

Гринштейн Ю. И.¹, Косинова А. А.¹, Гринштейн И. Ю.¹, Субботина Т. Н.², Савченко А. А.³

¹ ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

² ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск

³ ФГБНУ ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск

ВОЗМОЖНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ КОРОНАРНОГО ШУНТИРОВАНИЯ

Ключевые слова: коронарное шунтирование, сердечно-сосудистые осложнения, генетические предикторы.

Ссылка для цитирования: Гринштейн Ю. И., Косинова А. А., Гринштейн И. Ю., Субботина Т. Н., Савченко А. А. Возможные генетические предикторы развития сердечно-сосудистых осложнений после коронарного шунтирования. Кардиология. 2018;58(7):77–84.

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучить ассоциацию полиморфизмов генов тромбоцитарных рецепторов и цитохрома P450 (rs2046934, rs1126643, rs5918, rs6065, rs4244285; rs4986893) с сердечно-сосудистыми осложнениями (ССО) у пациентов после коронарного шунтирования (КШ). **Материалы и методы.** В исследование были включены 130 пациентов со стабильной стенокардией II–IV функционального класса. За 5 сут до КШ отменялись антитромбоцитарные препараты. После КШ 69 пациентов получали ацетилсалициловую кислоту – АСК (в дозе 100 мг, кишечнорастворимая форма), 61 – двухкомпонентную антитромбоцитарную терапию (100 мг кишечнорастворимой формы АСК + 75 мг клопидогрела). Средний период наблюдения составил 10,9±5,2 мес. Первичной конечной точкой являлись инфаркт миокарда (ИМ), острое нарушение мозгового кровообращения, смерть от всех причин. Контрольную группу составили 185 доноров. Оценена агрегация тромбоцитов (АТ) с АДФ (5 мкМ) и арахидоновой кислотой (1 мМ) на оптическом агрегометре. Образцы ДНК пациентов проанализированы в целях выявления следующих полиморфизмов: H1/H2 (rs2046934) – у 100 человек; 807C>T (rs1126643) – у 94; 176T>C (rs5918) – у 91; Thr145Met (rs6065) – 114; 681G>A (CYP2C19*2, rs4244285) – у 84; 636G>A (CYP2C19*3, rs4986893) – у 84. **Результаты.** Распространенность генетических вариантов полиморфизмов rs5918, rs6065, rs4244285, rs4986893, rs2046934 у пациентов и доноров статистически значимо не различалась. У доноров чаще встречался аллель Т гена ITGA2: 67,2% против 51,7% (p=0,021). При сравнении уровня АТ до и после КШ в группах пациентов с генотипом СС и общей группой пациентов с генотипами СТ и ТТ различий не выявлено. Носители редкого аллеля гена ITGB3 на 1–3-и сутки после КШ имели более высокие показатели АТ с арахидоновой кислотой. Амплитуда агрегации у носителей редкого аллеля С составила 27,5% против 12,7% в группе пациентов с генотипом ТТ (p<0,05). При анализе функциональной активности тромбоцитов в группах с наличием минорного аллеля по всем остальным анализируемым полиморфизмам по сравнению с соответствующими значениями в группах, несущих распространенный аллель в гомозиготном варианте, статистически значимых различий не выявлено. За период наблюдения зарегистрировано 12 ССО: 6 случаев острого ИМ, 3 – острого нарушения мозгового кровообращения, 3 летальных исхода. У пациентов при наличии комбинации минорных аллелей генов ITGB3+CYP2C19*2 или CYP2C19*2+ITGA2, а также редкой аллели гена CYP2C19*2 ССО встречались чаще, чем у лиц с другими генетическими комбинациями (относительный риск 4 при 95% доверительном интервале от 2,19 до 7,29; p=0,008). **Заключение.** Наличие комбинации минорных аллелей генов ITGB3+CYP2C19*2 или CYP2C19*2+ITGA2, а также редкого аллеля гена CYP2C19*2 является возможным предиктором ССО у пациентов после КШ.

Grinshtein Y. I.¹, Kosinova A. A.¹, Grinshtein I. Y.¹, Subbotina T. N.², Savchenko A. A.³

¹ Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

² Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

³ Scientific Research Institute of medical problems of the North, Krasnoyarsk, Russia

POSSIBLE GENETIC PREDICTORS OF CARDIOVASCULAR COMPLICATIONS AFTER CORONARY ARTERY BYPASS SURGERY

Keywords: coronary artery bypass surgery; cardiovascular events; genetic predictors.

For citation: Grinshtein Y. I., Kosinova A. A., Grinshtein I. Y., Subbotina T. N., Savchenko A. A. Possible Genetic Predictors of Cardiovascular Complications After Coronary Artery Bypass Surgery. Kardiologiya. 2018;58(7):77–84.

SUMMARY

Purpose: to investigate associations of single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs2046934, rs1126643, rs5918, rs6065, rs4244285; rs4986893 with cardiovascular complications (CVC) in patients after CABG. **Materials and Methods.** We enrolled in this study 130 patients with stable functional class II–IV angina. After CABG 69 patients received ASA (100 mg of enteric form), 61 patients received dual antiplatelet therapy (ASA 100 mg + clopidogrel 75 mg). Mean follow up period was 10.9±5.2 months. The primary composite endpoint included all-cause mortality, myocardial infarction (MI), and ischemic stroke. The control group comprised 185 healthy volunteers. Platelet function was assessed using light transmission aggregometry with ADP (5μM) and arachidonic acid (1 mM). The following single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified by real-time PCR: rs2046934 (H1/H2) on *P2RY12* [encoding platelet ADP receptor] (n=100); rs1126643 (C807T, Phe224Phe) on *ITGA2* [encoding collagen receptor] (n=87); rs5918 (176 T→C, Leu33Pro) on *ITGB3* [encoding fibrinogen receptor] (n=91); rs6065 (Thr145Met) on *GP1BA* [encoding platelet receptor for Von Willebrand factor] (n=114); rs4244285 (*2) (n=84), and rs4986893 (*3) (n=83) on *CYP2C19* [encoding cytochrome P450 activity]. **Results.** The prevalence of rs5918, rs6065, rs4244285, rs4986893, rs2046934 did not differ significantly between patients and healthy volunteers. The mutant allele (T) of *ITGA2* was detected more often in healthy volunteers: 67.2% vs 51.7% (p=0.021). Before and after CABG there was no significant difference in platelet aggregation between carriers and non-carriers of the mutant *ITGA2* allele. Number of CVCs registered during follow-up was 12: 3 strokes, 6 MIs, 3 deaths. Patients with composite mutant alleles of *ITGB3*+*CYP2C19**2 or *CYP2C19**2+*ITGA2*, and with the mutant allele (*2) of *CYP2C19* met end points more often than patients with other gene combinations (wild type homozygotes, presence of one mutant allele of *ITGB3* or *ITGA2*, the composite of mutant alleles of *ITGB3*+*ITGA2* or *ITGB3*+*ITGA2*+ *CYP2C19**2) (hazard ratio 4.0, 95% confidence interval 2,19–7.29, p=0.008). Carriers of *ITGB3* mutant allele showed higher AA-induced platelet reactivity on the 1st-3rd day after CABG. Amplitude of platelet aggregation in carriers of mutant allele was 27.5% vs 12.7% in wild type (p=0.016). No differences in platelet reactivity among carriers of other mentioned mutant alleles and wild types were observed. **Conclusion.** Carriage of the combination of mutant alleles *ITGB3*+*CYP2C19**2 or *CYP2C19**2+*ITGA2* or *CYP2C19**2 is possible predictor of CVC in patients after CABG.

Тромбоциты в большой степени вовлечены в атеросклероз и острый тромбоз. Фенотип тромбоцита имеет широкую вариабельность, обусловленную наследственными отличиями реактивности, их количества, размеров клеток и функций мембранных рецепторов тромбоцитов [1]. Но в исследованиях с участием сибсов, близнецов, родственников с семейным анамнезом ишемической болезни сердца (ИБС) индивидуальный ответ тромбоцитов высоко воспроизводим независимо от выбранного агониста или методики оценки агрегационной активности. Эти данные убедительно свидетельствуют о высоком уровне наследуемости функциональной активности тромбоцитов, что побуждает к проведению генетических исследований изменчивости функции тромбоцита [2, 3]. По данным некоторых исследований, до 30% вариабельности функциональной активности тромбоцитов объясняется генетическим наследованием [4].

Основными рецепторами тромбоцита, участвующими в активации клетки и формировании тромба, являются рецепторы фактора Виллебранда, АДФ-рецепторы, рецепторы к коллагену, рецепторы к фибриногену.

Генетические исследования рассматривают полиморфизмы генов перечисленных рецепторов для изучения ассоциации с острым коронарным синдромом и другими заболеваниями сердечно-сосудистой системы, атеротромботическими осложнениями, но практически нет данных об ассоциации полиморфизмов тромбоцитарных рецепторов с ишемическими исходами после коронарного шунтирования (КШ) [5, 6].

Как известно, носительство генетического полиморфизма может проявиться фенотипически, а может

остаться непроявленным признаком. В случае с атеротромбозом различные факторы риска могут способствовать проявлению признака, за который ответственен тот или иной полиморфизм.

Одним из факторов, провоцирующих сосудистый тромбоз, может быть КШ; с одной стороны, это оперативное лечение, направленное на улучшение качества жизни и прогноза пациента, с другой стороны, – большой стресс для организма, системы гемостаза. Во время искусственного кровообращения разрушаются клетки, в кровь выходят активные вещества – стимуляторы агрегации и адгезии тромбоцитов, межклеточного взаимодействия, воспалительной реакции эндотелия и системного воспаления, в кровоток выходят молодые, более активные клетки крови, в частности, тромбоциты [7, 8]. Все эти события происходят на фоне атеросклероза – системного процесса. Известно также, что после КШ возрастает риск резистентности к антитромбоцитарной терапии – АТТ (ацетилсалициловой кислоте – АСК и клопидогрелу) – препаратам вторичной профилактики тромботических осложнений [9]. Следовательно, для выявления ассоциации сердечно-сосудистых осложнений (ССО) также могут быть рассмотрены генетические полиморфизмы цитохрома P450 – фермента, превращающего пролекарство клопидогрел в его активный метаболит в печени.

Целью исследования было изучение ассоциации полиморфизмов H1/H2 (rs2046934), 807C>T (rs1126643), 176T>C (rs5918), Thr145Met (rs6065), 681G>A (rs4244285), 636G>A (rs4986893) в генах АДФ-рецептора тромбоцитов (*P2RY12*), рецептора к коллагену (*ITGA2*), рецептора к фибриногену (*ITGB3*), тромбоцитарного рецеп-

тора фактора Виллебранда (GP1BA) и цитохрома P450 (CYP2C19) с ССО у пациентов после КШ.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии Красноярск. В исследование были включены 130 пациентов (102 мужчины и 28 женщин) со стенокардией напряжения II–IV функционального класса (ФК), согласно Канадской классификации.

Критерии включения в исследование: стабильная стенокардия II–IV ФК, атеросклероз коронарных артерий (КА), подтвержденный результатами коронарографии, подписанное информированное согласие. Критерии исключения: почечная недостаточность, язвенная болезнь желудка и/или двенадцатиперстной кишки в стадии обострения, непереносимость АСК, клопидогрела.

В основной группе из 130 пациентов II ФК имели 74 (57%) пациента со стабильной стенокардией, III ФК – 53 (40,7%), IV ФК – 3 (2,3%). Возраст пациентов составлял от 36 до 78 лет (средний возраст $62 \pm 8,3$ года). Уровень холестерина составил $5,05 \pm 1,55$ ммоль/л, холестерина липопротеинов низкой плотности – $3,48 \pm 1,49$ ммоль/л. Активными курильщиками были 30,5% пациентов, у 19,4% имелся сахарный диабет, у 31,8% – ожирение. Пациентам выполняли аорто/маммарокоронарное шунтирование: 113 (87%) – в условиях искусственного кровообращения, 17 (13%) – на работающем сердце.

В группу контроля вошли 185 здоровых доноров, средний возраст которых составил $44,2 \pm 9,8$ года.

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования одобрен этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого. Всеми пациентами и донорами было подписано информированное согласие об участии в исследовании.

Всем пациентам во время госпитализации была назначена терапия согласно существующим рекомендациям Российского кардиологического общества. Пациенты прекращали прием АТТ до КШ минимум за 5 сут. В послеоперационном периоде с 1-х суток всем пациентам назначали АСК кишечнорастворимой формы в дозе 100 мг/сут, 69 пациентов получали терапию только АСК, 61 пациент – двухкомпонентную АТТ (ДАТТ): АСК + клопидогрел в дозе 75 мг/сут.

Агрегационную активность тромбоцитов определяли с индукторами АДФ (5 мкМ) и арахидоновой кислотой (1 мМ). В качестве материала исследования использовали периферическую кровь, полученную путем пункции локтевой вены. Кровь, предназначенную для исследования агрегации тромбоцитов (АТ), забирали в пробирку с 3,8%

цитратом натрия в соотношении крови и реагента 9:1. Для генетических исследований венозную кровь забирали в пробирку, в которой в качестве антикоагулянта использовалась ЭДТА-К2 в концентрации 1,2 мг/мл крови. Образцы крови брали с помощью закрытой вакуумной системы Vac-Tube в количестве 10 мл. Исследование АТ выполняли на оптическом агрегометре CHRONO-LOG 490 с использованием индукторов АДФ в концентрации 5 мкМ и арахидоновой кислоты 1 мМ до КШ, на 1–3-и сутки и на 8–10-е сутки после оперативного лечения.

Генетический анализ проводили на базе Красноярского филиала ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России. ДНК выделяли с использованием реагента ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь. Затем с образцами выделенной ДНК проводили полимеразную цепную реакцию с использованием комплектов реагентов для амплификации SNP-экспресс и SNP-экспресс-PB с электрофоретической детекцией продуктов амплификации и детекцией результатов в реальном времени соответственно. Образцы ДНК были проанализированы на наличие полиморфизмов в генах, кодирующих компоненты тромбоцитарных рецепторов, опосредующих процессы адгезии и агрегации тромбоцитов: полиморфизм гена АДФ-рецептора тромбоцитов P2RY12 (H1/H2 (744T/744C), rs2046934); гена рецептора к коллагену ITGA2 (807 C>T, rs1126643); гена рецептора к фибриногену ITGB3 (176 T>C, rs5918) и гена тромбоцитарного рецептора фактора Виллебранда GP1BA (Thr145Met, rs6065). Кроме того, исследовали полиморфизмы гена цитохрома P450 CYP2C19*2 (681G>A, rs4244285) и CYP2C19*3 (636G>A, rs4986893).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics версия 20.0. Для количественных показателей вычисляли следующие показатели описательной статистики: среднее значение, стандартное отклонение. Данные представлены как $M \pm \sigma$, где M – средняя арифметическая величина, σ – ошибка среднего. Для качественных показателей вычисляли следующие показатели: число наблюдений и доля (%) от общего числа пациентов или от числа пациентов в соответствующей подгруппе. Достоверность различий между двумя независимыми выборками оценивали по критерию Манна–Уитни. Для категориальных переменных применяли тест χ^2 . При частоте признака 5 и менее использовали точный критерий Фишера. Для оценки риска развития ССО при наличии редкой аллели изучаемых полиморфизмов производили оценку отношения шансов (ОШ) в таблицах сопряженности 2×2 с расчетом доверительных интервалов (ДИ) по стандартной методике с помощью четырехпольной таблицы. Формула расчета:

$$ОШ = (a/b)/(c/d),$$

где a – частота аллели (генотипа) в выборке больных, b – частота аллели (генотипа) в контрольной группе, c – сумма

частот остальных аллелей (генотипов) в выборке, d – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке. При невозможности расчета ОШ использовали расчет относительного риска (ОР) развития конечной точки. ОШ и ОР считали статистически значимыми, если их 95% ДИ не включал значение 1,0. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Результаты генотипирования образцов ДНК доноров и пациентов с ИБС представлены в табл. 1. При сравнении распространенности различных вариантов генотипов полиморфизмов rs5918, rs6065, rs2046934, rs4244285 и rs4986893 в группе пациентов с ИБС по сравнению с соответствующими данными в группе контроля не выявлено статистически значимых различий. В группах пациентов с ИБС и контроля не выявлено ни одного случая присутствия минорного аллеля А полиморфизма rs4986893 гена цитохрома P450 – CYP2C19*3, в связи с чем из дальнейшего сравнительного анализа данный полиморфизм был исключен. Следует отметить, что по данным литературы, частота генотипов по CYP2C19, соответствующих медленным метаболитам (носительство аллельных вариантов CYP2C19*2 и CYP2C19*3), в российской популяции составляет 11,4%, и это сопоставимо с европейскими этническими группами [10], но у российских пациентов с ИБС генотипы CYP2C19, связанные с медленным метаболизмом, могут встречаться с частотой до 27,3% [11]. В нашем же случае генотипы CYP2C19,

связанные с медленным метаболизмом, выявлялись в 17,9% случаев, т. е. чаще, чем в общей популяции, и реже, чем среди пациентов с ИБС в других регионах.

Чаще в группе здоровых доноров встречается редкий аллель гена ITGA2 (Т) полиморфизма rs1126643. Генотип СС имели 46,8% пациентов с ИБС, гетерозиготный генотип СТ – 44,7% и генотип ТТ – 8,5%, в группе контроля генотип СС имели 32,7%, гетерозиготный генотип СТ – 53,2% и генотип ТТ – 14,1% ($p = 0,025$). Ген ITGA2 кодирует аминокислотную последовательность α_2 -субъединицы интегринов – рецепторов коллагена. При этом аллель 807С ассоциирован с низким количеством рецепторов на тромбоцитах, а аллель 807Т – с высокой экспрессией гена [12].

По данным литературы, распространенность аллельных вариантов указанного полиморфизма составляет среди европейской популяции: СС – 26,5%, СТ – 59,8%, ТТ – 13,7% [13], что соответствует распределению в группе контроля в нашем исследовании.

При сравнении агрегационной активности с индукторами АДФ (5 мкМ) и арахидоновой кислотой (1 мМ) не было найдено отличий по полиморфизму rs1126643 между группой пациентов с генотипом СС и группой пациентов с генотипами СТ и ТТ как до, так и на 1–3-и и 8–10-е сутки после КШ. Амплитуда агрегации с АДФ до КШ, на 1–3-и и 8–10-е сутки после КШ для носителей редкого аллеля Т полиморфизма rs1126643 против носителей распространенного аллеля в гомозиготном состоянии составила $48,8 \pm 18,6$; 62 ± 13 и $49,8 \pm 23,2\%$ против $51,5 \pm 22,3$; $57,4 \pm 14,6$ и $45,8 \pm 22,9$

Таблица 1. Распространенность аллельных вариантов генов у пациентов с ИБС и в контрольной группе

Ген	Генотип		Распространенность аллельных вариантов генов, абс. (%)		p
			в группе пациентов с ИБС (n=130)	в группе контроля (n=185)	
ITGB3, 176 T>C, rs5918	n=91	TT	58 (63,5)	115 (66,1)	0,81
		TC	31 (33,8)	54 (31)	–
		CC	2 (2,7)	5 (2,9)	–
GP1BA, Thr145Met, rs6065	n=114	CC	80 (70,1)	133 (76,4)	0,18
		CT	30 (26,3)	38 (21,8)	–
		TT	4 (3,5)	3 (1,7)	–
ITGA2, 807 C>T, rs1126643	n=94	CC	44 (46,8)	56 (32,7)	0,025
		CT	42 (44,7)	91 (53,2)	–
		TT	8 (8,5)	24 (14,1)	–
P2RY12, rs2046934	n=100	H1H1	83 (83)	128 (71,1)	0,77
		H1H2	19 (19)	43 (23,9)	–
		H2H2	8 (8)	9 (5)	–
CYP2C19*2, 681G>A, rs4244285	n=84	*1/*1	69 (82,1)	23 (76,7)	0,42
		*1/*2	14 (16,7)	6 (20)	–
		*2/*2	1 (1,2)	1 (3,3)	–
CYP2C19*3, 636G>A, rs4986893	n=83	*1/*1	83 (100)	30 (100)	1
		*1/*3	0	0	–
		*3/*3	0	0	–

H1 – гаплотип 744Т, нет, 52G; H2 – гаплотип 139Т, 744С, ins801A, 52Т; CYP2C19*2: вариант *1/*1 – генотип GG, *1/*2 – генотип GA, *2/*2 – генотип AA; CYP2C19*3: *1/*1 – генотип GG, *1/*3 – генотип GA, *3/*3 – генотип AA. Здесь и в табл. 2: ИБС – ишемическая болезнь сердца.

($p=0,497$; $0,441$ и $0,687$ соответственно). Амплитуда агрегации с арахидоновой кислотой до КШ, на 1–3-и сутки и 8–10-е сутки после КШ для носителей редкого аллеля Т полиморфизма rs1126643 против носителей распространенного аллеля в гомозиготном состоянии составила $61,3 \pm 28,6$; $17,5 \pm 23,8$ и $28,0 \pm 30,5\%$ против $71,3 \pm 21,8$; $16,9 \pm 22,7$ и $29,9 \pm 33,5\%$ ($p=0,416$; $0,825$ и $0,872$ соответственно). Следовательно, полиморфизм rs1126643 не ассоциирован с повышенной АТ после КШ.

Данные об ассоциации полиморфизма rs1126643 с атеротромбозом в литературе противоречивы. В мета-анализе G. Wu и соавт. проведена оценка 15 исследований с включением 2242 исследуемых образцов, полученных у пациентов, и 2408 контрольных образцов. В мета-анализе продемонстрирована ассоциация между полиморфизмом rs1126643, C807T и риском развития ишемического инсульта в общей популяции, у представителей монголоидной расы и у госпитализированных пациентов вне зависимости от расы. Тем не менее не наблюдалось статистической значимости в данной ассоциации у представителей европеоидной расы и у негоспитализированных пациентов вне зависимости от расы [14].

Следует отметить, что гликопротеиновый Ia рецептор или интегрин $\alpha_2\beta_1$ (тромбоцитарный рецептор коллагена) относится к семейству интегринов, отвечающих за межклеточные взаимодействия. Генотип 807TT ассоциирован с большей плотностью рецепторов на поверхности тромбоцита и с развитием тромбоза ретинальных сосудов, инсульта, инфаркта миокарда (ИМ) [15, 16]. Хотя не во всех исследованиях эти данные однозначны [17, 18].

При сравнении пациентов с ИБС с наличием редкого аллеля и его отсутствием по агрегационной активности тромбоцитов выявлено, что носители редкого аллеля гена ITGB3 полиморфизма rs5918 (мутация повышенной экспрессии тромбоцитарных рецепторов фибриногена) на 1–3-и сутки после операции имеют более высокие показатели АТ с арахидоновой кислотой (1 мкМ). Амплитуда агрегации с арахидоновой кислотой у носителей редкого аллеля 27,5% против 12,7% у носителей распространенного аллеля в гомозиготном состоянии, скорость агрегации 47% против 32,8%, площадь под кривой – 97,9% против 55,6% ($p<0,05$). Этот факт еще раз подчеркивает необходимость назначения АСК уже в 1-е сутки после КШ. На 10-е сутки на фоне АТТ показатели АТ тромбоцитов для данных групп статистически значимо не различались (табл. 2).

Некоторые исследователи указывают на взаимосвязь между наличием С аллеля полиморфизма гена ITGB3 (Leu33Pro, rs5918) и повышенной активностью тромбоцитов, их агрегацией и/или фибриногенсвязывающей способностью [19, 20]. Иные авторы обнаружили отсутствие влияния носительства аллеля С на активность тромбоцитов [21]. В исследовании F. Abderrazek и соавт. [22] генетические варианты полиморфизма гена тромбоцитарных рецепторов GPIIb встречались в следующей последовательности: ТТ – 55,3%, СТ – 39,4% и СС – 5,3%.

В исследовании А.М. Kucharska-Newton и соавт. у 1202 пациентов – участников исследования ARIC наличие минорного аллеля полиморфизма rs5918 ассоциировалось с повышенным уровнем активации тромбоцита

Таблица 2. Показатели агрегации у пациентов с ИБС и различными вариантами полиморфизма rs5918 в гене ITGB3

Показатель	Группа пациентов с ИБС		P
	генотип ТТ (n=47)	генотипы ТС + СС (n=24)	
АЧТВ до КШ, с	28,7 $\pm$ 3,2	27,9 $\pm$ 3,2	0,308
Фибриноген до КШ, г/л	3,1 $\pm$ 0,69	3,1 $\pm$ 0,7	0,746
ПВ до КШ, с	11,9 $\pm$ 2,45	11,2 $\pm$ 2,3	0,897
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мкМ АДФ до КШ	52,0 $\pm$ 23,5	56,8 $\pm$ 21,0	0,561
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислоты до КШ	64,75 $\pm$ 26,5	60,96 $\pm$ 29,9	0,761
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мкМ АДФ на 1–3-и сутки после КШ	59,1 $\pm$ 15,8	66,4 $\pm$ 15,0	0,074
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислотой на 1–3-и сутки после КШ	12,7 $\pm$ 16,2	27,5 $\pm$ 31,1	0,016
Агрегация тромбоцитов (скорость) с 1 мМ арахидоновой кислотой на 1–3-и сутки после КШ	32,8 $\pm$ 20,8	47,0 $\pm$ 26,4	0,025
Агрегация тромбоцитов (лаг-фаза) с 1 мМ арахидоновой кислотой на 1–3-и сутки после КШ	23,9 $\pm$ 42,6	30,2 $\pm$ 61,3	0,616
Агрегация тромбоцитов (площадь) с 1 мМ арахидоновой кислотой на 1–3-и сутки после КШ	55,6 $\pm$ 74,9	97,9 $\pm$ 103,6	0,040
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мкМ АДФ на 8–10-е сутки после КШ	38,4 $\pm$ 23,9	44,7 $\pm$ 22,0	0,228
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислотой на 8–10-е сутки после КШ	32,9 $\pm$ 31,8	24,3 $\pm$ 26,7	0,160

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; ПВ – протромбиновое время. Здесь и в табл. 3: КШ – коронарное шунтирование.

(повышенной экспрессией Р-селектина) и снижением толщины покрышки атеромы [23].

При сравнении агрегационной активности тромбоцитов между соответствующими группами с наличием минорного аллеля (как в гетеро-, так и в гомозиготном вариантах) и с наличием распространенного аллеля в гомозиготном состоянии по всем остальным изучаемым полиморфизмам в нашем исследовании не найдено статистически значимых различий.

У 34 пациентов с полным набором данных по 6 изучаемым полиморфизмам мы проанализировали ассоциацию перечисленных полиморфизмов с развитием ССО после КШ. Средний период наблюдения составил $10,9 \pm 5,2$ мес. Первичной конечной точкой являлись ИМ, острое нарушение мозгового кровообращения, смерть от всех причин. За период наблюдения зарегистрировано 12 ССО: 6 случаев острого ИМ, 3 – острого нарушения мозгового кровообращения, 3 летальных исхода. Приверженность к терапии оценивалась при опросе пациентов по телефону, в исследовании вошли пациенты с высокой приверженностью. Мы сравнили группу пациентов, достигших конечные точки ($n=12$), и группу пациентов, не достигших конечных точек за период наблюдения, по наличию редких аллелей изучаемых полиморфизмов. У пациентов при наличии комбинации редких аллелей генов ITGB3+CYP2C19*2 или CYP2C19*2+ITGA2, а также редкого аллеля гена CYP2C19*2 по сравнению с другими генетическими комбинациями (гомозиготный генотип по распространенному аллелю, наличие редкого аллеля одного гена ITGB3 или ITGA2, комбинации редких аллелей генов ITGB3+ITGA2 или ITGB3+ITGA2+CYP2C19*2) чаще встречались конечные точки ($p=0,008$; ОР 4 при 95% ДИ от 2,19 до 7,29).

Следует отметить, что в перечисленных вариантах комбинаций наиболее неблагоприятным оказалась комбинация с наличием редкого аллеля полиморфизма rs4244285 гена пониженной активности цитохрома P450, превращающего клопидогрел в активный метаболит, т. е. предполагаемый полиморфизм резистентности к клопидогрелу. ДАТТ после КШ получали 66,7% из 12 пациентов с конечными точками (ИМ и/или стентирование КА менее года до КШ). Исходя из этого, можно сделать вывод, что при комбинации редких аллелей генов ITGB3+CYP2C19*2 или CYP2C19*2+ITGA2, а также редкого аллеля гена CYP2C19*2 ДАТТ менее эффективна в профилактике риска развития ССО.

Согласно данным литературы, распространенность аллелей CYP2C19 различается в зависимости от этнической группы [24]. По данным исследования D. Sibbing и соавт., 73% пациентов немецкой популяции были гомозиготными носителями распространенного аллеля CYP2C19 (*1/*1), 25% – гетерозиготами по CYP2C19

(*1/*2) и только 2% – гомозиготами по редкому аллелю CYP2C19*2 [25]. Особенности фармакокинетики и фармакодинамики клопидогрела в зависимости от носительства редкого аллеля подробно изучены в исследовании RECLOSE [26] с участием 772 пациентов с различными вариантами течения ИБС, с ИМ с подъемом сегмента ST и без такового, подвергшихся стентированию стентами, покрытыми лекарственным средством. Носители редкого аллеля полиморфизма CYP2C19*2 имели статистически значимо более высокие уровни АДФ-индуцированной АТ по сравнению с пациентами с распространенным аллелем. В ряде исследований показана ассоциация редкого аллеля CYP2C19 со снижением антитромбоцитарного эффекта клопидогрела и повышенным риском развития ССО [27, 28]. Генетическое подисследование от TRITON-TIMI 38, включавшее 1500 пациентов, получавших клопидогрел, выявило статистически значимое увеличение риска смерти от ССО, ИМ, инсульта у носителей как минимум одного редкого аллеля – 27,1% пациентов (ОШ 1,53 при 95% ДИ от 1,07 до 2,19; $p=0,01$) [29]. В генетическом подисследовании (10285 человек) крупного исследования PLATO среди пациентов с острым коронарным синдромом, принимавших клопидогрел, наличие редких аллелей CYP2C19 с пониженной функцией цитохрома (*2, *3-*8) ассоциировалось с более высокой частотой развития ССО в течение 30 дней наблюдения (5,7% против 3,8%; $p=0,028$), однако через год различия были статистически незначимы [30]. Тем не менее в крупном мета-анализе M. V. Holmes и соавт. из 32 исследований (42016 пациентов) авторам не удалось обнаружить клинически значимую связь между генотипом и сердечно-сосудистыми исходами, за исключением тромбоза стента [31]. Подобные выводы демонстрируют подисследования CURE и ACTIVE [32].

В нашей работе не установлено ассоциации редкого аллеля полиморфизма гена цитохрома P450 с риском развития ССО (табл. 3). На основании этого можно сделать вывод, что редкий аллель полиморфизма гена цитохрома P450 не изолированно, а в комбинации с редким аллелем полиморфизма гена, кодирующего рецепторы фибриногена и коллагена на поверхности тромбоцита, увеличивает риск развития ССО после КШ. Это означает необходимость изучения комбинации полиморфизмов в ассоциации с тем или иным фактором, а не отдельного взятого полиморфизма, особенно если кодируемый признак вовлечен в комплексный процесс.

Логичным было бы предположение о возможности развития ССО при комбинации редких аллелей полиморфизмов генов ITGB3+ITGA2+CYP2C19*2, однако такой неблагоприятной ассоциации не получено из-за того, что только один пациент имел данный набор минорных аллелей.

Таблица 3. Ассоциация редкого аллеля отдельных полиморфизмов с ССО после КШ

Ген, полиморфизм	ОШ	95% ДИ	p
ITGB3, 176 T>C, rs5918 (n=80)	0,284	От 0,032 до 2,486	0,225
GP1BA, Thr145Met, rs6065 (n=101)	0,563	От 0,112 до 2,820	0,484
ITGA2, 807 C>T, rs1126643 (n=64)	0,871	От 0,162 до 4,680	0,872
CYP2C19*2, 681G>A, rs4244285 (n=73)	1,543	От 0,279 до 8,532	0,619
P2RY12, rs2046934 (n=87)	0,281	От 0,033 до 2,376	0,244

ССО – сердечно-сосудистые осложнения; ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Ограничения исследования

Группа пациентов после КШ, проанализированная на ассоциацию генотипа с развитием первичных конечных точек, была небольшой.

Заключение

При анализе ассоциации носительства редких аллелей полиморфизмов: rs2046934 гена АДФ-рецептора тромбоцитов P2RY12; rs1126643 гена рецептора к коллагену ITGA2; rs5918 гена рецептора к фибриногену ITGB3, rs6065 гена тромбоцитарного рецептора фактора Виллебранда GP1BA, rs4244285 гена цитохрома P450 CYP2C19*2 и rs4986893 гена цитохрома P450 CYP2C19*3 с развитием первичных конечных точек выявлено, что у пациентов после коронарного шун-

тирования при наличии комбинации редких аллелей генов ITGB3+CYP2C19*2 или CYP2C19*2+ITGA2, а также редкого аллеля гена CYP2C19*2 чаще встречались инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения и смерть по сравнению с наличием других генетических комбинаций (гомозиготными генотипами по распространенному аллелю, наличием редкого аллеля одного гена ITGB3 или ITGA2, комбинациями редких аллелей генов ITGB3+ITGA2 или ITGB3+ITGA2+CYP2C19*2). Наличие комбинации редких аллелей генов ITGB3+CYP2C19*2 или CYP2C19*2+ITGA2, а также редкого аллеля гена CYP2C19*2 является возможным предиктором сердечно-сосудистых осложнений у пациентов после коронарного шунтирования.

Сведения об авторах:

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск

Гринштейн Ю. И. – д. м. н., проф., зав. кафедрой терапии ИПО.

Косинова А. А. – к. м. н., ассистент кафедры терапии ИПО.

Гринштейн И. Ю. – к. м. н., ассистент кафедры поликлинической терапии, семейной медицины и ЗОЖ с курсом ПО.

ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», Красноярск

Субботина Т. Н. – к. биол. н., доцент, ст. н. с.

ФГБНУ ФИЦ «Красноярский научный центр» СО РАН обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», Красноярск

Савченко А. А. – д. м. н., проф., зав. лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии.

E-mail: grinstein.yi@gmail.com

Information about the author:

Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

Yuriy I. Grinshtein – MD, professor.

E-mail: grinstein.yi@gmail.com

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Geisler T., Schaeffeler E., Gawaz M., Schwab M. Genetic variation of platelet function and pharmacology: An update of current knowledge. *Thrombosis and Haemostasis* 2013;110 (5):876–887. DOI:10.1160/TH13-02-0145.
- Jones C.L., Bray S., Garner S.F. et al. Bloodomics Consortium. A functional genomics approach reveals novel quantitative trait loci associated with platelet signaling pathways. *Blood* 2009;114 (7):1405–1416. DOI:10.1182/blood-2009-02-202614
- Zateishnikov D., Minushkina L., Chumakova O. et al. Genetic researchers in cardiology: unfavourable outcome prognosiing and the problem of personified treatment. *Cremlevskaya medicina. Clinical vestnik* 2014;1:84–91. Russian (Затейщиков Д. А., Минушкина Л. О., Чумакова О. С. и др. Кремлевская медицина. Клинический вестник 2014;1:84–91.)
- Quinn M.J., Topol E.J. Common variations in platelet glycoproteins: pharmacogenomic implications. *Pharmacogenomics* 2001;2 (4):341–352. DOI: 10.1517/14622416.2.4.341
- Hoppmann P., Koch W., Laugwitz K.L., Kastrati A. Genetic risk of restenosis after percutaneous coronary interventions in the era of drug-eluting stents. *Coronary Artery Disease* 2014;25 (8):658–664. DOI: 10.1097/MCA. 0000000000000149

6. Liu H., Wang Y., Zheng J. et al. Platelet glycoprotein gene Ia C807T, HPA-3, and Ib VNTR polymorphisms are associated with increased ischemic stroke risk: Evidence from a comprehensive meta-analysis. *International J Stroke* 2017;12 (1):46–70. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.218131
7. Grinshtein Y.I., Savchenko A.A., Filonenko I.V., Savchenko E.A. Zilt versus aspirin in patients with coronary atherosclerosis after coronary artery bypass surgery. Key findings ZEUS: efficacy, mechanism of resistance to acetylsalicylic acid, the immediate and long-term clinical results. *Cardiovascular therapy and prevention* 2009;8 (8):36–43. Russian (Гринштейн Ю.И., Савченко А.А., Филоненко И.В., Савченко Е.А. Зилт в сравнении с ацетилсалициловой кислотой у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий после аортокоронарного шунтирования. Основные результаты исследования ЗЕВС: эффективность препаратов, механизм резистентности к ацетилсалициловой кислоте, ближайшие и отдаленные клинические результаты. Кардиоваскулярная терапия и профилактика 2009;8 (8):36–43).
8. Schneider D.J., Chava S. Factors influencing platelet reactivity in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Coronary Artery Disease* 2016;27 (3):185–190. doi: 10.1097/MCA.0000000000000340.
9. Grinshtein Y.I., Kosinova A.A., Grinshtein I.Y. et al. Clinical and laboratory features of resistant to acetylsalicylic acid patients with coronary heart disease in the perioperative period of coronary artery bypass grafting: results of an open prospective study. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2016;12 (3):264–270. Russian (Гринштейн Ю.И., Косинова А.А., Гринштейн И.Ю. и др. Клинико-лабораторные особенности пациентов с ишемической болезнью сердца в периоперационном периоде коронарного шунтирования, резистентных к ацетилсалициловой кислоте: результаты открытого проспективного исследования. Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2016;12 (3):264–270).
10. Gaikovitch E.A., Cascorbi I., Mrozikiewicz P.M. et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *European J Clinical Pharmacology* 2003;59 (4):303–312. DOI: 10.1007/s00228-003-0606-2.
11. Komarov A.L., Panchenko E.P., Donnikov A.E. et al. Factors that determine the clopidogrel clinical efficacy and prognosis in patients with stable coronary heart disease. *Cardiologia* 2011;51 (2):8–18. Russian (Комаров А.Л., Панченко Е.П., Донников А.Е. и др. Факторы, определяющие клиническую эффективность клопидогрела и прогноз у больных стабильной формой ишемической болезни сердца. Кардиология 2011;51 (2):8–18).
12. Lewandowski K., Swierczynska A., Kwasnikowski P. et al. The prevalence of C807T mutation of glycoprotein Ia gene among young male survivors of myocardial infarction: a relation with coronary angiography results. *Kardiologia polska* 2005;63 (2):107-discussion114.
13. Zhang Q., Jin Y.Q., Shi D.M. et al. Glycoprotein Ia C807T: Polymorphisms and Their Association with Platelet Function in Patients with the Acute Coronary Syndrome. *Cardiology* 2015;132 (4):213–220. DOI: 10.1159/000435906.
14. Wu G., Xi Y., Yao L. et al. Genetic polymorphism of ITGA2 C807T can increase the risk of ischemic stroke. *International J Neuroscience* 2014;124 (11):841–851. doi: 10.3109/00207454.2013.879718.
15. Dodson P.M., Haynes J., Starczynski J. et al. The platelet glycoprotein Ia/Ila gene polymorphism C807T/G873A: a novel risk factor for retinal vein occlusion. *J Eye Science* 2003;17 (6):772–777. DOI: 10.1038/sj.eye.6700452.
16. Gerger A., Hofmann G., Langsenlehner U. et al. Integrin alpha-2 and beta-3 gene polymorphisms and colorectal cancer risk. *International J Colorectal Disease* 2009;24 (2):159–163. DOI: 10.1007/s00384-008-0587-9
17. Motovska Z., Kvasnicka J., Widimsky P. et al. Platelet glycoprotein GP VI 13254C allele is an independent risk factor of premature myocardial infarction. *Thrombosis Research* 2010;125 (2):E61–E64. DOI: 10.1016/j.thromres.2009.09.002
18. Ye Z., Liu E.H., Higgins J.P. et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66155 cases and 91307 controls. *Lancet* 2006;367 (9511):651–658. DOI:10.1016/S0140-6736 (06) 68263-9
19. Dropinski J., Musial J., Sanak M. et al. Antithrombotic effects of aspirin based on PLA1/A2 glycoprotein IIIa polymorphism in patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research* 2007;119 (3):301–303. DOI: 10.1016/j.thromres.2006.03.005
20. Lim E., Carballo S., Cornelissen J. et al. Dose-related efficacy of aspirin after coronary surgery in patients with PI (A2) polymorphism (NCT00262275). *Ann Thoracic Surgery* 2007;83 (1):134–139. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2006.08.002
21. Morawski W., Sanak M., Cisowski M. et al. Prediction of the excessive perioperative bleeding in patients undergoing coronary artery bypass grafting: Role of aspirin and platelet glycoprotein IIIa polymorphism. *J Thoracic Cardiovascular Surgery* 2005;130 (3):791–796. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2005.02.041
22. Abderrazek F., Chakroun T., Addad F. et al. The GPIIIa PLA polymorphism and the platelet hyperactivity in Tunisian patients with stable coronary artery disease treated with aspirin. *Thrombosis Research* 2010;125 (6):E265–E268. DOI: 10.1016/j.thromres.2010.01.011
23. Kucharska-Newton A.M., Monda K.L., Campbell S. et al. Association of the platelet GPIIb/IIIa polymorphism with atherosclerotic plaque morphology The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis* 2011;216 (1):151–156. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.038
24. Mirzaev K.B., Sychev D.A., Andreev D.A. Ethnic differences of the CYP2C19 gene polymorphism associated with the violation of the response to clopidogrel in the Russian Federation. *Molecular medicine* 2014;1:13–21. Russian (Мирзаев К.Б., Сычев Д.А., Андреев Д.А. Этнические особенности в Российской Федерации полиморфизма гена CYP2C19, ассоциированного с нарушением ответа на клопидогрел. Молекулярная медицина 2014;1:13–21).
25. Sibbing D., Stegheer J., Latz W. et al. Cytochrome P450C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention. *European Heart J* 2009;30 (8):916–922. DOI: 10.1093/eurheartj/ehp041
26. Varenhorst C., James S., Erlinge D. et al. Genetic variation of CYP2C19 affects both pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel but not prasugrel in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *European Heart J* 2009;30 (14):1744–1752. DOI: 10.1093/eurheartj/ehp157
27. Liang Z.Y., Han Y.L., Zhang X.L. et al. The impact of gene polymorphism and high on-treatment platelet reactivity on clinical follow-up: outcomes in patients with acute coronary syndrome after drug-eluting stent implantation. *Euro Intervention* 2013;9 (3):316–327 doi: 10.4244/EIJV9I3A53
28. Wang Y., Zhao X., Lin J. et al. Association Between CYP2C19 Loss-of-Function Allele Status and Efficacy of Clopidogrel for Risk Reduction Among Patients With Minor Stroke or Transient Ischemic Attack. *JAMA* 2016;316 (1):70–78 DOI: 10.1001/jama.2016.8662
29. Mega J.L., Close S.L., Wiviott S.D. et al. Cytochrome P-450 Polymorphisms and Response to Clopidogrel. *New England J Medicine* 2009;360 (4):354–362. DOI: 10.1056/NEJMoa0809171
30. Wallentin L., James S., Storey R.F. et al. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet* 2010;376 (9749):1320–1328. DOI: 10.1016/S0140-6736 (10) 61274-3
31. Holmes M.V., Perel P., Shah T. et al. CYP2C19 Genotype, Clopidogrel Metabolism, Platelet Function, and Cardiovascular Events A Systematic Review and Meta-analysis. *J American Medical Association* 2011;306 (24):2704–2714. DOI: 10.1001/jama.2011.1880.
32. Paré G., Mehta S.R., Yusuf S. et al. Effects of CYP2C19 Genotype on Outcomes of Clopidogrel Treatment. *New England J Medicine* 2010;363 (18):1704–1714. DOI: 10.1056/NEJMoa1008410.

Поступила 12.02.17 (Received 12.02.17)