,00 (0,50 – 1,00)	0,758	
Dawka 300 mg CLP					
CLPM		n = 3	n = 11	n = 3	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	36645 (34672 – 64797)	34613 (17236 – 39700)	25474 (22731 – 31172)	0,128*
	C _{maks} [ng/mL]	9762 (7277 – 9975)	7148 (4586 – 8946)	8026 (7229 – 15497)	0,367
	t _{0,5} [h]	10,31 (4,55 – 14,56)	4,67 (3,79 – 7,25)	7,68 (6,46 – 12,62)	0,131
t _{maks} [h]	2,00 (2,00 – 3,00)	1,00 (0,50 – 2,00)	1,00 (0,50 – 1,50)	0,177	

*test ANOVA



Rysunek 23: Zależność wartości CLP AUC_{0-t} od genotypu P-gp u pacjentów po dawce 75 mg CLP. Dane przedstawiono jako mediany z rozstępem kwartylnym oraz zakresem wartości minimalnych i maksymalnych.

Tabela 24. Wpływ genotypu P-gp na reaktywność płytek krwi u pacjentów przyjmujących dawkę 75 mg CLP

	C/C	C/T	T/T	p
	n = 8	n = 19	n = 10	
AUC_{agr}	156	141	100	0,596
[AU·min]	(108 – 212)	(67 – 217)	(76 – 198)	

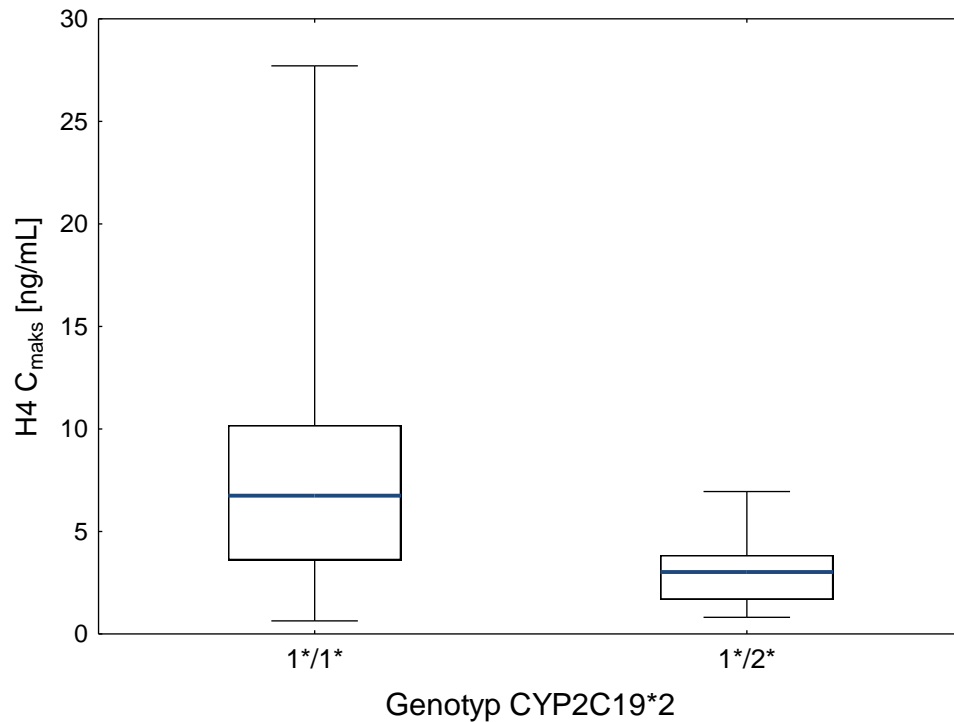
5.7.3 Wpływ polimorfizmu genetycznego CYP2C19 na parametry farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów

W Tabelach 25 - 26 przedstawiono wartości parametrów farmakokinetycznych z uwzględnieniem występowania alleli *CYP2C19*2* oraz *CYP2C19*17*. Do oceny CLPM $t_{0,5}$ użyto testu t-Studenta, natomiast do porównania H4 $AUC_{0 \rightarrow t}$ wykorzystano test Cohrana-Coxa. Statystyczną ocenę pozostałych parametrów przeprowadzono przy pomocy testu U Manna-Whitney'a. Wartości zostały przedstawione jako mediany z rozstępem kwartylnym.

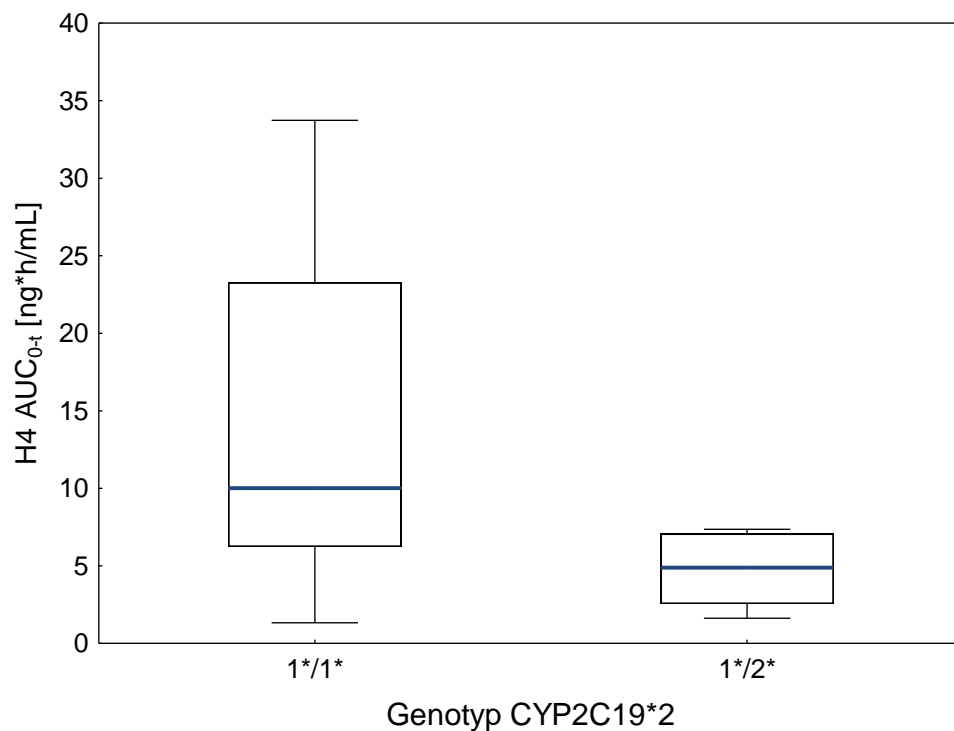
Tabela 25. Wartości parametrów farmakokinetycznych CLP i jego metabolitów u pacjentów z uwzględnieniem polimorfizmu genetycznego *CYP2C19*2*

Parametr farmakokinetyczny	*1/*1	*1/*2	p	
75 mg CLP				
	n = 31	n = 9		
CLP	$AUC_{0 \rightarrow t}$ [ng·h/mL]	4,04 (2,50 – 7,80)	3,05 (2,01 – 4,59)	0,517
	C_{maks} [ng/mL]	1,54 (0,64 – 3,07)	1,04 (0,59 – 1,67)	0,128
	$t_{0,5}$ [h]	1,15 (0,72 – 1,84)	2,33 (0,76 – 2,88)	0,265
	t_{maks} [h]	1,00 (0,50 – 2,00)	1,00 (0,50 – 2,00)	0,788
	Cl/F [$\times 10^3$ L/h]	13,85 (8,52 – 22,45)	19,06 (12,26 – 26,77)	0,422
	V_d/F [$\times 10^3$ L]	20,44 (13,84 – 56,54)	41,48 (30,28 – 67,27)	0,126
	n = 33	n = 11		
CLPM	$AUC_{0 \rightarrow t}$ [ng·h/mL]	8875 (6978-10793)	11604 (8118 – 16100)	0,074
	C_{maks} [ng/mL]	1952 (1497 – 2560)	2743 (1354 – 3419)	0,203
	$t_{0,5}$ [h]	7,19 (5,45 – 8,56)	6,55 (4,97 – 9,31)	0,782*
	t_{maks} [h]	1,00 (0,50 – 2,00)	2,00 (1,00 – 2,00)	0,402
	n = 22	n = 8		
H3	$AUC_{0 \rightarrow t}$ [ng·h/mL]	6,73 (3,31 – 11,32)	2,94 (2,38 - 6,26)	0,128
	C_{maks} [ng/mL]	3,60 (1,99 – 8,68)	2,54 (1,14 – 3,62)	0,071
	$t_{0,5}$ [h]	0,57 (0,35 - 0,87)	0,37 (0,30 – 0,72)	0,525
	t_{maks} [h]	1,00 (0,50 – 1,00)	1,00 (0,87 – 1,50)	0,293
	n = 22	n = 8		
H4	$AUC_{0 \rightarrow t}$ [ng·h/mL]	10,01 (6,23 – 23,27)	4,88 (2,56 – 7,07)	0,001**
	C_{maks} [ng/mL]	6,74 (3,60 – 10,18)	3,02 (1,68 – 3,85)	0,016
	$t_{0,5}$ [h]	0,60 (0,39 - 0,99)	0,39 (0,32 – 1,03)	0,326
	t_{maks} [h]	1,00 (0,50 – 1,00)	1,00 (0,62 – 1,00)	0,920
300 mg CLP				
	n = 10	n = 7		
CLPM	$AUC_{0 \rightarrow t}$ [ng·h/mL]	35659 (22996 – 39339)	31532 (17236 – 39700)	0,733
	C_{maks} [ng/mL]	7368 (7148 – 15066)	8026 (4586 – 8946)	0,464
	$t_{0,5}$ [h]	6,39 (4,55 – 7,68)	4,67 (3,99 – 10,31)	0,884
	t_{maks} [h]	1,42 (1,00 – 2,00)	1,00 (0,50 – 2,00)	0,455

* - test t-Studenta; ** - test Cohrana-Coxa



Rysunek 24: Zależność wartości H4 C_{maks} od występowania allelu *2 CYP2C19 u pacjentów po dawce 75 mg CLP. (p=0,016). Dane przedstawiono jako mediany z rozstępem kwartylnym oraz zakresem wartości minimalnych i maksymalnych.



Rysunek 25: Zależność wartości H4 AUC_{0-t} od występowania allelu *2 CYP2C19 u pacjentów po dawce 75 mg CLP. (p=0,001). Dane przedstawiono jako mediany z rozstępem kwartylnym oraz zakresem wartości minimalnych i maksymalnych.

Tabela 26. Wartości parametrów farmakokinetycznych CLP i jego metabolitów w zależności od genotypu *CYP2C19**17

Parametr farmakokinetyczny		*1/*1	*1/*17	*17/*17	p
75 mg CLP					
CLP		n = 19	n = 17	n = 4	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	5,44 (2,01 – 7,71)	3,84 (2,91 – 6,91)	3,88 (2,69 – 9,32)	0,849*
	C _{maks} [ng/mL]	1,54 (0,64 – 2,45)	1,36 (0,59 – 2,18)	2,34 (1,73 – 2,80)	0,412
	t _{0,5} [h]	1,07 (0,76 – 1,89)	1,29 (0,97 – 2,58)	1,23 (0,67 – 2,30)	0,696
	t _{maks} [h]	1,00 (0,50 – 2,00)	1,00 (0,50 – 2,00)	1,00 (0,75 – 1,50)	0,962
	Cl/F [x10 ³ L/h]	10,02 (8,69 – 26,66)	16,12 (9,92 – 22,45)	16,80 (9,92 – 27,77)	0,996
	V _d /F [x10 ³ L]	29,72 (15,10 – 72,66)	35,59 (15,19 – 65,74)	27,65 (18,68 – 37,44)	0,942
CLPM		n = 21	n = 18	n = 5	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	9665 (7085 – 14049)	9726 (8043 – 11128)	7012 (6728 – 10423)	0,908
	C _{maks} [ng/mL]	2057 (1743 – 2855)	2096 (1149 – 2869)	1713 (1354 – 2485)	0,760*
	t _{0,5} [h]	5,69 (4,97 – 7,78)	7,70 (6,97 – 11,38)	7,19 (5,59 – 9,34)	0,017*
	t _{maks} [h]	1,00 (1,00 – 2,00)	1,00 (0,50 – 2,00)	1,00 (1,00 – 1,00)	0,807
H3		n = 14	n = 12	n = 4	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	5,05 (2,60 – 8,61)	5,98 (2,94 – 9,91)	7,48 (4,42 – 12,35)	0,710
	C _{maks} [ng/mL]	3,34 (1,69 – 5,46)	3,06 (1,98 – 8,28)	3,41 (2,37 – 9,76)	0,931
	t _{0,5} [h]	0,36 (0,29 – 0,70)	0,62 (0,35 – 0,88)	0,62 (0,49 – 0,83)	0,300
	t _{maks} [h]	1,00 (0,50 – 1,00)	1,50 (0,50 – 2,00)	1,00 (0,75 – 1,00)	0,728
H4		n = 14	n = 12	n = 4	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	7,35 (4,88 – 25,58)	6,96 (2,55 – 10,18)	11,56 (5,01 – 18,84)	0,661
	C _{maks} [ng/mL]	5,18 (3,52 – 9,80)	4,51 (1,92 – 9,98)	9,22 (3,21 – 13,65)	0,671
	t _{0,5} [h]	0,48 (0,33 – 0,86)	0,75 (0,39 – 1,99)	0,76 (0,44 – 0,99)	0,525
	t _{maks} [h]	1,00 (0,50 – 1,00)	0,87 (0,50 – 2,00)	1,00 (0,75 – 1,00)	0,979
300 mg CLP					
CLPM		n = 11	n = 4	n = 2	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	31532 (17236 – 41435)	28805 (22863 – 35629)	36745 (34672 – 38817)	0,770*
	C _{maks} [ng/mL]	7460 (5000 – 9762)	7701 (6962 – 11812)	6828 (3680 – 9975)	0,845
	t _{0,5} [h]	5,25 (3,79 – 10,31)	5,93 (4,58 – 7,46)	10,45 (6,33 – 14,56)	0,491
	t _{maks} [h]	1,00 (1,00 – 2,00)	0,75 (0,50 – 2,00)	3,25 (2,00 – 4,50)	0,149

* - test ANOVA

5.7.4 Ocena wpływu fenotypu CYP2C19 na parametry farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów oraz agregację płytek krwi

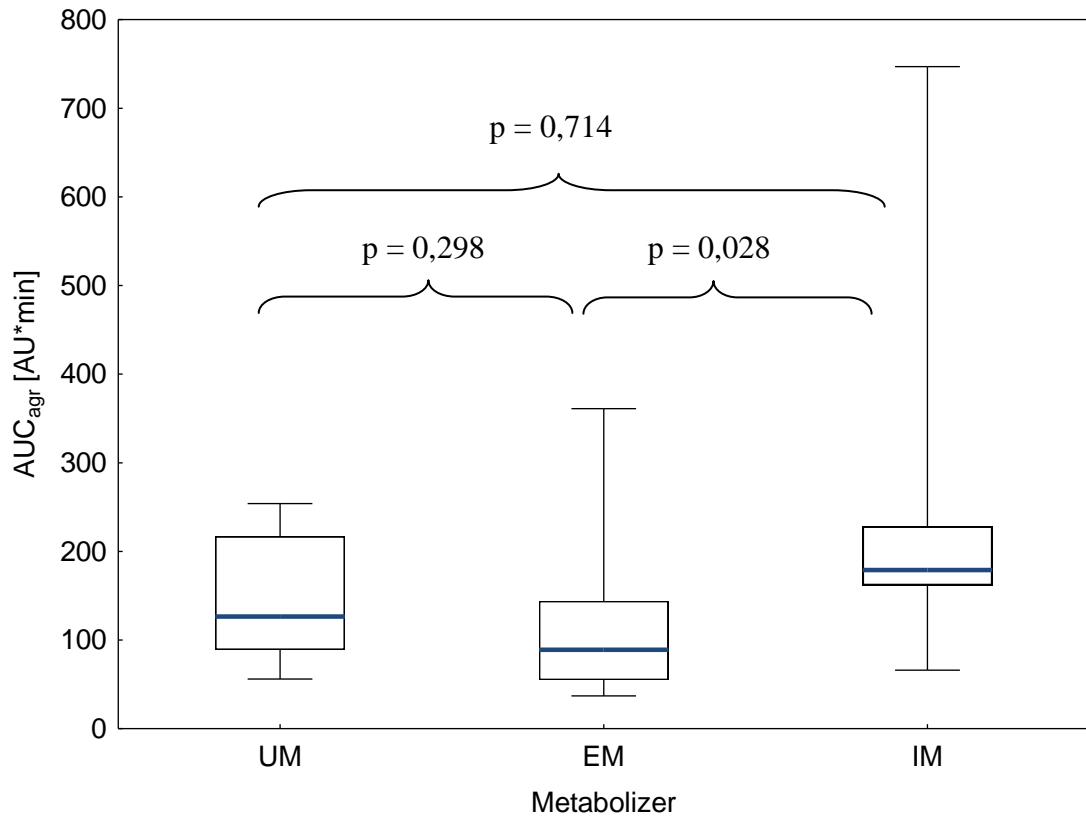
Klasyfikacja fenotypów pacjentów z uwagi na posiadany genotyp CYP2C19 została wykonana w oparciu o publikację Tantry i wsp. [207]. Liczba pacjentów posiadających określony fenotyp została przedstawiona w Tabeli 27. Wpływ posiadanego fenotypu CYP2C19 na wynik badania agregacji płytek krwi przeprowadzonej metodą Multiplate przedstawiono w Tabeli 28. W Tabeli 29 zamieszczono porównanie parametrów farmakokinetycznych dla trzech fenotypów, wykonane przy pomocy testu Kruskalla-Wallisa, z wyjątkiem CLPM C_{maks} i CLPM $t_{0,5}$, ocenianych przy pomocy testu ANOVA. Wyniki zostały przedstawione jako mediany z rozstępem kwartylnym.

Tabela 27. Klasyfikacja fenotypów CYP2C19

Genotyp	Fenotyp	Liczba pacjentów
*1/*17 i *17/*17	UM – ultra szybki metabolizer	23
*1/*1	EM – szybki metabolizer	20
*1/*2 i *2/*17	IM – pośredni metabolizer	18
*2/*2	PM – wolny metabolizer	0

Tabela 28. Wpływ fenotypu CYP2C19 na agregację płytek krwi mierzoną metodą Multiplate u pacjentów po dawce 75 mg CLP

	UM	EM	IM	p
	n = 14	n = 15	n = 8	
AUC_{agr}	126	92	179	0,028
[AU·min]	(89 – 217)	(55 – 144)	(162 – 228)	

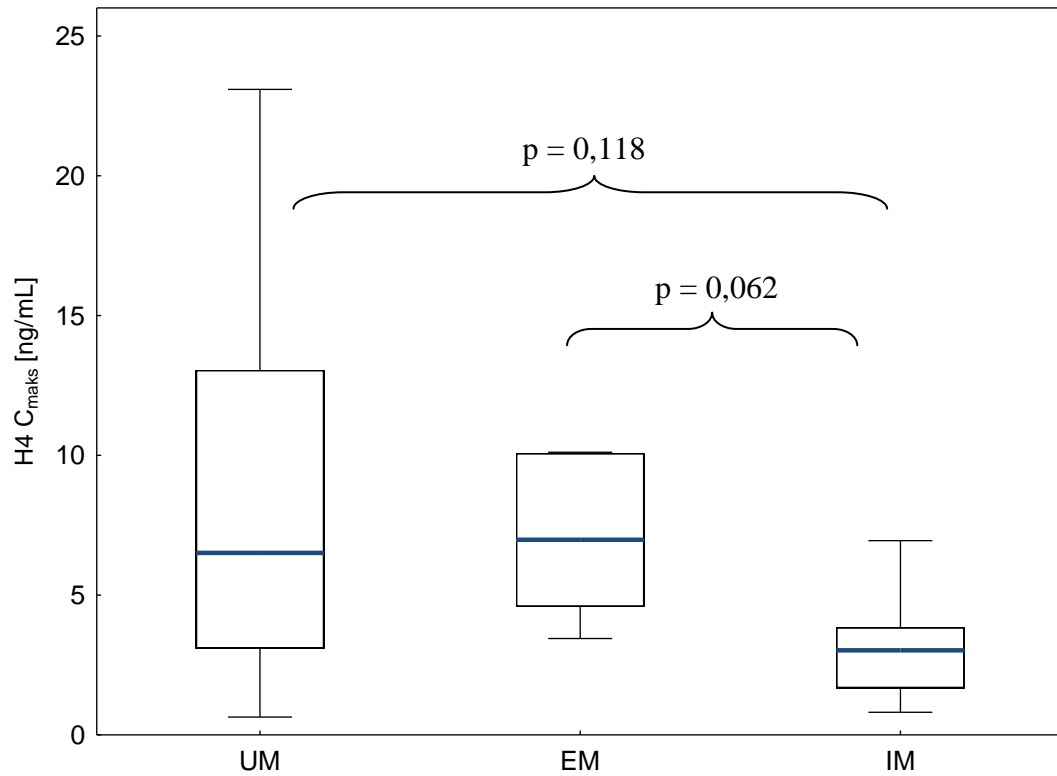


Rysunek 26: Zależność wielkości agregacji płytek krwi mierzonej metodą Multiplate od fenotypu CYP2C19 u pacjentów przyjmujących dawkę 75 mg CLP. Dane przedstawiono jako mediany z rozstępem kwartylnym oraz zakresem wartości minimalnych i maksymalnych.

Tabela 29. Porównanie parametrów farmakokinetycznych CLP i jego metabolitów w zależności od fenotypu CYP2C19 u pacjentów po dawce 75 mg CLP i 300 mg CLP

Parametr farmakokinetyczny		UM	EM	IM	p
75 mg CLP					
CLP		n = 17	n = 14	n = 9	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	3,88 (2,54 – 9,02)	7,06 (2,45 – 7,71)	3,05 (2,01 – 4,59)	0,786
	C _{maks} [ng/mL]	2,01 (1,15 – 2,38)	1,25 (0,64 – 3,38)	1,04 (0,59 – 1,67)	0,265
	t _{0,5} [h]	1,20 (0,67 – 1,96)	1,07 (0,77 – 1,64)	2,33 (0,76 – 2,88)	0,486
	t _{maks} [h]	1,00 (0,50 – 2,00)	1,50 (0,50 – 2,00)	1,00 (0,50 – 2,00)	0,745
	Cl/F [x10 ³ L/h]	16,19 (7,59 – 23,73)	9,59 (8,69 – 17,63)	19,06 (12,26 – 26,77)	0,599
	V _d /F [x10 ³ L]	24,90 (17,81 – 48,08)	16,56 (10,82 – 72,66)	41,48 (30,28 – 67,27)	0,288
CLPM		n = 17	n = 16	n = 11	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	9475 (6313 – 11101)	7640 (6988 – 10744)	11605 (8118 – 16100)	0,178
	C _{maks} [ng/mL]	2076 (1497 – 2560)	1855 (1483 – 2572)	2743 (1354 – 3419)	0,469
	t _{0,5} [h]	7,54 (5,95 – 9,58)	6,20 (3,75 – 7,83)	6,55 (4,97 – 9,31)	0,083*
	t _{maks} [h]	1,00 (0,50 – 2,00)	1,00 (1,00 – 2,00)	2,00 (1,00 – 2,00)	0,459
H3		n = 13	n = 9	n = 8	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	7,48 (3,61 – 13,29)	5,45 (2,76 – 11,32)	2,94 (2,38 – 6,26)	0,245
	C _{maks} [ng/mL]	3,53 (1,99 – 10,94)	4,41 (2,74 – 6,10)	2,54 (1,14 – 3,62)	0,188
	t _{0,5} [h]	0,64 (0,45 – 0,87)	0,33 (0,27 – 1,09)	0,37 (0,49 – 0,83)	0,204
	t _{maks} [h]	1,00 (0,50 – 2,00)	1,00 (0,50 – 1,00)	1,00 (0,87 – 1,50)	0,531
H4		n = 13	n = 9	n = 8	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	9,35 (6,60 – 15,89)	20,30 (4,02 – 29,14)	4,88 (2,55 – 7,07)	0,066
	C _{maks} [ng/mL]	6,51 (3,10 – 13,05)	6,98 (4,59 – 10,07)	3,02 (1,68 – 3,85)	0,046
	t _{0,5} [h]	0,83 (0,43 – 1,08)	0,48 (0,36 – 0,86)	0,39 (0,32 – 1,03)	0,389
	t _{maks} [h]	1,00 (0,50 – 1,00)	1,00 (0,50 – 1,00)	1,00 (0,62 – 1,00)	0,980
300 mg CLP					
CLPM		n = 5	n = 5	n = 7	
	AUC _{0→t} [ng·h/mL]	34672 (22996 – 36645)	39228 (25474 – 41435)	31532 (17236 – 39700)	0,935*
	C _{maks} [ng/mL]	7277 (6647 – 9975)	7460 (7229 – 15066)	8026 (4586 – 8946)	0,606
	t _{0,5} [h]	7,25 (6,33 – 7,68)	5,25 (3,79 – 6,46)	4,67 (3,99 – 10,31)	0,723*
	t _{maks} [h]	2,00 (1,00 – 3,00)	1,33 (1,00 – 1,50)	1,00 (0,50 – 2,00)	0,568

* - test ANOVA



Rysunek 27: Zależność wartości H4 C_{maks} od statusu metabolizera u pacjentów po dawce podtrzymującej 75 mg CLP. Dane przedstawiono jako medianę z rozstępem kwartylnym oraz zakresem wartości minimalnych i maksymalnych.

6. Omówienie i dyskusja wyników

Występowanie oporności na CLP u pacjentów jest związane z pojawianiem się wielu działań niepożądanych, wynikających z niedostatecznego zahamowania agregacji płytek krwi. Pacjenci charakteryzujący się obniżoną odpowiedzią na leczenie przeciwplatekcyjne mają zwiększone ryzyko tworzenia się skrzepów w stentach, wystąpienia epizodów niedokrwienych a także zawału mięśnia sercowego [34]. Poznanie przyczyn istnienia tego zjawiska powinno uwzględniać określenie farmakokinetyki związku macierzystego i jego metabolitów i powiązanie ich z parametrami farmakodynamicznymi oraz czynnikami genetycznymi. Umożliwi to ocenę występowania ryzyka oporności na kłopidogrel i optymalizację leczenia przeciwzakrzepowego.

Pierwsze metody stosowane do oznaczania CLP i jego metabolitów pozwalały na oznaczanie w płynach biologicznych wyłącznie CLPM, którego stężenia w osoczu są rzędu $\mu\text{g/mL}$. Pomimo braku aktywności przeciwagregacyjnej CLPM może być przydatny do badania farmakokinetyki CLP w sposób pośredni oraz do monitorowania tzw. compliance, czyli przestrzegania przez pacjenta zaleceń lekarskich [188]. Dotychczas opracowane metody oznaczania CLPM wykorzystywały GC-MS [185], HPLC z detektorami UV [29,179–181], MS [186], i MS/MS [208]. Poza HPLC, wykorzystywane są metody HPCE z detektorem diodowym [182–184]. W Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMP została opracowana metoda HPCE z detekcją UV, którą z powodzeniem zastosowano do badań farmakokinetyki CLP na podstawie oznaczeń CLPM w osoczu i moczu pacjentów leczonych CLP [182]. Metoda ta nie była jednak dostatecznie czuła, aby umożliwić oznaczenie w osoczu leku macierzystego oraz aktywnych metabolitów. Ponadto, oznaczanie wyłącznie CLPM czyli nieaktywnego metabolitu, nie pozwoliłoby na pełną ocenę zależności pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi a efektem farmakodynamicznym CLP. Niezbędne było zatem opracowanie metody umożliwiającej oznaczenie w osoczu nie tylko CLPM, ale także CLP i izomerów H1-H4 jego metabolitu tiolowego, a w szczególności H4, który wywiera właściwy efekt farmakodynamiczny [21]. Ze względu na niskie stężenia, rzędu ng/mL [12,21,54,187], do oznaczenia CLP i izomerów CLPA w osoczu konieczne było zastosowanie metody HPLC ze znacznie bardziej czułym tandemowym detektorem mas (MS/MS). Spośród dotychczas opisanych metod jedynie Taubert i wsp. [27] zaproponowali warunki umożliwiające jednoczesne oznaczenie CLP, CLPA oraz

CLPM w osoczu. Jednakże z powodu braku wzorca analitycznego dla CLPA, stężenia tego związku były szacowane przy wykorzystaniu krzywej wzorcowej dla CLP, co pozwoliło na określenie tylko przybliżonych wartości. Inne metody wykorzystywane do oznaczenia CLPA w postaci jego połączeń z MPB [24,25,191] nie umożliwiły rozdzielenia poszczególnych izomerów. Natomiast w metodzie Peera i wsp. [191] jako wzorce analityczne wykorzystane były stereizomery o konfiguracji E (H1 i H2), które nie występują w próbkach klinicznych. Dopiero Tuffal i wsp. [21] opisali metodę oznaczania czterech zderywatyzowanych izomerów (MP-H1 – MP-H4), w osoczu zdrowych ochotników. Jednak nie oznaczono tą metodą CLP oraz CLPM.

Opracowana metoda HPLC-MS/MS charakteryzowała się odpowiednią selektywnością i umożliwiła oznaczenie z odpowiednią czułością CLP, CLPM oraz zderywatyzowanych izomerów CLPA (Rysunek 5). Nie zaobserwowano interferencji pochodzących od związków endogennych bądź substancji leczniczych przyjmowanych przez pacjentów. Możliwe było również rozdzielenie czterech zderywatyzowanych izomerów MP-H1 - MP-H4 (Rysunek 6). MP-H3 i MP-H4 (posiadające konfigurację Z) dostępne były jako oddzielne wzorce analityczne, natomiast MP-H1 i MP-H2 (będące izomerami E) jedynie jako mieszanina diastereoizomerów. W związku z tym ostateczną kolejność elucji MP-H1 - MP-H4 ustalono na podstawie warunków zaproponowanych przez Tuffala i wsp. [21], którzy całkowicie rozdzielili i zidentyfikowali powyższe anality. Zastosowano podane przez autorów warunki gradientowe fazy ruchomej z użyciem ACN i wody, z dodatkiem 2% kwasu mrówkowego i 0,2 mM octanu amonu. Rozdział MP-H2 i MP-H3 był niecałkowity (Rysunek 6A), jednak dotychczasowe dane sugerują, że w osoczu pacjentów leczonych CLP w ilościach oznaczalnych występują jedynie izomery H3 i H4 [21]. Z tego powodu dalsza walidacja metody HPLC-MS/MS uwzględniała tylko diastereoizomery o konfiguracji Z. Opracowana metoda charakteryzowała się liniowością w wyznaczonych zakresach stężeń dla wszystkich badanych analitów: 0,25 – 5,0 ng/mL dla CLP, 50 – 10000 ng/mL dla CLPM oraz 0,25 – 50,0 ng/mL dla MP-H3 i MP-H4. Współczynniki korelacji krzywych wzorcowych mieściły się w granicach 0,9982 – 0,9999 a liniowy przebieg został potwierdzony przy pomocy testu Mandela ($TV < F_{kryt}$) (Tabela 12). Dla CLPM, MP-H3 i MP-H4 współczynnik przesunięcia b był statystycznie nieistotnie różny od 0, dlatego równania tych krzywych przyjęły postać $y=ax$. W przypadku CLP parametr b różnił się od 0, stąd w przypadku tego związku wykorzystywano równanie $y=ax + b$. Oznaczalność (LOQ) dla analitów zostały określone jako stężenia, dla których, według

wymagań stawianych metodom analitycznym przez EMA, obliczona dokładność i precyzja nie powinny przekraczać 20% [202]. LOQ wynosiło odpowiednio: CLP – 0,25 ng/mL, CLPM – 50 ng/mL oraz dla MP-H3 i MP-H4 – 0,25 ng/mL. W przypadku MP-H3 i MP-H4 wyznaczone LOQ jest dwukrotnie niższe, niż w metodzie zaproponowanej przez Tuffala i wsp. [21], w której LOQ dla powyższych związków wynosiło 0,5 ng/mL. Precyzja wyrażona przez WZ wynosiła 2,38 – 19,56 %, natomiast dokładność przedstawiona jako błąd względny zawierała się w granicach 0,00 – 19,60%. Opracowana metoda HPLC-MS/MS była również odpowiednio dokładna i precyzyjna zarówno w przypadku oznaczeń w ciągu dnia, jak i pomiędzy dniami (błąd oznaczeń oraz WZ dla wszystkich stężeń poza LOQ były mniejsze niż 15%) (Tabela 13). Obliczony MF, znormalizowany względem IS nie przekraczał 15%. Można zatem wykluczyć znaczący wpływ matrycy (osocza) na odpowiedź detektora dla badanych analitów (Tabela 14). Potwierdzona została również trwałość analitów w osoczu, w warunkach krótko- i długoterminowego przechowywania, trzykrotnego rozmrażania i zamrażania oraz po przygotowaniu i umieszczeniu gotowych próbek w autosamplerze (Tabela 15). Powyższa metoda została zastosowana do oznaczenia CLP, CLPM, H3 i H4 w próbkach, do których dodano MPB w celu dezaktywacji reaktywnych grup tiolowych. Obecność tego odczynnika w próbkach pełnej krwi prowadziła do częściowej hemolizy krwinek, na co zwrócili uwagę również Tuffal i wsp. [21]. Zgodnie z sugestią tych autorów stężenia MP-H3 i MP-H4 oznaczone w próbkach nie wykazujących oznak hemolizy były uznawane jako niepewne i nie zostały uwzględnione w dalszej analizie statystycznej [21]. W przypadku próbek pełnej krwi do których nie dodano roztworu MPB, do oznaczania CLP i CLPM zastosowana została metoda HPCE [182] opracowana i w pełni zwalidowana w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UMiKM. W niniejszej pracy wykonano zatem jedynie częściową walidację, ograniczoną do wyznaczenia precyzji i dokładności w ciągu dnia dla próbek kontrolnych (obejmujących stężenia 1,0; 2,5 oraz 5,0 µg/mL CLP i CLPM). Taka procedura według EMA jest dopuszczalna, a częściowa walidacja może ograniczać się do określenia precyzji i dokładności w ciągu dnia dla próbek kontrolnych [202]. Obliczony błąd względny i WZ były mniejsze niż 15% (Tabela 16), co spełnia wymogi stawiane metodom analitycznym do oznaczania leków i ich metabolitów w płynach biologicznych [202]. Opracowane i zwalidowane metody HPLC-MS/MS oraz HPCE-UV z powodzeniem stosowano do oznaczenia CLP i jego metabolitów w próbkach pochodzących od pacjentów znajdujących się pod opieką

Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń UMiKM oraz Katedry i Kliniki Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UMiKM. Stężenia CLP oraz jego metabolitów oznaczono w próbkach pobranych od 41 pacjentów przyjmujących dawkę podtrzymującą 75 mg CLP oraz 3 pacjentów przyjmujących dawkę inicjującą 300 mg CLP. Natomiast do oznaczania CLPM w osoczu 14 pacjentów przyjmujących dawkę 300 mg CLP i 4 pacjentów przyjmujących 75 mg CLP zastosowano metodę HPCE.

Uzyskane profile farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów: CLPM, H3 i H4 przedstawiono na Rys. 7 - 14. U części pacjentów nie było możliwe wyznaczenie pełnych profili CLP, H3 i H4 z powodu bardzo niskich stężeń tych związków w osoczu, których wartości były poniżej LOQ. W takich przypadkach jedynymi parametrami farmakokinetycznymi brany pod uwagę w dalszej analizie statystycznej było C_{maks} oraz t_{maks} . CLP ulegał szybkiej absorpcji z przewodu pokarmowego, osiągając C_{maks} po około 1 h od podania leku zarówno po dawce 75 mg jak i 300 mg CLP (Tabela 17). Na podstawie dostępnych danych literaturowych można zauważyć zmienność farmakokinetyki CLP w różnych grupach etnicznych. W badaniach Di Girolamo i wsp. [209], C_{maks} oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$ leku macierzystego w populacji kaukaskiej wynosiły odpowiednio 0,9 ng/mL oraz 2,0 ng·h/mL. Natomiast podczas badania biorównoważności dwóch postaci CLP w populacji egipskiej, El Ahmady i wsp. [210] odnotowali ponad czterokrotnie wyższe wartości C_{maks} (około 4,3 ng/mL) i sześciokrotnie wyższe wartości $AUC_{0 \rightarrow t}$ (około 12,0 ng·h/mL). Niniejsze badanie przeprowadzono na jednorodnej etnicznie grupie pacjentów z rejonu Wielkopolski. Wyznaczone wartości C_{maks} (1,39 ng/mL) oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$ (4,02 ng·h/mL) po podaniu 75 mg CLP były najbardziej zbliżone do wartości uzyskanych przez Angiolillo i wsp. [54] ($C_{maks} \approx 1,8$ ng/mL, $AUC_{0 \rightarrow t} \approx 3,5$ ng·h/mL) oraz Hurbin i wsp. [13] ($C_{maks} = 1,5$ ng/mL, $AUC_{0 \rightarrow t} = 3,13$ ng·h/mL). Po podaniu dawki 300 mg CLP stwierdzono proporcjonalne zwiększenie C_{maks} (4,71 ng/mL) oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$ (20,82 ng·h/mL), a obliczone parametry były porównywalne z danymi literaturowymi, w których C_{maks} osiągało wartości w granicach 4,9 - 7,4 ng/mL, natomiast $AUC_{0 \rightarrow t}$ 10,4 - 18,0 ng·h/mL [43,54]. Stwierdzono, że przyjęcie leku z pokarmem wpływa na parametry farmakokinetyczne CLP i skutkuje wyższymi wartościami C_{maks} i AUC w porównaniu do podania na czczo [11,13]. W przeprowadzonym przeze mnie badaniu wszyscy pacjenci przyjmowali lek na czczo, zatem potencjalny wpływ pokarmu na farmakokinetykę CLP można było pominąć w dalszej analizie wyników.

Główny metabolit CLP, którym jest nieaktywny farmakologicznie CLPM, osiągał stężenia tysiąckrotnie wyższe, niż lek macierzysty (2076 ng/mL po podaniu dawki 75 mg oraz 7460 ng/mL po podaniu dawki 300 mg). Dla jednego z pacjentów przyjmujących dawkę 75 mg CLP (Tabela A37) profil farmakokinetyczny i obliczone na jego podstawie parametry CLPM znacząco odbiegały od pozostałych, aż pięciokrotnie przewyższając mediany dla C_{maks} oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$. Mogło być to wynikiem omyłkowego zażycia przez pacjenta podwójnej dawki leku. Z tego względu wyniki obliczeń parametrów farmakokinetycznych dla tego pacjenta zostały uznane za wątpliwe i nie uwzględniono ich w dalszej analizie statystycznej. CLPM charakteryzował się ponadto najwolniejszą eliminacją spośród badanych związków. Wyniki badań farmakokinetyki populacyjnej CLPM sugerują też, że zmiany poziomów tego metabolitu przebiegają zgodnie z modelem dwukompartментowym, co wyjaśniałoby stosunkowo długi $t_{0,5}$ (7,17 h dla dawki 75 mg CLP oraz 6,33 h dla dawki 300 mg CLP) [211,212]. Izomery H3 i H4 były natomiast bardzo szybko wydalone z organizmu ($t_{0,5}$ równe 0,52 h dla H3 oraz 0,56 h w przypadku H4) przez to w większości przypadków ich stężenie było poniżej LOQ już po 4 godzinie od podania leku (Rysunek 11 - Rysunek 14). Porównując ekspozycję izomerów H3 i H4, zarówno C_{maks} jak i $AUC_{0 \rightarrow t}$ izomeru H4 były statystycznie istotnie wyższe ($p=0,030$), niż w przypadku izomeru H3 (Tabela 30). Podobne zależności zaobserwowano dla dawki 300 mg (Tabela 30), jednak w tym przypadku okazały się one nieistotne statystycznie.

Tabela 30. Porównanie ekspozycji na izomery H3 i H4 CLPA u pacjentów po dawce 75 mg CLP oraz 300 mg CLP (dane przedstawiono jako mediany)

	H3	H4	p
75 mg CLP			
C_{maks} [ng/mL] (n=30)	3,35	5,22	0,030
$AUC_{0 \rightarrow t}$ [ng·h/mL] (n=26)	5,99	7,60	0,030
300 mg CLP			
C_{maks} [ng/mL] (n=3)	7,56	8,44	0,593
$AUC_{0 \rightarrow t}$ [ng·h/mL] (n=3)	13,18	11,50	0,593

Co interesujące, oznaczone stężenia poszczególnych izomerów w danych próbkach niekiedy bardzo odbiegały od siebie. Przykładowo, u jednego z pacjentów stężenie H3 oznaczone po 2 godzinach od podania leku wynosiło 0,21 ng/mL, natomiast oznaczone w tej samej próbce stężenie H4 wynosiło 10,07 ng/mL (Tabela A1). Wyniki te

różnią się od przedstawionych przez Tuffala i wsp. [21], którzy odnotowali zbliżoną ekspozycję dla obydwu stereoizomerów CLPA w grupie zdrowych ochotników po podaniu dawki 75 mg CLP. Ponadto, obliczone przez mnie parametry (C_{maks} i $AUC_{0\rightarrow t}$) określające ekspozycję na H4 były niższe niż wartości wyznaczone dla zdrowych ochotników w dostępnej literaturze [13,21,54,213]. Przyczyną mogą być różnice między farmakokinetyką CLPA u zdrowych ochotników i pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi. Według Heestermansa i wsp. [214], stan fizjologiczny pacjentów ze STEMI może znacząco wpływać na farmakokinetykę CLP i jego metabolitów, w tym CLPA. Wynika to z mechanizmów kompensacyjnych występujących w STEMI, takich jak wytworzenie krążenia obocznego, aktywacja układu współczulnego, skurcz tętnic obwodowych oraz zmniejszona perfuzja żołądkowo-jelitowa. W związku z tym wchłanianie CLP u pacjentów ze STEMI jest zaburzone. Z kolei u pacjentów z historią zakrzepicy w stentach po zabiegach PCI stwierdzono zmniejszoną aktywację CLP do CLPA [215]. Stężenie CLPA oznaczone u tych pacjentów po podaniu 600 mg CLP wynosiło 3,2 ng/mL i było znacząco niższe w porównaniu do zdrowych ochotników, u których było równe 14,5 ng/mL. Czynniki takie jak niewydolność nerek, ostry zespół wieńcowy oraz zaawansowany wiek (>65 lat), uznawane za dobre wskaźniki ryzyka wystąpienia oporności na CLP i wystąpienia zdarzeń zakrzepowo-niedokrwienych [85] mogą mieć wpływ na farmakokinetykę tego leku. Poza tym, skuteczność leczenia przeciwzakrzepowego CLP może być zmniejszona na skutek przyjmowania innych leków, takich jak IPP, a w szczególności omeprazol [53,57,58]. W niniejszym badaniu nie stwierdzono jednak statystycznie istotnego wpływu wieku oraz jednoczesnego podawania IPP na C_{maks} i $AUC_{0\rightarrow t}$ izomerów H3 i H4 (Tabela 31).

Tabela 31. Porównanie ekspozycji H3 i H4 u pacjentów po dawce 75 mg CLP w zależności od wieku oraz jednoczesnego podawania PPI (dane przedstawiono jako mediana z rozstępem kwartylnym)

Parametr farmakokinetyczny	Czynnik		Wartość p
	Wiek		
	<65 lat (n=17)	≥65 lat (n=13)	
H3 C_{maks} [ng/mL]	2,46 (1,69 – 6,10)	3,67 (3,28 – 5,46)	0,279
H3 AUC_{0→t} [ng·h/mL]	5,69 (2,38 – 10,97)	6,26 (3,27 – 7,69)	0,789
H4 C_{maks} [ng/mL]	3,60 (2,15 – 10,07)	6,51 (3,96 – 9,79)	0,241
H4 AUC_{0→t} [ng·h/mL]	8,16 (3,89 – 20,30)	7,35 (4,88 – 14,42)	0,878
	IPP		
	Tak (n=13)	Nie (n=17)	
H3 C_{maks} [ng/mL]	3,53 (2,46 – 4,41)	3,28 (1,58 – 6,10)	0,490
H3 AUC_{0→t} [ng·h/mL]	6,09 (3,15 – 9,75)	4,72 (2,94 – 10,97)	0,807
H4 C_{maks} [ng/mL]	6,51 (3,60 – 10,07)	4,59 (1,69 – 10,11)	0,407
H4 AUC_{0→t} [ng·h/mL]	9,44 (7,01 – 22,94)	6,79 (3,22 – 12,22)	0,175

W celu określenia skuteczności leczenia CLP w badanej grupie pacjentów zbadano również efekt farmakodynamiczny po podaniu leku. Do niedawna, najczęściej stosowaną metodą badania odpowiedzi farmakodynamicznej na leczenie przeciwplatek było LTA, którą uważa się za „złoty standard” w ocenie funkcji płytek. Jej wadą jest jednak skomplikowana metodyka wymagająca dobrego przeszkolenia personelu oraz czasochłonność. Dlatego w poniższej pracy zdecydowano o zastosowaniu metody opartej na agregometrii impedancyjnej, która charakteryzuje się prostą procedurą przygotowania próbki do badania, jednocześnie pozwalając pewnie ocenić skuteczność przeciwagregacyjną CLP [216]. Mediany wartości określającej reaktywność płytek uzyskane w moich badaniach wynosiły odpowiednio 141 AU·min dla grupy przyjmującej 75 mg CLP oraz 400 AU·min w przypadku grupy pacjentów, którym podano dawkę inicjującą 300 mg CLP (Tabela 18). Porównując uzyskane wyniki z danymi literaturowymi, można stwierdzić, że dla dawki inicjującej 300 mg, wartości te były wyższe niż podane przez Oberhänsli i wsp. [217] (wartości średnie około 200 AU·min) oraz Sibbinga i wsp. [82] (mediana równa 225 AU·min). Należy

jednak zauważyć, że w obydwu cytowanych pracach, dawka inicjująca CLP była dwukrotnie większa, niż w przypadku badanej przez mnie grupy. Natomiast dla dawki podtrzymującej obserwowana reaktywność płytek krwi była niemal dwukrotnie niższa, niż odnotowana przez Oberhänsli i wsp. oraz Jaitner i wsp. [217,218]. W cytowanych wyżej badaniach stwierdzono również zdecydowanie większą częstość występowania odporności na CLP, sięgającą 13% [218]. W badanej przez mnie grupie spośród 37 pacjentów po dawce 75 mg CLP aż 14 wykazywało bardzo dobrą odpowiedź na leczenie ($AUC_{agr} < 100 \text{ AU}\cdot\text{min}$), a jedynie u dwóch pacjentów wartości AUC_{agr} przekraczały $468 \text{ AU}\cdot\text{min}$ [81]. Wynik jednego z pacjentów, który charakteryzował się wysoką reaktywnością płytek ($AUC_{agr} = 637 \text{ AU}\cdot\text{min}$), nie został uwzględniony w dalszych obliczeniach, ponieważ na podstawie wcześniejszych oznaczeń farmakokinetycznych CLPM stwierdzono, że pacjent ten mógł omyłkowo zażyć podwójną dawkę leku. Natomiast drugi pacjent, wykazujący podwyższoną reaktywność płytek ($AUC_{agr} = 747 \text{ AU}\cdot\text{min}$), charakteryzował się jednocześnie stosunkowo niskimi wartościami C_{maks} izomerów H3 i H4 (odpowiednio $3,41 \text{ ng/mL}$ oraz $2,53 \text{ ng/mL}$). Aby określić który parametr farmakokinetyczny jest najlepszym wskaźnikiem odpowiedzi farmakodynamicznej, zbadano zależności pomiędzy wartościami określającymi reaktywność płytek krwi (AUC_{agr}) z podstawowymi parametrami farmakokinetycznymi (Tabela 22). Stwierdzono istotną statystycznie korelację pomiędzy C_{maks} izomeru H4 a AUC_{agr} ($r = -0,439$; $p = 0,025$), a także tendencję do umiarkowanej korelacji pomiędzy C_{maks} H3 a reaktywnością płytek krwi ($r = -0,370$; $p = 0,063$). Wyniki te wskazują na użyteczność połączenia wskaźników farmakokinetycznych i farmakodynamicznych w przewidywaniu występowania oporności na CLP. Jest to zgodne z wnioskami Erlinge i wsp. [143], którzy stwierdzili, że niedostateczna odpowiedź na CLP jest związana z niższymi poziomami CLPA. Uzyskana w niniejszym badaniu korelacja pomiędzy C_{maks} H4 a reaktywnością płytek była wyższa niż podana przez Lianga i wsp. [219], gdzie współczynnik korelacji wynosił $r = -0,3384$ ($p < 0,01$). Należy jednak zauważyć, że Liang i wsp. oznaczali stężenia H4 jedynie po upływie godziny od podania leku, nie wyznaczano natomiast C_{maks} oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$.

W celu określenia przyczyn obserwowanej zmienności międzyosobniczej w odpowiedzi na CLP u badanych pacjentów oceniono wpływ polimorfizmu genetycznego CYP2C19 i P-gp na parametry farmakokinetyczne i efekt farmakodynamiczny. Biorąc pod uwagę częstość występowania poszczególnych polimorfizmów w populacji polskiej oraz ich możliwe znaczenie w rozwoju oporności

na CLP, a także stosunkowo niewielką grupę badaną, zdecydowano się na ocenę polimorfizmu P-gp (3435C>T), oraz alleli *2 i *17 genu kodującego CYP2C19. Poszczególne genotypy określono na podstawie klasycznej metody PCR-RFLP (w przypadku polimorfizmu *ABCB1* oraz *CYP2C19*2*) oraz allelo-specyficznego PCR (dla *CYP2C19*17*). Sekwencjonowanie losowo wybranych zamplifikowanych fragmentów DNA potwierdziło prawidłowość wyników uzyskanych klasycznymi metodami. Badanie to opierało się na zmodyfikowanej metodzie Sangera wykorzystującej znakowane fluorescencyjnie dideoksynukleotydy (ddNTP), z których każdy znakowany jest innym fluorochromem. Jeżeli podczas amplifikacji DNA do wydłużanej nici zostanie dołączony dNTP to brak grupy hydroksylowej w pozycji 3' uniemożliwia dalszą elongację DNA. W rezultacie otrzymywana jest mieszanina fragmentów DNA o różnej długości. Za pomocą elektroforezy kapilarnej połączonej z detekcją fluorescencyjną rozdzielono fragmenty DNA z dokładnością do 1 pz i zidentyfikowano terminalny ddNTP [220,221]. Częstości występowania genotypów zamieszczono w Tabelach 19-21. Test χ^2 nie wykazał statystycznie istotnych różnic pomiędzy oczekiwanymi a rzeczywistymi częstościami występowania genotypów, zatem spełnione zostało prawo równowagi Hardy'ego-Weinberga. Obliczone częstości poszczególnych alleli są zbliżone do wartości obserwowanych w populacji polskiej przez innych autorów [122,222–224]. W przypadku P-gp, częstości występowania alleli C i T były do siebie zbliżone, przy czym w badanej przez mnie grupie częściej występował uważany za polimorficzny wariant T. Dla polimorfizmu *CYP2C19*2* nie zaobserwowano występowania homozygot recesywnych *2/*2. Natomiast allel *17 genu *CYP2C19* był reprezentowany stosunkowo często w badanej populacji (*1 – 0,705, *17 – 0,295). Częstość występowania homozygot *17/*17 (11,5 %) była większa w porównaniu do danych pochodzących z innych populacji europejskich wynoszących 5,8 % [114] oraz 4,2 % [225].

Polimorfizm genetyczny P-gp miał największy wpływ na $AUC_{0 \rightarrow t}$ leku macierzystego u pacjentów po dawce 75 mg CLP (Tabela 23). Pacjenci posiadający genotyp *T/T* charakteryzowali się niemal czterokrotnie niższymi wartościami tego parametru niż osoby o genotypie *C/C* ($p = 0,027$) oraz dwukrotnie niższymi niż heterozygoty ($p = 0,057$). Oznaczone wartości C_{maks} dla tej grupy pacjentów także były niższe, niż w przypadku pozostałych wariantów genetycznych. Wyraźnie wyższe były również wartości Cl oraz V_d . Tendencja ta pokrywa się z dotychczas opublikowanymi wynikami Tauberta i wsp. [14], którzy odnotowali, że homozygoty *T/T* posiadały

znacząco niższe parametry C_{maks} oraz AUC niezmienionego CLP w porównaniu do pozostałych genotypów. Istotną różnicą jest to, że w wyżej cytowanej pracy stwierdzono również istotne różnice w stężeniach CLPA, natomiast w niniejszym badaniu nie zaobserwowano podobnej zależności. Polimorfizm genetyczny P-gp, a zwłaszcza obecność homozygotycznego wariantu *T/T*, jest poza tym wiązany ze zwiększoną częstością występowania niedostatecznego zahamowania agregacji płytek oraz zdarzeń niedokrwiennych [123]. W przeprowadzonym badaniu, nie zaobserwowałam jednak znaczącej różnicy w agregacji płytek u homozygot *T/T* (Tabela 24). Pokrywa się to z wynikami metaanalizy przeprowadzonej przez Su i wsp. [125], w której dowiedziono brak wpływu zmiany *3435C>T* na aktywność płytek. Część autorów nie odnotowuje istotnej zależności pomiędzy genotypem *ABCB1* a skutecznością terapii CLP i częstością występowania działań niepożądanych, co sugeruje, że wpływ P-gp na odpowiedź na CLP nie jest jednoznaczny [88,100,122].

Analizując wpływ polimorfizmu genetycznego *CYP2C19* stwierdzono u nosicieli allelu *2 znacząco niższe wartości C_{maks} (3,02 ng/mL) oraz $AUC_{0\rightarrow t}$ (4,88 ng·h/mL) dla aktywnego izomeru H4 w porównaniu do homozygot dzikich ($C_{maks} = 6,74$ ng/mL, $AUC_{0\rightarrow t} = 10,01$ ng·h/mL) po podaniu 75 mg CLP (Tabela 25). Osoby te charakteryzowały się również znacznie niższą ekspozycją na izomer H3, chociaż różnice te nie były istotne statystycznie. Wyniki te są zgodne z danymi opublikowanymi przez innych autorów, które pokazują, że allele typu LoF w znaczącym stopniu wpływają na farmakokinetykę izomerów aktywnego metabolitu CLP [92–95,206,226]. Według Hulota i wsp. [95] oraz Kelly i wsp. [226], stężenie oraz AUC CLPA są istotnie niższe, gdy pacjent jest nosicielem przynajmniej jednej kopii allelu *2. W przypadku nosicieli allelu *2 oba izomery były nieznacznie szybciej eliminowane, niż w przypadku homozygot **1/*1* (Tabela 25). Allel *2 może mieć także wpływ na zmniejszone stężenia CLP. Park i wsp. [227] stwierdzili, że u pacjentów posiadających przynajmniej jeden allel typu LoF, po podaniu dawki 75 mg lek macierzysty osiągał niższe stężenia. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach stężenia CLP były niższe u heterozygot **1/*2*, lecz zależność ta nie była statystycznie istotna. Co interesujące, heterozygoty **1/*2* wykazywały wyższe C_{maks} oraz $AUC_{0\rightarrow t}$ nieaktywnego CLPM, choć różnice te nie były istotne statystycznie. Zależności te były wyraźniej zaznaczone w grupie przyjmującej dawkę podtrzymującą, niż po podaniu dawki 300 mg. Rozpatrując różnice w farmakokinetyce CLP i jego metabolitów w aspekcie występowania polimorfizmu *CYP2C19*17*, który jest polimorfizmem typu

GoF, można przypuszczać, że ekspozycja na izomery aktywnego metabolitu będzie wyższa w przypadku nosicieli *17. Analizując wyniki uzyskane w grupie badanej można zauważyć u homozygot *17/*17 nieco wyższe wartości C_{maks} oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$ izomerów H3 i H4 (Tabela 26). Nie wykazano jednak statystycznej istotności tych różnic. Poza tym $t_{0,5}$ CLPM był znacznie krótszy u pacjentów z genotypem *1/*1 przyjmujących dawkę 75 mg CLP ($p=0,017$). W przypadku pozostałych parametrów farmakokinetycznych nie stwierdzono statystycznie znamiennych różnic.

Allele *2 i *17 *CYP2C19* mają przeciwstawny wpływ na aktywność tego izoenzymu [87], więc aby ocenić wpływ obydwu polimorfizmów, sklasyfikowano pacjentów pod względem fenotypu CYP2C19 w odniesieniu do statusu metabolicznego (Tabela 27). Pacjenci posiadający kopie obydwu alleli (*2 i *17) posiadają niejednoznaczny status metabolizera. Na podstawie publikacji Tantry i wsp. [207], zdecydowano o przyporządkowaniu tych pacjentów do grupy osób o średniej szybkości metabolizmu (IM). Ze względu na brak w badanej przeze mnie grupy osób o genotypie *2/*2, w podziale nie uwzględniono osób o fenotypie wolnego metabolizera (PM). Najliczniej reprezentowanym fenotypem był UM, do którego można było zaliczyć 37,7% pacjentów. Pozostałe fenotypy – EM i IM, miały zbliżoną liczebność. Test Kruskalla-Wallisa, przy pomocy którego badano zależność reaktywności płytek krwi od fenotypu CYP2C19 u pacjentów po dawce 75 mg CLP, wykazał, że pośredni metabolizerzy charakteryzowali się najwyższymi wartościami agregacji płytek (Tabela 28). Największa różnica występowała pomiędzy fenotypami IM oraz EM ($p=0,028$). Należy jednak zauważyć, że nawet w grupie IM, wartość AUC_{agr} charakteryzująca reaktywność płytek była znacznie niższa, niż wartość graniczna 486 AU·min, powyżej której znacząco wzrasta liczba incydentów zakrzepowych [81]. Najmniejsza odpowiedź farmakodynamiczna u IM związana była również z najniższymi wartościami C_{maks} aktywnego H4 w tej grupie pacjentów ($p=0,046$). Wartości dla AUC_{0-t} izomeru H4 oraz C_{maks} i $AUC_{0 \rightarrow t}$ izomeru H3 także były najniższe w przypadku IM, jednak zależności te nie były statystycznie istotne. Obecność allelu *2 wydaje się mieć przeważający wpływ, zarówno na odpowiedź farmakodynamiczną, jak i farmakokinetykę CLP. Świadczyć o tym mogą nieistotne statystycznie różnice w wartościach poszczególnych parametrów pomiędzy UM oraz EM. Jednocześnie wyraźna jest różnica w obliczonych parametrach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych pomiędzy IM a pozostałymi fenotypami. Potwierdzają to wyniki opublikowane przez Lewisa i wsp. [228], którzy dowiedli, że allel *2 a nie *17 jest czynnikiem determinującym zarówno zmniejszone stężenie

aktywnego metabolitu CLP, jak i agregację płytek krwi. Najprawdopodobniej jest to wynik tzw. nierównowagi sprzężeń występującej pomiędzy allelem *17 oraz *2 [229]. Nosiciele allelu *17, najczęściej nie posiadają równocześnie zmiany 681G>A, charakteryzującej allel *2. Można zatem przypuszczać, że wyraźniejszy efekt przeciwplatek u nosicieli *17 niż u nosicieli *2, jest wynikiem braku obecności u nich allelu odpowiadającego za obniżoną aktywność CYP2C19.

Uzyskane w niniejszych badaniach wyniki wskazują na wysoką międzyosobniczą zmienność parametrów farmakokinetycznych CLP i jego metabolitów oraz odpowiedzi farmakodynamicznej w grupie pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi. Częściowym wyjaśnieniem tego zjawiska mogą być obserwowane zmiany polimorficzne białek biorących udział we wchłanianiu oraz metabolizmie CLP. Do tej pory jednak, czynnikiem genetycznym najsilniej utożsamianym z występowaniem oporności na CLP są allele typu LoF, a zwłaszcza *CYP2C19**2, który może być bezpośrednią przyczyną nawet 12% obserwowanej zmienności w agregacji płytek [104]. Liczne meta-analizy i badania kohortowe dowodzą, że pacjenci z obniżoną aktywnością CYP2C19 są bardziej narażeni na wystąpienie niedostatecznego zahamowania agregacji płytek krwi i w konsekwencji na pojawienie się zdarzeń sercowo-naczyniowych [92,99,100,103,104,106,107,109,230–233]. W roku 2010 amerykańska Agencja Żywności i Leków zaleciła umieszczenie na opakowaniach CLP ostrzeżenia dotyczącego obniżonej skuteczności tego leku u wolnych metabolizerów [234]. Z uwagi na stosunkowo dużą częstość występowania alleli typu LoF w populacjach pochodzenia europejskiego (ok. 15%) i bardzo dużą w populacjach azjatyckich sięgającą 30% [235] przełamanie oporności na CLP wynikającej z czynników genetycznych staje się bardzo istotną kwestią. Jednym rozwiązaniem może być zastąpienie CLP bardziej nowoczesnym preparatem przeciwagregacyjnym – prasugrelem bądź tikagrelor. Prasugrel, podobnie jak CLP, wymaga dwuetapowej aktywacji do farmakologicznie czynnego metabolitu, jednak w przeciwieństwie do CLP enzymy CYP450 są zaangażowane w tylko w etapie przekształcenia metabolitu pośredniego do aktywnej postaci [236]. Przez to prasugrel charakteryzuje się lepszą odpowiedzią farmakodynamiczną oraz rzadziej występującą opornością [112,237]. Z kolei tikagrelor, odwracalny antagonistą ADP w obrębie receptora P2Y₁₂, ulega aktywacji z pominięciem CYP2C19, przez co jego efekt farmakodynamiczny i skuteczność zapobiegania poważnym zdarzeniom sercowo-naczyniowym jest wyższa niż w przypadku CLP i niezależna od polimorfizmu CYP450 [88,238]. Wadą nowych

leków przeciwzakrzepowych jest jednak wysoki koszt leczenia. Drugim z potencjalnych rozwiązań tego problemu wydaje się być spersonalizowana terapia przeciwplatekowa, oparta na określeniu genotypu pacjenta w placówce prowadzącej terapię przeciwplatekową (point-of-care) w celu ustalenia najbardziej optymalnego schematu dawkowania [239]. Do tej pory potwierdzono, że zwiększenie dawki inicjującej CLP z 300 mg do 600 mg [240] lub 900 mg [241] oraz podwyższenie dawki podtrzymującej do 150 mg [105] może skutecznie przełamać podwyższoną reaktywność płytek krwi, w szczególności u osobników heterozygotycznych (*1/LoF). W badaniu przeprowadzonym przez Frelingera i wsp. [242], pomimo rygorystycznego doboru grupy badanej (zdrowi, niepalący ochotnicy niebędący nosicielami allelu *CYP2C19*2*, nieprzyjmujący równocześnie innych substancji leczniczych), oraz starannego przeanalizowania czynników potencjalnie wpływających na oporność na CLP (w tym polimorfizmów *CYP3A5*, *ABCB1*, *PONI* a także czynników fizjologicznych), zmienność w odpowiedzi farmakodynamicznej wynosiła 35 – 65%. Pokazuje to, że duża różnorodność w opowiedzi na leczenie CLP, pomimo wielu przeprowadzonych badań i wyraźnego wpływu aspektów genetycznych i pozagenetycznych, wynika również z innych mechanizmów, które nie zostały do tej pory wyjaśnione. W tym kontekście istotna wydaje się ocena farmakokinetyki aktywnego metabolitu CLP.

7. Wnioski

- Opracowana metoda HPLC-MS/MS do oznaczania CLP i jego metabolitów w osoczu spełnia kryteria walidacyjne stawiane metodom bioanalitycznym, może być stosowana do badań farmakokinetycznych i jest pierwszą opisaną w literaturze metodą umożliwiającą jednoczesne oznaczenie CLP, CLPM, H3 i H4 w osoczu pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi.
- Zmienność międzyosobnicza parametrów farmakokinetycznych CLP i jego metabolitów nie była związana z równoczesnym przyjmowaniem IPP oraz zaawansowanym wiekiem pacjentów.
- Efekt farmakodynamiczny wyrażony jako agregacja płytek krwi w odpowiedzi na ADP istotnie zależy od C_{maks} H4, metabolitu CLP posiadającego aktywność farmakologiczną.
- Polimorfizm genetyczny P-gp (3435C>T) miał istotny wpływ na zmniejszoną absorpcję CLP u homozygot T/T, jednak nie wiązało się to z podwyższoną reaktywnością płytek krwi w tej grupie pacjentów.
- Pośredni metabolizerzy, będący nosicielami kopii allelu *CYP2C19*2*, charakteryzowali się zmniejszoną ekspozycją na aktywny metabolit H4 oraz wyższą reaktywnością płytek krwi w porównaniu do pozostałych fenotypów.
- Polimorfizm genetyczny glikoproteiny P oraz izoenzymu *CYP2C19* nie wyjaśniają w wystarczający sposób przyczyn zmienności międzyosobniczej farmakokinetyki CLP i jego metabolitów oraz reaktywności płytek krwi w grupie pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi.
- Połączenie badań farmakokinetycznych, farmakodynamicznych oraz genetycznych pozwala na uzyskanie pełniejszego obrazu przyczyn zmienności odpowiedzi na leczenie CLP.

8. Streszczenie

Nieprawidłowa odpowiedź na leczenie przeciwplatekcyjne z użyciem kłopidogrelu (CLP) dotyczy 5-44% populacji. Pacjenci wykazujący oporność na CLP narażeni są na częstsze występowanie udaru niedokrwiennego i zawału mięśnia sercowego a w konsekwencji zgonu z przyczyn naczyniowych. Przyczyny występowania oporności na CLP nie są jednoznaczne i obejmują zarówno czynniki genetyczne jak i pozagenetyczne. Wśród czynników genetycznych najistotniejszą rolę wydają się odgrywać polimorfizmy genów kodujących białka uczestniczące we wchłanianiu CLP oraz izoenzymów z grupy cytochromu P450. CLP wymaga bowiem przekształcenia do aktywnego metabolitu tiolowego przez układ CYP450, a zwłaszcza izoenzym CYP2C19. Wiedza na temat zależności farmakokinetyczno-farmakodynamicznych kłopidogrelu w odniesieniu do czynników genetycznych jest jednak niewystarczająca.

Aby ocenić farmakokinetykę CLP, jego nieaktywnego metabolitu karboksylowego (CLPM) oraz izomerów H3 i H4 metabolitu tiolowego u pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego, opracowano i zwalidowano metodę HPLC z tandemowym detektorem mas (MS/MS). Umożliwiła ona jednoczesne oznaczenie CLP i jego metabolitów w próbkach osocza. Ze względu na małą stabilność H3 i H4, związki te wymagały wcześniejszej derywatywacji przy pomocy 2-bromo-3'-metoksyacetofenonu, który dodawano do próbek pełnej krwi bezpośrednio po pobraniu od pacjenta. Opracowana metoda była odpowiednio dokładna i precyzyjna, określono granicę oznaczalności dla analitów, ich stabilność w warunkach przechowywania próbek oraz wpływ matrycy. Do oznaczania CLPM w próbkach, do których nie dodano odczynnika derywatywującego stosowano walidowaną metodę HPCE z detektorem UV. Obydwie metody spełniały wymogi stawiane metodom bioanalitycznym.

Powyższe metody zastosowano do oznaczenia CLP i jego metabolitów w próbkach pobranych od 45 pacjentów przyjmujących dawkę podtrzymującą 75 mg CLP oraz 17 pacjentów przyjmujących dawkę inicjującą 300 mg CLP. Oznaczone stężenia CLPM w osoczu, rzędu $\mu\text{g/mL}$, były tysiąckrotnie wyższe w porównaniu do pozostałych analitów. Parametry farmakokinetyczne CLP i jego metabolitów zostały obliczone za pomocą programu WinNonlin 6.2 przy wykorzystaniu założeń farmakokinetyki bezmodelowej. CLP, H3 oraz H4 były szybciej eliminowane z ustroju ($t_{0,5} \approx 1 \text{ h}$) w porównaniu do CLPM ($t_{0,5} \approx 6,5 \text{ h}$). Ponadto ekspozycja na izomer H4 metabolitu tiolowego była nieznacznie wyższa, niż w przypadku izomeru H3.

Wyznaczone parametry farmakokinetyczne charakteryzowały się dużą zmiennością międzyosobniczą. Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnego wpływu czynników pozagenetycznych, takich jak wiek pacjenta oraz równoczesne przyjmowanie leków z grupy inhibitorów pompy protonowej na farmakokinetykę CLP.

Efekt farmakodynamiczny wywoływany przez CLP oszacowano metodą agregometrii impedancyjnej. Mediany wartości agregacji wynosiły odpowiednio 400 AU·min po dawce 300 mg CLP i 141 AU·min po dawce 75 mg CLP. Jedynie u dwóch pacjentów z badanej grupy stwierdzono wyraźnie podwyższoną agregację płytek krwi. Ponadto stwierdzono istotną korelację pomiędzy agregacją płytek krwi a C_{maks} izomeru H4 aktywnego metabolitu CLP.

Oceniono również wpływ polimorfizmu genetycznego glikoproteiny P (zmiana 3435C>T) oraz CYP2C19 (allele *2 i *17) na obserwowaną zmienność parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych CLP. Badania wykonano przy zastosowaniu metody polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych oraz techniki allelo-specyficznego PCR. W przypadku polimorfizmu glikoproteiny P stwierdzono, że CLP w mniejszym stopniu ulega absorpcji w przypadku homozygot *T/T*. Nie zaobserwowano jednak statystycznie istotnego związku pomiędzy genotypem 3435C>T a reaktywnością płytek krwi. W przypadku badanych alleli *CYP2C19* dominujący wpływ zarówno na parametry farmakokinetyczne aktywnego metabolitu CLP jak i na odpowiedź farmakodynamiczną wywierał allel *2, związany ze zmniejszoną aktywnością *CYP2C19*. Pacjenci posiadający przynajmniej jedną kopię allelu *2 charakteryzowali się istotnie niższą ekspozycją na aktywny metabolit H4 a agregacja krwi była u nich wyższa w porównaniu do pacjentów nieposiadających tego allelu. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że włączenie badań farmakokinetycznych obok badań farmakodynamicznych i genetycznych pozwala na pełniejsze wyjaśnienie przyczyn zmienności odpowiedzi na leczenie CLP.

9. Abstract

Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in relation to the genetic polymorphisms of CYP2C19 isoenzyme and P-glycoprotein

Impaired reaction to the antiplatelet treatment with clopidogrel (CLP) affects 5-44% of population. Patients with CLP resistance are at the higher risk of stroke, myocardial infarction and vascular death. The causes of CLP resistance are uncertain, however both genetic and non-genetic factors have a potential influence. Among genetic factors the most prominent role seem to have polymorphic variants of proteins involved in CLP absorption and cytochrome P450 isoenzymes. CYP450 and in particular isoenzyme CYP2C19 is required for the transformation of CLP to an active thiol metabolite. Still, knowledge on pharmacokinetic-pharmacodynamic interactions of CLP with an emphasis on potential influence of genetic factors is insufficient.

An HPLC method with a tandem mass spectrometry detection (MS/MS) was developed and validated to assess pharmacokinetics of CLP, its inactive carboxylic metabolite (CLPM) and H3 and H4 isomers of an active thiol metabolite in patients with cardiovascular diseases. The method enabled simultaneous determination of CLP and its metabolites in incurred plasma samples. A derivatization process with 2-bromo-3'-methoxyacetophenone was required due to low stability of H3 and H4. The derivatizing agent was added to the full blood samples directly after collection. The elaborated method was accurate and precise. Quantitation limits and stability of the analytes as well as the matrix factor were evaluated. For samples not stabilized with bromoethoxyacetophenone a validated HPCE method with UV detection was applied. Both methods fulfilled the criteria for bioanalytical method validation.

Both the HPLC-MS/MS and HPCE methods were used for determination of CLP and its metabolites in samples collected from 45 patients receiving 75 mg maintenance dose of CLP and 17 patients receiving 300 mg loading dose of CLP. CLPM plasma concentrations were 1000-fold higher than other analytes. Pharmacokinetic parameters were calculated with a WinNonlin 6.2 software by means of non-compartmental analysis. CLP, H3 and H4 were rapidly eliminated ($t_{0.5} \approx 1$ h), while CLPM elimination was slower ($t_{0.5} \approx 6,5$ h). Exposition to the H4 isomer was slightly higher than to the H3 isomer. Evaluated pharmacokinetic parameters were characterized by a large inter-individual variability. However, no statistically important

influence of non-genetic factors, such as advanced patient's age or simultaneous treatment with proton pump inhibitors was observed.

Pharmacodynamic effect was evaluated by means of the impedance aggregometry method. Median aggregation values were 400 AU•min after 300 mg loading dose and 141 AU•min after 75 mg CLP, respectively. Only two patients in the studied group could be characterized as non-responders due to an increased platelet aggregation. Moreover, it was found that there was a significant correlation between platelet aggregation and Cmax H4 thiol metabolite isomer.

An influence of the glycoprotein P genetic polymorphism (3435C>T) and CYP2C19 (alleles *2 and *17) on the observed response to CLP was evaluated. Genetic polymorphisms were detected by means of the restriction fragments length polymorphism method and allelo-specific PCR. It was observed that in 3435 T/T homozygotes CLP absorption was diminished. However, no statistically significant influence of 3435C>T genotype on platelet reactivity was observed. Among studied CYP2C19 alleles, *2 variant had the most significant impact on both pharmacokinetics and measured pharmacodynamic response to CLP. In carriers of at least one copy of *2 allele exposition to the active metabolite H4 isomer was lower while at the same time blood aggregation was higher when compared to the wild type homozygotes. It was concluded, that addition of pharmacokinetic measurements along pharmacodynamic and genetic studies may result in more in-depth explanation of the variability in response to CLP.

10. Piśmiennictwo

1. Clopidogrel (DB00758). *DrugBank* 2013, <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00758>, data wejścia: 15.07.2013.
2. Reist M, Roy-de Vos M, Montseny JP, Mayer JM, Carrupt PA, Berger Y, Testa B: Very slow chiral inversion of clopidogrel in rats: a pharmacokinetic and mechanistic investigation. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 2000, 28:1405–1410.
3. Savi P, Bernat A, Dumas A, Ait-Chek L, Herbert JM: Effect of aspirin and clopidogrel on platelet-dependent tissue factor expression in endothelial cells. *Thromb. Res.* 1994, 73:117–124.
4. Gomez Y, Adams E, Hoogmartens J: Analysis of purity in 19 drug product tablets containing clopidogrel: 18 copies versus the original brand. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 34:341–348.
5. Durga Rao D, Kalyanaraman L, Sait SS, Venkata Rao P: A validated stability-indicating normal phase LC method for clopidogrel bisulfate and its impurities in bulk drug and pharmaceutical dosage form. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 52:160–165.
6. *United States Pharmacopeia, 32nd Edition.* United States Pharmacopeial Convention; 2009.
7. Kim S-D, Kang W, Lee HW, Park DJ, Ahn JH, Kim MJ, Kim EY, Kim SW, Nam HS, Na HJ, et al.: Bioequivalence and tolerability of two clopidogrel salt preparations, besylate and bisulfate: a randomized, open-label, crossover study in healthy Korean male subjects. *Clin. Ther.* 2009, 31:793–803.
8. Kim B-H, Kim J-R, Lim KS, Shin H-S, Yoon SH, Cho J-Y, Jang I-J, Shin S-G, Yu K-S: Comparative pharmacokinetics/pharmacodynamics of clopidogrel besylate and clopidogrel bisulfate in healthy Korean subjects. *Clin. Drug Investig.* 2012, 32:817–826.
9. Neubauer H, Krüger JC, Lask S, Endres HG, Pepinghege F, Engelhardt A, Bulut D, Mügge A: Comparing the antiplatelet effect of clopidogrel hydrogensulfate and clopidogrel besylate: a crossover study. *Clin. Res. Cardiol. Off. J. Ger. Card. Soc.* 2009, 98:533–540.
10. Park J-Y, Kim K-A, Ryu J-H, Lee G-H, Jeon S-H, Kim J-S: Pharmacokinetics and the antiplatelet effect of a new clopidogrel formulation, clopidogrel besylate, in healthy subjects. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2010, 48:259–269.
11. Nirogi RVS, Kandikere VN, Mudigonda K: Effect of food on bioavailability of a single oral dose of clopidogrel in healthy male subjects. *Arzneimittelforschung.* 2006, 56:735–739.
12. Pawłowska M, Duda J, Tejchman-Małecka B, Bogiel M, Marzec A, Sieradzki E: Usefulness of the parent compound determination in bioequivalence evaluation of clopidogrel generic products. *Arzneimittelforschung.* 2009, 59:289–296.
13. Hurbin F, Boulenc X, Daskalakis N, Farenc C, Taylor T, Bonneau D, Lacreata F, Cheng S, Sultan E: Clopidogrel pharmacodynamics and pharmacokinetics in the fed and fasted state: a randomized crossover study of healthy men. *J. Clin. Pharmacol.* 2012, 52:1506–1515.
14. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, Kastrati A, Schömig A, Schömig E: Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2006, 80:486–501.
15. Dogu GG, Kargi A, Turgut S, Ayada C, Taskoylu BY, Demiray G, Yaren A, Ozlu C, Temel S, Ergin A: MDR1 single nucleotide polymorphism C3435T in Turkish patients with non-small-cell lung cancer. *Gene* 2012, 506:404–407.
16. Caplain H, Donat F, Gaud C, Necciari J: Pharmacokinetics of clopidogrel. *Semin. Thromb. Hemost.* 1999, 25 Suppl 2:25–28.
17. Tang M, Mukundan M, Yang J, Charpentier N, LeCluyse EL, Black C, Yang D, Shi D, Yan B: Antiplatelet agents aspirin and clopidogrel are hydrolyzed by distinct carboxylesterases, and clopidogrel is transesterified in the presence of ethyl alcohol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006, 319:1467–1476.
18. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A: Identification of the Human Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Two Oxidative Steps in the Bioactivation of Clopidogrel to Its Pharmacologically Active Metabolite. *Drug Metab. Dispos.* 2010, 38:92–99.

19. Dansette PM, Rosi J, Bertho G, Mansuy D: Cytochromes P450 catalyze both steps of the major pathway of clopidogrel bioactivation, whereas paraoxonase catalyzes the formation of a minor thiol metabolite isomer. *Chem. Res. Toxicol.* 2012, 25:348–356.
20. Pereillo J-M, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga M-F, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert J-M, Maffrand J-P, Picard C: Structure and Stereochemistry of the Active Metabolite of Clopidogrel. *Drug Metab. Dispos.* 2002, 30:1288–1295.
21. Tuffal G, Roy S, Lavisse M, Brasseur D, Schofield J, Delesque Touchard N, Savi P, Bremond N, Rouchon M-C, Hurbin F, et al.: An improved method for specific and quantitative determination of the clopidogrel active metabolite isomers in human plasma. *Thromb. Haemost.* 2011, 105:696–705.
22. Lins R, Broekhuysen J, Necciari J, Deroubaix X: Pharmacokinetic profile of 14C-labeled clopidogrel. *Semin. Thromb. Hemost.* 1999, 25 Suppl 2:29–33.
23. European Medicines Agency - Plavix - Summary of product characteristics . http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000174/WC500042189.pdf, data wejścia: 4.11.2013
24. Takahashi M, Pang H, Kawabata K, Farid NA, Kurihara A: Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48:1219–1224.
25. Delavenne X, Basset T, Zufferey P, Malouk N, Laporte S, Mismetti P: Ultra-performance LC MS/MS method for quantification of clopidogrel active metabolite. *J. Sep. Sci.* 2010, 33:1968–1972.
26. Richter W, Erenmemisoglu A, Van der Meer MJ, Emritte N, Tuncay E, Koytchev R: Bioequivalence study of two different clopidogrel bisulfate film-coated tablets. *Arzneimittelforschung.* 2009, 59:297–302.
27. Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S, Gorchakova O, Lazar A, von Beckerath N, Schömig A, Schömig E: Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb. Haemost.* 2004, 92:311–316.
28. Abib Junior E, Duarte LF, Pirasol Vanunci ML, Oliveira DA de: Comparative Biological Availability of Clopidogrel Formulation in Healthy Volunteers After a Single Dose Administration. *J. Bioequivalence Bioavailab.* 2010, 02:45–49.
29. Bahrami G, Mohammadi B, Sisakhtnezhad S: High-performance liquid chromatographic determination of inactive carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human serum: Application to a bioequivalence study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2008, 864:168–172.
30. Savi P, Zachary J-L, Delesque-Touchard N, Labouret C, Hervé C, Uzabiaga M-F, Pereillo J-M, Culouscou J-M, Bono F, Ferrara P, et al.: The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y₁₂ receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103:11069–11074.
31. Smyth SS, Woulfe DS, Weitz JI, Gachet C, Conley PB, Goodman SG, Roe MT, Kuliopulos A, Moliterno DJ, French PA, et al.: G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009, 29:449–457.
32. Schoenwaelder SM, Ono A, Sturgeon S, Chan SM, Mangin P, Maxwell MJ, Turnbull S, Mulchandani M, Anderson K, Kauffenstein G, et al.: Identification of a unique co-operative phosphoinositide 3-kinase signaling mechanism regulating integrin alpha IIb beta 3 adhesive function in platelets. *J. Biol. Chem.* 2007, 282:28648–28658.
33. Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S: Basic Principles of Platelet Biology and Clinical Implications. *Circ. J.* 2010, 74:597–607.
34. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C, Bass TA, Costa MA: Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007, 49:1505–1516.
35. CAPRIE Steering Committee: A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996, 348:1329–1339.

36. Diener H-C, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, Leys D, Matias-Guiu J, Rupprecht H-J, MATCH investigators: Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004, 364:331–337.
37. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Collins R, Liu LS, COMMIT (CLOpidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group: Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005, 366:1607–1621.
38. 2012 Writing Committee Members, Jneid H, Anderson JL, Wright RS, Adams CD, Bridges CR, Casey DE Jr, Ettinger SM, Fesmire FM, Ganiats TG, et al.: 2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/Non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline and replacing the 2011 focused update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 2012, 126:875–910.
39. Zakarija A, Bandarenko N, Pandey DK, Auerbach A, Raisch DW, Kim B, Kwaan HC, McKoy JM, Schmitt BP, Davidson CJ, et al.: Clopidogrel-associated TTP: an update of pharmacovigilance efforts conducted by independent researchers, pharmaceutical suppliers, and the Food and Drug Administration. *Stroke J. Cereb. Circ.* 2004, 35:533–537.
40. Centrum Informacji o Leku - Indeks leków - B01AC04 Clopidogrel .<http://leki-informacje.pl/lek/kod-atc/730,b01ac04-clopidogrel.html>, data wejścia: 18.11.2013
41. Berger PB: Results of the Ticlid or Plavix Post-Stents (TOPPS) trial: do they justify the switch from ticlopidine to clopidogrel after coronary stent placement? *Curr. Control. Trials Cardiovasc. Med.* 2000, 1:83–87.
42. Cattaneo M: Chapter 61 - ADP Receptor antagonists . *Platelets (Second Edition)*. Michelson AD. Academic Press; 2007:1127–1144.
43. 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: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effect) Trial. *Circulation* 2005, 112:2946–2950.
44. Jarvis B, Simpson K: Clopidogrel: a review of its use in the prevention of atherothrombosis. *Drugs* 2000, 60:347–377.
45. Hamm CW, Bassand J-P, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, Caso P, Dudek D, Gielen S, Huber K, et al.: ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 2011, 32:2999–3054.
46. Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC), Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blömlundqvist C, Borger MA, Di Mario C, Dickstein K, Ducrocq G, et al.: ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* 2012, 33:2569–2619.
47. American College of Emergency Physicians, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE Jr, Chung MK, de Lemos JA, Ettinger SM, Fang JC, et al.: 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013, 61:e78–140.
48. Bhatt DL, Fox KAA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, et al.: Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N. Engl. J. Med.* 2006, 354:1706–1717.
49. Bellemain-Appaix A, O’Connor SA, Silvain J, Cucherat M, Beygui F, Barthélémy O, Collet J-P, Jacq L, Bernasconi F, Montalescot G, et al.: Association of clopidogrel pretreatment with mortality, cardiovascular events, and major bleeding among patients undergoing percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2012, 308:2507–2516.

50. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann F-J, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA, et al.: Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2007, 357:2001–2015.
51. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, et al.: Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2009, 361:1045–1057.
52. Abraham NS, Hlatky MA, Antman EM, Bhatt DL, Bjorkman DJ, Clark CB, Furberg CD, Johnson DA, Kahi CJ, Laine L, et al.: ACCF/ACG/AHA 2010 expert consensus document on the concomitant use of proton pump inhibitors and thienopyridines: a focused update of the ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use. A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010, 56:2051–2066.
53. Ho PM, Maddox TM, Wang L, Fihn SD, Jesse RL, Peterson ED, Rumsfeld JS: Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2009, 301:937–944.
54. Angiolillo DJ, Gibson CM, Cheng S, Ollier C, Nicolas O, Bergougnan L, Perrin L, LaCreta FP, Hurbin F, Dubar M: Differential effects of omeprazole and pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy subjects: randomized, placebo-controlled, crossover comparison studies. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011, 89:65–74.
55. Bates ER, Lau WC, Angiolillo DJ: Clopidogrel-Drug Interactions. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011, 57:1251–1263.
56. Frelinger AL 3rd, Lee RD, Mulford DJ, Wu J, Nudurupati S, Nigam A, Brooks JK, Bhatt DL, Michelson AD: A randomized, 2-period, crossover design study to assess the effects of dexlansoprazole, lansoprazole, esomeprazole, and omeprazole on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel in healthy volunteers. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012, 59:1304–1311.
57. Gilard M, Arnaud B, Cornily J-C, Le Gal G, Lacut K, Le Calvez G, Mansourati J, Mottier D, Abgrall J-F, Bosch J: Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, 51:256–260.
58. Ferreiro JL, Ueno M, Capodanno D, Desai B, Dharmashankar K, Darlington A, Charlton RK, Bass TA, Angiolillo DJ: Pharmacodynamic effects of concomitant versus staggered clopidogrel and omeprazole intake: results of a prospective randomized crossover study. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2010, 3:436–441.
59. Dunn SP, Steinhubl SR, Bauer D, Charnigo RJ, Berger PB, Topol EJ: Impact of proton pump inhibitor therapy on the efficacy of clopidogrel in the CAPRIE and CREDO trials. *J. Am. Heart Assoc.* 2013, 2:e004564.
60. McEwen J, Strauch G, Perles P, Pritchard G, Moreland TE, Necciari J, Dickinson JP: Clopidogrel bioavailability: absence of influence of food or antacids. *Semin. Thromb. Hemost.* 1999, 25 Suppl 2:47–50.
61. Yamane K, Kato Y, Tazaki J, Tada T, Makiyama T, Imai M, Jinnai T, Ikeda T, Shirakawa R, Kimura T, et al.: Effects of PPIs and an H2 blocker on the antiplatelet function of clopidogrel in Japanese patients under dual antiplatelet therapy. *J. Atheroscler. Thromb.* 2012, 19:559–569.
62. Small DS, Farid NA, Li YG, Ernest CS 2nd, Payne CD, Salazar DE, Winters KJ: Effect of ranitidine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel. *Curr. Med. Res. Opin.* 2008, 24:2251–2257.
63. Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS, Tait AR, Carville DGM, Guyer KE, Bates ER: Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 2003, 107:32–37.
64. Neubauer H, Günesdogan B, Hanefeld C, Spiecker M, Mügge A: Lipophilic statins interfere with the inhibitory effects of clopidogrel on platelet function--a flow cytometry study. *Eur. Heart J.* 2003, 24:1744–1749.
65. Clarke TA, Waskell LA: The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 2003, 31:53–59.

66. Geisler T, Zürn C, Paterok M, Göhring-Frischholz K, Bigalke B, Stellos K, Seizer P, Kraemer BF, Dippón J, May AE, et al.: Statins do not adversely affect post-interventional residual platelet aggregation and outcomes in patients undergoing coronary stenting treated by dual antiplatelet therapy. *Eur. Heart J.* 2008, 29:1635–1643.
67. Trenk D, Hochholzer W, Frundi D, Stratz C, Valina CM, Bestehorn H-P, Büttner HJ, Neumann F-J: Impact of cytochrome P450 3A4-metabolized statins on the antiplatelet effect of a 600-mg loading dose clopidogrel and on clinical outcome in patients undergoing elective coronary stent placement. *Thromb. Haemost.* 2008, 99:174–181.
68. Farid NA, Payne CD, Small DS, Winters KJ, Ernest CS 2nd, Brandt JT, Darstein C, Jakubowski JA, Salazar DE: Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007, 81:735–741.
69. Siller-Matula JM, Lang I, Christ G, Jilma B: Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, 52:1557–1563.
70. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW: Calcium-channel blockers decrease clopidogrel-mediated platelet inhibition. *Heart Br. Card. Soc.* 2010, 96:186–189.
71. Sibbing D, von Beckerath N, Morath T, Stegherr J, Mehilli J, Sarafoff N, Braun S, Schulz S, Schömig A, Kastrati A: Oral anticoagulation with coumarin derivatives and antiplatelet effects of clopidogrel. *Eur. Heart J.* 2010, 31:1205–1211.
72. Holmberg MT, Tornio A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Backman JT, Niemi M: Grapefruit Juice Inhibits the Metabolic Activation of Clopidogrel. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2013, doi:10.1038/clpt.2013.192.
73. Lau WC, Welch TD, Shields T, Rubenfire M, Tantry US, Gurbel PA: The effect of St John's Wort on the pharmacodynamic response of clopidogrel in hyporesponsive volunteers and patients: increased platelet inhibition by enhancement of CYP3A4 metabolic activity. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2011, 57:86–93.
74. Judge HM, Patil SB, Buckland RJ, Jakubowski JA, Storey RF: Potentiation of clopidogrel active metabolite formation by rifampicin leads to greater P2Y₁₂ receptor blockade and inhibition of platelet aggregation after clopidogrel. *J. Thromb. Haemost.* 2010, 8:1820–1827.
75. Lev EI, Arikian ME, Vaduganathan M, Alviar CL, Tellez A, Mathuria N, Builes A, Granada JF, del Conde I, Kleiman NS: Effect of caffeine on platelet inhibition by clopidogrel in healthy subjects and patients with coronary artery disease. *Am. Heart J.* 2007, 154:694.e1–7.
76. Gajos G, Rostoff P, Undas A, Piwowarska W: Effects of polyunsaturated omega-3 fatty acids on responsiveness to dual antiplatelet therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the OMEGA-PCI (OMEGA-3 fatty acids after pci to modify responsiveness to dual antiplatelet therapy) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010, 55:1671–1678.
77. Müller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schönig A, Gawaz M: Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb. Haemost.* 2003, 89:783–787.
78. Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Yoho JA, Herzog WR, Tantry US: The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005, 45:1392–1396.
79. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, et al.: Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes* 2005, 54:2430–2435.
80. Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD: Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007, 50:1822–1834.
81. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, Bhatt DL, Cattaneo M, Collet JP, Cuisset T, et al.: Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010, 56:919–933.

82. Sibbing D, Braun S, Morath T, Mehilli J, Vogt W, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N: Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009, 53:849–856.
83. Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, Kelder JC, Ruven HJT, Bal ET, Deneer VH, Harmsze AM, van der Heyden JAS, Rensing BJWM, et al.: Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2010, 303:754–762.
84. Cuisset T, Gaborit B, Dubois N, Quilici J, Loosveld M, Beguin S, Loundou AD, Moro PJ, Morange PE, Alessi M-C, et al.: Platelet reactivity in diabetic patients undergoing coronary stenting for acute coronary syndrome treated with clopidogrel loading dose followed by prasugrel maintenance therapy. *Int. J. Cardiol.* 2013, 168:523–528.
85. Geisler T, Grass D, Bigalke B, Stellos K, Drosch T, Dietz K, Herdeg C, Gawaz M: The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *J. Thromb. Haemost.* 2008, 6:54–61.
86. Bozina N, Bradamante V, Lovrić M: Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 2009, 60:217–242.
87. Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. <http://www.cypalleles.ki.se/>, data wejścia: 11.11.2013
88. Wallentin L, James S, Storey RF, Armstrong M, Barratt BJ, Horrow J, Husted S, Katus H, Steg PG, Shah SH, 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. *The Lancet* 2010, 376:1320–1328.
89. Karażniewicz-Lada M, Danielak D, Głowska F: Genetic and non-genetic factors affecting the response to clopidogrel therapy. *Expert Opin. Pharmacother.* 2012, 13:663–683.
90. Sim SC, Risinger C, Dahl M-L, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M: A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2006, 79:103–113.
91. Sugimoto K, Uno T, Yamazaki H, Tateishi T: Limited frequency of the CYP2C19*17 allele and its minor role in a Japanese population. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2008, 65:437–439.
92. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, et al.: Cytochrome P-450 Polymorphisms and Response to Clopidogrel. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360:354–362.
93. Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS 2nd, Lachno DR, Salazar D, Winters KJ: Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J. Thromb. Haemost.* 2007, 5:2429–2436.
94. Umemura K, Furuta T, Kondo K: The common gene variants of CYP2C19 affect pharmacokinetics and pharmacodynamics in an active metabolite of clopidogrel in healthy subjects. *J. Thromb. Haemost.* 2008, 6:1439–1441.
95. Hulot J-S, Collet J-P, Cayla G, Silvain J, Allanic F, Bellemain-Appaix A, Scott SA, Montalescot G: CYP2C19 but not PON1 genetic variants influence clopidogrel pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical efficacy in post-myocardial infarction patients. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2011, 4:422–428.
96. Bouman HJ, Harmsze AM, van Werkum JW, Breet NJ, Bergmeijer TO, Ten Cate H, Hackeng CM, Deneer VHM, Ten Berg JM: Variability in on-treatment platelet reactivity explained by CYP2C19*2 genotype is modest in clopidogrel pretreated patients undergoing coronary stenting. *Heart Br. Card. Soc.* 2011, 97:1239–1244.
97. Frere C, Cuisset T, Morange P-E, Quilici J, Camoin-Jau L, Saut N, Faille D, Lambert M, Juhan-Vague I, Bonnet J-L, et al.: Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *Am. J. Cardiol.* 2008, 101:1088–1093.
98. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccia R, Valente S, Antonucci D, Abbate R, Gensini GF: Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4

- IVS10+12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet. Genomics* 2007, 17:1057–1064.
99. Oh I-Y, Park KW, Kang S-H, Park JJ, Na S-H, Kang H-J, Koo B-K, Jeong Y-H, Hwang J-Y, Kwak CH, et al.: Association of cytochrome P450 2C19*2 polymorphism with clopidogrel response variability and cardiovascular events in Koreans treated with drug-eluting stents. *Heart Br. Card. Soc.* 2012, 98:139–144.
 100. Harmsze A, van Werkum JW, Bouman HJ, Ruven HJ, Breet NJ, Ten Berg JM, Hackeng CM, Tjoeng MM, Klungel OH, de Boer A, et al.: Besides CYP2C19*2, the variant allele CYP2C9*3 is associated with higher on-clopidogrel platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy undergoing elective coronary stent implantation. *Pharmacogenet. Genomics* 2010, 20:18–25.
 101. Hochholzer W, Trenk D, Fromm MF, Valina CM, Stratz C, Bestehorn H-P, Büttner HJ, Neumann F-J: Impact of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and of major demographic characteristics on residual platelet function after loading and maintenance treatment with clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010, 55:2427–2434.
 102. Zou J-J, Xie H-G, Chen S-L, Tan J, Lin L, Zhao Y-Y, Xu H-M, Lin S, Zhang J, Wang G-J: Influence of CYP2C19 loss-of-function variants on the antiplatelet effects and cardiovascular events in clopidogrel-treated Chinese patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2013, 69:771–777.
 103. Price MJ, Murray SS, Angiolillo DJ, Lillie E, Smith EN, Tisch RL, Schork NJ, Teirstein PS, Topol EJ: Influence of genetic polymorphisms on the effect of high- and standard-dose clopidogrel after percutaneous coronary intervention: the GIFT (Genotype Information and Functional Testing) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012, 59:1928–1937.
 104. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, Damcott CM, Pakyz R, Tantry US, Gibson Q, et al.: Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2009, 302:849–857.
 105. Barker CM, Murray SS, Teirstein PS, Kandzari DE, Topol EJ, Price MJ: Pilot study of the antiplatelet effect of increased clopidogrel maintenance dosing and its relationship to CYP2C19 genotype in patients with high on-treatment reactivity. *JACC Cardiovasc. Interv.* 2010, 3:1001–1007.
 106. Collet J-P, Hulot J-S, Pena A, Villard E, Esteve J-B, Silvain J, Payot L, Brugier D, Cayla G, Beygui F, et al.: Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet* 2009, 373:309–317.
 107. Mega JL, Simon T, Collet J-P, Anderson JL, Antman EM, Bliden K, Cannon CP, Danchin N, Giusti B, Gurbel P, et al.: Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2010, 304:1821–1830.
 108. Jang J-S, Cho K-I, Jin H-Y, Seo J-S, Yang T-H, Kim D-K, Kim D-S, Seol S-H, Kim D-I, Kim B-H, et al.: Meta-analysis of cytochrome P450 2C19 polymorphism and risk of adverse clinical outcomes among coronary artery disease patients of different ethnic groups treated with clopidogrel. *Am. J. Cardiol.* 2012, 110:502–508.
 109. Holmes MV, Perel P, Shah T, Hingorani AD, Casas JP: CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2011, 306:2704–2714.
 110. Dai Z-L, Chen H, Wu X-Y: Relationship between cytochrome P450 2C19*17 genotype distribution, platelet aggregation and bleeding risk in patients with blood stasis syndrome of coronary artery disease treated with clopidogrel. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2012, 10:647–654.
 111. Gladding P, Webster M, Zeng I, Farrell H, Stewart J, Ruygrok P, Ormiston J, El-Jack S, Armstrong G, Kay P, et al.: The pharmacogenetics and pharmacodynamics of clopidogrel response: an analysis from the PRINC (Plavix Response in Coronary Intervention) trial. *JACC Cardiovasc. Interv.* 2008, 1:620–627.
 112. Grosdidier C, Quilici J, Loosveld M, Camoin L, Moro PJ, Saut N, Gaborit B, Pankert M, Cohen W, Lambert M, et al.: Effect of CYP2C19*2 and *17 genetic variants on platelet response to

- clopidogrel and prasugrel maintenance dose and relation to bleeding complications. *Am. J. Cardiol.* 2013, 111:985–990.
113. Li Y, Tang H-L, Hu Y-F, Xie H-G: The gain-of-function variant allele CYP2C19*17: a double-edged sword between thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients. *J. Thromb. Haemost.* 2012, 10:199–206.
 114. Tiroch KA, Sibbing D, Koch W, Roosen-Runge T, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A: Protective effect of the CYP2C19 *17 polymorphism with increased activation of clopidogrel on cardiovascular events. *Am. Heart J.* 2010, 160:506–512.
 115. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, Morath T, Schömig A, von Beckerath N, Kastrati A: 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.
 116. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Cavallari U, Trabetti E, Sabate M, Hernandez R, Moreno R, Escaned J, et al.: Contribution of Gene Sequence Variations of the Hepatic Cytochrome P450 3A4 Enzyme to Variability in Individual Responsiveness to Clopidogrel. *Arter. Thromb Vasc Biol* 2006, 26:1895–1900.
 117. Fontana P, Hulot J -S, de Moerloose P, Gaussem P: Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J. Thromb. Haemost.* 2007, 5:2153–2155.
 118. Jinnai T, Horiuchi H, Makiyama T, Tazaki J, Tada T, Akao M, Ono K, Hoshino K, Naruse Y, Takahashi K, et al.: Impact of CYP2C19 polymorphisms on the antiplatelet effect of clopidogrel in an actual clinical setting in Japan. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 2009, 73:1498–1503.
 119. Lee JM, Park S, Shin D-J, Choi D, Shim CY, Ko Y-G, Kim J-S, Shin E-S, Chang CW, Lee J-E, et al.: Relation of genetic polymorphisms in the cytochrome P450 gene with clopidogrel resistance after drug-eluting stent implantation in Koreans. *Am. J. Cardiol.* 2009, 104:46–51.
 120. Hulot J-S, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvalle C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P: Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 2006, 108:2244–2247.
 121. Fojo A, Lebo R, Shimizu N, Chin JE, Roninson IB, Merlino GT, Gottesman MM, Pastan I: Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. *Somat. Cell Mol. Genet.* 1986, 12:415–420.
 122. Śpiewak M, Małek ŁA, Kostrzewa G, Kisiel B, Serafin A, Filipiak KJ, Płoski R, Opolski G: Influence of C3435T multidrug resistance gene-1 (MDR-1) polymorphism on platelet reactivity and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Kardiol. Pol.* 2009, 67:827–834.
 123. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Walker JR, Simon T, Antman EM, Braunwald E, Sabatine MS: 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, 376:1312–1319.
 124. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrières J, Danchin N, Becquemont L, et al.: Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360:363–375.
 125. Su J, Xu J, Li X, Zhang H, Hu J, Fang R, Chen X: ABCB1 C3435T polymorphism and response to clopidogrel treatment in coronary artery disease (CAD) patients: a meta-analysis. *PloS One* 2012, 7:e46366.
 126. Kassimis G, Davlouros P, Xanthopoulou I, Stavrou EF, Athanassiadou A, Alexopoulos D: CYP2C19*2 and other genetic variants affecting platelet response to clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb. Res.* 2012, 129:441–446.
 127. Luo M, Li J, Xu X, Sun X, Sheng W: ABCB1 C3435T polymorphism and risk of adverse clinical events in clopidogrel treated patients: a meta-analysis. *Thromb. Res.* 2012, 129:754–759.
 128. Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny J-L, Aiach M, Gaussem P: Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 2003, 108:989–995.

129. Staritz P, Kurz K, Stoll M, Giannitsis E, Katus HA, Ivandic BT: Platelet reactivity and clopidogrel resistance are associated with the H2 haplotype of the P2Y12-ADP receptor gene. *Int. J. Cardiol.* 2009, 133:341–345.
130. 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 Int. J. Haemost. Thromb.* 2005, 16:199–204.
131. Motovska Z, Widimsky P, Kvasnicka J, Petr R, Bilkova D, Hajkova J, Marinov I, Simek S, Kala P: 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 Int. J. Haemost. Thromb.* 2009, 20:257–262.
132. Kar R, Meena A, Yadav BK, Yadav R, Kar SS, Saxena R: Clopidogrel resistance in North Indian patients of coronary artery disease and lack of its association with platelet ADP receptors P2Y1 and P2Y12 gene polymorphisms. *Platelets* 2013, 24:297–302.
133. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Cavallari U, Trabetti E, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, Hernández R, Moreno R, et al.: Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Thromb. Res.* 2005, 116:491–497.
134. Cuisset T, Frere C, Quilici J, Morange P-E, Saut N, Lambert M, Camoin L, Vague IJ, Bonnet J-L, Alessi M-C: Role of the T744C polymorphism of the P2Y12 gene on platelet response to a 600-mg loading dose of clopidogrel in 597 patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Thromb. Res.* 2007, 120:893–899.
135. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Sabaté M, Fernández C, Stranieri C, Trabetti E, Pignatti PF, Macaya C: P1A polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 2004, 15:89–93.
136. Floyd CN, Ferro A: The P1A1/A2 Polymorphism of Glycoprotein IIIa in Relation to Efficacy of Antiplatelet Drugs: a Systematic Review and Meta-analysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2013, doi:10.1111/bcp.12204.
137. Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhäuser C, Waldmann C, Schmalz H-G, ten Berg JM, Taubert D: Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat. Med.* 2011, 17:110–116.
138. Sibbing D, Koch W, Massberg S, Byrne RA, Mehilli J, Schulz S, Mayer K, Bernlochner I, Schömig A, Kastrati A: No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting. *Eur. Heart J.* 2011, 32:1605–1613.
139. Ohmori T, Yano Y, Sakata A, Ikemoto T, Shimpo M, Madoiwa S, Katsuki T, Mimuro J, Shimada K, Kario K, et al.: Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thromb. Res.* 2012, 129:e36–40.
140. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Zolk O, Valina CM, Stratz C, Neumann F-J: Paraoxonase-1 Q192R polymorphism and antiplatelet effects of clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2011, 4:429–436.
141. Farhan S, Höchtel T, Kautzky-Willer A, Wojta J, Huber K: Antithrombotic therapy in patients with coronary artery disease and with type 2 diabetes mellitus. *Wien. Med. Wochenschr.* 1946 2010, 160:30–38.
142. Geisler T, Mueller K, Aichele S, Bigalke B, Stellos K, Htun P, Ninci E, Fateh-Moghadam S, May AE, Gawaz M: Impact of inflammatory state and metabolic control on responsiveness to dual antiplatelet therapy in type 2 diabetics after PCI: prognostic relevance of residual platelet aggregability in diabetics undergoing coronary interventions. *Clin. Res. Cardiol. Off. J. Ger. Card. Soc.* 2010, 99:743–752.
143. Erlinge D, Varenhorst C, Braun OO, James S, Winters KJ, Jakubowski JA, Brandt JT, Sugidachi A, Siegbahn A, Wallentin L: Patients with poor responsiveness to thienopyridine treatment or with diabetes have lower levels of circulating active metabolite, but their platelets respond normally to active metabolite added ex vivo. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, 52:1968–1977.

144. Ang L, Palakodeti V, Khalid A, Tsimikas S, Idrees Z, Tran P, Clopton P, Zafar N, Bromberg-Marin G, Keramati S, et al.: Elevated plasma fibrinogen and diabetes mellitus are associated with lower inhibition of platelet reactivity with clopidogrel. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, 52:1052–1059.
145. Geisler T, Anders N, Paterok M, Langer H, Stellos K, Lindemann S, Herdeg C, May AE, Gawaz M: Platelet response to clopidogrel is attenuated in diabetic patients undergoing coronary stent implantation. *Diabetes Care* 2007, 30:372–374.
146. Mangiacapra F, Patti G, Peace A, Gatto L, Vizzi V, Ricottini E, D'Ambrosio A, Muller O, Barbato E, Di Sciascio G: Comparison of platelet reactivity and periprocedural outcomes in patients with versus without diabetes mellitus and treated with clopidogrel and percutaneous coronary intervention. *Am. J. Cardiol.* 2010, 106:619–623.
147. Serebruany V, Pokov I, Kuliczowski W, Chesebro J, Badimon J: Baseline platelet activity and response after clopidogrel in 257 diabetics among 822 patients with coronary artery disease. *Thromb. Haemost.* 2008, 100:76–82.
148. Latif F, Kleiman NS, Cohen DJ, Pencina MJ, Yen C-H, Cutlip DE, Moliterno DJ, Nassif D, Lopez JJ, Saucedo JF, et al.: In-hospital and 1-year outcomes among percutaneous coronary intervention patients with chronic kidney disease in the era of drug-eluting stents: a report from the EVENT (Evaluation of Drug Eluting Stents and Ischemic Events) registry. *JACC Cardiovasc. Interv.* 2009, 2:37–45.
149. Keltai M, Tonelli M, Mann JFE, Sitkei E, Lewis BS, Hawken S, Mehta SR, Yusuf S, CURE Trial Investigators: Renal function and outcomes in acute coronary syndrome: impact of clopidogrel. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. Off. J. Eur. Soc. Cardiol. Work. Groups Epidemiol. Prev. Card. Rehabil. Exerc. Physiol.* 2007, 14:312–318.
150. Best PJM, Steinhubl SR, Berger PB, Dasgupta A, Brennan DM, Szczech LA, Califf RM, Topol EJ, CREDO Investigators: The efficacy and safety of short- and long-term dual antiplatelet therapy in patients with mild or moderate chronic kidney disease: results from the Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation (CREDO) trial. *Am. Heart J.* 2008, 155:687–693.
151. Park SH, Kim W, Park CS, Kang WY, Hwang SH, Kim W: A comparison of clopidogrel responsiveness in patients with versus without chronic renal failure. *Am. J. Cardiol.* 2009, 104:1292–1295.
152. Motovska Z, Odvodyova D, Fischerova M, Stepankova S, Maly M, Morawska P, Widimsky P: Renal function assessed using cystatin C and antiplatelet efficacy of clopidogrel assessed using the vasodilator-stimulated phosphoprotein index in patients having percutaneous coronary intervention. *Am. J. Cardiol.* 2012, 109:620–623.
153. Tello-Montoliu A, Ferreira JL, Kodali MK, Ueno M, Tomasello SD, Rollini F, Capodanno D, Darlington A, Patel R, Desai B, et al.: Impact of renal function on clopidogrel-induced antiplatelet effects in coronary artery disease patients without diabetes mellitus. *J. Thromb. Thrombolysis* 2012, 65:219–226.
154. Angiolillo DJ, Bernardo E, Capodanno D, Vivas D, Sabaté M, Ferreira JL, Ueno M, Jimenez-Quevedo P, Alfonso F, Bass TA, et al.: Impact of chronic kidney disease on platelet function profiles in diabetes mellitus patients with coronary artery disease taking dual antiplatelet therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010, 55:1139–1146.
155. Dasgupta A, Steinhubl SR, Bhatt DL, Berger PB, Shao M, Mak K-H, Fox KAA, Montalescot G, Weber MA, Haffner SM, et al.: Clinical outcomes of patients with diabetic nephropathy randomized to clopidogrel plus aspirin versus aspirin alone (a post hoc analysis of the clopidogrel for high atherothrombotic risk and ischemic stabilization, management, and avoidance [CHARISMA] trial). *Am. J. Cardiol.* 2009, 103:1359–1363.
156. Bonello L, Berbis J, Laine M, Armero S, Bessereau J, Jacquin L, Bonello C, Camillieri E, Barragan P, Dignat-George F, et al.: Biological efficacy of a 600 mg loading dose of clopidogrel in ST-elevation myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* 2012, 108:101–106.
157. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Barrera Ramírez C, Sabaté M, Fernandez C, Hernández-Antolín R, Escaned J, Alfonso F, Macaya C: Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting: should clopidogrel loading-dose be weight adjusted? *J. Invasive Cardiol.* 2004, 16:169–174.

158. Sibbing D, von Beckerath O, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N: Impact of body mass index on platelet aggregation after administration of a high loading dose of 600 mg of clopidogrel before percutaneous coronary intervention. *Am. J. Cardiol.* 2007, 100:203–205.
159. Gaglia MA Jr, Torguson R, Pakala R, Xue Z, Sardi G, Mahmoudi M, Suddath WO, Kent KM, Satler LF, Pichard AD, et al.: Relation of body mass index to on-treatment (clopidogrel + aspirin) platelet reactivity. *Am. J. Cardiol.* 2011, 108:766–771.
160. Lancefield T, Clark DJ, Andrianopoulos N, Brennan AL, Reid CM, Johns J, Freeman M, Charter K, Duffy SJ, Ajani AE, et al.: Is there an obesity paradox after percutaneous coronary intervention in the contemporary era? An analysis from a multicenter Australian registry. *JACC Cardiovasc. Interv.* 2010, 3:660–668.
161. Kelly RV, Hsu A, Topol E, Steinhubl S: The influence of body mass index on outcomes and the benefit of antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention. *J. Invasive Cardiol.* 2006, 18:115–119.
162. Aune E, Røislien J, Mathisen M, Thelle DS, Otterstad JE: The “smoker’s paradox” in patients with acute coronary syndrome: a systematic review. *BMC Med.* 2011, 9:97.
163. Zevin S, Benowitz NL: Drug interactions with tobacco smoking. An update. *Clin. Pharmacokinet.* 1999, 36:425–438.
164. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW: Smoking promotes clopidogrel-mediated platelet inhibition in patients receiving dual antiplatelet therapy. *Thromb. Res.* 2009, 124:588–591.
165. Ueno M, Ferreira JL, Desai B, Tomasello SD, Tello-Montoliu A, Capodanno D, Capranzano P, Kodali M, Dharmashankar K, Charlton RK, et al.: Cigarette smoking is associated with a dose-response effect in clopidogrel-treated patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of a pharmacodynamic study. *JACC Cardiovasc. Interv.* 2012, 5:293–300.
166. Bliden KP, Dichiaro J, Lawal L, Singla A, Antonino MJ, Baker BA, Bailey WL, Tantry US, Gurbel PA: The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, 52:531–533.
167. Yousef A-M, Arafat T, Bulatova NR, Al-Zumyly R: Smoking behaviour modulates pharmacokinetics of orally administered clopidogrel. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2008, 33:439–449.
168. Gurbel PA, Bliden KP, Logan DK, Kereiakes DJ, Lasseter KC, White A, Angiolillo DJ, Nolin TD, Maa J-F, Bailey WL, et al.: The influence of smoking status on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel and prasugrel: the PARADOX study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013, 62:505–512.
169. Motovska Z, Widimsky P, Petr R, Bilkova D, Marinov I, Simek S, Kala P, PRAGUE-8 Study Investigators: Factors influencing clopidogrel efficacy in patients with stable coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary intervention: statin’s advantage and the smoking “paradox.” *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2009, 53:368–372.
170. Park KW, Park JJ, Jeon K-H, Kang S-H, Oh I-Y, Yang H-M, Cho H-J, Lee H-Y, Kang H-J, Koo B-K, et al.: Enhanced clopidogrel responsiveness in smokers: smokers’ paradox is dependent on cytochrome P450 CYP1A2 status. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011, 31:665–671.
171. Park KW, Kang S-H, Kang J, Jeon K-H, Park JJ, Han J-K, Koh J-S, Lee SE, Yang H-M, Lee H-Y, et al.: Enhanced clopidogrel response in smokers is reversed after discontinuation as assessed by VerifyNow assay: additional evidence for the concept of “smokers” paradox’. *Heart Br. Card. Soc.* 2012, 98:1000–1006.
172. Sibbald M, Yan AT, Huang W, Fox KAA, Gore JM, Steg PG, Eagle KA, Brieger D, Montalescot G, Goodman SG: Association between smoking, outcomes, and early clopidogrel use in patients with acute coronary syndrome: insights from the Global Registry of Acute Coronary Events. *Am. Heart J.* 2010, 160:855–861.
173. Berger JS, Bhatt DL, Steinhubl SR, Shao M, Steg PG, Montalescot G, Hacke W, Fox KA, Lincoff AM, Topol EJ, et al.: Smoking, clopidogrel, and mortality in patients with established cardiovascular disease. *Circulation* 2009, 120:2337–2344.
174. Gaborit B, Frère C, Cuisset T, Alessi M-C, Dutour A: Enhanced post-clopidogrel platelet reactivity in diabetic patients is independently related to plasma fibrinogen level but not to glycemic control. *J. Thromb. Haemost.* 2009, 7:1939–1941.

175. Bernlochner I, Steinhubl S, Braun S, Morath T, Jaitner J, Stegherr J, Mehilli J, von Beckerath N, Schömig A, Kastrati A, et al.: Association between inflammatory biomarkers and platelet aggregation in patients under chronic clopidogrel treatment. *Thromb. Haemost.* 2010, 104:1193–1200.
176. Fontana P, Berdagué P, Castelli C, Nolli S, Barazer I, Fabbro-Peray P, Schved J-F, Bounameaux H, Mach F, DE Moerloose P, et al.: Clinical predictors of dual aspirin and clopidogrel poor responsiveness in stable cardiovascular patients from the ADRIE study. *J. Thromb. Haemost.* 2010, 8:2614–2623.
177. Ang L, Thani KB, Ilapakurti M, Lee MS, Palakodeti V, Mahmud E: Elevated plasma fibrinogen rather than residual platelet reactivity after clopidogrel pre-treatment is associated with an increased ischemic risk during elective percutaneous coronary intervention. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013, 61:23–34.
178. Park D-W, Lee S-W, Yun S-C, Song H-G, Ahn J-M, Lee J-Y, Kim W-J, Kang S-J, Kim Y-H, Lee CW, et al.: A point-of-care platelet function assay and C-reactive protein for prediction of major cardiovascular events after drug-eluting stent implantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011, 58:2630–2639.
179. Souri E, Jalalizadeh H, Kebriaee-Zadeh A, Shekarchi M, Dalvandi A: Validated HPLC method for determination of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr. BMC* 2006, 20:1309–1314.
180. Singh SS, Sharma K, Barot D, Mohan PR, Lohray VB: Estimation of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in Wistar rat plasma by HPLC and its application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2005, 821:173–180.
181. Rouini M-R, Ardakani Y, Foroumadi A, Lavasani H, Hakemi L: Sensitive Quantification of Carboxylic Acid Metabolite of Clopidogrel in Human Plasma by LC with UV Detection. *Chromatographia* 2009, 70:953–956.
182. Karaźniewicz-Łada M, Główka F, Oszkinis G: Capillary zone electrophoresis method for determination of (+)-S clopidogrel carboxylic acid metabolite in human plasma and urine designed for biopharmaceutical studies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2010, 878:1013–1018.
183. Fayed AS, Weshahy SA, Shehata MA, Hassan NY, Pauwels J, Hoogmartens J, Van Schepdael A: Separation and determination of clopidogrel and its impurities by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 49:193–200.
184. Serra H, Bronze M do R, Simplício AL: Simultaneous determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2010, 878:1480–1486.
185. Lagorce P, Perez Y, Ortiz J, Necciari J, Bressolle F: Assay method for the carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 1998, 720:107–117.
186. Ksycinska H, Rudzki P, Bukowska-Kiliszek M: Determination of clopidogrel metabolite (SR26334) in human plasma by LC-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41:533–539.
187. Lainesse A, Ozalp Y, Wong H, Alpan RS: Bioequivalence study of clopidogrel bisulfate film-coated tablets. *Arzneimittelforschung.* 2004, 54:600–604.
188. Mani H, Toennes SW, Linnemann B, Urbanek DA, Schwonberg J, Kauert GF, Lindhoff-Last E: Determination of clopidogrel main metabolite in plasma: a useful tool for monitoring therapy? *Ther. Drug Monit.* 2008, 30:84–89.
189. Robinson A, Hillis J, Neal C, Leary AC: The validation of a bioanalytical method for the determination of clopidogrel in human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2007, 848:344–354.
190. Silvestro L, Gheorghe MC, Tarcomnicu I, Savu S, Savu SR, Iordachescu A, Dulea C: Development and validation of an HPLC-MS/MS method to determine clopidogrel in human plasma. Use of incurred samples to test back-conversion. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2010, 878:3134–3142.
191. Peer CJ, Spencer SD, Vandenberg DAH, Pacanowski MA, Horenstein RB, Figg WD: A sensitive and rapid ultra HPLC-MS/MS method for the simultaneous detection of clopidogrel and its

- derivatized active thiol metabolite in human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2012, 880:132–139.
192. Frontrouth JP: Light transmission aggregometry. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2013, 992:227–240.
193. Cattaneo M, Hayward CPM, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD: Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 2009, 7:1029.
194. Syska K, Golański J: Laboratoryjne metody oceny działania klopidoogrelu oraz innych leków przeciwpłytkowych blokujących receptor P2Y₁₂. *Diagn. Lab.* 2012, 48:323–332.
195. Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, Collier BS: Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation* 1999, 99:620–625.
196. Cattaneo M: Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J. Thromb. Haemost.* 2007, 5 Suppl 1:230–237.
197. Łabuz-Roszak B, Pierzchała K, Machowska-Majchrzak A, Porosińska A, Wawrzyńczak M: Ocena funkcji płytek krwi u chorych zażywających kwas acetylosalicylowy w prewencji wtórnej udaru mózgu. *Ann. Acad. Medicae Silesiensis* 2010, 64:54–63.
198. PFA-100 System. <http://usa.healthcare.siemens.com/hemostasis/systems/pfa-100/features>, data wejścia: 9.01.2014
199. Koessler J, Kobsar AL, Rajkovic MS, Schafer A, Flierl U, Pfoertsch S, Bauersachs J, Steigerwald U, Rechner AR, Walter U: The new INNOVANCE® PFA P2Y cartridge is sensitive to the detection of the P2Y₁₂ receptor inhibition. *Platelets* 2011, 22:20–27.
200. Swallow RA, Agarwala RA, Dawkins KD, Curzen NP: Thromboelastography: potential bedside tool to assess the effects of antiplatelet therapy? *Platelets* 2006, 17:385–392.
201. Loco JV, Elskens M, Croux C, Beernaert H: Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation Qual. Assur.* 2002, 7:281–285.
202. European Medicines Agency - Guideline on bioanalytical method validation. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/includes/document/document_detail.jsp?webContentId=WC500109686&url=menus/document_library/document_library.jsp&mid=WC0b01ac058009a3dc, data wejścia: 14.05.2012
203. Corning Life Sciences Catalog. [http://catalog2.corning.com/Lifesciences/en-US/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=AP-MN-BL-GDNA-50\(Lifesciences\)&categoryname=Genomics+and+Proteomics\(Lifesciences\)%7cMolecular+Biology+Kits+and+Reagent\(Lifesciences\)%7cNucleic+Acid+Purification+Kits\(Lifesciences\)%7cFiltration+Kits\(Lifesciences\)%7cBlood+Genomic+DNA+Kits-Mini\(Lifesciences\)&activeview=techDoc](http://catalog2.corning.com/Lifesciences/en-US/Shopping/ProductDetails.aspx?productid=AP-MN-BL-GDNA-50(Lifesciences)&categoryname=Genomics+and+Proteomics(Lifesciences)%7cMolecular+Biology+Kits+and+Reagent(Lifesciences)%7cNucleic+Acid+Purification+Kits(Lifesciences)%7cFiltration+Kits(Lifesciences)%7cBlood+Genomic+DNA+Kits-Mini(Lifesciences)&activeview=techDoc), data wejścia: 30.07.2013
204. Drozdziak M, Mysliwiec K, Lewinska-Chelstowska M, Banach J, Drozdziak A, Grabarek J: P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene polymorphism in renal transplant patients with and without gingival overgrowth. *J. Clin. Periodontol.* 2004, 31:758–763.
205. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, data wejścia: 31.07.2013
206. Gong IY, Crown N, Suen CM, Schwarz UI, Dresser GK, Knauer MJ, Sugiyama D, DeGorter MK, Woolsey S, Tirona RG, et al.: Clarifying the importance of CYP2C19 and PON1 in the mechanism of clopidogrel bioactivation and in vivo antiplatelet response. *Eur. Heart J.* 2012, 33:2856–2464a.
207. Tantry US, Bliden KP, Wei C, Storey RF, Armstrong M, Butler K, Gurbel PA: First analysis of the relation between CYP2C19 genotype and pharmacodynamics in patients treated with ticagrelor versus clopidogrel: the ONSET/OFFSET and RESPOND genotype studies. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2010, 3:556–566.
208. Patel NK, Subbaiah G, Shah H, Kundlik M, Shrivastav PS: Rapid LC-ESI-MS-MS method for the simultaneous determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite in human plasma. *J. Chromatogr. Sci.* 2008, 46:867–875.

209. Di Girolamo G, Czerniuk P, Bertuola R, Keller GA: Bioequivalence of two tablet formulations of clopidogrel in healthy Argentinian volunteers: a single-dose, randomized-sequence, open-label crossover study. *Clin. Ther.* 2010, 32:161–170.
210. El Ahmady O, Ibrahim M, Hussein AM, Bustami RT: Bioequivalence of two oral formulations of clopidogrel tablets in healthy male volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2009, 47:780–784.
211. Lee J, Hwang Y, Kang W, Seong SJ, Lim M-S, Lee HW, Yim D-S, Sohn DR, Han S, Yoon Y-R: Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of clopidogrel in Korean healthy volunteers and stroke patients. *J. Clin. Pharmacol.* 2012, 52:985–995.
212. Yousef AM, Melhem M, Xue B, Arafat T, Reynolds DK, Van Wart SA: Population pharmacokinetic analysis of clopidogrel in healthy Jordanian subjects with emphasis optimal sampling strategy. *Biopharm. Drug Dispos.* 2013, 34:215–226.
213. Furlong MT, Savant I, Yuan M, Scott L, Mylott W, Mariannino T, Kadiyala P, Roongta V, Arnold ME: A validated HPLC-MS/MS assay for quantifying unstable pharmacologically active metabolites of clopidogrel in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 2013, 926:36–41.
214. Heestermans AACM, van Werkum JW, Taubert D, Seesing TH, von Beckerath N, Hackeng CM, Schömig E, Verheugt FWA, ten Berg JM: Impaired bioavailability of clopidogrel in patients with a ST-segment elevation myocardial infarction. *Thromb. Res.* 2008, 122:776–781.
215. Sibbing D, Taubert D, Schömig A, Kastrati A, Von Beckerath N: Pharmacokinetics of clopidogrel in patients with stent thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 2008, 6:1230–1232.
216. Chen F, Maridakis V, O’neill EA, Beals C, Radziszewski W, de Lepeleire I, Van Dyck K, Depré M, Bolognese JA, de Hoon J, et al.: A randomized clinical trial comparing point-of-care platelet function assays and bleeding time in healthy subjects treated with aspirin or clopidogrel. *Platelets* 2012, 23:249–258.
217. Oberhänsli M, Lehner C, Puricel S, Lehmann S, Togni M, Stauffer J-C, Baeriswyl G, Goy J-J, Cook S: A randomized comparison of platelet reactivity in patients after treatment with various commercial clopidogrel preparations: the CLO-CLO trial. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 2012, 105:587–592.
218. Jaitner J, Stegherr J, Morath T, Braun S, Bernlochner I, Schömig A, Kastrati A, Sibbing D: Stability of the high on-treatment platelet reactivity phenotype over time in clopidogrel-treated patients. *Thromb. Haemost.* 2011, 105:107–112.
219. Liang Y, Johnston M, Hirsh J, Pare G, Li C, Mehta S, Teo KK, Sloane D, Yi Q, Zhu J, et al.: Relation between clopidogrel active metabolite levels and different platelet aggregation methods in patients receiving clopidogrel and aspirin. *J. Thromb. Thrombolysis* 2012, 34:429–436.
220. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977, 74:5463–5467.
221. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986, 321:674–679.
222. Kurzawski M, Pawlik A, Górnik W, Drożdżik M: Frequency of common MDR1 gene variants in a Polish population. *Pharmacol. Rep. PR* 2006, 58:35–40.
223. Kurzawski M, Gawrońska-Szklarz B, Wrześniewska J, Siuda A, Starzyńska T, Drożdżik M: Effect of CYP2C19*17 gene variant on *Helicobacter pylori* eradication in peptic ulcer patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2006, 62:877–880.
224. Gawrońska-Szklarz B, Siuda A, Kurzawski M, Bielicki D, Marlicz W, Drożdżik M: Effects of CYP2C19, MDR1, and interleukin 1-B gene variants on the eradication rate of *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with pantoprazole, amoxicillin, and metronidazole. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2010, 66:681–687.
225. Frère C, Cuisset T, Gaborit B, Alessi M-C, Hulot J-S: The CYP2C19*17 allele is associated with better platelet response to clopidogrel in patients admitted for non-ST acute coronary syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 2009, 7:1409–1411.
226. Kelly RP, Close SL, Farid NA, Winters KJ, Shen L, Natanegara F, Jakubowski JA, Ho M, Walker JR, Small DS: Pharmacokinetics and pharmacodynamics following maintenance doses of

- prasugrel and clopidogrel in Chinese carriers of CYP2C19 variants. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2012, 73:93–105.
227. Park K-J, Chung H-S, Kim S-R, Kim H-J, Han J-Y, Lee S-Y: Clinical, pharmacokinetic, and pharmacogenetic determinants of clopidogrel resistance in Korean patients with acute coronary syndrome. *Korean J. Lab. Med.* 2011, 31:91–94.
228. Lewis JP, Stephens SH, Horenstein RB, O'Connell JR, Ryan K, Peer CJ, Figg WD, Spencer SD, Pacanowski MA, Mitchell BD, et al.: The CYP2C19*17 variant is not independently associated with clopidogrel response. *J. Thromb. Haemost.* 2013, 11:1640–1646.
229. Gurbel PA, Shuldiner AR, Bliden KP, Ryan K, Pakyz RE, Tantry US: The relation between CYP2C19 genotype and phenotype in stented patients on maintenance dual antiplatelet therapy. *Am. Heart J.* 2011, 161:598–604.
230. Sofi F, Marcucci R, Gori AM, Giusti B, Abbate R, Gensini GF: Clopidogrel non-responsiveness and risk of cardiovascular morbidity. *Thromb. Haemost.* 2010, 103:841–848.
231. Jin B, Ni H-C, Shen W, Li J, Shi H-M, Li Y: Cytochrome P450 2C19 polymorphism is associated with poor clinical outcomes in coronary artery disease patients treated with clopidogrel. *Mol. Biol. Rep.* 2010, 38:1697–1702.
232. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccia R, Buonamici P, Antonucci D, Abbate R, Gensini GF: Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis. *Am. J. Cardiol.* 2009, 103:806–811.
233. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Chialda L-E, Pahl A, Valina CM, Stratz C, Schmiebusch P, Bestehorn H-P, Büttner HJ, et al.: Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, 51:1925–1934.
234. Center for Drug Evaluation and Research: Postmarket Drug Safety Information for Patients and Providers - FDA Drug Safety Communication: Reduced effectiveness of Plavix (clopidogrel) in patients who are poor metabolizers of the drug . 2011,
235. Desta Z, Zhao X, Shin J-G, Flockhart DA: Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin. Pharmacokinet.* 2002, 41:913–958.
236. Wallentin L: P2Y12 inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur. Heart J.* 2009, 30:1964–1977.
237. Jernberg T, Payne CD, Winters KJ, Darstein C, Brandt JT, Jakubowski JA, Naganuma H, Siegbahn A, Wallentin L: Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and a lower rate of non-responders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 2006, 27:1166–1173.
238. Nawarskas JJ, Clark SM: Ticagrelor: a novel reversible oral antiplatelet agent. *Cardiol. Rev.* 2011, 19:95–100.
239. Chae H, Kim M, Koh Y-S, Hwang B-H, Kang M-K, Kim Y, Park H-I, Chang K: Feasibility of a microarray-based point-of-care CYP2C19 genotyping test for predicting clopidogrel on-treatment platelet reactivity. *BioMed Res. Int.* 2013, 2013:154073.
240. Bonello L, Armero S, Ait Mokhtar O, Mancini J, Aldebert P, Saut N, Bonello N, Barragan P, Arques S, Giacomoni M-P, et al.: Clopidogrel loading dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients carrying the 2C19*2 loss of function polymorphism. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010, 56:1630–1636.
241. Collet J-P, Hulot J-S, Anzaha G, Pena A, Chastre T, Caron C, Silvain J, Cayla G, Bellemain-Appaix A, Vignalou J-B, et al.: High Doses of Clopidogrel to Overcome Genetic Resistance: The Randomized Crossover CLOVIS-2 (Clopidogrel and Response Variability Investigation Study 2). *JACC Cardiovasc. Interv.* 2011, 4:392–402.
242. Frelinger AL 3rd, Bhatt DL, Lee RD, Mulford DJ, Wu J, Nudurupati S, Nigam A, Lampa M, Brooks JK, Barnard MR, et al.: Clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics vary widely despite exclusion or control of polymorphisms (CYP2C19, ABCB1, PON1), noncompliance, diet, smoking, co-medications (including proton pump inhibitors), and pre-existent variability in platelet function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013, 61:872–879.

11. Wykaz załączników

1. Zgoda Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań
2. Wyniki oznaczeń klopidogrelu i jego metabolitów w osoczu pacjentów, obliczeń farmakokinetycznych i badań genetycznych



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 581/11

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 1997, Nr 28, poz. 152); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2005 r. w sprawie szczegółowych wymagań Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2005, Nr 57, poz. 500); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo Farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 ze zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2008r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. Nr 201, poz. 1247), kierując się Zasadami Prawidłowego Prowadzenia Badań Klinicznych – GCP – opracowanymi w oparciu o Deklarację Helsińską.

Komisja, na posiedzeniu w dniu: 16 czerwca 2011 r.

rozpatrzyła wniosek, który przedstawiła Pani:

dr n. farm. Marta Karaźniewicz-Łada

w sprawie prowadzenia badań w

**Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki
UM w Poznaniu**

Główny badacz: dr n. farm. Marta Karaźniewicz-Łada

Członkowie zespołu

badawczego:

dr hab. n. farm. Franciszek Główka prof. UM

prof. dr hab. med. Grzegorz Oszkinis

lek. med. Katarzyna Motowidło

Temat badań: "Farmakokinetyka klopidogrelu i jego metabolitów u ludzi z uwzględnieniem oceny aktywności płytek krwi oraz polimorfizmu genetycznego enzymów cytochromu P450".

Uchwała Komisji Bioetycznej nr 117/09z dnia 05.02.2009r.

Komisja wyraziła zgodę na rozszerzenie składu zespołu badawczego w ww. badaniu o następujące osoby:

mgr farm Dorota Danielak – Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki UM w Poznaniu;

lek. med. Łukasz Kruszyna – Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń UM w Poznaniu;

dr n. med. Paweł Burchardt – Katedra i Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM w Poznaniu.

Przewodniczący Komisji

Prof. zw. dr hab. med. Zygmunt Przybylski

Załącznik 2

Wyniki oznaczeń klopidoogrelu i jego metabolitów w osoczu pacjentów, obliczeń farmakokinetycznych, pomiarów agregacji płytek krwi i badań genetycznych

A. Pacjenci przyjmujący dawkę 75 mg CLP

Tabela A1. Pacjent 1

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
A.J.		K		62		1,58		67						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	2,01	2,00	2,45	1,99	0,44	0,28	<LOQ	<LOQ	2,45	2	1,17	7,89	8,97	15,10
CLPM	645	826	1277	1154	784	538	410	50	1277	2	5,00	10697	-	-
H3	1,69	1,47	0,21	0,20	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,69	0,5	0,69	2,25	-	-
H4	7,12	8,79	10,07	5,08	0,55	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10,07	2	0,48	25,58	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17		Metabolizer			
89		T/T				*1/*1			*1/*1		EM			

Tabela A2. Pacjent 2

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
A.A.		M		73		1,70		85						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	0,76	2,38	1,36	0,29	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,38	1	0,67	3,75	18,56	17,92
CLPM	136	2485	1000	666	477	368	176	<LOQ	2485	1	5,59	6313	-	-
H3	1,67	15,99	3,21	0,86	0,23	<LOQ	<LOQ	<LOQ	15,99	1	0,53	17,01	-	-
H4	1,17	13,29	2,89	0,86	0,23	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13,29	1	0,53	14,59	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17		Metabolizer			
90		C/T				*1/*1			*17/*17		UM			

Tabela A3. Pacjent 3

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
A.J.		M		58		1,65		93						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	0,89	0,74	0,44	-	0,28	-	<LOQ	<LOQ	0,89	0,5	2,24	2,01	21,96	130,85
CLPM	2743	2532	1272	-	678	-	286	116	2743	0,5	8,67	12135	-	-
H3	<LOQ	0,20	<LOQ	-	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	0,20	1	-	-	-	-
H4	<LOQ	1,21	<LOQ	-	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	1,21	1	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
230		C/T				*1/*2			*1/*1			IM		

Tabela A4. Pacjent 4

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
B.J.		K		76		1,62		69						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	-
CLPM	429	1448	1743	1322	1186	931	289	154	1743	2	10,75	14049	-	-
H3	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
43		C/C				*1/*1			*1/*1			EM		

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A5. Pacjent 5

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
B.J.		K		68		1,59		68						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	1,78	0,97	0,27	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,78	0,5	0,55	1,75	38,09	30,28
CLPM	3189	3367	1801	1705	1041	739	274	63	3367	1	4,97	14979	-	-
H3	3,84	1,06	0,46	0,18	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,84	0,5	0,52	2,94	-	-
H4	6,95	2,02	1,43	0,50	0,30	<LOQ	<LOQ	<LOQ	6,95	0,5	1,03	7,07	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
66		C/T				*1/*2			*1/*1			IM		

Tabela A6. Pacjent 6

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
C.A.		M		53		1,63		87						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	0,27	0,50	0,25	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,50	1	1,00	0,70	70,88	102,25
CLPM	912	2802	1310	1116	1179	944	781	199	2802	1	7,15	18751	-	-
H3	0,63	1,58	0,16	<LOQ	*	*	<LOQ	<LOQ	1,58	1	0,30	1,65	-	-
H4	1,94	3,45	0,66	0,56	*	*	<LOQ	<LOQ	3,45	1	0,42	3,89	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
198		T/T				*1/*1			*1/*1			EM		

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A7. Pacjent 7

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
C.M.		K		68		1,59		68						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	<LOQ	<LOQ	0,64	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,64	2	-	-	-	-
CLPM	441	738	4596	1076	724	521	451	127	4596	2	8,35	15969	-	-
H3	0,48	5,46	0,75	<LOQ	*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,46	1	0,35	4,72	-	-
H4	0,59	4,59	0,56	<LOQ	*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4,59	1	0,33	4,02	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T					Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer			
79		C/T					*1/*1		*1/*1		EM			

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A8. Pacjent 8

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
C.I.		K		64		1,58		64						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	0,42	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,42	0,5	-	-	-	-
C-LPM	4363	2451	2390	1818	1499	1345	638	229	4363	0,5	7,73	22978	-	-
H3	15,55	5,78	3,67	0,77	0,26	<LOQ	<LOQ	<LOQ	15,55	0,5	0,62	16,68	-	-
H4	10,18	4,49	1,40	0,31	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10,18	0,5	0,47	10,01	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T					Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer			
217		C/T					*1/*1		*1/*17		UM			

Tabela A9. Pacjent 9

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
C.J.		M		60		1,68		90						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	5	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	0,54	-	0,31	-	0,25	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,54	0,5	4,42	1,68	23,73	151,22
CLPM	1497	-	497	-	219	106	70	65	1497	0,5	7,42	3650	-	-
H3	1,68	-	<LOQ	-	*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,68	0,5	-	-	-	-
H4	1,69	-	<LOQ	-	*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,69	0,5	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
-		C/T				*1/*1			*1/*17			UM		

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbek

Tabela A10. Pacjent 10

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
F.B.		K		70		1,55		59						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	0,49	1,74	1,46	-	1,00	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,74	1	4,23	9,96	6,56	40,13
CLPM	1842	2760	3419	-	-	926	377	<LOQ	3419	2	4,27	17301	-	-
H3	0,81	2,94	2,21	-	0,32	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,94	1	0,97	6,26	-	-
H4	0,81	3,52	2,66	-	0,32	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,52	1	0,65	7,35	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
189		C/T				*1/*2			*1/*1			IM		

Tabela A11. Pacjent 11

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
G.G.		K		50		-		-						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	0,59	0,78	0,85	-	0,25	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,85	2	1,13	2,45	10,21	79,93
CLPM	52	2855	2491	-	519	440	132	50	2855	1	7,88	10192	-	-
H3	0,50	6,10	4,35	-	0,40	0,25	<LOQ	<LOQ	6,10	1	2,73	12,44	-	-
H4	0,50	9,82	10,11	-	<LOQ	0,40	<LOQ	<LOQ	10,11	2	0,86	33,73	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
76		T/T				*1/*1		*1/*1		EM				

Tabela A12. Pacjent 12

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
G.J.		M		62		1,72		80						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	0,46	0,56	-	0,56	0,58	0,91	0,31	<LOQ	0,91	6	3,90	6,86	8,69	48,86
CLPM	146	103	1107	603	703	389	230	90	1107	2	8,56	7085	-	-
H3	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
52		C/T				*1/*1		*1/*1		EM				

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A13. Pacjent 13

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
G.J.		M		74		1,74		74						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	<LOQ	1,41	2,18	1,11	0,67	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,18	2	1,17	4,79	8,69	48,86
CLPM	<LOQ	1120	2560	706	353	218	66	<LOQ	2560	2	3,42	5732	-	-
H3	0,20	8,69	25,39	0,48	0,34	<LOQ	<LOQ	<LOQ	25,39	2	1,99	32,66	-	-
H4	0,20	5,79	23,09	0,48	0,34	<LOQ	<LOQ	<LOQ	23,09	2	1,99	29,16	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
217		C/T				*1/*1			*1/*17			UM		

Tabela A14. Pacjent 14

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
G.A.		M		61		1,78		74						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	<LOQ	<LOQ	0,43	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,43	2	-	-	-	-
CLPM	621	2599	2688	1607	850	988	471	90	2688	2	5,09	16561	-	-
H3	0,98	3,41	2,20	0,27	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,41	1	0,34	5,39	-	-
H4	1,09	2,53	2,30	0,29	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,53	1	0,33	4,89	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
747		C/C				*1/*2			*1/*1			IM		

Tabela A15. Pacjent 15

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
H.P.		M		50		1,78		80						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	<LOQ	1,54	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,54	0,5	-	-	-	-
CLPM	3451	5799	723	-	209	135	<LOQ	<LOQ	5799	1	2,49	7712	-	-
H3	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
55		C/T				*1/*1		*1/*1		EM				

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A16. Pacjent 16

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
K.J.		M		66		1,77		95						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	0,26	1,41	3,07	2,06	1,72	0,35	<LOQ	<LOQ	3,07	2	1,12	9,31	7,59	12,24
CLPM	160	889	837	1290	851	423	261	76	1290	3	6,97	8656	-	-
H3	0,34	1,44	3,67	2,36	*	0,18	<LOQ	<LOQ	3,67	2	0,85	9,91	-	-
H4	0,63	6,51	5,5	3,2	*	0,18	<LOQ	<LOQ	6,51	1	0,75	17,56	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
168		C/C				*1/*1		*1/*17		UM				

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A17. Pacjent 17

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
K.M.		M		54		1,72		76						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	7,37	3,36	1,10	0,25	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	7,37	0,5	0,53	7,43	9,84	7,57
CLPM	1952	1212	581	514	482	347	176	53	1952	0,5	6,70	6998	-	-
H3	11,22	2,32	*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	11,22	0,5	0,22	6,19	-	-
H4	27,71	12,03	*	0,25	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	27,71	0,5	0,36	29,28	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
144		C/T				*1/*1			*1/*1			EM		

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A18. Pacjent 18

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
K.H.		M		60		1,65		89						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	6,77	2,96	1,70	1,20	1,03	<LOQ	<LOQ	<LOQ	6,77	0,5	1,96	9,02	6,29	17,81
CLPM	2869	1758	1007	776	380	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2869	0,5	1,43	4726	-	-
H3	1,99	0,82	0,39	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,99	0,5	0,66	1,80	-	-
H4	4,91	5,29	1,11	0,45	0,34	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,29	1	1,18	8,16	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
254		C/C				*1/*1			*1/*17			UM		

Tabela A19. Pacjent 19

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
K.R.		M		60		1,80		90						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	-
CLPM	428	467	2140	715	424	382	232	61	2140	2	6,55	8043	-	-
H3	<LOQ	0,16	2,14	0,16	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,14	2	0,27	2,38	-	-
H4	<LOQ	0,28	2,15	0,25	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,15	2	0,32	2,55	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
226		C/T				*1/*2			*1/*17			IM		

Tabela A20. Pacjent 20

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
K.J.		M		71		1,71		81						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	-
CLPM	2342	1979	1340	967	748	389	291	89	2342	0,5	7,78	10793	-	-
H3	3,28	2,06	0,17	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,28	0,5	0,28	3,34	-	-
H4	6,98	5,02	0,50	0,16	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	6,98	0,5	0,60	7,84	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
144		C/T				*1/*1			*1/*1			EM		

Tabela A21. Pacjent 21

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
K.B.		K		74		1,64		71						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	1,05	1,36	0,45	-	0,26	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,63	1	1,35	2,54	24,61	48,08
CLPM	766	2076	1438	-	890	805	172	75	2076	1	9,33	11101	-	-
H3	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
107		C/C				*1/*1		*1/*17		UM				

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbki

Tabela A22. Pacjent 22

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
K.J.		K		75		1,52		73						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	1,42	1,67	0,42	0,27	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	1,67	1	0,75	2,51	26,77	29,16
CLPM	1281	3512	927	616	479	212	-	51	3512	1	6,40	8118	-	-
H3	1,13	1,32	0,20	*	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	1,32	1	0,37	1,66	-	-
H4	3,53	3,96	0,30	*	<LOQ	<LOQ	-	<LOQ	3,96	1	0,27	4,88	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
144		C/T				*1/*1		*1/*1		EM				

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbki

Tabela A23. Pacjent 23

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
K.E.		K		57		1,60		74						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	0,75	1,39	0,69	-	0,43	0,25	<LOQ	<LOQ	1,39	1	2,73	3,62	16,30	64,21
CLPM	1087	1449	1353	-	874	547	226	58	1449	1	5,95	9978	-	-
H3	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T					Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer			
37		T/T					*1/*1		*1/*1		EM			

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbek

Tabela A24. Pacjent 24

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
L.K.		M		63		1,80		91						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	9,45	2,45	1,21	0,57	0,36	0,30	<LOQ	<LOQ	9,45	0,5	1,64	9,18	7,58	17,95
CLPM	1960	896	677	411	241	166	<LOQ	<LOQ	1960	0,5	1,94	3268	-	-
H3	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T					Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer			
95		C/T					*1/*1		*1/*1		EM			

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbek

Tabela A25. Pacjent 25

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
L.M.		M		74		1,70		70						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	0,75	1,39	0,69	-	0,43	0,25	<LOQ	<LOQ	1,39	1	2,73	3,62	16,30	64,21
CLPM	1087	1449	1353	-	874	547	226	58	1449	1	5,95	9978	-	-
H3	*	*	*	*	*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	*	*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
-		C/T				*1/*1			*1/*17			UM		

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbek

Tabela A26. Pacjent 26

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
M.R.		M		65		1,86		92						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	0,92	1,15	0,41	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,15	1	0,67	1,63	36,99	35,87
CLPM	623	1223	841	616	469	351	190	85	1223	1	9,58	7012	-	-
H3	0,62	1,45	0,31	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,45	1	0,45	1,75	-	-
H4	0,59	1,26	0,18	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,26	1	0,36	1,33	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
-		T/T				*1/*1			*17/*17			UM		

Tabela A27. Pacjent 27

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
M.T.		M		64		1,79		104						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	0,92	1,15	0,41	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,15	1	0,67	1,63	36,99	35,87
CLPM	1879	1502	662	894	469	351	190	85	1879	0,5	7,34	9475	-	-
H3	0,62	1,45	0,31	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,45	1	0,45	1,75	-	-
H4	0,59	1,26	0,18	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,26	1	0,36	1,33	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T			Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer			
112		T/T			*1/*1			*1/*17			UM			

Tabela A28. Pacjent 28

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
M.F.		M		50		1,67		72						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2,33	3	5,33	6	13,33	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	<LOQ	<LOQ	0,55	-	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	0,55	2,33	-	-	-	-
CLPM	158	1716	1239	-	709	-	252	102	1716	1	7,67	11128	-	-
H3	*	*	*	-	*	-	*	*	1,45	1	0,45	1,75	-	-
H4	*	*	*	-	*	-	*	*	1,26	1	0,36	1,33	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T			Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer			
201		T/T			*1/*1			*1/*17			UM			

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A29. Pacjent 29

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
M.H.		K		58		1,63		71						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	0,37	1,26	1,54	3,81	1,56	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,81	3	0,77	7,25	8,34	9,31
CLPM	214	792	1129	1759	1381	389	109	<LOQ	1759	3	2,36	7543	-	-
H3	2,07	4,41	3,39	3,27	1,34	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4,41	1	1,50	11,68	-	-
H4	9,80	6,18	4,72	5,12	1,87	<LOQ	<LOQ	<LOQ	9,80	0,5	1,98	20,30	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
144		C/C				*1/*1			*1/*1			EM		

Tabela A30. Pacjent 30

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
N.T.		M		72		-		-						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	1,37	0,31	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,37	0,5	-	-	-	-
CLPM	3420	1329	857	866	785	727	143	90	3420	0,5	15,21	10346	-	-
H3	5,62	1,27	0,21	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,62	0,5	0,38	3,87	-	-
H4	9,79	1,60	0,28	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	9,79	0,5	0,39	6,23	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
56		T/T				*1/*1			*1/*17			UM		

Tabela A31. Pacjent 31

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
N.A.		M		41		1,83		98						
Stężenie [ng/mL]								Parametry farmakokinetyczne						
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	0,45	0,45	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,45	0,5	-	-	-	-
CLPM	472	427	585	284	214	116	<LOQ	<LOQ	585	2	2,33	1863	-	-
H3	2,31	2,74	*	*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,74	1	-	-	-	-
H4	2,81	3,61	*	*	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,61	1	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
361		T/T				*1/*1		*1/*1		EM				

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A32. Pacjent 32

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
P.S.		M		61		1,79		94						
Stężenie [ng/mL]								Parametry farmakokinetyczne						
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	<LOQ	1,69	5,21	3,31	0,65	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,21	2	0,42	10,51	6,87	4,20
CLPM	86	212	252	2276	1705	359	165	110	2276	3	11,38	8875	-	-
H3	0,65	*	2,46	2,04	0,44	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,46	2	0,45	5,99	-	-
H4	0,94	*	3,10	1,81	0,66	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,10	2	0,90	6,96	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
243		C/T				*1/*1		*1/*17		UM				

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A33. Pacjent 33

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
P.Z.		M		62		1,70		112						
Stężenie [ng/mL]								Parametry farmakokinetyczne						
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	0,46	0,94	1,02	1,03	0,77	0,44	<LOQ	<LOQ	1,03	3	2,42	4,59	12,26	42,82
CLPM	436	663	708	526	574	475	463	209	10137	3	14,28	10137	-	-
H3	0,77	0,80	0,97	0,79	0,77	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,97	3	3,49	2,94	-	-
H4	0,81	0,61	0,54	0,43	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,81	0,5	3,99	1,62	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
169		C/C				*1/*2			*1/*17			IM		

Tabela A34. Pacjent 34

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
P.J.		K		69		1,60		70						
Stężenie [ng/mL]								Parametry farmakokinetyczne						
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	2,62	3,38	2,34	-	0,28	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,38	1	0,80	7,71	9,34	10,82
CLPM	663	1689	1445	-	669	436	220	202	1689	1	5,45	7568	-	-
H3	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
110		C/C				*1/*1			*1/*1			EM		

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbeki

Tabela A35. Pacjent 35

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
P.W.		M		74		1,76		97						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,75	1,25	2,25	3,25	4,25	6,25	12,25	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	0,59	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,59	0,75	-	-	-	-
CLPM	3413	2340	1194	918	635	533	216	101	3413	0,75	9,57	11605	-	-
H3	5,06	4,63	0,47	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,06	0,75	0,30	6,87	-	-
H4	3,73	2,70	0,45	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,73	0,75	0,39	4,58	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
159		C/T				*1/*2			*1/*17			IM		

Tabela A36. Pacjent 36

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
P.W.		M		51		1,79		85						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	<LOQ	<LOQ	0,37	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,37	2	-	-	-	-
CLPM	2917	3111	5595	-	660	226	148	60	5595	2	9,31	16100	-	-
H3	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
165		C/T				*1/*2			*1/*17			IM		

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbki

Tabela A37. Pacjent 37

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
S.P.		M		55		1,76		96						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	0,64	0,72	2,99	2,09	1,41	0,97	0,46	<LOQ	2,99	2	5,03	13,30	4,51	32,79
CLPM	1869	8384	11021	9305	5100	2968	837	<LOQ	11021	2	3,12	49586	-	-
H3	7,02	10,09	15,31	7,35	0,76	<LOQ	<LOQ	<LOQ	15,31	2	0,46	34,11	-	-
H4	10,61	13,77	23,29	9,40	1,37	<LOQ	<LOQ	<LOQ	23,29	2	0,72	50,80	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
637		C/T				*1/*1		*17/*17		UM				

Tabela A38. Pacjent 38

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
S.Z.		M		56		1,68		54						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLPM	1156	1354	1225	-	620	422	123	<LOQ	1354	1	3,40	6,73	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
-		T/T				*1/*2		*17/*17		IM				

Tabela A39. Pacjent 39

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
S.J.		M		62		1,74		95						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	1,25	1,25	0,68	-	0,34	0,26	<LOQ	<LOQ	1,25	0,5	2,88	3,59	16,17	67,27
CLPM	481	800	844	-	594	529	275	89	844	2	7,21	8428	-	-
H3	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17		Metabolizer			
-		C/T				*1/*2			*1/*17		IM			

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbki

Tabela A40. Pacjent 40

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
S.L.		K		74		1,56		70						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	<LOQ	<LOQ	3,21	2,27	1,85	1,00	0,25	<LOQ	3,21	2	2,81	14,63	4,79	19,44
CLPM	169	2185	3164	2159	2280	1315	1144	443	3164	2	9,34	28679	-	-
H3	3,06	3,53	2,85	0,51	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,53	1	0,72	7,28	-	-
H4	3,76	5,15	1,89	0,83	0,46	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5,15	0,99	0,99	8,69	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17		Metabolizer			
77		C/T				*1/*1			*17/*17		UM			

Tabela A41. Pacjent 41

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
T.J.		M		56		1,68		75						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4,75	5,75	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	-	<LOQ	3,21	-	1,85	1,00	0,25	<LOQ	0,25	2	-	-	-	-
CLPM	-	333	1002	-	875	812	271	66	1002	2	5,69	9665	-	-
H3	-	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	-	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
63		C/T				*1/*1		*1/*1		EM				

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbki

Tabela A42. Pacjent 42

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
W.J.		K		69		1,50		80						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	2,31	1,50	0,80	0,66	0,37	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,31	0,5	1,80	4,02	15,05	39,02
CLPM	1713	1693	1105	1029	672	532	277	89	1713	0,5	7,19	10423	-	-
H3	3,29	2,95	1,99	1,56	0,56	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,29	0,5	0,94	7,69	-	-
H4	14,01	10,74	3,47	2,84	1,08	0,28	<LOQ	<LOQ	14,01	0,5	0,99	23,27	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
89		T/T				*1/*1		*17/*17		UM				

Tabela A43. Pacjent 43

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
W.A.		M		76		1,82		100						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	1,51	2,01	0,90	-	0,35	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,01	1	1,22	4,05	16,08	28,36
CLPM	1273	2116	1590	-	1056	675	196	123	2116	1	14,20	11922	-	-
H3	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
H4	*	*	*	-	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17		Metabolizer			
67		C/T				*1/*1			*1/*17		UM			

*wynik oznaczeń odrzucony ze względu na niedostateczną stabilizację próbek

Tabela A44. Pacjent 44

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
W.G.		M		54		1,79		103						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	<LOQ	0,47	2,37	0,44	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	2,37	2	0,41	3,28	21,18	12,58
CLPM	65	284	1051	1028	315	195	68	<LOQ	1051	2	14,03	4442	-	-
H3	<LOQ	0,93	1,97	0,90	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,97	2	0,88	3,35	-	-
H4	<LOQ	0,52	0,64	0,49	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,64	2	2,59	1,40	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17		Metabolizer			
141		C/T				*1/*1			*1/*17		UM			

Tabela A45. Pacjent 45

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
Z.T.		M		64		1,68		81						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2,5	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	-	1,1	1,54	-	0,28	-	<LOQ	-	1,54	2,5	0,58	4,02	17,63	15,18
CLPM	-	2057	899	-	287	-	108	-	2057	1	5,13	5715	-	-
H3	-	8,68	0,16	-	<LOQ	-	<LOQ	-	8,68	1	0,26	10,97	-	-
H4	-	5,76	<LOQ	-	<LOQ	-	<LOQ	-	5,76	1	-	-	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
-		C/T				*1/*1			*1/*1			EM		

B. Pacjenci przyjmujący dawkę 300 mg CLP

Tabela B1. Pacjent 46

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
C.Z.		M		68		1,68		75						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLP	6,17	7,83	5,45	-	3,45	1,33	<LOQ	<LOQ	7,83	1	2,30	30,26	9,63	31,95
CLPM	3873	6647	2093	-	1673	992	513	167	6647	1	7,25	22996	-	-
H3	10,34	10,42	4,90	-	0,28	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10,42	1	0,51	20,62	-	-
H4	24,36	41,32	8,35	-	0,90	<LOQ	<LOQ	<LOQ	41,32	1	0,61	56,60	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
-		C/T				*1/*1			*1/*17			UM		

Tabela B2. Pacjent 47

Inicjaly		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
D.W.		M		60		1,78		81						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	15497	4918	1964	-	1300	531	330	109	15497	0,5	7,68	22731	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
-		T/T				*1/*1		*1/*17		UM				

Tabela B3. Pacjent 48

Inicjaly		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
G.S.		M		76		1,64		85						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	4144	8868	9762	-	-	3894	1022	501	9762	2	10,31	64798	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
-		C/C				*1/*2		*1/*1		IM				

Tabela B4. Pacjent 49

Inicjaly		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
G.A.		M		64		1,65		64						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	1908	3904	3064	-	1694	908	410	<LOQ	3904	1	4,67	16729	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
-		C/T				*1/*2		*1/*1		IM				

Tabela B5. Pacjent 50

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
H.S.		M		-		-		-						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	3,75	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLPM	6135	-	-	7277	3423	1934	835	<LOQ	7277	3	4,55	36645	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
400		C/C				*1/*1			*1/*17			UM		

Tabela B6. Pacjent 51

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
K.S.		M		61		1,65		76						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	-	0,99	<LOQ	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,99	1	-	-	-	-
CLPM	-	4621	7147	-	2420	2272	805	452	7148	2	11,92	39228	-	-
H3	-	7,56	3,23	-	0,78	<LOQ	<LOQ	<LOQ	7,56	1	0,96	13,18	-	-
H4	-	4,01	1,72	-	0,44	<LOQ	<LOQ	<LOQ	4,01	1	0,99	7,03	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCBI 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
-		C/T				*1/*1			*1/*1			EM		

Tabela B7. Pacjent 52

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
K.Z.		M		60		1,67		93						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	715	8340	4150	-	1859	1153	410	<LOQ	4586	1	3,54	17236	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
-		C/T				*1/*2		*1/*17		IM				

Tabela B8. Pacjent 53

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
M.J.		M		67		1,67		81						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	-	2001	2878	-	5000	3635	753	<LOQ	5000	4	3,99	39700	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
-		C/T				*1/*2		*1/*1		IM				

Tabela B9. Pacjent 54

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
M.W.		M		61		1,75		74						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,25	0,5	1	1,5	2	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	5190	7460	3590	2850	1890	880	296	<LOQ	7460	0,5	3,79	16855	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2		Genotyp 2C19*17		Metabolizer				
475		C/T				*1/*1		*1/*1		EM				

Tabela B10. Pacjent 55

Inicjaly		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
N.T.		M		57		1,68		76						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	4706	15066	7497	-	3337	3009	798	<LOQ	15066	1	3,54	46003	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T			Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer			
-		C/T			*1/*1			*1/*1			EM			

Tabela B11. Pacjent 56

Inicjaly		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
P.H.		M		64		1,77		80						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1,33	2	2,75	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	-	15561	-	4740	3000	1603	807	<LOQ	15561	1,33	5,25	41435	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T			Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer			
-		C/T			*1/*1			*1/*1			EM			

Tabela B12. Pacjent 57

Inicjaly		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
P.A.		M		84		1,78		81						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	7306	8026	-	-	1495	1219	389	227	8026	1	12,62	31172	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T			Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer			
-		T/T			*1/*2			*1/*1			IM			

Tabela B13. Pacjent 58

Inicjaly		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
R.E.		M		66		1,68		84						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	1,5	3	4,5	7	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	-	2467	3581	-	3680	1837	-	314	3680	4,5	6,33	41686	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
-		C/T				*1/*1			*17/*17			UM		

Tabela B14. Pacjent 59

Inicjaly		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
R.R.		M		70		1,64		87						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	8	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	8946	8217	5367	-	2193	1181	570	288	8946	0,5	9,80	35054	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
-		C/T				*1/*2			*1/*1			IM		

Tabela B15. Pacjent 60

Inicjaly		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
W.T.		M		42		1,76		84						
Stężenie [ng/mL]							Parametry farmakokinetyczne							
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [$\cdot 10^3$ L/h]	V _d /F [$\cdot 10^3$ L]
CLPM	4531	6834	9975	-	2021	734	419	262	9975	2	14,56	34672	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]		Genotyp ABCB1 3435 C>T				Genotyp 2C19*2			Genotyp 2C19*17			Metabolizer		
-		C/C				*1/*1			*17/*17			UM		

Tabela B16. Pacjent 61

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
W.F.		M		58		1,65		85						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1,5	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLPM	-	7229	6018	-	2248	1073	644	<LOQ	7230	1,5	6,45	25474	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]			Genotyp <i>ABCB1</i> 3435 C>T				Genotyp <i>2C19</i> *2			Genotyp <i>2C19</i> *17			Metabolizer	
-			T/T				*1/*1			*1/*1			EM	

Tabela B17. Pacjent 62

Inicjały		Płeć		Wiek [lata]		Wzrost [m]		Masa ciała [kg]						
Z.A.		M		80		1,66		80						
Stężenie [ng/mL]									Parametry farmakokinetyczne					
Czas [h]	0,5	1	2	3	4	6	12	24	C _{maks} [ng/mL]	t _{maks} [h]	t _{0,5} [h]	AUC _{0-t} [ng·h/mL]	Cl/F [·10 ³ L/h]	V _d /F [·10 ³ L]
CLP	4,71	3,10	-	-	0,99	0,39	<LOQ	-	4,71	0,5	1,68	11,38	24,33	59,07
CLPM	8126	5623	-	-	2465	2179	924	-	8126	0,5	4,60	34613	-	-
H3	7,44	3,67	-	-	0,18	<LOQ	<LOQ	-	7,44	0,5	0,68	10,68	-	-
H4	8,44	3,40	-	-	0,39	<LOQ	<LOQ	-	8,44	0,5	0,92	11,50	-	-
Wynik reaktywności płytek krwi [AU·min]			Genotyp <i>ABCB1</i> 3435 C>T				Genotyp <i>2C19</i> *2			Genotyp <i>2C19</i> *17			Metabolizer	
-			C/T				*1/*2			*1/*17			IM	