

# **Trombocita aggregáció gátló kezelés hatékonyságának genetikai és metodikai aspektusai koronária intervención átesett betegek körében**

**Ph.D. tézis**

**Írta: Rideg Orsolya M.S.**

**Témavezetők:**

**Dr. Miseta Attila DSc., Ph.D.**

**és**

**Dr. Komócsi András Ph.D.**

**Programvezető:**

**Dr. Miseta Attila DSc., Ph.D.**

**Pécsi Tudományegyetem  
Klinikai Központ, Orvostudományi Kar  
Laboratóriumi Medicina Intézet**

**2011**

## **Bevezetés**

A kardiovaszkuláris megbetegedések (CAD) világszerte milliókat érintő, s a középkorú népesség vezető halálokaként számontartott igen heterogén, multifaktoriális háttérű betegségcsoport.

Az iszkémiás szívbetegség kezelésében lényegi áttörést a percután koronária intervenció (PCI) megjelenése és elterjedése jelentette. A módszer sikerei mellett azonban nem elhanyagolható, hogy a beavatkozásnak jelenleg is vannak mind rövid, mind hosszú távú korlátai. A stent implantáció sikertelenségének fő okai a stent trombózis (ST) és az instent restenózis (ISR), amelyek a tágított szakasz ismételt leszűkülését vagy elzáródását okozhatják. A trombocita aggregáció gátló (TAG) kezelés kulcsszerepet játszik a recidív ischémiás események megelőzésében. A TAG kezelés mellett észlelt egyének közti variabilitás és az ezzel kapcsolatos genetikai, környezeti, farmakokinetikai és klinikai háttér jelentőségét a közelmúlt számos vizsgálata vetette fel. Ugyanakkor a TAG hatékonyságát mérő módszerek standardizálásának hiánya több, a napi gyakorlatban történő alkalmazhatóságukkal kapcsolatos kételyt ébresztett. Figyelembe véve azokat az adatokat, amelyek szerint a szokásos gyógyszerelésre a betegeknél eltérő mértékű válasz figyelhető meg, valamint az egyénenként különböző vérzési rizikó tényét, jogosnak tűnik az egyén igényeihez adaptált individualizált kezelési algoritmusok kialakítása.

## **Koronária stent implantációt kiegészítő gyógyszerterápiás lehetőségek**

A trombociták arterotrombózis és arteroszklerózis kialakulásában betöltött szerepe alapvető, így a trombocita aktiváció és aggregáció megfelelő gyógyszeres szabályozása kulcsfontosságú a recidív trombotikus események kivédésében. Jelenleg, a koronária stent implantációt megelőző és az azt követő trombotikus események kivédésére 3 fő trombocita aggregáció gátló gyógyszercsoport használt: Glicoprotein -IIb/IIIa receptor (GP IIb/IIIa)

antagonisták, cyclooxygenáz-1 (COX-1) gátló aszpirin és ADP-receptor antagonisták.

Utóbbiak megjelenése, a trombocita aggregáció és stabil okkluzív trombus kivédésében jelentős terápiás előrelépést jelent. A napjainkban legelterjedtebben alkalmazott ADP-antagonista a clopidogrel, amely a citokróm P450 (CYP450) metabolizációt/aktivációt követően, irreverzibilisen s kovalensen kötődik a trombocita felszíni P2Y<sub>12</sub> ADP-receptoraihoz, ezzel gátolva az ADP-receptor-cAMP közvetítette trombocita aggregációs folyamatokat.

Az elmúlt évtized intenzív klinikai kutatásainak eredményeként bebizonyosodott, hogy koronária intervenciót (PCI) követően, az aszpirin monoterápiához képest, az aszpirin+ADP-receptor antagonistá kombinált trombocita aggregáció gátló kezelés (TAG) jelentősen, s eredményesebben csökkentette az iszkémiás szövődmények arányát.

### **Egyének közötti különbségek a clopidogrel-aszpirin kombinált trombocita aggregáció (TAG) kezelés hatékonyságában**

A clopidogrel-aszpirin kombinált TAG terápia alkalmazása bár jelentős előrelépést jelent a trombocita aggregáció szabályozásában, már az első nagy klinikai vizsgálatok eredményei igazolták, hogy a clopidogrel kezelés hatékonysága jelentős egyének közötti különbségeket mutat; fix-dózisú clopidogrel terápiára adott egyéni válasz eltérő.

Az eltérések háttere multifaktoriális, környezeti, klinikai és genetikai tényezők egyaránt befolyásolják. Különösen jelentősek a drog abszorpciót/transzportot befolyásoló, multidrog rezisztencia 1 gén (mdr1, ABCB1) C3435T és G2677T/A funkcionális polimorfizmusai; valamint a metabolizmust érintő CYP2C19 gén CYP2C19\*2,\*3 funkció-vesztő (LOF) és CYP2C19\*17 funkciónyerő (GOF) allélvariánsai. Ezek mellett az utóbbi időben, egyre több figyelem fordul a clopidogrel biotranszformációjának második lépését irányító

paraoxanase-1 (PON1) enzim Q192R allélvariánsának szerepére is. Mindazonáltal, az intenzív genetikai irányú vizsgálatok ellenére számos kérdés és ellentmondás vár továbbra is tisztázásra.

## **Célkitűzések**

Figyelembe véve az Európai és az Amerikai Kardiológiai Társaságok hivatalos ajánlását, a percután koronária intervenciót (PCI) követő trombotikus események megelőzésére, „first-line”, a kettős, clopidogrel-aszpirin trombocita aggregáció gátló kezelés javasolt.

Tekintettel a clopidogrel terápiát követő jelentős egyéni eltérésekre, a magas trombocita reaktivitás prognosztikai jelentőségével kapcsolatos bizonytalanságokra, értekezésünkben első célként a magas trombocita reaktivitás (HPR) prognosztikai jelentőségére vonatkozó ismeretek, szisztematikus irodalomkutatással történő feldolgozását tűztük ki.

A vizsgálati módszereket övező rendkívüli heterogenitás és az elégtelen standardizáció miatt, további célunk volt a trombocita aggregáció gátló kezelés hatékonyságát monitorozó konvencionális optikai aggregometria (OAG) és P2Y<sub>12</sub>-receptor specifikus, vasodilátor foszfoprotein foszforilációs (VASP-PRI) tesztek összevetése, stabil angina pectoris miatt percután koronária intervención átesett betegcsoportban, az alábbiak szerint:

- a különböző OAG paraméterek prediktív értékének jellemzésével,
- a két teszt által definiált/kategorizált HPR- tartományok jellemzésével.

További célunk volt a clopidogrel terápia hatékonyságát befolyásoló, főbb genetikai variációk vizsgálata, stabil angina pectoris miatt percután koronária intervención átesett betegekben. A genetikai analízis a következő génekre terjedt ki:

- CYP2C19\*2 és \*3 funkció-vesztő (LOF) és CYP2C19\*17 funkció-nyerő (GOF) allélvariánsok;

- multidrog rezisztencia 1 gén (mdr1, ABCB1) C3435T és G2677T/A polimorfizmusok;
- paraoxanase-1 gén (PON1) Q192R polimorfizmus.

## **Módszerek**

### **Optikai Aggregometria (OAG)**

A trombocita aggregációs méréseinkhez CARAT TX4 (Carat Diagnostics, Magyarország) típusú, 4 csatornás optikai aggregométert használtunk. A készülék kalibrálása trombocita-dús (PRP) (0% transzmisszió), valamint trombocita-szegény (PPP) (100% transzmisszió) plazmák alapján történt. A vizsgálatot 10ml, nátrium-citráttal (3,8%) alvadásgátolt vérből, mintavételt követő 2 órán belül végeztük el. A plazma PRP–PPP-frakcionálását követően, trombocita aggregáció stimulálására 5  $\mu$ M ADP-t használtunk. A trombocita reaktivitás mértékét maximális aggregációval ( $Agg_{max}$ ), 6 perces késői aggregációval ( $Agg_{late}$ ), görbe alatti terület nagyságával (AUC) és disaggregációval (disAgg) jellemeztük.

### **Vasodilator foszfoprotein foszforiláció (VASP-PRI) meghatározás flow cytometriával**

A vasodilator foszfoprotein (VASP) intracelluláris fehérje, a P2Y<sub>12</sub> ADP-receptorhoz kapcsolódva, cAMP kaszkádrendszer elemeként, a citoszkeleton szabályozásban, valamint GP IIb/IIIa receptor aktiválásában vesz részt. A P2Y<sub>12</sub>-receptor aktiválódását követően, az intracelluláris cAMP szint csökkenése a VASP defoszforilációját eredményezi. Ezzel szemben a P2Y<sub>12</sub>-receptor gátlása esetén az emelkedett cAMP szint hatására a VASP foszforilált formába kerül. Trombocita specifikus immunfluoreszcens technikával (Biocytex Platelet VASP Kit) elkülöníthető/mérhető a foszforilált, valamint

defoszforilált VASP aránya (VASP-PRI); értéke jól jellemzi az ADP-receptor aktiváltsági fokát, így a gátlószer hatékonyságának szelektív jellemzője. A módszer előnye a P2Y<sub>12</sub>-receptor specificitás.

### **ABCB1, CYP2C19 és PON1 gének funkcionálisan releváns genetikai variánsainak analízise**

A genetikai analízishez etilén-diamin-tertraecetsav (EDTA) alvadásgátolt vérből izolált DNS-t használtunk. A genotipizálást szekvencia specifikus - primerekkel és fluoreszcens próbákkal, 2.0 típusú LightCycler valós idejű PCR készülékkel végeztük. Kiértékeléshez a LightCycler PCR 4.05 olvadáspont elemző szoftvert használtuk.

### **Vizsgálati terv és beteganyag**

A metaanalízis során 2003. január és 2010. februárja között közölt megfigyeléses vizsgálatokat kerestünk, amelyek a klinikailag jelentős (magas) trombocita reaktivitást (HPR) vizsgálták adenosine diphosphate (ADP)-specifikus mérőmódszerek segítségével. Elsődleges végpontoknak a kardiovaszkuláris halálozást (CV), az igazolt/lehetséges stent trombózist (ST), a nem halálos kimenetelű myokardiális infarktust (MI) és összetett iszkémiás eseményeket (CIE) tekintettünk. Az elemzést generikus-inverz variancia súlyozás segítségével random-hatás modell szerint végeztük el.

Munkacsoportunk 2008 februárjában indította el prospektív, randomizált, kettős-vak, placebo-kontrolált, egy-centrumú klinikai vizsgálatát DOSER trial megjelöléssel (NCT006638326). A módszertani és a genetikai vizsgálatok ezen tanulmány részvizsgálatainak tekinthetők.

A tanulmányba 200, stabil angina pectoris miatt perkután koronária intervenció (PCI) átesett beteget vontunk be. A koronária intervenciót követő napon, majd ismételten a negyedik héten, ADP-specifikus optikai aggregometriával, valamint

VASP-PRI teszttel meghatároztuk a betegek trombocita reaktivitási értékét. Összesen, 121 beteg esetében tudunk mindkét módszerrel sikeres vizsgálatot végezni. A módszertani összehasonlító tanulmány ennek eredményeit dolgozza fel.

A genetikai vizsgálat során a kiindulási 200 főből, 189 betegnél végeztünk CYP2C19\*2, \*3, \*17 és paraoxanase 1 (PON1) Q192R allélvariancia analízist, míg multidrog rezisztencia 1 gén (ABCB1) C3435T és G2677T/A genotipizálás 181 esetben történt.

## **Statisztikai analízis**

Munkáink elemzéséhez a Review manager 5.0.22 és az „SPSSv11.0/Graphpad Prism 5.0 szoftvereket használtuk.

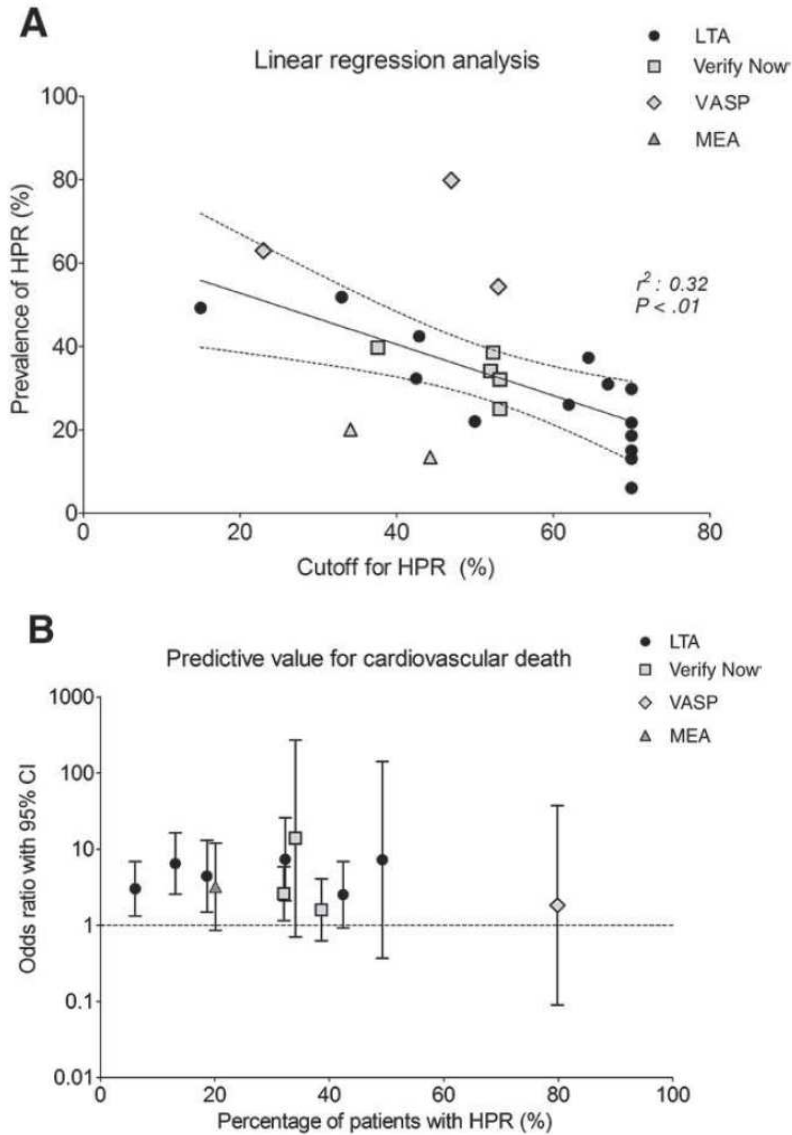
## **Eredmények**

*Magas trombocita reaktivitás klinikai jelentősége percután koronária intervenciót követően: szisztematikus irodalomkutatás és metaanalízis*

Az 1801 keresési találatból, húsz, összesen 9187 beteg, adatait tartalmazó tanulmány felelt meg a követelményeknek; amelyek a klinikailag jelentős trombocita reaktivitást (HPR) vizsgálták, ADP-specifikus mérőmódszer segítségével.

A húsz vizsgálatban a HPR mértéke jelentős heterogenitást mutatott, amelynek átlagos gyakorisága 32.3% volt.

A különböző tanulmányokban definiált trombocita reaktivitás küszöbérték és az alkalmazott mérőmódszer szignifikáns összefüggést mutatott a HPR gyakorisággal (Ábra 1.).



**Ábra 1. Metodikai heterogenitás hatása a trombocita aggregációs tesztekben.**

**A:** Lineáris regressziós analízis a választott küszöbérték és az észlelt magas trombocita reaktivitás (HPR) gyakorisága között.

**B:** A vizsgálatok során észlelt HPR gyakoriság és a HPR-hez kapcsolódó mortalitási rizikó összefüggése.

### **A magas trombocita reaktivitás prognosztikai jelentősége**

Összesített eredmények alapján a magas trombocita reaktivitás (HPR), a nem halálos kimenetelű MI tekintetében 3-szoros (OR: 3.00; 95%CI: 2.26-3.99;  $p < 0.00001$ ), az igazolt/lehetséges ST előfordulása esetén 4-szeres (OR: 4.14; 95%CI: 2.74-6.25;  $p < 0.0001$ ), míg az összetett iszkémiás események esetén 5-



szörös (OR: 4.95; 95%CI: 3.34-7.34;  $p < 0.00001$ ) rizikót jelent a normál trombocita reaktivitáshoz (NPR) képest.

A HPR küszöbértéket receiver operating characteristic (ROC)–analízissel meghatározó vizsgálatok alcsoport elemzése hasonló eredményeket adott (CV halálozás 2.34 [1.40-3.92], MI 2.89 [2.07-4.04], ST 4.75 [2.13-10.63], és összetett iszkémiás végpont (CIE): 3.06 [2.07- 4.51];  $P < 0.001$  minden esetben).

Bár jelentős heterogenitás mutatkozott mind a mérőmódszerek, mind az egyes módszerek által meghatározott HPR küszöbértékek tekintetében a fent leírt adatok kiugró heterogenitást nem mutattak. Szignifikáns heterogenitás csak a legkevésbé standardizált összetett iszkémiás végpontot jellemezte.

Az egyes vizsgálati módszerek egymástól független prediktív értékének elemzése során csak az optikai aggregometria (OAG) alapján meghatározott HPR értékek korreláltak szignifikánsan a CV halálozás, MI és ST klinikai végpontokkal (CV halálozás: 4.18 [2.70-6.46], MI: 2.93 [1.97-4.35], ST: 3.66 [2.32-5.78];  $P < 0.0001$  minden esetben). A VerifyNow P2Y<sub>12</sub> vizsgálat a CV halálozással és MI-val mutatott korrelációt (CV halál: 2.28 [1.23-4.25],  $P = 0.009$ ; MI: 2.98 [1.94-4.58],  $P < 0.00001$ ), míg a MEA<sub>ADP</sub> módszer a MI és a ST-val volt szignifikáns összefüggésben (MI: 4.03 [1.16-14.00],  $P = 0.03$ ; ST: 13.89 [2.63-73.45],  $P = 0.002$ ). További két kisebb vizsgálat elemzése nem igazolta a VASP-PRI teszt alapján definiált HPR-értékek prediktivitását sem a CV halálozás (1.84 [0.09-37.07],  $P = 0.69$ ), sem a ST (1.48 [0.28-7.77],  $P = 0.64$ ) vonatkozásában.

*Trombocita aggregáció gátló kezelés monitorozása: konvencionális optikai aggregometria versus vasodilátor stimulált foszfoprotein foszforilációs teszt*

### **Optikai aggregometria vizsgálati értékek összevetése a VASP-PRI teszt eredményeivel**

121 beteg OAG és VASP-PRI monitorozása során, a mért trombocita funkciós paraméterek, mind a clopidogrel telítő dózis beadását követően, mind a fenntartó fázist követően jelentős egyének közötti eltéréseket mutattak [telítő dózis:  $Agg_{max}$ :  $29.1 \pm 14.4$ ;  $Agg_{late}$ :  $9.4 \pm 18.7$ ;  $disAgg$ :  $71.5 \pm 32.4$ ; AUC:  $67.6 \pm 55.0$ ; VASP-PRI:  $48.3 \pm 21.3$ ] [fenntartó kezelés:  $Agg_{max}$ :  $29.6 \pm 12.7$ ;  $Agg_{late}$ :  $8.7 \pm 16.6$ ;  $disAgg$ :  $72.2 \pm 30.9$ ; AUC:  $67.7 \pm 49.3$ ; VASP-PRI:  $47.9 \pm 19.6$ ].

Az OAG mérések alapján az  $Agg_{max}$  és  $Agg_{late}$  eredmények erős korrelációja volt kimutatható ( $p < 0.001$ ; Spearman's  $\rho$ : 0.91).

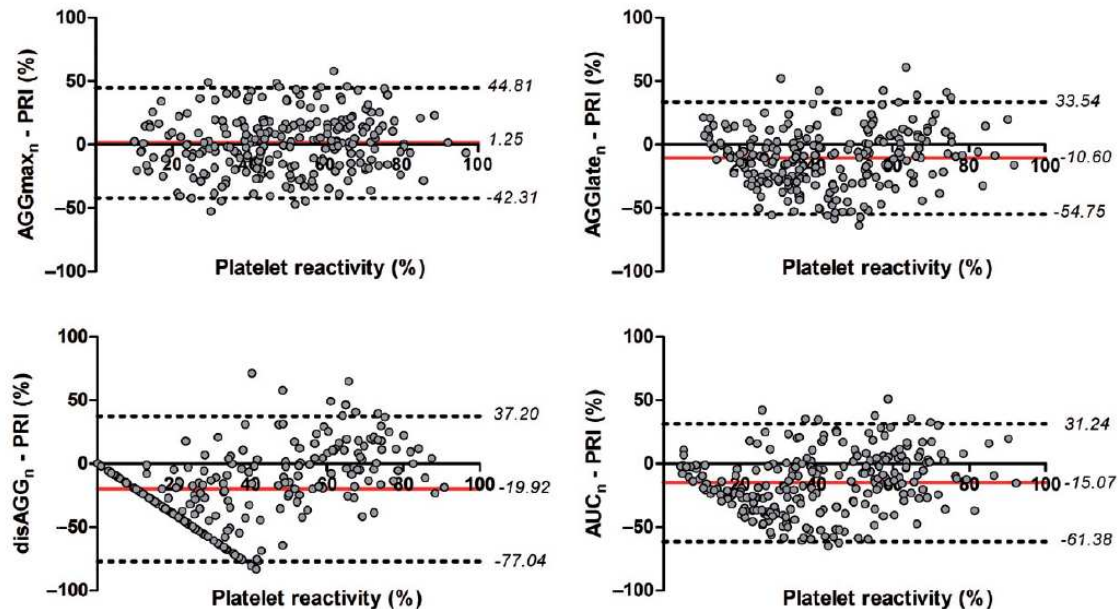
Az OAG mérési értékek a VASP-PRI teszt eredményeivel összevetve közepes erősségű, szignifikáns kapcsolatot mutattak, amely minden paraméter esetében megfigyelhetőek voltak ( $Agg_{max}$ :  $\rho = 0.47$ ;  $Agg_{late}$ :  $\rho = 0.45$ ;  $disAgg$ :  $\rho = -0.44$ ; AUC:  $\rho = 0.50$ ).

Az aszpirin terápia hatékonyságát jellemző adrenalin stimulált aggregációs értékek nem korreláltak a VASP-PRI eredményekkel ( $p = 0.75$ ;  $\rho = -0.24$ ).

Míg az egyváltozós lineáris regressziós analízis minden OAG paraméter esetében egyöntetűen szignifikáns kapcsolatot mutatott a VASP-PRI mérési eredményekkel, addig a többváltozós modell alapján az AUC volt a VASP-PRI teszt független prediktora.

A VASP-PRI és a különböző OAG paraméterek által meghatározott trombocita reaktivitási értékek egyénen belüli különbségeinek elemzése Bland-Altman analízissel történt (Ábra 2.). Eredmények szerint mind az  $Agg_{late}$ ,  $disAgg$  és AUC szisztémásan alábecsüli a VASP-PRI teszt által meghatározott trombocita reaktivitási értékeket (eltérés: -10.6, -19.9 és -15.1, sorban); ez alól kivétel az

Agg<sub>max</sub>, amely közel hasonlóan bizonyult (eltérés: 1.3). A két módszer által meghatározott értékek között, a betegek nagy százalékában jelentős egyéni belüli különbségek lehetnek (Ábra 2.).



Ábra 2. Bland-Altman diagramok a VASP-PRI teszt és az OAG által meghatározott trombotocita reaktivitás egyéni belüli különbségeinek jellemzésére.

A folytonos szürkevonallal a szisztémás hibahatárt mutatja; a szaggatott vonalak a 95%-os konfidencia-intervallumot mutatják. A választott aggregációs paramétereket a VASP-PRI skálájához normalizáltuk (0-100%).

### A különböző vizsgálati módszerek megfeleltethetősége a normal és magas trombotocita reaktivitás definiálásában

Az egyes aggregációs paraméterek prediktív értékét, a VASP-PRI teszttel meghatározott magas trombotocita reaktivitás (HPR) vonatkozásában ROC – analízissel értékeltük. Korábbi vizsgálatok eredménye alapján a HPR definíciója 50% feletti VASP-PRI volt. Az elemzés szerint az egyes aggregációs paraméterek prediktív értéke azonos volt, ugyanakkor a görbe alatti területtel jelzett prediktív érték az AUC esetében volt a legmagasabb.

Az OAG paraméterek optimális küszöbértékeinek meghatározását követően a két módszer által definiált magas és normal trombocita reaktivitási csoportok között szoros kapcsolat/átfedés volt.

Cut-off	HPR <sup>#</sup>	Specificity	Sensitivity	Concordant	Discordant	$\kappa$
AGG <sub>max</sub> >34.5%	39.3%	79.4%	61.3%	71.1%	28.9%	0.4 <sup>*</sup>
AGG <sub>late</sub> >12%	37.2%	83.2%	62.2%	73.1%	26.9%	0.45 <sup>*</sup>
disAGG >63.5%	37.6%	80.2%	63.1%	72.7%	27.3%	0.44 <sup>*</sup>
AUC >82 × min	39.7%	86.7%	60.8%	72.3%	27.7%	0.44 <sup>*</sup>

**Ábra 3. Az OAG paraméterek ROC-analízissel meghatározott normál és magas trombocita reaktivitási határértékei.**

*Trombocita aggregáció gátló kezelés hatékonyságát befolyásoló genetikai variánsok vizsgálata percután koronária intervención átesett betegek körében*

## Genetikai elemzések

Tanulmányunk során 200 betegből, 189 esetben végeztünk CYP2C19 és paraoxanase-1 (PON1) genetikai analízist, és 181 főnél multidrog rezisztencia 1 gén (ABCB1) genotipizálást.

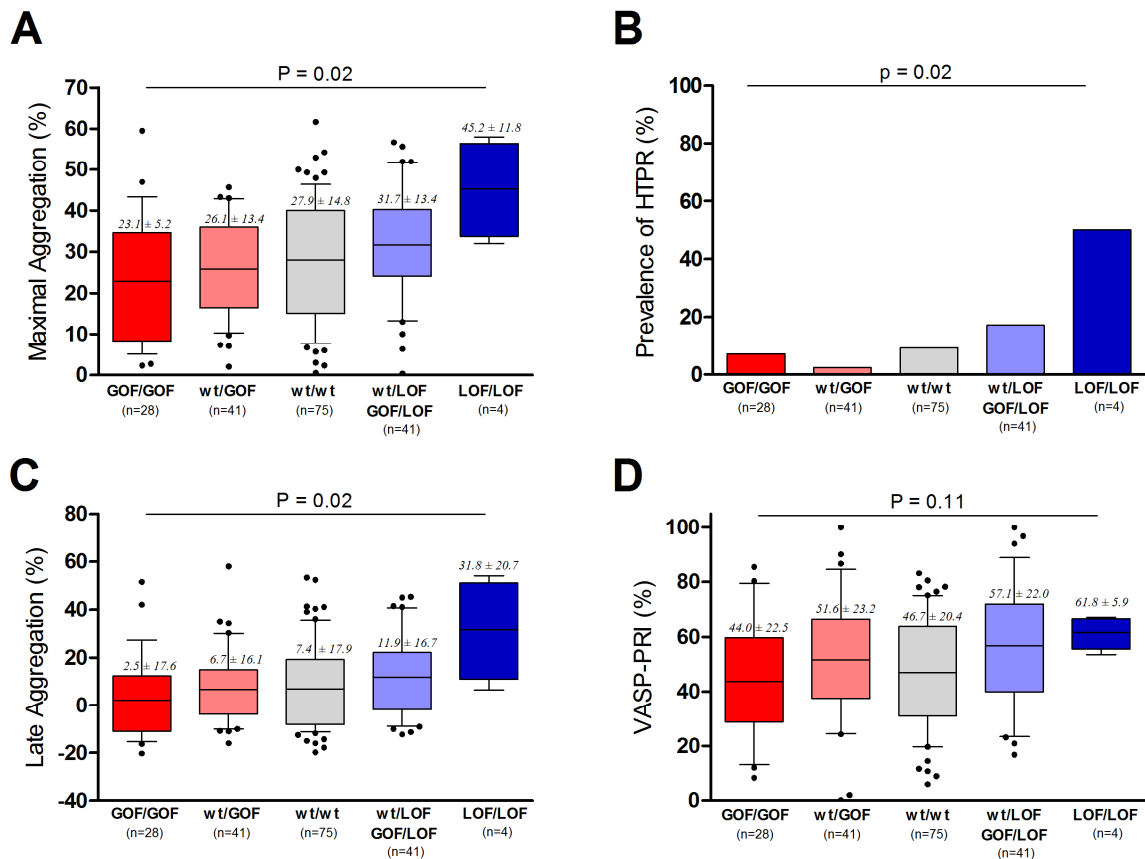
## Normál és magas trombocita reaktivitás definíciója

A genetikai tanulmányunk során a 2010-ben elfogadott, konszenzus dokumentumban rögzített  $\text{Agg}_{\text{max}} \geq 46\%$ -ot tekintettük a normál és magas trombocita reaktivitás határértékének.

## CYP2C19 genotípusok és trombocita reaktivitás

Trombocita reaktivitás eredmények alapján CYP2C19\*2 és\*3 funkció-vesztő (LOF) allélokot hordozó betegeket szignifikánsan magasabb  $\text{Agg}_{\text{max}}$  ( $32.9 \pm 13.6$  vs.  $26.4 \pm 14.5$ ;  $P=0.01$ ),  $\text{Agg}_{\text{late}}$  ( $13.7 \pm 17.8$  vs.  $6.3 \pm 17.3$ ,  $p<0.01$ ) és VASP-PRI ( $57.6 \pm 20.8$  vs.  $47.6 \pm 6$ ;  $P=0.02$ ) értékek jellemezték, mint a vad típusú (wt)

allélt (CYP2C19\*1) hordozókat. Ugyanakkor a CYP2C19\*17 funkció-nyerő (GOF) allél legalább heterozigóta formában való jelenléte csak kismértékben csökkentette a trombocita reaktivitást ( $Agg_{max}$ :  $26.4 \pm 14.4$  vs.  $29.2 \pm 14.6$ ,  $P=0.19$ ;  $Agg_{late}$ :  $6.1 \pm 16.8$  vs.  $9.5 \pm 18.3$ ,  $P=0.19$ ). A betegek genotípusok szerinti osztályozása géndózis hatást jelzett (Ábra 4.).



**Ábra 4. Trombocita reaktivitás értékek elemzése a CYP2C19 genotípusok alapján.**

A trombocita reaktivitás mértéke és a magas trombocita reaktivitású (HPR) betegek száma a következő genotípusok alapján növekedett: GOF homozigóta, GOF/wt heterozigóta, wt homozigóta, wt/LOF vagy LOF/GOF heterozigóták és LOF homozigóta (Ábra 4.). Ugyanakkor, a genotípusok szerinti, növekvő trombocita reaktivitás tendencia ellenére, az egyes genotípusokon belül a mért értékek jelentős variabilitást mutattak.

## PON1 genotípusok és trombocita reaktivitás

A PON1 Q192R genetikai variáns trombocita reaktivitásra gyakorolt hatását sem az optikai aggregometria, sem a VASP-PRI teszt eredményei nem támasztották alá.

## ABCB1 genotípusok és trombocita reaktivitás

A különböző ABCB1 C3435T és G2677T/A polimorfizmusok analízise során szignifikáns különbségek az  $Agg_{max}$ ,  $Agg_{late}$  és VASP-PRI értékekben nem jelentkeztek; ugyanakkor a kisebb ABCB1 génexpresszivitással jellemzett T3435T genotípusú betegek alacsonyabb  $Agg_{max}$  értékeket mutattak, mint a nagyobb ABCB1 génexpresszivitással jellemzett C3435C genotípusú betegek ( $30.7 \pm 15.3$  vs.  $26.1 \pm 13.8$ ;  $P=0.11$ ). Bár a C3435C genotípus HPR-re vonatkozó prediktív értéke szignifikánsan nem igazolódott, a HPR értékek ebben a genotípusban emelkedettebbek voltak a T3435T hordozókhöz képest (9 [19.6%] vs. 9 [6.7%],  $P=0.02$ ) (Táblázat 1.).

Test Result Variables	AUC	95% CI	P
LOF+GOF+ABCB1	0.697	0.558 - 0.837	0.006
LOF+GOF	0.670	0.538 - 0.802	0.018
LOF	0.639	0.495 - 0.783	0.053
ABCB1	0.630	0.484 - 0.776	0.070
PON-1	0.583	0.448 - 0.719	0.247
GOF	0.559	0.422 - 0.696	0.415

GOF: gain-of-function, HPR: high on-treatment platelet reactivity; LOF: loss-of-function; PON-1: paraoxonase-1.

Classification: GOF: \*17-carriers vs. non-carriers; LOF: \*2 or \*3 carriers vs. non-carriers; ABCB1: 3435 CC carriers vs. CT and TT; PON-1: 192 RR and QR vs. QQ carriers; LOF+GOF: \*17\*17 or \*1\*17 vs. \*1\*1 vs. \*1\*2 or \*1\*3 or \*2\*17 or \*2\*2; LOF+GOF+ABCB1: CYP2C19 \*17 carriers and 3435 CC non-carriers vs. CYP2C19 \*1\*1 and 3435 CC non-carriers vs. CYP2C19 \*1\*1 and 3435 CC carriers vs. CYP2C19 \*2 or \*3 carriers and 3435 CC non-carriers vs. CYP2C19 \*2 or \*3 carriers and 3435 CC carriers.

**Táblázat 1. Különböző genotípusok szerepe a magas tromboticita reaktivitás kialakulásában.**

A CYP2C19, ABCB1 és PON1 genotípusokat együttesen elemző többváltozós vizsgálat alapján igazolódott, hogy a CYP2C19 funkció-vesztő allélok a HPR független determinánsai. Ezt a ROC-analízis is alátámasztotta, amely szerint a LOF allél jelenléte a HPR legfőbb prediktora.

**Klinikai kimenet**

A betegek funkció-vesztő (LOF) allélt hordozó, ill. nem hordozó csoportokba sorolása alapján szignifikáns különbségeket az egyéves nyomon követés alatt bekövetkező CV halálozás, MI vagy revaszkularizáció előfordulásában nem tapasztaltunk (Kaplan-Meier analízis: 13.8% vs. 11.1%, HR: 1.24 95%CI: 0.44-3.47, P=0.69). Ugyanakkor a betegeket a LOF allélok száma alapján kategorizálva egyértelmű különbségek adódtak: LOF allél heterozigóta és a vad típusú betegek között hasonló valószínűséggel fordult elő elsődleges kompozit kimenet, míg a LOF homozigóták esetében 7-szer nagyobb valószínűséggel jelent meg CV halálozás, MI vagy revaszkularizáció (HR: 7.22, 95%CI: 1.61-32.65, P=0.01). Ez a szignifikáns eltérés funkció-nyerő (GOF) alléltól függetlenül is jelen volt (HR: 9.44, 95%CI: 1.96-45.38, p<0.01).

Az ABCB1 gén különböző genotípusai szignifikáns összefüggést nem mutattak az összesített kompozit végkimenetellel. Ugyanakkor a C3435C genotípusú

betegeknél a C3435T heterozigóta és T3435T homozigóta betegekhez viszonyítva nagyobb valószínűséggel fordult elő CV halálozás, MI vagy revaszkularizáció (Kaplan Meier analízis: 14.8% vs. 10.6%, HR: 1.61, 95%CI: 0.60-4.35, P=0.35).

A PON1 Q192R polimorfizmus vizsgálat a klinikai kimenettel nem mutatott összefüggést.

## **Diszkusszió**

ADP-specifikus mérő módszerrel meghatározott magas trombocita reaktivitás (HPR) fokozott veszélyt jelent, s bizonyítottan emeli a CV halálozás, nem-halálos kimenetelű MI, ST és az ismétlődő iszkémiás események megjelenésének/előfordulásának gyakoriságát. Bár a metaanalízis során feldolgozott tanulmányokat jelentős metodikai, beteg-beválasztási heterogenitás és eltérő trombocita reaktivitási küszöbértékek jellemezték, a HPR CV halálozást, MI-t és ST-t jelző prediktív értéke egyöntetű volt. Közel 9200 beteg összesített eredményei alapján a magas trombocita reaktivitással bíró betegek esetében a nem halálos kimenetelű MI 3-szor, CV halálozás 3.4-szer, igazolt/lehetséges ST 4-szer nagyobb valószínűséggel fordult elő a normál trombocita reaktivitású betegekhez képest. Korábbi és jelen metaanalízis vizsgálatok eredményei alapján egyértelműen megállapítható, hogy a különböző módszerek érzékenysége és prediktív értéke, mind a HPR meghatározásában, mind pedig a klinikai kimenet vonatkozásában eltérő. A különböző tanulmányokban meghatározott magas trombocita reaktivitás előfordulási gyakorisága, az alkalmazott vizsgálati módszerektől függően, 6-80% tartományban, jelentős eltéréseket mutatott. A trombocita aggregáció gátlás meghatározására számos laboratóriumi teszt áll rendelkezésre, azonban sem a módszerek standardizálásában, sem a klinikailag releváns HPR küszöbértékek tekintetében a mai napig nincsen konszenzus.



Vizsgálatunkban az összes optikai aggregometriai paraméternek és a VASP-PRI teszt eredményeinek értékelése szignifikáns közepes erősségű kapcsolatot mutatott. Eredményeink alapján elvetendő azon korábbi, más munkacsoportok által felállított hipotézis, amely a késő aggregáció szerepét hangsúlyozza a P2Y<sub>12</sub>-receptor gátlás jellemzésére. Ugyanakkor a többváltozós lineáris regressziós analízisünk szerint, a görbe alatti területtel (AUC) jellemzett érték jelzi legmegfelelőbben a trombocita aggregáció gátlás hatékonyságának mértékét. A Bland-Altman diagramm elemzések azonban rámutatnak, hogy a különböző OAG paraméterek és a VASP-PRI értékek közötti szignifikáns korreláció ellenére a két módszer között jelentős eltérések is lehetnek; amely különbözőségek miatt a két módszer egymást nem helyettesítheti.

A fix-dózisú clopidogrel kezelést követő trombocita reaktivitás mértékében, s a klinikai kimenetben észlelt jelentős egyének közötti eltérés farmakogenetikai háttere vitathatatlan, ugyanakkor, a mai napig számos ellentmondás és kérdés övezi. Genetikai vizsgálatunkban, a TAG kezelés hatékonyságát befolyásoló, a clopidogrel felszívódásra/transzportra ható (multidrog rezisztencia 1 gén), valamint a terápiás hatással rendelkező aktív -clopidogrel-metabolit képződését irányító CYP2C19 és PON1 gének funkcionális allélvariánsainak szerepét és prediktív értékét vizsgáltuk.

A CYP2C19 gén analízise során géndózis hatás igazolódott. A CYP2C19\*17/\*17 (GOF) ultrarapid metabolizáló csoport, átlagos trombocita reaktivitási értékei voltak a legalacsonyabbak. Ez az érték fokozatosan növekedett az extenzív, intermediér és lassú metabolizáló fenotípusoknak megfelelően. Legmagasabb értékek a CYP2C19\*2\*3 funkció-vesztő (LOF) allélokot homozigóta formában hordozóknál adódtak. Annak ellenére, hogy a CYP2C19 allélvariánsoknak enzimműködésre, s a clopidogrel terápia hatékonyságára gyakorolt hatása egyértelmű, az egyének között jelentkező eltérő terápiás választ, csak mintegy 3.6%-ban magyarázta. Bár a kis mintaszám nem tette lehetővé, hogy a különböző genotípusok és a klinikai kimenet között

szignifikáns összefüggést határozzunk meg, az egyértelmű, hogy a LOF allélt homozigóta formában hordozók esetében a percután koronária intervenciót követő iszkémiás esemény bekövetkezésének rizikója szignifikánsan nagyobb.

A különböző munkacsoportok multidrog rezisztencia 1 gén C3435T és G2677T/A funkcionális polimorfizmusainak tulajdonított szerepéről alkotott hipotéziseit számos ellentmondás jellemzi. Saját eredményeink nem igazoltak szignifikáns kapcsolatot a vizsgált ABCB1 polimorfizmusok és a trombocita reaktivitás mértéke között. Ugyanakkor C3435C homozigóta betegek esetében számottevően nagyobb mértékben jelentkezett HPR és váratlan iszkémiás esemény.

A clopidogrel biotranszformációjának második lépését irányító PON1 gén Q192R genetikai elemzése nem mutatott szignifikáns összefüggést sem a trombocita reaktivitás mértékével sem a klinikai kimenettel.

## Új felismerések

Percután koronária intervenciót követően ADP-specifikus mérőmódszerrel meghatározott magas trombocita reaktivitás értéke (HPR) összefügg a kardiovaszkuláris halálozással, a nem halálos kimenetelű myokardiális infarktussal és a stent trombózissal. Annak ellenére, hogy nagy metodikai különbségek, és eltérő trombocita reaktivitást jellemző küszöbértékek figyelhetők meg a feldolgozott, eltérő betegbeválasztási kritériumokat használó vizsgálatokban, a közölt eredmények szignifikáns heterogenitást nem mutattak.

A P2Y<sub>12</sub> ADP-receptor gátló, trombocita aggregációt szabályozó kezelés hatékonyságának monitorozására használt specifikus vazodilatator stimulált foszoprotein foszforilációs (VASP-PRI) teszt szignifikáns korrelációban van az optikai aggregometria mérési paramétereivel (Agg<sub>max</sub>, Agg<sub>late</sub>, disAgg, AUC). A módszerek közötti korreláció alapján a VASP-PRI teszt validálja az optikai

aggregometria alkalmasságát az ADP-receptor gátlás hatékonyságának monitorozására. Ugyanakkor a két módszer között észlelt különbségek alapján a két módszer nem felcserélhető, egyes betegeknél jelentős különbségek lehetnek közöttük.

A két módszer összevetése, és az OAG paraméterek részletes elemzése alapján elvetendő a feltevés, amely szerint a késői aggregáció ( $Agg_{late}$ ) a legmegfelelőbb paraméter a specifikus  $P2Y_{12}$ -receptor gátlás monitorozására; a vizsgált paraméterek között nincs jelentős különbség.

A CYP2C19 farmakogenetikai szempontból releváns alléljai lényeges determinánsai a clopidogrel kezelést követő trombocita reaktivitás mértékének. A különböző CYP2C19 genetikai variánsokat géndózis hatás jellemzi; a funkció-vesztő, CYP2C19 \*2 és \*3 allélokot homozigóta formában hordozók rizikója, a magas trombocita reaktivitás és az összetett iszkémiás események kialakulására a legmagasabb.

Sem a multidrog rezisztencia 1 gén, sem a paraoxanase-1 gén vizsgált genetikai variánsai nem mutattak szignifikáns összefüggést a trombocita reaktivitás mértékével vagy a klinikai kimenettel.

## **Kitekintés**

Az elmúlt évtized kutatói munkáinak, valamint farmakogenomikai és metodikai fejlesztéseinek köszönhetően bár jelentős az előrelépés, mégis a trombocita aggregációt szabályozó terápiás protokollokat a mai napig számos bizonytalanság övezi. A betegágy melletti célzott diagnosztika, standardizált, prediktív értékkel bíró vizsgálati módszerek alapján genetikai predisponáló faktorok analízisét figyelembe vevő személyre szabott terápiás javaslat a kardiovasculáris betegségcsoport (CAD) hatékony gyógyításának sarokkövei.

Hangsúlyozva a terület komplexitását, fontos figyelembe vennünk, hogy a trombocita aggregáció gátló kezelésre adott egyéni válasz létrejöttében a

genetikai prediszponáló faktorok mellett külső, környezeti és klinikai tényezők szerepe is eszenciális.

Mindemellett elengedhetetlen, s jelentős az igény, egy objektív mérőmódszerre, amellyel a kiváltott hatás megítélhető, hatékonysága monitorozható. Mindezekkel együtt valósulhat csak meg az egyénre szabott trombocita aggregáció gátló kezelési stratégia: amely a beteg rizikóstatuszához illesztett még kellően hatékony, s biztonságos terápia.

## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretném hálámat kifejezni Professzor Dr. Miseta Attila Úrnak és Professzor Dr. Kovács L. Gábor Úrnak, a lehetőségért, hogy a Laboratóriumi Medicina Intézet nagyszerű munkacsoportjához tartozhatom. Köszönettel tartozom továbbá a tudományos karrieremben nyújtott folytonos, önzetlen támogatásukért mind az egyetemi, mind az azt követő éveim alatt.

Rendkívüli hálával tartozom Dr. Komócsi Andrásnak, amiért csatlakozhattam kutatócsoportjához. Köszönöm a közös munka során nyújtott folyamatos segítségét, útmutatását és inspiráló tanácsait.

Köszönettel tartozom Dr. Aradi Dánielnek a folyamatos segítségéért és lelkesítő támogatásáért.

Köszönettel tartozom Dr. Magyarlaci Tamás, Dr. Tökés-Füzesi Margit és Pappné Bácskai Sarolta munkatársaimnak, a folyamatos szakmai és baráti támogatásukért.

Hálával tartozom családomnak és barátaimnak töretlen támogatásukért és gondos szeretetükért, amely nélkül képtelen lettem volna céljaimat megvalósítani.

# List of Publications/ Publikációk

## I. Topic related/ Témához kapcsolódó

### I.1 International articles/ Nemzetközi közlemények

Rideg O, Komócsi A, Magyarlaki T, Tőkés-Füzesi M, Miseta A, Kovács LG, Aradi D. Impact of Genetic Variants on Post-Clopidogrel Platelet Reactivity in Patients after Elective Percutaneous Coronary Intervention.

Pharmacogenomics 2011 Sept. E-pub ahead of print IF (2010): 3,876

Rideg O, Háber Á, Botz L, Szücs F, Várnai R, Miseta A, Kovács LG. Pilot study for the characterization of pharmacogenetically relevant *CYP2D6*, *CYP2C19* and *ABCB1* gene polymorphisms in the Hungarian population. Cell Biochemistry and Function, 2011 Aug. E-pub ahead of print / DOI:10.1002/cbf.1788 IF (2010): 1,651

Aradi D, Komocsi A, Vorobcsuk A, Rideg O, Tőkés-Füzesi M, Magyarlaki T, Horváth G I, Serebruany LV. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: Systematic review and meta-analysis.

American Heart Journal, Volume: 160 Issue:3 P: 543-551, 2010. IF: 5,052

Aradi D, Magyarlaki T, Tőkés-Füzesi M, Rideg O, Vorobcsuk A, Sayour A, Horváth IG, Komócsi A. Comparison of conventional aggregometry with VASP for monitoring P2Y12-specific platelet inhibition.

Platelets, Volume: 21 P: 563-570, 2010 IF: 2,117

Aradi D, Rideg O, Vorubcsuk A, Magyarlaki T, Magyar B, Kónyi A, Pintér T, Horvát I, Komócsi A. Justification of 150mg clopidogrel in patients with high on-clopidogrel platelet reactivity. European Journal of Clinical Investigation, DOI: 10.1111/j.1365-2362.2011.02594.x, 2011 IF: 2,736

Aradi D, Rideg O, Komócsi A: Platelet function monitoring in patients on clopidogrel. *Interventional Medicine & Applied Science* Volume: 3(1), P. 32-38, 2011.

Komócsi A, Rideg O, Költő G, Vorobcsuk A, Aradi D: Genetic Variants Affecting Clopidogrel Metabolism Have Minor Influence on Platelet Reactivity After Elective Percutaneous Coronary Intervention. *J Am Coll Cardiol* Vol. 58 No. 20 Suppl B B40. Abstract No. TCT-150 TCT 2011.

## **I.2 Hungarian abstracts and posters/ Magyar absztraktok és poszterek**

Aradi D, Rideg O, Magyarlaki T, Tőkés-Füzesi M, Vorobcsuk A, Horváth I, Komócsi A. Genetikai tényezők hatása a clopidogrel kezelt betegek trombocita-reaktivitására és klinikai kimenetélére. *Cardiologia Hungarica* 41: F71, 2011.

Aradi D, Vorobcsuk A, Sayour A, Magyarlaki T, Tőkés-Füzesi M, Rideg O, Horváth IG, Komócsi A. Optikai Aggregometria mérési eredményeinek összevetése specifikus P2Y<sub>12</sub> receptor gátlás áramlási citometriás meghatározásával *Cardiologia Hungarica* 39: A19, 2009.

Aradi D, Rideg O, Magyarlaki T, Tőkés-Füzesi M, Vorobcsuk A, Horváth I, Komócsi A. Genetikai tényezők hatása a clopidogrel-kezelt betegek trombocita-reaktivitására és klinikai kimenetélére. *Cardiologia Hungarica* 41: F71, 2011.

Háber Á, Rideg O, Várnai R, Szücs F, Botz L.

Initial Experiences with Parallel CYP2D6/CYP2C19 Geno-Phenotyping in Hungarian Healthy Volunteers. *Gyógyszerészet Supplementum* 2009/11. Suppl. I., LIII.évf, P-125, pp.: S120.

Háber Á, Szücs F, Rideg O, Osváth P, Fekete S, Botz L. Increased Carrier Prevalence of Deficient CYP2D6 Alleles in Treatment-resistant Depressed Patients. *Gyógyszerészet Supplementum* 2009/11. Suppl. I., LIII.évf, P-126, pp.: S121.

Rideg O, Aradi D, Magyarlaki T, Tőkés-Füzesi M, Miseta A, Komócsi A, Kovács LG. Impact of Genetic Variants on the Antiplatelet effect of Clopidogrel in Stable Angina Patients after Percutaneous Coronary Intervention, IX MAGE és XVI. Sejt és Fejlődésbiológiai Konferencia, Siófok, 2011.

Rideg O, Aradi D, Magyarlaki T, Tőkés-Füzesi M, Komócsi A, Miseta A, Kovács LG. Impact of Genetic Variants on the Antiplatelet effect of Clopidogrel. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 55. Nagygyűlése, Pécs, 2010.

Rideg O, Háber Á, Várnai R, Botz L, Kovács LG. A Magyar populáció CYP2D6 és CYP2C19 allélfrekvenciájának vizsgálata AmpliChip CYP450 teszttel. Magyar Humán genetikai Társaság 2010 évi Konferenciája, Debrecen, 2010.

Rideg O, Háber Á, Várnai R, Botz L, Miseta A, Kovács LG. A Magyar populáció CYP2D6 és CYP2C19 allélfrekvenciájának vizsgálata Amplichip CYP450 teszttel. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 55. Nagygyűlése, Pécs, 2010.

**Cumulative/ Kumulatív IF: 15.432**

## **II. Non Topic related/ Témához nem kapcsolódó**

### **II.1 Articles/ Közlemények**

Rideg O, Teibert A, Magyarlaki T, Tőkés-Füzesi M, Miseta A, Schmelczer M, Kovács LG. Appearance of multidrug resistance (MDR) as an early predictor of relapse in imatinib treated chronic myeloid leukaemia patients. Clinical Chimica Acta 355: S285-S285 Suppl. S 2005. IF: 2,149

Rideg O, Csutora P, Magyarlaki T, Teibert A, Nagy T, Kovács LG, Miseta A. Többszörös Gyógyszer-Rezisztencia: Diagnosztikai Megközelítések és Nehézségek. Orvosi Hetilap 146 évf. 20. szám, O: 995-1001, 2005.

Csutora P, Karsai Á, Nagy T, Vas B, Kovács LG, Rideg O, Bogner P, Miseta A. Lithium induces phosphoglucomutase activity in various tissues of rats and in bipolar patients International Journal of Neuropsychopharmacology, Volume: 9 P: 613-619, 2006. IF: 5.889

Szendrei T, Magyarlaki T, Kovács G, Szomor A, Nagy A, Molnár L, Tőkés-Füzesi M, Rideg O, Poto L, Losonczy H. Multidrug-resistance in chronic lymphocytic leukemia Blood Reviews Volume: 21, Suppl 1, S-140, 2007. IF: 5,922

Szendrei T, Magyarlaki T, Rideg O, Tőkés-Füzesi M, Kovács G, Nagy Á, Szomor Á, Molnár L, Dávid M, Pótó L, Pajor L és Losonczy H Multidrog rezisztencia vizsgálatok chronicus lymphoid leukaemiában. Orvosi Hetilap 149 évf. 4. szám, O: 161-167, 2008.

Nagy T, Balassa A, Frank D, Rab A, Rideg O, Kotek G, Magyarlaki T, Bogner P, Kovács LG, Miseta A. O-GlcNAc modification of proteins affects volume regulation in Jurkat cells European Biophys Journal. Volume: 39 (8) P: 1207-17 2010. IF: 2.387

Toth-Kovacs K, Pamer Z, Rideg O, Kovacs A, Fekete S, Biro Z, Kovacs GL: Association of Alzheimer's disease and Age-related macular degeneration in South-Western Hungary, Spektrum Augenheilkd Volume: 2 P: 96-97 DOI 10.1007/s00717-011-0478-2, 2011. IF: 0.120

## **II.2 Abstracts and Posters/ Absztraktok és posztterek**

Rideg O, Magyarlaki T, Tőkés-Füzesi M, Nagy T, Schmelzer M, Miseta A, Kovács LG. Quantitative analysis of the bcr-abl and the mdr-1 mRNA at Chronic Myeloid Leukaemia patients by LightCycler PCR.

8th International Symposium on instrumental analysis, Graz, 2005. (Poster presentation)

Rideg O, Tőkés-Füzesi M, Magyarlaki T, Schmelzer M, Miseta A, Kovács LG.

Bcr-Abl és MDR-1 mRNS mennyiségi analízis Valós idejű LightCycler PCR technikával krónikus myeloid leukémiás betegekben.

Magyar Hematológiai és Transzfúziológiai Társaság XX. Kongresszusa, Budapest, 2005. (Poster presentation)

Rideg O, Rab A, Jurkuvenaite A, Varga K, Li Y, Clancy J.P. Sorscher E.J. Collawn J.F. Bebok Zs. Cellular Mechanisms Associated with dF508 CFTR Rescue.

The 20th annual North American Cystic Fibrosis Conference, Denver, 2006. (Poster presentation)



Varga K, Jurkuvenaite A, Rideg O, Rowe SM, Clancy J.P., Sorscher E.J, Bebok Zs, Collawn J.F. dF508CFTR surface stability in human airway epithelial cells.

The 20th annual North American Cystic Fibrosis Conference, Denver, 2006. (Poster presentation)

Rideg O, Tőkés-Füzesi M, Magyarlaki T, Miseta A, Kovács LG. Protrombin FII G20210A és Leiden FV G1691A mutációk vizsgálata valós idejű, multiplex PCR technikával.

Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 54. Nagygyűlése, Debrecen, 2008. (Poster presentation)

Rideg O, Tőkés-Füzesi M, Magyarlaki T, Miseta A, Kovács LG. Janus-kináz 2 gén VAL617PHE mutáció detektálása krónikus myeloproliferatív kórképekben LightCycler PCR technikával. Magyar Humán-genetikai Társaság 2008. évi Konferenciája, Pécs, 2008. (Poster presentation)

Rideg O, Lamár I., Miseta A. Az antidepresszív terápia jelene és jövője.

Magyar Orvosi Laboratóriumi Szakdolgozók Egyesülete XI. Nagygyűlése, Pécs, 2009. (Oral presentation)

Frank D, Szalma J, Rideg O, Nagy T, Miseta A, Olasz L Humán papillomavírusok (HPV) szerepe a szájüregi daganatos megbetegedésekben, Magyar Arc-, Állcsont- és Szájsebészeti Társaság XIII. Kongresszusa, Pécs, 2009. (Poster presentation)

Toth-Kovacs K, Pamer Z, Rideg O, Kovacs A, Fekete S, Biro Z, Kovacs LG. Genetical and clinical association between Alzheimer's dementia and age-related macular degeneration.

Joint Congress of the European Society of Ophthalmology (SOE) and the American Academy of Ophthalmology (AAO), Geneva, 2011 (Oral presentation)

**Cumulative/ Kumulatív IF: 16,467**

**Total Cumulative/ Összesített IF: 31,899**