



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ : ΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

**ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ  
ΤΟΥ ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΤΗΣ  
ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗΣ ΣΕ ΜΕΤΕΜΦΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥΣ  
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΞΕΙΑ  
ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ**

ΓΟΥΛΙΕΛΜΟΣ ΜΙΧΑΛΗΣ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

ΑΘΗΝΑ 2020

## Πρόλογος-Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αριστείδη Δοκουμετζίδα για την πολύτιμη βοήθεια του σε κάθε στάδιο πραγματοποίησης αυτής της εργασίας. Η αμεσότητα και η εξαιρετική επαγγελματική κατάρτιση του συνέβαλαν τα μέγιστα και η καθοδήγηση του και οι παρεμβάσεις του ήταν καθοριστικές για την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Οι συζητήσεις μας ήταν ιδιαίτερα εποικοδομητικές και ενδιαφέρουσες και με βοήθησαν να αποκτήσω μία πιο σφαιρική άποψη πάνω στην πληθυσμιακή μοντελοποίηση. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την επίκουρη καθηγήτρια Μαρία Βερτζώνη για το ενδιαφέρον της και τις συμβουλές της που συνέβαλαν σημαντικά στην διαμόρφωση του τελικού κειμένου της παρούσας εργασίας. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την καθηγήτρια Σοφία Μαρκαντώνη-Κυρούδη τόσο για τις επισημάνσεις και συμβουλές της για την παρούσα εργασία όσο και για την κατά το δυνατόν άριστη οργάνωση του προγράμματος σπουδών του μεταπτυχιακού αλλά και το ειλικρινές ενδιαφέρον που επέδειξε κατά τη διάρκεια φοίτησης σε αυτό.

Τέλος ,δε θα μπορούσα να παραλείψω να εκφράσω τις πιο ιδιαίτερες ευχαριστίες μου προς την οικογένεια μου για όλη τη στήριξη και την υποστήριξη που έδειχναν πάντα και συνεχίζουν να δείχνουν απέναντι σε εμένα και σε κάθε επιλογή μου.

Γουλιέλμος Μιχάλης

Αθήνα 2020

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### **1.Γενικό μέρος**

<b>1.1. Στεφανιαία νόσος</b>	<b>5</b>
1.1.1. Γενικά στοιχεία	5
1.1.2. Παθοφυσιολογία στεφανιαίας νόσου	6
1.1.3. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	8
1.1.4. Ο υποδοχέας P2Y12	10
<b>1.2 Κλοπιδογρέλη</b>	<b>12</b>
1.2.1. Εισαγωγή	12
1.2.2. Φαρμακοδυναμική	13
1.2.3. Φαρμακοκινητική	14
1.2.3.1. Απορρόφηση	14
1.2.3.2. Μεταβολισμός	15
1.2.3.3. Κατανομή	16
1.2.3.4. Κάθαρση	17
1.2.4. Ανεπιθύμητες ενέργειες	18
1.2.5. Αλληλεπιδράσεις κλοπιδογρέλης με φάρμακα ,συμπληρώματα και τροφές	19
1.2.6. Μέθοδοι μέτρησης αναστολής συγκόλλησής αιμοπεταλίων	22
1.2.7.Φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό μοντέλο περιγραφής της κλοπιδογρέλης	24
1.2.8. Αντίσταση στη θεραπεία με κλοπιδογρέλη	27

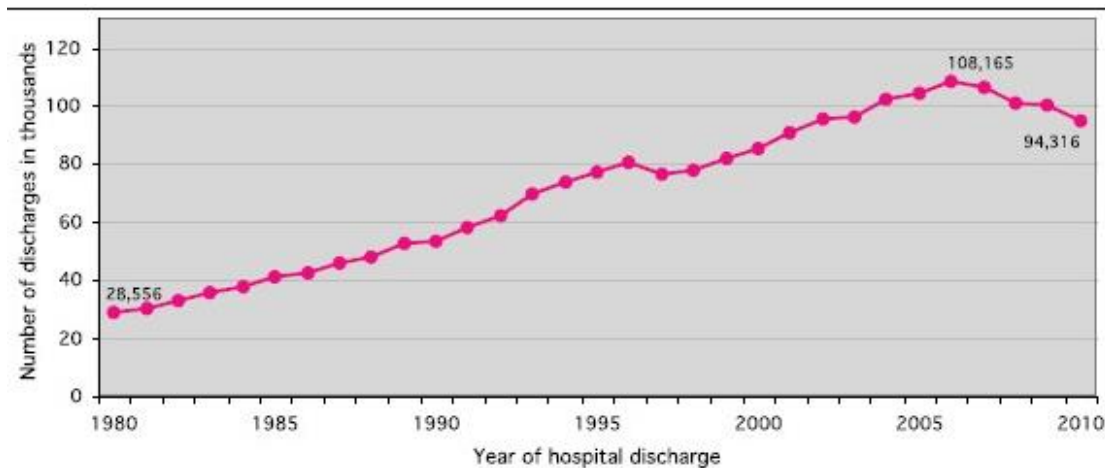
1.2.9. Φαρμακοκινητικές μελέτες σχετικά με την φαρμακογενετική αντίσταση της κλοπιδογρέλης	31
<b>1.3. Πληθυσμιακή φαρμακοκινητική</b>	<b>36</b>
1.3.1. Εισαγωγή στη φαρμακοκινητική	36
1.3.2. Εισαγωγή στη πληθυσμιακή φαρμακοκινητική ανάλυση	40
1.3.3. Δομή πληθυσμιακού μοντέλου	43
1.3.4. Μέθοδος εκτίμησης των παραμέτρων του πληθυσμιακού μοντέλου	47
1.3.5. Αξιολόγηση πληθυσμιακού μοντέλου	48
<b>2. Ειδικό Μέρος</b>	<b>56</b>
2.1 Σκοπός της μελέτης	56
2.2 Ασθενείς και μέθοδοι	56
2.3. Αποτελέσματα	60
2.4. Συζήτηση-Συμπεράσματα	82
<b>3. Περίληψη</b>	<b>88</b>
<b>4. Βιβλιογραφία</b>	<b>92</b>
<b>5. Παράρτημα</b>	<b>103</b>
5.1. Τίτλος και αριθμός άδειας μελέτης	104
5.2 Περίληψη πρωτοκόλλου μελέτης	105

# 1. Γενικό Μέρος

## 1.1 Στεφανιαία νόσος

### 1.1.1. Γενικά στοιχεία

Οι καρδιαγγειακές νόσοι (cardiovascular disease, CVD) αποτελούν μια σύνθετη κατηγορία παθήσεων που περιλαμβάνουν προσβολή στην καρδιά (coronary heart disease, CHD), στα αγγεία (coronary artery disease, CAD) είτε και στα δύο ταυτόχρονα. Ενώ υπάρχει σύγχυση στην χρησιμοποίηση της ορολογίας στην κλινική πράξη, είναι απόλυτα εδραιωμένο ότι η στεφανιαία νόσος της καρδιάς προέρχεται από την στεφανιαία νόσο των αγγείων ενώ η οξεία αρτηριακή στεφανιαία νόσος (acute coronary syndrome, ACS) προκαλείται από την χρόνια αθηροσκλήρωση που επάγεται από την αρτηριακή στεφανιαία νόσο. Η στεφανιαία νόσος χαρακτηρίζεται από συμπτώματα όπως πόνος ή αίσθημα μούδιασματος στην αριστερή πλευρά του σώματος με συνηθέστερα μέρη το χέρι, την πλάτη, την γνάθο και το λαιμό, έντονη εφίδρωση, δυσκολία αναπνοής ή δύσπνοια, ταχυκαρδία, ναυτία ή έμετο και αίσθημα ζάλης ή συγκοπής που ανάλογα με την σοβαρότητα τους μπορεί να οδηγήσουν σε σταθερή ή ασταθή στηθάγχη ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (myocardial infarction, MI) με ή χωρίς ανόσωση του ST. Τα καρδιαγγειακά συμβάντα είναι ένα σημαντικό αίτιο θνητότητας και πρόκλησης αναπηρίας στις αναπτυγμένες χώρες. Επομένως, παρόλο που η θνητότητα από αυτά έχει μειωθεί σταδιακά τις τελευταίες δεκαετίες, συνεχίζουν να ευθύνονται για το ένα τρίτο των θανάτων σε άτομα άνω των 35 ετών. Πιο συγκεκριμένα, υπολογίζεται ότι περίπου 15,5 εκατομμύρια άτομα άνω των 20 ετών στην Αμερική πάσχουν από κάποια καρδιαγγειακή ασθένεια, ότι κάθε 42 sec υπάρχει τουλάχιστον μια προσβολή από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και ότι τα CVD ενοχοποιούνται για 102,6 θανάτους στους 100.000 συνολικούς. Αντιθέτως στην Ευρωπαϊκή ένωση, η θνητότητα από καρδιαγγειακά συμβάντα την χρονική περίοδο 1995-1997 υποχώρησε στο 100 στους 100.000 συνολικούς θανάτους στους άνδρες (από 146 στους 100.000 την περίοδο 1965-1969) και στο 45 στους συνολικούς θανάτους στις γυναίκες (από 64 στους 100.000 την περίοδο 1965-1969)[1]. Παράλληλα, το 2014 ο επιπολασμός της στεφανιαίας νόσου στον ελληνικό πληθυσμό ήταν 6,3% (8,9% στους άνδρες και 3,8% στις γυναίκες) και αυτού του εμφράγματος του μυοκαρδίου 3,6%(5,2% στους άνδρες και 2,1% στις γυναίκες), αρκετά αυξημένος συγκριτικά με την δεκαετία του 1980 όπου η συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου ήταν 1,6% και του εμφράγματος μυοκαρδίου 1,1%. Διαπιστώθηκε επίσης και σημαντική αύξηση εμφάνισης των προδιαθεσικών παραγόντων για την πρόκληση στεφανιαίας νόσου όπως υπερχοληστεραιμία (23,8%), υπέρταση (27,2%), κάπνισμα(38,9%), σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (11,1%) και έλλειψη φυσικής άσκησης (43%) που πιθανόν να ευθύνονται για την αυξημένη επίπτωση καρδιαγγειακών συμβάντων και την αύξηση του αριθμού των ασθενών που εισάγονται για νοσοκομειακή περίθαλψη τους στο Σχήμα 1 [2].



**Σχήμα 1:** Ο συνολικός αριθμός αποδέσμευσης των κλινών ασθενών που εισήχθησαν με καρδιαγγειακά συμβάντα (CVD) στην Ελλάδα το 1980-2010. Ο συνολικός αριθμός αποδέσμευσης των κλινών περιλαμβάνει και τους ζωντανούς αλλά και τους νεκρούς ασθενείς[2].

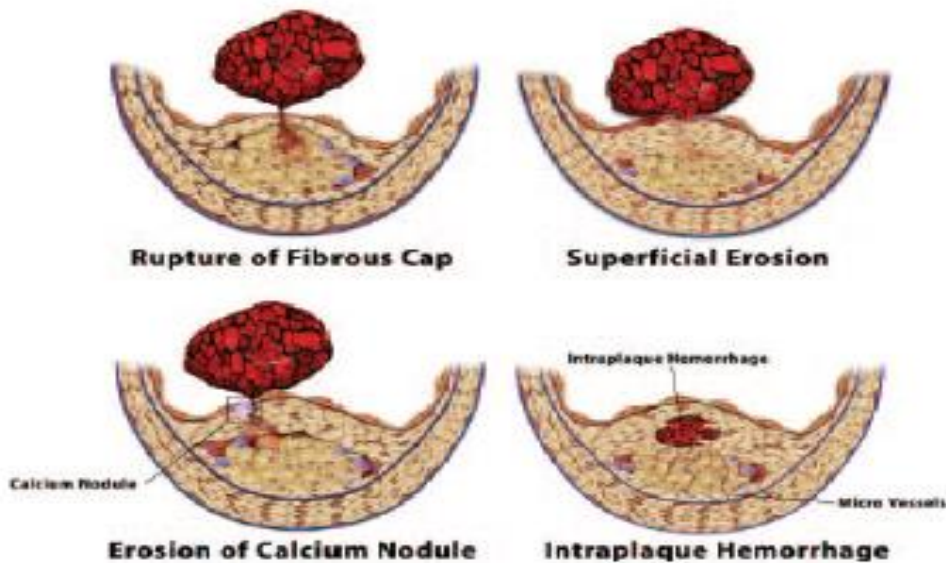
### 1.1.2. Παθοφυσιολογία στεφανιαίας νόσου

Η στεφανιαία νόσο ανεξαρτήτως αν παρουσιάζει χρόνιες ή οξείες εκδηλώσεις, είναι μια προοδευτική νόσος που απαιτεί τον σταδιακό σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Οι σύγχρονες μελέτες φανερώνουν ότι η αθηρωματική πλάκα δεν είναι μόνο αποτέλεσμα συσσώρευσης χοληστερόλης στα αγγεία αλλά συνέπεια μιας διαρκούς και δυναμικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος και των συστατικών του αίματος που πυροδοτούνται από την ύπαρξη φλεγμονής σε όλα τα στάδια σχηματισμού της αθηρωμάτωσης. Πιο αναλυτικά, όταν το ενδοθήλιο των αρτηριών έρχεται σε επαφή με συγκεκριμένα βακτηριακά προϊόντα, αυξημένο αριθμό λιπιδίων, αγγειοσυσπαστικές ορμόνες προερχόμενες από υπέρταση, προϊόντα γλυκοοξειδωσης από υπεργλυκαιμία ή με προφλεγμονώδες κυτοκίνες που παράγονται από τον πλεονάζοντα λιπώδη ιστό, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ουσιών που ευνοούν την συγκόλληση των λευκοκυττάρων στο εσωτερικό αρτηριακό τοίχωμα, κυρίως T-λεμφοκυττάρων και φαγοκυττάρων. Ευρισκόμενα στο εσωτερικό των αρτηριακών κυττάρων, τα λευκοκύτταρα επικοινωνούν με τα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα μέσω μιας ποικιλίας μεσολαβητών που περιλαμβάνουν λιπιδικά παράγωγα όπως προσταγλανδίνες και άλλα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος όπως λευκοτριένια, επάγοντας την δημιουργία φλεγμονής. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν επίσης η ισταμίνη που αυξάνει την διαπερατότητα των αγγείων και οι πρωτεϊνικοί μεσολαβητές της φλεγμονής όπως οι κυτοκίνες και οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Ως αποτέλεσμα πρόκλησης φλεγμονής τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν στο εξωτερικό και πολλαπλασιάζονται, δημιουργώντας μια εξωκυττάρια κάψα. Εκεί μαζί με τα ενδοθήλια και τα λευκοκύτταρα, ως απάντηση σε διάφορα οξειδωτικά και φλεγμονώδη ερεθίσματα παράγουν μεταλλοπρωτεάσες (MMPs) που φυσιολογικά με τους ενδογενείς ανασταλτές τους έχουν ως κύριο ρόλο την ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμό, μετανάστευση και τον προγραμματισμό κυτταρικού θανάτου στα κύτταρα των αγγείων. Προκαλούν επίσης μετασχηματισμό της γεωμετρίας των αγγείων καθώς και καταστροφή της εξωκυττάριας κάψας που σχηματίζεται. Στη συνέχεια, δεσμεύονται λιποπρωτεΐνες οι οποίες καθίστανται πιο επιρρεπείς στο οξειδωτικό stress και στην γλυκοζυλίωση. Αυτά τα προϊόντα τροποποίησης των λιποπρωτεϊνών διατηρούν την φλεγμονώδη απόκριση. Τέλος, επιπλέον στοιχεία που πιθανόν να επιβαρύνουν την αθηρωμάτωση είναι πιθανή

ασβεστοποίηση της πλάκας, εναπόθεση νεκρών κυττάρων στο εσωτερικό της κάψας όπως επίσης και εναπόθεση μακροφάγων που έχουν φαγοκυτταρώσει λίπη που επιδεινώνουν την εξωτερική προσκόλληση ιστών και λιπιδίων[3].

Ιδιαίτερη σημασία δίνεται ωστόσο στην τροποποίηση της γεωμετρίας των αγγείων από την αθηρωμάτωση. Για πολλά χρόνια κατευθυνόμενοι κυρίως από τις αγγειογραφίες και την επιτυχία της επαναιμάτωσης ως θεραπεία της στένωσης των αρτηριών, κύρια πεποίθηση ήταν ότι οι αθηρωματικές πλάκες επεκτείνονται προς το εσωτερικό του αγγείου προκαλώντας στένωση και τα αντίστοιχα συμπτώματα στηθάγχης. Αντιθέτως, είναι πια αποδεδειγμένο ότι οι αθηρωματικές πλάκες ,στο μεγαλύτερο ποσοστό της ζωής τους, επεκτείνονται προς το εξωτερικό των αγγείων παρά προς το εσωτερικό, καταδεικνύοντας το γεγονός της ύπαρξης μεγάλης αθηρωματικής πλάκας με την παράλληλη απουσία ύπαρξης στένωσης. Οι στενώσεις εν τέλει αποτελούν το τελευταίο στάδιο στον σχηματισμό της αθηρωμάτωσης και από την στιγμή που θα προκύψουν τονίζουν το προχωρημένο σημείο της στεφανιαίας νόσου.

Για την εκδήλωση όμως οξέος στεφανιαίου συνδρόμου ευθύνονται μια σειρά μικροανατομικών μηχανισμών με κυριότερο από αυτούς την ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Σε μικρότερο ποσοστό εμπλέκονται και μηχανισμοί όπως επιφανειακή διάβρωση της πλάκας, διάβρωση της ασβεστοποιημένης περιοχής ή αιμορραγία στο εσωτερικό της κάψας (Σχήμα 2). Ανεξαρτήτως της αιτίας που προκάλεσε την αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας, το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία στεφανιαίου θρόμβου με πολλούς μηχανισμούς. Αρχικά, η επαφή του κολλαγόνου που βρίσκεται στο εξωτερικό τμήμα της πλάκας ενεργοποιεί την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και τον καταρράκτη πήξης (με τη βοήθεια των μακροφάγων και των λείων μυϊκών κυττάρων), κινητοποιώντας παράλληλα και την δημιουργία θρόμβου αλλά και τον μηχανισμό πήξης. Παραγωγή και απελευθέρωση επίσης της θρομβίνης ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια και άλλα κύτταρα στην κάψα, επιδεινώνοντας το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο[4].



Σχήμα 2: Μικροανατομία των αρτηριακών θρομβώσεων και της επακόλουθης οξείας προσβολής. Πάνω αριστερά απεικονίζεται η ρήξη της ινώδους κάψας που αποτελεί και το πιο συχνό αίτιο (2/3 των περιπτώσεων). Πάνω δεξιά η σταδιακή επιφανειακή διάβρωση της πλάκας που αποτελεί το δεύτερο πιο σύνηθες αίτιο. Τέλος, σε μικρότερο ποσοστό ενδέχεται να ευθύνεται διάβρωση της ασβεστοποιημένης περιοχής (κάτω αριστερά) ή αιμορραγία στο εσωτερικό της κάψας (κάτω δεξιά)[3].

### 1.1.3. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο

Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην φλεγμονώδη απόκριση που μεσολαβεί από την αθηροσκλήρωση. Διαρκής και επίμονη συσσώρευση αιμοπεταλίων είναι ένα σοβαρό πρόβλημα σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία νόσο καθώς και σε αυτούς που υποβάλλονται σε διαδερμική στεφανιαία επέμβαση (percutaneous coronary intervention, PCI). Φυσιολογικά, σε ένα υγιές αγγείο δεν ενεργοποιούνται αλλά ούτε προσκολλώνται αλλά σε περίπτωση τραυματισμού του αγγείου ή σε ρήξη αθηρωματικής πλάκας σε περίπτωση στεφανιαίας νόσου, τα αιμοπετάλια συνδέονται με το απελευθερωμένο κολλαγόνο με έναν σταδιακό διπλό μηχανισμό: πρώτα τα αιμοπετάλια επιβραδύνονται από την παρουσία κολλαγόνου συνδεδεμένου με τον παράγοντα von Willebrand factor και ύστερα ακινητοποιούνται από το κολλαγόνο μέσω του υποδοχέα τους γλυκοπρωτεΐνη (GP). Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων κολλαγόνου ενεργοποιεί τον μεσολαβούμενο από την φωσφολιπάση-C καταρράκτη. Αυτό οδηγεί σε κινητοποίηση  $Ca^{2+}$  και αύξηση του ενδοκυττάρια, οδηγώντας μέσω ενεργοποίησης διαφόρων κινασών σε τροποποίηση της μορφολογίας και μετατροπή τους στην προθρομβωτική κατάσταση, την απελευθέρωση του κοκκιδώδους περιεχόμενου τους και τέλος την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A2. Η παρουσίαση της προθρομβωτικής μορφής των αιμοπεταλίων οδηγεί στην συσσώρευση πολλών θρομβωτικών παραγόντων στην επιφάνεια τους, απελευθερώνοντας θρομβίνη από προθρομβίνη. Παράλληλα, ADP και σεροτονίνη απελευθερώνεται από το εσωτερικό των αιμοπεταλίων και η ενεργοποιημένη φωσφολιπάση A2 συνθέτει αραχιδονικό οξύ που αποτελεί απαραίτητο μόριο για τη σύνθεση θρομβοξάνης A2. Όλα τα ανωτέρω έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την ταχεία συσσώρευση μορίων όπως ADP, θρομβίνη και θρομβοξάνη A2 τα οποία συνδέονται στους αντίστοιχους G-υποδοχείς τους, οδηγώντας σε περαιτέρω αλλαγή της μορφής των αιμοπεταλίων, ενίσχυση του σήματος της συσσώρευσης τους και τέλος στην ενεργοποίηση του υποδοχέα ινωδογόνου GPIIb/GPIIIa πάνω στα αιμοπετάλια. Η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων



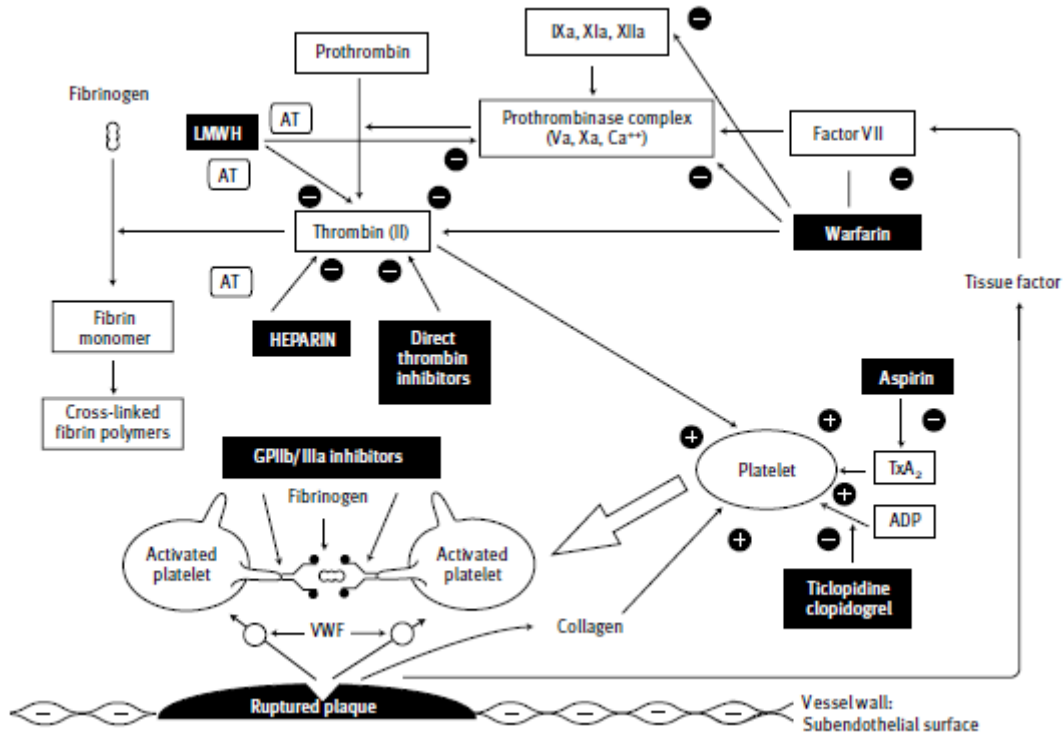
επιτρέπει την εμφάνιση των σημείων σύνδεσης του ινωδογόνου, διαδικασία που αποτρέπεται φυσιολογικά σε ανενεργά αιμοπετάλια. Η σύνδεση του ινωδογόνου με τη σειρά του συνδέει τα αιμοπετάλια μεταξύ τους, ευνοώντας τη συσσωμάτωσή τους και τη δημιουργία θρόμβου[5],[6].

Πέρα από τον καλά καθορισμένο ρόλο των αιμοπεταλίων στην δημιουργία του θρόμβου, τα αιμοπετάλια μπορεί να επιδεινώσουν σημαντικά την κλινική εικόνα μέσω και διαφορετικών μηχανισμών:

- Την πρόκληση μικροεμβολών και την επακόλουθη απόφραξη της μικροκυκλοφορίας του καρδιαγγειακού συστήματος. Προκαλούν επίσης αγγειοσύσπαση μέσω σεροτονίνης και οξειδωτικών ριζών, επιβαρύνοντας την χρόνια ισχαιμία και την ήδη υπάρχουσα αδυναμία αιμάτωσης και μειώνουν την συσταλτικότητα του μυοκαρδίου. Συνεπώς, επιδεινώνουν πολύ την τελική πρόγνωση του ασθενή[7].
- Την επαγωγή της φλεγμονής μέσω αυξητικών παραγόντων και χυμοκινών, ενισχύοντας και σταθεροποιώντας την αθηρωματική πλάκα. Από τους σημαντικότερους αιμοπεταλιακούς διαμεσολαβητές που θεωρείται ότι προάγει την φλεγμονή είναι ο CD40L, που αντιδρά με το CD40 των ενδοθηλιακών και των λευκοκυττάρων. Έτσι, παράγονται περαιτέρω χυμοκίνες και αυξητικοί παράγοντες και πολλαπλασιάζεται η συσσωμάτωση. Τέλος, ο CD40L ενδέχεται να αποσταθεροποιεί την αθηρωματική πλάκα μέσω απελευθέρωσης ενζύμων που την πέπτουν[8],[9].

Ωστόσο, εκτός από τον σημαντικό ρόλο των αιμοπεταλίων στη οξεία στεφανιαία νόσο και την άμεση θεραπευτική παρέμβαση που στοχεύει στην αναστολή συσσωμάτωσής τους, ιδιαίτερη σημασία έχει και η δευτερογενής πρόληψη με κάποια αντιαιμοπεταλιακή αγωγή ύστερα από ένα καρδιαγγειακό συμβάν, διότι η μελέτη TIMA-12 φανέρωσε αυξημένη ενεργοποίηση και δραστηριότητα των αιμοπεταλίων μετά από ένα στεφανιαίο επεισόδιο μέχρι και 1 μήνα[10]. Οι διαθέσιμες φαρμακολογικές επιλογές σε οξύ ή χρόνια στεφανιαίο επεισόδιο είναι οι εξής (Σχήμα 3):

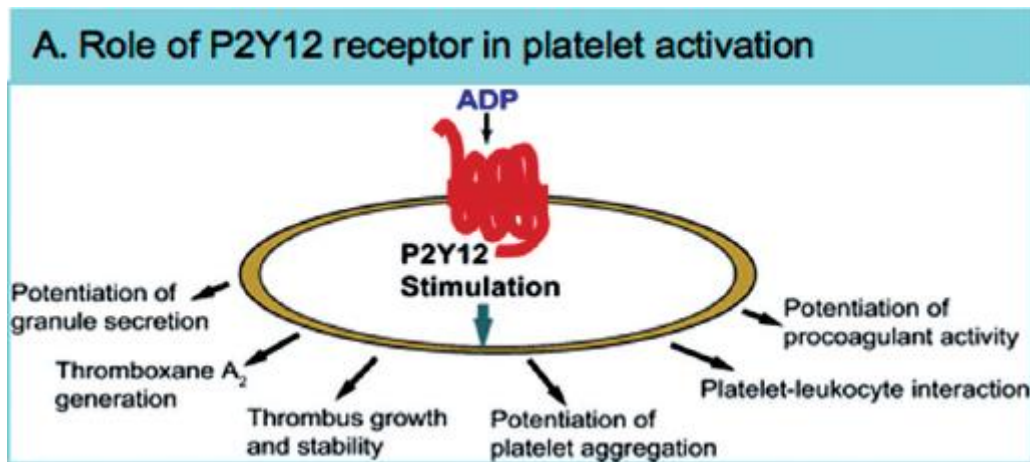
- Η ασπιρίνη που αναστέλλει την δραστηριότητα των αιμοπεταλίων μέσω μη αντιστρεπτής ακετυλίωσης της κυκλοοξυγενάσης-1. Έτσι αποτρέπεται η σύνθεση θρομβοξάνης A<sub>2</sub> που είναι ένας ισχυρός μεσολαβητής της αιμοπεταλιακής συσσωμάτωσης.
- Οι θειονυπριδίνες με εκπρόσωπους την τικλοπιδίνη και την κλοπιδογρέλη που αναστέλλουν την μέσω ADP ενεργοποίηση του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> και άρα αναστέλλεται η συσσώρευση αιμοπεταλίων.
- Οι αναστολείς του υποδοχέα γλυκοπρωτεΐνης (GP) IIb/IIIa. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας είναι ένας προθρομβωτικός μεσολαβητής της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων και το τελευταίο βήμα πριν τον σχηματισμό του θρόμβου. Μετά την ενεργοποίηση, δεσμεύει το ινωδογόνο και διευκολύνει την σύνδεση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους δημιουργώντας το τελικό πλέγμα του θρόμβου.



Σχήμα 3: Ο μηχανισμός ενεργοποίησης και συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων μετά την ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και οι διαθέσιμες αντιαιμοπεταλιακές αγωγές ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους[6].

### 1.1.4. Ο υποδοχέας P2Y<sub>12</sub>

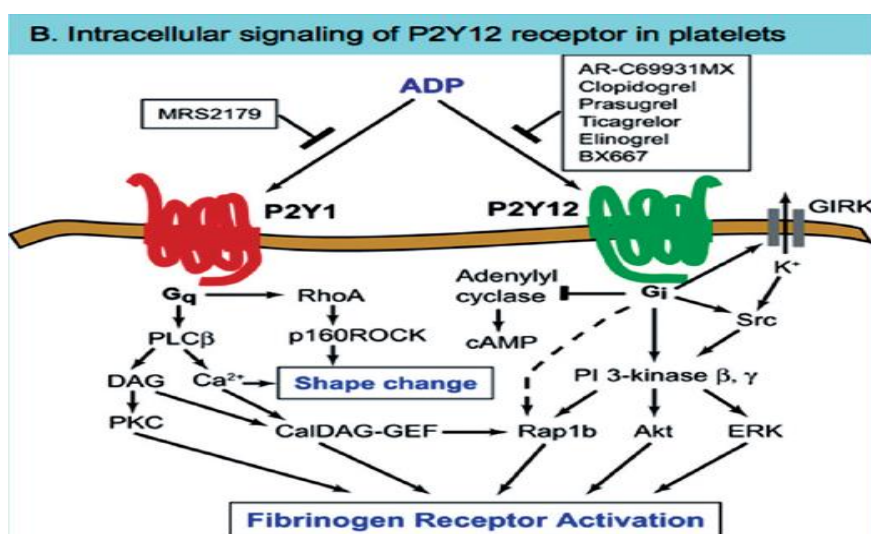
Οι υποδοχείς P2Y είναι 7 διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Από τα οκτώ είδη αυτών των υποδοχέων, τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν τους P2Y<sub>12</sub> και P2Y<sub>1</sub> στους οποίους προσδένεται η 5-διφωσφονική αδενοσίνη (ADP). Παρότι αρχικές μελέτες υπέδειξαν ότι ο υποδοχέας P2Y<sub>12</sub> εκφράζεται μόνο στα αιμοπετάλια και σε κάποιες περιοχές του εγκεφάλου, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι ο υποδοχέας εκφράζεται σε μικρογλιακά κύτταρα, αγγειακά κύτταρα του λείου μυϊκού ιστού, δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, λευκοκύτταρα, και στους οστεοκλάστες χωρίς ωστόσο να έχει αποσαφηνιστεί η δράση σε αυτούς τους ιστούς. Για την επιτυχή μετάδοση του σήματος, απαιτείται η ταυτόχρονη σύνδεση του ADP και στους δύο υποδοχείς και συμμετέχουν σε πολύ μεγάλο βαθμό στην αύξηση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων και στην συνεπακόλουθη συσσώρευση τους για τη δημιουργία θρόμβου[11](Σχήμα 4).



Σχήμα 4: Κύριοι μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα P2Y12 μετά την ενεργοποίησή του από το ADP που συμβάλλουν στην αύξηση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων[12].

Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει ο ADP, που αποτελεί τον πρώτο χρονικά αλλά και από τους πιο σημαντικούς διαμεσολαβητές της θρόμβωσης. Και αυτό διότι μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την μετέπειτα απελευθέρωση του από τα αιμοπετάλια, συνδέεται ξανά σε αυτά, μεγεθύνοντας το σήμα της συσσωμάτωσης και μεγιστοποιώντας το θρομβωτικό αποτέλεσμα μέσω περαιτέρω αποκοκκίωσης του περιεχομένου των αιμοπεταλίων.

Η σύνδεση του ADP συμπερασματικά επιφέρει αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης και την ενεργοποίηση της φωσφοϊνσιτιδο-3-κινάσης. Η αναστολή της πρώτης οδηγεί σε μια μείωση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) η οποία έχει ως συνέπεια την ελάττωση της, μεσολαβούμενης από την cAMP, φωσφορυλίωση της VASP. Έτσι, η φωσφορυλιωμένη VASP δεν μπορεί να προστατεύσει τον υποδοχέα (GP) IIb/IIIa όπως φυσιολογικά θα έκανε και η VASP ενεργοποιεί τον συγκεκριμένο υποδοχέα πυροδοτώντας την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Αντιθέτως, η ενεργοποίηση της φωσφοϊνσιτιδο-3-κινάσης ενεργοποιεί πάλι τους υποδοχείς (GP) IIb/IIIa μέσα από την ενεργοποίηση της σερίνο-θρεόνινο-πρωτεϊνικής κινάσης B και των Rap1b GTP-πρωτεϊνών(Σχήμα 5).



Σχήμα 5: Ενδοκυττάρια οδοί σήμανσης μετά την ενεργοποίηση του P2Y12 από την ADP[12].

Η μεγάλη σημασία που έχει ο υποδοχέας P2Y<sub>12</sub> για την αιμόσταση και την θρόμβωση καταδεικνύεται από το γεγονός ότι ποντίκια με έλλειψη αυτού του υποδοχέα στα αιμοπετάλια παρουσιάζουν φτωχή συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και αποτυχία αναστολής της αδενυλικής κυκλάσης μεσολαβούμενη από τον ADP. Διατηρούν ωστόσο την μεσολαβούμενη από το ADP τροποποίηση της μορφολογίας τους και την ενδοκυττάρια είσοδο Ca<sup>2+</sup>[12].

Επομένως, το μικρό φάσμα κατανομής του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> και το γεγονός ότι ενδεχόμενη αναστολή του διακόπτει τον καταρράκτη που οδηγεί σε σχηματισμό θρόμβου πολύ νωρίς, καθιστά τον συγκεκριμένο υποδοχέα ως έναν ελκυστικό στόχο για φαρμακευτική παρέμβαση. Φάρμακα που αναστέλλουν την επαγόμενη από το ADP συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων είναι η τικλοπιδίνη, η κλοπιδογρέλη και η πρασουγρέλη, όλα στην χημική κατηγορία των θειονυριδινών. Επίσης, ανασταλτής του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub> είναι και η τικαγρελόρη που αποτελεί νουκλεοσιδικό ανάλογο. Καταλήγοντας, όλοι οι αναστολείς του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub>, πέρα από την αναστολή της δημιουργίας θρόμβου, προλαμβάνουν την αποκοκκίωση των αιμοπεταλίων αποτρέποντας την δημιουργία προθρομβωτικών και προφλεγμονωδών καταστάσεων, αναστέλλουν το τελικό στάδιο συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων μέσω αποτροπής μετατροπής του υποδοχέα GP IIb/IIIa στη μορφή που συνδέεται με τα αιμοπετάλια και τέλος ελαττώνουν τον σχηματισμό συσσωματωμάτων μεταξύ λευκοκυττάρων-αιμοπεταλίων καθώς και την έκφραση και απελευθέρωση CD40L[11].

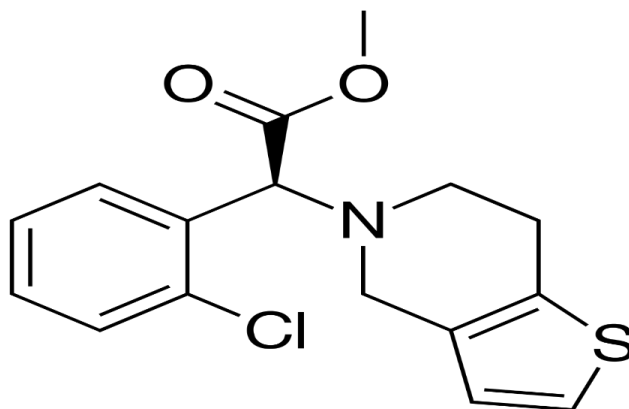
## 1.2 Κλοπιδογρέλη

### 1.2.1. Εισαγωγή

Η συμμετοχή και ο σημαντικός ρόλος των αιμοπεταλίων τόσο στον σταδιακό σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας όσο και στην πρόκληση οξέος στεφανιαίου επεισοδίου είναι καλά εδραιωμένος. Επομένως, η αναστολή συγκόλλησης των αιμοπεταλίων μέσω χορήγησης αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων είναι αναγκαία τόσο για την αντιμετώπιση ενός οξέος στεφανιαίου συνδρόμου όπως επίσης και για την επίτευξη πρωτογενής ή δευτερογενής πρόληψης με σκοπό την αποφυγή εμφάνισης ενός καρδιαγγειακού συμβάντος. Χρονολογικά, το πρώτο φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε για αυτό το σκοπό ήταν το ακετυλοσαλικυλικό οξύ και αργότερα η διπυριδαμόλη και η τικλοπιδίνη, το πρώτο αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο της κατηγορίας των θειονυριδινών. Λόγω όμως σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών όπως ουδετεροπενία και πρόκληση θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας, ήταν επιτακτική η ανάγκη σύνθεσης αποτελεσματικότερων και ασφαλέστερων φαρμάκων στην ίδια χημική κατηγορία. Έτσι κυκλοφόρησε η κλοπιδογρέλη (δεύτερη γενιά) και ύστερα η πρασουγρέλη (τρίτη γενιά) που η τελευταία αποτελεί και το καλύτερο φάρμακο της κατηγορίας, εφόσον εμπλέκεται σε λιγότερες αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα λόγω καλύτερου μεταβολισμού, έχει γρηγορότερη δράση, υψηλότερη αναστολή συγκόλλησης αιμοπεταλίων και μικρότερη διατομική μεταβλητότητα συγκριτικά με την κλοπιδογρέλη[13]. Άλλα φάρμακα που στοχεύουν τον ίδιο υποδοχέα είναι η τικαγρελόρη και η κανγκρελόρη που είναι ανάλογα του ADP και προσφέρουν το πλεονέκτημα της αντιστρεπτής αναστολής του υποδοχέα P2Y<sub>12</sub>. Τελευταία κατηγορία αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων που κυκλοφόρησε είναι οι αναστολείς των υποδοχέων IIb/IIIa που αναστέλλουν το τελευταίο βήμα πριν την σύνδεση των αιμοπεταλίων και την δημιουργία του αιμοπεταλιακού βύσματος, και άρα τον σχηματισμό του θρόμβου.

Από όλα τα διαθέσιμα αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα, αυτό με την μεγαλύτερη διατομική μεταβλητότητα και με την λιγότερο αποσαφηνισμένη φαρμακοκινητική είναι η κλοπιδογρέλη παρά

την πολυετή χρήσης της. Κυκλοφόρησε το 1997 στην Αμερική και το 1998 στην Ευρώπη και σε μεγάλο βαθμό αντικατέστησε στην καθημερινή κλινική πράξη την τικλοπιδίνη λόγω ευνοϊκότερου προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών στο αίμα, παρόμοιας αποτελεσματικότητας και ευκολότερου δασολογικού σχήματος (1 φορά την ημέρα). Παρότι η χορήγηση της σε στεφανιαίους ασθενείς, συνήθως μαζί με ασπιρίνη, είναι αποτελεσματική τόσο για την θεραπεία όσο και για την πρόληψη, η χορήγηση της στην κλινική πράξη περιορίζεται από τα μειονεκτήματα όπως την καθυστερημένη έναρξη δράσης σε δόσεις προφύλαξης 75mg λόγω επίτευξης της σταθεροποιημένης κατάστασης σε 3-4 ημέρες, την μεγάλη διατομική μεταβλητότητα που οφείλεται κυρίως σε διαφορές στον μεταβολισμό της και τέλος την μη αντιστρεπτή αναστολή του υποδοχέα P2Y12.



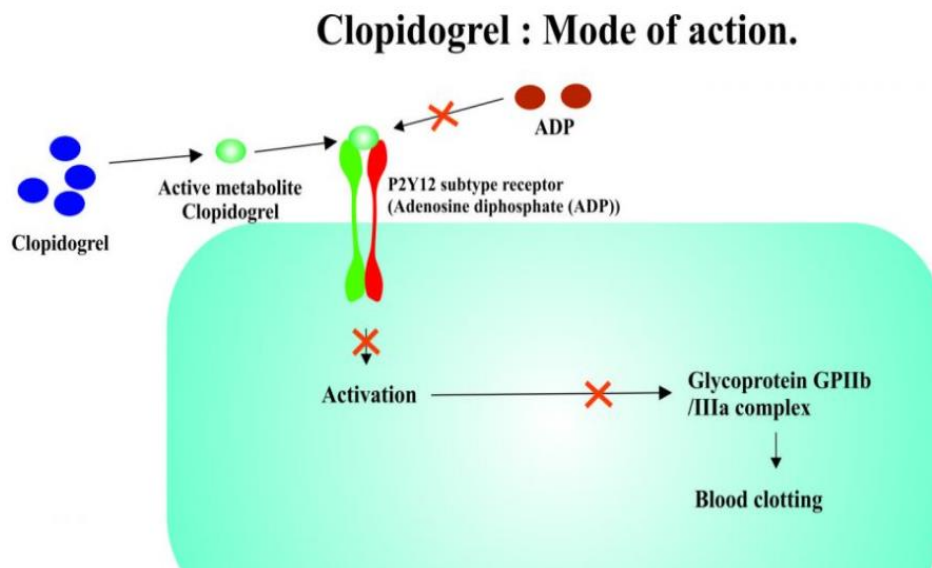
Σχήμα 6: Χημικός τύπος της κλοπιδογρέλης

## 1.2.2. Φαρμακοδυναμική

Η κλοπιδογρέλη είναι ένα προφάρμακο το οποίο μετατρέπεται σε ενεργό φάρμακο μετά το μεταβολισμό από τα ηπατικά ένζυμα του CYP450. Ο ενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης αναστέλλει εκλεκτικά τη σύνδεση του μορίου της διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) στον υποδοχέα P2Y12 των αιμοπεταλίων και τη διαμεσολαβούμενη από την ADP ενεργοποίηση της γλυκοπρωτεΐνης GPIIb/IIIa, αναστέλλοντας τελικά τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων (Σχήμα 7). Ο ενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης συνδέεται μη αντιστρεπτά με τα αιμοπετάλια, αδρανοποιώντας καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους, δηλαδή για περίπου 7-10 ημέρες και η φυσιολογική λειτουργία των αιμοπεταλίων επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα σύμφωνα με το ρυθμό αποκατάστασης-παραγωγής των αιμοπεταλίων από το μυελό των οστών.

Η συγκόλληση των αιμοπεταλίων διαμεσολαβούμενη από άλλους αγωνιστές εκτός του ADP επίσης αναστέλλεται, μέσω της αναστολής της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από το ήδη κυκλοφορούν ADP. Επειδή ο ενεργός μεταβολίτης είναι προϊόν των ενζύμων του CYP450, μέρος των οποίων υπόκεινται σε πολυμορφισμούς ή αναστέλλονται μερικώς ή πλήρως η λειτουργία τους από τροφές, φυσικά προϊόντα και φάρμακα, μέρος των ασθενών δε θα έχει τη βέλτιστη αναστολή συγκόλλησης αιμοπεταλίων (αντίσταση στη θεραπεία με κλοπιδογρέλη). Επαναλαμβανόμενες δόσεις των 75mg τη μέρα προκαλούν σημαντική αναστολή της διαμεσολαβούμενης από το ADP συγκόλλησης των αιμοπεταλίων από την πρώτη κιόλας ημέρα. Αυτή η δράση αυξάνεται προοδευτικά και φθάνει στη σταθερή κατάσταση (steady state) μεταξύ της 3ης και 7ης ημέρας. Στη σταθερή κατάσταση, η μέση αναστολή των αιμοπεταλίων στη δόση των 75mg υπολογίστηκε μεταξύ 40-60%. Η συγκόλληση των αιμοπεταλίων και ο χρόνος πήξης του αίματος επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα εντός 5 ημερών μετά την απότομη διακοπή του φαρμάκου[14]. Επίσης, σε ασθενείς έτοιμους να υποβληθούν σε

διαδερμική επέμβαση στεφανιαίων αρτηριών, δόση εφόδου 600mg κλοπιδογρέλης οδήγησε σε μέγιστη αναστολή συγκόλλησης αιμοπεταλίων εντός 2 ωρών[15].



Σχήμα 7:Μηχανισμός δράσης της κλοπιδογρέλης

### 1.2.3. Φαρμακοκινητική

#### 1.2.3.1. Απορρόφηση

Μετά από εφάπαξ αλλά και επαναλαμβανόμενες per-os δόσεις 75mg τη μέρα διαπιστώθηκε ότι η απορρόφηση της κλοπιδογρέλης είναι ταχύτατη και απορροφάται τουλάχιστον το 50% της δόσης στο λεπτό έντερο. Οι μέσες τιμές  $C_{max}$  του μητρικού μορίου της κλοπιδογρέλης (κατά προσέγγιση 2.2-2.5 ng/ml μετά από μονή per-os δόση των 75mg), παρατηρήθηκαν περίπου 45 λεπτά μετά τη χορήγηση. Η απορρόφηση υπολογίστηκε τουλάχιστον στο 50% της δόσης βάσει των μεταβολιτών της κλοπιδογρέλης στα ούρα[14].

Σε χορήγηση δόσεων 50-150mg το  $T_{max}$  υπολογίστηκε σε 0,8-1,0h μετά από 8 ώρες νηστεία και παράλληλα διαπιστώθηκε γραμμική αύξηση της έκτασης της απορρόφησης (area under the curve,AUC) με την αύξηση της δόσης. Η μέγιστη συγκέντρωση  $C_{max}$  (ng/mL) του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης ανάλογα με την χορηγηθείσα δόση υπολογίστηκε[16]:

Πίνακας 1:Μέσες συγκεντρώσεις  $C_{max}$  ύστερα από χορήγηση εφάπαξ δόσεων 50,75,100,150 mg σε 12 άνδρες ασθενείς[16].

Δόση	50mg	75mg	100mg	150mg
$C_{max}$	1,6±0,30	2,9 ± 0,68	3,1 ± 0,94	4,9 ± 1,22

Μετά από χορήγηση δόση φόρτισης 300mg σε 17 ασθενείς και δόση συντήρησης 75mg σε 45 ασθενείς καθημερινά για μία εβδομάδα, τα επίπεδα του μητρικού μορίου, του ενεργού και του ανενεργού μεταβολίτη βρέθηκαν[17]:

Πίνακας 2: Φαρμακοκινητικές παράμετροι μητρικού μορίου, ανενεργού και ενεργού μεταβολίτη ύστερα από την χορήγηση εφάπαξ δόσης εφόδου 300mg και χορήγηση δόσης συντήρησης 75mg για 7 ημέρες[17].

Δόση=75mg	Ενεργός μεταβολίτης	Ανενεργός μεταβολίτης	Κλοπιδογρέλη
C <sub>max</sub>	7.13 ± 6.32 ng/ml	2.52 ± 1,75μg/ml	2.04 ± 2.00 ng/ml
T <sub>max</sub> (h)	1.04 ± 0.53	1.37 ± 0.74	1.40 ± 1.07
t <sub>1/2</sub> (h)	0.90 ± 0.86	7.14 ± 3.32	1.71 ± 1.28
Δόση=300mg			
C <sub>max</sub>	17.92 ± 20.38 ng/ml	8.46 ± 3.77 μg/ml	4.51 ± 3.42 ng/ml
t <sub>max</sub> (h)	0.83 ± 0.29	1.61 ± 1.21	1.17 ± 0.76
t <sub>1/2</sub> (h)	0.84 ± 0.20	7.11 ± 3.50	1.99 ± 0.44

Για δόση φόρτισης 300mg σε 28 γυναίκες με σταθερή στεφανιαία νόσο και χωρίς προηγούμενη λήψη κλοπιδογρέλης βρέθηκαν τα εξής[18]:

Πίνακας 3:Φαρμακοκινητικές παράμετροι για μητρικό μόριο, ανενεργό και ενεργό μεταβολίτη ύστερα από δόση εφόδου 300mg σε 28 στεφανιαίες γυναίκες[18].

Φαρμακοκινητική παράμετρος	Κλοπιδογρέλη-Μητρικό μόριο	Ανενεργός μεταβολίτης	Ενεργός μεταβολίτης
C <sub>max</sub>	14,5±9,6ng/ml	6,2±5,2μg/ml	17,4±17,9ng/ml
T <sub>max</sub> (min)	70,8±33,5	72,9±43,2	54,6±28,3
T <sub>1/2</sub> (min)	60,0±28,8	83,6±32,5	45,4±31,5
AUC(0,240,min)	1498±1122ng/ml*h	655±515μg/ml*h	1406±1465ng/ml*h

Τέλος, σε χορήγηση υψηλής δόσης εφόδου 600mg σε 10 ασθενείς βρέθηκε[19]:

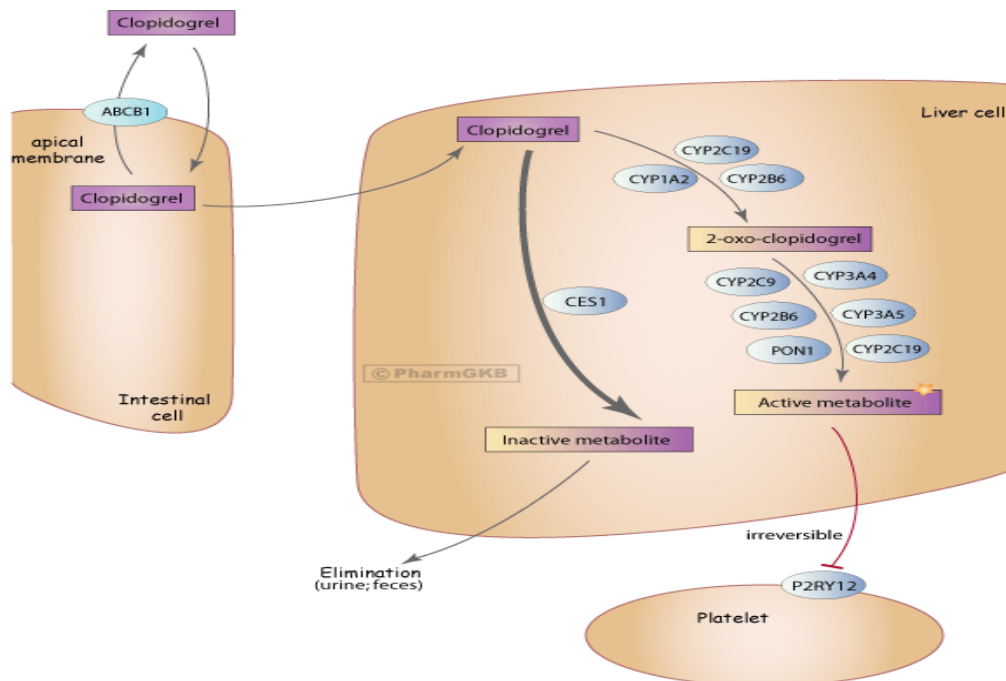
Πίνακας 4:Φαρμακοκινητικές παράμετροι ύστερα από χορήγηση εφάπαξ δόσης 600mg σε 10 υγιείς συμμετέχοντες (9 άνδρες,1 γυναίκα)[19].

Φαρμακοκινητική παράμετρος	Ανενεργός μεταβολίτης	Κλοπιδογρέλη-Μητρικό μόριο
C <sub>max</sub>	43±16,9μg/ml	38±22,9ng/ml
T <sub>max</sub> (h)	1,6±0,9h	1,4±0,7h
T <sub>1/2</sub> (h)	1,9±0,9h	1,0±0,5h
AUC(0,240)	198,6±52,4μg/ml*h	125,5±60ng/ml*h

Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει στον περιορισμό της απορρόφησης της κλοπιδογρέλης από την p-γλυκοπρωτεΐνη (P-grp), έναν ATP-εξαρτώμενο μεταφορέα που αποβάλλει την κλοπιδογρέλη πίσω στον γαστρεντερικό σωλήνα και μειώνει έτσι την απορρόφηση της. Κωδικοποιείται από το ABCB1 γονίδιο και εντοπίζεται στο γαστρεντερικό επιθήλιο[20]. Πιθανές μεταλλάξεις του γονιδίου ABCB1 που κωδικοποιεί την συγκεκριμένη γλυκοπρωτεΐνη πιθανόν να επηρεάζει το φαρμακοδυναμικό αποτέλεσμα της κλοπιδογρέλης.

### 1.2.3.2. Μεταβολισμός

Αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα της φαρμακοκινητικής της κλοπιδογρέλης, εφόσον είναι απαραίτητος προκειμένου να ασκήσει την δράση της από προφάρμακο αλλά και επειδή έχει ενοχοποιηθεί για το μεγαλύτερο τμήμα της διατομικής μεταβλητότητας, και άρα στις διαφορές στην αντιαιμοπεταλιακή της δράση μεταξύ των διαφόρων ασθενών. Μόλις απορροφηθεί, η κλοπιδογρέλη μεταφέρεται μέσω της πυλαίας φλέβας στο ήπαρ προκειμένου να μεταβολιστεί. Μόλις φτάσει στο ήπαρ, ένας αριθμός ενζύμων του κυτοχρώματος CYP450, μεταξύ των οποίων τα CYP2C19, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9 και CYP3A4, συμμετέχουν στη βιομετατροπή της κλοπιδογρέλης σε δύο βήματα. Αρχικά, η 2-οξο-κλοπιδογρέλη ένα ενδιάμεσο και αδρανές φαρμακολογικά προϊόν συντίθεται και στο δεύτερο στάδιο διαμορφώνεται ο φαρμακολογικά ενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης. Ταυτόχρονα, ένα μεγάλο ποσοστό της απορροφούμενης κλοπιδογρέλης υφίσταται ισχυρό φαινόμενο πρώτης δίοδου από την καρβοξυλεστεράση CES1 στο γαστρεντερικό επιθήλιο, στο αίμα και στο ήπαρ με ένα 85-90% ποσοστό της απορροφηθείσας δόσης να μετατρέπεται σε έναν αδρανή φαρμακολογικά καρβοξυλικό μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης. Ως συνέπεια, ένα 2% περίπου της χορηγούμενης δόσης της κλοπιδογρέλης μετατρέπεται στον ενεργό μεταβολίτη της και φτάνει την συστηματική κυκλοφορία προκειμένου να ασκήσει την αντιαιμοπεταλιακή του δράση[21](Σχήμα 8).



Σχήμα 8: Η πορεία της κλοπιδογρέλης στο ανθρώπινο σώμα από τη στιγμή της απορρόφησης της μέχρι και την επίτευξη της αντιαιμοπεταλιακής της δράσης.

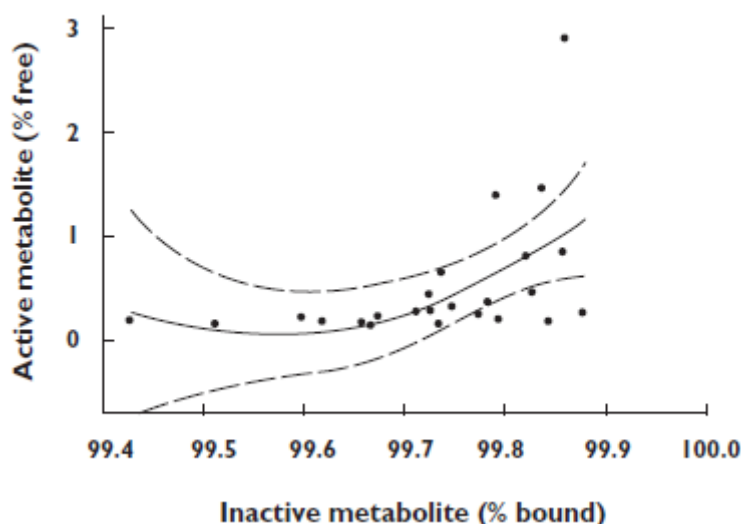
In vitro ενζυματικές κινητικές μελέτες κατέδειξαν το ποσοστό συμμετοχής του κάθε CYP στον μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης. Αναλυτικότερα, το CYP1A2 (35.8%), CYP2B6 (19.4%) and CYP2C19 (44.9%) συνεισφέρουν κυρίως στον σχηματισμό του ενδιάμεσου αδρανή μεταβολίτη της 2-οξο-κλοπιδογρέλης ενώ τα CYP2B6 (32.9%), CYP2C9 (6.79%), CYP2C19 (20.6%) and CYP3A4 (39.8%) συμμετέχουν κυρίως στην δημιουργία του ενεργού μεταβολίτη που ασκεί την αντιαιμοπεταλιακή δράση. Επομένως, είναι εμφανές ότι το CYP2C19 συνεισφέρει παραπάνω από το 50% στην συνολική βιομετατροπή της κλοπιδογρέλης στον ενεργό μεταβολίτη, καθιστώντας το πολύ σημαντικό ώστε να ασκήσει η κλοπιδογρέλη την αντιαιμοπεταλιακή της δράση ενώ οι υπόλοιπες



ομάδες ενζύμων του CYP450 συμμετέχουν στο σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη σε μικρότερο βαθμό[22].

### 1.2.3.3. Κατανομή

Η σύνδεση της κλοπιδογρέλης και του ανενεργού μεταβολίτη της με τις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι πολύ υψηλή, με την πρωτεϊνοσύνδεση της μητρικής ουσίας να είναι 98% ενώ του ανενεργού μεταβολίτη 94% με την αλβουμίνη. Βρέθηκε επίσης ότι σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος δεν είχε προσεγγίσει τον κορεσμό σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων[14]. Επιπλέον, αποκαλύφθηκε ότι οι ολικές συγκεντρώσεις του ανενεργού μεταβολίτη παρουσιάζουν υψηλή συσχέτιση και με τα ολικά επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη ( $r=0,83, p<0,001$ ) όπως επίσης και με τα ελεύθερα επίπεδα του ( $r=0,84, p<0,001$ ). Διαπιστώθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ των ελεύθερων συγκεντρώσεων του ενεργού μεταβολίτη με τις ελεύθερες συγκεντρώσεις του ανενεργού μεταβολίτη ( $r=0,58, p<0,01$ ) και ότι το ελεύθερο κλάσμα του ενεργού μεταβολίτη αυξήθηκε με την αύξηση της σύνδεσης του ανενεργού μεταβολίτη ( $r=0,46, p<0,05$ ). Επιβεβαιώθηκε τέλος, το υψηλό ποσοστό σύνδεσης τόσο και των δύο μεταβολιτών, ενεργού και ανενεργού (<1%)[18].(Σχήμα 9)



Σχήμα 9: Η συμπαγής γραμμή αντιπροσωπεύει την γραμμή της ανάλυσης παλινδρόμησης ενώ οι δύο διακεκομμένες το 95% διάστημα εμπιστοσύνης[18].

Στοιχεία για τον όγκο κατανομής υπάρχουν από πληθυσμιακές μελέτες. Πιο συγκεκριμένα:

- Σε ένα πληθυσμιακό φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό μοντέλο από 79 Κορεάτες ασθενείς (44 υγιείς και 35 με ιστορικό εγκεφαλικού), ο όγκος κατανομής του ανενεργού μεταβολίτη στο κεντρικό διαμέρισμα υπολογίστηκε στα 21L ενώ ο όγκος του περιφερικού διαμερίσματος υπολογίστηκε στα 38,8L[23].
- Σε άλλο ένα πληθυσμιακό φαρμακοκινητικό μοντέλο σε 76 υγιείς Ιορδάνιους ασθενείς, ύστερα από άπαξ χορήγηση 75mg κλοπιδογρέλης βρέθηκε ο όγκος κατανομής του ανενεργού μεταβολίτη στο κεντρικό διαμέρισμα ίσος με 14,3 L και στο περιφερικό διαμέρισμα ίσος με 82,1L[24].

Επιπλέον ο όγκος του μητρικού μορίου της κλοπιδογρέλης ύστερα από δόση 75mg ισούται με  $39.24 \pm 33.52$  L ενώ ύστερα από δόση 300mg ίσος με  $45.50 \pm 19.22$  L[17] και του ενεργού μεταβολίτη ύστερα από χορήγηση 75mg κλοπιδογρέλης για 7 ημέρες ίσος με 7660 L στο κεντρικό διαμέρισμα και 4,89 L στο περιφερικό[25].

### 1.2.3.4. Κάθαρση

Μετά από per-os δόση 75mg σημασμένης  $^{14}\text{C}$ -labelled κλοπιδογρέλης, το 50% της δόσης απεκκρίθει στα ούρα και το 46% στα κόπρανα μετά από 120 ώρες. Ο χρόνος ημιζωής του μητρικού μορίου είναι 1-2 ώρες και του ανενεργού μεταβολίτη 1-8 ώρες μετά από μονή αλλά και πολλαπλή χορήγηση[26]. Αντιθέτως, ο χρόνος ημιζωής του μητρικού μορίου, του ενεργού αλλά και ανενεργού μεταβολίτη μετά από χορήγηση 75mg κλοπιδογρέλης επί μια εβδομάδα ή χορήγηση δόσης φόρτισης 300mg βρέθηκε να είναι [17]:

Πίνακας 5:Φαρμακοκινητικές παράμετροι μητρικού μορίου, ανενεργού και ενεργού μεταβολίτη ύστερα από την χορήγηση εφάπαξ δόσης εφόδου 300mg και χορήγηση δόσης συντήρησης 75mg για 7 ημέρες[17].

Φαρμακοκινητική παράμετρος	Κλοπιδογρέλη-Μητρικό μόριο	Ενεργός μεταβολίτης	Ανενεργός μεταβολίτης
Δόση 75mg	-	-	-
t1/2(hr)	$1.71 \pm 1.28$	$0.90 \pm 0.86$	$7.14 \pm 3.32$
Δόση 300mg	-	-	-
t1/2(hr)	$1.99 \pm 0.44$	$0.84 \pm 0.20$	$7.11 \pm 3.50$

Επίσης, η κάθαρση του μητρικού μορίου υπολογίστηκε  $18.96 \pm 15.89$  και  $16.98 \pm 10.41$  L/hr για δόσεις 75 και 300mg αντίστοιχα [17] ενώ η κάθαρση του ενεργού μεταβολίτη βρέθηκε ίση με 14,5 L/hr[25] έπειτα από χορήγηση δόσης 75mg.

### 1.2.4.Ανεπιθύμητες ενέργειες

Όπως όλα τα φάρμακα, έτσι και η κλοπιδογρέλη πέρα από την επιθυμητή αντιαιμοπεταλιακή της δράση, μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες στους ασθενείς. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που αναφέρονται στο SPC(summary of products characteristics)του φαρμάκου και που παρατηρήθηκαν είτε στις κλινικές μελέτες είτε κατά τη διάρκεια της φαρμακοεπαγρύπνησης παρατίθενται στον κάτωθι πίνακα. Η κατηγοριοποίηση τους γίνεται σύμφωνα με τη συχνότητα εμφάνισής τους: πολύ συχνές ( $\geq 1/10$ ), συχνές ( $\geq 1/100$  με  $< 1/10$ ),όχι συχνές ( $\geq 1/1,000$  με  $< 1/100$ ), σπάνιες ( $\geq 1/10,000$  με  $< 1/1,000$ ), πολύ σπάνιες ( $< 1/10,000$ ), άγνωστης συχνότητας/δεν μπορεί να εκτιμηθεί από τα δεδομένα[14](Πίνακας 1).

Πίνακας 6:Ανεπιθύμητες ενέργειες κλοπιδογρέλης ανάλογα με τη συχνότητα εμφάνισης και το σύστημα που προσβάλλει[14].

ΣΥΣΤΗΜΑ	ΣΥΝΗΘΕΙΣ	ΑΣΥΝΗΘΕΙΣ	ΣΠΑΝΙΕΣ	ΠΟΛΥ ΣΠΑΝΙΕΣ
Αγγειακό και λεμφικό σύστημα	Αιμάτωμα	Θρομβοκυτοπενία Ηωσινοφιλία Λευκοπενία	Ουδετεροφιλία	Πορφύρα Απλαστική αναιμία Πανκυτοπενία Σοβαρή θρομβοκυτοπενία Αναιμία
Ανοσοποιητικό				Ορονοσία Αναφυλαξία
Ψυχιατρικές διαταραχές				Σύγχυση Παραισθήσεις
Νευρικό σύστημα		Ενδοκρανιακή αιμορραγία Πονοκέφαλος Παραισθησίες Ζαλάδα		Διαταραχές γεύσης
Οφθαλμοί		Αιμορραγία		
Ωτά και λαβύρινθος			Τλιγγος	
Αναπνευστικό σύστημα	Επίσταξη			Βρογχόσπασμος Διάμεση πνευμονίτιδα Αιμορραγία
Γαστρεντερικό σύστημα	Αιμορραγία Διάρροια Πόνος Δυσπεψία	Έλκος Γαστρίτιδα Έμετος Ναυτία Δυσκοιλιότητα	Οπισθοπεριτοναϊκή ή αιμορραγία	Θανατηφόρος αιμορραγία Στοματίτιδα Οξεία ηπατική ανεπάρκεια Αύξηση ηπατικών ενζύμων
Μυοσκελετικό σύστημα				Αιμορραγία Αρθρίτιδα Αρθραλγία Μυαλγία
Νεφρικό σύστημα		Αιματουρία		Σπειραματονεφρίτιδα Αύξηση κρεατινίνης ορού
Γενικές				Πυρετός
Δέρμα	Μελανιές	Εξάνθημα Κνησμός Πορφύρα		Steven johnson Αγγειοοίδημα Ουρτικαρία Έκζεμα Λειχήνας

Παρότι σπάνια, η ηπατοτοξικότητα από την κλοπιδογρέλη μπορεί να είναι από ήπια που εκδηλώνεται με αύξηση των ηπατικών ενζύμων στη γενική αίματος έως και πολύ σοβαρή, που μπορεί να οδηγήσει σε οξεία ηπατική ανεπάρκεια. Πρόσφατα, φάνηκε ότι η αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων CYP2C19 και CYP2B6 είναι παράγοντες προδιάθεσης για αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ηπατικής προσβολής από την κλοπιδογρέλη, ένζυμα όμως απαραίτητα για την βιομετατροπή της κλοπιδογρέλης στον ενεργό μεταβολίτη. Το συμπέρασμα προέκυψε ύστερα από έκθεση ηπατοκυττάρων αρουραίου σε υψηλές δόσεις κλοπιδογρέλης (100μM και 300Mμ), η οποία οδήγησε σε αιφνίδια αύξηση των επιπέδων ALS,AST και χολερυθρίνης στο αίμα των αρουραίων. Η ηπατοτοξικότητα ήταν δυνατό να

αποτραπεί με προηγούμενη χορήγηση μη εκλεκτικού ανασταλτή του CYP450, γεγονός που επιβεβαιώνει το συμπέρασμα[27].

Τέλος, παρατηρήθηκε αυξημένο ποσοστό αντιδράσεων υπερευαισθησίας στην κλοπιδογρέλη από τη στιγμή που κυκλοφόρησε έναντι των ποσοστών που είχαν καταγραφεί στο SPC του φαρμάκου όταν κυκλοφόρησε. Σήμερα, υπολογίζεται ότι ένα περίπου 6% των ασθενών που λαμβάνει κλοπιδογρέλη θα εμφανίσει κάποιας μορφής αλλεργική αντίδραση, με την πιο συχνή εκδήλωση να είναι αυτή του δερματικού εξανθήματος. Συνήθως ενοχοποιείται η δόση συντήρησης και η πιθανότητα να εμφανιστεί αλλεργική αντίδραση δεν αυξάνεται με την χορήγηση δόσεων φόρτισης και ο πιθανότερος παθοφυσιολογικός μηχανισμός είναι μάλλον μέσω T-λεμφοκυττάρων[28].

### 1.2.5. Αλληλεπιδράσεις κλοπιδογρέλης με φάρμακα, συμπληρώματα και τροφές:

Η κλοπιδογρέλη, όπως και τα περισσότερα φάρμακα, συμμετέχουν σε πολλές αλληλεπιδράσεις τόσο σε επίπεδο φαρμακοκινητικής όσο και σε επίπεδο φαρμακοδυναμικής.

- Ακετυλοσαλικυλικό οξύ: Παρότι είναι ο πιο συνηθισμένος συνδυασμός αντιαιμοπεταλιακής αγωγής για προφύλαξη από καρδιαγγειακά συμβάντα, η συγχορήγηση κλοπιδογρέλης με ασπιρίνη αυξάνει τον κίνδυνο αιμορραγίας (3,9%) συγκριτικά με την χορήγηση μόνο ακετυλοσαλικυλικού οξέος (1,39%)[29]. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από τη μελέτη CURE όπου το 3,7% των ασθενών που λάμβανε κλοπιδογρέλη και ακετυλοσαλικυλικό οξύ εμφάνισε αιμορραγικά συμβάντα σε σχέση με το 2,7% των ασθενών που έλαβε μόνο ακετυλοσαλικυλικό οξύ[30]. Επιπλέον, στην μελέτη MATCH εμφανίστηκαν επεισόδια θανατηφόρου αιμορραγίας στο 2,6% των ασθενών που λάμβαναν το διπλό σχήμα σε σχέση με 1,3% που έλαβε μόνο ασπιρίνη[31] ενώ στη μελέτη CHARISMA ήταν αυξημένα τα περιστατικά μέτριας και σοβαρής αιμορραγίας στο διπλό σχήμα σε σχέση με το μονό (μέτρια αιμορραγία 2,1% και 1,3% αντίστοιχα, σοβαρή αιμορραγία 1,7% και 1,3% αντίστοιχα)[32].
- Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη: Τα ΜΣΑΦ λόγω του μηχανισμού δράσης τους, προκαλούν από μόνα τους μια μικρή αντιαιμοπεταλιακή δράση. Σε συγχορήγηση με κλοπιδογρέλη αυξάνεται το ποσοστό αιμορραγιών (2,9%) συγκριτικά με τη χορήγηση μόνο της κλοπιδογρέλης (1,67%)[29].
- Αναστολείς μετατρεπτικού ενζύμου αγγειοτενσίνης (AMEA): Οι AMEA μεταβολίζονται επίσης από το CES1 στο ήπαρ, που το τελευταίο αποτελεί και το κύριο ένζυμο υδρόλυσης προς τον ανενεργό μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης. Άρα λόγω ανταγωνισμού ως υπόστρωμα ενζύμου, η συγχορήγηση εναλαπρίλης και τραντολαπρίλης μείωσε τον μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης προς τον ανενεργό μεταβολίτη και αύξησε τον μεταβολισμό προς τη σύνθεση του ενεργού. Αυτό είχε ως τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού αιμορραγίας σε συγχορήγηση κλοπιδογρέλης με AMEA (1,1%) σε σχέση με χορήγηση κλοπιδογρέλης (0,9%)[33].
- Ντασαμπουβίρη και ριτοναβίρη: Και τα δύο αντικα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C. Συγχορήγηση ωστόσο με κλοπιδογρέλη επηρεάζει τη φαρμακοκινητική της ντασαμπουβίρης λόγω ικανότητας αναστολής του CYP2C8 από τη κλοπιδογρέλη. Έτσι,

αυξάνει τα επίπεδα της ντασαμπουβίρης 5 φορές εφόσον η τελευταία μεταβολίζεται κυρίως από αυτό το υπόστρωμα. Παράλληλα, επειδή η ριτοναβίρη αναστέλλει το υπόστρωμα CYP3A4 που εμπλέκεται στο μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης, μειώνει το AUC<sub>4h</sub> του ενεργού μεταβολίτη κατά 51%[34].

- Πακλιταξέλη: Η πακλιταξέλη μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ από το CYP2C8 το οποίο ενδέχεται να ανασταλεί από ενδεχομένη χρήση της κλοπιδογρέλης. Έτσι, παρατηρήθηκε αυξημένη επίπτωση περιφερικής νευροπάθειας, που αποτελεί κλασική ανεπιθύμητη ενέργεια της πακλιταξέλης, σε συγχορήγηση με κλοπιδογρέλη, το οποίο ήταν ακόμα πιο αυξημένο με υψηλότερες δόσεις πακλιταξέλης[35].
- Ριφαμπικίνη: Η ριφαμπικίνη είναι ένας ισχυρός επαγωγέας του CYP450, άρα ενδεχόμενη συγχορήγηση με κλοπιδογρέλη μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του μεταβολισμού της, και άρα αυξημένη σύνθεση του ενεργού μεταβολίτη. Πράγματι, τα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη σε θεραπεία με 75mg κλοπιδογρέλης ύστερα από χορήγηση 600mg ριφαμπικίνης την ημέρα ήταν σημαντικά αυξημένα[36].
- Μορφίνη: Η μορφίνη χρησιμοποιείται πολλές φορές για την ανακούφιση από τον οξύ πόνο σε έμφραγμα του μυοκαρδίου. Συγχορήγηση όμως με κλοπιδογρέλη οδηγεί σε καθυστερημένη απορρόφηση αυτής, που μειώνει τα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη κατά 34% οδηγώντας πιθανόν σε ανεπιτυχή αποτελέσματα[37].
- Πιογλιταζόνη: Αυτός ο αντιδιαβητικός παράγοντας μεταβολίζεται κυρίως από το CYP2C8. Άρα, σε πιθανή ταυτόχρονη χορήγηση με κλοπιδογρέλη, αυξάνονται τα επίπεδα του κατά 2,1 φορές, προκαλώντας ενδεχομένως αυξημένη επίπτωση των δοσοεξαρτώμενων ανεπιθύμητων ενεργειών της όπως κατακράτηση υγρών[38].
- Σιμετιδίνη: Σε αναδρομικές μελέτες βρέθηκε ότι η συγχορήγηση κλοπιδογρέλης και σιμετιδίνης αύξησε τον κίνδυνο επαναθρόμβωσης εντός 90 ημερών[39]. Σε άλλη αναδρομική μελέτη βρέθηκε ότι η συγχορήγηση κλοπιδογρέλης και σιμετιδίνης αύξησε την πιθανότητα επανεισαγωγής στο νοσοκομείο για OEM ή του θανάτου σε σχέση με τη μη χορήγηση σιμετιδίνης (28,6%,11,6% αντίστοιχα)[40].
- Κετοκοναζόλη: Ως ισχυρός αναστολέας του CYP450, μειώνει το σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη και την αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης[41].
- Κουμαρίνες, Ηπαρίνες, Ριβαροξαμπάνη, Μπιβαλιρουδίνη, Δαβιγατράνη, Fondaparinux: Η συγχορήγηση κλοπιδογρέλης με τους ανωτέρω αντιπηκτικούς παράγοντες αυξάνει τον κίνδυνο αιμορραγίας[42,43].
- Αναστολείς αντλίας πρωτονίων: Η ομεπραζόλη και η εσομεπραζόλη είναι ισχυροί αναστολείς του ισοενζύμου CYP2C19 και μειώνουν το σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη και την αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης, ελαττώνοντας σημαντικά την θεραπευτική της δράση[44,45,46].

- Φλουβοξαμίνη: Η φλουβοξαμίνη, εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης σεροτονίνης και ισχυρός αναστολέας του CYP2C19, παρεμποδίζει την αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης μειώνοντας το σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη[47].
- Η χρήση του καπνού μέσω του καπνίσματος οδηγεί σε επαγωγή του κυτοχρώματος CYP450 και ιδιαίτερα του CYP1A2, αυξάνοντας το μεταβολισμό του μητρικού μορίου και την επακόλουθη σύνθεση του ενεργού μεταβολίτη, οδηγώντας στο λεγόμενο smoking paradox όπου το κάπνισμα παρότι το αδιαμφισβήτητο αρνητικό αποτέλεσμα στην στεφανιαία νόσο, ωφελεί στην θεραπεία με κλοπιδογρέλη λόγω ενισχυμένου αντιαιμοπεταλιακού αποτελέσματος από αυτήν[48,49,50,51].
- Χυμός grapefruit: Ο χυμός grapefruit μέσω των φλαβονοειδών που περιέχει, αναστέλλει το κυτόχρωμα CYP3A4 και σε μικρότερο ποσοστό το CYP2C19, ελαττώνοντας σημαντικά το μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης προς τον ενεργό μεταβολίτη και μειώνοντας το θεραπευτικό της αποτέλεσμα ακόμα και σε ποσότητες των 200ml[52].

## 1.2.6. Μέθοδοι μέτρησης αναστολής συγκόλλησης αιμοπεταλίων

Όπως επισημάνθηκε, η θεραπεία με αντιαιμοπεταλιακούς παράγοντες αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο για την πρόληψη ή θεραπεία της στεφανιαίας νόσου. Ωστόσο, ένα περίπου 10% των ασθενών υπό θεραπεία με ασπιρίνη ή/και κλοπιδογρέλη παρουσιάζουν ισχαιμικά συμβάντα υποδεικνύοντας μεγάλη διατομική μεταβλητότητα στην αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία, με τα ευρήματα από τις κλινικές μελέτες να αποκαλύπτουν μεγάλη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων υπό αυτήν. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η μέτρηση της αναστολής συγκόλλησης των αιμοπεταλίων αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα στην θεραπεία με αντιαιμοπεταλιακά φάρμακα και ειδικά υπό θεραπεία με την κλοπιδογρέλη. Οι μέθοδοι μέτρησης της αναστολής συγκόλλησης των αιμοπεταλίων είναι αρκετές και εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα μαζί με τα θετικά και τα αρνητικά χαρακτηριστικά τους[53]:

Πίνακας 7: Οι μέθοδοι μέτρησης της αναστολής συγκόλλησης των αιμοπεταλίων με τα θετικά και αρνητικά τους χαρακτηριστικά[53].

				Πρόβλεψη έκβασης	Παρακολούθηση	
Μέθοδος	Θετικά	Αρνητικά		Ασπιρίνη	Κλοπιδογρέλη	GP IIb/IIIa
Συγκόλληση Αιμοπεταλίων:						

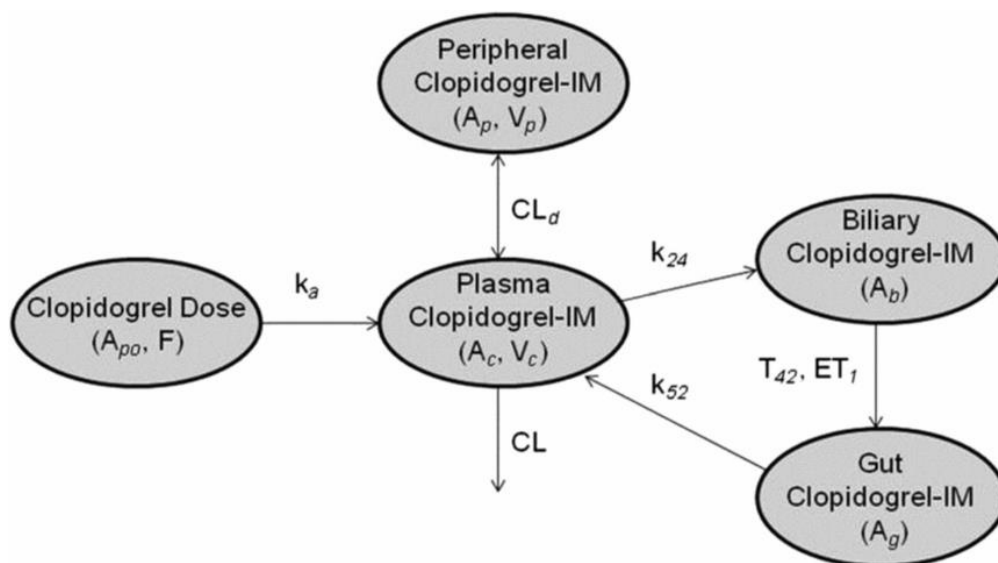
			Πρόβλεψη έκβασης	Παρακολούθηση		
Μέθοδος	Θετικά	Αρνητικά		Ασπιρίνη	Κλοπιδογρέλη	GP IIb/IIIa
<b>Turbidometric light transmittance</b>	gold standard μέθοδος	Χρονοβόρα, προετοιμασία δείγματος, κακή επαναληψιμότητα, έμπειρο προσωπικό	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
<b>Electrical impedance</b>	Ολικό αίμα	Χρονοβόρα, προετοιμασία δείγματος, κακή επαναληψιμότητα, έμπειρο προσωπικό	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Κυτταρομετρία ροής:						
<b>Assessment of platelet surface P-selectin, activated GPIIb/IIIa, leucocyte-platelet aggregates</b>	Ολικό αίμα, μικρός όγκος δείγματος	Προετοιμασία δείγματος, κακή αναπαραξιμότητα, έμπειρο προσωπικό	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
<b>VASP phosphorylation</b>	Ολικό αίμα, όγκος δείγματος, ειδική για τον υποδοχέα P <sub>2</sub> Y <sub>12</sub>	Προετοιμασία δείγματος, έμπειρο προσωπικό	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι

Μέθοδος	Πρόβλεψη έκβασης		Παρακολούθηση			
	Θετικά	Αρνητικά	Ασπιρίνη	Κλοπιδογρέλη	GP IIb/IIIa	
Παρακολούθηση θεραπείας:						
<b>VerifyNow</b>	Ολικό αίμα, εύκολη μέθοδος, μικρός όγκος δείγματος, γρήγορη	Απαιτούνται επιπλέον στοιχεία για τις τιμές-κατώφλι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
<b>Thrombelastogram</b>	Ολικό αίμα, μέτρηση σχηματισμού θρόμβου και διάλυσης του	Προετοιμασία δείγματος, χειροκίνητη χρήση πιπέτας	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
<b>Multiplate</b>	Ολικό αίμα, γρήγορη	Χειροκίνητη χρήση πιπέτας	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
<b>PFA-100</b>	Ολικό αίμα, εύκολη, γρήγορη, μικρός όγκος δείγματος	Επηρεάζεται από VWF, αιματοκρίτη, αιμοπετάλια, χειροκίνητη χρήση πιπέτας	Ναι	Ναι	-	-
<b>PlateletWorks</b>	Whole blood assay, ease of use, rapid, small sample volume	Δεν έχει δοκιμαστεί διεξοδικά	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι



## 1.2.7.Φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό μοντέλο περιγραφής της κλοπιδογρέλης.

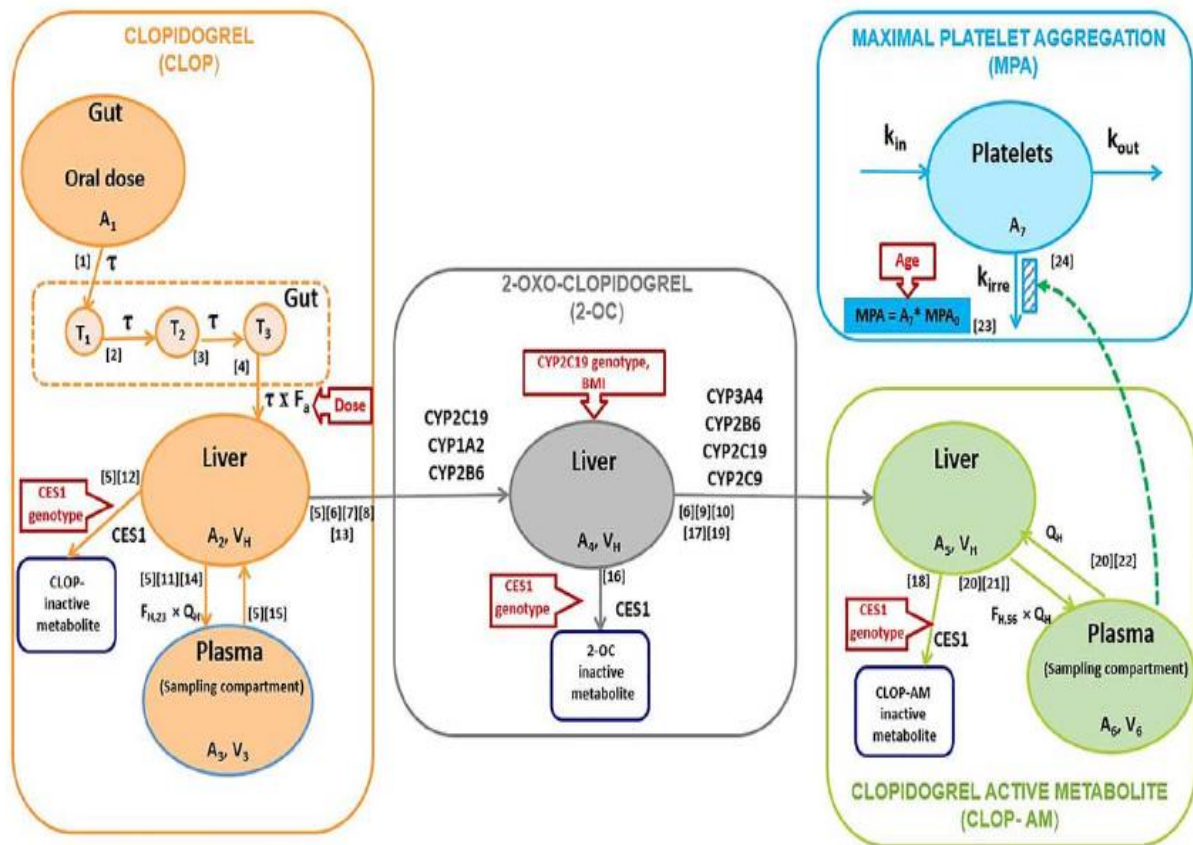
Σε Ιορδανούς ασθενείς αναπτύχθηκε διδιαμερισματικό φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό μοντέλο περιγραφής της κινητικής του ανενεργού μεταβολίτη με κινητική απορρόφησης και απέκκρισης πρώτης τάξεως και με χαρακτηριστικά εντεροηπατικής κυκλοφορίας. Η χορηγηθείσα δόση του μητρικού μορίου της κλοπιδογρέλης ( $A_{po}$ ) απορροφάται ταχύτατα από το λεπτό έντερο με κινητική πρώτης τάξεως και μεταβολίζεται εξίσου ταχύτατα από τις εστεράσες του αίματος (διαδικασίες που εκφράζονται από τον όρο  $F$ ). Παρουσιάζονται στη συνέχεια το κύριο και το περιφερικό διαμέρισμα με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά τους.



Σχήμα 10: Φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό μοντέλο του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης[24].

Λόγω παρατήρησης μικρών κορυφών του ανενεργού μεταβολίτη 4 ώρες μετά την απορρόφηση του μητρικού μορίου αυτό αποδόθηκε είτε στην εντεροηπατική κυκλοφορία του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης είτε στο μεταβολίτη υπό μορφή γλυκουρονιδίου ο οποίος στο έντερο μεταβολίζεται εκ νέου προς ανενεργό μεταβολίτη. Επομένως, στο διδιαμερισματικό μοντέλο προστέθηκαν τα διαμερίσματα της χολής και του εντέρου προς μίμηση της εντεροηπατικής κυκλοφορίας, με τον ανενεργό μεταβολίτη να συσσωρεύεται στη χολή και με κινητική μηδενικής τάξεως να διοχετεύεται στο έντερο, απ' όπου με κινητική πρώτης τάξεως επαναπορροφάται στην πυλαία κυκλοφορία.

Παράλληλα, σε μια προσπάθεια να βρεθεί η σημαντική διατομική μεταβλητότητα που χαρακτηρίζει τη θεραπεία με κλοπιδογρέλη, αναπτύχθηκε ένα φυσιολογικό φαρμακοκινητικό-φαρμακοδυναμικό μοντέλο που περιγράφει την πορεία της κλοπιδογρέλης στο ανθρώπινο σώμα, από τη στιγμή της χορήγησης και της απορρόφησης της, μέχρι και τον σταδιακό σχηματισμό της σε δύο βήματα στον ενεργό μεταβολίτη και την αναστολή του υποδοχέα P1Y12 από αυτόν. Η απορρόφηση της κλοπιδογρέλης από το έντερο ( $A_1$ ) στο ήπαρ ( $A_2$ ) μετά από  $per\ os$  χορήγηση περιγράφεται από ένα μεταβατικό (transit) διαμέρισμα και το κλάσμα της αρχικής δόσης που απορροφάται είναι  $F_a$  είναι 0,5. Για την ηπατική βιομετατροπή της κλοπιδογρέλης χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικά στοιχεία όπως όγκος ήπατος (1,5L), ηπατική ροή αίματος (90L/hr) και *in vivo*  $V_{max}$  τιμές κάθαρσης για κάθε ισόενζυμο CYP [54].



Σχήμα 11: Φαρμακοδυναμικό-φαρμακοκινητικό μοντέλο της κλοπιδογρέλης και του ενεργού μεταβολίτη της, με την ταυτόχρονη ενσωμάτωση φυσιολογικών χαρακτηριστικών.

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερο τμήμα της διατομικής μεταβλητότητας, ενσωματώθηκαν όλες εκείνες οι συμμεταβλητές που έχουν συσχετιστεί με πιθανή αποτυχία ή αντίσταση σε θεραπεία με κλοπιδογρέλη όπως ηλικία, παχυσαρκία και γενετικοί πολυμορφισμοί και έγινε εφικτό να αποδοθεί το 52% της συνολικής μεταβλητότητας με το υπόλοιπο 48% να παραμένει αδιευκρίνιστο. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρέαζαν την ανταπόκριση στην θεραπεία ήταν οι γενετικοί πολυμορφισμοί του CES1 και του CYP2C19, η ύπαρξη παχυσαρκίας ή αυξημένου σωματικού βάρους (BMI), το κλάσμα της δόσης που απορροφάται (Fa) καθώς και η ύπαρξη ηλικίας [54].

## 1.2.8. Αντίσταση στη θεραπεία με κλοπιδογρέλη

**Αντίσταση ή μη ανταπόκριση στην κλοπιδογρέλη** είναι ένα φαρμακοδυναμικό φαινόμενο όπου δεν υπάρχει κλινική διαφορά στην λειτουργία των αιμοπεταλίων συγκριτικά με τις τιμές αναφοράς. Σε μελέτες που μέτρησαν την ικανότητα συγκόλλησής των αιμοπεταλίων με την ADP ως αγωνιστή, βρέθηκε ότι μια μείωση της τάξης του <10% στην συνολική δραστικότητα των αιμοπεταλίων μετά την χορήγηση κλοπιδογρέλης, συγκριτικά με τις τιμές αναφοράς ορίζεται ως αντίσταση στη θεραπεία με κλοπιδογρέλη. Η αποτυχία στην θεραπεία με κλοπιδογρέλη επίσης ορίζεται ως η εμφάνιση ενός θρομβωτικού ή ισχαιμικού επεισοδίου κατά την διάρκεια θεραπείας με τον συγκεκριμένο αντιαιμοπεταλιακό παράγοντα και με ταυτόχρονη ύπαρξη αυξημένης αντιδραστικότητας αιμοπεταλίων στην διάρκεια της θεραπείας (High on platelet reactivity, HPR). Εκτιμάται ότι ένα 16-50% των ασθενών υπό θεραπεία με κλοπιδογρέλη έχει αυξημένη αντιδραστικότητα αιμοπεταλίων[55]. Πιο συγκεκριμένα, σε μία μελέτη, η μεταβλητότητα στην ανταπόκριση της κλοπιδογρέλης μέσω εύρεσης της αντιδραστικότητας των αιμοπεταλίων από το ADP και των ενεργοποιημένων GB ΠΒ/ΠΙΑ, μετρήθηκε πριν την εφαρμογή stent αλλά και κάθε μέρα για ένα μήνα μετά. Στους ασθενείς είχε χορηγηθεί 300mg κλοπιδογρέλης ως δόσης εφόδου την πρώτη μέρα και 75mg ως δόση συντήρησης για κάθε επόμενη μέρα. Έτσι, με βάση και τον ορισμό της αντίστασης στη θεραπεία που αναφέρθηκε προηγουμένως, το ποσοστό των ασθενών με αυξημένη αντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων την ημέρα 5 ήταν 31% και στο τέλος του μήνα ήταν 15% [56].

Η αντίσταση στην κλοπιδογρέλη οφείλεται σε πολλούς παράγοντες και το αποτέλεσμα της αντίστασης ενδέχεται να οφείλεται σε έναν ή σε συνδυασμό από αυτούς. Οι μεταβλητές που έχουν ενοχοποιηθεί ότι συνεισφέρουν στην μεταβλητότητα της ανταπόκρισης στην κλοπιδογρέλη είναι δημογραφικοί, γενετικοί πολυμορφισμοί ενζύμων καθώς και φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις. Πιο αναλυτικά:

### Δημογραφικές μεταβλητές:

- **Ηλικία:** Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει την σημαντική συσχέτιση της αυξημένης ηλικίας με του αυξημένου επιπολασμού εμφάνισης της HPR [57,58,59]. Παράλληλα, η κλινική εμπειρία έχει δείξει ότι η αυξημένη ηλικία συσχετίζεται με μια αύξηση των καρδιαγγειακών συμβάντων [60,61] ή των περιστατικών αιμορραγιών[62]. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν την επιτακτικότερη ανάγκη προσαρμογής της δοσολογίας της κλοπιδογρέλης στους γηραιότερους ασθενείς σε σχέση με τους νεότερους για να βελτιστοποιηθεί η αναστολή συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων αλλά και να αποφευχθούν αιμορραγικά επεισόδια.
- **Βάρος:** Το αυξημένο βάρος σώματος και η παχυσαρκία γενικότερα είναι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της κλοπιδογρέλης, το οποίο επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα πολλών μελετών[63,64]. Η μεταβλητότητα στην θεραπεία με κλοπιδογρέλη στους παχύσαρκους ασθενείς μπορεί να οφείλεται εν μέρει στην μειωμένη ενεργότητα των ηπατικών ενζύμων στους υπέρβαρους ασθενείς (κυρίως CYP2C9,CYP2C19 και CYP3A4)[65] οδηγώντας σε μειωμένα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη της και/ή στην αυξημένη έκφραση της CES1 η οποία μπορεί να προκαλέσει αυξημένη παραγωγή του ανενεργού μεταβολίτη της[66,67].
- **Φύλο:** Ο ρόλος του φύλου στην μεταβλητότητα της αποτελεσματικότητας της κλοπιδογρέλης έχει διερευνηθεί επίσης και έχει βρεθεί ίδια συστηματική συγκέντρωση ενεργού μεταβολίτη σε άνδρες και γυναίκες[58]. Επιπλέον, δεν έχει εντοπιστεί εμφανής διαφορά στην

φαρμακοδυναμική αλλά και στο κλινικό αποτέλεσμα μεταξύ ανδρών και γυναικών υπό θεραπεία με κλοπιδογρέλη[59].

- Φυλή: Αποτελεί ίσως το πιο σημαντικό δημογραφικό παράγοντα που ενδέχεται να συμβάλλει στην διατομική μεταβλητότητα της κλοπιδογρέλης, κυρίως λόγω του διαφορετικού γενετικού υποστρώματος αλλά και σε μικρότερο βαθμό λόγω του διαφορετικού τρόπου ζωής, διαίτας και συννοσηροτήτων. Είναι ευρέως γνωστό στις μέρες μας ότι το CYP2C19 γονίδιο υπόκειται σε διαφορετικούς πολυμορφισμούς ανάλογα με την φυλή. Αναλυτικότερα, το CYP2C19\*2 γονίδιο που είναι και το πιο συχνό γονίδιο μειωμένης ενεργότητας, ευρίσκεται σε ποσοστό 13% στους Καυκάσιους, 20% στους Αφροαμερικανούς και 28% στους Ασιάτες. Άλλο γονίδιο ελαττωμένης ενεργότητας, το CYP2C19\*3 που είναι πιο σπάνιο, απαντάται επίσης πιο συχνά στους Ασιάτες (5%) σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό (1%)[68]. Αντιθέτως, το CYP2C19\*17 που αποτελεί γονίδιο ενισχυμένης λειτουργίας εκφράζεται σε μικρότερο βαθμό στους Ασιάτες (6%) συγκριτικά με τους Καυκάσιους (16%) ή τους Αφροαμερικανούς (18%). Εκτός από το CYP2C19 που εμπλέκεται στο μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης, άλλα ένζυμα που εμφανίζουν διαφορετικό ποσοστό εμφάνισης ανά φυλή και συνεισφέρουν στην απορρόφηση και βιομετατροπή της κλοπιδογρέλης είναι το ABCB1 και το CYP2C9. Επομένως, είναι λογικό τα περιστατικά αντίστασης στην κλοπιδογρέλη να είναι υψηλότερα στον Ασιατικό πληθυσμό (Κινέζοι, Ιάπωνες, Κορεάτες) από ότι στους Καυκάσιους, γεγονός που επιβεβαιώνεται από μια μελέτη που φανέρωσε ένα ποσοστό 20-65% αντίστασης στην κλοπιδογρέλη στους Ασιατικούς πληθυσμούς, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο από τις κλινικές μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί στους Καυκάσιους[69].

### Γενετικοί πολυμορφισμοί ενζύμων:

- ABCB1: Η μετάλλαξη CT3435T του συγκεκριμένου γονιδίου έχει συσχετιστεί με διαφορές στην εντερική απορρόφηση των φαρμάκων και άρα στην από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα τους. Παρόλα αυτά, ο αντίκτυπος της στην φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική της κλοπιδογρέλης παραμένει αμφισβητήσιμος. Μια κλινική φαρμακοκινητική μελέτη σε ασθενείς υπό επέμβαση PCI μετά από χορήγηση δόσεων φόρτισης 300 ή 600mg έδειξε ότι η μέγιστη συγκέντρωση πλάσματος (C<sub>max</sub>) και η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC) του μητρικού μορίου και του ενεργού μεταβολίτη είναι σημαντικά χαμηλότερες σε 3435T ομοζυγώτες από ότι σε ετεροζυγώτες 3435C/T και wild type ομοζυγώτες C/C υποδεικνύοντας μια αλλαγή στην *per os* βιοδιαθεσιμότητα της κλοπιδογρέλης λόγω ενισχυμένης εκροής της από την μετάλλαξη CT3435T[20]. Ωστόσο, δεν επιβεβαιώθηκε η επιρροή της ABCB1 σε χαμηλότερες δόσεις των 75 και 150mg. Τέλος, μία μέτα-ανάλυση που διενεργήθηκε για να αξιολογήσει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο σε σχέση με την ABCB1 CT3435T μετάλλαξη έδειξε ότι η μετάλλαξη δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατομική μεταβλητότητα της κλοπιδογρέλης[70].
- CES1: Η ηπατική CES1 είναι μια ευρέως φάσματος υδρολάση, υπεύθυνη για την βιομετατροπή τόσο ενδοβιοτικών όσο και ξενοβιοτικών παραγόντων όπως κλοπιδογρέλη, AMEA και οσελταμιβίρη. Μια *in vitro* έρευνα ανέφερε ότι η υδρόλυση της κλοπιδογρέλης καθώς και του ενεργού μεταβολίτη της μειώθηκε στους ασθενείς με μετάλλαξη CES1 G143E, με συνέπεια τα αυξημένα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη[71]. Παράλληλα με την προηγούμενη μελέτη, η έρευνα PAPI αποκάλυψε ότι οι ετεροζυγώτες με το CES1 143E αλληλόμορφο έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα μητρικού μορίου και ενεργού μεταβολίτη

συγκριτικά με τους ομοζυγώτες CES1 143G (wild-type), με αποτέλεσμα πιο ενισχυμένο αντιαιμοπεταλιακό αποτέλεσμα[72]. Ωστόσο, περισσότερη έρευνα χρειάζεται για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της CES1 στην διατομική μεταβλητότητα που παρουσιάζεται στην θεραπεία με κλοπιδογρέλη.

- Ένζυμα του CYP κυτοχρώματος: Το ένζυμο CYP2C19 αποτελεί ίσως το σημαντικό ένζυμο του CYP κυτοχρώματος με βάσει τους 20 μέχρι στιγμής γενετικούς πολυμορφισμούς που έχουν βρεθεί. Τα CYP2C19\*2 και CYP2C19\*3 είναι τα πιο ευρέως διαδεδομένα αλληλία μειωμένης λειτουργίας και αντιπροσωπεύουν το 90% των μειωμένης ενεργότητας αλληλίων του CYP2C19 ενώ το CYP2C19\*17 έχει συνδεθεί με αυξημένη δραστικότητα και ενζυμική ισχύς του CYP2C19. Όλες οι μελέτες που περιλαμβάνουν ασθενείς με ένα αλληλίο μειωμένης δραστικότητας (είτε CYP2C19\*2 ή CYP2C19\*3) έχουν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα ενεργού μεταβολίτη και άρα αντιαιμοπεταλιακή δράση σε σχέση με τους wild type ομοζυγώτες[73,74,75]. Συνεπώς, υπάρχει αυξημένη δραστικότητα των αιμοπεταλίων υπό θεραπεία με κλοπιδογρέλη και ο ασθενής έχει αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακού συμβάντος όπως καρδιακό θάνατο, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και εγκεφαλικού όπως επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα τριών μετά-αναλύσεων[76,77,78]. Αυτά τα αποτελέσματα προέτρεψαν και το FDA να εισάγει black box warning για την κλοπιδογρέλη ώστε να αποφεύγεται η χορήγηση της σε ασθενείς που είναι ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες με τα μειωμένης ενεργότητας αλληλόμορφα του CYP2C19 λόγω αυξημένου κινδύνου αποτυχίας της θεραπείας και εμφάνισης καρδιαγγειακών συμβάντων. Αντιθέτως, ο αντίκτυπος του CYP2C19\*17 μάλλον είναι ασήμαντος εφόσον δεν έχει παρατηρηθεί διαφορά στο αποτέλεσμα μεταξύ wild type φυσιολογικών ασθενών και ασθενών με αλληλόμορφο CYP2C19\*17. Τέλος, δεν εντοπίστηκε ισχυρή συσχέτιση μεταξύ γενετικών πολυμορφισμών των CYP2B6, CYP2C9, CYP1A2 και CYP3A4, ενζύμων που συμμετέχουν σε μικρό ποσοστό στον σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη, και της φαρμακοκινητικής-φαρμακοδυναμικής της κλοπιδογρέλης καθώς και του τελικού κλινικού αποτελέσματος[22].

- PON-1: Η paraoxonase-1 είναι μια αρωματική εστεράση που πιστεύεται ότι έχει αντιοξειδωτικές και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Πιθανόν η μετάλλαξη PON1 Q192R να διαδραματίζει κάποιο ρόλο και να ρυθμίζει τη βιομετατροπή του μητρικού μορίου της κλοπιδογρέλης στον ενεργό μεταβολίτη της[79], ωστόσο χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να καθοριστεί ο ρόλος της στην διατομική μεταβλητότητα που παρουσιάζει η κλοπιδογρέλη.

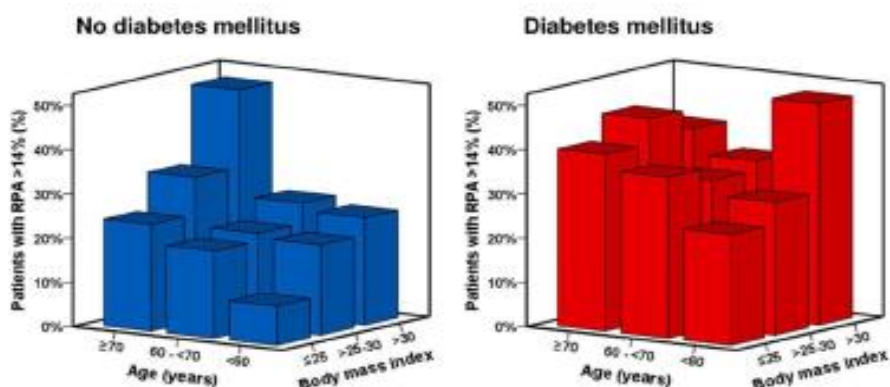
### Φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις:

- Αναστολείς αντλίας πρωτονίων: Εφόσον η αιμορραγία από το γαστρεντερικό είναι μια συχνή ανεπιθύμητη ενέργεια της κλοπιδογρέλης, ειδικά αν συνδυάζεται με ασπιρίνη, οι αναστολείς αντλίας πρωτονίων (Proton pumps inhibitors, PPIs) συχνά συνχορηγούνται με αυτές μιας και αποτελούν τα αντιεκκριτικά φάρμακα εκλογής για την μείωση της φαρμακοεπαγόμενης αιμορραγίας από το γαστρεντερικό. In vitro έρευνα αποκάλυψε ότι η ομεπραζόλη, η εσομεπραζόλη και η λανσοπραζόλη και όχι η παντοπραζόλη είναι ισχυροί αναστολείς του CYP2C19 μειώνοντας την μετατροπή της κλοπιδογρέλης στον ενεργό μεταβολίτη και ελαττώνοντας το συνολικό αντιαιμοπεταλιακό αποτέλεσμα[80]. Από κλινικές φαρμακοκινητικές-φαρμακοδυναμικές (PK-PD) μελέτες επιβεβαιώθηκε ότι η ομεπραζόλη, η εσομεπραζόλη αλλά όχι η παντοπραζόλη παρεμβαίνουν στην PK-PD της κλοπιδογρέλης, με την μεγαλύτερη επιρροή να ασκεί η ομεπραζόλη που οδηγεί σε σημαντική μείωση του

σηματισμού του ενεργού μεταβολίτη και σε ελαττωμένο αντιαιμοπεταλιακό αποτέλεσμα[81-84]. Για αυτό ακριβώς το λόγο το 2009 και το 2011 το FDA εξέδωσε ανακοίνωση με την οποία τόνιζε την αποφυγή συγχορήγησης της κλοπιδογρέλης με ομεπραζόλη ή εσομεπραζόλη λόγω αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου από τα μειωμένα επίπεδα του ενεργού μεταβολίτη[85]. Παρόλα αυτά, οι μετά-αναλύσεις έδειξαν ότι δεν υπάρχει κλινικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ κλοπιδογρέλης και PPIs και ότι είναι μια ασφαλής επιλογή για την προστασία από ενδεχόμενη αιμορραγία από το γαστρεντερικό. Τα αποτελέσματα όμως αυτών των μετά-αναλύσεων πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή λόγω των περιορισμών που τις χαρακτηρίζει (42% έπαιρναν κλοπιδογρέλη για την θεραπεία του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου, γρήγορος τερματισμός της μελέτης και χρησιμοποίηση σταθερών δοσολογιών) και προτίμηση θα πρέπει να δίνεται στον PPI που αναστέλλει λιγότερο το CYP2C19 όταν χορηγείται ήδη στον ασθενή κλοπιδογρέλη[86-88].

- Στατίνες: Η κλοπιδογρέλη συχνά συνταγογραφείται μαζί με στατίνες για την επιτυχή θεραπεία ή πρόληψη της στεφανιαίας νόσου. Υπήρχε έντονη ανησυχία ότι αυτές θα μπορούσαν να παρεμποδίζουν την βιομετατροπή της κλοπιδογρέλης μέσω έντονου μεταβολισμού τους από το CYP3A4 (κυρίως οι λιπόφιλες σιμβαστατίνη, ατορβαστατίνη και λοβαστατίνη) ή μέσω επαγωγής του CYP2B6 και του CYP2C9 από τις ροσουβαστατίνη, σιμβαστατίνη, λοβαστατίνη και πραβαστατίνη. Τα αποτελέσματα κλινικών μελετών ωστόσο διέψευσαν τους παραπάνω ισχυρισμούς και έδειξαν ότι η χορήγηση στατινών δεν επιφέρει κάποιο αρνητικό κλινικό αποτέλεσμα στους ασθενείς που λαμβάνουν κλοπιδογρέλη[89,90].
- Αναστολείς διαύλων ασβεστίου: Κάποιοι από τους αναστολείς διαύλων ασβεστίου όπως η βεραπαμίλη, η αμλοδιπίνη και η νικαρδιπίνη είναι αναστολείς και υποστρώματα του CYP3A4, και έτσι υπήρχε η αντίληψη ότι σε χορήγηση τους σε ασθενείς που λαμβάνουν ήδη κλοπιδογρέλη, θα μείωνε το αντιαιμοπεταλιακό αποτέλεσμα και αύξανε σημαντικά τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Ωστόσο, πολλές έρευνες που διενεργήθηκαν δεν κατέδειξαν κάποια μείωση του αντιαιμοπεταλιακού αποτελέσματος ή αύξηση του συνολικού καρδιαγγειακού κινδύνου από την συγχορήγηση τους σε ασθενείς υπό θεραπεία με κλοπιδογρέλη[91,92].
- Αναστολείς και επαγωγείς του P450 κυτοχρώματος: Εφόσον το φαρμακολογικό αποτέλεσμα της κλοπιδογρέλης είναι στενά συνδεδεμένο με τον μεταβολισμό του μητρικού μορίου και την βιομετατροπή του στον ενεργό μεταβολίτη, οποιαδήποτε συγχορηγούμενη ουσία που επηρεάζει την λειτουργία των ηπατικών ενζύμων ενδέχεται να μεταβάλλει το αντιαιμοπεταλιακό αποτέλεσμα της. Οι αναστολείς του CYP3A4 όπως η ερυθρομυκίνη, τρολεανδομυκίνη και κετοκοναζόλη αλλά και ο χυμός grapefruit και η φλουοξετίνη που είναι αναστολείς του CYP2C9, CYP2C19 και CYP3A4 μειώνουν τον σχηματισμό του ενεργού μεταβολίτη μέσω της αναστολής της βιομετατροπής του μητρικού μορίου[41,52,93]. Αντίθετη δράση έχουν οι επαγωγείς των ηπατικών ενζύμων, που λόγω αύξησης του μεταβολισμού του μητρικού μορίου, συντίθεται μεγαλύτερα επίπεδα ενεργού μεταβολίτη και ενισχύοντας το αντιαιμοπεταλιακό αποτέλεσμα. Τέτοιοι ισχυροί επαγωγείς που μεγεθύνουν την αντιαιμοπεταλιακή δράση της κλοπιδογρέλης είναι η ριφαμπικίνη, το βαλσαμόχορτο (St John's wort) που είναι επαγωγέας του CYP3A4 καθώς και η χρήση καπνού που είναι επαγωγέας του CYP1A2[36,48-51,94].

Εκτός από τις ανωτέρω μεταβλητές που μπορεί να ευθύνονται για την διατομική μεταβλητότητα που παρουσιάζει η κλοπιδογρέλη, η τελευταία μπορεί να επηρεάζεται και από συννοσηρότητες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2. Πιο συγκεκριμένα, ένα σημαντικό ποσοστό των στεφανιαίων ασθενών, περίπου 30%, πάσχει παράλληλα και από διαβήτη τύπου 2 αυξάνοντας τον συνολικό καρδιαγγειακό κίνδυνο και τον κίνδυνο θανατηφόρου καρδιακού συμβάντος. Η μελέτη EXCELSIOR συμπεράνε ότι η ύπαρξη σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και η ύπαρξη ενός CYP2C19 αλληλόμορφου μειωμένης ενεργότητας ήταν οι πιο σημαντικές μεταβλητές που ευθύνονται για την αυξημένη δραστικότητα των αιμοπεταλίων υπό θεραπεία με κλοπιδογρέλη[59].



Σχήμα 12: Ποσοστό των ασθενών με υψηλή δραστικότητα των αιμοπεταλίων υπό θεραπεία με κλοπιδογρέλη (HPR). Η HPR ορίστηκε ως υπολειπόμενη δραστικότητα αιμοπεταλίων (RPA) >14%. Η HPR ήταν σημαντικά αυξημένη σε όλους τους διαβητικούς ασθενείς σε όλες τις ομάδες βάρους και ηλικίας[59].

Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ακόμη γνωστός, πιστεύεται ότι για την αυξημένη HPR πιθανόν να ευθύνεται η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και η διαταραγμένη ινωδογονόλυση ή η μειωμένη συστηματική έκθεση στον ενεργό μεταβολίτη[95,96].

### 1.2.9.Φαρμακοκινητικές μελέτες σχετικά με την φαρμακογενετική αντίσταση της κλοπιδογρέλης.

Συμπερασματικά, η πιο εδραιωμένη μεταβλητή που μπορεί να συνεισφέρει στην διατομική μεταβλητότητα της κλοπιδογρέλης είναι η ύπαρξη μετάλλαξης στο γονίδιο CYP2C19 που αποτελεί είναι ένα από τα κύρια ένζυμα μεταβολισμού της κλοπιδογρέλης στον ενεργό μεταβολίτη. Το CYP2C19\*1 αποτελεί το αλληλίο wild-type και σχετίζεται με τη φυσιολογική ενζυματική δραστηριότητα ενώ το CYP2C19\*2 και CYP2C19\*3 αποτελούν τα αλληλία μειωμένης ενζυματικής δραστηριότητας και το αλληλίο CYP2C19\*17 σχετίζεται με αυξημένη ενζυματική δραστηριότητα. Έτσι, έχουν αναγνωρισθεί τέσσερις φαινότυποι: ταχύτατοι μεταβολιστές, φυσιολογικοί μεταβολιστές (εκτενείς), ενδιάμεσοι μεταβολιστές και φτωχοί μεταβολιστές. Η κλασική δόση της κλοπιδογρέλης, όπως αναγράφεται στο φύλλο οδηγιών χρήσεως του φαρμάκου, δικαιολογείται στους ασθενείς που ανήκουν στους ταχύτατους ή/και στους εκτενείς μεταβολιστές (\*1/\*1, \*1/\*17 και \*17/\*17). Σε περίπτωση ωστόσο που η κλινική γονοτύπωση ανιχνεύσει ασθενή που ανήκει στους φτωχούς μεταβολιστές (π.χ. \*2/\*2), η ισχύουσα βιβλιογραφία υποστηρίζει τη χρήση εναλλακτικού αντιαιμοπεταλιακού φαρμάκου, δεδομένου ότι δεν υπάρχει κάποια σχετική αντένδειξη (πρασουγρέλλη, τικαγρελόρη). Η ομάδα ασθενών με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον όμως αποτελεί τους ενδιάμεσους μεταβολιστές (π.χ. \*1/\*2) διότι αυτή η ομάδα ασθενών έχει υψηλότερη αρχική

υπολειπόμενη δραστηριότητα αιμοπεταλίων σε σχέση με τους εκτενείς μεταβολιστές και λόγω γονότυπου παράγονται μειωμένες ποσότητες ενεργού μεταβολίτη κλοπιδογρέλης. Συνεπώς οι ετεροζυγώτες για το CYP2C19 που προσέρχονται στα επείγοντα με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και λαμβάνουν κλοπιδογρέλη, έχουν αυξημένες πιθανότητες για δυσμενή καρδιαγγειακή έκβαση, συμπεριλαμβανομένης της θρόμβωσης του stent λόγω αυξημένης δραστηριότητας των αιμοπεταλίων αλλά και λόγω μειωμένης αντιαιμοπεταλιακής δράσης της κλοπιδογρέλης. Με βάση αυτά τα στοιχεία, οι θεραπευτικές προσεγγίσεις στους ετεροζυγώτες για το CYP2C19 ασθενείς είναι είτε η χορήγηση ενός πιο ισχυρού P2Y<sub>12</sub> αναστολέα όπως είναι η τικαγρελόρη ή η πρασουγρέλλη είτε η αύξηση της δόσης εφόδου ή συντήρησης κλοπιδογρέλης προκειμένου να επιτευχθεί αναστολή της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων παρόμοια με αυτήν των εκτενών μεταβολιστών και να υπερνικηθεί η αντίσταση και η έλλειψη ανταπόκρισης στην θεραπεία με κλοπιδογρέλη[97].

### Κλινικές μελέτες:

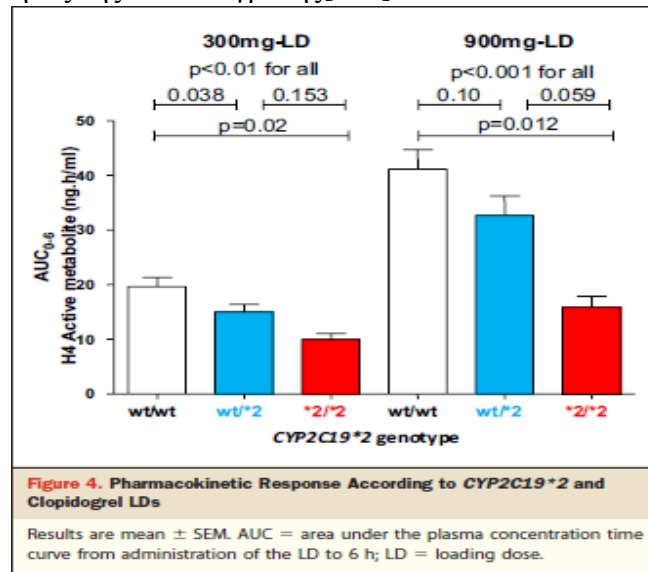
- ❖ Στην μελέτη GRAVITAS 2214 ασθενείς με υψηλή δραστηριότητα αιμοπεταλίων υπό θεραπεία με κλοπιδογρέλη (μετρημένη με το VerifyNow P2Y test) τέθηκαν υπό PCI και χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες. Η μία έλαβε την συμβατική θεραπεία με κλοπιδογρέλη (όχι δόση εφόδου και έπειτα 75mg/day) και η άλλη 600mg δόση εφόδου και 150mg/day ως δόση συντήρησης. Το σημείο λήξης της μελέτης ήταν σε διάστημα 6 μηνών θρόμβωση του stent, μη θανατηφόρο έμφραγμα του μυοκαρδίου ή θάνατος από καρδιαγγειακά αίτια και ήταν πανομοιότυπο και στις δύο ομάδες. Ενδεχόμενα αίτια που μπορεί να οδήγησαν στο ουδέτερο αποτέλεσμα της μελέτης είναι ότι ο αριθμός των συμμετεχόντων στη μελέτη ήταν χαμηλός, ότι η πλειοψηφία των ασθενών είχαν σταθερή στηθάγχη και επιτυχημένη έκβαση του PCI και ότι η φαρμακολογική παρέμβαση με την κλοπιδογρέλη που αποτελούσε και το υπό μελέτη φάρμακο έγινε 12 ώρες μετά το PCI και τον τραυματισμό του αγγείου από την επέμβαση[98].
- ❖ Στην μελέτη ARMYDA-2 ένα σύνολο 255 ασθενών προγραμματιζόταν να λάβουν μέρος σε PCI και χωρίστηκαν σε αυτούς που θα λάμβαναν 600mg δόση εφόδου κλοπιδογρέλης (126 ασθενείς) 4 με 8 ώρες πριν τη διαδικασία και σε αυτούς που θα λάμβαναν 300mg δόση εφόδου (129 ασθενείς). Το τέλος της παρακολούθησης (primary end point) ορίστηκε ως εμφάνιση θανάτου, αγγειακής επαναιμάτωσης ή εμφράγματος του μυοκαρδίου. Στο 4% των ασθενών στο σχήμα υψηλής δόσης εφόδου και στο 12% του σχήματος συμβατικής δόσης εφόδου προέκυψε το end point και το ποσοστό εμφάνισης εμφράγματος μυοκαρδίου ήταν 50% μειωμένο στην ομάδα που έλαβε το σχήμα υψηλής δόσης εφόδου. Έτσι, οι ερευνητές συμπέραναν στο τέλος ότι το σχήμα με 600mg δόση εφόδου είναι πιο ασφαλές και αποτελεσματικό διότι μειώνει σημαντικά τα καρδιαγγειακά συμβάντα και ιδιαίτερα την εμφάνιση MI[99].
- ❖ Σε μία άλλη μελέτη που περιλάμβανε 162 ασθενείς που επίσης προγραμματιζόταν να λάβουν μέρος σε PCI, η χαμηλή ανταπόκριση σε κλοπιδογρέλη ορίστηκε ως VASP index>50% μετά από δόση εφόδου κλοπιδογρέλης 600mg. Στη συνέχεια όλοι οι ασθενείς με VASP index>50% χωρίστηκαν στο control group και στο VASP-guided group, όπου στο control group το PCI πραγματοποιήθηκε χωρίς κάποια επιπρόσθετη bolus δόση κλοπιδογρέλης ενώ στο VASP-guided group χορηγήθηκαν μέχρι και τρεις bolus δόσεις κλοπιδογρέλης των 600mg. Το VASP index επαναξιολογήθηκε σε 12 ώρες μετά την επιπλέον χορήγηση και μέχρι να επιτευχθεί VASP index<50%. Στο VASP-guided group, 38 ασθενείς χρειάστηκαν δύο δόσεις για να επιτευχθεί VASP index<50%, σε 14 ασθενείς τρεις δόσεις ενώ 15 ασθενείς τέσσερις δόσεις. Επίσης, παρά την συνολική δόση 2400mg κλοπιδογρέλης 11 ασθενείς παρέμειναν ανθεκτικοί και έλαβαν PCI. Τέλος, ο αριθμός των σημαντικών καρδιαγγειακών συμβάντων μέσα στον



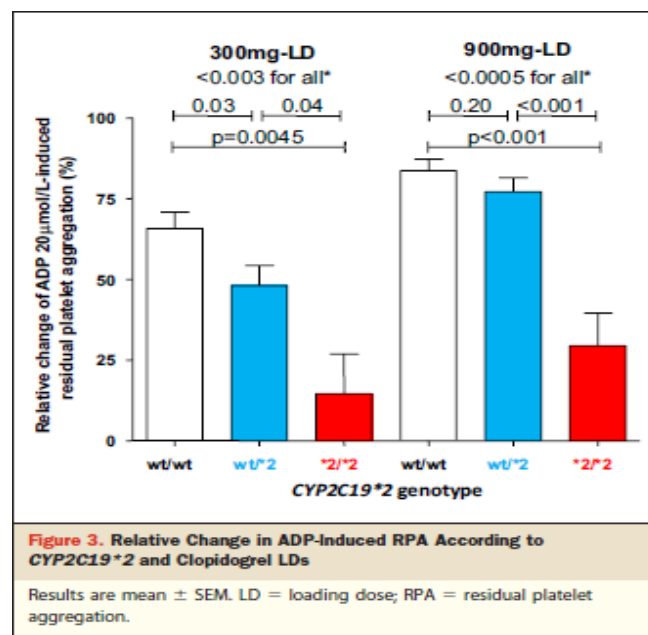
- πρώτο μήνα ήταν σημαντικά μειωμένος τον πρώτο μήνα στην VASP-guided group σε σύγκριση με την control group ( 0 εναντίον 8 περιστατικών αντίστοιχα)[100].
- ❖ Στην μελέτη CREATIVE 1078 ασθενείς είχαν ταυτοποιηθεί ότι έχουν ελαττωμένη ανταπόκριση σε θεραπεία με κλοπιδογρέλη διαχωρίστηκαν τυχαία σε τρεις κατηγορίες ασθενών: η πρώτη θα λάμβανε την κλασική διπλή αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία με κλοπιδογρέλη 75mg/day και ασπιρίνη 100mg/day, η δεύτερη θα λάμβανε ενισχυμένη δόση κλοπιδογρέλης, δηλαδή 150mg/day κλοπιδογρέλης ασπιρίνη 100mg/day και η τρίτη σιλοσταζόλη 100mg x2/day, κλοπιδογρέλη 75mg x2/day και ασπιρίνη 100mg/day. Το primary end point στις τρεις αυτές ομάδες όπως ορίστηκε από την προσβολή από μείζονα καρδιοαγγειακά συμβάντα στους 18 μήνες, ήταν 14,4%, 10,6% και 8,5% σε κάθε ομάδα αντίστοιχα ενώ δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες όσον αφορά τα περιστατικά αιμορραγίας. Το τελικό συμπέρασμα ήταν η ανάδειξη των υψηλών δόσεων συντήρησης της κλοπιδογρέλης ως τρόπο αντιμετώπισης της αντίστασης στην θεραπεία με αυτήν[101].
  - ❖ Παράλληλα η μελέτη ELEVATE study of PCI έδειξε ότι 225mg κλοπιδογρέλης ημερησίως απαιτούνται για να μειώσουν την δραστηριότητα των αιμοπεταλίων στους CYP2C19\*2 ετεροζυγώτες σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της 75mg δόσης κλοπιδογρέλης ημερησίως σε εκτενείς μεταβολίτες[102].
  - ❖ Σε μία άλλη μελέτη η πρασουγρέλλη ήταν πιο αποτελεσματική στην μείωση της αιμοπεταλιακής λειτουργίας σε σχέση με την κλοπιδογρέλη όπως μετρήθηκε από το VerifyNow P2Y assay. Ο επιπολασμός της high on platelet treatment therapy(HPR) ήταν σημαντικά μειωμένος στη θεραπεία με πρασουγρέλλη συγκριτικά με την κλοπιδογρέλη τόσο στους CYP2C19\*2 ετερόζυγους (5,3% έναντι 35,8%) όσο και στους εκτενείς μεταβολίτες (8,8% έναντι 29,4%).Σαν τελικό συμπέρασμα, προέκυψε ότι η θεραπεία με 10mg πρασουγρέλλης είναι πολύ πιο αποτελεσματική στους ετεροζυγώτες CYP2C19\*2 σε σχέση με την υψηλή δόση συντήρησης 150mg κλοπιδογρέλης[103].
  - ❖ Στην μελέτη RAPID-GENE, 200 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε PCI διαχωρίστηκαν σε ετεροζυγώτες CYP2C19\*2 και σε φυσιολογικούς μεταβολίτες. Οι ετεροζυγώτες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες και η μία τέθηκε υπό αγωγή με 10mg πρασουγρέλλη και η άλλη με 75mg κλοπιδογρέλης ενώ οι εκτενείς μεταβολίτες τέθηκαν όλοι υπό αγωγή με την κλασική δόση συντήρησης 75mg κλοπιδογρέλης. Το primary end point ήταν η HPR μετά από μία εβδομάδα αντιαιμοπεταλιακής αγωγής και συνέβη σε 7 από τους 23 ετεροζυγώτες υπό κλοπιδογρέλη και σε κανέναν από τους ετεροζυγώτες υπό αγωγή με πρασουγρέλλη.[104]
  - ❖ Σε μία φαρμακοδυναμική μελέτη όπου χορηγήθηκε είτε 300mg κλοπιδογρέλης 2 φορές την ημέρα είτε τικαγρελόρη 60 mg 2 φορές ημερησίως, ή τικαγρελόρη 90mg ημερησίως σε 180 ασθενείς με σταθερή στηθάγχη που λάμβαναν ήδη ασπιρίνη διαπιστώθηκε ότι και οι δύο διαφορετικές δόσεις συντήρησης με τικαγρελόρη ήταν πολύ πιο αποτελεσματικές από την κλοπιδογρέλη στον πρώτο μήνα θεραπείας[105].
  - ❖ Παράλληλα, σε μια μελέτη οι ασθενείς με φτωχή ανταπόκριση σε θεραπεία με ασπιρίνη ή κλοπιδογρέλη, όπως αυτή μετρήθηκε από το VerifyNow assay, υποβλήθηκαν σε θεραπεία με (GP) IIb/IIIa αναστολείς η οποία είχε ως συνέπεια την μειωμένη μηνιαία και ετήσια θνητότητα από ισχαιμικά επεισόδια χωρίς να αυξάνεται ταυτόχρονα ο κίνδυνος για αιμορραγικά συμβάντα[106].
  - ❖ Στην μελέτη ARMYDA 150 για τους ασθενείς που υποβάλλονται σε διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση (PCI), η χορήγηση δόσης συντήρησης 150mg κλοπιδογρέλης στους ετεροζυγώτες για το CYP2C19\*2 αλληλίο, σχετίζεται με αυξημένη αναστολή συγκόλλησης αιμοπεταλίων,

καλύτερη λειτουργία του ενδοθηλίου των αγγείων, μείωση της φλεγμονής σε σχέση με τη δόση συντήρησης των 75mg. Αυτά τα αποτελέσματα καταλήγουν οι ερευνητές ίσως έχουν σημαντικό ρόλο στο κλινικό όφελος της χρήσης της αυξημένης δόσης κλοπιδογρέλης και ίσως να αποτελούν ορθή πρακτική σε επιλεγμένους ασθενείς[107].

- ❖ Στην μελέτη CLOVIS-2 που διενεργήθηκε με σκοπό να υπερκεραστεί η αντίσταση στην θεραπεία με κλοπιδογρέλη με υψηλές δόσεις εφόδου (300 και 900mg), αποκάλυψε ότι η χρήση δόσεων εφόδου υπερνικά την κακή ανταπόκριση των ετερόζυγων του αλληλίου CYP2C19\*1/\*2 αλλά όχι των ομόζυγων CYP2C19 \*2/\*2 (Σχήμα 13 και 14). Στους ομόζυγους ασθενείς για το μεταλλαγμένο γονίδιο πρέπει να χορηγείται διαφορετικό αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο λόγω μηδαμινής δραστηριότητας της κλοπιδογρέλης[108].

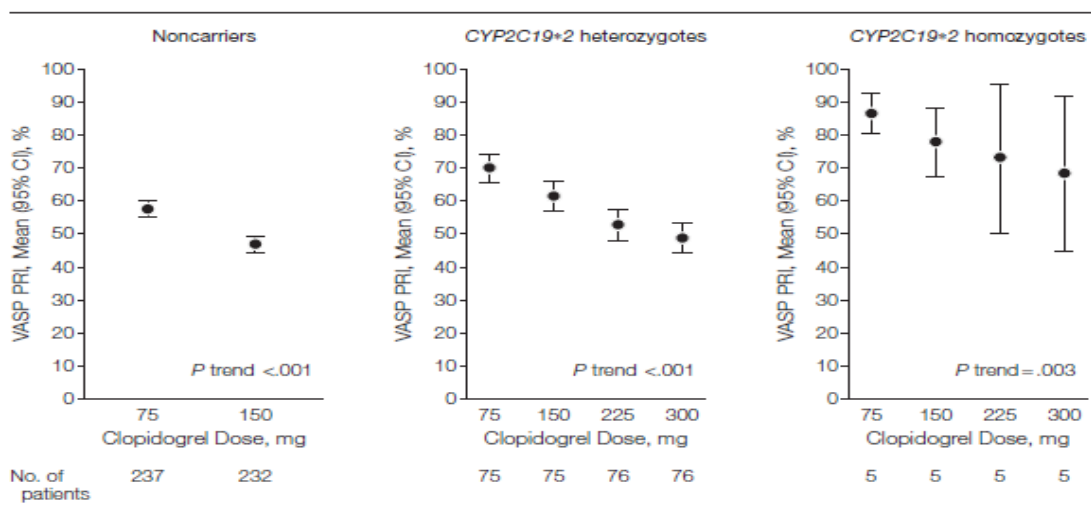


Σχήμα 13: . Επίπεδα ενεργού μεταβολίτη στη συστηματική κυκλοφορία ανάλογα με το γονότυπο και τις δόσεις εφόδου της κλοπιδογρέλης.



Σχήμα 14: . Υπολειπόμενη αιμοπεταλιακή αντιδραστικότητα ανάλογα με το γονότυπο και τις δόσεις εφόδου της κλοπιδογρέλης.

- ❖ Σε άλλη μελέτη, 259 ασθενείς ηλικίας <45 ετών που επέζησαν ενός πρώτου εμφράγματος του μυοκαρδίου, υποβλήθηκαν σε θεραπεία με κλοπιδογρέλη για τουλάχιστον 1 μήνα και παράλληλα προσδιορίστηκε ο γονότυπος τους. Τα πρωτογενή καταληκτικά σημεία (Primary end points) ήταν ο θάνατος, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και η επείγουσα στεφανιαία επαναγγείωση. Τα πρωτογενή καταληκτικά σημεία συνέβησαν συχνότερα στους φορείς των μεταλλαγμένων αλληλίων σε σχέση με τους φυσιολογικούς (15 vs. 11 events; hazard ratio [HR] 3.69 [95% CI 1.69–8.05],  $p=0.0005$ ). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και ως προς τη θρόμβωση του stent (eight vs. four events; HR 6.02 [1.81–20.04],  $p=0.0009$ ). Η αρνητική επίδραση του αλληλίου CYP2C19\*2 στην θεραπεία με κλοπιδογρέλη διατηρήθηκε από τους 6 μήνες μετά τη χρήση της έως και το τέλος της παρακολούθησης των ασθενών (HR 3.00 [1.27–7.10],  $p=0.009$ ). Μετά από ανάλυση πολλών μεταβλητών (multivariate analysis), η ύπαρξη του αλληλίου CYP2C19 ήταν ο μοναδικός ανεξάρτητος παράγοντας πρόκλησης καρδιαγγειακού συμβάματος ( $p=0.0006$ )[109].
- ❖ Τέλος, η μελέτη ELEVATE-TIMI 56 αποκάλυψε ότι η χρήση κλασικής δόσης συντήρησης κλοπιδογρέλης 75mg τόσο στους ομοζυγώτες όσο και στους ετεροζυγώτες για το CYP2C19\*2 αλληλίο είχε σαν απόρροια σημαντικώς υψηλότερη αιμοπεταλιακή δραστηριότητα σε σχέση με τους φυσιολογικούς μεταβολίτες. Πιο συγκεκριμένα ανάμεσα στους ετεροζυγώτες, υψηλότερες δόσεις συντήρησης κλοπιδογρέλης (μέχρι 300mg), απέφεραν σημαντικές μειώσεις στη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων ενώ για κάθε αύξηση της κλοπιδογρέλης κατά 75mg, αυτό οδήγησε σε 8-9% μείωση της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων. Έτσι, μέσω σταδιακής αύξησης των δόσεων διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση δόσης 150mg συσχετιζόταν με αυξημένη δραστηριότητα και συγκολλητικότητα και η χορήγηση δόσης 225mg συνδεόταν με καλή ανταπόκριση, με την βέλτιστη να έχει η δόση συντήρησης των 300mg. Προτάθηκε επομένως σε αυτή την ομάδα των ασθενών ο τριπλασιασμός της δόσης συντήρησης από 75mg σε 225mg για βέλτιστο αποτέλεσμα (Σχήμα 15). Στους ομοζυγώτες για το μεταλλαγμένο αλληλίο ωστόσο, η χορήγηση 300mg δόσης συντήρησης είχε ανεπιτυχή αποτελέσματα με συνέπεια να μην προτείνεται ως αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο η κλοπιδογρέλη σε αυτούς τους ασθενείς. Αξίζει επίσης να τονισθεί ότι η έκθεση στις τροποποιημένες δόσεις φαρμάκου ήταν 28 ημέρες και άρα τα αποτελέσματα δε δίνουν σαφή εικόνα για μακροχρόνια θεραπεία σ' αυτές τις δόσεις[110].



Σχήμα 15: Αντιδραστικότητα αιμοπεταλίων σε σχέση με το γονότυπο και τη δόση συντήρησης της κλοπιδογρέλης, όπως αυτή μετρήθηκε με βάση το VASP-

## 1.3. Πληθυσμιακή φαρμακοκινητική

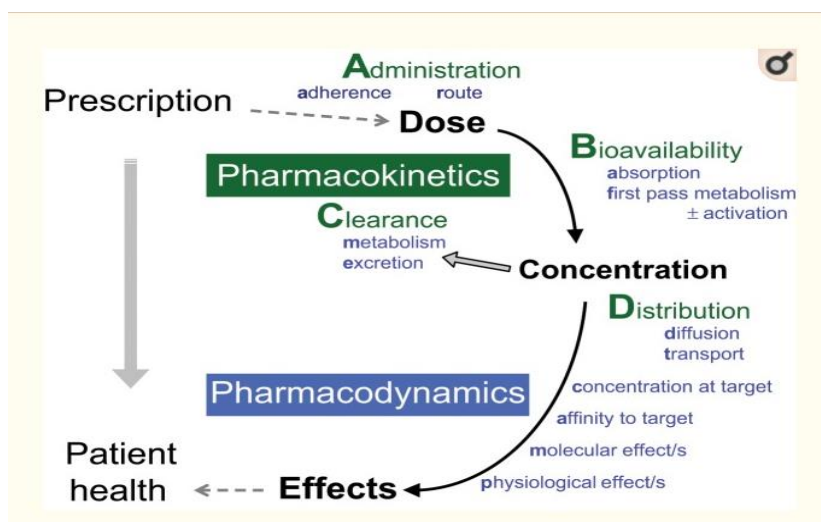
### 1.3.1. Εισαγωγή στη φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική είναι ο κλάδος της επιστήμης της φαρμακευτικής που ασχολείται και αναλύει την πορεία των φαρμάκων στον οργανισμό. Με άλλα λόγια, μελετά τι κάνει το σώμα μας στο φάρμακο που χορηγήθηκε, μέσω δεδομένων που αποτελούνται από συγκεντρώσεις του φαρμάκου σε διάφορα βιολογικά υγρά έναντι του χρόνου λήψεως. Η κλινική φαρμακοκινητική αποτελεί μια υποκατηγορία της φαρμακοκινητικής επιστήμης και ασχολείται με την εφαρμογή των φαρμακοκινητικών αρχών με σκοπό την ασφαλή και αποτελεσματική χορήγηση φαρμάκων σε κάθε ασθενή ώστε να παρουσιαστεί το βέλτιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Η φαρμακοκινητική έχει σημαντική και σαφή διαφορά με τον κλάδο της φαρμακοδυναμικής διότι η φαρμακοδυναμική είναι η επιστήμη που ασχολείται με την συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο σημείο δράσης και του επακόλουθου φαρμακολογικού αποτελέσματος (θεραπευτικού ή τοξικού) και αναλύει δεδομένα συγκέντρωσης του φαρμάκου στο σημείο δράσης σε σχέση με το παραγόμενο αποτέλεσμα στον οργανισμό. Συνεπώς, εν αντιθέσει με τη φαρμακοκινητική, η φαρμακοδυναμική μελετά τι κάνει το φάρμακο στο σώμα μας. Πιο συγκεκριμένα, η φαρμακοκινητική ανάλυση της πορείας των φαρμακευτικών ενώσεων στον οργανισμό, χωρίζεται σε τέσσερις(4) επιμέρους κατηγορίες[111]:

- Την απορρόφηση, που ορίζεται ως η διαδικασία εισόδου του φαρμάκου στη συστηματική κυκλοφορία. Η απορρόφηση μπορεί να γίνει μέσω πολλών οργάνων όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας, οι πνεύμονες ή το δέρμα. Το κυριότερο όργανο απορρόφησης θεωρείται ο γαστρεντερικός σωλήνας και η διαδικασία απορρόφησης από αυτόν μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες όπως φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου, το pH του στομάχου, την κινητικότητα του εντέρου και την συγκέντρωση του φαρμάκου στο σημείο απορρόφησης.
- Την κατανομή του φαρμάκου που σχετίζεται με την αναστρέψιμη μεταφορά του φαρμάκου σε διάφορα σημεία του σώματος. Η κατανομή επηρεάζεται και αυτή από διάφορους παράγοντες όπως λιποδιαλυτότητα, σύσταση του οργανισμού σε υγρά, συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα καθώς και από τη σύνδεση του με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (κυρίως αλβουμίνη και α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη).
- Τον μεταβολισμό που συνιστά την βιομετατροπή των φαρμακευτικών ενώσεων από τα μητρικά μόρια σε δευτερογενή μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες των μητρικών φαρμάκων μπορεί να είναι φαρμακολογικά αδρανείς ή ενεργοί, ανάλογα αν το αρχικό μόριο φαρμάκου είναι προφάρμακο ή όχι. Το κύριο όργανο μεταβολισμού είναι το ήπαρ (μεταβολισμός πρώτης διόδου) ενώ ένα μικρό ποσοστό μεταβολισμού πραγματοποιείται και στον εντερικό αυλό. Οι αντιδράσεις μεταβολισμού αποτελούνται από την φάση I και φάση II, όπου στην φάση I συμμετέχουν κυρίως τα ένζυμα του P450 και είναι αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής, υδρόλυσης και υδροξυλίωσης ενώ στην φάση II υπερτερούν οι αντιδράσεις σύζευξης. Το σύνολο των αντιδράσεων του μεταβολισμού στο ήπαρ στοχεύει να μετατρέψει τα ξενοβιοτικά μόρια σε πιο υδατοδιαλυτά, ώστε να μπορέσουν να απεκκριθούν από τους νεφρούς. Ο μεταβολισμός μπορεί να επηρεαστεί από μια πληθώρα μεταβλητών όπως μεταβολική ικανότητα, γονότυπο, την δόση του φαρμάκου αλλά και τις συννοσηρότητες του ασθενούς.

- Την κάθαρση που είναι η διαδικασία αποβολής του φαρμάκου και άλλων ξеноβιοτικών ουσιών όπως οι τοξίνες από τον οργανισμό. Το κυριότερο όργανο που συντελείται η κάθαρση είναι οι νεφροί και η κάθαρση είναι μεγαλύτερη στα υδρόφιλα μόρια συγκριτικά με τα λιπόφιλα.

Αναλυτικότερα, η μελέτη της φαρμακοκινητικής πραγματοποιείται με την ανάπτυξη μαθηματικών μεθόδων οι οποίες διακρίνονται σε διαμερισματικές και μη διαμερισματικές. Η μη διαμερισματική μέθοδο δεν βασίζεται στην υπόθεση ύπαρξης κάποιου διαμερισματικού μοντέλου στο σώμα και εκτιμά την συνολική έκθεση στο φάρμακο μέσω υπολογισμού της περιοχής κάτω από την επιφάνεια της καμπύλης ενός γραφήματος συγκέντρωσης-χρόνου.



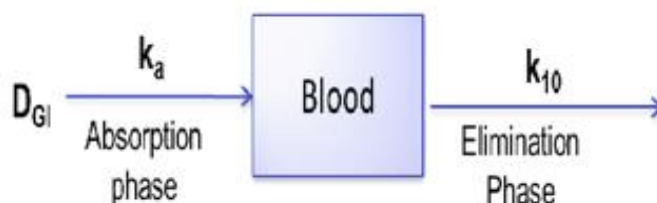
Σχήμα 16: Διαφορά φαρμακοκινητικής-φαρμακοδυναμικής με έμφαση στις επιμέρους διεργασίες της φαρμακοκινητικής που είναι η απορρόφηση, ο μεταβολισμός, η κατανομή και η απέκκριση[111].

Είναι πιο εύκολη και ευέλικτη μέθοδος στον υπολογισμό των φαρμακοκινητικών παραμέτρων σε σύγκριση με τη διαμερισματική ανάλυση εφόσον βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά σε αλγεβρικές εξισώσεις και δίνει αρκετά ακριβή αποτελέσματα, πλεονέκτημα που την καθιστά χρήσιμη ιδιαίτερα σε μελέτες βιοισοδυναμίας. Αντιθέτως, η διαμερισματική φαρμακοκινητική ανάλυση στηρίζεται στην χρήση και υιοθέτηση συγκεκριμένων μοντέλων, των φαρμακοκινητικών διαμερισματικών μοντέλων. Ένα διαμερισματικό μοντέλο είναι μια υπόθεση που χρησιμοποιεί μαθηματικούς όρους για να περιγράψει συνοπτικά ποσοτικές σχέσεις. Η χρησιμότητα και η δυνατότητα που παρέχει ένα μοντέλο στην πρόβλεψη της φαρμακοκινητικής εξαρτάται από τη σωστή επιλογή και ανάπτυξη μαθηματικών εξισώσεων οι οποίες παραμετροποιούν τους κυριότερους παράγοντες της κινητικής διαδικασίας, δηλαδή την απορρόφηση, τον μεταβολισμό, την κατανομή και την απέκκριση. Αυτά τα μοντέλα βασίζονται στην αρχική υπόθεση ότι ο οργανισμός αποτελείται από ένα σύνολο θεωρητικών διαμερισμάτων, όπου ως διαμέρισμα ορίζεται κάθε περιοχή του σώματος στην οποία η συγκέντρωση του φαρμάκου αυξάνεται ή μειώνεται ομοίμορφα με αποτέλεσμα την ταχεία εξισορρόπηση του φαρμάκου μέσα στο διαμέρισμα. Επίσης, σύμφωνα με τα διαμερισματικά μοντέλα, η κινητική του φαρμάκου μέσα στον οργανισμό περιγράφεται ως ροή όγκων του υγρού μεταξύ των διαμερισμάτων και έξω από το σύστημα. Επειδή τα φαρμακοκινητικά μοντέλα βασίζονται σε απλουστευμένες υποθέσεις, δεν μπορεί να βασιστεί κανείς εξολοκλήρου σε αυτά προκειμένου να προβλέψει την δράση των φαρμάκων διότι υπάρχουν φάρμακα που τα επίπεδα τους στο αίμα δεν σχετίζονται με την φαρμακολογική τους δράση, φάρμακα όπου γενετικοί ή άλλοι παράγοντες έχουν τροποποιήσει την φαρμακοκινητική τους στον συγκεκριμένο ασθενή ή λόγω της πραγματικής φυσιολογικής κατάστασης του οργανισμού (ύπαρξη ιστών με μικρότερη ή μεγαλύτερη αιμάτωση ή φραγμών όπως

ο αιματοεγκεφαλικός, [blood-brain barrier, BBB]). Συμπεραίνεται επομένως, ότι τα αποτελέσματα των φαρμακοκινητικών μοντέλων θα πρέπει να αξιολογούνται μαζί με τις κλινικές παρατηρήσεις. Για να αποσαφηνιστούν οι παραπάνω έννοιες, θα περιγραφούν παρακάτω, οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μορφές των φαρμακοκινητικών μοντέλων: το μονοδιαμερισματικό και το διδιαμερισματικό[112].

### Μονοδιαμερισματικό μοντέλο:

Το απλούστερο φαρμακοκινητικό μοντέλο είναι το μονοδιαμερισματικό και αποτελεί τον πιο απλό τρόπο περιγραφής της διαδικασίας κατανομής και απομάκρυνσης από του φαρμάκου προϋποθέτοντας ότι το φάρμακο μπορεί να εισέλθει και να εξέλθει από το σώμα (ανοιχτό μοντέλο) και ότι το σώμα ενεργεί σαν ένας ενιαίος και ομοιόμορφος χώρος. Με την εφαρμογή του μοντέλου, θεωρούμε ότι οι κινητικά σημαντικές διαδικασίες είναι μόνο η είσοδος του φαρμάκου στη συστηματική κυκλοφορία και η απομάκρυνση του. Στο κεντρικό και μοναδικό διαμέρισμα του μοντέλου, προσαρμόζεται ένα μοντέλο εισόδου του φαρμάκου και προσδιορίζεται η κινητική της απομάκρυνσης καθώς θεωρούμε ότι οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο κεντρικό διαμέρισμα ισοδυναμούν με τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο αίμα ή στο πλάσμα. Παραδείγματα μοντέλου εισόδου στο κεντρικό διαμέρισμα είναι η *per-os* χορήγηση όπου η απορρόφηση είναι η κινητικά σημαντική διαδικασία και περιγράφεται ως πρωτοταξική διαδικασία, όπου ο ρυθμός εισόδου του φαρμάκου στην συστηματική κυκλοφορία είναι ανάλογος με την διαφορά συγκέντρωσης ανάμεσα στον γαστρεντερικό σωλήνα και το αίμα, με σταθερά αναλογίας την σταθερά απορρόφησης  $k_a$ . Αντιθέτως, η ενδοφλέβια έγχυση, σταθερής διάρκειας, εισάγει με σταθερό ρυθμό φάρμακο στην συστηματική κυκλοφορία και κατά συνέπεια είναι μία μηδενοταξική διαδικασία.



Σχήμα 17: Σχηματική παρουσίαση του μονοδιαμερισματικού μοντέλου

Η απομάκρυνση του φαρμάκου από το κεντρικό διαμέρισμα που ισοδυναμεί με την συστηματική κυκλοφορία ακολουθεί συνήθως πρωτοταξική κινητική, δηλαδή ο ρυθμός αποβολής του φαρμάκου είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του στο αίμα:

$$\frac{dA}{dt} = \text{dose rate} - CL \times C_j$$

Αυτός ο μηχανισμός απομάκρυνσης συνήθως χαρακτηρίζει καλά τα περισσότερα φάρμακα διότι η απομάκρυνση τους από τον οργανισμό εξαρτάται από την ροή του αίματος στο ήπαρ ή στους νεφρούς και την συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα. Ωστόσο, μερικά φάρμακα που απομακρύνονται με ειδικότερους μηχανισμούς και υψηλές δόσεις αυτών οδηγούν σε κορεσμό των μεταβολικών ενζύμων, δεν ακολουθούν πρωτοταξική διαδικασία αλλά περιγράφονται καλύτερα από την εξίσωση Michaelis-Menten σύμφωνα με την οποία στις συγκεντρώσεις μέχρι τον κορεσμό των μηχανισμών απομάκρυνσης η κινητική είναι πρωτοταξική (εξαρτάται από την συγκέντρωση), ενώ σε μεγαλύτερες

συγκεντρώσεις η κινητική είναι μηδενοταξική, δηλαδή ο ρυθμός απομάκρυνσης προσεγγίζει ένα μέγιστο και μετά λόγω κορεσμού παραμένει σταθερός (π.χ. φαινουτοίνη).

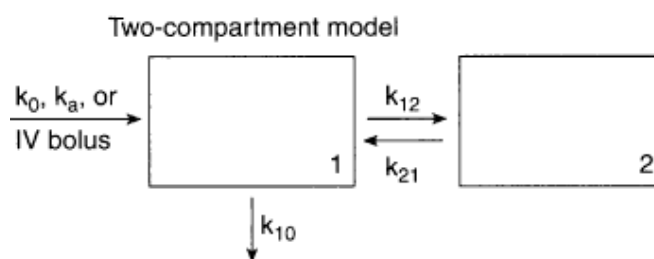
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$V_0$  = Initial velocity (moles/times)  
 $[S]$  = substrate concentration (molar)  
 $V_{\max}$  = maximum velocity  
 $K_m$  = substrate concentration at half  $V_{\max}$

Από όλες τις περιπτώσεις η καλύτερη εφαρμογή του μονοδιαμερισματικού μοντέλου είναι στην στιγμιαία IV bolus injection όπου το φάρμακο χορηγείται στιγμιαία στο διαμέρισμα(αίμα), κατανέμεται άμεσα και ομοιόμορφα σε αυτό και συνοδεύεται από απομάκρυνση από αυτό και οι προς υπολογισμό φαρμακοκινητικοί παράμετροι είναι η σταθερά απορρόφησης  $K_a$  ή  $K_0$ , ο όγκος κατανομής του μοναδικού διαμερίσματος  $V_d$  και η κάθαρση  $Cl$ .

### Διδιαμερισματικό μοντέλο:

Το μονοδιαμερισματικό μοντέλο δεν μπορεί να περιγράψει τα δεδομένα συγκέντρωσης – χρόνου των περισσότερων φαρμάκων στο αίμα. Το διδιαμερισματικό μοντέλο περιγράφει την φαρμακοκινητική των φαρμάκων, για τα οποία κινητικά σημαντικές διαδικασίες δεν είναι μόνο η είσοδος και η απομάκρυνση, αλλά είναι και η διαδικασία της κατανομής. Έτσι η συγκέντρωση του φαρμάκου δεν εξισορροπείται ακαριαία σε όλο το σώμα, όπως θα συνέβαινε στο μονοδιαμερισματικό μοντέλο, και η συγκέντρωση του στο αίμα ακολουθεί δύο φάσεις, της κατανομής και της απομάκρυνσης, που χαρακτηρίζονται από τα δύο διαμερίσματα. Με μία πιο αυθαίρετη προσέγγιση, μπορούμε να πούμε ότι το κεντρικό διαμέρισμα χαρακτηρίζει το αίμα και τα όργανα με πλούσια αιμάτωση όπως το ήπαρ, οι νεφροί και ο εγκέφαλος, στα οποία η συγκέντρωση εξισορροπείται ακαριαία μετά την είσοδο του φαρμάκου και το περιφερικό διαμέρισμα που χαρακτηρίζει τους ιστούς και τα όργανα στα οποία το φάρμακο κατανέμεται πιο αργά ως αποτέλεσμα πιθανών βιολογικών φραγμών ή χαμηλής αιμάτωσης.



Σχήμα 18: Σχηματική αναπαράσταση του διδιαμερισματικού μοντέλου

Η διαδικασία της κατανομής είναι πρωτοταξική και εξαρτάται από την διαφορά της συγκέντρωσης στα δύο διαμερίσματα. Οι προς εκτίμηση φαρμακοκινητικοί παράμετροι είναι η κάθαρση ( $CL$ ), ο όγκος του κεντρικού διαμερίσματος ( $V_1$ ), ο όγκος του περιφερικού διαμερίσματος ( $V_2$ ) και η σταθερά  $k_{12}$ . Η σταθερά  $k_{12}$  είναι η πρωτοταξική σταθερά που συνδέει το ρυθμό εισόδου του φαρμάκου στο δεύτερο διαμέρισμα με την διαφορά των συγκεντρώσεων. Έτσι ο ρυθμός κατανομής του φαρμάκου από το κεντρικό στο περιφερειακό διαμέρισμα είναι:

$$\frac{dA_{12}}{dt} = -k_{12}A_1 \qquad \frac{dA_{21}}{dt} = k_{21}A_2$$

όπου  $A_1$  η ποσότητα του φαρμάκου στο κεντρικό διαμέρισμα και  $A_2$  η ποσότητα του φαρμάκου στο περιφερικό διαμέρισμα. Παράλληλα, το μοντέλο μπορεί να παραμετροποιηθεί και με την παράμετρο της μεταξύ των διαμερισμάτων κάθαρσης  $Q$ , όπου:

$$k_{12} = \frac{Q}{V_1}$$

Τέλος, εκτός από τα κλασικά διαμερισματικά φαρμακοκινητικά μοντέλα, υπάρχουν και τα φυσιολογικά φαρμακοκινητικά μοντέλα αλλά και οι συζεύξεις φαρμακοδυναμικών-φαρμακοκινητικών μοντέλων. Τα φυσιολογικά φαρμακοκινητικά μοντέλα χαρτογραφούν τη σύνθετη διαδικασία της μεταφοράς του φαρμάκου σε μια φυσιολογικά ρεαλιστική διαμερισματική δομή όπου τα κύρια δομικά στοιχεία ενός φυσιολογικού μοντέλου είναι φυσιολογικοί ιστοί, υγρά, όργανα και/ή συστήματα. Έτσι, η δομή ενός τέτοιου μοντέλου είναι προκαθορισμένη και σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη από το υπό μελέτη φάρμακο και γενικότερα παρέχουν πιο πλούσια πληροφορία από τα συμβατικά φαρμακοκινητικά μοντέλα[113]. Οι συζεύξεις φαρμακοκινητικού-φαρμακοδυναμικού μοντέλου έχουν ως στόχο μέσω της ένωσης της πληροφορίας από φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά διαγράμματα: την συσχέτιση φαρμακολογικού αποτελέσματος, τοξικού ή θεραπευτικού, με την χορηγούμενη δόση του φαρμάκου, τον προσδιορισμό των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών παραμέτρων του συζευγμένου μοντέλου που δίνουν πληροφορίες για τις ενδογενείς ιδιότητες του φαρμάκου και τον καθορισμό έτσι του βέλτιστου δοσολογικού σχήματος.

### 1.3.2. Εισαγωγή στη πληθυσμιακή φαρμακοκινητική ανάλυση.

Πριν πραγματοποιηθεί μια αδρή ανάλυση της πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής, επιβάλλεται αρχικά να διαχωριστεί η έννοια της πληθυσμιακής ανάλυσης από την ατομική φαρμακοκινητική ανάλυση. Η ατομική φαρμακοκινητική ανάλυση (individual PK) χρησιμοποιείται κυρίως όταν είναι επιθυμητή η γρήγορη εκτίμηση των βασικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων συγκεκριμένων ασθενών. Αυτή η ανάλυση απαιτεί πλούσια δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου ανά ασθενή, σταθερούς χρόνους δειγματοληψίας και χρησιμοποιεί κυρίως μη διαμερισματική μέθοδο ανάλυσης για τον υπολογισμό των ατομικών φαρμακοκινητικών χαρακτηριστικών ενώ είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην φάση 1 των κλινικών δοκιμών ενός φαρμάκου όπου απαιτούνται αρχικά πλούσια δεδομένα. Η πληθυσμιακή φαρμακοκινητική αντιθέτως διαφέρει από την ατομική στο γεγονός ότι παράλληλα με την εκτίμηση των ατομικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων, πραγματοποιείται και ανάλυση της μεταβλητότητας των φαρμακοκινητικών χαρακτηριστικών ενός φαρμάκου σε έναν πληθυσμό ασθενών που λαμβάνουν κλινικά παρόμοιες δόσεις φαρμάκου. Η ορολογία της πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής δεν είναι καινούργια αλλά εισήχθη πρώτη φορά το 1972 από τον Sheiner et al προκειμένου να αντιμετωπίσει

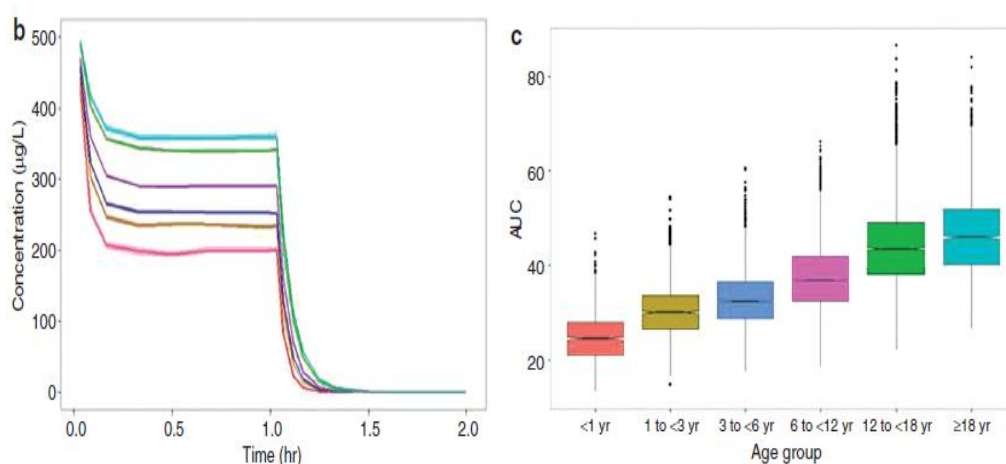


τα αραιά φαρμακοκινητικά δεδομένα που συλλέχθηκαν κατά την θεραπευτική παρακολούθηση φαρμάκων (therapeutic drug monitoring, TDM). Παρότι με μία αρχική ματιά φαίνεται ότι ο όρος πληθυσμιακή φαρμακοκινητική αγνοεί τα ατομικά φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά, ωστόσο η σημαντικότητα της ατομικής πληροφορίας στα πληθυσμιακά μοντέλα αποτυπώνεται στην περιγραφή της μεταβλητότητας, εφόσον τα ατομικά δεδομένα συνεισφέρουν στην διαμόρφωση των τάσεων που μεταβάλλουν την ανταπόκριση σε ένα φάρμακο και εκτιμούν τα τελικά πληθυσμιακά δεδομένα.



Σχήμα 19: Το φαρμακολογικό αποτέλεσμα του φαρμάκου συσχετίζεται καλύτερα με τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα. Συνεπώς, διαφορές στη φαρμακευτική δράση μεταξύ των ασθενών θα συσχετίζεται με διαφορετικά επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα, παρότι θα έχει χορηγηθεί η ίδια δόση.

Η παραδοχή ότι όλα τα φάρμακα παρουσιάζουν μεταβλητότητα μεταξύ των διαφορετικών ατόμων που μπορεί να επηρεάσει την έκθεση και την απόκριση στη φαρμακοθεραπεία αλλά και η σταδιακή παραδοχή ότι πολλά φάρμακα επηρεάζονται από μεταβλητές όπως βάρος, ηλικία, ηπατική ή/και νεφρική λειτουργία και γονότυπο και άρα η ανταπόκριση και η ασφάλεια ρυθμίζονται από τροποποίηση της δοσολογίας με βάσει τις παραπάνω παραμέτρους, ενίσχυσε την χρήση των πληθυσμιακών μοντέλων πέρα από το TDM (Σχήμα 20).



Σχήμα 20: Αναπαράσταση των διαγραμμάτων C-t ενός φαρμάκου ύστερα από 1hr IV έγχυση δόσης 10mg/kg(b) και των box-whisker plots του AUC(c). Είναι εμφανής η διαφορά στην έκθεση στο φάρμακο ανάλογα με την ηλικία και το βάρος, γεγονός που εγείρει ζητήματα ασφάλειας και αποτελεσματικότητας και καθιστά έτσι ακόμη πιο απαραίτητο την ανάπτυξη ενός πληθυσμιακού μοντέλου για το συγκεκριμένο φάρμακο[114].

Έτσι στη συνέχεια, η χρήση της πληθυσμιακής ανάλυσης επεκτάθηκε και στις φάσεις 2 και 3 των κλινικών δοκιμών των φαρμάκων όπου τα φαρμακοκινητικά δεδομένα είναι αραιά αλλά και στην ενσωμάτωση φαρμακοδυναμικών δεδομένων όπως συγκέντρωση φαρμάκου έναντι φαρμακολογικής απόκρισης (πληθυσμιακή φαρμακοκινητική-φαρμακοδυναμική). Επομένως, η πληθυσμιακή μοντελοποίηση, τμήμα της οποίας είναι και η πληθυσμιακή φαρμακοκινητική, αποτελεί στις μέρες μας ένα σημαντικό εργαλείο για την συσχέτιση και περιγραφή των φυσιολογικών χαρακτηριστικών και ιδιαιτεροτήτων των ατόμων με την ασφάλεια και την παρατηρούμενη ανταπόκριση ενός φαρμάκου[114]. Πιο συγκεκριμένα, η πληθυσμιακή φαρμακοκινητική συμβάλλει:

- ❖ Στην εύρεση των πληθυσμιακών φαρμακοκινητικών παραμέτρων και των πηγών μεταβλητότητας σε έναν πληθυσμό.
- ❖ Στην συσχέτιση των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων με τις χορηγούμενες δόσεις μέσω της ταυτοποίησης προγνωστικών ομοιοτήτων στο πληθυσμό στόχο.
- ❖ Στην προσομοίωση εναλλακτικών δόσεων, επιτρέποντας την τεκμηριωμένη αξιολόγηση των δοσολογικών σχημάτων πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την ανάλυση των φαρμακοκινητικών δεδομένων και άρα των πληθυσμιακών παραμέτρων είναι η μέθοδος των δύο σταδίων, η απλή συγκεντρωτική μέθοδος, η μέθοδος των μη γραμμικών μικτών επιδράσεων και η μη διαμερισματική ανάλυση που είχε επισημανθεί και ανωτέρω[115].

- Η μη-διαμερισματική ανάλυση υπολογίζει την ολική έκθεση στο φάρμακο με τον υπολογισμό της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης – χρόνου και εκτιμά έτσι στη συνέχεια τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους όπως  $C_{max}$ . Στον υπολογισμό της ολικής έκθεσης η συγκεκριμένη μέθοδος έχει το πλεονέκτημα των ελάχιστων παραδοχών λόγω της μη ύπαρξης φαρμακοκινητικών μοντέλων αλλά ως μειονεκτήματα παρουσιάζονται η απαίτηση των πολλών δειγματοληψιών και η μέτρηση των επιπέδων στην κλινική πράξη κάτι που δεν είναι εφικτό σε πολλές κλινικές μελέτες.
- Η μέθοδος δύο σταδίων αποτελείται από δύο στάδια. Στην πρώτη φάση, το μοντέλο εκτιμά τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους κάθε ασθενή ξεχωριστά ενώ κατά τη δεύτερη φάση συνδυάζονται οι εκτιμήσεις των φαρμακοκινητικών παραμέτρων κάθε ασθενούς με σκοπό να υπολογιστούν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση αυτών των παραμέτρων στον υπό μελέτη πληθυσμό (χρήση περιγραφικής στατιστικής).
- Η απλή συγκεντρωτική μέθοδος (naïve pooled analysis) στηρίζεται στην προσαρμογή των δεδομένων από όλους τους ασθενείς και τα χειρίζεται σαν να προέρχονται από έναν ασθενή, εκτιμώντας έτσι τις πληθυσμιακές παραμέτρους με μη-γραμμική παλινδρόμηση.
- Η πληθυσμιακή μέθοδος ή μέθοδος των μη-γραμμικών μικτών επιδράσεων αναλύει ταυτόχρονα όλα τα πληθυσμιακά δεδομένα, υπολογίζοντας παράλληλα τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους, την μεταβλητότητα τους(ενδοατομική και διατομική) καθώς και το σφάλμα. Η μη γραμμικότητα προκύπτει από την μη-γραμμική σχέση της εξαρτώμενης μεταβλητής (όπως π.χ. συγκέντρωση του φαρμάκου) με τις παραμέτρους του μοντέλου και τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Ο όρος «μικτές επιδράσεις» αναφέρεται στις παραμέτρους του μοντέλου και οφείλεται στην ύπαρξη παραμέτρων που δεν διαφέρουν μεταξύ των ατόμων και καλούνται σταθερές επιδράσεις και στην ύπαρξη παραμέτρων που δεν μπορούν να προβλεφθούν και που η τιμή τους διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ατόμων του υπό μελέτη πληθυσμού (τυχαίες επιδράσεις). Η μέθοδος αυτή είναι σήμερα στο επίκεντρο της φαρμακοκινητικής – φαρμακοδυναμικής μοντελοποίησης και προσομοίωσης και είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την ανάπτυξη των πληθυσμιακών φαρμακοκινητικών μοντέλων.

### 1.3.3. Δομή πληθυσμιακού μοντέλου.

Ένα πληθυσμιακό μοντέλο αποτελείται από τα εξής συστατικά μέρη: Το δομικό ή φαρμακοκινητικό μοντέλο που περιγράφει την καμπύλη της συγκέντρωσης στον χρόνο, προσαρμόζοντας και ενσωματώνοντας τα φαρμακοκινητικά δεδομένα κάθε ασθενούς στο πιθανότερο φαρμακοκινητικό μοντέλο που περιγράφει με ακρίβεια την φαρμακοκινητική του φαρμάκου στον υπό μελέτη πληθυσμό. Το στατιστικό μοντέλο που περιγράφει την μεταβλητότητα σε ιεραρχικά επίπεδα και ποσοτικοποιεί τη δι-ατομική ή πληθυσμιακή μεταβλητότητα (intersubject or interpatient variability) που εκφράζει την μεταβλητότητα των φαρμακοκινητικών παραμέτρων στον πληθυσμό και τη υπολειπόμενη ανεξήγητη μεταβλητότητα (residual unexplained variability) που εκφράζει την μεταβλητότητα στο επίπεδο των συγκεντρώσεων και υπολογίζεται ως σφάλμα. Το στατιστικό μοντέλο επιτρέπει και τον υπολογισμό ενός ακόμη είδους μεταβλητότητας, της ενδοατομικής μεταβλητότητας που εκφράζει την μεταβλητότητα των φαρμακοκινητικών παραμέτρων στο ίδιο άτομο, αλλά σε διαφορετική περίπτωση, όπως μπορεί να είναι μία άλλη περίοδος θεραπείας. Το μοντέλο συμμεταβλητών τέλος σκοπεύει στην εισαγωγή συμμεταβλητών που ως στόχο έχουν να μειώσουν την στοχαστική διατομική μεταβλητότητα, εξηγώντας ένα ποσοστό μεταβλητότητας του φαρμάκου και προσαρμόζοντας αναλόγως τα δοσολογικά σχήματα.

#### Δομικό(φαρμακοκινητικό) μοντέλο:

Το δομικό μοντέλο αποτελείται από την περιγραφή της μέσης μεταβολής της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα η οποία καθίσταται δυνατή με αλγεβρικές ή διαφορικές εξισώσεις. Οι αλγεβρικές εξισώσεις προτιμώνται για την περιγραφή των πιο απλών φαρμακοκινητικών μοντέλων ενώ οι διαφορικές για την περιγραφή των πιο σύνθετων. Οι δύο πιο σημαντικοί παράγοντες για την ανάπτυξη ενός όσο πιο ορθού με βάση τα δεδομένα δομικού μοντέλου είναι ο καθορισμός του σωστού αριθμού φαρμακοκινητικών διαμερισμάτων και ο προσδιορισμός της φαρμακοκινητικής της απορρόφησης και της απομάκρυνσης.

Φαρμακοκινητικά μοντέλα όπως το μονοδιαμερισματικό, διδιαμερισματικό έως και το τριδιαμερισματικό συνήθως χαρακτηρίζουν με επάρκεια τα περισσότερα πληθυσμιακά μοντέλα ενώ όσον αφορά τον αριθμό των διαμερισμάτων αξίζει να επισημανθεί ότι λίγα διαμερίσματα πιθανόν να μην περιγράφουν επαρκώς τα δεδομένα ενώ πολλά να μην εκτιμούν τις παραμέτρους με ακρίβεια ή να οδηγούν το σύστημα σε υπερπαραμετροποίηση, καθιστώντας το πιο πολύπλοκο και πιο δύσκολο στον ακριβή υπολογισμό των παραμέτρων.

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό της κινητικής της απομάκρυνσης, εάν η κινητική του φαρμάκου χαρακτηρίζεται ως γραμμική (linear elimination), τότε ο ρυθμός απομάκρυνσης είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του φαρμάκου και η κάθαρση θεωρείται σταθερή, ενώ εάν χαρακτηρίζεται από μη γραμμική απομάκρυνση, ο ρυθμός απομάκρυνσης μπορεί να περιγράφει με την εξίσωση των Michaelis Menten.

Όσον αφορά την κινητική της απορρόφησης, η αναπαράσταση της εξωαγγειακής απορρόφησης ύστερα από per os χορήγηση του φαρμάκου συνήθως περιγράφεται ως μία πρωτοταξική διαδικασία με μια σταθερά αναλογίας  $ka$ . Έτσι, η διαδικασία της απορρόφησης αναπαρίσταται ως μια παθητική διαδικασία που επηρεάζεται από τη διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ του σημείου απορρόφησης και

του αίματος. Μία επέκταση του συγκεκριμένου μοντέλου είναι και η προσθήκη ενός χρόνου καθυστέρησης (lag time) σε περίπτωση που η εμφάνιση του φαρμάκου στο αίμα καθυστερεί. Επίσης υπάρχει και η δυνατότητα προσθήκης διαμερισμάτων διέλευσης για την περιγραφή της εντερικής απορρόφησης όπου το απορροφούμενο φάρμακο διέρχεται μέσω μια σειράς διαμερισμάτων διέλευσης που χαρακτηρίζονται από μια σταθερά  $K_{tr}$ . Έτσι, παρέχεται η αναπαράσταση μιας συνεχούς λειτουργίας που τεκμηριώνει τις καθυστερήσεις στην απορρόφηση. Τέλος, η IV συνεχής έγχυση περιγράφεται καλύτερα ως μια μηδενοταξική διαδικασία, χαρακτηριζόμενη από μια σταθερά  $K_0$ . Η μηδενοταξική διαδικασία απορρόφησης σε περίπτωση *per os* χορήγησης βρίσκει εφαρμογή συνήθως όταν η φαρμακοτεχνική μορφή του χορηγούμενου φαρμάκου είναι βραδείας ή τροποποιημένης αποδέσμευσης.

### Στατιστικό μοντέλο:

Το στατιστικό μοντέλο περιγράφει τη μεταβλητότητα που παρουσιάζεται γύρω από το δομικό μοντέλο των φαρμακοκινητικών δεδομένων του υπό μελέτη πληθυσμού. Υπάρχουν δύο διαφορετικά είδη μεταβλητότητας: η διατομική μεταβλητότητα και η ενδοατομική μεταβλητότητα [116].

Η διατομική μεταβλητότητα (Between-subject variability, BSV) αφορά στη διακύμανση μίας παραμέτρου μεταξύ των ατόμων του υπό μελέτη πληθυσμού, περιγράφεται από την παράμετρο τυχαίας επίδρασης  $\eta$ , η οποία θεωρείται ότι ακολουθεί μία στατιστική κανονική κατανομή με μέση τιμή μηδέν και διακύμανση  $\omega^2$ . Με άλλα λόγια, οι τιμές του  $\omega$  περιγράφουν τις κατανομές των ατομικών τιμών των παραμέτρων και η παράμετρος  $\eta$  υποδηλώνει την διαφορά κάθε ατομικής τιμής μιας φαρμακοκινητικής παραμέτρου από τις αντίστοιχες πληθυσμιακές μέσες τιμές  $\theta$  που έχουν υπολογιστεί κατά την ανάπτυξη του πληθυσμιακού μοντέλου. Άρα, με βάση τον διαχωρισμό τυχαίων και σταθερών επιδράσεων σε μια πληθυσμιακή ανάλυση που έχει εκπονηθεί με την μέθοδο των μικτών επιδράσεων, οι φαρμακοκινητικές παράμετροι με διατομική μεταβλητότητα κατατάσσονται στην κατηγορία των τυχαίων επιδράσεων. Επομένως η φαρμακοκινητική παράμετρος του όγκου κατανομής  $V_d$  μπορεί να ενταχθεί σε ένα πληθυσμιακό μοντέλο ως:

$$V_{di} = \theta + \eta_i \quad (1)$$

Ωστόσο, οι φαρμακοκινητικές παράμετροι μοντελοποιούνται θεωρώντας ότι ακολουθούν λογαριθμοκανονική (log-normal) κατανομή, καθώς αυτό φαίνεται να περιγράφει καλύτερα τα φαρμακοκινητικά δεδομένα αλλά και το γεγονός ότι οι αυτοί παράμετροι παίρνουν πάντα θετικές τιμές. Συνεπώς, ο όγκος κατανομής θα εντασσόταν στο μοντέλο ως:

$$V_{di} = \theta * \exp(\eta_i) \quad (2)$$

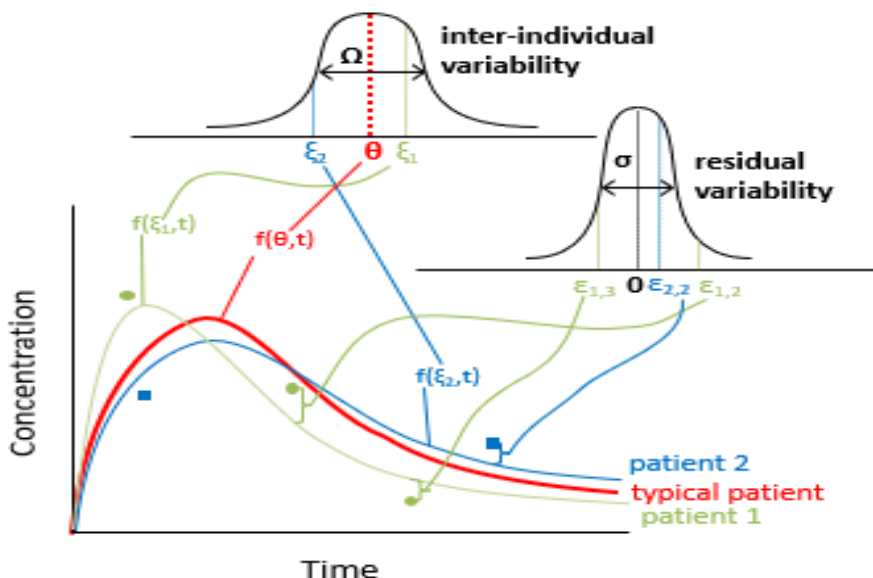
Σε ένα πληθυσμιακό μοντέλο, οι προς εκτίμηση παράμετροι από τα δεδομένα είναι οι τιμές των  $\theta$  και  $\omega$  για κάθε φαρμακοκινητική παράμετρο που περιγράφει το μοντέλο. Η έννοια της διατομικής μεταβλητότητας είναι πολύ σημαντική καθώς οι διαφορές στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους μεταξύ διαφορετικών ασθενών μεταβάλλουν και την συνολική έκθεση στο φάρμακο, διαμορφώνοντας την τελική του δράση στο οργανισμό. Για παράδειγμα, μεγάλη μεταβλητότητα στον όγκο κατανομής μπορεί να επηρεάσει το ποσοστό του συνδεδεμένου ή μη φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και άρα να περιορίσει ή να ενισχύσει την φαρμακολογική του δράση, δεδομένου ότι το ελεύθερο κλάσμα του φαρμάκου είναι το φαρμακολογικά δραστικό. Επίσης, μεταβολές στον όγκο κατανομής σε έναν πληθυσμό ενδέχεται να μεταβάλλει και τις απαιτήσεις για την δόση εφόδου ενός φαρμάκου,

μιας και αυξημένος όγκος κατανομής απαιτεί υψηλότερες δόσεις εφόδου ενώ αντίστοιχα χαμηλός όγκος κατανομής απαιτεί μικρότερες. Επιπλέον, μεγάλη μεταβλητότητα στην κάθαρση σε έναν πληθυσμό, μπορεί να οδηγήσει σε μία κλινικά σημαντική μεταβλητότητα της έκθεσης ενός πληθυσμού στο φάρμακο, μεγάλο τμήμα του οποίου θα εμφανίζει υποθεραπευτικά ή τοξικά επίπεδα του φαρμάκου σε αυξημένη ή μειωμένη κάθαρση αντίστοιχα. Συνεπώς, η ενσωμάτωση της πληροφορίας στην οποία οφείλεται η μεταβλητότητα στο πληθυσμιακό μοντέλο καθίσταται επιτακτική για την ανάπτυξη του βέλτιστου δοσολογικού σχήματος το οποίο θα παρουσιάζει μέγιστη αποτελεσματικότητα και ελάχιστες ανεπιθύμητες ενέργειες.

Η ενδοατομική ή υπολειπόμενη μεταβλητότητα (residual error) επιχειρεί να συμπεριλάβει τη μεταβλητότητα που δεν μπορεί να ερμηνευτεί από άλλες αιτίες μεταβλητότητας (όπως π.χ. την διατομική) και μπορεί να περιλαμβάνει σφάλματα κατά τον αναλυτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων ή την ελλιπή καταγραφή των φαρμακοκινητικών δεδομένων. Επίσης, εμπεριέχει πληροφορίες σχετικά με την μεταβλητότητα των παραμέτρων στο ατομικό επίπεδο του ενός ασθενή, από περίοδο δειγματοληψίας σε περίοδο δειγματοληψίας. Έτσι, πραγματοποιείται μια πρώτη προσπάθεια να ερμηνευτεί η μεταβλητότητα που παρατηρείται στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους μεταξύ δόσεων στην ίδια ημέρα ή σε διαφορετικές ημέρες. Κάνοντας την παραδοχή ότι το υπολειπόμενο σφάλμα  $\epsilon$  είναι ανεξάρτητο της ανεξάρτητης μεταβλητής και των τιμών των φαρμακοκινητικών παραμέτρων, θεωρούμε ότι ακολουθεί κανονική κατανομή με μέση τιμή μηδέν και διακύμανση  $\sigma^2$ . Σε συνδυασμό με το δομικό μοντέλο επομένως, η συνάρτηση που περιγράφει την παρατηρούμενη συγκέντρωση του φαρμάκου την χρονική στιγμή  $t_i$  είναι η  $f(\xi, t_i)$ :

$$C_i = f(\xi, t_i) + \epsilon_i \quad (3)$$

Όπου το  $\xi$  το διάνυσμα όλων των φαρμακοκινητικών παραμέτρων όπως η κάθαρση  $Cl$  και ο όγκος κατανομής  $Vd$  και  $\epsilon_i$  το υπολειπόμενο σφάλμα που προκύπτει από την προσαρμογή του πληθυσμιακού μοντέλου στα φαρμακοκινητικά δεδομένα (Σχήμα 21).



Σχήμα 21: Διάκριση της ενδοατομικής από την διατομική μεταβλητότητα σε σχέση με τις γραφικές παραστάσεις C-t του τυπικού ασθενή του πληθυσμιακού μοντέλου (τιμές  $\theta$ ) και των επιμέρους ασθενών στις οποίες στηρίχθηκε η ανάπτυξη του.

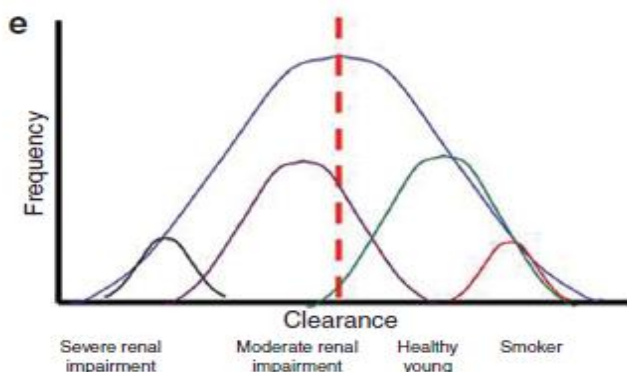
Το σφάλμα μπορεί να εκφραστεί ως προσθετικό, αναλογικό, εκθετικό ή συνδυαστικό και το μοντέλο σφάλματος που θα επιλεγεί κατά την φαρμακοκινητική ανάλυση εξαρτάται από τα δεδομένα. Τότε η παραπάνω συνάρτηση (δεδομένου ότι σε αυτήν το σφάλμα εκφράζεται ήδη προσθετικά) μετατρέπεται σε:

1.  $C_j = f(\xi, t_i)(1+\varepsilon_i)$  (4) αν το σφάλμα εκφράζεται αναλογικά.
2.  $C_j = f(\xi, t_i)\exp(\varepsilon_i)$  (5) αν το σφάλμα εκφράζεται εκθετικά.
3.  $C_j = f(\xi, t_i)(1+\varepsilon_{i1}) + \varepsilon_{i2}$  (6) αν το σφάλμα εκφράζεται με συνδυαστικό τρόπο.

Καταλήγοντας, η εκτίμηση του  $\sigma^2$  από πληθυσμιακά δεδομένα ποσοτικοποιεί την υπολειπόμενη ανεξήγητη μεταβλητότητα των δεδομένων ή την ενδοατομική μεταβλητότητα των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων που δεν μπορούν να ερμηνευθούν από την διατομική μεταβλητότητα των φαρμακοκινητικών παραμέτρων.

### Μοντέλο συμμεταβλητών:

Το μοντέλο συμμεταβλητών επιχειρεί να απαντήσει σε θεμελιώδη ερωτήματα που προκύπτουν κατά την ανάπτυξη ενός φαρμάκου, όπως πόσο μπορεί να επηρεάσει η ηλικία την έκθεση σε ένα φάρμακο, πόσο επηρεάζει ο γονότυπος ενός ατόμου την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου, πως μεταβάλλεται η φαρμακοκινητική ενός φαρμάκου σε ένδειξη έκπτωσης της νεφρικής ή ηπατικής λειτουργίας καθώς και σε πολλά άλλα ερωτήματα που συνδέονται με αλλαγές στην φαρμακοκινητική ή φαρμακοδυναμική ενός φαρμάκου ανάλογα με τα ιδιαίτερα ατομικά χαρακτηριστικά κάθε ασθενή στον υπό μελέτη πληθυσμό. Για παράδειγμα στο σχήμα 22, ύστερα από καταγραφή των διαφορετικών τιμών κάθαρσης ενός φαρμάκου στον γενικό πληθυσμό, έγινε αρχικά διαχωρισμός των μειωμένων τιμών τους ανάλογα με μια οργανική κατάσταση (νεφρική ανεπάρκεια) ή συμμεταβλητή (ενεργοί καπνιστές). Έπειτα από ανάλυση και διαπίστωση ότι οι τιμές κάθαρσης του φαρμάκου μεταβάλλονται ανάλογα με αυτές τις καταστάσεις, η ανάπτυξη ενός πληθυσμιακού μοντέλου κρίνεται επιτακτική ώστε να ενσωματωθεί όλη η διαθέσιμη πληροφορία που επηρεάζει την κάθαρση ως συμμεταβλητές.



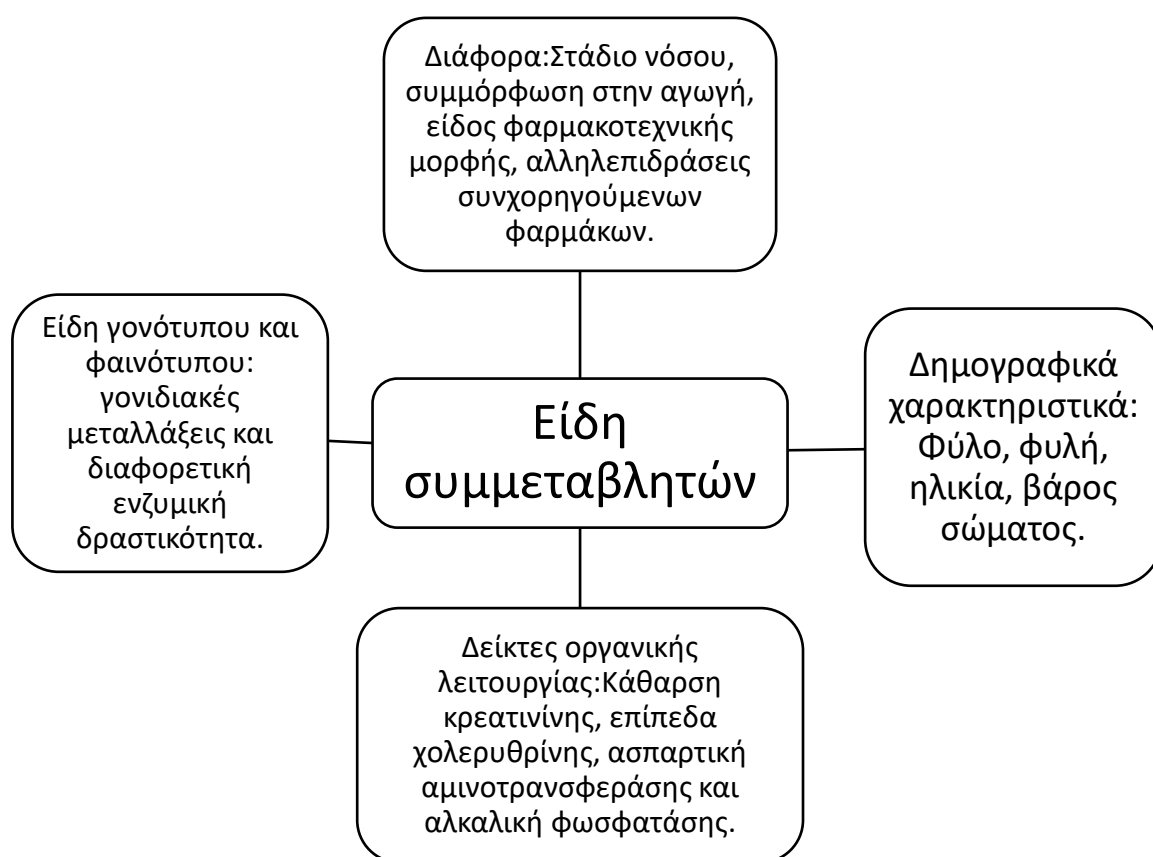
Σχήμα 22: Αντιπροσωπευτική κατανομή των τιμών κάθαρσης ενός φαρμάκου με τις υποκείμενες τιμές κάθαρσης να έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένες οργανικές καταστάσεις και συμμεταβλητές[114].

Ως συμμεταβλητή επομένως ορίζεται μία ανεξάρτητη μεταβλητή που εκφράζει ένα χαρακτηριστικό που αναφέρεται σε ένα άτομο και μπορεί να επηρεάσει το φαρμακοκινητικό ή φαρμακοδυναμικό προφίλ του φαρμάκου. Οι συμμεταβλητές διακρίνονται σε συνεχείς και κατηγορικές. Οι συνεχείς συμμεταβλητές παίρνουν συνεχείς τιμές (π.χ. βάρος, ύψος), ενώ οι κατηγορικές συμμεταβλητές παίρνουν διακριτές τιμές (π.χ. φυλή, φύλο)[117]. Οι μεταβλητές που έχουν αυτά τα χαρακτηριστικά

εντάσσονται στις συναρτήσεις που δίνουν τις τιμές των παραμέτρων, για παράδειγμα με συμμεταβλητή το βάρος (WT) ο όγκος κατανομής Vd από την εξίσωση (2) εισάγεται στο μοντέλο ως:

$$Vd=(\theta_1+ \theta_2 *WT)*\exp(\eta_i) \quad (7)$$

Συμπερασματικά, το μοντέλο συμμεταβλητών αποτελεί έναν από τους βασικούς στόχους της πληθυσμιακής μοντελοποίησης και προσπαθεί να επεξηγήσει τη διατομική μεταβλητότητα και να προσαρμόσει τα δοσολογικά σχήματα ανάλογα με τα ατομικά χαρακτηριστικά με πρωταρχικό στόχο να εντοπίσει υποομάδες κινδύνου με αυξημένη τοξικότητα ή μερική κλινική απόκριση. Η τελική επιλογή των συμμεταβλητών και η επακόλουθη εισαγωγή τους στο πληθυσμιακό μοντέλο βασίζεται σε στατιστικά κριτήρια, κριτήρια φυσιολογικής σημασίας καθώς και σε διαγνωστικά γραφήματα. Παραδείγματα συμμεταβλητών παρουσιάζονται παρακάτω:



### 1.3.4. Μέθοδος εκτίμησης των παραμέτρων του πληθυσμιακού μοντέλου.

Η εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου  $\theta$ ,  $\omega$  και  $\sigma$  για τις οποίες το μοντέλο προσαρμόζεται καλύτερα στα υπάρχοντα δεδομένα υπολογίζονται με τη μέθοδο εκτίμησης της μεγίστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood estimation method), μέθοδο που υιοθετείται ως μέσο εκτίμησης από την πλειονότητα των διαθέσιμων υπολογιστικών προγραμμάτων. Η μέθοδος αυτή εκτιμά τις τιμές των παραμέτρων και την διακύμανση τους, για τις οποίες η συνάρτηση πιθανοφάνειας

μεγιστοποιείται, δηλαδή μεγιστοποιείται η πιθανότητα τα παρατηρούμενα δεδομένα να ταιριάζουν και να προσαρμόζονται στις προβλέψεις του μοντέλου. Η συνάρτηση πιθανοφάνειας τροποποιείται στην μορφή μίας συνάρτησης που ονομάζεται αντικειμενική συνάρτηση, αντίστοιχη της συνάρτησης ελάχιστων τετραγώνων, η ελαχιστοποίηση της οποίας συνεπάγεται την μεγιστοποίηση της συνάρτησης πιθανότητας. Η ελάχιστη τιμή της αντικειμενικής συνάρτησης (objective function value – OFV) είναι το διπλάσιο του αρνητικού λογάριθμου της αντίστοιχης τιμής (-2LL) της συνάρτησης πιθανότητας. Η τιμή OFV αποτελεί ένα μέτρο της προσαρμογής του μοντέλου στα δεδομένα, έτσι ώστε μικρή τιμή OFV να αντιστοιχεί σε μία καλύτερη προσαρμογή, δηλαδή το μοντέλο να εκφράζει καλύτερα τα δεδομένα. Η ίδια η τιμή OFV δεν έχει κάποια σημασία, αφού εξαρτάται από τα εκάστοτε δεδομένα. Αντιθέτως, μεγάλη σημαντικότητα έχει η μεταβολή του OFV ή ΔOFV που πληροφορεί για την προσαρμογή διαφορετικών μοντέλων στο ίδιο αρχείο δεδομένων. Τα περισσότερα στατιστικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την επιλογή του βέλτιστου μοντέλου προσαρμογής στα φαρμακοκινητικά δεδομένα και που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην αξιολόγηση ενός πληθυσμιακού μοντέλου στηρίζονται στην τιμή OFV για τον διαχωρισμό των καλύτερων μοντέλων όπως θα επισημανθεί και στο κεφάλαιο της αξιολόγησης του πληθυσμιακού μοντέλου.

### 1.3.5. Αξιολόγηση πληθυσμιακού μοντέλου.

Κάθε προσαρμογή ενός πληθυσμιακού μοντέλου σε φαρμακοκινητικά δεδομένα θα πρέπει να διατηρεί μια ισορροπία ανάμεσα στην απλότητα και την πολυπλοκότητα. Θα πρέπει δηλαδή να είναι τόσο απλό ώστε να επιτρέπει την διεξαγωγή περαιτέρω αναλύσεων και διερεύνησης όπως τον υπολογισμό εναλλακτικών δοσολογικών σχημάτων σε διάφορες υποομάδες του συγκεκριμένου πληθυσμού αλλά και αρκετά σύνθετο και πολύπλοκο ώστε να περιγράφει και να αναλύει επαρκώς τα υπάρχοντα δεδομένα με μεγάλη προβλεπτική ικανότητα. Η πλειονότητα των εργαλείων αξιολόγησης ενός πληθυσμιακού μοντέλου σκοπεύουν στην αποκάλυψη τμημάτων του μοντέλου που οδηγεί σε κακή προσαρμογή των δεδομένων και που δεν εξηγούν ή ταιριάζουν στα δεδομένα και αποτελούνται κυρίως από διαγνωστικά γραφήματα ή στατιστικά κριτήρια. Η τελική επιλογή του δομικού και στατιστικού μοντέλου αλλά όπως επίσης και του μοντέλου συμμεταβλητών βασίζεται στα βέλτιστα αποτελέσματα που προκύπτουν από το σύνολο των κριτηρίων αξιολόγησης και ο συνυπολογισμός τους κρίνεται αναγκαίος για την ορθή επιλογή του τελικού πληθυσμιακού μοντέλου που θα παρουσιάζει την βέλτιστη προσαρμογή και ακρίβεια προς τα υπάρχοντα δεδομένα.

#### Έλεγχος των δεδομένων πριν την διεξαγωγή της ανάλυσης:

Πριν την διεξαγωγή της ανάλυσης, επιβάλλεται αρχικά ένας αναλυτικός έλεγχος των δεδομένων με σκοπό τον εντοπισμό πιθανών ελλειπών ή λογοκριμένων δεδομένων. Σε περίπτωση ύπαρξης ελλειπών δεδομένων, αν αυτά λείπουν με τυχαίο τρόπο τότε συνήθως απλώς δεν συμπεριλαμβάνονται στη ανάλυση διότι πιθανότατα δεν θα επηρεαστεί το τελικό αποτέλεσμα. Ωστόσο, αν τα δεδομένα λείπουν με συστηματικό τρόπο τότε ενδεχόμενη παράλειψη τους να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα της ανάλυσης. Η ύπαρξη από την άλλη μεριά δεδομένων κάτω από το όριο ανίχνευσης (below limit of quantification, BLQ) έχει αποδειχθεί ότι μεροληπτεί στον υπολογισμό των ατομικών παραμέτρων και καταλήγει σε επιλογή λανθασμένου μοντέλου. Γενικά, BLQ τιμή μπορεί να περιέχει οποιαδήποτε τιμή από μηδέν έως LLQ (lower limit quantification). Η παράλειψη των τιμών BLQ οδηγεί σε μεροληψία και συνήθως τακτική είναι η αντικατάσταση αυτών των τιμών με μηδέν ή LLQ/2. Γενικά, είναι ευρέως εδραιωμένο ότι η ύπαρξη τιμών BLQ σε ποσοστό <10% των συνολικών διαθέσιμων τιμών, δεν επηρεάζει την επιλογή του τελικού μοντέλου. Τέλος, κρίνεται σκόπιμο πριν την έναρξη της



αναλυτικής ανάπτυξης του πληθυσμιακού μοντέλου, να διερευνηθεί γραφικά το σύνολο των δεδομένων, έτσι ώστε να είναι πιο εύκολος ο εντοπισμός ενδεχόμενης εξωκείμενης παρατήρησης αλλά και να διευκολυνθεί η ανίχνευση συσχετίσεων ή συμμεταβλητών[115].

### Η τιμή του λογαρίθμου πιθανοφάνειας (-2LL) και έλεγχος λόγου πιθανοφάνειας:

Ο έλεγχος αυτός είναι ένας στατιστικός έλεγχος υποθέσεων που συγκρίνει την καλύτερη προσαρμογή δύο ιεραρχικών μοντέλων, που το ένα περιέχεται στο άλλο (φωλιασμένα μοντέλα). Είναι χρήσιμος κατά την διαδικασία ανάπτυξης του μοντέλου, όπου έχουμε την προσθήκη ενός στοιχείου ή μίας παραμέτρου σε ένα μοντέλο και επιθυμούμε να ελέγξουμε αν είναι πιο πιθανό το νέο μοντέλο να ταιριάζει και να περιγράφει καλύτερα τα δεδομένα. Όπως επισημάνθηκε και ανωτέρω, η μέθοδος της μέγιστης πιθανοφάνειας επιδιώκει να εκτιμήσει τις παραμέτρους ενός μοντέλου, οι οποίες δηλώνονται ως  $\beta$ , μεγιστοποιώντας τη συνάρτηση πιθανότητας  $L(\beta)$ . Αντί ωστόσο να μεγιστοποιηθεί η συνάρτηση πιθανότητας  $L(\beta)$ , είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί ο διπλάσιος αρνητικός φυσικός λογάριθμος  $-2\text{Log}L$  και σε αυτόν βασίζεται ο έλεγχος του λόγου πιθανοφάνειών (likelihood ratio test, LRT) που αποτελεί ένα στατιστικό τεστ για τη σύγκριση της καλής προσαρμογής δύο μοντέλων. Επομένως, μία πτώση την τιμής OFV ( $\Delta\text{OFV}$ )  $> 3.84$  αντιστοιχεί σε ένα θετικό έλεγχο υποθέσεων για την προσθήκη μίας παραμέτρου ή ενός βαθμού ελευθερίας, με επίπεδο σημαντικότητας 0.05 ενώ με επίπεδο σημαντικότητας 0.01 η αντίστοιχη τιμή για έναν θετικό έλεγχο υποθέσεων είναι 6.63[117].

### Τα κριτήρια πληροφορίας Akaike -AIC και Bayesian -BIC:

Όταν υπάρχουν πολλά υποψήφια μοντέλα για ένα σύνολο δεδομένων, όπως συμβαίνει στην πληθυσμιακή μοντελοποίηση, χρησιμοποιούμε κριτήρια επιλογής του βέλτιστου μοντέλου. Εν αντιθέσει με τον έλεγχο του λόγου πιθανοφάνειας που βασίζεται σε στατιστικά τεστ υπόθεσης, τα κριτήρια επιλογής μοντέλου βασίζονται στη θεωρία της πληροφορίας. Το κριτήριο πληροφοριών Akaike (AIC) είναι ένας εκτιμητής της σχετικής ποιότητας των στατιστικών μοντέλων για ένα συγκεκριμένο σύνολο δεδομένων και αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την σύγκριση και την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου. Το AIC μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μοντέλα που δεν είναι φωλιασμένα και χρησιμοποιείται πάντα για τα ίδια δεδομένα. Ένα δεδομένο πληθυσμιακό μοντέλο δεν θα μπορεί να περιγράψει ολοκληρωτικά τα δεδομένα και έτσι πάντα θα υπάρχει ένα τμήμα της πληροφορίας που θα παραμένει ανερμήνευτο. Το AIC περιγράφεται από τον παρακάτω τύπο:

$$AIC = -2LL + 2p$$

Όπου  $p$  ο αριθμός των εκτιμώμενων παραμέτρων στο μοντέλο και  $L$  είναι η μέγιστη τιμή της συνάρτησης πιθανότητας για το μοντέλο (μέγιστη πιθανοφάνεια). Το προτιμώμενο μοντέλο λοιπόν είναι εκείνο με την ελάχιστη τιμή AIC. Επομένως, το AIC λαμβάνει υπόψιν την μέγιστη πιθανοφάνεια του μοντέλου που περιγράφηκε παραπάνω, αλλά περιλαμβάνει επίσης και μια ποινή, που είναι μια αυξανόμενη συνάρτηση του αριθμού των εκτιμώμενων παραμέτρων. Η ποινή τιμωρεί την υπερπαραμετροποίηση, η οποία σχεδόν πάντα βελτιώνει την προσαρμογή. Συνεπώς, το κριτήριο AIC μεταφράζει το συμβιβασμό μεταξύ της καλής προσαρμογής του μοντέλου και της απλότητας του[118].

Το Μπεϋζιανό κριτήριο πληροφοριών (BIC) ή το κριτήριο πληροφοριών Schwarz είναι ένα επίσης κριτήριο για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου μεταξύ ενός συνόλου μοντέλων. Επιλέγεται εκείνο με το χαμηλότερο BIC και σε αυτήν την περίπτωση. Στηρίζεται και αυτό στην πιθανοφάνεια

αλλά θεωρείται αυστηρότερο και πιο συντηρητικό συγκριτικά με το κριτήριο πληροφοριών Akaike. Επομένως, αυτό περιγράφεται από τον κάτωθι τύπο:

$$BIC = -2LL + pLn(n)$$

Όπου  $p$  είναι ο αριθμός των εκτιμώμενων παραμέτρων στο μοντέλο,  $L$  είναι η μέγιστη τιμή της συνάρτησης πιθανότητας για το μοντέλο (μέγιστη πιθανοφάνεια) και  $n$  ο αριθμός των παρατηρήσεων. Το καταλληλότερο δομικό και στατιστικό μοντέλο λοιπόν ενός πληθυσμιακού μοντέλου είναι αυτό με τις χαμηλότερες τιμές  $-2LL$ , AIC και BIC, με μεγαλύτερη έμφαση να δίνεται στο κριτήριο BIC καθώς αυτό θεωρείται αυστηρότερο από τα υπόλοιπα δύο [119].

### Τιμές πληθυσμιακών παραμέτρων, ποσοστό σχετικού σφάλματος και ύπαρξη shrinkage:

Ύστερα από την εύρεση των πληθυσμιακών παραμέτρων από την προσαρμογή ενός πληθυσμιακού μοντέλου σε ένα σύνολο δεδομένων, επιβάλλεται να συγκριθούν με αντίστοιχες τιμές πληθυσμιακών παραμέτρων που είχαν υπολογισθεί από πληθυσμιακά μοντέλα προηγούμενων εργασιών. Σε περίπτωση σύγκλισης των τιμών από δύο διαφορετικές μελέτες, ενισχύεται η αξιοπιστία και εγκυρότητα των εκτιμώμενων πληθυσμιακών παραμέτρων από την υπάρχουσα έρευνα.

Το ποσοστό του σχετικού σφάλματος (R.S.E.%) της κάθε παραμέτρου, αλλά και η τιμή της διατομικής μεταβλητότητας, πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερα ώστε να συμπεραίνεται ότι οι φαρμακοκινητικές παράμετροι έχουν υπολογιστεί με το μικρότερο τυπικό σφάλμα και άρα με τη μεγαλύτερη ακρίβεια εφόσον τα τυπικά σφάλματα (standard errors) αντιπροσωπεύουν την αβεβαιότητα των εκτιμώμενων πληθυσμιακών παραμέτρων.

Επίσης, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί όταν υπάρχει υψηλό shrinkage στα δεδομένα. Υψηλό shrinkage (>30%) παρατηρείται όταν λόγω περιορισμένων δεδομένων (sparse data) οι ατομικές εκτιμήσεις του μοντέλου (EBEs) επηρεάζονται περισσότερο από τις τιμές των πληθυσμιακών παραμέτρων σε σχέση με τα δεδομένα. Αυτό έχει ως συνέπεια, οι EBEs να κλίνουν προς τις πληθυσμιακές τιμές και να μην αποτυπώνεται ξεκάθαρα η διατομική μεταβλητότητα και τα διαγνωστικά γραφήματα να είναι παραπλανητικά.

### Έλεγχος επίδρασης και εισαγωγής συμμεταβλητών:

Μετά την εύρεση του καταλληλότερου δομικού και στατιστικού μοντέλου και των συσχετίσεων πραγματοποιείται ο έλεγχος των συμμεταβλητών που μπορούν να επηρεάσουν το φαρμακοκινητικό προφίλ του φαρμάκου και του μεταβολίτη του. Πριν όμως από την έναρξη περαιτέρω ανάλυσης για τον έλεγχο ύπαρξης συμμεταβλητών, πραγματοποιείται πρώτα μια γραφική απεικόνιση των διαθέσιμων μεταβλητών με τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους. Αυτή η μέθοδος συμβάλλει στην εξοικονόμηση χρόνου αλλά και σε μία πρώτη εκτίμηση πιθανής ύπαρξης συμμεταβλητών διότι θεωρείται ότι αν υπάρχει μια στατιστικά σημαντική σχέση, αυτή θα μεταφράζεται στο γράφημα και θα είναι ορατή γραφικά. Έπειτα από την γραφική απεικόνιση, χρησιμοποιήθηκε η "stepwise forward" μέθοδος για την κατασκευή του μοντέλου των συμμεταβλητών κατά την οποία ελέγχεται η επίδραση του συνόλου των συμμεταβλητών στο σύνολο των παραμέτρων. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχεται η εισαγωγή κάθε μεταβλητής στο αρχικό μηδενικό μοντέλο, προσθέτοντας τη μεταβλητή της οποίας η

επίδραση δίνει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0.05$ ) και αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να μην εισάγεται άλλη μεταβλητή στο μοντέλο. Η σημαντικότητα της επίδρασης κάθε συμμεταβλητής προκύπτει :

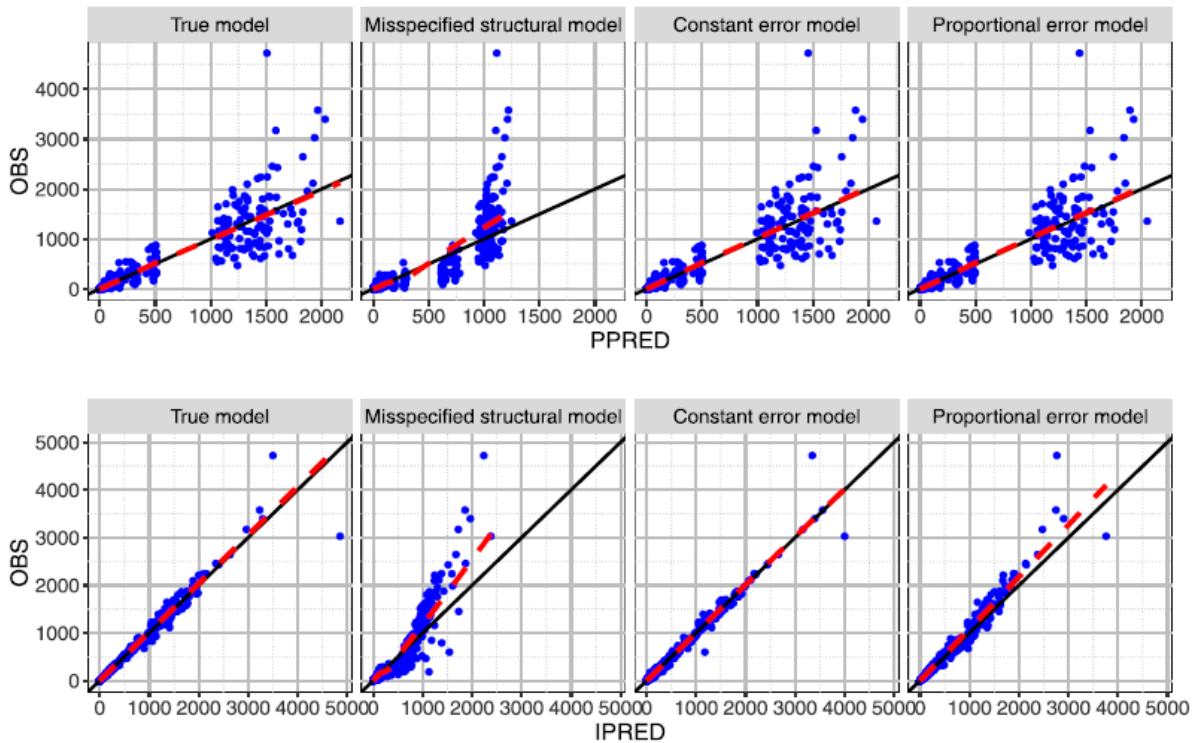
1. Από την τιμή της σημαντικότητας (p-value ) που εκτιμάται μέσω Wald chi square test στο οποίο ως μηδενική υπόθεση θεωρείται ότι η επίδραση της μεταβλητής είναι μηδενική.
2. Από την τυχόν μείωση της τιμής του λογαρίθμου πιθανοφάνειας (-2LL) κατά 3.84 μονάδες κατά την εισαγωγή μίας συμμεταβλητής.
3. Καθώς και από οποιαδήποτε μείωση των κριτηρίων πληροφορίας Akaike (AIC) και Bayesian (BIC).

Έπειτα, εφαρμόστηκε η μέθοδος “Backward elimination”, κατά την οποία ελέγχεται η επίδραση κάθε επιμέρους συμμεταβλητής παρουσία των άλλων σε κάθε παράμετρο. Αναλυτικότερα, ξεκινώντας με όλες τις υποψήφιες μεταβλητές του προηγούμενου σταδίου, δοκιμάζεται η διαγραφή κάθε μεταβλητής χρησιμοποιώντας ένα επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0.01$ , πιο αυστηρού σε σχέση με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο στάδιο. Διαγράφεται έτσι η μεταβλητή η απώλεια της οποίας προκαλεί στατιστικώς ασήμαντη χειροτέρευση του μοντέλου και επαναλαμβάνεται αυτή τη διαδικασία μέχρι καμία μεταβλητή να μην μπορεί να διαγραφεί χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική χειροτέρευση. Για να διαγραφεί μία μεταβλητή η τιμή του λογαρίθμου πιθανοφάνειας (-2LL) πρέπει να αυξάνεται λιγότερο από 6.63 μονάδες με την διαγραφή μιας μεταβλητής και τα κριτήρια πληροφορίας Akaike (AIC) και Bayesian (BIC) να παραμένουν σταθερά ή να μειώνονται[116].

### Αξιολόγηση των γραφημάτων καλής προσαρμογής (goodness-of-fit plots):

Τα βασικά διαγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον γραφικό έλεγχο καλής προσαρμογής ήταν τόσο πληθυσμιακά όσο και εξατομικευμένα διαγράμματα. Πιο αναλυτικά, αυτά ήταν[120]:

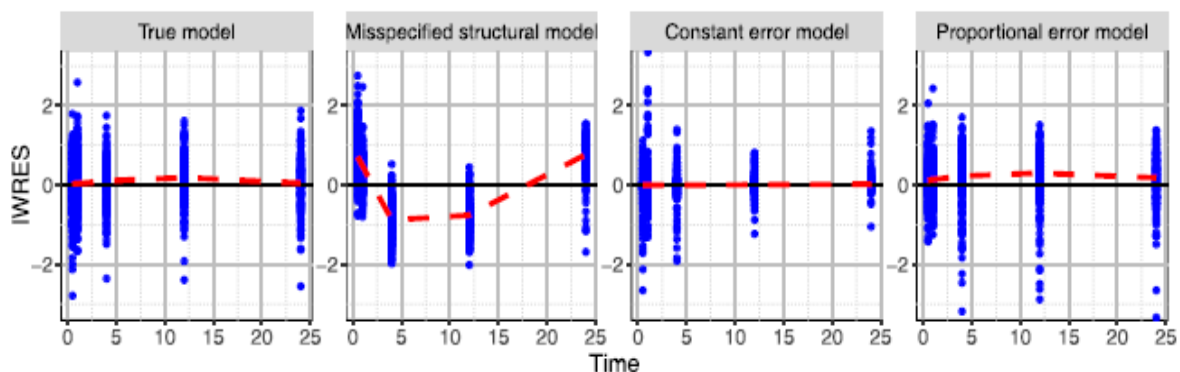
- ❖ Τα διαγράμματα παρατηρούμενων (observed) έναντι προβλεπόμενων ατομικών και πληθυσμιακών συγκεντρώσεων (Individual Predicted-Population Predicted) ή με τη συντομογραφία OBS vs. PRED/IPRED. Το συγκεκριμένο διάγραμμα επιχειρεί να υπολογίσει πόσο αποκλίνει η μέση συμπεριφορά, η οποία προκύπτει από τα πειραματικά δεδομένα όλων των εθελοντών, από τη συμπεριφορά των πειραματικών δεδομένων του κάθε εθελοντή. Αν το μοντέλο προσαρμόζεται καλά στα δεδομένα, τα σημεία κατανέμονται γύρω από την ευθεία  $y = x$ , ενώ στο διάγραμμα των ατομικών προβλέψεων θα πρέπει επιπλέον η διασπορά τους γύρω από την ευθεία να είναι στενή.



Σχήμα 23: Τυπική εικόνα του OBS vs PPRED, IPRED σε καλή προσαρμογή του μοντέλου, σε λανθασμένη επιλογή του μοντέλου και σε σταθερό και αναλογικό υπολειπόμενο σφάλμα[120].

Όπως φαίνεται και ανωτέρω, ύπαρξη τάσεων (trends) υποδεικνύει λανθασμένη επιλογή δομικού μοντέλου, μοντέλου υπολειπόμενου σφάλματος ή διατομικής μεταβλητότητας (Σχήμα 23).

- ❖ Τα διαγράμματα μεμονωμένων σταθμισμένων υπολοίπων (Individual Weighted Residuals) σε σχέση με το χρόνο ή με τη συντομογραφία IWRES vs. Time. Τα συγκεκριμένα διαγράμματα συμβάλλουν στην αξιολόγηση του δομικού και στατιστικού μοντέλου, με περισσότερη έμφαση να δίνεται στην αξιολόγηση του μοντέλου υπολειμματικής μεταβλητότητας. Σε περίπτωση καλής προσαρμογής του μοντέλου στα δεδομένα, τα σημεία θα πρέπει να κατανέμονται ομοιόμορφα γύρω από την οριζόντια γραμμή και τα περισσότερα σημεία να βρίσκονται στο διάστημα  $-1,96$  με  $1,96$ .

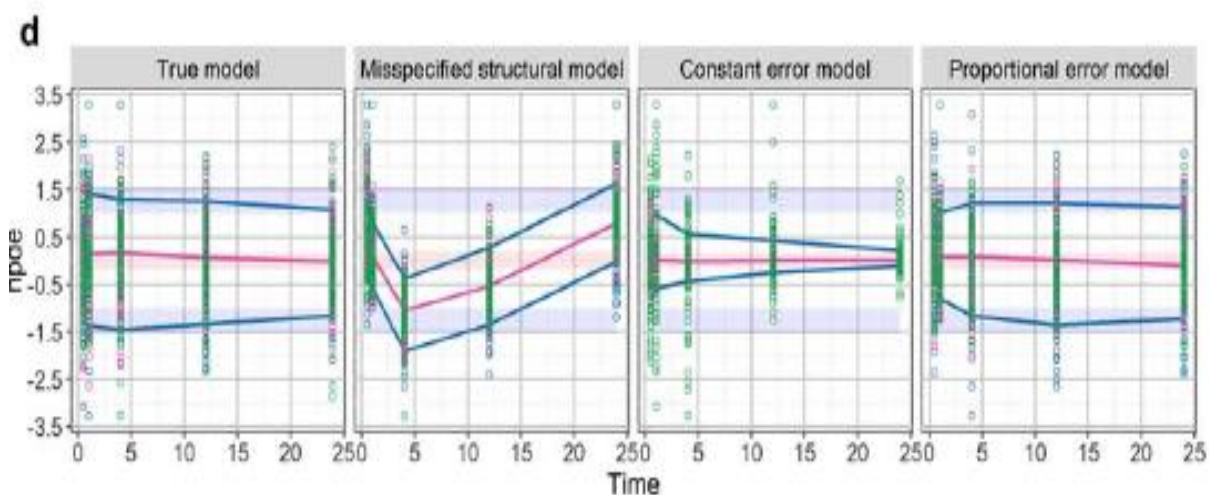


Σχήμα 24: Τυπική εικόνα του IWRES vs time σε καλή προσαρμογή του μοντέλου, σε λανθασμένη επιλογή του μοντέλου και σε σταθερό και αναλογικό υπολειπόμενο σφάλμα[120].

Και εδώ η ύπαρξη τάσεων υποδηλώνει λανθασμένη επιλογή δομικού ή υπολειπόμενου μοντέλου μεταβλητότητας. Αξίζει να τονιστεί ότι σε περίπτωση αραιών (sparse) δεδομένων, η απουσία τάσεων

δεν ισοδυναμεί με σωστή επιλογή μοντέλου και ότι η καλή απεικόνιση του γραφήματος μπορεί να είναι παραπλανητική.

- ❖ Τα διαγράμματα κανονικοποιημένης πρόβλεψης κατανομής σφαλμάτων (Normalized prediction distribution errors, NPDE) σε σχέση με το χρόνο ή NPDE vs time. Τα κανονικοποιημένα προβλεπόμενα σφάλματα κατανομής που αποτελούν μια μη παραμετρική μορφή των πληθυσμιακών σταθμισμένων υπολοίπων (Population Weighted Residuals). Και σε αυτή την κατηγορία γραφημάτων, σε μία καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα, τα σημεία θα πρέπει να κατανέμονται ομοιόμορφα γύρω από την οριζόντια γραμμή και τα περισσότερα σημεία να βρίσκονται στο διάστημα  $-1,96$  με  $1,96$ .

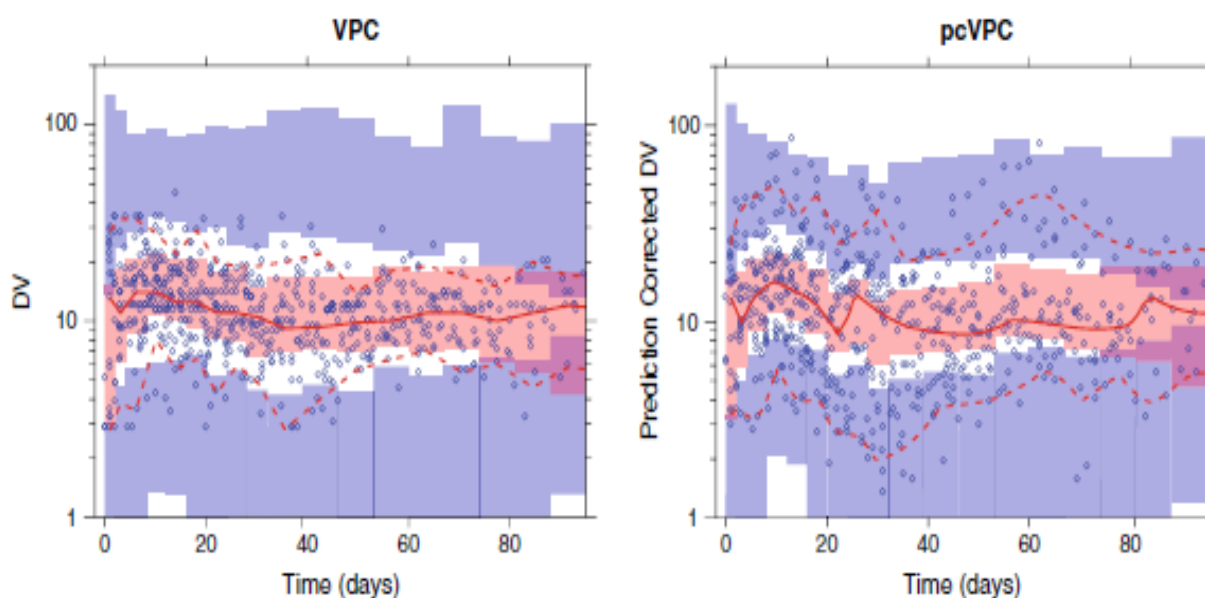


Σχήμα 25: Τυπική εικόνα του NPDE vs time σε καλή προσαρμογή του μοντέλου, σε λανθασμένη επιλογή του μοντέλου και σε σταθερό και αναλογικό υπολειπόμενο σφάλμα[120].

Ύπαρξη τάσεων υποδηλώνει λανθασμένη επιλογή δομικού, υπολειπόμενου μοντέλου μεταβλητότητας ή διατομικής μεταβλητότητας, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα παραπάνω αντιπροσωπευτικά γραφήματα.

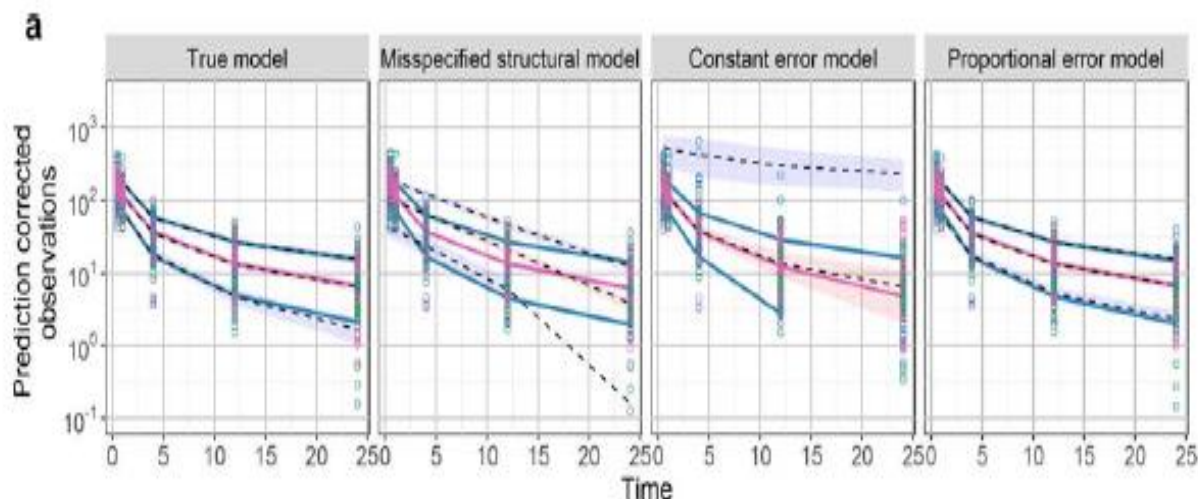
- ❖ Τα διαγράμματα συσχετίσεων μεταξύ των EBEs αλλά και τα διαγράμματα EBEs-covariates (συμμεταβλητές). Οι ατομικές εκτιμήσεις των φαρμακοκινητικών παραμέτρων καλούνται εμπειρικές μπεϋζιανές εκτιμήσεις (empirical bayesian estimates – EBEs), αφού υπολογίζονται με δεδομένη την πληθυσμιακή κατανομή των παραμέτρων. Αφού υπολογιστούν οι EBEs μπορούμε στη συνέχεια να τις αναπαραστήσουμε γραφικά μεταξύ τους ή έναντι των δοκιμαζόμενων συμμεταβλητών. Η γραφική αναπαράσταση μεταξύ των EBEs έχει ως σκοπό την αποκάλυψη πιθανών συσχετίσεων μεταξύ των φαρμακοκινητικών παραμέτρων, η εισαγωγή των οποίων θα σταθεροποιήσει και θα βελτιώσει το πληθυσμιακό μοντέλο. Παράλληλα, η γραφική παράσταση των EBEs έναντι των πιθανών συμμεταβλητών έχει ως κύριο σκοπό την εμφάνιση τάσεων μεταξύ των EBEs και των συμμεταβλητών ώστε να εισαχθούν καινούργιες συμμεταβλητές στο πληθυσμιακό μοντέλο ή να τροποποιηθεί το ήδη υπάρχον μοντέλο συμμεταβλητών, με απώτερο στόχο την βελτίωση της προσαρμογής του πληθυσμιακού μοντέλου στα δεδομένα και την τεκμηρίωση ενός σημαντικού ποσοστού της διατομικής μεταβλητότητας μέσω της εισαγωγής νέων συμμεταβλητών.
- ❖ Τα διαγράμματα οπτικού ελέγχου προβλεπτικής ικανότητας μοντέλου (Visual Predictive Check, VPC). Η μέθοδος του VPC βασίζεται στην αρχή ότι αν ένα μοντέλο περιγράφει καλά τα πραγματικά δεδομένα, και διεξάγουμε προσομοιώσεις βασισμένοι στο μοντέλο, τα

προσομοιωμένα δεδομένα θα είναι παρόμοια με τα πραγματικά, αξιολογείται δηλαδή η ικανότητα του μοντέλου που αναπτύχθηκε να περιγράφει τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξή του. Επομένως, ένας μεγάλος αριθμός εικονικών σετ μετρήσεων αναγεννάται με προσομοίωση Monte Carlo, αξιοποιώντας το ίδιο μοτίβο δειγματοληψίας με αυτό του αρχικού αρχείου δεδομένων. Το VPC προσφέρει την δυνατότητα για μία οπτική σύγκριση των κατανομών των παρατηρήσεων και των προσομοιωμένων προβλέψεων ως προς τον χρόνο ή κάποια άλλη μεταβλητή επιλογής. Τα pcVPC διαφέρουν από τα παραδοσιακά VPC στο ότι η εξαρτημένη μεταβλητή έχει υποστεί διόρθωση πρόβλεψης πριν τον υπολογισμό των περιγραφικών στατιστικών μεγεθών. Η διόρθωση πρόβλεψης στοχεύει να διορθώσει τις διαφορές που προκύπτουν από το σύνολο των εξαρτημένων μεταβλητών (χρόνος, δόση κλπ) σε κάθε διάστημα χρόνου και έτσι να διαγνώσει με μεγαλύτερη ευκολία τις αστοχίες του επιλεγμένου μοντέλου. Μία τυπική εικόνα VPC και pcVPC είναι η παρακάτω που συγκρίνει προσομοιώσεις και παρατηρήσεις ως προς τον χρόνο μετά την δόση [121].



Σχήμα 26: Τυπική εικόνα VPC από συγκεντρώσεις του τακρόλμους σε ng/ml (ανοσοκατασταλτικό φάρμακο) σε μεταμοσχευμένους παιδιατρικούς ασθενείς έναντι του χρόνου [121].

Παρατηρήσεις και προβλέψεις αθροίζονται σε διαστήματα χρόνου μετά την δόση (bins) για τα οποία υπολογίζονται τα μέτρα περιγραφικής στατιστικής. Η κόκκινη συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην διάμεσο (median) των παρατηρήσεων, ενώ οι διακεκομμένες κόκκινες γραμμές στο 5ο και 95ο εκατοστημόριο των παρατηρήσεων. Η κόκκινη περιοχή συμπερασματικά ορίζει το 95% διάστημα εμπιστοσύνης της διαμέσου των προσομοιωμένων προβλέψεων ενώ η μπλε περιοχή ορίζει το 95% διάστημα εμπιστοσύνης του 5ου και 95ου εκατοστημορίου των προβλέψεων. Η ύπαρξη τάσεων στο διάγραμμα VPC μπορεί να οφείλεται σε λανθασμένη επιλογή δομικού μοντέλου ή μοντέλου υπολειπόμενης ή διατομικής μεταβλητότητας όπως διαπιστώνεται και στα κάτωθι διαγράμματα (Σχήμα 27).



Σχήμα 27: Τυπική εικόνα του VPC vs time σε καλή προσαρμογή του μοντέλου, σε λανθασμένη επιλογή του μοντέλου και σε σταθερό και αναλογικό υπολειπόμενο σφάλμα[120].

### Μέθοδος Bootstrap:

Συνήθως, το τελικό πληθυσμιακό μοντέλο ενός συνόλου δεδομένων ελέγχεται για την αξιοπιστία και τη σταθερότητα του με την μέθοδο «bootstrap». Η μέθοδος bootstrap είναι μία μέθοδος για την αναγέννηση πλήθους σειρών δεδομένων από ένα dataset, που βασίζεται στην επαναληπτική δειγματοληψία (resampling) υποδειγμάτων του αρχικού dataset και επανάθεσή τους στη συνέχεια με τυχαία σειρά. Έπειτα από την δημιουργία ενός νέου dataset από τα αρχικά δεδομένα, το υπό αξιολόγηση τελικό πληθυσμιακό μοντέλο προσαρμόζεται σε κάθε ένα dataset και εκτιμώνται εκ νέου οι αντίστοιχες φαρμακοκινητικές παράμετροι αλλά και οι διακυμάνσεις και τα τυπικά σφάλματα τους. Ύστερα με βάση αυτούς τους υπολογισμούς, εκτιμώνται τα μεγέθη περιγραφικής στατιστικής όπως τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης (confidence intervals) και το σχετικό τυπικό σφάλμα (relative standard error). Στο τέλος, γίνεται σύγκριση των αντίστοιχων μέσων τιμών των πληθυσμιακών παραμέτρων και των σχετικών τυπικών σφαλμάτων που προέκυψαν από την bootstrap με αυτές του τελικού μοντέλου καθώς και ελέγχεται αν οι πρώτες εμπεριέχονται στα διαστήματα εμπιστοσύνης που προέκυψαν από την bootstrap. Συνεπώς, καθίστανται ευνόητο ότι η bootstrap αποτελεί μια σημαντική μέθοδος για την επικύρωση της σταθερότητας (robustness) και της αξιοπιστίας του τελικού μοντέλου[122].

## 2. Ειδικό Μέρος

### 2.1 Σκοπός της μελέτης.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν αρχικά η ανάπτυξη ενός πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου, βασισμένο σε πυκνά δεδομένα, για τον χαρακτηρισμό της φαρμακοκινητικής του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη φαρμακοκινητική της κλοπιδογρέλης στο πλάσμα σε άμεση συσχέτιση με το γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς. Επιπλέον, παράλληλα με την ανάπτυξη του πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου, έγινε διερεύνηση των ατομικών χαρακτηριστικών των ασθενών αλλά και του εκάστοτε βιοισοδύναμου σκευάσματος για τυχόν ύπαρξη συμμεταβλητών ή συσχετίσεων σε σχέση με τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους. Έμφαση δόθηκε στο αλληλίο μειωμένης ενεργότητας του CYP2C19 λόγω ύπαρξης τεκμηριωμένης φαρμακογενετικής αντίστασης στην κλοπιδογρέλη με την παρουσία του αλλά και στην χρήση διαφορετικών σκευασμάτων κλοπιδογρέλης (πρωτότυπο Plavix-bisulfate clopidogrel, βιοισοδύναμα Clovelen, Grepid-besylate clopidogrel) διότι πέρα από την προφανή ισοδυναμία στη βιοδιαθεσιμότητα τους, εξετάστηκε αν μεταβάλλονται οι υπόλοιπες φαρμακοκινητικές παράμετροι ανάλογα με το άλας μητρικού μορίου που χρησιμοποιείται.

### 2.2 Ασθενείς και μέθοδοι.

Η πληθυσμιακή ανάλυση βασίστηκε σε φαρμακοκινητικά δεδομένα της μελέτης «ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΗΣ ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΞΕΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ»[Βλ. Παράρτημα] που περιλάμβανε αρχικά τη χορήγηση κλοπιδογρέλης σε δόση εισαγωγής-φόρτισης 300mg, 600mg ή 75mg για την πρώτη ημέρα και εν συνεχεία σε δόση συντήρησης 75 mg την ημέρα για διάστημα τουλάχιστον 6 μηνών-1 χρόνου (πιθανώς σε συνδυασμό με ακετυλοσαλικυλικό οξύ σε δόση 75-325mg ημερησίως) και λήψη αίματος για τον προσδιορισμό των επιπέδων του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης στο αίμα. Το προτεινόμενο δειγματοληπτικό σχήμα περιλάμβανε τη συλλογή έξι (6) δειγμάτων αίματος στα ακόλουθα χρονικά σημεία: προ χορήγησης (κατά την έναρξη της θεραπείας), 15 min, 45 min, 1h, 6h και 24h μετά τη χορήγηση. Επίσης, οι ασθενείς παρέχουν δυο (2) επιπλέον δείγματα σε διαφορετικές περιπτώσεις εντός του διαστήματος χορήγησης. Τα επιπλέον αυτά δείγματα θα επιτρέψουν τον καλύτερο χαρακτηρισμό του πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου.

#### Μετρούμενες παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στην πληθυσμιακή ανάλυση:

- Συγκέντρωση ανενεργού μεταβολίτη κλοπιδογρέλης στο πλάσμα που αποτελεί την φαρμακοκινητική μεταβλητή της μελέτης.
- Γονοτύπηση του γονιδίου CYP2C19 που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του φαρμάκου προκειμένου να καθοριστούν ποιοι από τους συμμετέχοντες ασθενείς στην μελέτη διαθέτουν τα αλληλίου μειωμένης δραστηριότητας CYP2C19\*2 και CYP2C19\*3.

#### Κριτήρια εισόδου στη μελέτη:

Δικαίωμα εισόδου στην μελέτη είχαν όλοι οι Καυκάσιοι ασθενείς (άνδρες και γυναίκες) με οξεία στεφανιαία νόσο ή ιστορικό οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου ηλικίας 20-80 ετών που εισάγονται



για πρώτη φορά στη θεραπεία με κλοπιδογρέλη μετά τη διάγνωση της αγγειακής νόσου. Λήφθηκε υπόψη η ταυτόχρονη χορήγηση στατινών και ακετυλοσαλικυλικού οξέος κατά την έναρξη θεραπείας με κλοπιδογρέλη στα πλαίσια της μελέτης.

### Γενικά κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη:

Ασθενείς με ασταθή στηθάγχη, αιμοδυναμική αστάθεια, ενεργό αιμορραγία και αιμορραγική προδιάθεση αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Επίσης, όσοι λάμβαναν από του στόματος αντιπηκτική αγωγή με κουμαρινικά παράγωγα, όσοι είχαν πρόσφατη θεραπεία με ανταγωνιστές της γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa ή άλλα αντιπηκτικά και αντιαιμοπεταλιακά σκευάσματα (εξαιρείται η ασπιρίνη) ή μακρόχρονη χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών (ΜΣΑΦ) θεωρήθηκαν ακατάλληλοι για συμμετοχή.

Σε ό,τι αφορά εργαστηριακά ευρήματα, κριτήρια αποκλεισμού αποτελούσαν:

- Αριθμός αιμοπεταλίων  $< 150000/L$  που συνιστούν σοβαρή θρομβοπενία.
- Κρεατινίνη ορού  $> 2 \text{ mg/dL}$  που υποδηλώνει σοβαρή νεφρική δυσλειτουργία.
- Ηπατική νόσος με επίπεδα χολερυθρίνης μεγαλύτερα των  $2 \text{ mg/dL}$ .
- Αναιμία με επίπεδα αιμοσφαιρίνης  $< 10 \text{ g/dL}$ .



## Πληθυσμός , διάρκεια και τύπος διεξαγωγής μελέτης:

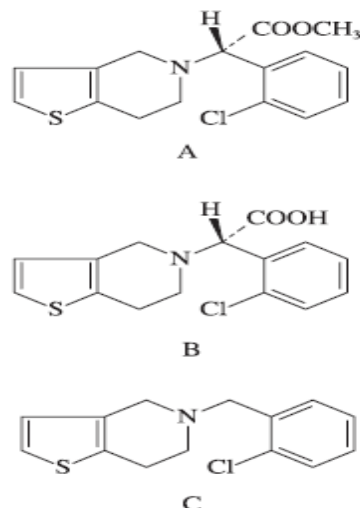
Στη μελέτη είχαν λάβει μέρος 50 ασθενείς με οξεία στεφανιαία νόσο, που ήταν Καυκάσιοι άνδρες και γυναίκες ηλικίας 20-80 ετών με ιστορικό εμφράγματος του μυοκαρδίου και στεφανιαίας νόσου και η διάρκεια μελέτης ήταν 24 μήνες. Το κλινικό μέρος, που περιλάμβανε την δειγματοληψία των ασθενών, την μέτρηση των επιπέδων του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης ύστερα από φυγοκέντρηση και μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) καθώς και την γονοτύπηση των ασθενών με τη χρήση PCR, πραγματοποιήθηκε στην Β' Καρδιολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικών». Η φαρμακοκινητική ανάλυση και η ανάπτυξη του πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου διενεργήθηκε στο Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ.

## Ανάλυση δειγμάτων:

Η ανάλυση των δειγμάτων περιλάμβανε μέτρηση των επιπέδων του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης clopidogrel-IM με τη χρήση της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ανίχνευση υπεριώδους-ορατού (HPLC-UV-Vis). Επιπλέον, είχε γίνει γονοτύπηση των γονιδίων CYP2C19 με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Τα συλλεγόμενα δείγματα αίματος (σε σωληνάκια με 3.8 % κιτρικό νάτριο) φυγοκεντρήθηκαν προς παραλαβή του πλάσματος και εν συνεχεία καταψύχθηκαν στους -20 °C μέχρι την ανάλυση. Τα κυτταρικά κλάσματα αποθηκεύτηκαν για σύντομο χρονικό διάστημα στους -20 °C μέχρι την απομόνωση του γονιδιώματος. Το γονιδίωμα DNA απομονώθηκε από τα περιφερειακά λευκοκύτταρα του αίματος με τη χρήση του FlexiGene kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), μια γονοτυπική προσέγγιση του CYP2A19 και CYP2C19 πολυμορφισμού χρησιμοποιώντας restriction fragment length polymorphism. Όλες οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι επικυρωμένες. Η δειγματοληψία έγινε από το νοσηλευτικό προσωπικό του νοσοκομείου ΑΤΤΙΚΟΝ στις εξής ώρες:

- ❖ 1η δειγματοληψία: Πρίν ακριβώς τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης
- ❖ 2η δειγματοληψία: 30 λεπτά με τη χορήγηση κλοπιδογρέλης
- ❖ 3η δειγματοληψία: 2 ώρες μετά τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης
- ❖ 4η δειγματοληψία: 4 ώρες μετά τη χορήγηση της κλοπιδογρέλης

Η μέτρηση του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης (καρβοξυλικού οξέος της κλοπιδογρέλης, CCA) σε δείγματα πλάσματος αίματος έγινε με τη βοήθεια συνδυασμού υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) και φασματομετρίας υπεριώδους-ορατού (UV) [123]. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ήταν ισοκρατική και αντιστρόφου φάσεως και πριν την εισαγωγή του δείγματος σε αυτήν, προηγήθηκε υγρή-υγρή εκχύλιση ενώ το εσωτερικό πρότυπο (internal standard, I.S.) που επιλέχθηκε ήταν η τικλοπιδίνη λόγω παρόμοιας χημικής δομής και άρα χρωματογραφικής συμπεριφοράς.



Σχήμα 28: Χημική δομή της κλοπιδογρέλης(A), του ανενεργού-καρβοξυλικού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης(B) και της τικλοπιδίνης(C). Είναι εμφανής η συγγένεια των χημικών δομών μεταξύ τους που οδήγησε στην επιλογή της τικλοπιδίνης ως εσωτερικό πρότυπο για την χρωματογραφική ανάλυση[123].

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση των αλληλίων μειωμένης δραστηριότητας ως προς το μεταβολισμό της κλοπιδογρέλης CYP2C19\*2 και CYP2C19\*3 είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η επιλογή των συγκεκριμένων γονιδίων έγινε διότι το CYP2C19 συμμετέχει σε μεγάλο ποσοστό στην βιομετατροπή της κλοπιδογρέλης στον ενεργό μεταβολίτη, και πιθανή ύπαρξη των μειωμένων αλληλίων οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση του ενεργού μεταβολίτη και άρα ελαττωμένο αντιαιμοπεταλιακό αποτέλεσμα. Η γονοτύπηση έγινε με τη χρήση του High Pure PCR Template Preparation Kit και του Lightmix kit CYP2C19\*2 and CYP2C19\*3 της εταιρείας ROCHE. Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκαν σαν κατηγορικές μεταβλητές στην φαρμακοκινητική ανάλυση τρεις(3) διαφορετικοί γονότυποι όπου 0 όταν δεν εντοπιζόταν κανένας πολυμορφισμός στο γονίδιο (wild type/wild type) CYP2C19, 1 όταν εντοπιζόταν το αλληλίο μειωμένης δραστηριότητας CYP2C19\*2 και 2 όταν εντοπιζόταν το αλληλίο μειωμένης δραστηριότητας CYP2C19\*3.

### Λογισμικό-υπολογιστικό πρόγραμμα:

Η πληθυσμιακή φαρμακοκινητική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη μέθοδο της μη γραμμικής ανάλυσης μικτών επιδράσεων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα Monolix© 2019R2 (Lixoft, Orsay, France). Το Monolix είναι το αποτέλεσμα ενός δεκαετούς ερευνητικού προγράμματος στον τομέα της στατιστικής και της μοντελοποίησης, με επικεφαλής την Inria (Εθνικό Ινστιτούτο Ερευνών Πληροφορικής και Αυτοματισμού) πάνω στα μη γραμμικά μοντέλα μικτών επιδράσεων για προηγμένη πληθυσμιακή ανάλυση, PK/PD (φαρμακοκινητική/φαρμακοδυναμική), προκλινική και κλινική μοντελοποίηση. Η εκτίμηση των πληθυσμιακών παραμέτρων είναι ο βασικός στόχος στη μη γραμμική μοντελοποίηση μικτών επιδράσεων. Στο Monolix, γίνεται με τον αλγόριθμο της στοχαστικής προσέγγισης της προσδοκίας-μεγιστοποίησης (Stochastic Approximation Expectation-Maximization, SAEM), με σκοπό να υπολογιστεί η μέγιστη πιθανοφάνεια των πληθυσμιακών φαρμακοκινητικών παραμέτρων. Ο SAEM έχει αποδειχθεί ότι είναι εξαιρετικά αποτελεσματικός τόσο για απλά όσο και για πολύπλοκα μοντέλα: για κατηγορικά δεδομένα, ποσοτικά, time-to-event δεδομένα, μικτά μοντέλα καθώς και σε μοντέλα

που βασίζονται σε πολύπλοκες διαφορικές εξισώσεις. Η σύγκλιση του SAEM έχει αποδειχθεί αρκετά δύσκολη αλλά η εφαρμογή της στο Monolix είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική. Επιπλέον, μία βελτιστοποίηση της εφαρμογής του SAEM στο Monolix αποτελεί η ενσωμάτωση και χρησιμοποίηση των ρυθμίσεων της μαρκοβιανής αλυσίδας Monte Carlo (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) για το βήμα προσομοίωσης. Τέτοιες μέθοδοι προσδοκίας - μεγιστοποίησης έχουν μεγαλύτερη σταθερότητα στην ανάλυση σύνθετων μοντέλων και μπορούν να προσφέρουν περισσότερο ακριβή αποτελέσματα. Για την εφαρμογή της μεθόδου επικύρωσης του μοντέλου με τη μέθοδο Bootstrap χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα R και συγκεκριμένα το πακέτο 'Rsmix' που δημιουργήθηκε μόλις τον Ιούλιο 2018.

## 2.3. Αποτελέσματα

### Δημογραφικά χαρακτηριστικά ασθενών:

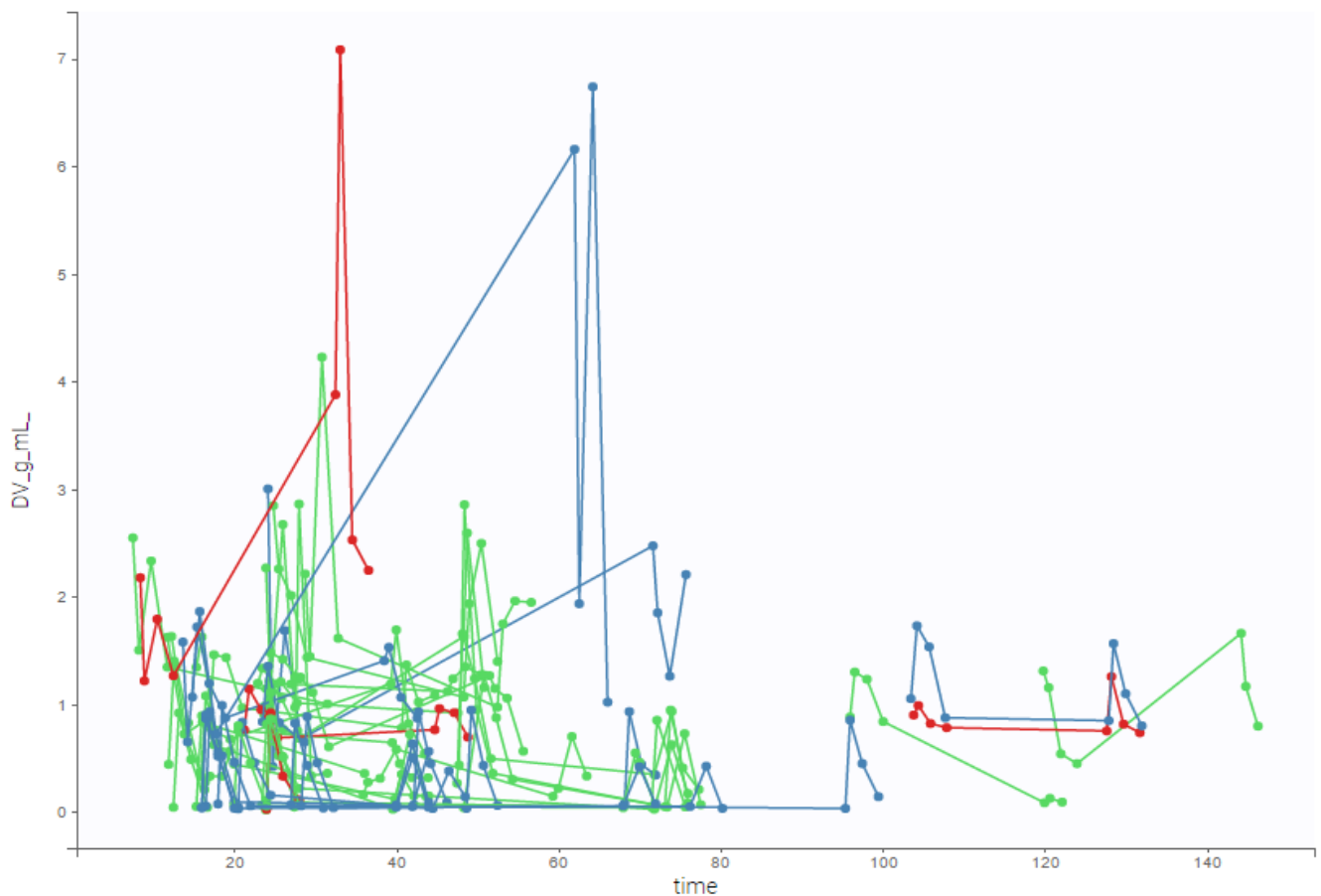
Ο αριθμός των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη εργασία ήταν συνολικά 50 άτομα, τα οποία πληρούσαν τα κριτήρια επιλογής που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο Ασθενείς και μέθοδοι. Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται συνολικά και όχι ανάλογα με το νόσημα (οξύ στεφανιαίο σύνδρομο ή ιστορικό οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου) εφόσον αυτός ο παράγοντας δεν λήφθηκε υπόψιν κατά τη πληθυσμιακή φαρμακοκινητική ανάλυση. Οι δόσεις κλοπιδογρέλης που χορηγήθηκαν ήταν 75,300 και 600mg. Πιο συγκεκριμένα, σε 20 ασθενείς χορηγήθηκε η δόση των 75mg, σε 24 ασθενείς η δόση των 300mg ενώ τέλος σε 6 ασθενείς χορηγήθηκε η δόση των 600mg. Η ηλικία των συμμετεχόντων ήταν  $67 \pm 11$  χρόνια με ύψος  $170 \pm 10$ cm και ζύγιζαν  $81 \pm 15$  κιλά. Συμμετείχαν άτομα και των δύο φύλων με την πλειοψηφία όμως να απαρτίζεται από τους άντρες και συγκεκριμένα, ο αριθμός των ανδρών και γυναικών ήταν 39 και 11 αντίστοιχα. Το πρωτότυπο σκεύασμα ήταν το Plavix ενώ τα βιοισοδύναμα σκευάσματα της κλοπιδογρέλης ήταν το Clovelen και το Grepid. 4 ασθενείς χρησιμοποιούσαν το Clovelen (DRUG 1), 15 το Plavix (DRUG 0) και τέλος 31 ασθενείς έκαναν χρήση του Grepid (DRUG 2). Επίσης 14 ασθενείς ήταν σε σταθεροποιημένη κατάσταση με την θεραπεία τους με κλοπιδογρέλη κατά την εισαγωγή τους στην παρούσα μελέτη. Παράλληλα, από το σύνολο των 50 ασθενών οι 35 ήταν ομοζυγώτες στο φυσιολογικό αλληλίο και άρα φυσιολογικοί μεταβολιστές ενώ 11 ασθενείς ήταν ετεροζυγώτες στο αλληλίο μειωμένης ενεργότητας \*1/\*2 και 4 ασθενείς ήταν ετεροζυγώτες στο αλληλίο μειωμένης ενεργότητας \*1/\*3 και άρα 15 ασθενείς στο σύνολο ήταν ενδιάμεσοι μεταβολιστές.

Πίνακας 8: Συνοπτική παρουσίαση των δημογραφικών χαρακτηριστικών των 50 ασθενών που έλαβαν μέρος στην συγκεκριμένη μελέτη.

Μεταβλητή	Τιμή	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Εύρος(min-max)
Φύλο:				
Άνδρες	39			
Γυναίκες	11			
Ύψος(cm)		170	10	150-190

Βάρος(kg)	81	15	41-122
Ηλικία(χρόνια)	67	11	37-80
<b>Δόση(mg):</b>			
75mg	20		
300mg	24		
600mg	6		
<b>Βιοισοδύναμο σκεύασμα:</b>			
Grepid(βιοισοδύναμο-besylate)	31		
Plavix(πρωτότυπο-bisulfate)	15		
Clovelen(βιοισοδύναμο-besylate)	4		
<b>Γονότυπος:</b>			
Ομοζυγώτες	35		
Ετεροζυγώτες *1/*2	11		
Ετεροζυγώτες *1/*3	4		

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα συγκέντρωσης του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης (μg/ml) έναντι του χρόνου (σε hr) των 50 ασθενών.



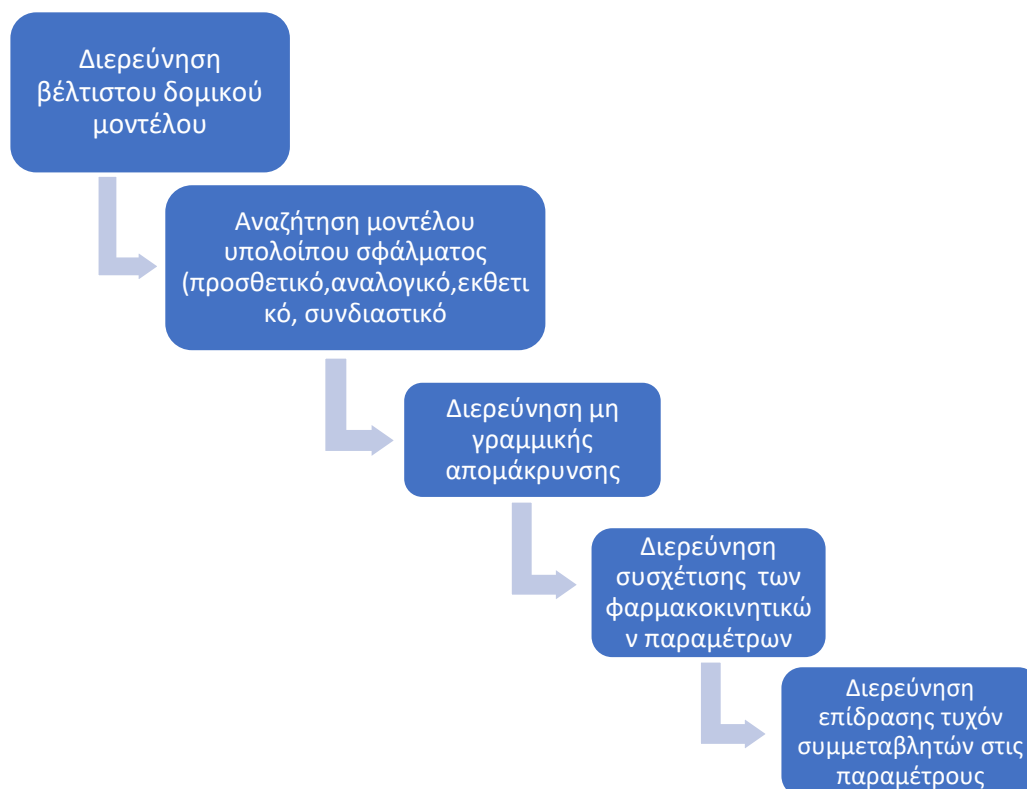
Σχήμα 29:Γραφική παρουσίαση των συγκεντρώσεων του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης (μg/ml) έναντι του χρόνου (σε hr) των 50 ασθενών. Οι πράσινες συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στους 31 ασθενείς που έλαβαν το Grepid, οι μπλε στους 15 ασθενείς που έλαβαν το Plavix ενώ οι κόκκινες συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στους 4 ασθενείς που έλαβαν το Clovelen.

Τα γραφήματα αυτά παρέχουν τη δυνατότητα μίας πρώτης εκτίμησης της φαρμακοκινητικής συμπεριφοράς του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης, τόσο μεμονωμένα αλλά και συγκριτικά μεταξύ των διαφόρων ασθενών. Επιπλέον, χρησιμεύουν στο να παρατηρηθούν τυχόν ακραία υψηλές και χαμηλές τιμές των συγκεντρώσεων ορισμένων ασθενών που πιθανόν να επηρεάζουν σημαντικά την μετέπειτα ανάλυση (outliers).

### Πορεία διερεύνησης πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου:

Η διερεύνηση του βέλτιστου πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου πραγματοποιήθηκε με την πραγματοποίηση μεγάλου αριθμού δοκιμών, έτσι ώστε να εξεταστούν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί. Έγινε έτσι σταδιακός έλεγχος για την εύρεση του δομικού και ύστερα του στατιστικού μοντέλου, ελέγχθηκαν μοντέλα μη γραμμικής απομάκρυνσης καθώς και εξετάστηκε η επίδραση πιθανών συσχετίσεων και συμμεταβλητών στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους. Λόγω της από του στόματος χορήγησης (Per os), ήταν αναμενόμενο ότι η κινητική της απορρόφησης θα ακολουθούσε πιθανότατα πρωτοταξική κινητική. Ταυτόχρονα, λήφθηκαν υπόψη και τα αποτελέσματα δύο προηγούμενων πληθυσμιακών μελετών του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης που συμπέραναν ότι ακολουθεί διδιαμερισματικό μοντέλο με πρωτοταξική κινητική στην απορρόφηση και απομάκρυνση[23,24].

Παράλληλα, δεν επιβεβαιώθηκε η επίδραση καμίας συµµεταβλητής στο πληθυσµιακό µοντέλο[23]. Τα βήµατα που ακολουθήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:



### Διερεύνηση δοµικού µοντέλου:

Όπως τονίστηκε και στο αντίστοιχο κεφάλαιο του γενικού µέρους, σκοπός στην διερεύνηση ενός δοµικού µοντέλου στη πληθυσµιακή ανάλυση είναι ο προσδιορισµός της κινητικής της απορρόφησης και της αποµάκρυνσης αλλά και του αριθµού των φαρµακοκινητικών διαµερισµάτων που περιγράφουν καλύτερα τα φαρµακοκινητικά δεδοµένα. Θεωρήθηκε αρχικά ότι ισχύει η κλασική γραµµική κινητική αποµάκρυνσης χωρίς τις συµµεταβλητές και ότι το σφάλµα ήταν αναλογικό. Επιπλέον, σε κάθε πιθανό µοντέλο χρησιµοποιήθηκε και η επιλογή του Monolix για την χρήση της µεθόδου γραµµικοποίησης που βελτιώνει τις τιµές των τυπικών σφαλµάτων και των κριτηρίων στατιστικής σηµαντικότητας. Επίσης, οι 11 ασθενείς µε τον ετεροζυγωτικό τύπο \*1/\*2 και οι 4 ασθενείς µε τον ετεροζυγωτικό τύπο \*1/\*3 ενσωµατώθηκαν σε µία οµάδα των 15 ατόµων µε GENOTYPE 1. Επειδή και οι δύο υποοµάδες των ενδιάµεσων µεταβολιστών θεωρήθηκε ότι θα έχουν το ίδιο περίπου µεταβολικό προφίλ και παρόμοιες συγκεντρώσεις ανενεργού µεταβολίτη στο αίµα, διαµόρφωσαν µία γονοτυπική οµάδα ασθενών στην ανάλυση έναντι των οµόζυγων στον φυσιολογικό αλληλίο που διαµόρφωσαν την οµάδα GENOTYPE 0. Αρχικά, δοκιµάστηκαν 12 διαφορετικοί συνδυασµοί και ελέγχθηκαν οι αντίστοιχες τιµές του λογαρίθµου πιθανοφάνειας (-2LL) και των κριτηρίων πληροφορίας Akaike -AIC , Bayesian -BIC και corrected-BIC(BICc), µε σκοπό την εύρεση της µικρότερης δυνατής.

Πίνακας 9: Πίνακας αποτελεσμάτων κατά την διερεύνηση του βέλτιστου δομικού μοντέλου για τα υπάρχοντα δεδομένα.

	<b>-2LL</b>	<b>AIC</b>	<b>BIC</b>	<b>BICc</b>
<b>Μονοδιαμερισματικό Μηδενοταξική απορρόφηση k0,απουσία tlag</b>	<b>425,36</b>	<b>439,36</b>	<b>452,74</b>	<b>460,17</b>
<b>Μόνοδιαμερισματικό Μηδενοταξική απορρόφηση k0,παρουσία tlag</b>	<b>425,21</b>	<b>443,21</b>	<b>460,42</b>	<b>469,70</b>
<b>Μόνοδιαμερισματικό Πρωτοταξική απορρόφηση k0,απουσία tlag</b>	<b>482,06</b>	<b>496,06</b>	<b>509,45</b>	<b>516,87</b>
<b>Μόνοδιαμερισματικό Πρωτοταξική απορρόφηση k0,παρουσία tlag</b>	<b>486,64</b>	<b>504,64</b>	<b>521,85</b>	<b>531,13</b>
<b>Διδιαμερισματικό Μηδενοταξική απορρόφηση k0,απουσία tlag</b>	<b>290,17</b>	<b>312,17</b>	<b>333,2</b>	<b>344,34</b>
<b>Διδιαμερισματικό Μηδενοταξική απορρόφηση k0,παρουσία tlag</b>	<b>348,64</b>	<b>374,64</b>	<b>399,50</b>	<b>412,49</b>
<b>Διδιαμερισματικό Πρωτοταξική απορρόφηση ka,απουσία tlag</b>	<b>291,32</b>	<b>313,32</b>	<b>334,35</b>	<b>345,49</b>
<b>Διδιαμερισματικό Πρωτοταξική απορρόφηση ka,παρουσία tlag</b>	<b>299,5</b>	<b>325,5</b>	<b>350,36</b>	<b>363,35</b>
<b>Τριδιαμερισματικό, Μηδενοταξική απορρόφηση, απουσία tlag</b>	<b>294,03</b>	<b>324,03</b>	<b>352,72</b>	<b>367,57</b>
<b>Τριδιαμερισματικό, Μηδενοταξική απορρόφηση, παρουσία tlag</b>	<b>292,34</b>	<b>326,34</b>	<b>358,84</b>	<b>375,55</b>
<b>Τριδιαμερισματικό, Πρωτοταξική απορρόφηση, απουσία tlag</b>	<b>299,13</b>	<b>329,13</b>	<b>357,81</b>	<b>372,66</b>
<b>Τριδιαμερισματικό,</b>	<b>292,7</b>	<b>326,7</b>	<b>359,21</b>	<b>375,91</b>



<b>Πρωτοταξική απορρόφηση, παρουσία flag</b>				
--	--	--	--	--

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκαν τα βασικά διαγράμματα καλής προσαρμογής, δηλαδή τα διαγράμματα οπτικού ελέγχου προβλεπτικής ικανότητας μοντέλου (VPC) και τα διαγράμματα παρατηρούμενων (obs) έναντι προβλεπόμενων ατομικών /πληθυσμιακών συγκεντρώσεων (IPRED-PPRED), για τους συνδυασμούς που εμφανίζουν τις μικρότερες τιμές AIC, BIC και λογαρίθμου πιθανοφάνειας (-2LL). Επιπλέον η επιλογή του μοντέλου έγινε μετά και από τη σύγκριση των τιμών των πληθυσμιακών παραμέτρων, των τιμών του σχετικού τυπικού σφάλματος των πληθυσμιακών παραμέτρων και της διατομικής μεταβλητότητας. Τέλος, όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, συνυπολογίστηκαν και τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών καθώς και ότι η χορήγηση είναι από του στόματος με απουσία δισκίων τροποποιημένης αποδέσμευσης. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα ανωτέρω, αποφασίστηκε ότι το διδιαμερισματικό μοντέλο με πρωτοταξική απορρόφηση και απουσία χρόνου καθυστέρησης στην απορρόφηση (flag) είναι το πλέον κατάλληλο για να περιγράψει τα υπάρχοντα φαρμακοκινητικά δεδομένα.

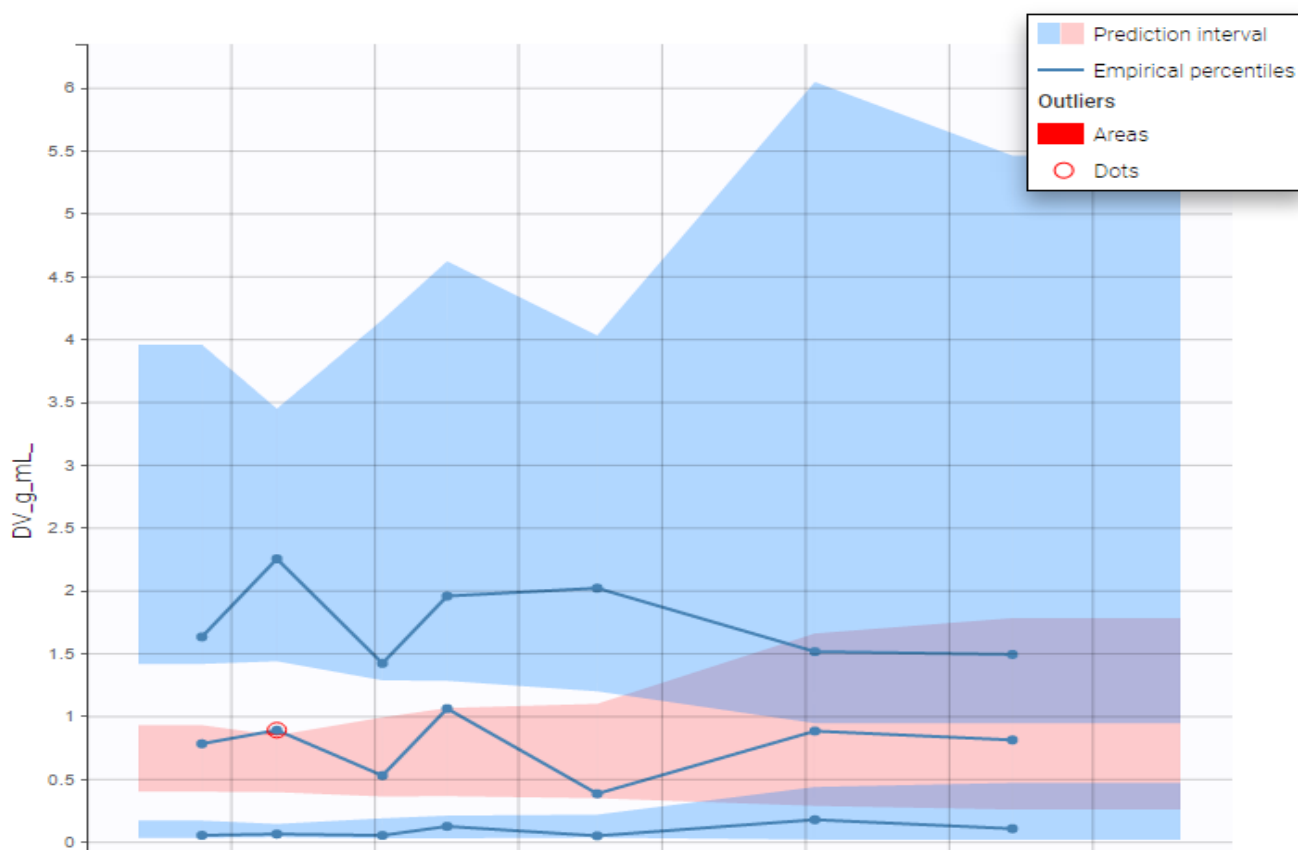
#### Διερεύνηση στατιστικού μοντέλου:

Παράλληλα, όπως αναφέρθηκε και στην πορεία της πληθυσμιακής ανάλυσης, το επόμενο βήμα για τον προσδιορισμό του πληθυσμιακού μοντέλου είναι η εύρεση του υπολειπόμενου σφάλματος που περιγράφει με τον βέλτιστο τρόπο τα δεδομένα μας. Έτσι, το σφάλμα μπορεί να εκφραστεί ως προσθετικό, αναλογικό, εκθετικό ή συνδυαστικό και το μοντέλο σφάλματος που θα επιλεγεί κατά την φαρμακοκινητική ανάλυση εξαρτάται αποκλειστικά από τα δεδομένα. Στον κάτωθι πίνακα παρουσιάζονται όλα τα πιθανά σφάλματα που ενδέχεται να περιγράψουν καλύτερα το δομικό μοντέλο που κρίθηκε καταλληλότερο στο προηγούμενο βήμα.

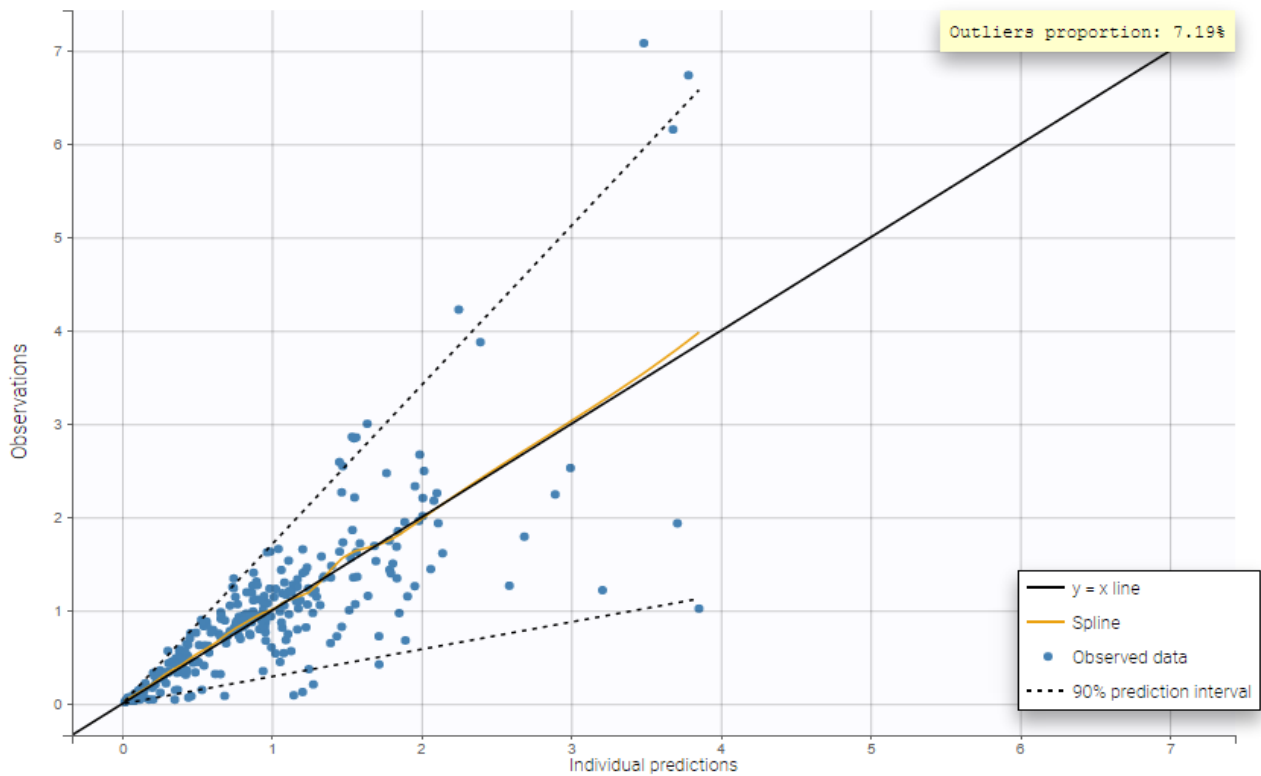
Πίνακας 10: Πίνακας αποτελεσμάτων κατά την διερεύνηση του βέλτιστου στατιστικού μοντέλου για τα υπάρχοντα δεδομένα.

	<b>-2LL</b>	<b>AIC</b>	<b>BIC</b>	<b>BICc</b>
<b>Αναλογικό</b>	<b>291,32</b>	<b>313,32</b>	<b>334,35</b>	<b>345,49</b>
<b>Προσθετικό</b>	<b>684,63</b>	<b>706,63</b>	<b>727,66</b>	<b>738,8</b>
<b>Συνδυαστικό 1</b>	<b>292,56</b>	<b>316,56</b>	<b>339,51</b>	<b>352,5</b>
<b>Συνδυαστικό 2</b>	<b>296,99</b>	<b>320,99</b>	<b>343,93</b>	<b>356,93</b>

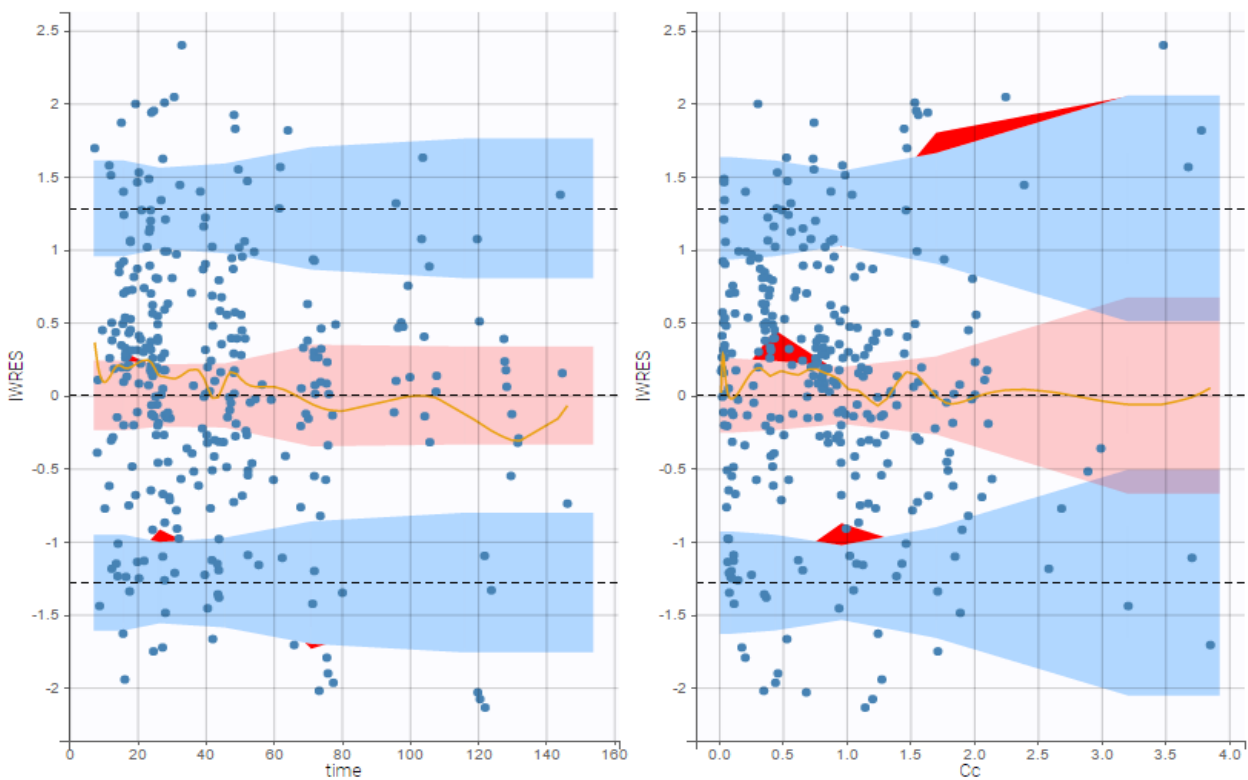
Παρατηρούμε ότι το αναλογικό μοντέλο χαρακτηρίζεται από χαμηλότερες τιμές -2LL, AIC, BIC, BICc. Επίσης, διαθέτει χαμηλότερες τιμές τυπικών σφαλμάτων συγκριτικά με τα μοντέλα συνδυαστικού σφάλματος που έπονται στις τιμές των στατιστικών κριτηρίων και συμπεραίνουμε επομένως ότι το βέλτιστο μοντέλο σφάλματος για το δομικό μοντέλο που επιλέχθηκε προηγουμένως είναι το αναλογικό. Παρακάτω δίνονται τα αντίστοιχα διαγράμματα του μοντέλου που επιλέχθηκε και ο πίνακας τιμών των παραμέτρων.



Σχήμα 30: Γράφημα VPC του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης στο μοντέλο που έχει επιλεχθεί μέχρι στιγμής: διδιαμερισματικό μοντέλο με πρωτοταξική απορρόφηση και αναλογικό υπολειπόμενο σφάλμα. Ο άξονας συγκέντρωσης είναι εκφρασμένος σε  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και ο άξονας χρόνου είναι εκφρασμένος σε ώρες. Οι μπλε γραμμές αναφέρονται στο 10ο, 50ο, 90ο εκατοστημόριο των εμπειρικών δεδομένων και οι σκιασμένες περιοχές αναφέρονται στην πρόβλεψη 95% του διαστήματος εμπιστοσύνης γύρω από κάθε εκατοστημόριο.



Σχήμα 31: Γράφημα OBS VS PPRED του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης. Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει την  $y=x$ , η κίτρινη την γραμμή τάσης κυλιόμενου μέσου, ανάμεσα στις διακεκομμένες περιλαμβάνεται το 90% διάστημά πρόβλεψης.



Σχήμα 32: Διάγραμμα IWRES έναντι του χρόνου. Η κίτρινη γραμμή αντιπροσωπεύει την τάση κυλιόμενου μέσου, οι κόκκινες περιοχές τις εξωκείμενες (outliers) παρατηρήσεις και οι σκιασμένες περιοχές αναφέρονται στην πρόβλεψη 95% του διαστήματος εμπιστοσύνης γύρω από κάθε εκατοστημόριο.

Είναι εμφανές στο παραπάνω διάγραμμα VPC ότι όλα σχεδόν τα εκατοστημόρια των πειραματικών δεδομένων εμπεριέχονται στα διαστήματα εμπιστοσύνης με την εξαίρεση ενός σημείου, πράγμα που κάνει το μοντέλο ικανοποιητικό. Στα διαγράμματα OBS vs IPRED παρατηρείται ότι τα πειραματικά δεδομένα (μπλε κουκκίδες) ταυτίζονται σε μεγάλο βαθμό με την ευθεία  $y = x$  γεγονός που καθιστά το μοντέλο ακόμα πιο αξιόπιστο. Το ίδιο επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα IWRES vs time όπου η πλειονότητα των σημείων κατανέμεται γύρω από την οριζόντια γραμμή. Στη συνέχεια παρατίθενται και οι τιμές του αρχικού φαρμακοκινητικού μοντέλου (Base model).

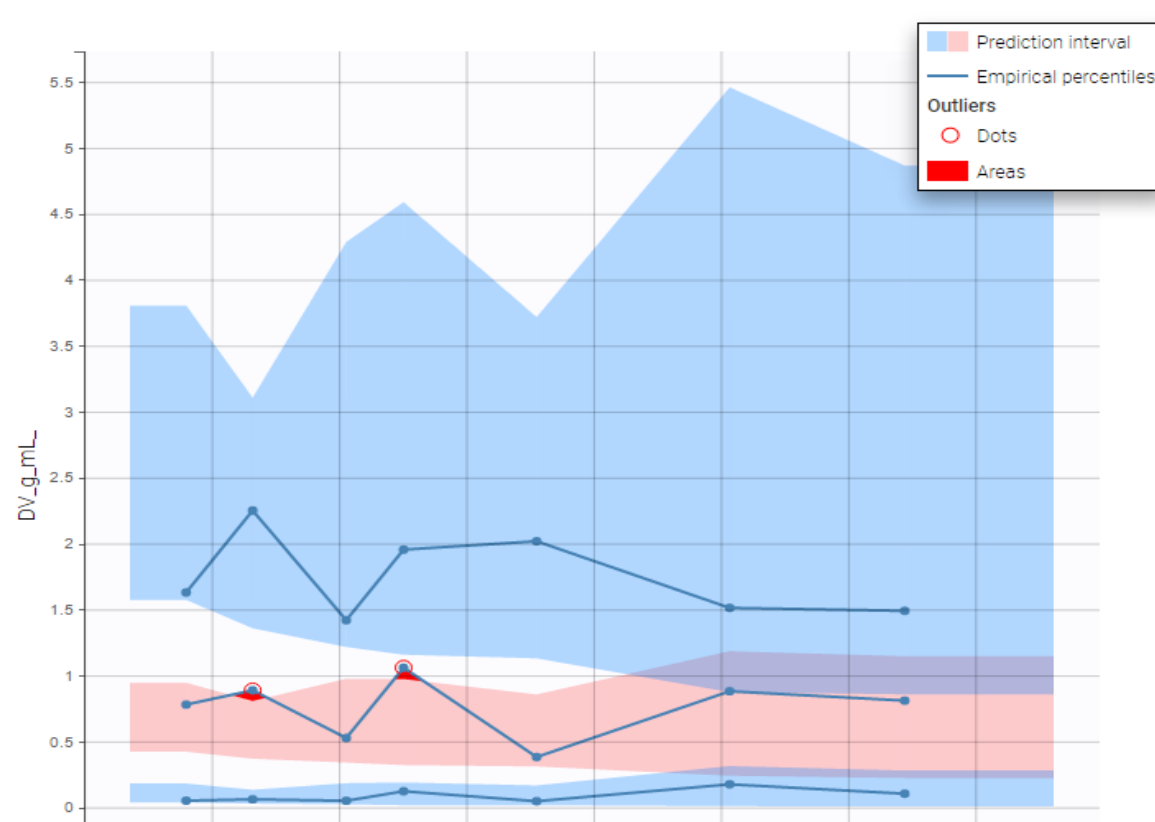
Πίνακας 11: Τιμές του αρχικού φαρμακοκινητικού μοντέλου (base model)

-	Τιμές	Τυπικό σφάλμα S.E.	Σχετικό τυπικό σφάλμα R.S.E.(%)
<b>Σταθερές επιδράσεις</b>			
Ka_pop(hr <sup>-1</sup> )	6,25	6,19	99,1
Cl_pop(l/hr)	1,01	0,511	50,6
V1_pop(L)	62,9	8,58	13,6
Q_pop(l/hr)	40,0	3,93	9,83
V2_pop(L)	865	282	32,6
<b>Τυπική απόκλιση τυχαίων επιδράσεων</b>			
Omega_Ka	2,36	0,748	31,7
Omega_Cl	0,974	0,393	40,4
Omega_V1	0,365	0,166	45,3
Omega_Q	0,273	0,0903	33,1
Omega_V2	2,03	0,252	12,4
<b>Παράμετροι μοντέλου σφάλματος</b>			
B	0,43	0,0257	5,96
<b>Στατιστικά κριτήρια</b>			
-2LL	291,32		
AIC	313,32		
BIC	334,35		
BICc	345,49		

Από τον παραπάνω πίνακα, παρατηρείται ότι τα σχετικά τυπικά σφάλματα (R.S.E) της σταθεράς πρωτοταξικής απορρόφησης Ka, της κάθαρσης απέκκρισης Cl αλλά και του όγκου κατανομής του περιφερικού διαμερίσματος V2 είναι πολύ υψηλά. Παράλληλα, τα σχετικά τυπικά σφάλματα των  $\omega$  με εξαίρεση του V2 είναι επίσης πολύ υψηλά. Επομένως συμπεραίνουμε ότι τα υψηλά τυπικά σφάλματα στην πλειονότητα των παραμέτρων υποδηλώνουν μία αδυναμία του μοντέλου στην εκτίμηση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων χωρίς όμως αυτό να απορρίπτεται. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η επιπλέον διερεύνηση για εύρεση καλύτερου μοντέλου.

### Διερεύνηση μη γραμμικής απομάκρυνσης:

Ύστερα από την πληθυσμιακή ανάλυση δύο προηγούμενων μελετών[23,24] συμπεραίνεται ότι ο ανενεργός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης χαρακτηρίζεται από γραμμική κινητική απομάκρυνσης. Ωστόσο, στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται μια αύξηση 4 και 2 φορές στην AUC του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης όταν αυξάνεται η δόση του μητρικού μορίου από 75mg σε 600mg και από 300mg σε 900mg αντίστοιχα[103,108]. Επιπλέον, μια αύξηση της δόσης του μητρικού μορίου από 75mg σε 150 ή 300mg οδήγησε σε μία αύξηση της AUC του ενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης σε 1,5 φορές περισσότερο σε εκτενείς και ενδιάμεσους μεταβολιστές και σε 2,2 φορές περισσότερο σε φτωχούς μεταβολιστές[74]. Όλα τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη μη γραμμικότητας στο μονοπάτι μεταβολισμού της κλοπιδογρέλης οπότε χρήζει διερεύνησης και στο συγκεκριμένο πληθυσμιακό μοντέλο. Για αυτό το λόγο έγινε διερεύνηση μοντέλου μη γραμμικής απομάκρυνσης και συγκρίθηκε με το μοντέλο που επιλέχθηκε παραπάνω. Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή του συγκεκριμένου μοντέλου ήταν οι ίδιες με αυτές του μοντέλου που επιλέχθηκε προηγουμένως με τη διαφορά ότι η κάθαρση του ανενεργού μεταβολίτη δεν περιγράφεται από την  $Cl_{por}$  όπως γίνεται στις περιπτώσεις γραμμικής απομάκρυνσης αλλά από τον τύπο του Michaelis-Menten (Εισαγωγή στην φαρμακοκινητική 2.3.1.) όπου  $V_m$  ο μέγιστος ρυθμός κάθαρσης και  $K_m$  η συγκέντρωση στην οποία ο ρυθμός κάθαρσης είναι μισός του  $V_m$ . Όσον αφορά τον τύπο σφάλματος χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος με το μοντέλο γραμμικής απομάκρυνσης καθώς φάνηκε να περιγράφει καλύτερα τα δεδομένα. Το διάγραμμα VPC για το μοντέλο μη γραμμικής απομάκρυνσης παρατίθεται παρακάτω:



Σχήμα 33: Γράφημα VPC του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης στο μοντέλο μη γραμμικής απομάκρυνσης: διδιαμερισματικό μοντέλο με πρωτοταξική απορρόφηση, μη γραμμική απομάκρυνση και αναλογικό υπολειπόμενο σφάλμα. Ο άξονας συγκέντρωσης είναι εκφρασμένος σε  $\mu\text{g/mL}$  και ο άξονας χρόνου είναι εκφρασμένος σε ώρες. Οι μπλε γραμμές αναφέρονται στο 10ο, 50ο, 90ο εκατοστημόριο των εμπειρικών δεδομένων και οι σκιασμένες περιοχές αναφέρονται στην πρόβλεψη 95% του διαστήματος εμπιστοσύνης γύρω από κάθε εκατοστημόριο.

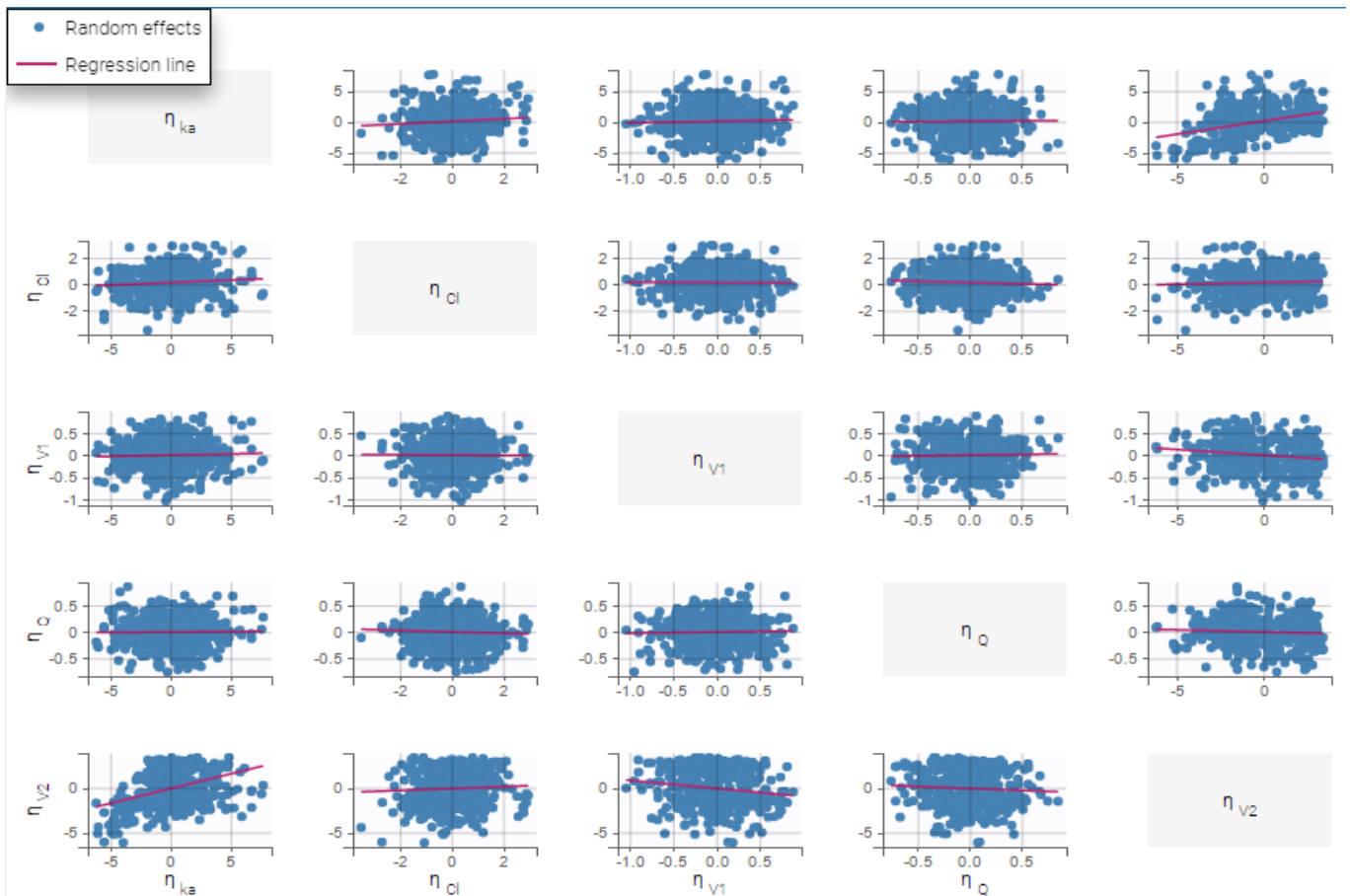
Από τα διαγράμματα VPC του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης γίνεται φανερό ότι τα εκατοστημόρια των πειραματικών δεδομένων του μεταβολίτη δεν εμπεριέχονται στα διαστήματα εμπιστοσύνης στον ίδιο βαθμό με το προηγούμενο μοντέλο αλλά παρουσιάζουν μεγαλύτερες αποκλίσεις (οι κόκκινες περιοχές υποδηλώνουν τις εξωκείμενες περιοχές). Παράλληλα, οι τιμές των κριτηρίων πληροφορίας AIC, BIC και BICc ήταν αυξημένες συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές που προέκυψαν από το μοντέλο με γραμμική κινητική απομάκρυνσης. Επίσης, οι τιμές των πληθυσμιακών παραμέτρων διέφεραν σημαντικά σε σχέση με αυτές του μοντέλου με γραμμική απομάκρυνση ενώ σημαντική αύξηση στις τιμές των τυπικών σφαλμάτων βρέθηκε στην σταθερά απορρόφησης  $k_a$  αλλά και στην διατομική μεταβλητότητά της σταθεράς κάθαρσης μεταξύ των διαμερισμάτων Q. Γενικά, το μοντέλο μη γραμμικής κινητικής απομάκρυνσης έδειξε χειρότερη συμπεριφορά όσον αφορά στην περιγραφή της κινητικής του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης και το μοντέλο με την γραμμική απομάκρυνση κρίθηκε καταλληλότερο και επιλέχθηκε για την συνέχεια της εργασίας.

#### Διερεύνηση συσχέτισης πληθυσμιακών παραμέτρων του μοντέλου:

Η αξιολόγηση των πιθανών συσχετίσεων βασίστηκε:

- στην τιμή του κριτηρίου “correlation” του πίνακα των πληθυσμιακών παραμέτρων,
- στη μείωση του λόγου πιθανοφάνειας  $-2LL$  και των τιμών των κριτηρίων AIC και BIC συγκριτικά με το απλό μοντέλο χωρίς έλεγχο συσχέτισης των παραμέτρων
- καθώς και στα γραφήματα τυχαίων επιδράσεων, VPC και OBS vs IPRED και PPRED.

Αρχικά, έγινε έλεγχος των συσχετίσεων μέσω του διαγράμματος συσχετίσεων τυχαίων επιδράσεων (correlation between random effects).



Σχήμα 34: Διαγράμματα συσχετίσεων μεταξύ των πληθυσμιακών φαρμακοκινητικών παραμέτρων του μοντέλου (conditional distribution).

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω διαγράμματα, εισήχθησαν στο μοντέλο οι παρακάτω συσχετίσεις:

- Μεταξύ του κεντρικού όγκου κατανομής V1 και της σταθεράς πρωτοταξικής απορρόφησης ka με τιμή correlation:0,0385
- Μεταξύ του περιφερικού όγκου κατανομής V2 και της σταθεράς πρωτοταξικής απορρόφησης ka με τιμή correlation:0.379
- Και τέλος μεταξύ του κεντρικού όγκου κατανομής V1 και του περιφερικού όγκου κατανομής V2 με τιμή συσχέτισης:-0.153

Τέλος, οι υπολογισμένες πληθυσμιακές τιμές από το Monolix χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικές εκτιμήσεις (Initial Estimates) με σκοπό την περαιτέρω σύγκλιση του τελικού φαρμακοκινητικού μοντέλου με το βέλτιστο. Όσον αφορά λοιπόν τις τιμές του λόγου πιθανοφάνειας -2LL και των κριτηρίων AIC και BIC μετά την είσοδο των συσχετίσεων στο μοντέλο αυτές είναι:

Πίνακας 12: Πίνακας αποτελεσμάτων κατά την διερεύνηση της ύπαρξης συσχετίσεων μεταξύ των φαρμακοκινητικών παραμέτρων.

-	-2LL	AIC	BIC	BICc
Απλό μοντέλο χωρίς συσχετίσεις	291,32	313,32	334,35	345,49
Μοντέλο και με τις τρεις συσχετίσεις	248,9	276,9	303,7	314,81

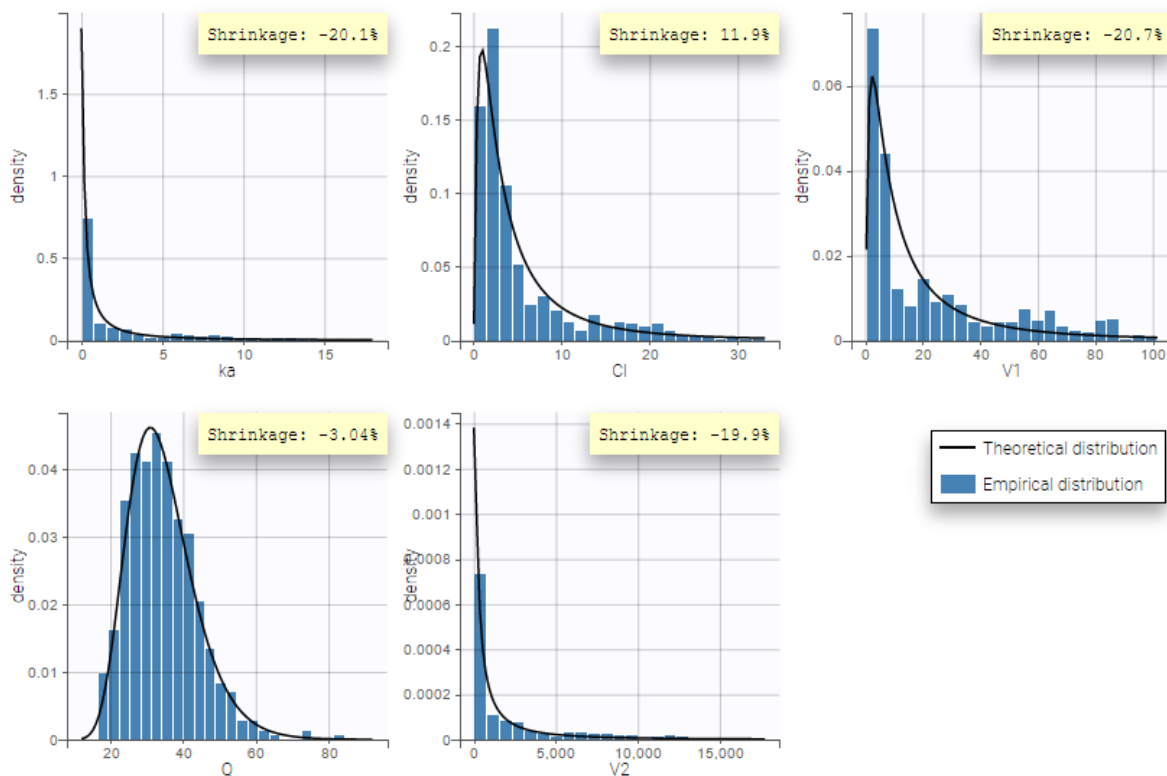
Επομένως το μοντέλο βελτιώνεται σημαντικά αφού υπάρχει σημαντική μείωση των τιμών. Οι τιμές του “correlation” του πίνακα των πληθυσμιακών παραμέτρων είναι πολύ ικανοποιητικές και όλες εμφάνισαν πολύ μικρά τυπικά σφάλματα. Παράλληλα, μειώθηκαν οι τιμές των τυπικών σφαλμάτων των περισσότερων φαρμακοκινητικών παραμέτρων. Ωστόσο, τα διαγράμματα VPC και OBS vs IPRED και PPRED παρουσιάζουν μια μικρή χειροτέρευση συγκριτικά με το μοντέλο χωρίς την ύπαρξη συσχετίσεων οπότε αποφασίστηκε να κρατηθούν οι συσχετίσεις στο μοντέλο και μετά τον έλεγχο πιθανών επιδράσεων συμμεταβλητών να ελεγχθεί αν αξίζει να παραμείνουν στο μοντέλο ή χάνουν τη σημαντικότητα τους παρουσία των συμμεταβλητών.

#### Έλεγχος επίδρασης συμμεταβλητών:

Ελέγχθηκε όπως περιεγράφηκε και στο τμήμα «Ασθενείς και Μέθοδο» η επίδραση βασικών δημογραφικών χαρακτηριστικών των ασθενών, όπως: το φύλο, η ηλικία, το βάρος και το ύψος. Επιπλέον ελέγχθηκαν και γενετικά χαρακτηριστικά των ασθενών όπως η ύπαρξη ή μη ενός αλληλίου μειωμένης ενεργότητας CYP2C19 που τους καθιστά ενδιάμεσους μεταβολιστές αλλά και διαφορετικά βιοισοδύναμα σκευάσματα κλοπιδογρέλης. Αξίζει να επισημανθεί για άλλη μια φορά ότι το σύνολο των ετεροζυγωτών με αλληλίο \*1/\*2 ή \*1/\*3 ενσωματώθηκαν σε μία ομάδα των ενδιάμεσων μεταβολιστών που ονομάστηκε GENOTYPE 1. Επίσης, οι συνεχείς μεταβλητές πέρα από την αρχική τους μορφή, εισήχθησαν και με την λογαριθμοποιημένη τους μορφή. Αν λάβουμε υπόψη το παράδειγμα της ηλικίας, η log μορφή της ως συμμεταβλητή θα είναι  $\log(\text{τιμή ηλικίας ασθενούς}/\text{μέση τιμή της ηλικίας των ασθενών})$ . Ομοίως, εισήχθησαν το βάρος και το ύψος. Ο σκοπός της συγκεκριμένης μετατροπής των συνεχών μεταβλητών είναι η πιθανή εύρεση καλύτερης συσχέτισης ως συμμεταβλητών με τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους από την αποκλειστική εισαγωγή τους ως έχει.

Αρχικά έγινε γραφική απεικόνιση των μεταβλητών με τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους για εύρεση πιθανής σχέσης, για μείωση των επακόλουθων δοκιμών αφού υπήρχαν δεδομένα για έναν μεγάλο αριθμό χαρακτηριστικών. Για να είναι αξιόπιστα όμως αυτά τα διαγράμματα και να μην επηρεάζονται οι σχέσεις από το shrinkage που υπήρχε, χρησιμοποιήθηκε η επιλογή των τυχαίων επιδράσεων να γίνεται από την δεσμευμένη κατανομή (conditional distribution) και όχι από την επικρατέστερη τιμή της κατανομής (conditional mode)





Σχήμα 35: Διαγράμματα για έλεγχο ύπαρξης shrinkage στην εκτίμηση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων του μοντέλου:ka,Cl,V1,Q,V2.

Υψηλό shrinkage (>30%) δεν παρατηρείται, συνεπώς οι ατομικές εκτιμήσεις του μοντέλου(EBEs) δεν θα επηρεάζονται περισσότερο από τις τιμές των πληθυσμιακών παραμέτρων σε σχέση με τα δεδομένα. Έπειτα χρησιμοποιήθηκε η “stepwise forward” μέθοδος για την κατασκευή του μοντέλου των συμμεταβλητών. Έγινε πλήθος δοκιμών για την εύρεση του καταλληλότερου μοντέλου. Η επιλογή των σημαντικών επιδράσεων βασίστηκε στη σημαντικότητα ( $p$ -value < 0.05) του κριτηρίου beta από τον πίνακα των πληθυσμιακών παραμέτρων που υπολογιζόταν μέσω Wald chi square test, στη μείωση του λόγου πιθανοφάνειας 2LL και των τιμών AIC,BIC και BICc, στις τιμές του σχετικού τυπικού σφάλματος τόσο για τις πληθυσμιακές παραμέτρους όσο και για τη διατομική μεταβλητότητά τους και στα διαγράμματα των συμμεταβλητών. Η επιλογή του τελικού μοντέλου με τις συμμεταβλητές ήταν λοιπόν ένας συνδυασμός όλων των παραπάνω παραγόντων.

Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε αρχικά “Forward addition” κατά την οποία εισάγονταν στο μοντέλο μεταβλητές με επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0.05$ , που δηλαδή μείωναν την τιμή του -2LL του προηγούμενου μοντέλου τουλάχιστον κατά 3.84 μονάδες. Μετά την ολοκλήρωση της μεθόδου προέκυψαν ως πιθανά σημαντικές επιδράσεις οι εξής:

- Ο περιφερικός όγκος κατανομής V2 επί του βιοισοδύναμου σκευάσματος κλοπιδογρέλης (DRUG)
- Η κάθαρση του φαρμάκου Cl επί το γονότυπο των ασθενών (GENOTYPE)
- Η μεταξύ των διαμερισμάτων κάθαρση Q επί το γονότυπο των ασθενών (GENOTYPE)

Παρακάτω δίνεται αναλυτικά ο πίνακας με την σειρά που εισήχθησαν οι μεταβλητές στο μοντέλο και οι αντίστοιχες τιμές των  $-2LL$ , AIC, BIC καθώς και τα p-value του wald chi square test μετά την εισαγωγή κάθε μεταβλητής.

Πίνακας 13: Πίνακας αποτελεσμάτων μετά την διαδοχική εισαγωγή των μεταβλητών. \*Η σύγκριση των τιμών γίνεται με το μοντέλο της προηγούμενης στήλης.

	Μοντέλο χωρίς συμμεταβλητές	Εισαγωγή C1-GENOTYPE(p-value=0,0388)	Εισαγωγή V2-DRUG(p-value=0,072)	Εισαγωγή Q-GENOTYPE(p-value=0,011)
<b>-2log-likelihood</b>	248,9	230,88	220,34	211,72
<b>Διαφορά(-2log-likelihood)*</b>	-	18,02	10,54	8,62
<b>AIC</b>	276,9	260,88	254,34	247,72
<b>BIC</b>	303,67	289,56	286,84	282,14
<b>BICc</b>	314,81	300,7	297,98	293,28

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η μέθοδος “Backward elimination”, κατά την οποία έγινε έλεγχος κατά πόσο ήταν δυνατό να διαγραφεί μια μεταβλητή από το μοντέλο που προέκυψε από την “forward addition” χωρίς να επηρεάζονται σημαντικά οι τιμές του λογαρίθμου πιθανοφάνειας, των AIC και BIC. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιήθηκε ως επίπεδο σημαντικότητας  $\alpha=0.01$  και η διαφορά των λογαρίθμων πιθανοφάνειας των μοντέλων πρέπει να ναι μικρότερη από 6.63 προκειμένου να διαγραφεί μία μεταβλητή. Επιπλέον κατά την διαγραφή μιας μεταβλητής έγινε έλεγχος αν μπορεί να εισαχθεί στο μοντέλο κάποια μεταβλητή από αυτές που απορρίφθηκαν στο προηγούμενο στάδιο.

Πίνακας 14: Πίνακας αποτελεσμάτων μετά την διαγραφή κάθε μεταβλητής από το μοντέλο με όλες τις συμμεταβλητές. \*Η σύγκριση των τιμών γίνεται με το μοντέλο της πρώτης στήλης.

	A)Μοντέλο με τις 3 συμμεταβλητές	B)Διαγραφή C1-GENOTYPE	Γ)Διαγραφή V2-DRUG	Δ)Διαγραφή Q-GENOTYPE
<b>-2log-likelihood</b>	211,72	224,46	221,93	219,82
<b>Διαφορά(-2log-likelihood)*</b>	-	12,74	10,21	8,1
<b>AIC</b>	247,72	258,46	253,93	253,82
<b>BIC</b>	282,14	290,96	284,52	286,33
<b>BICc</b>	293,28	302,1	295,66	297,47

Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα καμία μεταβλητή δεν διαγράφεται αλλά ούτε και εισάγεται νέα στο τελικό μοντέλο. Τέλος έγινε και έλεγχος για την αφαίρεση των συσχετίσεων που εισήχθησαν σε παραπάνω στάδιο. Με την αφαίρεση των συσχετίσεων από το μοντέλο παρατηρείται και σημαντική αύξηση των τιμών  $-2LL$ , AIC και BIC, αλλά και αποσταθεροποίηση του μοντέλου με την εμφάνιση πολύ μεγάλων τιμών σχετικού τυπικού σφάλματος τόσο στις πληθυσμιακές τιμές όσο και στην διατομική μεταβλητότητα τους. Επομένως αυτές διατηρούνται στο τελικό μοντέλο.

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται οι τελικές τιμές των πληθυσμιακών φαρμακοκινητικών παραμέτρων, όπως επίσης, και οι συντελεστές με τους οποίους συμμετέχουν οι συμμεταβλητές στο τελικό φαρμακοκινητικό μοντέλο του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης.

Πίνακας 15: Τιμές του τελικού φαρμακοκινητικού μοντέλου

-	Τιμές	Τυπικό σφάλμα S.E.	Σχετικό τυπικό σφάλμα R.S.E.(%)
<b>Σταθερές επιδράσεις</b>			
Ka <sub>pop</sub> (hr <sup>-1</sup> )	0,538	0,169	31,4
Cl <sub>pop</sub> (L/hr)	1,19	0,386	32,6
Beta_Cl_GENOTYPE_1(p-value=0,018)	1,43	0,404	28,2
V1 <sub>pop</sub> (L)	18,4	2,39	14
Q <sub>pop</sub> (L/hr)	42,9	3,72	8,67
Beta_Q_GENOTYPE_1(p-value=0,000396)	-0,457	0,163	35,7
V2 <sub>pop</sub> (L)	1,25e+3	396	31,6
Beta_V2_DRUG_1(p-value=nan)	-0,684	0,359	52,5
Beta_V2_DRUG_2(p-value=9,86544e-13)	-0,814	0,114	14
<b>Τυπική απόκλιση τυχαίων επιδράσεων</b>			
Omega_Ka	1,95	0,274	14,1
Omega_Cl	0,831	0,189	22,8
Omega_V1	0,906	0,178	19,6
Omega_Q	0,199	0,0809	35,4
Omega_V2	1,98	0,324	16,4
<b>Συσχετίσεις</b>			
Corr_V2_V1	0,999	0,0324	3,25
Corr_ka_V1	0,997	0,00314	0,315
Corr_ka_V2	0,997	0,00346	0,347
<b>Παράμετροι μοντέλου σφάλματος και στατιστικά κριτήρια</b>			
b	0,41	0,0213	5,19
-2LL	211,72		
AIC	247,72		
BIC	282,14		
BICc	293,28		

Από τα αποτελέσματα του τελικού φαρμακοκινητικού μοντέλου του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης, οι τιμές των επιμέρους πληθυσμιακών παραμέτρων που προέκυψαν είναι οι εξής:

- Σταθερά πρωτοταξικής απορρόφησης του μητρικού μορίου Ka=0,538 hr<sup>-1</sup>
- Κάθαρση απέκκρισης του καρβοξυλικού(ανενεργού) μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης Clp=1,19L/hr
- Φαινόμενος όγκος κατανομής του κεντρικού διαμερίσματος V1:17,1L
- Μεταξύ των διαμερισμάτων κάθαρση Q=42,9L/hr
- Φαινόμενος όγκος κατανομής του περιφερικού διαμερίσματος V2:1,25e+3L=1250L

Όσον αφορά την διατομική μεταβλητότητα των παραμέτρων αυτή περιγράφεται με τον συντελεστή διακύμανσης (CVx100%) που περιγράφει το ποσοστό μεταβλητότητας. Έτσι προκύπτει ότι η μεταβλητότητα, μεταξύ των ατόμων,

- Της σταθεράς πρωτοταξικής απορρόφησης  $K_a$  του μητρικού μορίου είναι 195%.
- Της συνολικής κάθαρσης του ανενεργού μεταβολίτη  $Cl_r$  είναι 83,1%.
- Του φαινόμενου όγκου κατανομής του κεντρικού διαμερίσματος  $V_1$  είναι 90,6%.
- Της ενδοδιαμερισματικής κάθαρσης  $Q$  είναι 19,9%.
- Του φαινόμενου όγκου κατανομής του περιφερικού διαμερίσματος  $V_2$  είναι 198%.

Το υπόλοιπο ποσοστό μεταβλητότητας ερμηνεύεται από το μοντέλο σφάλματος. Έτσι για τον ανενεργό μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης η τιμή του αναλογικού σφάλματος του μοντέλου είναι 41%. Τέλος, εντοπίζεται σχεδόν απόλυτη θετική συσχέτιση μεταξύ κεντρικού και περιφερικού όγκου κατανομής  $V_1$  και  $V_2$  καθώς των δύο όγκων κατανομής του μοντέλου με την πρωτοταξική σταθερά απορρόφησης  $k_a$  (correlation=0,99 το οποίο συνοδεύεται από πολύ χαμηλά τυπικά σφάλματα).

Στον πίνακα 15 παρουσιάζεται επίσης και η σημαντικότητα (P-value) της επίπτωσης της συμμεταβλητής στην παράμετρο που προαναφέρθηκε. Συγκεκριμένα, αποδεικνύεται η επίδραση του γονότυπου των ασθενών στην συνολική κάθαρση του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης με θετικό πρόσημο (p-value=0,0186). Η στατιστικά σημαντική επίπτωση της συμμεταβλητής ξεχωριστά στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους σταθμίζοντας για τους άλλους παράγοντες, όπως προέκυψε από την ανάλυση του τελικού μοντέλου, περιγράφεται από την εξίσωση:

$$Cl_{rOP} = 1,43L/hr * \exp(1,26 \times (\text{γονότυπο:GENOTYPE } 1))$$

$$Q = 42,9L/hr * \exp(-0,457 \times (\text{γονότυπο:GENOTYPE } 1))$$

$$V_2 = 1250L * \exp(-0,684 \times (\text{φάρμακο:DRUG } 1))$$

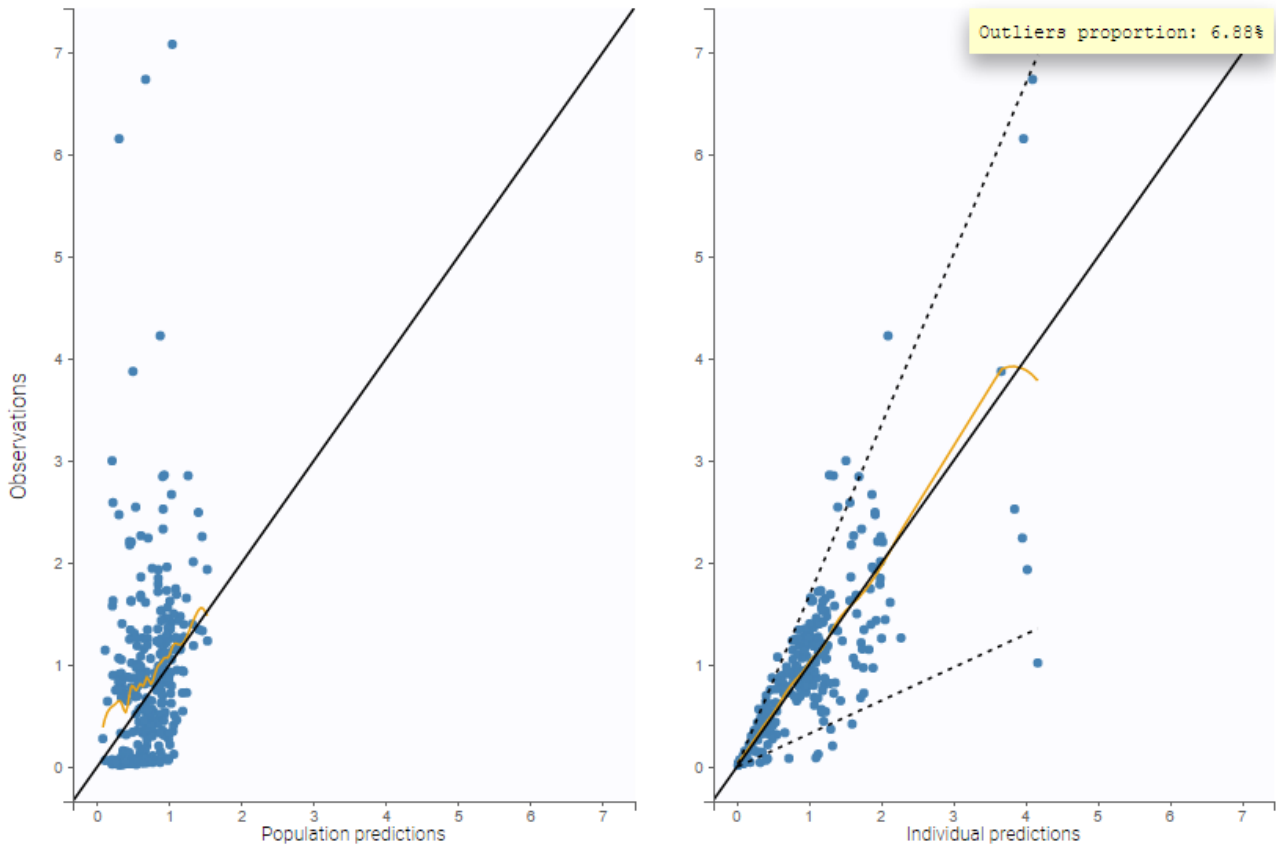
$$V_2 = 1250L * \exp(-0,814 \times (\text{φάρμακο:DRUG } 2))$$

Συνεπώς, παρατηρούμε ότι:

- ❖ η κάθαρση του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης στους ετεροζυγώτες για το CYP2C19 αλληλίο είναι 3,5 φορές υψηλότερη από την κάθαρση του στους ομοζυγώτες.
- ❖ Η ενδοδιαμερισματική κάθαρση του ανενεργού μεταβολίτη στους ετεροζυγώτες για το CYP2C19 αλληλίο είναι 0,63 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη των ομοζυγωτών.
- ❖ Ο περιφερικός όγκος κατανομής  $V_2$  του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης είναι 0,5 φορές μικρότερος όταν χορηγείται το βιοισοδύναμο σκεύασμα Clovelen.
- ❖ Ο περιφερικός όγκος κατανομής  $V_2$  του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης είναι 0,44 φορές μικρότερος όταν χορηγείται το βιοισοδύναμο σκεύασμα Grepid.

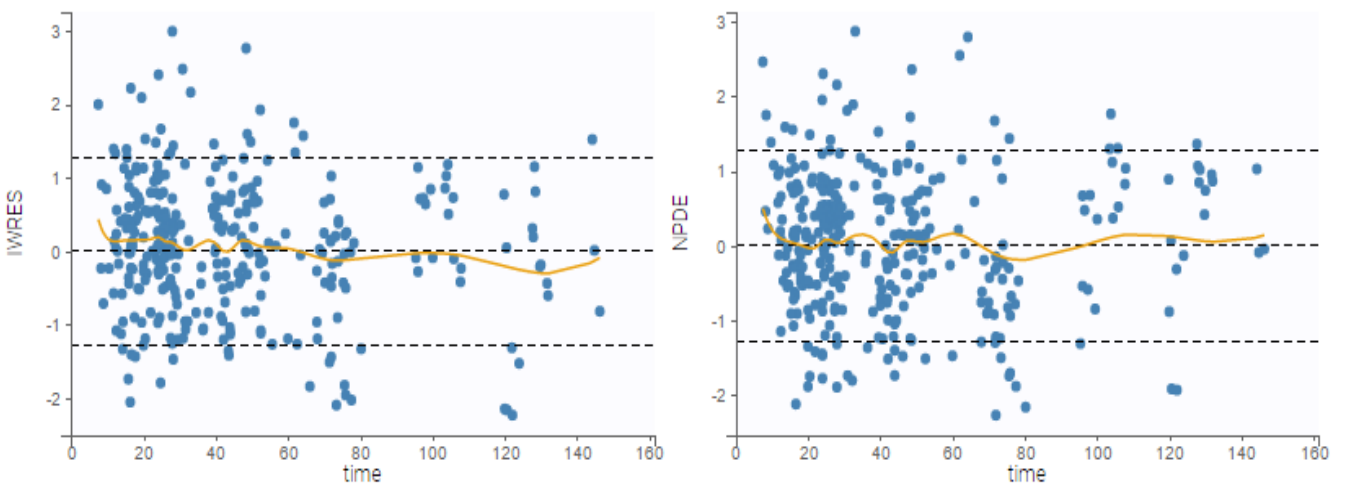
Αυτό που παρατηρείται σε σύγκριση με τον πίνακα 11 του αρχικού φαρμακοκινητικού μοντέλου (base model) είναι ότι μετά την προσθήκη των συσχετίσεων και των συμμεταβλητών στο μοντέλο παρατηρείται σημαντική μείωση της πλειοψηφίας των σχετικών τυπικών σφαλμάτων των πληθυσμιακών παραμέτρων αλλά και των σχετικών τυπικών σφαλμάτων των αντίστοιχων διατομικών μεταβλητοτήτων.

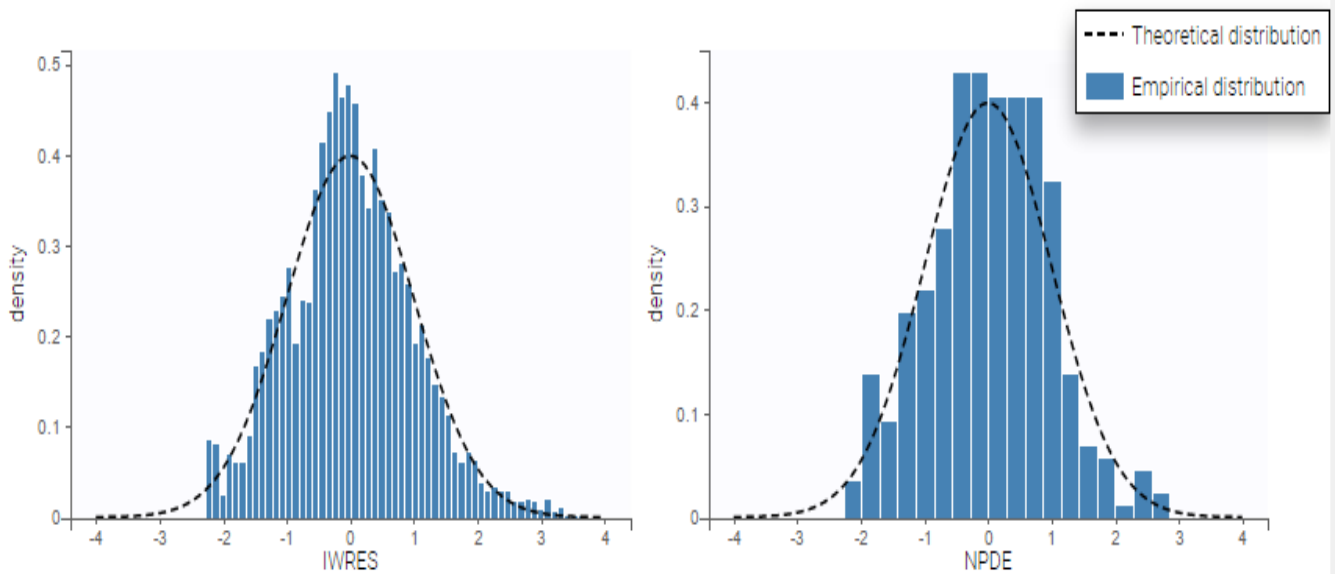
Στη συνέχεια, απεικονίζονται τα βασικά διαγράμματα καλής προσαρμογής OBS vs IPRED, OBS vs PPRED, IWRES vs Time, NPDE vs Time, και VPC για το τελικό μοντέλο.



Σχήμα 36: Γράφημα OBS VS PPRED και OBS VS IPRED του τελικού φαρμακοκινητικού μοντέλου. Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει την  $y=x$ , η κίτρινη την γραμμή τάσης κυλιόμενου μέσου, ανάμεσα στις διακεκομμένες περιλαμβάνεται το 90% διάστημα πρόβλεψης.

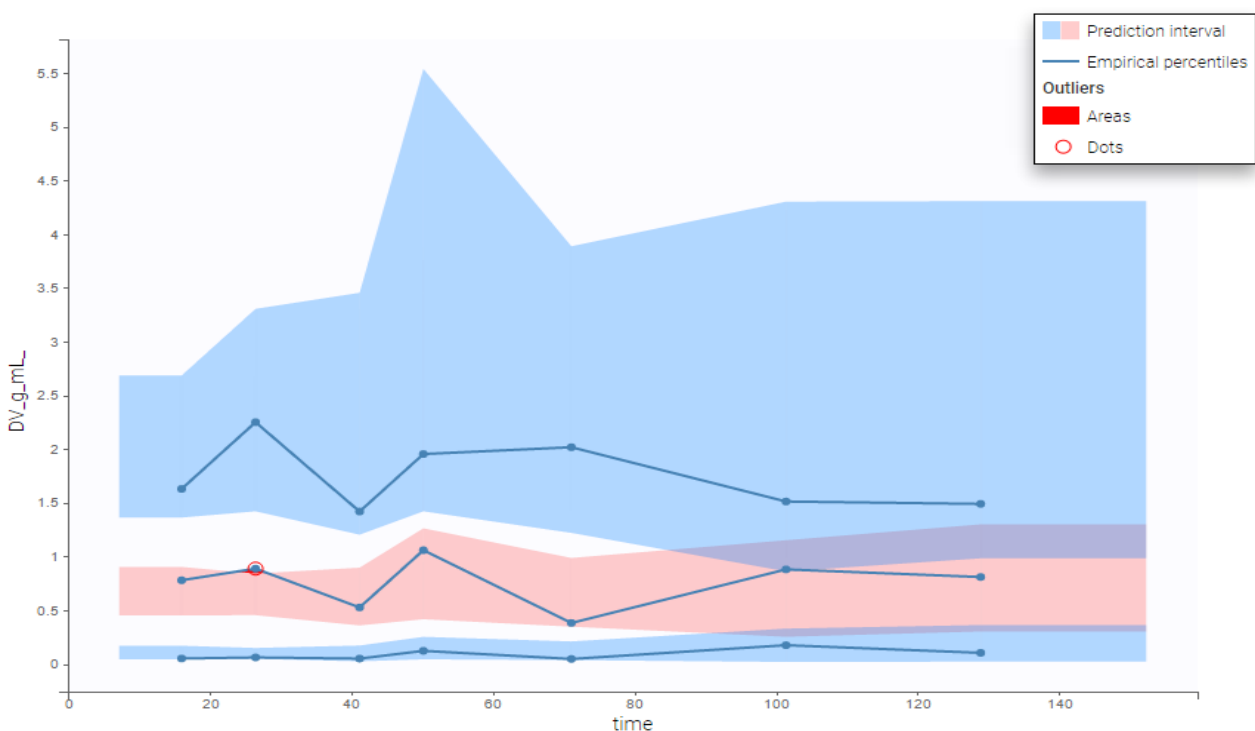
Στα παραπάνω διαγράμματα OBS vs IPRED και OBS vs PPRED του τελικού μοντέλου, παρατηρείται ότι τα πειραματικά δεδομένα (μπλε κουκκίδες) σχεδόν ταυτίζονται με την ευθεία  $y = x$  και είναι από τα καλύτερα συγκριτικά με τα παραπάνω μοντέλα που εξετάστηκαν στα προηγούμενα βήματα. Το μοντέλο βέβαια φαίνεται να υπερεκτιμά κάποιες παρατηρήσεις μεταξύ των 0 και 0,8 μονάδων στο διάγραμμα OBS vs PPRED αφού εκεί εντοπίζεται μία απόκλιση από την ευθεία (spline). Παράλληλα, είναι φανερό ότι υπερεκτιμά ελαφρώς μερικές παρατηρήσεις μεταξύ των 3 και 4 μονάδων στο διάγραμμα OBS vs IPRED.

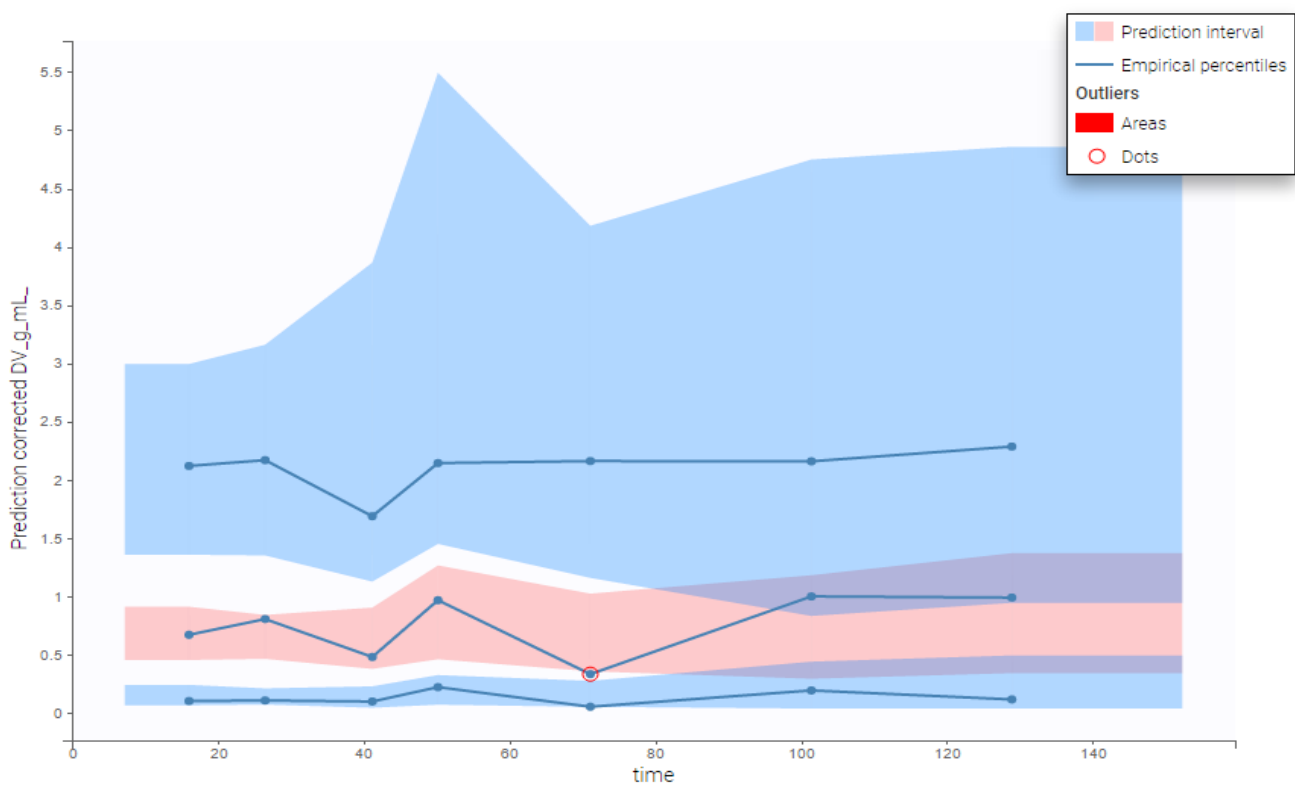




Σχήμα 37: Διάγραμμα IWRES vs Time και NPDE vs Time, και Density vs IWRES και Density vs NPDE του τελικού φαρμακοκινητικού μοντέλου. Η κίτρινη γραμμή αντιπροσωπεύει την τάση κυλιόμενου μέσου στα διαγράμματα σταθμισμένων υπολοίπων ενώ στα διαγράμματά πυκνότητας η διακεκομμένη μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύει την ευθεία  $\psi=0$ , η κόκκινη την γραμμή τάσης κυλιόμενου μέσου του μοντέλου και η κόκκινη διακεκομμένη την Gaussian συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας.

Από τα παραπάνω διαγράμματα ,για τα ατομικά σταθμισμένα υπόλοιπα (Weighted Residuals) παρατηρείται ότι η πλειονότητα των σημείων κατανέμονται ομοιόμορφα και τυχαία γύρω από το μηδέν και σε απόσταση έως δύο τυπικών αποκλίσεων από το μηδέν ( $\pm 2$  SD). Η γραμμή τάσης κυλιόμενου μέσου δηλαδή φαίνεται να ταυτίζεται με την  $\psi=0$  σε μεγάλο βαθμό καθώς και τα εμπειρικά διαγράμματα πυκνότητας πιθανότητας να προσεγγίζουν την κανονική κατανομή. Το ίδιο ισχύει και για τα κανονικοποιημένα προβλεπόμενα σφάλματα κατανομής που αποτελούν μια μη παραμετρική μορφή των πληθυσμιακών σταθμισμένων υπολοίπων (Population Weighted Residuals).





Σχήμα 38: Διάγραμμα VPC του τελικού φαρμακοκινητικού μοντέλου. Ο άξονας συγκέντρωσης εκφρασμένος σε  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και άξονας χρόνου εκφρασμένος σε ώρες. Οι μπλε γραμμές αναφέρονται στο 10ο, 50ο, 90ο εκατοστημόριο των εμπειρικών δεδομένων και οι σκιασμένες περιοχές αναφέρονται στην πρόβλεψη 95% του διαστήματος εμπιστοσύνης γύρω από κάθε εκατοστημόριο.

Πέρα από το αρχικό διάγραμμα VPC, χρησιμοποιήθηκε και η επιλογή που παρέχει το Monolix για διορθωμένες προβλέψεις στο διάγραμμα VPC, βελτιώνοντας τις επιδόσεις του διαγράμματος (δεύτερο διάγραμμα VPC). Είναι εμφανές ότι στα παραπάνω διαγράμματα VPC του τελικού μοντέλου τα εκατοστημόρια των πειραματικών δεδομένων εμπεριέχονται σε μεγάλο βαθμό στα διαστήματα εμπιστοσύνης, πράγμα που κάνει το μοντέλο ικανοποιητικό.

### Αξιολόγηση του τελικού πληθυσμιακού μοντέλου:

Αρχικά, το τελικό μοντέλο ελέγχθηκε για την σταθερότητα των αποτελεσμάτων του με την μέθοδο «BOOTSTRAP». Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν 1000 σύνολα δεδομένων από το αρχικό με τυχαία επιλογή και αντικατάσταση. Εκτιμήσεις για τις παραμέτρους του τελικού μοντέλου αποκτήθηκαν από κάθε βάση δεδομένων και κατασκευάστηκαν έτσι τα 90% διαστήματα εμπιστοσύνης για κάθε μεταβλητή. Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα τα αποτελέσματα της μεθόδου bootstrap ήταν πολύ κοντά με τις αρχικές εκτιμήσεις του μοντέλου, οι οποίες εμπεριέχονταν στα διαστήματα εμπιστοσύνης και άρα το τελικό μοντέλο θεωρείται ικανοποιητικό.

Πίνακας 16: Πίνακας αποτελεσμάτων μεθόδου BOOTSTRAP και σύγκριση με τις εκτιμήσεις του τελικού μοντέλου.

	<b>Εκτίμηση τελικού μοντέλου</b>	<b>R.S.E.(%) τελικού μοντέλου</b>	<b>Bootstrap εκτίμηση μέσου</b>	<b>Τυπική απόκλιση</b>	<b>90% διάστημα εμπιστοσύνης</b>	<b>R.S.E.(%) Bootstrap μεθόδου</b>
Ka_pop(hr-1)	0,538	31,4	0,545	0,191	0,282/0,906	35,2
Cl_pop(L/hr)	1,19	32,6	1,215	0,620	0,1187/2,125	51
Beta_Cl_GENOTYPE 1	1,43	28,2	1,633	1,235	0,5814/3,593	75,68
V1_pop(L)	18,4	17,1	15,35	3,025	10,83/20,44	19,7
Q_pop(L/hr)	42,9	8,67	43,09	3,586	37,45/48,84	8,32
Beta_Q_GENOTYPE_1	-0,457	35,7	-0,467	0,325	-0,932/0,05	69,7
V2_pop(L)	1,25e+3	31,6	1325,8	565,4	631,55/2373,7	42,6
Beta_V2_DRUG_1	-0,684	52,2	-0,483	0,486	-1,18/0,362	100,5
Beta_V2_DRUG_2	-0,814	14	-0,837	0,349	-1,407/-0,285	41,7
Omega_Ka	1,95	14,1	1,989	0,2286	1,621/2,386	11,49
Omega_Cl	0,831	22,8	0,689	0,2579	0,2856/1,067	37,39
Omega_V1	0,906	19,6	1,013	0,1302	0,807/1,230	12,85
Omega_Q	0,199	35,4	0,1439	0,069	0,043/0,264	48,1
Omega_V2	1,98	16,4	2,0	0,215	1,637/2,366	10,79
Corr_V2_V1	0,999	3,25	0,998	0,0004	0,9984/0,999	0,04
Corr_ka_V1	0,997	0,00314	0,998	0,001	0,9983/0,999	0,11
Corr_ka_V2	0,997	0,00346	0,998	0,0006	0,9985/0,999	0,06
b	0,41	5,19	0,409	0,026	0,3676/0,4520	6,35

Τέλος, αξιοποιήθηκε και η νέα δυνατότητα αξιολόγησης (Assessment) του επιλεγόμενου τελικού μοντέλου από το Monolix. Πιο αναλυτικά, αξιοποιώντας το υφιστάμενο μοντέλο και τις τιμές των αρχικών εκτιμήσεων (initial estimates), λαμβάνει μία ελάχιστη και μία μέγιστη τιμή, δημιουργώντας ένα εύρος τιμών από κάθε πληθυσμιακή παράμετρο που περιγράφει το τελικό μοντέλο, δηλαδή στην συγκεκριμένη περίπτωση την ka, Cl, V1, Q και V2. Με βάση λοιπόν αυτά τα εύρη, υπολογίζει το σύνολο των πληθυσμιακών παραμέτρων και στατιστικών κριτηρίων που χαρακτηρίζουν το τελικό μοντέλο για έναν αριθμό πιθανών μοντέλων που έχει επιλεγθεί. Στην συγκεκριμένη περίπτωση επιλέξαμε να αναπαραχθούν τα πιθανά αποτελέσματα για ένα σύνολο 10 πιθανών μοντέλων. Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται αναλυτικά στο Σχήμα 39:





Σχήμα 39: Τιμές των πληθυσμιακών παραμέτρων και στατιστικών κριτηρίων των 10 πιθανών μοντέλων με βάση τα εύρη των φαρμακοκινητικών παραμέτρων που υπολογιστήκαν από το τελικό μοντέλο.

Με βάση και το τελευταίο στάδιο αξιολόγησης του τελικού μοντέλου του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης, συμπεραίνουμε ότι το μοντέλο κρίνεται ικανοποιητικό εφόσον η μεγάλη πλειονότητα των υπολογισμένων πληθυσμιακών παραμέτρων από τα 10 πιθανά μοντέλα προσεγγίζουν τις τιμές του τελικού πληθυσμιακού μοντέλου αλλά και τις τελικές τιμές υπολογισμένες στηριζόμενοι στην μέθοδο Bootstrap με μοναδικές εξαιρέσεις τον V1 και την διατομική μεταβλητότητα του.

## 2.4 Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η φαρμακοκινητική της κλοπιδογρέλης έχει περιγραφεί σε μεγάλο βαθμό από πληθώρα δημοσιευμάτων [16,17,21] εφόσον αποτελεί ένα παλιό και αποτελεσματικό αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο, χρήσιμο για την πρωτογενή και δευτερογενή προφύλαξη από καρδιοαγγειακά συμβάντα αλλά και από εγκεφαλικό επεισόδιο. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της περιορίζεται σε ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών από την μεγάλη διατομική μεταβλητότητα που την χαρακτηρίζει και η οποία ενδέχεται να επηρεάζεται από δημογραφικούς παράγοντες, γενετικούς πολυμορφισμούς ενζύμων, αλληλεπιδράσεις συγχορηγούμενων φαρμάκων και παρουσία συννοσηροτήτων. Όλα τα ανωτέρω, κατέστησαν επιτακτική την ανάγκη διερεύνησης του φαρμακοκινητικού προφίλ της κλοπιδογρέλης και των μεταβολιτών του μέσω της δημιουργίας ενός πληθυσμιακού μοντέλου με σκοπό την αποφυγή εμφάνισης τοξικότητας ή έλλειψη αποτελεσματικότητας ύστερα από χορήγηση της. Στην συγκεκριμένη εργασία, αναλύθηκε το φαρμακοκινητικό προφίλ του ανενεργού-καρβοξυλικού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης ώστε έμμεσα να εξαχθούν συμπεράσματα για την κλινική φαρμακοκινητική της κλοπιδογρέλης που θα είχαν άμεσο αντίκτυπο στην κλινική πράξη και καθημερινή χρήση της, ώστε να αποφευχθούν περιπτώσεις τοξικότητας και αναποτελεσματικότητας. Παράλληλα, έγινε έλεγχος της επίδρασης διαφόρων παραγόντων (δημογραφικοί, γενετικοί και βιοισοδύναμα σκευάσματα) στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους του πληθυσμιακού μοντέλου που αναπτύχθηκε.

Αρχικά, για την ανεύρεση του πιο κατάλληλου δομικού φαρμακοκινητικού μοντέλου εξετάστηκαν όλα τα πιθανά μοντέλα με διαφορετικό αριθμό διαμερισμάτων και κινητική απορρόφησης. Το πλέον βέλτιστο βρέθηκε να είναι το δι-διαμερισματικό με πρωτοταξική κινητική απορρόφησης και χωρίς παρουσία χρόνου καθυστέρησης στην απορρόφηση (tlag). Με εξαίρεση την απουσία ύπαρξης tlag στο μοντέλο, αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα δύο δημοσιευμένα πληθυσμιακά μοντέλα του ανενεργού μεταβολίτη που υπάρχουν στη βιβλιογραφία[23,24] στα οποία το βέλτιστο δομικό μοντέλο βρέθηκε να είναι δι-διαμερισματικό με πρωτοταξική κινητική απορρόφησης παρουσία χρόνου καθυστέρησης (tlag ή Erlang model) και πρωτοταξική κινητική απομάκρυνσης.

Όσον αφορά στην υπολειμματική μεταβλητότητα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος και των διαφόρων τύπων σφάλματος, του αναλογικού, του προσθετικού και του συνδυαστικού (1 και 2), με εφαρμογή διάφορων συνδυασμών στο επιλεγμένο δομικό μοντέλο του προηγούμενου βήματος. Από τα αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι το αναλογικό μοντέλο σφάλματος για τον ανενεργό μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης, βρέθηκε να παρουσιάζει τη βέλτιστη προσαρμογή. Στη συνέχεια, το επόμενο βήμα ανάπτυξης του πληθυσμιακού μοντέλου ήταν η διερεύνηση ύπαρξης μη γραμμικής απομάκρυνσης. Στην βιβλιογραφία, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν την ύπαρξη μη γραμμικότητας στο μονοπάτι μεταβολισμού της κλοπιδογρέλης εξαιτίας μη ανάλογης αύξησης της AUC από ανάλογη αύξηση της χορηγούμενης δόσης[74,103,108]. Το πληθυσμιακό αυτό μοντέλο όμως απορρίφθηκε λόγω μη καλής προσαρμογής στα δεδομένα τόσο γραφικά όσο και σε επίπεδο στατιστικών κριτηρίων και τυπικών σφαλμάτων τα οποία ήταν αυξημένα συγκριτικά με το μοντέλο γραμμικής απομάκρυνσης. Το φαρμακοκινητικό μοντέλο επομένως που περιγράφει καλύτερα είναι το δι-διαμερισματικό μοντέλο με πρωτοταξική κινητική εισόδου και πρωτοταξική κινητική απομάκρυνσης με αναλογικό μοντέλο σφάλματος.

Ύστερα, εξετάστηκε η πιθανή ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ των φαρμακοκινητικών παραμέτρων με σκοπό την περαιτέρω βελτίωση και σταθεροποίηση του μοντέλου. Από τα διαγράμματα συσχετίσεων τυχαίων επιδράσεων, εισήχθησαν στο μοντέλο οι θετικές συσχετίσεις των V1-V2, ka-V2, ka-V1 οι οποίες βελτίωσαν σημαντικά το μοντέλο τόσο σε γραφικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο τιμών των

στατιστικών κριτηρίων και τυπικών σφαλμάτων. Τέλος, το τελευταίο στάδιο κατά την ανάπτυξη του πληθυσμιακού μοντέλου ήταν η διερεύνηση ύπαρξης πιθανών συμμεταβλητών. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν το φύλο, η ηλικία, το βάρος, το ύψος, η ύπαρξη αλληλίου μειωμένης ενεργότητας CYP2C19 καθώς και η χορήγηση διαφορετικών βιοισοδύναμων σκευασμάτων. Με βάση τη σημαντικότητα ( $p$ -value  $< 0.05$ ) του κριτηρίου beta από τον πίνακα των πληθυσμιακών παραμέτρων που υπολογιζόταν μέσω Wald chi square test, τη μείωση του λόγου πιθανοφάνειας 2LL και των τιμών AIC, BIC και BICc, αλλά και την μείωση των τιμών του σχετικού τυπικού σφάλματος τόσο για τις πληθυσμιακές παραμέτρους όσο και για τη διατομική μεταβλητότητά τους, αποφασίστηκε η εισαγωγή των εξής συμμεταβλητών στο τελικό μοντέλο: της ολικής κάθαρσης C1-Genotype 1 με θετικό πρόσημο, της ενδοδιαμερισματικής κάθαρσης Q-Genotype 1 καθώς και του περιφερικού φαινομένου όγκου κατανομής V2-Drug 1, Drug 2 με αρνητικό πρόσημο. Οι συγκεκριμένες συμμεταβλητές δεν εισήχθησαν σε κανένα από τα δύο προηγούμενα δημοσιευμένα πληθυσμιακά μοντέλα του ανενεργού μεταβολίτη διότι η ύπαρξη αλληλίου CYP2C19 μειωμένης ενεργότητας καθώς και η παρουσία διαφορετικών βιοισοδύναμων φαρμάκων κλοπιδογρέλης δεν είχαν εξεταστεί ως πιθανές συμμεταβλητές στα τελικά μοντέλα.

Όσον αφορά τις πληθυσμιακές τιμές που βρέθηκαν, ξεχωρίζουν οι πολύ υψηλές τιμές των δύο φαινομένων όγκων κατανομής με τον συνολικό όγκο κατανομής του ανενεργού μεταβολίτη να υπολογίζεται σε 1268,4 L. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να ερμηνευτεί τόσο από τη φύση του μορίου όσο και από την παρουσία συν-νοσηροτήτων που μπορούν να μεταβάλλουν τον όγκο κατανομής. Πιο συγκεκριμένα, τόσο η κλοπιδογρέλη όσο και ο ανενεργός μεταβολίτης είναι πολύ λιπόφιλα μόρια με υψηλό logP. Συνεπώς, η κατανομή τους στο ανθρώπινο σώμα δεν περιορίζεται μόνο στο αίμα όπως συμβαίνει στα υδρόφιλα φάρμακα αλλά και στους ιστούς, συνδεδεμένοι με τον λιπώδη ιστό και τις μεμβράνες κυττάρων. Αυτό, πέρα από τις υψηλές τιμές των όγκων κατανομής, δικαιολογεί και την επιλογή δι-διαμερισματικού μοντέλου ως του βέλτιστου δομικού μοντέλου για την περιγραφή της φαρμακοκινητικής του ανενεργού μεταβολίτη, εφόσον το μονοδιαμερισματικό ενδείκνυται συνήθως για την περιγραφή της φαρμακοκινητικής φαρμάκων που περιορίζεται η κατανομή τους στο αίμα ή πλάσμα. Παράλληλα, σημαντική συνεισφορά στις υψηλές τιμές των όγκων κατανομής ενδέχεται να έχει διαδραματίσει η πιθανή παρουσία συννοσηροτήτων. Για παράδειγμα, πιθανή παράλληλη ύπαρξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2, ασθένεια που αποτελεί επιβαρυντικό προγνωστικό παράγοντα για στεφανιαία νόσο και έμφραγμα του μυοκαρδίου και συνυπάρχει σε ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών, μπορεί να μεταβάλλει τον όγκο κατανομής των φαρμάκων με υψηλό ποσοστό σύνδεσης με την αλβουμίνη και άρα του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης (ποσοστό σύνδεσης με αλβουμίνη 94% [14,18]). Έτσι, παρουσία σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 μπορεί να συνοδεύεται από αυξημένη παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων και σύνθεση γλυκοζυλιωμένης αλβουμίνης με μειωμένη συγγένεια σύνδεσης φαρμάκων. Όλα αυτά έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την μείωση της ποσότητας του συνδεδεμένου ανενεργού μεταβολίτη, αυξάνοντας τον όγκο κατανομής του [124].

Επιπλέον, υπάρχει μια ισοδύναμη σχέση μεταξύ των χαμηλών επιπέδων αλβουμίνης στο αίμα και πρόκλησης καρδιαγγειακών συμβάντων. Αναλυτικότερα, χαμηλά επίπεδα αλβουμίνης, προκαλούμενα από φλεγμονώδεις διαδικασίες ή υποκείμενα νοσήματα, έχουν ως συνέπεια μειωμένη αντιπηκτική και αντιοξειδωτική δράση και άρα προκαλούν αυξημένη επίπτωση καρδιαγγειακών συμβάντων (προγνωστικός δείκτης). Αντιστρόφως, τα ίδια καρδιαγγειακά νοσήματα μέσω οξειδωτικού stress μειώνουν την αλβουμίνη και επιδεινώνουν τα συμπτώματα που προκαλούν με το μηχανισμό που αναφέρθηκε ανωτέρω [125,126]. Συνεπώς, η υποαλβουμιναιμία μπορεί να μειώνει περαιτέρω τη σύνδεση του ανενεργού μεταβολίτη με την αλβουμίνη, αυξάνοντας ακόμη περισσότερο τον συνολικό όγκο κατανομής. Η παρουσία σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και υποαλβουμιναιμίας ως αίτιο ή

αποτέλεσμα καρδιαγγειακής νόσου μπορεί να ευθύνεται και για την εμφάνιση μεγάλης διατομικής μεταβλητότητας στους όγκους κατανομής που υπολογιστήκαν από το τελικό μοντέλο. Αυτό το ενδεχόμενο θα μπορούσε να εξεταστεί για την περαιτέρω ανάλυση του πληθυσμιακού μοντέλου του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης με την ανάπτυξη ενός μοντέλου και με την ταυτόχρονη εξέταση της παρουσίας ΣΔ τύπου 2 ή υποαλβουμιναιμίας ως πιθανές συμμεταβλητές. Τέλος, μικρή συμμετοχή στις υψηλές τιμές των όγκων κατανομής καθώς και στις υψηλές τιμές διατομικής μεταβλητότητας τους, μπορεί να διαδραματίσει πιθανή αυξημένη λιπώδη μάζα των ασθενών, εφόσον η υπερλιπιδαιμία αποτελεί επιβαρυντικό παράγοντα στεφανιαίας νόσου και η λιπώδης σύσταση του σώματος αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας[127]. Ωστόσο, πιθανή επιρροή της αυξημένης ηλικίας και άρα της αυξημένης λιπώδους σύστασης του σώματος στον όγκο κατανομής του ανενεργού μεταβολίτη θα είναι μικρή εφόσον η ηλικία δεν εισήχθη ως συμμεταβλητή του όγκου κατανομής στο τελικό μοντέλο.

Ωστόσο, μεγάλη διατομική παρουσιάζει και η σταθερά πρωτοταξικής απορρόφησης  $k_a$ . Μέρος αυτής της διατομικής μεταβλητότητας δεν οφείλεται στην χορήγηση διαφορετικών βιοισοδύναμων σκευασμάτων κλοπιδογρέλης καθώς τα δύο άλατα της(Plavix-Hydrogen sulfate,Bisulfate και Clovelen,Grepid-Besilate) έχουν παρόμοια βιοδιαθεσιμότητα (προϋπόθεση που είναι απαραίτητη για την έγκριση βιοισοδύναμων σκευασμάτων)[128] γεγονός που επιβεβαιώνεται και στη συγκεκριμένη εργασία εφόσον το είδος του φαρμάκου δεν εισήχθη ως συμμεταβλητή της  $k_a$ . Αντιθέτως, ένα ποσοστό αυτής μπορεί πάλι να οφείλεται στην παρουσία συννοσηροτήτων όπως ΣΔ τύπου 2 και καρδιακή ανεπάρκεια. Πιο αναλυτικά, ένα μικρό ποσοστό της μεταβλητότητας μπορεί πάλι να αποδοθεί στην ύπαρξη ΣΔ τύπου 2 η οποία ενδέχεται να προκαλέσει γαστροπάρεση η οποία καθυστερεί τον χρόνο γαστρικής κένωσης. Η γαστροπάρεση, προερχόμενη από τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, επηρεάζει τον ρυθμό και/ή την έκταση της απορρόφησης συνήθως των φαρμάκων που απορροφούνται μέσω μεταφορέα και όχι μέσω παθητικής διάχυσης όπως συμβαίνει με την κλοπιδογρέλη (BCS class II). Επομένως αναμένεται να επηρεάσει σε μικρότερο την απορρόφηση του μητρικού μορίου και άρα να συνεισφέρει σε μικρότερο ποσοστό στην διατομική μεταβλητότητα της  $k_a$ . Επιπλέον, άλλο ένα ποσοστό μεταβλητότητας ίσως οφείλεται στην παρουσία καρδιακής ανεπάρκειας, που αποτελεί συχνή συννοσηρότητα της στεφανιαίας νόσου ως αίτιο ή αποτέλεσμα αυτής. Πιο συγκεκριμένα, λόγω μείωσης της καρδιακής παροχής που έχει ως αποτέλεσμα την περιφερική υποάρδευση των ιστών, μπορεί να μειώνεται η παροχή αίματος στο γαστρεντερικό σωλήνα και άρα να ελαττώνεται η απορρόφηση των φαρμάκων. Θα έχει ενδιαφέρον επομένως σε μια μελλοντική έρευνα να εξεταστεί κατά πόσο επηρεάζει η παρουσία της καρδιακής ανεπάρκειας την απορρόφηση του μητρικού μορίου και άρα την  $k_a$ , λαμβάνοντας υπόψη την καρδιακή ανεπάρκεια ως πιθανή συμμεταβλητή της  $k_a$ . Με τον ίδιο μηχανισμό, προκαλείται και μειωμένη ροή αίματος στο ήπαρ και στους νεφρούς μειώνοντας την ολική κάθαρση. Συνεπώς, εφόσον η κλοπιδογρέλη και ο ανενεργός μεταβολίτης της ακολουθούν μεικτή οδό απομάκρυνσης[26] ίσως η καρδιακή ανεπάρκεια συνεισφέρει και στην διατομική μεταβλητότητα της κάθαρσης. Οπότε, θα μπορούσε, παράλληλα με την εξέταση της συμμεταβλητής καρδιακής ανεπάρκειας- $k_a$ , να εξεταστεί και η πιθανή σχέση συμμεταβλητής καρδιακής ανεπάρκειας-Cl. Ωστόσο, η πιο σημαντική πηγή διατομικής μεταβλητότητας στην  $k_a$  μάλλον προέρχεται από την p-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp), που όπως αναφέρθηκε στο «Γενικό Μέρος», αποτελεί έναν ATP-εξαρτώμενο μεταφορέα που αποβάλλει την κλοπιδογρέλη πίσω στον γαστρεντερικό σωλήνα και μειώνει έτσι την απορρόφηση της. Κωδικοποιείται από το ABCB1 γονίδιο και εντοπίζεται στο γαστρεντερικό επιθήλιο. Παρουσία μετάλλαξης CT3435T, πιθανόν να μειώνεται η βιοδιαθεσιμότητα κλοπιδογρέλης λόγω αυξημένης εκροής. Στη συγκεκριμένη εργασία δεν εξετάστηκε η παρουσία της μετάλλαξης CT3435T στον πληθυσμό μελέτης σε ομοζυγωτικό ή ετεροζυγωτικό επίπεδο η οποία πιθανόν να επηρέαζε την απορρόφηση του μητρικού

μορίου και άρα τη σταθερά  $k_a$  ιδιαίτερα όταν χορηγούνται αυξημένες δόσεις εφόδου. Επομένως, είναι σκόπιμο σε μια παρόμοια μελέτη μελλοντικώς να εισαχθεί και η πληροφορία πιθανής μετάλλαξης στο ABCB1 γονίδιο σε περίπτωση που ένα σημαντικό ποσοστό διατομικής μεταβλητότητας ερμηνεύεται από την συγκεκριμένη πληροφορία.

Επιπλέον έγινε διερεύνηση της συσχέτισης των φαρμακοκινητικών παραμέτρων του μοντέλου κάτι που δεν έχει πραγματοποιηθεί σε προγενέστερη εργασία όσον αφορά τον καρβοξυλικό μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης. Από τα αποτελέσματα, προέκυψαν ισχυρές θετικές συσχετίσεις  $k_a$ -V1,  $k_a$ -V2 με  $\text{corr}:0,997, V1$ -V2 με  $\text{corr}:0,999$ . Συμπερασματικά, προκύπτει ότι όσο αυξάνεται η πρωτοταξική σταθερά απορρόφησης  $k_a$ , δηλαδή όσο αυξάνεται ο ρυθμός και η έκταση της απορρόφησης του μητρικού μορίου και άρα η ποσότητα του ανενεργού μεταβολίτη που σχηματίζεται από την βιομετατροπή του, τόσο αυξάνεται και ο όγκος κατανομής του, κεντρικός και περιφερικός. Αυτό το εύρημα μπορεί να ερμηνευτεί περαιτέρω και από τις πολύ υψηλές τιμές των όγκων κατανομής του μεταβολίτη λόγω της υψηλής λιποφιλικότητας του. Επομένως, όσο αυξάνεται η ποσότητα του ανενεργού-καρβοξυλικού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης στον οργανισμό λόγω μεταβολισμού αυξημένης ποσότητας μητρικού μορίου, τόσο θα αυξάνεται η κατανομή του στις κυτταρικές μεμβράνες των ιστών λόγω λιποφιλικότητας. Τέλος, η υψηλή συσχέτιση μεταξύ των δύο όγκων κατανομής μπορεί να δικαιολογηθεί και από την υψηλή πληθυσμιακή τιμή της ενδοδιαμερισματικής κάθαρσης  $Q:42,9L/hr$ . Αναλυτικότερα, όπως τονίστηκε και στο «Γενικό Μέρος», η μεταξύ των διαμερισμάτων κάθαρση δείχνει την ποσότητα του προς προσδιορισμό μορίου που μεταφέρεται μεταξύ των δύο όγκων κατανομής. Από τη συγκεκριμένη τιμή, συμπεραίνουμε ότι υπάρχει ταχεία και μεγάλη μεταφορά του ανενεργού μεταβολίτη από το κεντρικό διαμέρισμα στο περιφερικό. Έτσι, κατά την χορήγηση του μητρικού μορίου κλοπιδογρέλης, όσο αυξάνεται ο κεντρικός όγκος κατανομής του ανενεργού μεταβολίτη, τόσο θα αυξάνεται και ο περιφερικός όγκος κατανομής του. Συνεπώς, έτσι δικαιολογείται και η ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο όγκων κατανομής.

Τέλος, στο τελευταίο στάδιο επιβεβαιώθηκε η εισαγωγή τεσσάρων συμμεταβλητών, της ολικής κάθαρσης Cl-Genotype 1 με θετικό πρόσημο και της ενδοδιαμερισματικής κάθαρσης Q-Genotype 1 καθώς και του περιφερικού φαινόμενου όγκου κατανομής V2-Drug 1, Drug 2 με αρνητικό πρόσημο. Πιο αναλυτικά, βρέθηκε ότι η ολική κάθαρση του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης είναι αυξημένη κατά 3,5 φορές στους ετεροζυγώτες για το CYP2C19 αλληλίο μειωμένης ενεργότητας. Αυτό μπορεί να αποδοθεί με τον εξής συναγωνιστικό μηχανισμό: εφόσον το CYP2C19 αποτελεί το κύριο ένζυμο του κυτοχρώματος που συμμετέχει στην βιομετατροπή του μητρικού μορίου της κλοπιδογρέλης στον ενεργό μεταβολίτη που ασκεί το αντιαιμοπεταλιακό αποτέλεσμα[22], στους ετεροζυγώτες για το CYP2C19 αλληλίο μειωμένης ενεργότητας θα σχηματιστεί μειωμένη ποσότητα ενεργού μεταβολίτη και άρα περισσότερη ποσότητα της μητρικής ουσίας θα μεταβολιστεί από το CES1 προς τον ανενεργό-καρβοξυλικό μεταβολίτη. Επομένως, θα περιμέναμε να αντικρίζαμε αυξημένες συγκεντρώσεις του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης σε αυτήν την ομάδα ασθενών. Ωστόσο, στην συγκεκριμένη εργασία προέκυψαν μειωμένα επίπεδα σε σχέση με τους φυσιολογικούς μεταβολιστές. Φαίνεται λοιπόν, ότι η ολική κάθαρση του ανενεργού μεταβολίτη αυξάνεται στους ετεροζυγώτες ώστε να εξισορροπήσει την αυξημένη παραγωγή του από την περίσσεια μεταβολισμού της μητρικής ουσίας από το CES1. Συμπληρωματικά προς τη συγκεκριμένη συμμεταβλητή, φαίνεται να λειτουργεί και η εισαγωγή της ενδοδιαμερισματικής κάθαρσης με την παρουσία CYP2C19 αλληλίου μειωμένης ενεργότητας. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι στους ετεροζυγώτες για το CYP2C19 αλληλίο είναι 0,63 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη των

ομοζυγωτών. Η συγκεκριμένη εισαγωγή συµµεταβλητής µπορεί να ερµηνευτεί και µε την επιλογή του δοµικού µοντέλου, που εδώ αποτελεί το δι-διαµερισµατικό µοντέλο. Όπως αναλύθηκε στο «Γενικό Μέρος», στο δι-διαµερισµατικό µοντέλο οι σηµαντικές κινητικές διαδικασίες αποτελούν η αποµάκρυνση και η κατανοµή, που η πρώτη αντιπροσωπεύεται από την τιµή της ολικής κάθαρσης και η δεύτερη από τις τιµές των όγκων κατανοµής και της ενδοδιαµερισµατικής κάθαρσης Q. Συνεπώς, στους ετεροζυγώτες αυξάνεται σηµαντικά η κάθαρση του ανενεργού µεταβολίτη ενώ µειώνεται η κατανοµή του από τον κεντρικό στο περιφερικό όγκο κατανοµής. Συµπερασµατικά, παρατηρούµε ότι µε την παρουσία του CYP2C19 αλληλίου µειωµένης ενεργότητας, η σηµαντική κινητική διαδικασία στο φαρµακοκινητικό µοντέλο του καρβοξυλικού µεταβολίτη είναι η αποµάκρυνση συγκριτικά µε την κατανοµή του.

Τέλος, κατά την διερεύνηση ύπαρξης συµµεταβλητών, επιβεβαιώθηκε και η εισαγωγή των συµµεταβλητών V2-Drug 1 (Clovelen), Drug 2 (Grepid). Αναλυτικότερα, µε την χορήγηση του βιοισοδύναµου σκευάσµατος Clovelen, βρέθηκε ότι µειώνεται 0,5 φορές ο περιφερικός όγκος κατανοµής V2 ενώ µε την χορήγηση του Grepid αντίστοιχα µειώνεται 0,44 φορές. Γενικά, η ελεύθερη βάση της κλοπιδογρέλης είναι ασταθής και επιρρεπής σε ρακεµοποίηση και υδρόλυση και παρουσιάζει χαµηλή διαλυτότητα και καθαρότητα, εποµένως οι διάφορες βιοισοδύναµες µορφές στοχεύουν στην τροποποίηση των φυσικοχηµικών ιδιοτήτων µέσω σχηµατισµού διαφόρων αλάτων κλοπιδογρέλης[130]. Η πρώτη µορφή άλατος ήταν η hydrogen sulfate (bissulfate) που αποτελεί τη δραστική ουσία του σκευάσµατος Plavix ενώ µετέπειτα αναπτύχθηκαν και άλλες µορφές µε την κυριότερη να είναι η besylate που αποτελεί και τη δραστική ουσία του Grepid και Clovelen. Από προηγούµενες µελέτες, έχει βρεθεί ότι οι δύο αυτές βιοισοδύναµες µορφές έχουν παρόµοια αποτελεσµατικότητα στο αντιαιµοπεταλιακό αποτέλεσµα καθώς και παρόµοιο φαρµακοκινητικό προφίλ και προφίλ ανεπιθύµητων ενεργειών[128,131,132]. Συνεπώς, το εύρηµα αυτής της εργασίας ότι µειώνεται ο περιφερικός όγκος κατανοµής περίπου στο 50% µε την χρήση της βιοισοδύναµης µορφής κλοπιδογρέλης besylate, δεν έχει παρατηρηθεί σε προηγούµενες εργασίες και παρουσιάζει µεγάλο ενδιαφέρον καθώς φαίνεται η χορήγηση διαφορετικών βιοισοδύναµων µορφών κλοπιδογρέλης να επηρεάζει το φαρµακοκινητικό προφίλ του ανενεργού µεταβολίτη της κλοπιδογρέλης και άρα του µητρικού µορίου και του ενεργού µεταβολίτη εφόσον λόγω παρόµοιων φυσικοχηµικών ιδιοτήτων, παρουσιάζουν παρόµοια φαρµακοκινητική συµπεριφορά. Στην κλινική πράξη, χαµηλότερος Vd σηµαίνει ότι µια δεδοµένη δόση φαρµάκου θα κατανεµηθεί σε µικρότερο όγκο στον ανθρώπινο σώµα και η µέγιστη συγκέντρωση του φαρµάκου (peak) θα αυξηθεί. Έτσι, λόγω χαµηλότερου Vd για τα σκευάσµατα κλοπιδογρέλης besylate, πιθανόν να απαιτούνται χαµηλότερες δόσεις εφόδου(σε περιπτώσεις εμφάνισης οξέος εµφράγµατος του µυοκαρδίου ή σε συµπτώµατα οξείας στεφανιαίας νόσου). Συνεπώς, ίσως είναι προτιµότερο για τα besylate σκευάσµατα κλοπιδογρέλης να χορηγούνται δόσεις εφόδου των 150 mg και όχι των 300mg για να επιτευχθούν αρχικές συγκεντρώσεις παρόµοιες µε αυτές των υπόλοιπων σκευασµάτων. Σε κάθε περίπτωση, είναι θεµιτό να επανεξεταστεί µελλοντικά και να επιβεβαιωθεί αν πράγµατι διαφέρει ο όγκος κατανοµής µεταξύ των διαφόρων βιοισοδύναµων σκευασµάτων κλοπιδογρέλης µε µελέτες συγκριτικής φαρµακοκινητικής µεταξύ των διαφόρων σκευασµάτων.

Συµπερασµατικά, τα αποτελέσµατα της συγκεκριµένης µελέτης θα µπορούσαν να αποτελέσουν βάση, αλλά και εργαλείο για την περαιτέρω έρευνα της πληθυσµιακής φαρµακοκινητικής της κλοπιδογρέλης και του ανενεργού µεταβολίτη της, σε µεγαλύτερο πληθυσµό εθελοντών, που λαµβάνουν το συγκεκριµένο φάρµακο και µε την ταυτόχρονη εξέταση των διαφόρων συννοσηροτήτων που αναφέρθηκαν προηγουµένως ως πιθανές συµµεταβλητές µε σκοπό την µείωση της διατοµικής µεταβλητότητας των φαρµακοκινητικών παραµέτρων και τη διερεύνηση της επίδρασης τους.

Ιδανικότερη επιλογή θα ήταν η ταυτόχρονη μοντελοποίηση του μητρικού μορίου ή του ενεργού μεταβολίτη ταυτόχρονα με τον ανενεργό μεταβολίτη, η οποία θα ερμηνεύει καλύτερα τις αβεβαιότητες των δεδομένων και την επιρροή του ανενεργού μεταβολίτη στον ενεργό ή στο μητρικό μόριο, καθώς και θα διευκολύνει μακροπρόθεσμα την προσομοίωση νέων κλινικών σεναρίων (πχ. αλλαγές στα δοσολογικά σχήματα ή στους κλινικούς παράγοντες). Παράλληλα, στόχος περαιτέρω μελέτης θα ήταν η επιβεβαίωση των συµµεταβλητών που εισήχθησαν στην παρούσα εργασία αλλά και η επιβεβαίωση της µείωσης στον Vd που διαπιστώθηκε ύστερα από χορήγηση του σκευάσματος κλοπιδογρέλης besylate μέσω συγκριτικής φαρµακοκινητικής µελέτης µε σκοπό την βελτίωση της ασφάλειας και αποτελεσµατικότητας αυτού του τόσο ευρέως χρησιµοποιούµενου αντιαιµοπεταλιακού φαρµάκου.

### 3.Περίληψη

#### Εισαγωγή:

Η κλοπιδογρέλη είναι ένα αντιαιμοπεταλιακό φάρμακο που χρησιμοποιείται ευρέως στις μέρες μας για την πρόληψη εμφάνισης καρδιαγγειακού συμβάντος τόσο πρωτογενώς όσο και δευτερογενώς σε ασθενείς με ιστορικό εμφράγματος του μυοκαρδίου ή οξείας στεφανιαίας νόσου. Υφίσταται έντονο μεταβολισμό πρώτης διόδου με το 85% περίπου της απορροφηθείσας δόσης να μετατρέπεται σε έναν καρβοξυλικό, φαρμακολογικά ανενεργό μεταβολίτη και το 2% περίπου της δόσης που απορροφάται να μετατρέπεται στον ενεργό μεταβολίτη που ασκεί την αντιαιμοπεταλιακή δράση. Ωστόσο, λόγω μεγάλης διατομικής μεταβλητότητας, σε ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών εμφανίζεται αντίσταση στη θεραπεία με κλοπιδογρέλη που εκφράζεται ως εκδήλωση μειωμένης αντιαιμοπεταλιακής δράσης. Στην εμφάνιση σημαντικής διατομικής μεταβλητότητας έχουν ενοχοποιηθεί πολλοί παράγοντες όπως δημογραφικές μεταβλητές, φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις, ύπαρξη συννοσηροτήτων αλλά και γενετικοί πολυμορφισμοί ενζύμων και ιδιαίτερα η ύπαρξη αλληλίου μειωμένης ενεργότητας CYP2C19.

#### Σκοπός της μελέτης:

Όλοι οι ανωτέρω λόγοι δημιούργησαν την ανάγκη διερεύνησης του φαρμακοκινητικού προφίλ του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης με σκοπό την ανάπτυξη ενός πληθυσμιακού μοντέλου και την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη φαρμακοκινητική της κλοπιδογρέλης στο πλάσμα σε άμεση συσχέτιση με το γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς, των ατομικών χαρακτηριστικών τους αλλά και του εκάστοτε βιοισοδύναμου σκευάσματος.

#### Μέθοδοι:

Τα δεδομένα συγκέντρωσης (C) – χρόνου (t), που αναλύθηκαν στη συγκεκριμένη πληθυσμιακή φαρμακοκινητική μελέτη, αποκτήθηκαν από Β' Καρδιολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν» μετά από αρχικής χορήγηση κλοπιδογρέλης σε δόσεις 75,300,600mg την πρώτη ημέρα και εν συνεχεία σε δόση συντήρησης 75 mg την ημέρα για διάστημα τουλάχιστον 6 μηνών-1 χρόνου. Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης ήταν η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV). Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Monolix© έκδοσης 2019R2 και με την εφαρμογή της μεθόδου της μη γραμμικής ανάλυσης μικτών επιδράσεων. Κατά την ανάλυση, πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση του δομικού μοντέλου (αριθμός διαμερισμάτων, διερεύνηση κινητικής απορρόφησης), του μοντέλου υπόλοιπου σφάλματος (αναλογικό, προσθετικό, συνδυαστικό), της μη γραμμικής απομάκρυνσης καθώς και των αρχικών τιμών των παραμέτρων. Ακόμη, εξετάστηκε η συσχέτιση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων και η επίδραση των συμμεταβλητών όπως φύλο, ηλικία, βάρος, ύψος, γενετικά χαρακτηριστικά (ύπαρξη αλληλίου μειωμένης ενεργότητας CYP2C19) καθώς και διαφορετικό βιοισοδύναμο σκεύασμα στις παραμέτρους. Επιπλέον, εξετάστηκαν οι συνδυασμοί όλων των ανωτέρω παραγόντων μεταξύ τους. Η επιλογή του βέλτιστου μοντέλου πραγματοποιήθηκε με χρήση ορισμένων διαγνωστικών εργαλείων, όπως η αξιολόγηση των τιμών των πληθυσμιακών παραμέτρων και της φυσιολογικής τους σημασίας, η τιμή του ποσοστού του σχετικού σφάλματος (r.s.e.%), ο στατιστικός έλεγχος καλής προσαρμογής με τη χρήση της τιμής μέγιστης πιθανοφάνειας (-2LL), των κριτηρίων πληροφορίας Akaike (AIC), Bayesian (BIC), και corrected Bayesian (BICc), η σημαντικότητα (p-value <0.05 του Wald test) και



τα διαγράμματα καλής προσαρμογής (πληθυσμιακά και εξατομικευμένα). Το τελικό μοντέλο ελέγχθηκε για την αξιοπιστία του με το διάγραμμα VPC (Visual Predictive Check), την μέθοδο «Bootstrap» αλλά και την καινούργια δυνατότητα αξιολόγησης του τελικού μοντέλου που παρέχεται από το Monolix.

### Αποτελέσματα:

Το μοντέλο που βρέθηκε να περιγράφει καλύτερα τη φαρμακοκινητική του καρβοξυλικού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης είναι το δι-διαμερισματικό μοντέλο με πρωτοταξική κινητική απορρόφησης και γραμμική κινητική απομάκρυνσής και με μοντέλο σφάλματος το αναλογικό. Τα δομικά μοντέλα με ένα διαμέρισμα ή τρία διαμερίσματα ή με την ύπαρξη μη γραμμικής απομάκρυνσης απορρίφθηκαν λόγω μη καλής προσαρμογής στα δεδομένα. Με την ίδια λογική, απορρίφθηκαν και τα υπόλοιπα μοντέλα σφάλματος. Η τιμή της σταθεράς πρωτοταξικής απορρόφησης  $k_a$  βρέθηκε ίση με  $0,538 \text{ hr}^{-1}$ , η τιμή της συνολικής κάθαρσης  $Cl$  ίση με  $1,19 \text{ L/hr}$ , η τιμή του κεντρικού και περιφερικού όγκου κατανομής  $V_1$  και  $V_2$  ίση με  $18,4 \text{ L}$  και  $1250 \text{ L}$  ενώ η ενδοδιαμερισματική κάθαρση  $Q$  βρέθηκε ίση με  $42,9 \text{ L/hr}$ . Όλες οι πληθυσμιακές τιμές των φαρμακοκινητικών παραμέτρων που υπολογιστήκαν είχαν σημαντική διατομικής μεταβλητότητα με εξαίρεση την πληθυσμιακή τιμή της ενδοδιαμερισματικής κάθαρσης  $Q$ . Εντοπίστηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ του κεντρικού και περιφερικού φαινομένου όγκου κατανομής ( $V_1$  και  $V_2$ ) με τη σταθερά πρωτοταξικής απορρόφησης  $k_a$  αλλά και μεταξύ των δύο φαινομένων όγκων κατανομής. Η ύπαρξη αλληλίου μειωμένης ενεργότητας CYP2C19 (GENOTYPE 1) βρέθηκε να επηρεάζει σημαντικά την ολική κάθαρση αλλά και την ενδοδιαμερισματική κάθαρση  $Q$  ενώ ο περιφερικός όγκος κατανομής βρέθηκε να μεταβάλλεται με την χορήγηση σκευάσματος DRUG 1 ή DRUG 2 οπότε οι παραπάνω σχέσεις εισήχθησαν στο τελικό μοντέλο ως συμμεταβλητές. Τέλος, τα αποτελέσματα του τελικού μοντέλου επικυρώθηκαν με την μέθοδο «Bootstrap», αφού οι τιμές του εμπεριέχονταν στα 90% διαστήματα εμπιστοσύνης που προέκυψαν αλλά και με την δυνατότητα αξιολόγησης του Monolix εφόσον οι προσομοιωμένες τιμές προσεγγίζουν τις υπολογισθείσες του τελικού μοντέλου.

### Συμπεράσματα:

Η εφαρμογή της πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής στα δεδομένα του συγκεκριμένου υπό μελέτη πληθυσμού οδήγησε στην ανάπτυξη ενός αξιόπιστου πληθυσμιακού φαρμακοκινητικού μοντέλου που περιγράφει ικανοποιητικά την φαρμακοκινητική του ανενεργού μεταβολίτη της κλοπιδογρέλης. Σημαντική διατομική μεταβλητότητα βρέθηκε στην πλειονότητα των φαρμακοκινητικών παραμέτρων με εξαίρεση την ενδοδιαμερισματική κάθαρση  $Q$ , η οποία ενδεχομένως να οφείλεται σε παρουσία συννοσηροτήτων. Ισχυρή συσχέτιση εντοπίστηκε μεταξύ του κεντρικού και περιφερικού φαινομένου όγκου κατανομής ( $V_1$  και  $V_2$ ) με τη σταθερά πρωτοταξικής απορρόφησης  $k_a$  αλλά και μεταξύ των δύο φαινομένων όγκων κατανομής. Η ύπαρξη αλληλίου CYP2C19 (GENOTYPE 1) βρέθηκε να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ολική και ενδοδιαμερισματική κάθαρση  $Cl$  και  $Q$  ενώ η χορήγηση διαφορετικού βιοισοδύναμου σκευάσματος Clovelen (DRUG 1) και Grepid (DRUG 2) να μεταβάλλει σε σημαντικό βαθμό τον περιφερικό όγκο κατανομής  $V_2$  επηρεάζοντας πιθανόν τις χορηγήσεις δόσεων εφόδου. Η περαιτέρω έρευνα, η οποία θα εισάγει επιπλέον συννοσηρότητες ως συμμεταβλητές ή θα διαπιστώνει την μεταβολή του όγκου κατανομής ανάλογα με την βιοισοδύναμη μορφή της κλοπιδογρέλης, θα μπορούσε να συμβάλει στην επιβεβαίωση των ευρημάτων της παρούσας εργασίας και στην βελτιστοποίηση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας της κλοπιδογρέλης, μέσω εξαγωγής έμμεσων συμπερασμάτων από τη φαρμακοκινητική του ανενεργού μεταβολίτη.

Λέξεις-Κλειδιά: στεφανιαία νόσος, κλοπιδογρέλη, ανενεργός-καρβοξυλικός μεταβολίτης της κλοπιδογρέλης, πληθυσμιακό φαρμακοκινητικό μοντέλο, μη γραμμική ανάλυση μικτών επιδράσεων, Bootstrap.

### 3. Abstract

#### Introduction:

Clopidogrel is an antiplatelet medicine widely used nowadays in order to prevent cardiovascular event, primarily and secondary, in patients suffering from acute coronary syndrome or with previous history of myocardial infarction. Metabolized extensively from the first-pass effect, about 85% of the absorbed drug is metabolized in an inactive-carboxylic acid derivative and about 2% of the total dose prescribed is metabolized in to an active metabolite who acts as an antiplatelet agent. However, due to significant inter-individual variability, there is, in a significant number of patients, resistance in treatment with clopidogrel which is shown as reduced antiplatelet activity. There are a number of factors contributing in the development of the inter-individual variability, such as demographic factors, drug-drug interactions, presence of comorbidities and genetic polymorphisms, primarily the presence of the CYP2C19 genetic mutation of reduced activity.

#### Objectives:

Considering all the above, the objectives of this study is to investigate the pharmacokinetic profile of the inactive metabolite clopidogrel so as to deduce conclusions regarding clopidogrel's pharmacokinetics in plasma in direct correlation with the genetic profile of patients, their individual characteristics and the different bioequivalence products.

Methods: Clopidogrel's inactive metabolite plasma concentration (C) – time (t) data was obtained from the B Cardiology Clinic of Attikon University Hospital after the initial administration of 75, 300 or 600mg of clopidogrel the first day of the study and 75 mg dose per day for the rest of the study, a total period of 6 months or 1 year. Data were analyzed using a validated HPLC/UV methodology. Nonlinear mixed effect modeling was applied in order to describe the kinetics of inactive metabolite of clopidogrel through the usage of Monolix 2019R2 version. During the analysis, it was conducted the investigation of structural model (number of compartments, investigation of absorption kinetics) and residual error model, the possibility of non-linear elimination and the investigation of the initial estimates of the population parameters. The correlations of pharmacokinetic parameters were assessed for their impact on clopidogrel's inactive metabolite kinetics. Potential variables evaluated as potential covariates were sex, age, weight, height, genetic characteristics (presence of CYP2C19 reduced activity genetic mutation) and different bioequivalence clopidogrel products. Evaluation of the results was based on goodness-of-fit plots, statistical information criteria (-2LL, Akaike and Bayesian information criteria), and the physiological soundness of the derived parameters. The entire computational task was performed in Monolix 2019R2. The final model was tested for its credibility with Visual Predictive Check, the Bootstrap method and the new ability of Final Model's Assessment provided by Monolix.

## Results:

A two-compartment model with first-order absorption and linear elimination and with proportional residual error was found to describe best the C-t profiles of the carboxylic metabolite of clopidogrel. The use of one compartment or three compartments models or the option of non-linear elimination were rejected due to poor fitness in our data. The usage of the same estimation, led to the rejection of the other possible models for the residual error. The following estimates were found for the pharmacokinetic parameters: first-order absorption constant  $k_a:0,538\text{hr}^{-1}$ , total clearance  $Cl:1,19\text{L/hr}$ , apparent volume of distribution of central and peripheral compartment  $V_1$  and  $V_2:18,4$  and  $1250\text{L}$  and between compartments clearance  $Q:42,9\text{L/hr}$ . The majority of the values of population parameters estimated in final model had significant inter-individual variability with the exception of the between compartments clearance. Moreover, strong correlation was found between  $k_a$  and central and peripheral apparent volume of distribution  $V_1$ ,  $V_2$  and between the two apparent volumes of distribution. The presence of CYP2C19 genetic mutation of reduced activity (GENOTYPE 1) was found to contribute significantly to total clearance  $Cl$  and between the compartment clearance  $Q$  and the option of bioequivalent clopidogrel product (DRUG 1 or 2) to peripheral apparent volume of distribution. Consequently, they introduced as covariates in the final model. Finally, the results of the final model were validated by the Bootstrap method, since its values were contained in the 90% confidence intervals and by the new assessment ability provided by Monolix since its simulated values were close to those estimated with the final model.

## Conclusions:

A population pharmacokinetic model was developed for the description of the inactive-carboxylic metabolite of clopidogrel. Significant inter-individual variability was found in the majority of pharmacokinetics parameters, with the sole exception of the between the compartment's clearance  $Q$ , which it may be attributed to the presence of comorbidities. Strong correlation was found between  $k_a$  and central and peripheral apparent volume of distribution  $V_1$ ,  $V_2$  and between the two apparent volumes of distribution. The presence of CYP2C19 genetic mutation of reduced activity (GENOTYPE 1) was found to contribute significantly to total clearance  $Cl$  and between the compartment clearance  $Q$  and the option of bioequivalent clopidogrel product (DRUG 1 or 2) to peripheral apparent volume of distribution, with last one being important as it may affect loading doses. Further research which could introduce comorbidities as additional covariates or confirm the variability of peripheral distribution volume depending on the bioequivalent form of clopidogrel, may contribute in the confirmation of our findings and the optimization of safety and effectiveness of clopidogrel, through the conduction of indirect conclusions from the pharmacokinetics of the inactive metabolite.

Key-Words: coronary disease, clopidogrel, inactive-carboxylic metabolite of clopidogrel, population pharmacokinetic model, nonlinear mixed effect analysis, bootstrap.

## 4. Βιβλιογραφία

- [1] Fabian Sanchis-Gomar, Carme Perez-Quilis, Roman Leischik, and Alejandro Lucia, *Ann Transl. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. Med* 2016 July,4(13): 256.
- [2] Aristofanis Gikas, Vaia Lambadiari, Alexios Sotiropoulos, Demosthenes Panagiotakos, and Stavros Pappas. Prevalence of Major Cardiovascular Risk Factors and Coronary Heart Disease in a Sample of Greek Adults: The Saronikos Study. *Open Cardiovasc Med J.* 2016; 10: 69–80.
- [3] Peter Libby, Pierre Theroux. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation.* 2005; 111:3481-3488.
- [4] John A Ambrose, Manmeet Singh. Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes. *F1000Prime Reports* 2015, 7:08 (doi:10.12703/P7-08).
- [5] Katrin Sangkuhla, Alan R. Shuldiner, Teri E. Kleina and Russ B. Altmana. Platelet aggregation pathway. *Pharmacogenetics and Genomics* 2011, 21:516–521.
- [6] Eugene Braunwald, Dominick Angiolillo, Eric Bates, Peter B. Berger, Deepak Bhatt, Christopher P. Cannon, Mark I. Furman, Paul Gurbel, Alan D. Michelson, Eric Peterson, Stephen Wiviott. The Problem of Persistent Platelet Activation in Acute Coronary Syndromes and Following Percutaneous Coronary Intervention.
- [7] Meinrad Gawaz. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):498-511.
- [8] Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001;89:1092–1103.
- [9] Inflammatory role of platelets in acute coronary syndromes. *Heart* 2001;86:605–606.
- [10] Ault KA, Cannon CP, Mitchell J, McCahan J, Tracy RP, Novotny WF, Reimann JD, Braunwald E, J Am Coll. Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial. *Thrombolysis in Myocardial Infarction. Cardiol.* 1999 Mar;33(3):634-9.
- [11] M.Cattaneo. P2Y12 receptors, structure and function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13 (Suppl. 1): S10–S16.
- [12] Dorsam RT1, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest.* 2004 Feb;113(3):340-5.
- [13] Cattaneo M. New P2Y(12) inhibitors. *Circulation* 2010; 121:171–9.
- [14] Plavix, summary of product characteristics
- [15] Willibald Hochholzer, MD; Dietmar Trenk, PhD; Devine Frundi; Philipp Blanke; Benjamin Fischer; Katharina Andris; Hans-Peter Bestehorn, MD; Heinz Joachim Büttner, MD; Franz-Josef Neumann, MD. Time Dependence of Platelet Inhibition After a 600-mg Loading Dose of Clopidogrel in a Large, Unselected Cohort of Candidates for Percutaneous Coronary Intervention. *Circulation.* 2005 May 24;111(20):2560-4. Epub 2005 Apr 4.
- [16] Semin. Pharmacokinetics of clopidogrel. *Thromb Hemost.* 1999;25 Suppl 2:25-8.

- [17] Karaźniewicz-Łada M<sup>1</sup>, Danielak D, Burchardt P, Kruszyna L, Komosa A, Lesiak M, Głowska F. Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases. *Clin Pharmacokinet*. 2014 Feb;53(2):155-64.
- [18] Shobana Ganesan, Craig Williams, Cheryl L. Maslen & Ganesh Cherala. Clopidogrel variability: role of plasma protein binding alterations. *British Journal of Clinical Pharmacology*, DOI:10.1111/bcp.12017.
- [19] Taubert D<sup>1</sup>, Kastrati A, Harlfinger S, Gorchakova O, Lazar A, von Beckerath N, Schömig A, Schömig E. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost*. 2004 Aug;92(2):311-6
- [20] Taubert D<sup>1</sup>, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, Kastrati A, Schömig A, Schömig E. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Nov;80(5):486-501 Grimberg G.
- [21] Katrin Sangkuhla, Teri E. Kleina, and Russ B. Altmana,b. Clopidogrel pathway. *Pharmacogenet Genomics*. 2010 July; 20(7): 463–465. doi:10.1097/FPC.0b013e3283385420.
- [22] Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, 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 Jan; 38(1):92–9.
- [23] Lee J, Hwang Y, Kang W, Seong SJ, Lim MS, Lee HW, Yim DS, Sohn DR, Han S, Yoon YR. Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of clopidogrel in Korean healthy volunteers and stroke patients. *J Clin Pharmacol*. 2012 Jul;52(7):985-95. doi: 10.1177/0091270011409228. Epub 2011 May 26.
- [24] Yousef AM, Melhem M, Xue B, Arafat T, Reynolds DK, Van Wart SA. Population pharmacokinetic analysis of clopidogrel in healthy Jordanian subjects with emphasis optimal sampling strategy. *Biopharm Drug Dispos*. 2013 May;34(4):215-26. doi: 10.1002/bdd.1839. Epub 2013 Apr 29.
- [25] Dorota Danielak<sup>1</sup> & Marta Karaźniewicz-Łada & Anna Komosa & Paweł Burchardt & Maciej Lesiak & Łukasz Kruszyna & Agnieszka Graczyk Szuster & Franciszek Głowska. Influence of genetic co-factors on the population pharmacokinetic model for clopidogrel and its active thiol metabolite. *Eur J Clin Pharmacol* (2017) 73:1623–1632.
- [26] <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/24272>
- [27] Zhai Y, Wang L, Yang F, Feng G, Feng S, Cui T, An L, He X. The mechanism and risk factors of clopidogrel-induced liver injury. *Drug Chem Toxicol*. 2016 Oct;39(4):367-74.
- [28] Hypersensitivity reactions to clopidogrel – UpToDate
- [29] Joseph A. Delaney MSc, Lucie Opatrny MD MSc, James M. Brophy MD PhD, Samy Suissa PhD. Drug–drug interactions between antithrombotic medications and the risk of gastrointestinal bleeding

- [30] Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2001 Aug 16;345(7):494-502
- [31] Diener HC<sup>1</sup>, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, Leys D, Matias-Guiu J, Rupprecht HJ; MATCH investigators. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004 Jul 24-30;364(9431):331-7.
- [32] Deepak L. Bhatt, M.D., Keith A.A. Fox, M.B., Ch.B., Werner Hacke, M.D., Peter B. Berger, M.D., Henry R. Black, M.D., William E. Boden, M.D., Patrice Cacoub, M.D., Eric A. Cohen, M.D., Mark A. Creager, M.D., J. Donald Easton, M.D., Marcus D. Flather, M.D., Steven M. Haffner, M.D., Christian W. Hamm, M.D., Graeme J. Hankey, M.D., S. Claiborne Johnston, M.D., Koon-Hou Mak, M.D., Jean-Louis Mas, M.D., Gilles Montalescot, M.D., Ph.D., Thomas A. Pearson, M.D., P. Gabriel Steg, M.D., Steven R. Steinhubl, M.D., Michael A. Weber, M.D., Danielle M. Brennan, M.S., Liz Fabry-Ribaudo, M.S.N., R.N., Joan Booth, R.N., and Eric J. Topol, M.D. for the CHARISMA Investigators. Clopidogrel and Aspirin versus Aspirin Alone for the Prevention of Atherothrombotic Events. *N Engl J Med* 2006; 354:1706-1717 April 20, 2006 DOI: 10.1056/NEJMoa060989.
- [33] Kristensen KE, Zhu HJ, Wang X, Gislason GH, Torp-Pedersen C, Rasmussen HB, Markowitz JS, Hansen PR. Clopidogrel bioactivation and risk of bleeding in patients cotreated with angiotensin-converting enzyme inhibitors after myocardial infarction: a proof-of-concept study. *Clin Pharmacol Ther*. 2014 Dec;96(6):713-22.
- [34] Matti K. Itkonen, Aleksi Tornio, Outi Lapatto-Reiniluoto<sup>1</sup>, Mikko Neuvonen<sup>1</sup>, Pertti J. Neuvonen, Mikko Niemi<sup>1</sup> and Janne T. Backman. Clopidogrel Increases Dasabuvir Exposure With or Without Ritonavir, and Ritonavir Inhibits the Bioactivation of Clopidogrel.
- [35] Agergaard K, Mau-Sørensen M, Stage TB, Jørgensen TL, Hassel RE, Steffensen KD, Pedersen JW, Milo M, Poulsen SH, Pottgård A, Hallas J, Brøsen K, Bergmann TK. Clopidogrel-Paclitaxel Drug-Drug Interaction: A Pharmacoepidemiologic Study. *Clin Pharmacol Ther*. 2017 Sep;102(3):547-553.
- [36] Judge HM, Patil SB, Buckland RJ, Jakubowski JA, Storey RF. Potentiation of clopidogrel active metabolite formation by rifampicin leads to greater P2Y<sub>12</sub> receptor blockade and inhibition of platelet aggregation after clopidogrel. *J Thromb Haemost*. 2010 Aug;8(8):1820-7.
- [37] Hobl EL, Stimpfl T, Ebner J, Schoergenhofer C, Derhaschnig U, Sunder-Plassmann R, Jilma-Stohlawetz P, Mannhalter C, Posch M<sup>4</sup>, Jilma B. Morphine decreases clopidogrel concentrations and effects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Feb 25;63(7):630-635.
- [38] Itkonen MK, Tornio A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Clopidogrel Markedly Increases Plasma Concentrations of CYP2C8 Substrate Pioglitazone. *Drug Metab Dispos*. 2016 Aug;44(8):1364-71.
- [39] Sheng-Wen Wang S, Tsai SS, Hsu PC, Yang CY, Wu DC. Am. Concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors or cimetidine after acute myocardial infarction would increase the risk of re-infarction. *J Gastroenterol*. 2009 Dec;104(12):3116-7

- [40] Wu CY1, Chan FK, Wu MS, Kuo KN, Wang CB, Tsao CR, Lin JT. Histamine2-receptor antagonists are an alternative to proton pump inhibitor in patients receiving clopidogrel. *Gastroenterology*. 2010 Oct;139(4):1165-71.
- [41] Farid NA1, Payne CD, Small DS, Winters KJ, Ernest CS 2nd, Brandt JT, Darstein C, Jakubowski JA, Salazar DE. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 May;81(5):735-41. Epub 2007 Mar 14.
- [42] Plavix (Clopidogrel hydrogen sulphate). Sanofi-aventis.UK Summary of product characteristics,May 2011
- [43] Plavix (Clopidogrel bisulphate). Bristol-Myers Squibb/Sanofi Pharmaceuticals Partnership.US Prescribing information,December 2011.
- [44] FDA reminder to avoid concomitant use of Plavix(clopidogrel) and omeprazole. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm231161.htm>(accessed 06/11/12)
- [45] Medicines Healthcare Products Regulatory Agency and the Commission on Human Medicines. Clopidogrel and proton pump inhibitors: interaction-clarification. *Drug safety Update*(2009) 3,8.
- [46] EMEA. Interaction between clopidogrel and proton pump inhibitors. CHMP updates warning for clopidogrel-containing medicines.London,17 March 2010. [://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Plavix/17494810en.pdf](http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Plavix/17494810en.pdf) (accessed 06/11/12).
- [47] Hirsh-Rokach B, Spectre G, Shai E, Lotan A, Ritter A, Al-Aieshy F, Malmström RE, Varon D, Alcalai R. Differential impact of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet response to clopidogrel: a randomized, double-blind, crossover trial. *Pharmacotherapy*. 2015 Feb;35(2):140-7.
- [48] Jeong YH1, Cho JH, Kang MK, Koh JS, Kim IS, Park Y, Hwang SJ, Kwak CH, Hwang JY. Smoking at least 10 cigarettes per day increases platelet inhibition by clopidogrel in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Thromb Res*. 2010 Oct;126(4): e334-8.
- [49] Bliden KP1, Dichiaro J, Lawal L, Singla A, Antonino MJ, Baker BA, Bailey WL, Tantry US, Gurbel PA. The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Aug 12;52(7):531-3
- [50] Gremmel T1, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Smoking promotes clopidogrel-mediated platelet inhibition in patients receiving dual antiplatelet therapy. *Thromb Res*. 2009 Nov;124(5):588-91.
- [51] Motovska Z1, Widimsky P, Petr R, Bilkova D, Marinov I, Simek S, Kala P; PRAGUE-8 Study Investigators. Factors influencing clopidogrel efficacy in patients with stable coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary intervention: statin's advantage and the smoking "paradox". *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009 May;53(5):368-72.
- [52] Holmberg MT, Tornio A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Backman JT, Niemi M. Grapefruit juice inhibits the metabolic activation of clopidogrel. *Clin Pharmacol Ther*. 2014 Mar;95(3):307-13.
- [53] Nalyaka Sambu, and Nick Curzen. Monitoring the effectiveness of antiplatelet therapy: opportunities and limitations. *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Oct; 72(4): 683–696.

- [54] Samant, XL Jiang, LA Peletier, AR Shuldiner, RB Horenstein, JP Lewis, LJ Lesko and S Schmidt. Identifying Clinically Relevant Sources of Variability: The Clopidogrel Challenge.
- [55] Clopidogrel resistance and clopidogrel treatment- UpToDate
- [56] Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation*. 2003 Jun 17;107(23):2908-13.
- [57] Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA*. 2009 Aug 26; 302(8):849–57.
- [58] Frelinger AL 3rd, Bhatt DL, Lee RD, Mulford DJ, Wu J, Nudurupati S, et al. Clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics vary widely despite exclusion or control of polymorphisms (CYP2C19, ABCB1, PON1), noncompliance, diet, smoking, co-medications (including proton pump inhibitors), and pre-existent variability in platelet function. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Feb 26; 61(8):872–9.
- [59] Hochholzer W, Trenk D, Fromm MF, Valina CM, Stratz C, Bestehorn HP, et al. Impact of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and of major demographic characteristics on residual platelet function after loading and maintenance treatment with clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jun 1; 55(22):2427–34.
- [60] Boggon R, van Staa TP, Timmis A, Hemingway H, Ray KK, Begg A, et al. Clopidogrel discontinuation after acute coronary syndromes: frequency, predictors and associations with death and myocardial infarction--a hospital registry-primary care linked cohort (MINAP-GPRD). *Eur Heart J*. 2011 Oct; 32(19):2376–86.
- [61] Carlquist JF, Knight S, Horne BD, Huntinghouse JA, Rollo JS, Muhlestein JB, et al. Cardiovascular risk among patients on clopidogrel anti-platelet therapy after placement of drug-eluting stents is modified by genetic variants in both the CYP2C19 and ABCB1 genes. *Thromb Haemost*. 2013 Apr 8; 109(4):744–54.
- [62] Cay S, Cagirci G, Aydogdu S, Balbay Y, Sen N, Maden O, et al. Safety of clopidogrel in older patients: a nonrandomized, parallel-group, controlled, two-centre study. *Drugs & aging*. 2011 Feb 1; 28(2):119–29.
- [63] Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA*. 2009 Aug 26; 302(8):849–57.
- [64] Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Barrera Ramirez C, Sabate M, Fernandez C, et al. Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting: should clopidogrel loading-dose be weight adjusted? *J Invasive Cardiol*. 2004 Apr; 16(4):169–74.
- [65] Brill MJ, Diepstraten J, van Rongen A, van Kralingen S, van den Anker JN, Knibbe CA. Impact of obesity on drug metabolism and elimination in adults and children. *Clinical pharmacokinetics*. 2012 May 1; 51(5):277–304.



- [66] Jernas M, Olsson B, Arner P, Jacobson P, Sjostrom L, Walley A, et al. Regulation of carboxylesterase 1 (CES1) in human adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009 May 22; 383(1):63–7.
- [67] Nagashima S, Yagyu H, Takahashi N, Kurashina T, Takahashi M, Tsuchita T, et al. Depot-specific expression of lipolytic genes in human adipose tissues--association among CES1 expression, triglyceride lipase activity and adiposity. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2011; 18(3):190–9.
- [68] Martis S, Peter I, Hulot JS, Kornreich R, Desnick RJ, Scott SA. Multi-ethnic distribution of clinically relevant CYP2C genotypes and haplotypes. *The pharmacogenomics journal*. 2012 Apr 10.
- [69] Hasan MS, Basri HB, Hin LP, Stanslas J. Genetic polymorphisms and drug interactions leading to clopidogrel resistance: why the Asian population requires special attention. *The International journal of neuroscience*. 2013 Mar; 123(3):143–54.
- [70] Su J, Xu J, Li X, Zhang H, Hu J, Fang R, et al. ABCB1 C3435T polymorphism and response to clopidogrel treatment in coronary artery disease (CAD) patients: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46366.
- [71] Zhu HJ, Wang X, Gawronski BE, Brinda BJ, Angiolillo DJ, Markowitz JS. Carboxylesterase 1 as a determinant of clopidogrel metabolism and activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013 Mar; 344(3):665–72.
- [72] Lewis JP, Horenstein RB, Ryan K, O'Connell JR, Gibson Q, Mitchell BD, et al. The functional G143E variant of carboxylesterase 1 is associated with increased clopidogrel active metabolite levels and greater clopidogrel response. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Jan; 23(1):1–8.
- [73] Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS 2nd, et al. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost*. 2007 Dec; 5(12):2429–36.
- [74] Horenstein RB, Madabushi R, Zineh I, Yerges-Armstrong LM, Peer CJ, Schuck RN, et al. Effectiveness of clopidogrel dose escalation to normalize active metabolite exposure and antiplatelet effects in CYP2C19 poor metabolizers. *J Clin Pharmacol*. 2014 Apr 7.
- [75] Gong IY, Crown N, Suen CM, Schwarz UI, Dresser GK, Knauer MJ, et al. Clarifying the importance of CYP2C19 and PON1 in the mechanism of clopidogrel bioactivation and in vivo antiplatelet response. *Eur Heart J*. 2012 Feb 27.
- [76] Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomas M, et al. Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. *Heart*. 2012 Jan; 98(2):100–8.
- [77] Sorich MJ, Polasek TM, Wiese MD. Challenges and Limitations in the Interpretation of Systematic Reviews: Making Sense of Clopidogrel and CYP2C19 Pharmacogenetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2013 May 13.

- [78] Mega JL, Simon T, Collet JP, Anderson JL, Antman EM, Bliden K, 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 Oct 27; 304(16):1821–30.
- [79] Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhauser C, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med*. 2011 Jan; 17(1):110–6.
- [80] Ohbuchi M, Noguchi K, Kawamura A, Usui T. Different effects of proton pump inhibitors and famotidine on the clopidogrel metabolic activation by recombinant CYP2B6, CYP2C19 and CYP3A4. *Xenobiotica*. 2012 Jul; 42(7):633–40.
- [81] Angiolillo DJ, Gibson CM, Cheng S, Ollier C, Nicolas O, Bergougnan L, et al. Differential effects of omeprazole and pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy subjects: randomized, placebo-controlled, crossover comparison studies. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Jan; 89(1):65–74.
- [82] Frelinger AL 3rd, Lee RD, Mulford DJ, Wu J, Nudurupati S, Nigam A, et al. A randomized, 2-period, crossover design study to assess the effects of dexlansoprazole, lansoprazole, esomeprazole, and omeprazole on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel in healthy volunteers. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Apr 3; 59(14):1304–11.
- [83] Fontes-Carvalho R, Albuquerque A, Araujo C, Pimentel-Nunes P, Ribeiro VG. Omeprazole, but not pantoprazole, reduces the antiplatelet effect of clopidogrel: a randomized clinical crossover trial in patients after myocardial infarction evaluating the clopidogrel-PPIs drug interaction. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011 May; 23(5):396–404.
- [84] Furuta T, Iwaki T, Umemura K. Influences of different proton pump inhibitors on the anti-platelet function of clopidogrel in relation to CYP2C19 genotypes. *Br J Clin Pharmacol*. 2010 Sep; 70(3):383–92.
- [85] FDA. PLAVIX (clopidogrel bisulfate) tablets Labeling Revision. 2011. [cited 2013 08/04];[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/020839s0551bl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/020839s0551bl.pdf)
- [86] Focks JJ, Brouwer MA, van Oijen MG, Lanas A, Bhatt DL, Verheugt FW. Concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors: impact on platelet function and clinical outcome- a systematic review. *Heart*. 2013 Apr; 99(8):520–7.
- [87] Siller-Matula JM, Jilma B, Schror K, Christ G, Huber K. Effect of proton pump inhibitors on clinical outcome in patients treated with clopidogrel: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2010 Dec; 8(12):2624–41.
- [88] Gerson LB, McMahon D, Olkin I, Stave C, Rockson SG. Lack of significant interactions between clopidogrel and proton pump inhibitor therapy: meta-analysis of existing literature. *Digestive diseases and sciences*. 2012 May; 57(5):1304–13.
- [89] Smith SM, Judge HM, Peters G, Storey RF. Multiple antiplatelet effects of clopidogrel are not modulated by statin type in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Platelets*. 2004 Dec; 15(8):465–74.
- [90] Serebruany VL, Midei MG, Malinin AI, Oshrine BR, Lowry DR, Sane DC, et al. Absence of interaction between atorvastatin or other statins and clopidogrel: results from the interaction study. *Arch Intern Med*. 2004 Oct 11; 164(18):2051–7.

- [91] Sarafoff N, Neumann L, Morath T, Bernlochner I, Mehilli J, Schomig A, et al. Lack of impact of calcium-channel blockers on the pharmacodynamic effect and the clinical efficacy of clopidogrel after drug-eluting stenting. *Am Heart J*. 2011 Mar; 161(3):605–10.
- [92] Good CW, Steinhubl SR, Brennan DM, Lincoff AM, Topol EJ, Berger PB. Is there a clinically significant interaction between calcium channel antagonists and clopidogrel? results from the Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation (CREDO) trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012 Feb 1; 5(1):77–81.
- [93] Delavenne X, Magnin M, Basset T, Piot M, Mallouk N, Ressenkoff D, et al. Investigation of drug-drug interactions between clopidogrel and fluoxetine. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2013 Feb 17.
- [94] Lau WC, Welch TD, Shields T, Rubenfire M, Tantry US, Gurbel PA. The effect of St John's Wort on the pharmacodynamic response of clopidogrel in hyporesponsive volunteers and patients: increased platelet inhibition by enhancement of CYP3A4 metabolic activity. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 Jan; 57(1):86–93.
- [95] Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Diabetes and antiplatelet therapy in acute coronary syndrome. *Circulation*. 2011 Feb 22; 123(7):798–813.
- [96] Erlinge D, Varenhorst C, Braun OO, James S, Winters KJ, Jakubowski JA, et al. Patients with poor responsiveness to thienopyridine treatment or with diabetes have lower levels of circulating active metabolite, but their platelets respond normally to active metabolite added ex vivo. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Dec 9; 52(24):1968–77.
- [97] Laura Dean, MD. Clopidogrel Therapy and CYP2C19 Genotype. *Medical Genetics Summaries*. National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
- [98] Gurbel PA, Tantry US. An initial experiment with personalized antiplatelet therapy: the GRAVITAS trial. *JAMA* 2011; 305:1136.
- [99] Patti G, Colonna G, Pasceri V, Pepe LL, Montinaro A, Di Sciascio G. Randomized trial of high loading dose of clopidogrel for reduction of periprocedural myocardial infarction in patients undergoing coronary intervention: results from the ARMYDA-2 (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty) study. *Circulation*. 2005;111(16):2099. Epub 2005 Mar 6.
- [100] Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, Boyer C, Panagides D, Wittenberg O, Simeoni MC, Barragan P, Dignat-George F, Paganelli F. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(14):1404.
- [101] Tang YD, Wang W, Yang M, et al. Randomized Comparisons of Double-Dose Clopidogrel or Adjunctive Cilostazol Versus Standard Dual Antiplatelet in Patients With High Posttreatment Platelet Reactivity: Results of the CREATIVE Trial. *Circulation* 2018; 137:2231.
- [102] Mega JL, Hochholzer W, Frelinger AL 3rd, et al. Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *JAMA* 2011; 306:2221.

- [103] Alexopoulos D, Dimitropoulos G, Davlouros P, Xanthopoulou I, Kassimis G, Stavrou EF, Hahalis G, Athanassiadou A. Prasugrel overcomes high on-clopidogrel platelet reactivity post-stenting more effectively than high-dose (150-mg) clopidogrel: the importance of CYP2C19\*2 genotyping. *JACC Cardiovasc Interv.* 2011 Apr;4(4):403-10.
- [104] Roberts JD, Wells GA, Le May MR, Labinaz M, Glover C, Froeschl M, Dick A, Marquis JF, O'Brien E, Goncalves S, Druce I, Stewart A, Gollob MH, So DY. Point-of-care genetic testing for personalisation of antiplatelet treatment (RAPID GENE): a prospective, randomised, proof-of-concept trial. *Lancet.* 2012;379(9827):1705. Epub 2012 Mar 29.
- [105] Orme RC, Parker WAE, Thomas MR, Judge HM, Baster K, Sumaya W, Morgan KP, McMellon HC, Richardson JD, Grech ED, Wheeldon NM, Hall IR, Iqbal J, Barmby D, Gunn JP, Storey RF. Study of Two Dose Regimens of Ticagrelor Compared with Clopidogrel in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention for Stable Coronary Artery Disease (STEEL-PCI). *Circulation.* 2018.
- [106] Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, Boyer C, Panagides D, Wittenberg O, Simeoni MC, Barragan P, Dignat-George F, Paganelli F. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(14):1404.
- [107] Patti G1, Grieco D, Dicuonzo G, Pasceri V, Nusca A, Di Sciascio G. High Versus Standard Clopidogrel Maintenance Dose After Percutaneous Coronary Intervention and Effects on Platelet Inhibition, Endothelial Function, and Inflammation Results of the ARMYDA-150 mg (Antiplatelet Therapy for Reduction of Myocardial Damage During Angioplasty) Randomized Study. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Feb 15;57(7):771-8.
- [108] Collet JP, Hulot JS, Anzaha G, Pena A, Chastre T, Caron C, Silvain J, Cayla G, Bellemain-Appaix A, Vignalou JB, Galier S, Barthélémy O, Beygui F, Gallois V, Montalescot G; CLOVIS-2 Investigators. High doses of clopidogrel to overcome genetic resistance: the randomized crossover CLOVIS-2 (Clopidogrel and Response Variability Investigation Study 2). *JACC Cardiovasc Interv.* 2011 Apr;4(4):392-402.
- [109] Collet JP1, Hulot JS, Pena A, Villard E, Esteve JB, Silvain J, Payot L, Brugier D, Cayla G, Beygui F, Bensimon G, Funck-Brentano C, Montalescot G. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet.* 2009 Jan 24;373(9660):309-17. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61845-0. Epub 2008 Dec 26.
- [110] Jessica L. Mega, MD, MPH; Willibald Hochholzer, MD; Andrew L. Frelinger, PhD; Michael J. Kluk, MD, PhD; Dominick J. Angiolillo, MD; Dean J. Kereiakes, MD; Steven Isserman, MD; William J. Rogers, MD; Christian T. Ruff, MD, MPH; Charles Contant, PhD; Michael J. Pencina, PhD; Benjamin M. Scirica, MD, MPH; Janina A. Longtine, MD, PhD; Alan D. Michelson, MD; Marc S. Sabatine, MD, MPH. Dosing Clopidogrel Based on CYP2C19 Genotype and the Effect on Platelet Reactivity in Patients With Stable Cardiovascular Disease. *JAMA.* 2011;306(20):2221-2228. doi:10.1001/jama.2011.1703
- [111] Matthew P. Doogue and Thomas M. Polasek. The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Ther Adv Drug Saf.* 2013 Feb; 4(1): 5–7.

- [112] Ruiz-Garcia, A., Bermejo, M., Moss, A. and Casabo, V. (2008). Pharmacokinetics in Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), pp.654-690.
- [113] Gerlowski L. and Jain R. Physiologically based pharmacokinetic modeling: principles and applications. *J. Pharm. Sci.* 72:1103-1129, 1983.
- [114] DR Mould and RN Upton. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* (2012) 1, e6.
- [115] DR Mould and RN Upton. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development—Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* (2013) 2, e38.
- [116] W Byon, MK Smith, P Chan, MA Tortorici, S Riley, H Dai, J Dong, A Ruiz-Garcia, K Sweeney and C Cronenberger. Establishing Best Practices and Guidance in Population Modeling: An Experience With an Internal Population Pharmacokinetic Analysis Guidance. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* (2013) 2, e51.
- [117] Bonate PL. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling and simulation. New York: Springer Science+Business Media, Inc.
- [118] Guthery, F., Burnham, K. and Anderson, D. (2003). Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. *The Journal of Wildlife Management*, 67(3), p.655.
- [119] Bhat, H. S.; Kumar, N (2010). "On the derivation of the Bayesian Information Criterion" (PDF). Archived from the original (PDF) on 28 November 2018.
- [120] THT Nguyen, M-S Mouksassi, N Holford, N Al-Huniti, I Freedman, AC Hooker, J John, MO Karlsson, DR Mould ,JJ Perez Ruixo, EL Plan, R Savic, JGC van Hasselt, B Weber, C Zhou, E Comets, and F Mentre. Model Evaluation of Continuous Data Pharmacometric Models: Metrics and Graphics. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* (2017) 6, 87–109.
- [121] Martin Bergstrand, Andrew C. Hooker, Johan E. Wallin, and Mats O. Karlsson. Prediction-Corrected Visual Predictive Checks for Diagnosing Nonlinear Mixed-Effects Models. *The AAPS Journal*, Vol. 13, No. 2, June 2011.
- [122] Efron, B. (2003). Second Thoughts on the Bootstrap. *Statistical Science*, 18(2), pp.135-140.
- [123] Effat Souri, Hassan Jalalizadeh, Abbas Kebriaee-Zadeh, Maral Shekarchi and Afshin Dalvandi. Validated HPLC method for determination of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 20: 1309–1314 (2006).
- [124] Gwilt PR, Nahhas RR, Tracewell WG. The effects of diabetes mellitus on pharmacokinetics and pharmacodynamics in humans. *Clin Pharmacokinet.* 1991 Jun;20(6):477-90.
- [125] Shih-Chieh Chien, Chun-Yen Chen, Chao-Feng Lin, and Hung-I Yeh. Critical appraisal of the role of serum albumin in cardiovascular disease. *Biomark Res.* 2017; 5: 31.
- [126] Oduncu V, Erkol A, Karabay CY, Kurt M, Akgün T, Bulut M, Pala S, Kirma C. The prognostic value of serum albumin levels on admission in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing a primary percutaneous coronary intervention. *Coron Artery Dis.* 2013 Mar;24(2):88-94.

- [127] Klotz U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metab Rev.* 2009;41(2):67-76.
- [128] Kim SD, Kang W, Lee HW, Park DJ, Ahn JH, Kim MJ, Kim EY, Kim SW, Nam HS, Na HJ, Yoon YR. Bioequivalence and tolerability of two clopidogrel salt preparations, besylate and bisulfate: a randomized, open-label, crossover study in healthy Korean male subjects. *Clin Ther.* 2009 Apr;31(4):793-803.
- [129] Arduino A, Mangoni and Elzbieta A, Jarmuzewska. The influence of heart failure on the pharmacokinetics of cardiovascular and non-cardiovascular drugs: a critical appraisal of the evidence. *Br J Clin Pharmacol* (2019) 85 20–36.
- [130] M.E. Tsoumani, I.V. Ntalas, J.A. Goudevenos & A.D. Tselepis. Evaluating the bioequivalence of clopidogrel generic formulations. *Current Medical Research and Opinion* Volume 31, 2015 - Issue 5.
- [131] Tsoumani ME, Kalantzi KI, Dimitriou AA, Ntalas IV, Goudevenos IA, Tselepis AD. Antiplatelet efficacy of long-term treatment with clopidogrel besylate in patients with a history of acute coronary syndrome: comparison with clopidogrel hydrogen sulfate. *Angiology.* 2012 Oct;63(7):547-51.
- [132] Park JY, Kim KA, Ryu JH, Lee GH, Jeon SH, Kim JS. Pharmacokinetics and the antiplatelet effect of a new clopidogrel formulation, clopidogrel besylate, in healthy subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010 Apr;48(4):259-69.

## 5. Παράρτημα

### 5.1. Τίτλος και αριθμός άδειας μελέτης

**ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΣΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ/ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΑ ΜΕ ΒΑΣΗ  
ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ: ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΑ ΓΕΝΟΣΗΜΑ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011: ΚΑ 11ΣΥΝ\_1152**

**ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΧΑΙΡΑΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΕΚΠΑ**

**ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΤΗΣ ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΟΞΕΙΑ  
ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ**

-----  
**ΑΘΗΝΑ 31/05/2013**

## **ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

**Β΄ ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ «ΑΤΤΙΚΟΝ»**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ - ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ**

## 5.2.Περίληψη πρωτοκόλλου μελέτης

<b>ΤΙΤΛΟΣ</b>	Κλινική μελέτη εξατομίκευσης φαρμακοθεραπείας της κλοπιδογρέλης σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία νόσο
<b>ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	Να μελετηθούν οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου που επιτυγχάνονται στο πλάσμα και να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη φαρμακοκινητική της κλοπιδογρέλης στο πλάσμα σε άμεση συσχέτιση με το γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς (μεταβολισμός)
<b>ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	Η μελέτη είναι προοπτική μη τυχαιοποιημένη. Θα συμμετέχουν ασθενείς με συμπτώματα οξείας στεφανιαίας νόσου καθώς και καρδιαγγειακά προβλήματα χρήζοντα θεραπεία με κλοπιδογρέλη
<b>ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Συγκέντρωση κλοπιδογρέλης στο πλάσμα</li> <li>• Βαθμός συγκόλλησης αιμοπεταλίων</li> <li>• Προσδιορισμός RPI (Platelet reactivity index)</li> <li>• Προσδιορισμός VASP</li> <li>• Γονοτύπηση συγκεκριμένων CYP γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του φαρμάκου</li> </ul>
<b>ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΣΘΕΝΩΝ</b>	100 ασθενείς με οξεία στεφανιαία νόσο
<b>ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ</b>	Ασθενείς με στεφανιαία νόσο και αρτηριακή θρόμβωση που εισάγονται για πρώτη φορά στη θεραπεία και συντηρητική αγωγή με κλοπιδογρέλη
<b>ΓΕΝΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΑΠΟ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ</b>	Συγχορήγηση άλλων αντιθρομβωτικών-αντιαιμοπεταλιακών παραγόντων
<b>ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	Καυκάσιοι άνδρες και γυναίκες ηλικίας 20-80 ετών με ιστορικό εμφράγματος του μυοκαρδίου και στεφανιαίας νόσου
<b>ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	24 μήνες
<b>ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</b>	Β' Καρδιολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικών» Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής ΕΚΠΑ
<b>ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΕΣ</b>	Γ. Βαλσαμή, Α. Δοκουμετζίδης
<b>ΚΥΡΙΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ</b>	Ει. Χριστοδούλου



<b>ΤΟΥ ΚΛΙΝΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ</b>	
<b>ΣΥΜΜΕΤΕΧΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ</b>	A. Ζωγραφίδης
<b>ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ</b>	E. Ηλιοδρομίτης
<b>ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ- ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ</b>	Eι. Χριστοδούλου, A. Δοκουμετζίδης
<b>ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ</b>	Εμφάνιση επιπλοκών ή ανεπιθύμητων ενεργειών
<b>ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ</b>	Π. Μαχαίρας
<b>ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ</b>	Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης)