

## INFLUENCE OF THE CYP3A4 ISOENZYME METABOLIC ACTIVITY AND CYP2C19 GENE POLYMORPHISMS ON CLOPIDOGREL ANTIPLATELET EFFECT IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME UNDERGOING PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION

K.B. Mirzaev<sup>1</sup>, R.E. Kazakov<sup>2</sup>, V.V. Smirnov<sup>3</sup>, D.A. Andreev<sup>4</sup>, D.A. Sychev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Russian Medical Academy of Postgraduate Education. Barricadnaya ul. 2/1, Moscow, 123995, Russia

<sup>2</sup> Research Center for Evaluation of Medical Products. Petrovsky bulv. 8, Moscow, 127051 Russia

<sup>3</sup> State Research Center Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia. Kashirskoye shosse, 24-2, Moscow, 115478 Russia

<sup>4</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University. Trubetskaya ul. 8-2, Moscow, 119991, Russia

**Aim.** Carriership of CYP2C19\*2 allelic variant and reduced CYP3A4 activity can affect the formation of clopidogrel's active metabolite and, respectively, its antiplatelet effect. We sought to determine the impact of CYP3A4 isoenzyme activity and CYP2C19 polymorphisms on platelet aggregation.

**Material and methods.** The study included 81 patients with acute coronary syndrome (ACS) and subsequent percutaneous coronary intervention (PCI): 64 males and 17 females, mean age 63.9±10.9 years. CYP2C19 allelic variants were detected by the method of real-time polymerase chain reaction. CYP3A4 isoenzyme activity was estimated by urinary 6-β-hydroxycortisol/free cortisol ratio (6-OHC/FC) using the method of high-performance liquid chromatography. Platelet functional activity was evaluated by a portable aggregometer - the VerifyNow P2Y<sub>12</sub> assay.

**Results.** Logistic regression analysis has demonstrated significantly increased risk of clopidogrel resistance in patients-carriers of the CYP2C19\*2 polymorphism (p=0.022). CYP2C19\*2 non-carriers had significantly higher mean platelet inhibition percentage as compared with the carriers of this allele: 30.7±20.1 in the CYP2C19\*1/\*1 group vs 18.2±16.4 in the CYP2C19\*1/\*2 one (p=0.03). Clopidogrel laboratory resistance (P2Y<sub>12</sub> Reaction Units (PRU)>208) was found out to be higher in the CYP2C19\*2-carriers as compared with non-carriers: 53.8% in the patients with the CYP2C19\*1/\*2 genotype and 16.2% in subjects with the CYP2C19\*1/\*1 genotype (odds ratio [OR]=1.8; 95% confidence interval [95% CI]: 1.0–3.2; p=0.0067). Linear regression analysis has revealed that smaller mean diameter of stent slightly reduces the risk of clopidogrel resistance development. No significant distinctions in urinary 6-OHC/FC ratios (the marker of CYP3A4 activity) were observed: 3.4±2.8 in the PRU>208 group and 3.2±3.0 in the PRU<208 group (p=0.8). Besides, no significant correlation between platelet activity and the 6-OHC/FC ratio was found (p=0.84).

**Conclusion.** CYP2C19\*2-carriership in ACS patients undergoing PCI significantly increases the risk of clopidogrel laboratory resistance. The urinary 6-OHC/FC ratio (as a marker of CYP3A4 isoenzyme activity) does not correlate with platelet functional activity.

**Key words:** CYP2C19\*2; acute coronary syndrome; CYP3A4; pharmacogenetics; clopidogrel; P2Y<sub>12</sub>-receptor blockers.

**Ration Pharmacother Cardiol 2015;11(4):344–354**

**Влияние метаболической активности изофермента CYP3A4 и полиморфных маркеров гена CYP2C19 на антиагрегантный эффект клопидогрела у больных с острым коронарным синдромом, перенесших чрескожное коронарное вмешательство**

К.Б. Мирзаев<sup>1\*</sup>, Р.Е. Казаков<sup>2</sup>, В.В. Смирнов<sup>3</sup>, Д.А. Андреев<sup>4</sup>, Д.А. Сычев<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российская медицинская академия последиplomного образования. 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

<sup>2</sup> Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 127051, Москва, Петровский бульвар, 8

<sup>3</sup> Государственный научный центр Институт иммунологии, Федеральное медико-биологическое агентство России. 115478, Москва, Каширское шоссе, 24 корп. 2

<sup>4</sup> Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова. 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8 стр. 2

**Цель.** Носительство аллельного варианта CYP2C19\*2 и снижение активности изофермента CYP3A4 может влиять на процесс образования активного метаболита клопидогрела, и, соответственно, на его антиагрегантный эффект. Целью исследования является оценка влияния активности изофермента CYP3A4 и полиморфных маркеров гена CYP2C19 на функциональную активность тромбоцитов.

**Материал и методы.** В исследование включено 81 пациент с острым коронарным синдромом (ОКС) и последующим чрескожным коронарным вмешательством (ЧКВ): 64 мужчины и 17 женщин; средний возраст: 63,9±10,9 года. Аллельные варианты гена CYP2C19 определялись методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Активность изофермента CYP3A4 оценивалась через измерение отношения концентрации 6-β-гидрооксикортизола к кортизолу (6-OHC/FC) в утренней моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Функциональная активность тромбоцитов оценивалась с использованием портативного агрегометра VerifyNow P2Y<sub>12</sub> assay.

**Результаты.** Логистический регрессионный анализ показал достоверное повышение риска развития резистентности к клопидогрелу у пациентов-носителей полиморфного маркера CYP2C19\*2 (p=0,022). Средний процент ингибирования тромбоцитов был значительно выше у пациентов без CYP2C19\*2 по сравнению с носителями данного аллеля: 30,7±20,1 в группе CYP2C19\*1/\*1 против 18,2±16,4 в группе CYP2C19\*1/\*2 (p=0,03). Лабораторная резистентность к клопидогрелу (P2Y<sub>12</sub> Reaction Units (PRU)>208) оказалась выше среди носителей CYP2C19\*2, по сравнению с пациентами без данного аллеля: 53,8% среди пациентов с генотипом CYP2C19\*1/\*2 и 16,2% с генотипом CYP2C19\*1/\*1 (отношение шансов [ОШ]=1,8; 95% доверительный интервал [95% ДИ]: 1,0–3,2; p=0,0067). Линейный регрессионный анализ показал, что меньшее значение среднего диаметра стента незначительно снижает риск развития резистентности к клопидогрелу. Значимых различий по показателю 6-OHC/FC в утренней моче (маркер активности CYP3A4) не обнаружено: 3,4±2,8 в группе PRU>208 и 3,2±3,0 в группе PRU<208 (p=0,8). Кроме того, не отмечалось статистически значимой корреляции между активностью тромбоцитов и отношением 6-OHC/FC (p=0,84).

**Заключение.** Носительство CYP2C19\*2 у пациентов с ОКС, подвергнутых ЧКВ, достоверно повышает риск развития лабораторной резистентности к клопидогрелу. Отношение 6-OHC/FC в утренней моче, как маркер активности изофермента CYP3A4, не коррелирует с функциональной активностью тромбоцитов.

**Ключевые слова:** CYP2C19\*2, острый коронарный синдром, CYP3A4, фармакогенетика, клопидогрел, блокаторы P2Y<sub>12</sub>-рецепторов.

**Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2015;11(4):344–354**

\*Corresponding author (Автор, ответственный за переписку): karin05doc@yandex.ru

### Author's information:

**Karin B. Mirzaev** – MD, Junior Researcher, Group of Clinical and Pharmacological Technology of the Research Center, Russian Medical Academy of Postgraduate Education

**Ruslan E. Kazakov** – PhD, Head of the Laboratory of Clinical Pharmacogenetics and Personalized Medicine, Research Center for Evaluation of Medical Products

**Valeriy V. Smirnov** - PhD, Head of the Laboratory of Clinical Pharmacology, State Research Center Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency of Russia

**Denis A. Andreev** – MD, PhD, Professor, Chair of the Urgent Cardiology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

**Dmitriy A. Sychev** – MD, PhD, Professor, Head of the Chair of Clinical Pharmacology and Therapy; Leading Researcher, Group of Clinical and Pharmacological Technology of the Research Center, Russian Medical Academy of Postgraduate Education

### Сведения об авторах:

**Мирзаев Карин Бадавиевич** – м.н.с. группы клинико-фармакологических технологий, Научно-исследовательский центр РМАПО

**Казаков Руслан Евгеньевич** – к.б.н., руководитель лаборатории клинической фармакогенетики и персонализированной медицины НЦЭСМП

**Смирнов Валерий Валерьевич** – к.фарм.н., зав. лабораторией клинической фармакологии ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России

**Андреев Денис Анатольевич** – д.м.н., профессор кафедры неотложной кардиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

**Сычев Дмитрий Алексеевич** – д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической фармакологии и терапии РМАПО, в.н.с. группы клинико-фармакологических технологий НИЦ РМАПО

Platelets activation plays a key role in the development of thrombotic complications at a place of atheroma lesion [1]. Acute coronary syndrome (ACS), ischemic stroke and peripheral arteries thrombotic occlusion are the clinical consequences of such complications [1]. Dual antiplatelet therapy (DAT) comprised of acetylsalicylic acid (ASA) and one of P2Y<sub>12</sub>-receptor blockers is the standard of ACS patients' treatment regardless of treatment strategy [2-4]. Non-responsiveness to antiplatelet agents is one of the key problems in the prevention of thrombotic events in cardiovascular diseases. So, clopidogrel non-responsiveness may reach 30% [5]. Intrinsic ASA non-responsiveness is rather rare, that is why non-responsiveness to clopidogrel (the most frequently used P2Y<sub>12</sub>-receptor blocker) deserves more attention. A lot of factors (genetic, clinical, demographic, laboratory and other) influence clopidogrel pharmacodynamics, clinical efficacy and safety [6,7] (Table 1), that is why the response to clopidogrel varies significantly [8,9]. Two-step bioactivation involving enzymes of cytochrome P450 system is necessary to realize the antiplatelet effect of clopidogrel [10]. At that cytochrome P450 enzyme 2C19 plays a key role in the formation of active metabolite R-130964, while other P450 isoenzymes, such as 2B6, 1A2, 3A4, 3A5 and 2C9 are less important [11]. The most prevalent polymorphisms of *CYP2C19* gene are *CYP2C19\*2*, *CYP2C19\*3*, which are responsible for the synthesis of isoenzyme with reduced function and insufficient clopidogrel antiplatelet effect, and *CYP2C19\*17*, which is related to the synthesis of isoenzyme with high activity and excessive platelets' inactivation [12]. The *CYP3A4* isoenzyme can also play an important role in changes of clopidogrel antiplatelet effect. Several studies have demonstrated significant interindividual variability of this isoenzyme's activity due to its induction or inhibition by endo- or exogenous substrates, in particular, by drugs. At that *CYP3A4* gene polymorphism was noted as less significant factor determining *CYP3A4* activity [13]. So, phenotypic methods of *CYP3A4* enzyme activity estimation overweigh genotypic ones. These methods are as follows: erythromycin breath test, midazolam test, urinary 6- $\beta$ -hydrocortisol to free cortisol ratio (6-OHC/FC) assessment and others. Evaluation of 6- $\beta$ -hydrocortisol to free cortisol ratio in morning urine is the most simple and safe method of *CYP3A4* activity estimation [14].

The aim of our study was to evaluate the influence of *CYP3A4* isoenzyme metabolic activity, *CYP2C19* polymorphisms and different clinical, demographic, laboratory and instrumental factors on platelets' functional activity.

Активация тромбоцитов играет ведущую роль в развитии тромботических осложнений на месте повреждения атеросклеротической бляшки [1]. Клиническими последствиями подобных осложнений является развитие острого коронарного синдрома (ОКС), а так же ишемического инсульта и тромботической окклюзии периферических артерий [1]. Стандартом лечения больных с ОКС, независимо от стратегии лечения, является двойная антитромбоцитарная терапия (ДАТ), в состав которой входит ацетилсалициловая кислота (АСК) и один из блокаторов P2Y<sub>12</sub>-рецепторов [2-4]. Одной из ключевых проблем в профилактике тромботических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний является проблема резистентности к антиагрегантным препаратам. Так, частота резистентности к клопидогрелу может достигать до 30% [5]. Истинная резистентность к АСК встречается достаточно редко, и поэтому большего внимания заслуживает резистентность к наиболее часто применяемому блокатору P2Y<sub>12</sub>-рецепторов – клопидогрелу. На фармакодинамический ответ, клиническую эффективность и безопасность клопидогрела влияет множество факторов: генетических, клинических, демографических, лабораторных и др. [6,7] (табл. 1), в связи с чем ответ на клопидогрел отличается значительной вариабельностью [8,9]. Для реализации антиагрегантного эффекта требуется двухступенчатая биоактивация клопидогрела в организме человека при участии ферментов системы цитохрома P450 [10], при этом главенствующая роль в образовании активного метаболита R-130964 играет изофермент P450 2C19, в меньшей степени участвуют другие изоферменты P450: 2B6, 1A2, 3A4, 3A5 и 2C9 [11]. Наиболее распространенными полиморфными маркерами гена *CYP2C19* являются *CYP2C19\*2*, *CYP2C19\*3*, которые приводят к синтезу изофермента с низкой ферментативной активностью и недостаточным антиагрегантным эффектом клопидогрела, а так же *CYP2C19\*17*, связанный с синтезом изофермента с высокой ферментативной активности и чрезмерным подавлением функциональной активности тромбоцитов [12]. Важную роль в изменении антиагрегантного эффекта клопидогрела может играть и изофермент *CYP3A4*. В нескольких исследованиях была продемонстрирована выраженная межиндивидуальная вариабельность активности этого изофермента вследствие индукции или ингибирования активности изофермента эндо- и экзогенными субстратами и, в частности, лекарственными препаратами, при этом было отмечено, что полиморфизм гена *CYP3A4* – менее значимый фактор, определяющий активность изофермента *CYP3A4* [13]. Таким образом, фенотипические методы оценки активности изофермента *CYP3A4* имеют большее значение, чем генотипические. К таким методам относятся эритромициновый дыхательный тест, мидозаламовый тест, определение отношения концентрации 6- $\beta$ -гидрокортизола к свободному кортизолу (6-ОНС/FC) в моче и др. Наиболее удобным и безопасным методом оценки активности *CYP3A4* является метод определения отношения концентрации 6- $\beta$ -гидрокортизола к свободному кортизолу в утренней моче [14].

**Table 1. Factors associated with alteration of pharmacological response to clopidogrel**

**Таблица 1. Факторы, ассоциированные с нарушением фармакологического ответа на клопидогрел**

Nongenetic / Негенетические	Genetic / Генетические
I. Clinical and demographic / Клинико-демографические:	I. Gene polymorphisms / Полиморфизмы генов:
1. Age / Возраст	1. CYP2C19
2. Renal failure / Почечная недостаточность	2. CYP2C9
3. Gender / Пол	3. CYP3A4
4. Body mass index / Индекс массы тела	4. CYP3A5
5. Diabetes mellitus / Сахарный диабет	5. ABCB1
6. Systemic inflammation / Системное воспаление	6. ABCC3
7. Hematocrit / Гематокрит	7. ITGB3
8. Platelet count / Количество тромбоцитов	8. IRS-1
9. Fibrinogen level / Уровень фибриногена	9. P2Y12
10. Acute coronary syndrome / Острый коронарный синдром	10. PON-1
11. Low ejection fraction / Низкая фракция выброса	11. CYP4F2
12. Smoking / Курение	12. C5E1
13. Inadequate dose / Неадекватная доза	
II. Interaction with medications and herbs / Взаимодействие с лекарственными средствами и травами:	
1. Proton pump inhibitors / Ингибиторы протонной помпы	
2. Calcium-channel blockers / Блокаторы кальциевых каналов	
3. Statins / Статины	
4. Coumarin derivatives / Производные кумарина	
5. Ketoconazole / Кетоконазол	
6. Morphine / Морфин	
7. Rifampicine / Рифампицин	
8. Hypericum perforatum / Зверобой продырявленный	
III. Low treatment adherence / Низкая приверженность лечению	

## Material and methods

**Population.** The clinical part of the study (including estimation of platelets' functional activity) was conducted in Moscow city clinical hospital №1 and №7. Genotyping for *CYP2C19* and phenotyping for *CYP3A4* were performed in "Research Center for Evaluation of Medical Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation. The research protocol was approved by a local Ethics Committee.

**The inclusion criteria** were as follows: ACS with subsequent percutaneous coronary intervention (PCI); ASA intake in the loading dose of 300 mg and in the maintaining one of 100 mg, clopidogrel intake in the loading dose of 300 mg and in the maintaining one – 75 mg (11 patients were receiving 600 mg as the loading dose and 2 patients – 150 mg as the maintaining one); patient's written consent for participation in the study.

**Exclusion criteria** were as follows: individual ASA or clopidogrel intolerance, active bleeding, major trauma or surgical interventions during the last month, severe renal and liver failure.

A total of 81 patients with ACS and subsequent PCI (64 males) were enrolled into the study. All the patients were prescribed DAT: ASA in the loading dose of 300 mg and maintaining dose of 100 mg, clopidogrel in the loading dose of 300 mg and in the maintaining one – 75 mg (11 patients received 600 mg

Целью нашего исследования является оценка влияния метаболической активности изофермента *CYP3A4*, полиморфных маркеров гена *CYP2C19*, а также различных клинико-демографических и лабораторно-инструментальных факторов на функциональную активность тромбоцитов.

## Материал и методы

**Популяция.** Клиническая часть исследования (включая оценку функциональной активности тромбоцитов) проводилась на базе ГКБ №1 и ГКБ №7 города Москвы. Генотипирование по *CYP2C19* и фенотипирование по *CYP3A4* проводились на базе ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. Протокол исследования был одобрен локальным Этическим комитетом.

**Критерии включения:** ОКС с последующим чрескожным коронарным вмешательством (ЧКВ); прием АСК в дозе 300 мг – нагрузочная и 100 мг – поддерживающая; клопидогрел в дозе 300 мг – нагрузочная, 75 мг – поддерживающая (11 пациентов получали нагрузочную дозу – 600 мг и 2 пациента поддерживающую дозу – 150 мг); письменное согласие пациента на участие в исследовании.

**Критерии исключения:** индивидуальная непереносимость АСК или клопидогрела, активное кровотечение, обширные травмы и операции за последний месяц, тяжелая почечная и печеночная недостаточность.

В исследование включен 81 пациент (64 мужчины и 17 женщин) с ОКС и последующим ЧКВ. Всем больным была

as the loading dose and 2 patients – 150 mg as the maintaining one). ACS with ST-segment elevation was diagnosed in 50 patients and ACS with no ST-segment elevation – in 31 patients.

Patient selection and biological material sampling were performed 2-5 days after the intervention. In patients receiving IIb-IIIa glycoprotein inhibitors platelet aggregation was evaluated no sooner than 5-6 days after cessation of intravenous administration of the drug. 77 patients had undergone coronary artery stenting, to 30 of them (38.9%) drug-eluting stents were implanted; mean number of stents for one patient was 1.13.

**Estimation of platelet aggregation.** Venous blood samples obtained no sooner than 24 hours after the PCI in 2 ml vacutainer tubes with 3.2% sodium citrate were used to estimate platelet functional activity.

The assessment of platelet on-treatment reactivity was carried out using a test-system for bed-side test of platelet activity – the VerifyNow P2Y<sub>12</sub> («Accumetrics», the USA). Platelets are activated due to ADP influence and interact with fibrinogen on microparticles in the solution. The more agglutination is expressed, the less an optical dense of the solution is. The blockade of the P2Y<sub>12</sub> receptors results in the absence of platelet activation and, consequently, of agglutination on microparticles. The level of platelet aggregation is expressed in units of the PRU reaction and in platelet inhibition percentage. The assessment was performed within one hour after venous blood collection.

**Identification of CYP2C19 gene polymorphisms.** Venous blood samples obtained on 2-5 day after the PCI in the VACUETTE® vacutainer tubes (Greiner Bio-One, Austria) with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were used for genotyping. Carriership of CYP2C19 polymorphisms was revealed by the method of polymerase chain reaction in real time (the Real-Time PCR) on the Applied Biosystems StepOne™ device (Life Technologies, the USA). The PCR sets “Clopidogrel 1” and “Clopidogrel 2” (“Litech”, Russia) were used for genotyping.

**Measurement of CYP3A4 isoenzyme metabolic activity.** 5 ml of patient's morning urine samples collected on 2-5 day in tubes without preserving additives were used as a material for the assay. 6-β-hydroxycortisol and cortisol levels were measured by the chromatography-mass spectrometry analysis on a high-performance liquid chromatograph – the Agilent G1978B Multimode Source for 6410 Triple Quade LC/MS (Agilent Technologies, Inc., USA). Metabolic activity of the CYP3A4 was estimated by urinary 6-OHC/FC ratio.

назначена ДАТ: АСК в дозе 300 мг – нагрузочная и 100 мг – поддерживающая; клопидогрел в дозе 300 мг – нагрузочная, 75 мг – поддерживающая (11 пациентов получали нагрузочную дозу – 600 мг и 2 пациента поддерживающую дозу – 150 мг). У 50 пациентов наблюдался ОКС с подъемом сегмента ST, и у 31 – ОКС без подъема сегмента ST.

Отбор пациентов и набор биологического материала осуществлялся на 2-5 день после вмешательства. У пациентов, получавших ингибиторы гликопротеина IIb-IIIa, агрегация оценивалась не ранее 5-6 дней после окончания внутривенного введения препарата. Стентирование коронарных артерий было выполнено 77 пациентам: 30 (38,9%) с лекарственным покрытием; среднее количество стентов на пациента – 1,13.

**Оценка агрегации тромбоцитов.** Для оценки функциональной активности тромбоцитов использовали венозную кровь, набранную не ранее 24 часов после ЧКВ в вакуумные пробирки объемом 2 мл с 3,2% цитратом натрия. Измерение остаточной реактивности тромбоцитов осуществлялось на тест-системе для прикроватной оценки активности тромбоцитов – VerifyNow P2Y<sub>12</sub> («Accumetrics», США). Тромбоциты под влиянием АДФ активируются и взаимодействуют с фибриногеном на микрочастицах в растворе. Чем больше выражена агглютинация, тем ниже оптическая плотность раствора. При блокаде P2Y<sub>12</sub> рецепторов активации тромбоцитов и, следовательно, агглютинации на микрочастицах, не происходит. Степень агрегации тромбоцитов выражается в единицах реакции PRU (P2Y<sub>12</sub> Reaction Units) и процентах ингибирования. Исследование проводилось в течение 1 часа после взятия образца цельной венозной крови.

**Определение полиморфизмов гена CYP2C19.** Для генотипирования использовали венозную кровь, собранную на 2-5 сутки после ЧКВ в вакуумные пробирки VACUETTE® (Greiner Bio-One, Австрия) с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА). Носительство полиморфных маркеров гена CYP2C19 выявлялось методом полимеразно-цепной реакции в реальном времени (Real-Time PCR) на приборе Applied Biosystems StepOne™ (Life Technologies, USA). При проведении генотипирования были использованы наборы для ПЦР реакции: «Клопидогрел 1» и «Клопидогрел 2» (ООО НПФ «Литех», Россия).

**Измерение метаболической активности изофермента CYP3A4.** Материал для исследования: 5 мл утренней мочи пациента, собранные на 2-5 день в пробирки без консерванта. Содержание 6-β-гидроксикортизола и кортизола определялось методом хромато-масс-спектрометрического анализа на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent G1978B Multimode Source for 6410 Triple Quade LC/MS (Agilent Technologies, Inc., USA). Метаболическая активность CYP3A4 оценивалась по отношению 6-ОНС/ФС в утренней моче.

**Статистическая обработка результатов.** Статистическая обработка результатов проводилась в SPSS Statistics 20.0.



**Statistical processing of the results.** Statistical processing of the results was performed using the Statistics 20.0 SPSS. Mean values are presented as  $M \pm SD$ , where M - Mean and SD - Standard Deviation. To estimate significance of differences between quantitative variables the one-way analysis of variance (ANOVA) was used. The influence of quantitative factors on platelet activity was estimated by the linear regression analysis. To determine distinctions in categorical variables the Pearson's chi-squared ( $\chi^2$ ) test was used. The influence of *CYP2C19* genotypes on platelet aggregation was assessed by the logistic regression method. Variables which revealed tendency to statistical significance of differences in groups of aggregation in variance analysis (heart rhythm disturbances, calcium channel blockers intake) were also included in a number of covariates. To check on compliance with the Hardy-Weinberg equilibrium the Fisher's exact test was applied. Differences with  $p < 0.05$  were regarded as significant.

## Results

Characteristics of the patients enrolled into the study are shown in Tables 2-4.

Linear regression analysis revealed that a smaller mean stent diameter slightly decreased the risk of high on-treatment platelet reactivity (HPR) (Table 5). Other quantitative clinical, demographic and laboratory parameters did not influence the risk of HPR occurrence (Table 2-4). Logistic regression analysis revealed significant increase in HPR risk in patients-carriers of *CYP2C19\*2* polymorphism (Table 5). The tendency of increasing HPR risk was also shown in those who were receiving calcium channel blockers or had different heart rhythm disturbances.

**Influence of *CYP2C19* gene polymorphism on platelet activity.** *CYP2C19* genotypes were distributed as follows: 68 (84.0%) patients had normal genotype (*CYP2C19\*1/\*1*) and 13 (16.0%) were the carriers of the allele associated with reduced metabolism (*CYP2C19\*1/\*2*) (Fig. 1). *CYP2C19\*2/\*2* genotype and *CYP2C19\*3* allelic variant were not revealed. Distribution of alleles and genotypes was in line with Hardy-Weinberg law ( $\chi^2=0.61$ ;  $p=0.43$ ). Patients non-responsive to clopidogrel ( $PRU > 208$ ) were significantly more often the *CYP2C19\*2* carriers: 36.8% vs 9.7% ( $p=0.01$ ) (Fig. 2). The mean platelet inhibition percentage was significantly higher in patients with no *CYP2C19\*2* as compared to the carriers of this allele:  $30.7 \pm 20.1$  in the group of the *CYP2C19\*1/\*1* vs  $18.2 \pm 16.4$  in the group of the *CYP2C19\*1/\*2* ( $p=0.03$ ) (Fig. 3). A share of patients with laboratory non-re-

Средние показатели представлены как  $M \pm SD$ , где M – среднее, SD – стандартное отклонение. Для оценки достоверности различий количественных показателей был применен однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Определение влияния количественных факторов на активность тромбоцитов проводилась при помощи линейного регрессионного анализа. Для установления различий категориальных показателей был применен критерий хи-квадрат Пирсона  $\chi^2$ . Влияния генотипов *CYP2C19* на агрегацию тромбоцитов оценивалось методом логистической регрессии; в число ковариат были также включены переменные, имеющие тенденцию к значимости различий между группами агрегации в вариационном анализе (нарушение ритма, прием блокаторов медленных кальциевых каналов). Для проверки соблюдения равновесия Харди-Вайнберга применялся точный критерий Фишера. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в табл. 2-4.

Линейный регрессионный анализ показал, что меньшее значение среднего диаметра стента незначительно снижает риск развития высокой остаточной реактивности тромбоцитов (ВОРТ) (табл. 5). Остальные количественные клинические, демографические и лабораторные показатели не влияли на риск развития ВОРТ (табл. 2-4). В результате логистического регрессионного анализа было выявлено значимое повышение риска развития ВОРТ у пациентов-носителей полиморфного маркера *CYP2C19\*2* (табл. 5), а также наблюдалась тенденция к повышению риска ВОРТ среди пациентов, принимающих блокаторы медленных кальциевых каналов, и имеющих различные виды нарушения ритма сердца.

**Влияние полиморфизма гена *CYP2C19* на активность тромбоцитов.** Распределение генотипов *CYP2C19*: 68 (84,0%) пациентов имели нормальный генотип (*CYP2C19\*1/\*1*) и 13 (16,0%) являлись носителями аллеля, связанного со сниженным метаболизмом (*CYP2C19\*1/\*2*) (рис. 1). Генотип *CYP2C19\*2/\*2* и аллельный вариант *CYP2C19\*3* обнаружены не были. Распределение аллелей и генотипов соответствовало закону Харди-Вайнберга ( $\chi^2=0,61$ ;  $p=0,43$ ). Носительство *CYP2C19\*2* значимо чаще встречалось в группе резистентных к клопидогрелу ( $PRU > 208$ ): 36,8% ( $n=7$ ) против 9,7% ( $n=6$ ;  $p=0,01$ ) (рис. 2). Средний процент ингибирования тромбоцитов был значительно выше у пациентов без *CYP2C19\*2* по сравнению с носителями данного аллеля:  $30,7 \pm 20,1$  в группе *CYP2C19\*1/\*1* против  $18,2 \pm 16,4$  в группе *CYP2C19\*1/\*2* ( $p=0,03$ ) (рис. 3). Доля пациентов с лабораторной резистентностью к клопидогрелу ( $PRU > 208$ ) оказалась выше среди носителей *CYP2C19\*2* по сравнению с пациентами без данного аллеля: 53,8% среди пациентов с генотипом *CYP2C19\*1/\*2* и 16,2% с генотипом *CYP2C19\*1/\*1* (от-

**Table 2. Clinical and demographic data**  
**Таблица 2. Клинико-демографические данные**

Parameters Параметры	All patients Все пациенты	Patients with PRU<208 Пациенты с PRU<208	Patients with PRU>208 Пациенты с PRU>208	p
Age, years / Возраст, годы	63.9±10.9	63.2±11.0	66.2±10.4	0.265
Men / Число мужчин, n (%)	64 (79.0)	50 (80.6)	14 (73.7)	0.360
BMI, kg/m <sup>2</sup> / ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	27.8±3.1	28.0±3.2	27.8±3.1	0.361
<b>Diagnosis / Диагноз</b>				
Unstable angina pectoris / Нестабильная стенокардия, n (%)	10 (12.3)	9 (14.5)	1 (5.3)	
Q-wave myocardial infarction Q-образующий инфаркт миокарда, n (%)	50 (61.7)	35 (56.5)	15 (78.9)	
Non-Q-wave myocardial infarction Не-Q-образующий инфаркт миокарда, n (%)	17 (21.0)	14 (22.6)	3 (15.8)	0.290
Unspecified myocardial infarction Инфаркт миокарда неуточненный, n (%)	4 (4.9)	4 (6.5)	0 (0.0)	
<b>Risk factors / Факторы риска</b>				
Type 2 diabetes mellitus / Сахарный диабет 2 тип, n (%)	16 (19.8)	12 (19.4)	4 (21.1)	0.552
Arterial hypertension / Артериальная гипертония, n (%)	75 (92.5)	58 (95.1)	17 (89.5)	0.340
Anemia / Анемия, n (%)	4 (4.9)	4 (6.5)	0 (0.0)	0.335
Active smoking / Активное курение, n (%)	17 (21.5)	20 (0.0)	5 (26.3)	0.385
Myocardial infarction / Инфаркт миокарда, n (%)	14 (17.2)	8 (12.9)	6 (31.5)	0.497
Ischemic stroke / Ишемический инсульт, n (%)	5 (6.2)	4 (6.5)	1 (5.6)	0.686
FC II-III CHF / ХСН II-III ФК, n (%)	3 (3.7)	1 (1.6)	2 (10.5)	0.136
Heart rhythm disturbances, n (%) / Нарушения ритма, n (%)	8 (9.9)	4 (6.5)	4 (21.1)	0.083
Previous PCI / Выполненное ЧКВ, n (%)	12 (14.8)	8 (12.9)	4 (21.1)	0.295
PRU - P2Y <sub>12</sub> Reaction Units; FC – functional class; CHF – chronic heart failure; PCI – percutaneous coronary intervention; BMI – body mass index				
PRU – единицы реакции тромбоцитов (P2Y <sub>12</sub> Reaction Units); ФК – функциональный класс; ХСН – хроническая сердечная недостаточность; ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство; ИМТ – индекс массы тела				

sponsiveness to clopidogrel was higher among the *CYP2C19*\*2 carriers as compared to non-carriers: 53.8% among the *CYP2C19*\*1/\*2 patients and 16.2% - in those with the *CYP2C19*\*1/\*1 genotype (odds ratio [OR]=1.8; 95% confidence interval [95% CI]: 1.0–3.2; p=0.0067). Carriership of *CYP2C19*\*2 responsible for hypometabolism irrespectively increased the HPR risk (OR=4.3; 95% CI: 1.3–17.6; p=0.022).

**Estimation of CYP3A4 metabolic activity influence on platelet activity.** According to linear regression analysis results the levels of 6- -hydrocortizol, cortizol and their ratio did not significantly influence the HPR. No significant distinctions with respect to urinary 6-ОНС/FC ratio (the marker of CYP3A4 activity) were found: 3.4±2.8 in the group of PRU>208 and 3.2±3.0 in the group of PRU<208 (p=0.8) (Fig.4). Moreover, we revealed no significant correlation between platelet activity and 6-ОНС/FC ratio (p=0,849).

## Discussion

Previous studies have proved the association of HPR with ischemic complications in patients with is-

ношение шансов [ОШ]=1,8; 95% доверительный интервал [95% ДИ]: 1,0-3,2; p=0,0067). Носительство аллеля, ответственного за сниженный метаболизм *CYP2C19*\*2, независимо повышало риск развития ВОПТ (ОШ=4,3; 95% ДИ: 1,3-17,6; p=0,022).

**Оценка влияния метаболической активности CYP3A4 на активность тромбоцитов.** По результатам линейного регрессионного анализа, достоверного влияния уровня 6-β-гидрокортизола, кортизола, а также их соотношения на ВОПТ не обнаружено. Не наблюдалось и значимых различий по показателю 6-ОНС/FC в утренней моче (маркер активности CYP3A4): 3,4±2,8 в группе PRU>208 и 3,2±3,0 в группе PRU<208 (p=0,8) (рис. 4). Кроме того, не было отмечено статистически значимой корреляции между активностью тромбоцитов и отношением 6-ОНС/FC (p=0,849).

## Обсуждение

В проведенных ранее исследованиях была доказана ассоциация ВОПТ с развитием ишемических осложнений у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) [15-17]. Так, в многоцентровом регистре ADAPT-DES (Assessment of Dual AntiPlatelet Therapy with Drug Eluting Stents) [18] с участием 8583 пациентов с ИБС, подвергнутых ЧКВ (50% с

**Table 3. Angiographic data**

**Таблица 3. Ангиографические данные**

Parameters Параметры	All patients Все пациенты	Patients with PRU<208 Пациенты с PRU<208	Patients with PRU>208 Пациенты с PRU>208	p
Single-vessel disease / Поражен 1 сосуд, n (%)	70 (86.4)	53 (85.5)	17 (89.5)	0,508
Two-vessel disease / Поражено 2 сосуда, n (%)	7 (8.6)	5 (8.1)	2 (10.5)	
Three-vessel disease / Поражено 3 сосуда, n (%)	4 (4.9)	4 (6.5)	0 (0.0)	
Left main coronary artery / Ствол левой коронарной артерии, n (%)	4 (4.9)	4 (6.5)	0 (0.0)	0.335
Circumflex artery / Огибающая артерия, n (%)	27 (34.2)	22 (36.7)	5 (26.3)	0.295
Right coronary artery / Правая коронарная артерия, n (%)	23 (28.3)	15 (24.6)	8 (42.1)	0.115
Obtuse marginal artery / Артерия тупого края, n (%)	4 (4.9)	3 (4.8)	1 (5.3)	0.665
Anterior descending artery / Передняя нисходящая артерия, n (%)	39 (49.4)	32 (53.3)	7 (36.8)	0.161
Stent thrombosis / Тромбоз стента, n (%)	2 (2.5)	1 (1.7)	1 (5.3)	0.416
Drug-eluting stents / Стенты с лекарственным покрытием, n (%)	30 (38.9)	25 (43.1)	5 (26.3)	0.331
Stent mean diameter, mm / Средний диаметр стента, мм	2.75±6.8	2.6±0.8	3.0±0.3	0.049
Mean overall stent length for a patient, mm Средняя суммарная длина стентов на пациента, мм	25.5±5.1	26.3 (10.9)	22.7 (6.4)	0.178
1 stent deployment / Установлен 1 стент, n (%)	67 (82.7)	50 (86.2)	17 (89.4)	0.489
2 stents deployment / Установлено 2 стента, n (%)	10 (12.3)	8 (13.7)	2 (10.5)	
PRU - P2Y <sub>12</sub> Reaction Units PRU – единицы реакции тромбоцитов (P2Y <sub>12</sub> Reaction Units)				

**Table 4. Laboratory and instrumental parameters and medical co-therapy 2-5 days after PCI**

**Таблица 4. Лабораторно-инструментальные показатели и сопутствующая медикаментозная терапия через 2-5 дней после ЧКВ**

Parameters Параметры	All patients Все пациенты	Patients with PRU<208 Пациенты с PRU<208	Patients with PRU>208 Пациенты с PRU>208	p
Left ventricle ejection fraction Фракция выброса левого желудочка, %	48.8±8.8	48.8±9.1	49.0±8.2	0.922
Left ventricle aneurism / Аневризма левого желудочка, n (%)	8 (10.0)	7 (11.3)	1 (5.3)	0.396
White blood count, 10 <sup>9</sup> cell/l / Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> клеток /л	8.9±2.5	8.8±2.7	9.5±1.6	0.275
Platelet count, 10 <sup>9</sup> cell/l / Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> клеток /л	229.2±59.5	228.4±55.9	219±20.3	0.614
Hemoglobin, g/l / Гемоглобин, г/л	142.1±17.4	143.4±18.1	137±14.6	0.233
Total cholesterol, mmol/l / Общий холестерин, ммоль/л	5.1±1.1	5.2±1.2	4.9±1.1	0.415
LDL-C, mmol/l / ЛПНП, ммоль/л	2.8±1.2	2.88±1.1	2.8±1.0	0.810
Triglycerides, mmol/l / Триглицериды, ммоль/л	1.6±0.6	1.7±0.7	1.6±0.5	0.729
Creatinine, mcmol/l / Креатинин, мкмоль/л	105.1±20.3	104.9±21.2	105.8±17.9	0.862
Glucose, mmol/l / Глюкоза, ммоль/л	6.1±1.7	6.9±2.4	6.2±2.0	0.657
Hematocrit / Гематокрит, %	43±3.4	41.9±7.5	42.1±3.6	0.689
Calcium channel blockers / Блокаторы кальциевых каналов, n (%)	5 (6.2)	2 (3.2)	3 (15.8)	0.081
Diuretics / Диуретики, n (%)	22 (27.2)	17 (27.4)	5 (26.3)	0.588
Proton pump inhibitors / Ингибиторы протонной помпы, n (%)	80 (98.8)	62 (100)	18 (94.7)	0.235
Beta-adrenoblockers / Бета-адреноблокаторы, n (%)	71 (89.9)	54 (90.0)	17 (89.5)	0.621
ACE-inhibitors / Ингибиторы АПФ, n (%)	62 (76.5)	49 (79.0)	13 (68.4)	0.254
LDL-C – low-density lipoprotein cholesterol; ACE-inhibitors - angiotensin-converting-enzyme inhibitors ЛПНП – липопротеиды низкой плотности; ингибиторы АПФ – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента				

chemic heart disease (IHD) [15-17]. So, the multi-center ADAPT-DES register of 8583 IHD patients undergoing PCI (50% with ACS) has shown that HPR development on clopidogrel treatment (PRU>208; method: VerifyNow) was irrespectively associated

ОК), было выявлено, что развитие ВОПТ на терапии клопидогрелом (PRU>208; метод: VerifyNow) независимо ассоциировано с трехкратным повышением риска вероятно-определенного тромбоза стента как в первые 30 дней (ОШ: 3,00; 95% ДИ: 1,39-6,49; p=0,005), так и инфарк-

Table 5. High on-treatment platelet reactivity predictors

Таблица 5. Предикторы высокой остаточной реактивности тромбоцитов

Factors / Факторы	Odds ratio Отношение шансов	95% confidence interval 95% Доверительный интервал	p
CYP2C19*2	4.365	1.248-17.673	0.022
Mean stent diameter / Средний диаметр стента	0.219	0.002-0.229	0.049

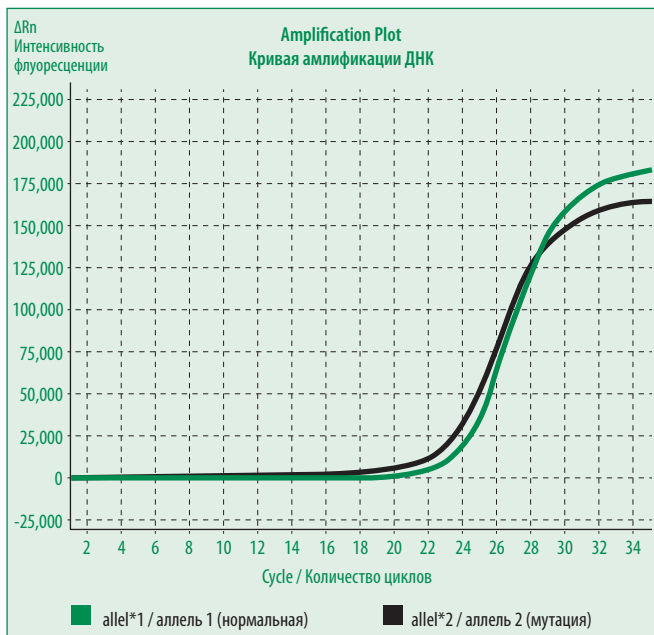


Figure 1. The Real-Time PCR results of the patient D.M. with the CYP2C19\*1/\*2 genotype

Рисунок 1. Результат ПЦР в реальном времени пациента Д.М. с генотипом CYP2C19\*1/\*2

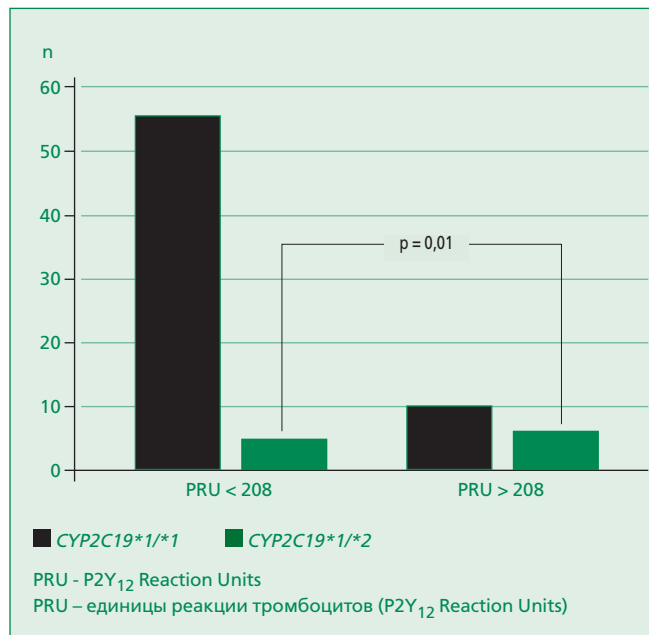


Figure 2. CYP2C19\*2 carriership influence on the absolute platelet reactivity

Рисунок 2. Влияние носительства CYP2C19\*2 на абсолютную реактивность тромбоцитов

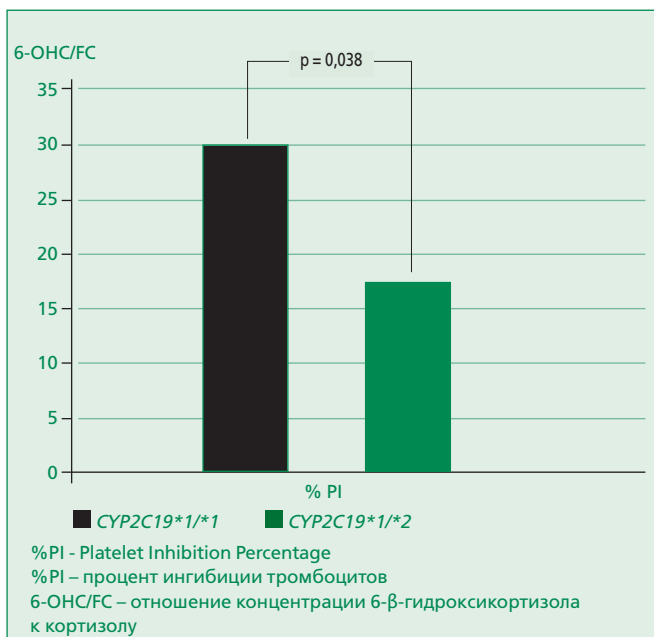


Figure 3. CYP2C19\*2 carriership influence on mean platelet inhibition percentage

Рисунок 3. Влияние носительства CYP2C19\*2 на средний процент ингибирования тромбоцитов

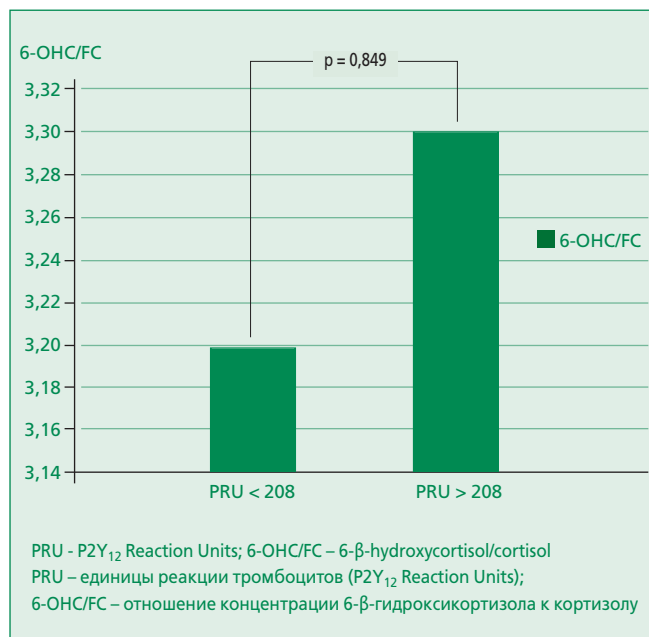


Figure 4. Influence of the index of CYP3A4 metabolic activity on platelet aggregation

Рисунок 4. Влияние показателя метаболической активности CYP3A4 на активность тромбоцитов



with three-fold increase both in the risk of probable/definite stent thrombosis in the first 30 days (OR: 3.00; 95% CI: 1.39–6.49;  $p=0.005$ ) and of myocardial infarction (MI) and stent thrombosis a year after the intervention: (OR: 2.49; 95% CI: 1.43–4.31;  $p=0.001$ ) and (OR: 1.42; 95% CI: 1.09–1.86;  $p=0.01$ ) respectively. Independent meta-analyses have also confirmed significant increase in the risks of MI, stent thrombosis and cardiovascular death [19,20]. According to the guidelines of the European Society of Cardiology the assessment of platelet functional activity is indicated for ACS patients at a high risk for stent thrombosis: left main coronary artery (LMCA) lesion, history of stent thrombosis, thrombosis of an only patent artery, multivascular lesion [21]. So, it is important to additive determine different clinical, demographic, laboratory and genetic factors influencing platelet activity to detect predictors of clopidogrel non-responsiveness. Our study revealed no significant impact of any clinical, demographic, laboratory and instrumental factors on the risk of clopidogrel non-responsiveness development. Insufficient sample size is a possible reason for this result. Mean stent diameter was the only angiographic index which significantly influenced HPR risk ( $p=0.049$ ). At that carriership of the *CYP2C19\*2* allele significantly several times increased the risk of HPR development ( $p=0.022$ ). This is in line with the literature data. For example, Mega et al. in a well-known meta-analysis of 9685 patients (PCI – 91%, ACS – 55%) [22] demonstrated significant increase in the risk of composite endpoint (cardiovascular death, myocardial infarction or stroke) in carriers of *CYP2C19* alleles encoding enzyme with reduced function (OR=1.76; 95% CI: 1.24–2.50;  $p=0.002$ ). According to guidelines of the International Pharmacogenetics Implementation Consortium in patients with revealed *CYP2C19* gene alleles P2Y<sub>12</sub>-receptors blockers, that are not metabolized by P450C19 (ticagrelor, prasugrel), should be recommended, [23], at that genotyping for P2Y<sub>12</sub>-receptors blockers selection is not indicated for everyone, but first of all, for patients at a high risk for stent thrombosis (grade of recommendation IIB [4,24,25]): interventions on unprotected left main coronary artery (LMCA), stenosis of LMCA bifurcation, stenosis of the only patent coronary artery, repeated PCI. The influence of new genetic markers on platelet functional activity is being extensively studied. So, V. Tatarunas et al. studied the effect of *CYP4F2* gene polymorphisms on the platelet activity in 89 IHD patients receiving clopidogrel as a part of DAT: patients with GA genotype for polymorphic marker *CYP4F2 G1347A* had significantly higher platelet aggregation level as

та миокарда (ИМ) и тромбоз стента через год после вмешательства (ОШ: 2,49; 95% ДИ: 1,43-4,31;  $p=0,001$ ) и (ОШ: 1,42; 95% ДИ: 1,09-1,86;  $p=0,01$ ) соответственно. Достоверное повышение риска ИМ, тромбоз стента и смерти от сердечно-сосудистых причин также подтверждено результатами независимых мета-анализов [19, 20]. Согласно рекомендациям экспертов Европейского общества кардиологов оценка функциональной активности тромбоцитов показана прежде всего пациентам с ОКС, имеющим высокий риск тромбоза стента: поражение ствола левой коронарной артерии, тромбоз стента в анамнезе, тромбоз единственной проходимой артерии, многососудистое поражение [21]. Таким образом, чрезвычайно важно установить различные клинико-демографические, лабораторные и генетические факторы, влияющие на активность тромбоцитов, с целью выявления предикторов резистентности к клопидогрелу. В проведенном нами исследовании достоверного влияния различных клинико-демографических и лабораторно-инструментальных факторов на риск развития резистентности к клопидогрелу обнаружено не было. Возможной причиной такого результата является недостаточный объем выборки. Единственным ангиографическим показателем, достоверно влияющим на риск развития ВОПТ, оказался средний диаметр стента ( $p=0,049$ ). Вместе с тем, носительство аллеля *CYP2C19\*2* достоверно повышало в несколько раз риск развития высокой остаточной реактивности тромбоцитов ( $p=0,022$ ). В этом наши результаты согласуются с литературными данными. Например, в известном мета-анализе Мега и соавт. [22] с включением 9685 пациентов (ЧКВ – 91%, ОКС – 55%) продемонстрировано значительное повышение риска комбинированной конечной точки в виде сердечно-сосудистой смерти, инфаркта миокарда или инсульта у носителей аллелей *CYP2C19*, кодирующих фермент со сниженной функциональной активностью (ОШ=1,76; 95% ДИ: 1,24-2,50;  $p=0,002$ ). Согласно рекомендациям международного консорциума по внедрению фармакогенетики при выявлении у пациента аллель гена *CYP2C19* рекомендуется назначение блокатора P2Y<sub>12</sub>-рецепторов, не метаболизирующегося изоферментом P450C19 (тикагрелор, прасугрел) [23], при этом генотипирование для выбора блокатора P2Y<sub>12</sub>-рецепторов показано не всем пациентам, а, прежде всего, имеющим высокий риск тромбоза стента (класс рекомендаций IIB [4, 24, 25]): вмешательства на незащищенном стволе левой коронарной артерии (ЛКА), бифуркационный стеноз ствола ЛКА, стеноз единственной проходимой коронарной артерии, повторные ЧКВ. Активно изучается и влияние новых генетических маркеров на функциональную активность тромбоцитов. Так, в исследовании V. Tatarunas и соавт. среди 89 больных ИБС, получающих клопидогрел в составе ДАТ, было изучено влияние полиморфизма гена *CYP4F2* на активность тромбоцитов: пациенты с генотипом GA по полиморфному маркеру *CYP4F2 G1347A* имели достоверно более высокий уровень агрегации тромбоцитов

compared with the carriers of GG ( $p=0.04$ ) or AA ( $p=0.01$ ) genotypes [26].

**Russian studies experience.** While discussing the issue of clopidogrel resistance it is necessary to mention one of the first full-value studies on this problem conducted by V.A. Sulimov et al in Russian Federation [27]. The study included 100 patients (74 males) with angina pectoris of functional class II-IV and mean age 61 (40-79) years. The main results of this research related to the aspects studied in our trial are listed below: 1) incidence rate of clopidogrel in standard dose non-responsiveness was 56%; 2) such factors as diabetes mellitus, obesity, omeprazol intake and angina pectoris functional class significantly influenced the development of non-responsiveness. Unlike V.A. Sulimov's et al research our study included patients with ACS, and the primary goal was to estimate the influence of CYP3A4 metabolic activity and CYP2C19 polymorphisms on platelet functional activity. Contribution of genetic factors to clinical and laboratory clopidogrel non-responsiveness was studied in some other more recent studies that revealed similar data with some limitations (A.L. Komarov, 2012 [28]; E.Z. Goluhova, 2014 [29]; A.V. Mazurov, 2014 [30]). The study of Komarov A.L. et al demonstrated that male sex, low ejection fraction, multivascular lesion of coronary arteries, the ABCB1 C3435T polymorphism and proton pump inhibitors intake significantly increase the risk of clopidogrel non-responsiveness. Carrier-ship of CYP2C19\*2 allelic variant in homozygous state 2.4-times increased the risk of thrombotic cardiovascular complications (95% CI=1.2-4.9;  $p=0.01$ ) [28].

Our study was the first to assess the influence of CYP3A4 isoenzyme metabolic activity on platelet functional activity in ACS patient undergoing PCI on dual antiplatelet therapy. According to the study data there was no significant association between the CYP3A4 isoenzyme activity and platelet on-treatment reactivity. This may be a result (1) of inadequacy of the method for CYP3A4 metabolic activity estimation [31] due to significant variability of cortisol and its metabolites levels in urine as well as (2) of relatively small sample size.

## Conclusion

CYP2C19\*2 carriership in ACS patients subjected to PCI significantly increases the risk of clopidogrel resistance (high on-treatment platelet reactivity). Urinary 6-OHC/FC ratio used as a marker of CYP3A4 isoenzyme activity does not correlate with platelet functional activity.

по сравнению с носителями генотипа GG ( $p=0,04$ ) или AA ( $p=0,01$ ) [26].

**Опыт российских исследований.** Раскрывая различные аспекты проблемы резистентности к клопидогрелу, необходимо упомянуть одно из первых полноценных исследований по данной проблеме в Российской Федерации, проведенное В.А. Сулимовым и соавт. [27]. Приведем основные результаты данного исследования (100 пациентов со стенокардией напряжения II-IV функционального класса, 74 мужчины, средний возраст 61 (40-79) лет), имеющие отношение к аспектам, изучаемым в проведенном нами исследовании: 1) частота резистентности к клопидогрелу в стандартной дозе составила 56%; 2) на развитие резистентности значимо влияли такие факторы, как сахарный диабет, ожирение, прием омепразола и функциональный класс стенокардии. В отличие от работы В.А. Сулимова и соавт., в нашем исследовании участвовали больные с ОКС, и основной целью являлась оценка влияния метаболической активности изофермента CYP3A4 и полиморфных маркеров гена CYP2C19 на функциональную активность тромбоцитов. Вклад генетических факторов в развитии лабораторной и клинической резистентности к клопидогрелу изучался в ряде других, более поздних исследований, где получены схожие данные, с некоторыми ограничениями (А.Л. Комаров, 2012 [28]; Е.З. Голухова, 2014 [29]; А.В. Мазуров, 2014 [30]). В исследовании Комарова А.Л., и соавт. было продемонстрировано, что мужской пол, низкая фракция выброса, многососудистое поражение коронарного русла, полиморфизм ABCB1 C3435T и прием ингибиторов протонного насоса достоверно повышают риск развития резистентности к клопидогрелу. Носительство аллельного варианта CYP2C19\*2 в гомозиготном состоянии повышает риск тромботических осложнений сердечно-сосудистой системы в 2,4 раза (95% ДИ=1,2-4,9;  $p=0,01$ ) [28].

В нашем исследовании впервые изучалось влияние метаболической активности изофермента CYP3A4 на функциональную активность тромбоцитов на фоне ДАТ терапии у пациентов с ОКС, перенесших ЧКВ. По результатам исследования статистически значимой ассоциации между активностью изофермента CYP3A4 и остаточной реактивностью тромбоцитов не обнаружено. Причиной этого может послужить (1) несовершенство метода оценки метаболической активности CYP3A4 [31] из-за значительной вариабельности уровня кортизола и его метаболитов в моче, а также (2) относительно небольшое число пациентов, включенных в исследование.

## Заключение

Носительство CYP2C19\*2 у пациентов с ОКС, подвергнутых ЧКВ, значимо повышает риск развития резистентности (высокой остаточной реактивности тромбоцитов) к клопидогрелу. Отношение 6-ОНС/FC в утренней моче, используемое в качестве маркера активности изофермента CYP3A4, не коррелирует с функциональной активностью тромбоцитов.

**Disclosures.** All authors disclose that have no potential conflict of interest regarding the content of this paper.

**Конфликт интересов.** Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## References / Литература

1. Ruggeri Z.M., Platelets in atherothrombosis, *Nature Med.* 2002;8:1227-34.
2. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, et al. ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2013;34(38):2949-3003.
3. Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2012;33(20):2569-619.
4. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, 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(23):2999-3054.
5. Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, et al. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation. *JAMA* 2010;303(8):754-762.
6. Elsenberg EH, van Werkum JW, van de Wal RM, et al. The influence of clinical characteristics, laboratory and inflammatory markers on 'high on-treatment platelet reactivity' as measured with different platelet function tests. *Thromb Haemost* 2009;102:719-27.
7. Voisin S1, Bongard V, Tidjane MA, et al. Are P2Y12 reaction unit (PRU) and % inhibition index equivalent for the expression of P2Y12 inhibition by the VerifyNow assay? Role of haematocrit and haemoglobin levels. *Thromb Haemost* 2011;106(2):227-9.
8. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, et al. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003; 107: 2908-2913.
9. Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, et al. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 246-251.
10. Savi P, Herbert JM, Pflieger AM, et al. Importance of hepatic metabolism in the antiaggregating activity of the thienopyridine clopidogrel. *Biochem Pharmacol.* 1992;44(3):527-32.
11. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, et al. 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;38:92-9.
12. Beitelshoes AL, Horenstein RB, Vesely MR, Mehra MR, Shuldiner AR. Pharmacogenetics and clopidogrel response in patients undergoing percutaneous coronary interventions. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89:455-9.
13. Lamba JK, Lin YS, Thummel K, Daly A, et al. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics* 2002;12:121-32.
14. Mičuda S, Šišpera L, Hodač M, et al. Diurnal Variation of 6β-Hydroxycortisol in Cardiac Patients. *Physiol Res* 2007; 56: 307-313.
15. Angiolillo DJ, Bernardo E, Sabate M, et al. Impact of platelet reactivity on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50: 1541-1547.
16. Sibbing D, Braun S, Morath T, Mehili J, Vogt W, Schomig A et al. 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.
17. Pettersen AA, Seljeflot I, Abdelnoor M, et al. High on aspirin platelet reactivity and clinical outcome in patients with stable coronary artery disease: results from ASCET (Aspirin Nonresponsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial). *J Am Heart Assoc.* 2012;1:e000703
18. Stone GW, Witztzenbichler B, Weisz G, et al. Platelet reactivity and clinical outcomes after coronary artery implantation of drug-eluting stents (ADAPT-DES): a prospective multicentre registry study. *Lancet* 2013;382: 614-23.
19. Soffi F, Marcucci R, Gori AM, Giusti B, Abbate R, Gensini GF. Clopidogrel non-responsiveness and risk of cardiovascular morbidity. An updated meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2010;103(4):841-848.
20. Aradi D, Komócsi A, Vorobcsuk A, et al. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis. *Am Heart J.* 2010;160(3):543-551.
21. Aradi D, Storey RF, Komócsi A, Trenk D, Gulba D, Kiss RG et al. Expert position paper on the role of platelet function testing in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2014;35(4):209-215.
22. Mega JL, Simon T, Collet JP, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA* 2010;304(16):1821-30.
23. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(3):317-23.
24. Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, et al. 2011 ACCF/AHA/SCAI guideline for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:e44-122.
25. Jneid H, Anderson JL, Wright RS, et al. 2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/non-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* 2012;60:645-81.
26. Tatarunas V, Jankauskiene L, Kupstyte N, et al. The role of clinical parameters and of CYP2C19 G681 and CYP4F2 G1347A polymorphisms on platelet reactivity during dual antiplatelet therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014;25(4):369-74.
27. Sulimov V.A., Moroz E.V. Resistance to antiplatelet drugs (aspirin, clopidogrel) in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. *Rational Pharmacother. Card.* 2012;8(1):23-30. Russian (Сулимов В.А., Мороз Е.В. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам (аспирину, клопидогрелу) у пациентов, подвергающихся элективному стентированию коронарных артерий. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии* 2012;8(1):23-30.)
28. Komarov A.L., Shahmatova O.O., Iljushenko T.A., et al. Assessing Risk of Cardiovascular Events in Clopidogrel-Treated Patients with Stable CHD: Platelet Function or Genetic Testing? *Doktor.Ru* 2012; 6:11-19. Russian (Комаров А.Л., Шахматова О.О., Илющенко Т.А., и др. Оценка риска сердечно-сосудистых осложнений у больных стабильной ИБС, получающих клопидогрел: функция тромбоцитов или генетические исследования? *Доктор.Ру* 2012; 6:11-19)
29. Goluhova E.Z., Grigorjan M.V., Rjabinina M.N., et al. The platelet reactivity after percutaneous coronary intervention in patients with double antiplatelet therapy: impact of genetic polymorphisms. *Kreativnaja kardiologija* 2014; 3:39-52. Russian (Голухова Е.З., Григорян М.В., Рябинина М.Н., и др. Современные аспекты фармакогенетики клопидогрела и его клиническое значение. *Креативная кардиология* 2014; 3:39-52.)
30. Mazurov A.V., Zjurjaev I.T., Haspekova S.G., et al. Factors influencing platelet aggregation in patients with acute coronary syndrome. *Terapevticheskij arhiv* 2014; 9:83-89. Russian (Мазуров А.В., Зюряев И.Т., Хаспекова С.Г., и др. Факторы, влияющие на агрегационную активность тромбоцитов у больных с острым коронарным синдромом. *Терапевтический архив* 2014; 9:83-89.)
31. Hu ZY, Zhao YS, Wu D et al. Endogenous cortisol 6 beta-hydroxylation clearance is not an accurate probe for overall cytochrome P450 3A phenotyping in humans. *Clin Chim Acta* 2009;408(1-2): 92-7.

Received / Поступила: 22.06.2015  
Accepted / Принята в печать: 14.07.2015