

Изучение ассоциации полиморфизма V599L (V640L), rs6133 в гене Р-селектина с резистентностью к Ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ишемической болезнью сердца после коронарного шунтирования

А.А. Косинова ¹, Т.С. Монгуш ^{1,2}, М.Д. Гончаров ^{1,2}, Т.Н. Субботина ³, К.С.Семащенко ³, Ю.И. Гринштейн ¹

¹ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, 660022 ул. Партизана Железняка, 1, г. Красноярск, Россия

²ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 660020 ул. Караульная, д.45, г.Красноярск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Александра Александровна Косинова, к.м.н., ассистент кафедры терапии ИПО КрасГМУ, ORCID: [0000-0002-7412-2516](https://orcid.org/0000-0002-7412-2516) (разработка концепции и дизайна, набор материала, анализ и интерпретация данных)

Таира Семеновна Монгуш - соискатель кафедры терапии ИПО ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, врач-кардиолог ФГБУ «ФЦССХ» г.Красноярска (набор материала, анализ и интерпретация данных)

Максим Дмитриевич Гончаров - соискатель кафедры терапии ИПО ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, врач лабораторной диагностики ФГБУ «ФЦССХ» г. Красноярска

Татьяна Николаевна Субботина – к.б.н., заведующая научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ) (анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи)

Ксения Сергеевна Семашенко - Студентка 3 курса бакалавриата Института фундаментальной биологии и биотехнологии, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» (набор материала, анализ и интерпретация данных)

Юрий Исаевич Гринштейн, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой терапии ИПО ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, ORCID: 0000-0002-4621-1618 (разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи, окончательное утверждение на представление рукописи)

АССОЦИАЦИЯ RS6133 С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К АСК

Для корреспонденции. Косинова Александра Александровна, e-mail: tarskihaa@mail.ru, +79048938335

Study of the association of polymorphism V599L (V640L), rs6133 in the P-selectin gene of platelets with acetylsalicylic acid resistance in patients after coronary bypass surgery

A.A. Kosinova¹, T.S.Mongush^{1,2}, M.D.Goncharov^{1,2}, T.N.Subbotina³, K.S.Semashchenko³, Y.I. Grinshtein¹

1 FGBOU VO Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenets Health Ministry of Russia, 660022 ul. Partizan Zheleznyaka, 1, Krasnoyarsk, Russia

2 FGBU "Federal Center for Cardiovascular Surgery" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 660020, ul. Karaulnaya, 45, Krasnoyarsk, Russia

3 FSAEI "Siberian Federal University"

Kosinova Aleksandra Aleksandrovna, Candidate of Medical Science, Assistant of the Therapeutics Department, Krasnoyarsk State Medical University. ORCID: 0000-0002-7412-2516

Mongush Tayra Semenovna - Applicant of the Therapeutics Department, Krasnoyarsk State Medical University, Cardiologist of FGBU "FCSSH", Krasnoyarsk

Goncharov Maxim Dmitrievich - Applicant of the Therapeutics Department, Krasnoyarsk State Medical University, physician of laboratory diagnostics of FGBU "FCSSH", Krasnoyarsk

Subbotina Tatyana Nikolaevna - Candidate of Medical Science, Head of the Scientific and Practical Laboratory of Molecular Genetic Research Methods, FSAEI "Siberian Federal University"

Semashchenko Ksenia Sergeevna - 3rd year undergraduate student of the Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, FSAEI "Siberian Federal University"

Grinshtein Yury Isayevich, Doctor of Medical Science, Professor, Head of the Therapeutics Department, Krasnoyarsk State Medical University, ORCID: 0000-0002-4621-1618

ASSOCIATION RS6133 WITH RESISTANCE TO ASA

For correspondence: Kosinova A.A., E-mail: tarskihaa@mail.ru, +79048938335

Резюме

Цель. Изучить ассоциацию полиморфизма V599L (V640L), rs6133 в гене Р-селектина с резистентностью к Ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ишемической болезнью сердца после коронарного шунтирования

Материал и методы. В исследование включено 104 пациента со стенокардией напряжения. Из них, 61 (58,7%) пациентов с II ФК, 41 (39,4%) пациента с III ФК и 2 (1,9%) с IV ФК, в возрасте от 36 до 78 лет (средний возраст $61,6 \pm 6,9$ года), с атеросклеротическим поражением коронарных артерий, подтвержденным коронароангиографией. Группа контроля состояла из 30 здоровых доноров. Средний возраст доноров составил $44,2 \pm 9,8$ лет. Пациенты прекращали прием антиагрегантов до КШ минимум за 5 суток. В послеоперационном периоде с первых суток всем пациентам назначалось 100 мг кишечнорастворимой формы ацетилсалициловой кислоты (АСК), 61 пациент получал терапию АСК, 43 пациентов комбинированную антиагрегантную терапию: АСК +клопидогрель (75 мг в сутки).

Исследование агрегации проводилось на оптическом агрегометре с использованием индукторов АДФ в концентрации 5 μ М и арахидоновая кислота 1 мМ до КШ, на 1-3 сутки и на 8-10 сутки после оперативного лечения.

Образцы ДНК были исследованы на наличие полиморфизма V599L (V640L), rs6133 в гене Р-селектина с помощью ПЦР в реальном времени.

Результаты. Частота гомозиготного генотипа GG полиморфизма rs6133 составила 84,6%; гетерозиготного генотипа GT – 15,4%, что статистически не отличалось от частоты в группе контроля: 94% и 3%, соответственно ($p=0,93$). Амплитуда агрегации с АДФ до КШ, на 1-3е и 8-10е сутки после КШ для носителей гомозиготы по распространенной аллели G против носителей редкой аллели T составила соответственно: $47,9\pm 19,3\%$, $44,5\pm 17,8\%$, $30,1\pm 13,2\%$ против $47,9\pm 17,1\%$, $46,3\pm 16,5\%$, $39,6\pm 22,0$ ($p=0,497$, $0,441$ и $0,687$, соответственно). Амплитуда агрегации с арахидоновой кислотой до КШ, на 1-3е сутки и 8-10е сутки после КШ для носителей гомозиготы по распространенной аллели против носителей редкой аллели T составила соответственно: $47,9\pm 23,2\%$, $24,5\pm 21,7\%$, $12,3\pm 16,3$ против $54,3\pm 17,8\%$, $29,7\pm 23,7\%$, $11\pm 10,9\%$ ($p=0,416$, $0,825$ и $0,872$, соответственно). В первые 10 дней послеоперационного периода в исследуемой группе наблюдалось 6 тромботических событий (5,7%): 2 острого нарушения мозгового кровообращения и 4 периоперационных инфаркта миокарда. 5 событий произошло в группе пациентов с генотипом GG, 1 событие в группе пациентов с генотипом GT.

Заключение. Полиморфизм V599L (V640L), rs6133 в гене Р-селектина не ассоциирован с резистентностью к Ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ИБС после коронарного шунтирования. Редкая аллель T полиморфизма rs6133 не ассоциирована с повышенной агрегационной активностью тромбоцитов после КШ. Редкая аллель полиморфизма rs6133 гена Р-селектина не приводит к увеличению рисков неблагоприятных событий в первые 10 дней после КШ. Требуются дальнейшие исследования на больших выборках и с включением комплекса полиморфизмов.

Abstract

Summary

Purpose. To study the association of polymorphism V599L (V640L), rs6133 in the P-selectin gene with acetylsalicylic acid resistance in patients with coronary heart disease after coronary bypass surgery (CABG).

Material and methods. The study included 104 patients with stable angina pectoris. 61 (58.7%) patients had II functional class (FC), 41 (39.4%) patients with III FC and 2 (1.9%) with IV FC, aged 36 to 78 years (mean age 61, 6 ± 6.9 years), with atherosclerotic lesions of the coronary arteries, confirmed by coronary angiography. The control group consisted of 30 healthy donors. The average age of donors was 44.2 ± 9.8 years. The antiplatelet therapy was stopped for at least 5 days before CABG. In the postoperative period, from the first day, all patients were received 100 mg of an enteric form of acetylsalicylic acid (ASA), 61 patients received ASA therapy, 43 patients - combined antiplatelet therapy: ASA + clopidogrel (75 mg per day).

The aggregation study was carried out on an optical aggregometer, using ADF inductors at a concentration of 5 μ M and arachidonic acid 1 mM before CABG, on 1-3 day and on 8-10 day after surgical treatment.

DNA samples were examined for the V599L polymorphism (V640L), rs6133 in the P-selectin gene using real-time PCR.

Results. The frequency of the homozygous GG genotype of the rs6133 polymorphism was 84.6%; heterozygous GT genotype - 15.4%, that was not statistically different compared with control group: 94% and 3%, respectively ($p = 0.93$). The amplitude of aggregation with ADP before CABG, on 1-3 day and on 8-10 day after CABG for carriers of homozygotes of allele G against carriers of the allele T were: $47.9 \pm 19.3\%$, $44.5 \pm 17.8\%$, $30.1 \pm 13.2\%$ versus $47.9 \pm 17.1\%$, $46.3 \pm 16.5\%$, 39.6 ± 22.0 ($p = 0.497$, 0.441 and 0.687 , respectively). The amplitude of aggregation with arachidonic acid before CABG, on 1-3 day and on 8-10 day after CABG for carriers of homozygotes of allele G against carriers of the allele T, were respectively: $47.9 \pm 23.2\%$, $24.5 \pm 21.7\%$, 12.3 ± 16.3 versus $54.3 \pm 17.8\%$, $29.7 \pm 23.7\%$, $11 \pm 10.9\%$ ($p = 0.416$, 0.825 and 0.872 , respectively). In the first 10 days of the postoperative period, 6 thrombotic events (5.7%) were

observed in the study group: 2 strokes and 4 perioperative myocardial infarction. 5 events occurred in the group of patients with the GG genotype, 1 event - in the group of patients with the GT genotype.

Conclusion. V599L (V640L), rs6133 polymorphism in the P-selectin gene is not associated with acetylsalicylic acid resistance in patients with coronary artery disease after coronary bypass grafting. The T allele of the rs6133 polymorphism is not associated with increased platelet aggregation activity after CABG. The allele T of the rs6133 polymorphism of the P-selectin gene does not increase the risk of adverse events in the first 10 days after CABG. Further studies are required on larger cohort and with the complex of polymorphisms.

Ключевые слова. Коронарное шунтирование, генетические полиморфизмы, резистентность, Ацетилсалициловая кислота, rs6133, P-селектин

Keywords. Coronary bypass grafting, genetic polymorphisms, resistance, Acetylsalicylic acid, rs6133, P-selectin

Конфликт интересов. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта: № 18-415-243003

«Персонализация антитромбоцитарной терапии пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) в зависимости от уровня экспрессии гена P-селектина, выраженности межклеточного взаимодействия и воспаления»

Conflict of interests. The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research, Government of Krasnoyarsk Territory, Krasnoyarsk Regional Fund of Science to the research project: “Antiplatelet therapy personification in patients with coronary heart disease (CHD) depending on the level of P-selectin gene expression, the intensity of intercellular interaction and inflammation”

Перечень сокращений

АДФ = Аденозиндифосфат

АСК = Ацетилсалициловая кислота

АЧТВ = Активированное частичное тромбопластиновое время

ИБС = Ишемическая болезнь сердца

КШ = коронарное шунтирование

ПЦР – полимеразная цепная реакция

Введение

Несмотря на то, что реваскуляризация миокарда снижает смертность пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), часть из них имеет высокие риски неблагоприятных событий после коронарных вмешательств [1], в том числе из-за резистентности к Ацетилсалициловой кислоте (АСК), препарату для вторичной профилактики [2].

Проблема резистентности к антитромбоцитарным препаратам стоит на сегодняшний день остро и требует выявления новых предикторов, так как до сих пор нет идеального теста для определения агрегационной активности тромбоцитов, а отсюда и однозначных данных о необходимости рутинной диагностики остаточной реактивности тромбоцитов в снижении рисков неблагоприятных событий.

Ранее нашим научным коллективом были получены данные о связи воспаления и резистентности к антитромбоцитарным препаратам (АСК). [3] В последнее время, большое внимание уделяется молекулам клеточной адгезии, синтезируемым в тромбоците и потенцирующим воспалительный ответ, например Р-селектину.

Р-селектин – молекула адгезии, опосредующая взаимодействие эндотелиальных клеток или тромбоцитов с лейкоцитами. [4] Р-селектин необходим для эффективного рекрутинга нейтрофилов во время острого или хронического воспаления [5]. Повышенная экспрессия Р-селектина описана в атеросклеротической бляшке [6], при сахарном диабете

[7], у пациентов с нестабильной стенокардией [8], при рестенозе после ангиопластики [9], после коронароспазма [10].

С.А. Бернс с соавторами определили повышенный уровень экспрессии Р-селектина как лабораторный предиктор неблагоприятных исходов у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) без подъёма сегмента ST [11] и у пациентов ОКС с подъёмом сегмента ST после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ). [12] По данным авторов, повышение уровня Р-селектина на 10е сутки является предиктором развития тромбоза стента в отдаленном периоде. О возможности использования уровня экспрессии Р-селектина в прогнозировании риска рестенозов и тромбозов стентов у пациентов с ОКС с подъёмом сегмента ST после проведённого ЧКВ также сообщают Фадеева Е.А. и соавторы. [13]

В работе Р. Gurbel и др. увеличение концентрации Р-селектина у больных в остром периоде ИМ достоверно ассоциировалось с тяжелыми сосудистыми осложнениями в последующие 3 месяца. [14].

Учитывая данные наблюдения можно сделать вывод, что ген Р-селектина может быть кандидатом в развитии ишемической болезни сердца (ИБС), в повышенном воспалительном ответе, и как следствие резистентности к АСК с высоким риском неблагоприятных событий.

Р-селектин кодируется геном SELP, расположенным на хромосоме 1q21-q24, охватывающий >50 kb и содержит 17 экзонов, кодирующих структурно различные области [15]. Ген является высокополиморфным.

Группа исследователей под руководством Herrmann S. предположила, что увеличение уровня Р-селектина в плазме может привести к развитию ИБС. Проведя скрининг гена, было обнаружено 13 полиморфизмов, которые могут быть ассоциированы с ишемической болезнью сердца [16]. Одним из таких полиморфизмов является G1918C/T (Val640Leu; rs6133). Мы предположили, что некая ассоциация полиморфизмов в гене Р-селектина тромбоцитов может быть причиной недостаточного ответа тромбоцитов на АСК.

Поэтому целью нашего исследования было изучение ассоциации полиморфизма V599L (V640L), rs6133 в гене Р-селектина тромбоцитов с резистентностью к Ацетилсалициловой кислоте у пациентов после коронарного шунтирования

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии г. Красноярска (главный врач д.м.н., профессор Сакович В.А.). В исследование включено 104 пациента (89 мужчины и 15 женщин) с II-IV функциональным классом (ФК) стенокардии напряжения, согласно Канадской классификации. Из них, 61 (58,7%) пациентов с II ФК, 41 (39,4%) пациента с III ФК и 2 (1,9%) с IV ФК, в возрасте от 36 до 78 лет (средний возраст $61,6 \pm 6,9$ года), с атеросклеротическим поражением коронарных артерий, подтвержденным коронароангиографией. Уровень холестерина составил $4,65 \pm 1,43$ ммоль/л. Активными курильщиками были 39% пациентов, 29,8 % имели сахарный диабет, 26,2% - ожирение.

Пациентам выполнялось аорто/маммарокоронарное шунтирование (92 пациентам (88,5%) в условиях искусственного кровообращения, 12 пациентам (11,5%) на работающем сердце.

Критерии включения пациентов: стабильная стенокардия II-IV функционального класса, атеросклероз коронарных артерий, подтвержденный коронароангиографией, подписанное информированное согласие. Критерии исключения: почечная недостаточность, печеночная недостаточность, язвенная болезнь желудка и/или 12-перстной кишки в стадии обострения, аллергия на ацетилсалициловую кислоту (АСК), клопидогрел.

Группа контроля состояла из 30 здоровых доноров. Средний возраст доноров составил $44,2 \pm 9,8$ лет. Агрегационная активность тромбоцитов определялась с индукторами АДФ (5 μ M) и АК (1мM).

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики и принципами Хельсинской Декларации. Протокол исследования был

одобрен этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф. Войно-Ясенецкого. 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 [17]. Пациенты прекращали прием антиагрегантов до КШ минимум за 5 суток. В послеоперационном периоде с первых суток всем пациентам назначалось 100 мг кишечнорастворимой формы ацетилсалициловой кислоты (АСК), 61 пациент получал терапию АСК, 43 пациентов комбинированную антиагрегантную терапию: АСК +клопидогрель (75 мг в сутки).

В качестве материала исследования использовалась периферическая кровь, полученная путем пункции локтевой вены. Кровь, предназначенная для исследования агрегации тромбоцитов, забиралась в пробирку с 3,8%-ным цитратом натрия в соотношении крови и реагента 9:1. Для генетических исследований венозная кровь собиралась в пробирку, где в качестве антикоагулянта использовалась ЭДТА-К2 в концентрации 1,2 мг/мл крови. Взятие крови производилось с помощью закрытой вакуумной системы Vac-Tube в количестве 10мл. Исследование агрегации проводилось на оптическом агрегометре «CHRONO-LOG 490», США с использованием индукторов АДФ в концентрации 5 μ М и арахидоновая кислота 1 мМ до КШ, на 1-3 сутки и на 8-10 сутки после оперативного лечения.

ДНК выделяли с использованием реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС-кровь» (Литех). Далее с образцами выделенной ДНК была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием комплектов реагентов для амплификации «SNP-экспресс» и «SNP-экспресс-РВ» детекцией результата в режиме реального времени и с электрофоретической детекцией продуктов амплификации соответственно. Образцы ДНК были исследованы на наличие полиморфизма V599L (V640L), rs6133 в гене Р-селектина тромбоцитов.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics (Версия 20.0) и программы Excel for Windows.

Для количественных показателей вычислялись следующие показатели описательной статистики: среднее значение, стандартное отклонение. Описательные статистики представлены как $M \pm \sigma$, где M - средняя арифметическая величина вариационного ряда, σ - ошибка среднего. Для качественных показателей вычислялись следующие показатели: число наблюдений и доля (в %) от общего количества пациентов или от количества пациентов в соответствующей подгруппе. Достоверность различий между двумя независимыми выборками оценивалась по критерию Манна-Уитни ($n < 30$). Для категориальных переменных применяли χ^2 -тест. При частоте встречаемости признака 5 и менее использовался точный критерий Фишера. Для оценки наличия резистентности к АСК при наличии редкого аллеля изучаемых полиморфизмов производили оценку отношения шансов в таблицах сопряженности 2×2 с расчетом доверительных интервалов по стандартной методике с помощью четырехпольной таблицы. Формула расчета отношения шансов: $(ОШ) = (a/b)/(c/d)$, где a – частота аллеля (генотипа) в выборке больных, b – частота аллеля (генотипа) в контрольной группе, c – сумма частот остальных аллелей (генотипов) в выборке, d - сумма частот остальных аллелей (генотипов) в контрольной выборке. Для анализа выборки применена общая модель наследования. Отношение шансов и относительный риск считали статистически значимым, если в границы их 95-ого доверительного интервала не попадает 1. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости 95% ($p < 0,05$).

Результаты исследования.

Сравнение пациентов с ИБС и доноров по распределению частоты генотипов позволило обнаружить следующие данные (Таблица 1). Частота гомозиготного генотипа GG полиморфизма rs6133 составила 84,6%; гетерозиготного генотипа GT – 15,4%, что статистически не отличалось от частоты в группе контроля: 94% и 3%, соответственно ($p = 0,93$).

Таблица 1

Распространенность аллельных вариантов гена Р-селектина полиморфизма rs6133

у пациентов с ИБС и в контрольной группе.

Генотип	Частота встречаемости среди пациентов с ИБС, n=104, %	Наличие резистентности к АСК, n, %	Частота встречаемости в группе контроля, n=30, %	Наличие резистентности к АСК	ОШ [95% ДИ]	Значение p
GG	88 (84,6 %)	20 (22,7%)	28 (94%)	3 (10,7%)	1,95 [007-58.24]	0,93
GT	16 (15,4%)	1 (6,4%)	1 (3%)	0	0.51 [0.02-15.28]	
TT	0	0	1 (3%)	0	0.16 [0.00-9.62]	
Аллель G, ОШ [95% ДИ]	104 (100%)		29 (96,6%)		2.13 [0.08-58.03]	0.7

При сравнении агрегационной активности тромбоцитов с индукторами АДФ (5 μ M) и арахидоновая кислота (1 mM) не было найдено отличий среди пациентов носителей редкой аллели гена Р-селектина полиморфизма rs6133 и пациентов носителей гомозиготы по распространенной аллели как до, так и на 1-3, 8-10 сутки после КШ. Амплитуда агрегации тромбоцитов с АДФ до КШ, на 1-3е и 8-10е сутки после КШ для носителей гомозиготы по распространенной аллели полиморфизма rs6133 против носителей редкой аллели Т составила соответственно: 47,9 \pm 19,3%, 44,5 \pm 17,8%, 30,1 \pm 13,2% против 47,9 \pm 17,1%, 46,3 \pm 16,5%, 39,6 \pm 22,0 (p=0,497, 0,441 и 0,687, соответственно). Амплитуда агрегации тромбоцитов с

арахидоновой кислотой до КШ, на 1-3е сутки и 8-10е сутки после КШ для носителей гомозиготы по распространенной аллели против носителей редкой аллели Т составила соответственно: $47,9 \pm 23,2\%$, $24,5 \pm 21,7\%$, $12,3 \pm 16,3$ против $54,3 \pm 17,8\%$, $29,7 \pm 23,7\%$, $11 \pm 10,9\%$ ($p=0,416$, $0,825$ и $0,872$, соответственно). Следовательно, редкая аллель полиморфизма rs6133 не ассоциирована с повышенной агрегационной активностью тромбоцитов после КШ.

Таблица 2

Характеристика некоторых показателей гемостаза у носителей редкой аллели и гомозиготы по распространенной аллели гена Р-селектина полиморфизма rs6133 среди пациентов с ИБС

Признак	Генотип GG (n=88)	Генотип GT (n=16)	Значение p
АЧТВ до КШ	$26,7 \pm 3,3$	$28,6 \pm 3,4$	0,308
Фибриноген до КШ, г/л	$2,9 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,6$	0,897
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мМ АДФ до КШ	$47,9 \pm 19,3$	$47,9 \pm 17,1$	0,561
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислотой до КШ	$47,9 \pm 23,2$	$54,3 \pm 17,8$	0,761
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мМ АДФ на 1-3 сутки после КШ	$44,5 \pm 17,8$	$46,3 \pm 16,5$	0,074
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ	$24,5 \pm 21,7$	$29,7 \pm 23,7$	0,645

арахидоновой кислотой на 1-3 сутки после КШ			
Агрегация тромбоцитов(амплитуда) с 5 μМ АДФ на 8-10 сутки после КШ	30,1±13,2	39,6±22,0	0,749
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислотой на 8-10 сутки после КШ	12,3±16,3	11±10,9	0,785

Примечание: Критерий Манна-Уитни (n1=88, n2=16), АЧТВ – Активированное частичное тромбопластиновое время.

В первые, 10 дней послеоперационного периода в исследуемой группе наблюдалось 6 тромботических событий (5,7%): 2 острого нарушения мозгового кровообращения и 4 периоперационных инфаркта миокарда. 5 событий произошло в группе пациентов с генотипом GG (n=88), 1 событие в группе пациентов с генотипом GT (n=16). (Таблица 3)

Не установлено ассоциации редкой аллели полиморфизма rs6133 гена Р-селектина с сердечно-сосудистыми событиями в раннем послеоперационном периоде (первые 10 дней после коронарного шунтирования). Редкая аллель полиморфизма rs6133 гена Р-селектина не приводит к увеличению рисков неблагоприятных событий в первые 10 дней после КШ.

Таблица 3

Ассоциация редкого аллеля Р-селектина полиморфизма rs6133 с сердечно-сосудистыми событиями в течение первых 10 дней после КШ.

Генотип	Общее число тромботических событий	ОШ	95% ДИ	Значение p
---------	--	----	--------	------------

GG, n=88	5	0,9	0,10-8,29	1
GT, n=16	1	1,11	0,12-10,15	

Обсуждение

Распределение генотипов G/G, G/T, T/T в европейско-американской популяции по базе данных The European Bioinformatics Institute составляет 77%, 21%, 1% соответственно [18]. Что соответствует распределению в нашем исследовании.

Полиморфизм G1918T (Val640Leu; rs6133) в гене Р-селектина расположен в области около трансмембранного домена (экзон12) Р-селектина, который может иметь функциональную роль во взаимодействии молекулы клеточной адгезии и лейкоцитов, а также уменьшает стабильность структуры белка [19]. В литературе не так много работ, касающихся полиморфизма rs6133 гена Р-селектина. Исследования, с участием данного полиморфизма были проведены на когортах пациентов с системной красной волчанкой [20], рассеянным склерозом [21], пациентов после коронарного шунтирования [22], с коронарной болезнью сердца и инфарктом миокарда [23]. Метаанализ Zhou D.H. и соавт., включавший 9 контролируемых исследований, 3154 пациента с ИБС, 1608 пациентов с инфарктом миокарда, 17304 здоровых добровольцев, отмечал отсутствие ассоциации полиморфизма rs6133 среди азиатов и кавказоидов с коронарной болезнью сердца и инфарктом миокарда [23], указывая на патогенетическую ассоциацию с ИБС и инфарктами другие полиморфизмы гена Р-селектина: 1969G/A (rs1800805 G>A), -1817T/C (rs1800808 T>C), -2123C/G (rs1800807 C>G), Thr715Pro (rs6136 A>C). [23] Однако, при изучении полиморфизма V599L (rs6133, val640leu) в составе гаплотипов, обнаружены противоположные результаты. Volcik K.A. и соавторы показали, что V599L совместно с полиморфизмами S290N, N562D, T715P у 17592 пациентов с атеросклерозом оказывает влияние на развитие ишемической болезни сердца [24] Другими исследователями под руководством Zee R.Y.L. было показано, что после

корректировки по возрасту, курению, индексу массы тела, гипертензии, гиперлипидемии и диабету, две составляющих, относящихся к воспалению: полиморфизм val640leu гена Р-селектина (ОШ 1.63, 95% ДИ 1.22–2.17, P = 0.001) и C582T полиморфизм гена интерлейкина 4 (ОШ 1.40, 95% ДИ 1.13–1.73, P = 0.003) являлись независимыми предикторами тромбоэмболического инсульта. Данное исследование было проспективным. Изучались образцы крови от 319 пациентов с инсультом и от 2092 здоровых волонтеров, выбранных случайным образом из 14916 образцов крови здоровых американских мужчин, сдавших кровь в начале наблюдения. Период наблюдения составил 13,2 года. Исследовались 92 полиморфизма-кандидата связанные с воспалением, тромбозом или нарушением липидного метаболизма, учитывались возникшие тромботические инсульты за период наблюдения. [25]

Почему же по данным нашего исследования полиморфизм rs6133 гена молекулы клеточной адгезии, опосредующей воспалительный процесс не ассоциирован с резистентностью к АСК, которая наблюдается чаще у пациентов с повышенным воспалительным ответом после КШ? На наш взгляд объяснение может быть следующим.

Так как ген Р-селектина является высокополиморфным, скорее всего более продуктивным будет изучение влияния гаплотипов и комплекса полиморфизмов на резистентность к АСК и возможные неблагоприятные кардиоваскулярные события. В том числе и по той причине, что один полиморфизм гена адгезивной молекулы в сложном каскаде гемостаза и воспаления может быть компенсирован работой множеством других. В нашей предыдущей работе редкая аллель полиморфизма отдельно взятого тромбоцитарного рецептора не приводила к развитию неблагоприятных исходов после КШ, тогда как носительство редких аллелей нескольких полиморфизмов увеличивало риски кардиоваскулярных событий [26].

Заключение

Полиморфизм V599L (V640L), rs6133 в гене Р-селектина тромбоцитов не ассоциирован с резистентностью к Ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ИБС после коронарного шунтирования. Полиморфизм rs6133 не ассоциирован с повышенной агрегационной активностью тромбоцитов после КШ. Редкая аллель полиморфизма rs6133 гена Р-селектина не приводит к увеличению рисков неблагоприятных событий в первые 10 дней после КШ. Требуются дальнейшие исследования на больших выборках и с включением комплекса полиморфизмов.

Список литературы

1. Mohr F.W., Morice M.C., Kappetein A.P., Eldman T.E., Stahle E., Colombo A. et al. Coronary artery bypass graft surgery vs. percutaneous coronary intervention in patients with three-vessel disease and left main coronary disease: 5-year follow-up of the randomised, clinical SYNTAX trial. *Lancet*. 2013; 381: 629-638 DOI:10.1016/S0140-6736(13)60141-5
2. McCullough P.A., Vasudevan A., Sathyamoorthy M., Schussler J.M., Velasco C.E., Lopez L.R., et al. Urinary 11-Dehydro-Thromboxane B2 and Mortality in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol*. 2017;119(7):972-977. doi: 10.1016/j.amjcard.2016.12.004.
3. Гринштейн Ю.И., Косинова А.А., Гринштейн И.Ю., Ковалев А.В., Суховольский В.Г., Савченко А.А. Клинико-лабораторные особенности пациентов с ишемической болезнью сердца, резистентных к Ацетилсалициловой кислоте, в периоперационном периоде коронарного шунтирования: результаты открытого проспективного исследования. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2016; 12(3):265-271. Grinshtein Yu.I., Kosinova A.A., Grinshtein I.Yu., Kovalev A.V., Sukhovolsky V.G., Savchenko A.A. Clinical and laboratory features of patients with ischemic heart disease resistant to acetylsalicylic acid in the perioperative period of coronary artery bypass surgery: results of an open prospective study. *Rational pharmacotherapy in cardiology*. 2016; 12 (3): 265-271. (In Russ.)

4. Johnston G.I., Bliss B.A., Newman P.J., McEver P.J. (1990) Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of the adhesion receptors for leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 265, 21381–21385
5. Johnson, R.C., Mayadas, T.N., Frenette, P.S., Mebius, R.E., Subramaniam, M., Lacasce, A., Hynes, R.O. and Wagner, D.D. (1995) Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood*, 86, 1106–1114
6. Johnson-Tidey, R.R., McGregor, J.L., Taylor, P.R. and Poston, R.N. (1994) Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am. J. Pathol.*, 144, 952–961.
7. Tschoepe, D., Rauch, U. and Schwippert, B. (1997) Platelet–leukocyte-cross talk in diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* 29, 631–635.
8. Ikeda, H., Takajo, Y., Ichiki, K., Ueno, T., Maki, S., Noda, T., Sugi, K. and Imaizumi, T. (1995) Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation*, 92, 1693–1696.
9. Ishiwata, S., Tukada, T., Nakanishi, S., Nishiyama, S. and Seki, A. (1997) Postangioplasty restenosis: platelet activation and the coagulation– fibrinolysis system as possible factors in the pathogenesis of restenosis. *Am. Heart J.*, 133, 387–392.
10. Kaikita, K., Ogawa, H., Yasue, H., Sakamoto, T., Suefuji, H., Sumida, H. and Okumura, K. (1995) Soluble P-selectin is released into the coronary circulation after coronary spasm. *Circulation*, 92, 1726–1730
11. С.А. Бернс, Е.А. Шмидт, Е.С. Юхно, О.А. Нагирняк, Т.А. Хомякова, О.Л. Барбараш
Влияние дисфункции эндотелия на прогноз у больных с острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST, *Кардиология*, 2015, №4(55), с.14-18.
12. Бернс С.А., Шмидт Е.А., Киприна Е.С., Клименкова А.В., Барбараш О.Л., Синьков М.В., Моисеенков Г.В., Барбараш. Предикторы неблагоприятных коронарных событий у

больных острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам. Кардиология, 2010, №7(50), 21-25.

13. Предикторы развития тромбозов и рестенозов коронарных стентов Е. А. Фадеева, Е. Ф. Котовщикова, А. А. Ефремушкина, Е. И. Бувечич, Е. Н. Сюльжина, А. В. Афанасьева, И. Н. Тарасова, Медицина и образование в сибире, № 2 - 2014 г.

14. Gurbel P.A., Bliden K.P., Hiatt B.I. et al. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 2003;107:2908—2913

15. Kaur R., Structural and functional impact of SNPs in P-selectin gene: A comprehensive in silico analysis / R. Kaur, J. Singh, M. Kaur // *Open Life Sciences* – 2017, с. 19-33

16. Herrmann S., The P-Selectin Gene is Highly Polymorphic: Reduced Frequency of the Pro715 Allele Carriers in Patients with Myocardial Infarction / S. Herrmann, S. Ricard, V. Nicaud // *Human Molecular Genetics* – 1998, с. 1277–1284

17. Task Force Members: Montalescot G., Sechtem U, Achenbach S., Andreotti F., Arden C., et al. ESC Committee for Practice Guidelines. ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease. *European Heart Journal* (2013) 34, 2949–3003 doi:10.1093/eurheartj/ehs296

18. Retrieved from The European Bioinformatics Institute: <https://www.ebi.ac.uk/> (Дата обращения: 22.09.18)

19. Kaur R., Structural and functional impact of SNPs in P-selectin gene: A comprehensive in silico analysis / R. Kaur, J. Singh, M. Kaur // *Open Life Sciences* – 2017, с. 19-33.

20. Morris DL1, Graham RR, Erwig LP, Gaffney PM, Moser KL, Behrens TW, Vyse TJ, Graham DS. Variation in the upstream region of P-Selectin (SELP) is a risk factor for SLE. *Genes Immun.* 2009 Jul;10(5):404-13. doi: 10.1038/gene.2009.17.

21. Fenoglio C, Scalabrini D, Piccio L, De Riz M, Venturelli E, Cortini F, Villa C, Serpente M, Parks B, Rinker J, Cross AH, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D. Candidate gene analysis of

selectin cluster in patients with multiple sclerosis. *J Neurol.* 2009 May;256(5):832-3. doi: 10.1007/s00415-009-5016-7

22. Podgoreanu MV¹, White WD, Morris RW, Mathew JP, Stafford-Smith M, Welsby IJ, Grocott HP, Milano CA, Newman MF, Schwinn DA; Perioperative Genetics and Safety Outcomes Study (PEGASUS) Investigative Team. Inflammatory gene polymorphisms and risk of postoperative myocardial infarction after cardiac surgery. *Circulation.* 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I275-81.

23. Zhou DH¹, Wang Y, Hu WN, Wang LJ, Wang Q, Chi M, Jin YZ. SELP genetic polymorphisms may contribute to the pathogenesis of coronary heart disease and myocardial infarction: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2014 May;41(5):3369-80. doi: 10.1007/s11033-014-3199-1.

24. Kelly A. Volcik a,* , Christie M. Ballantyne b, Josef Coresh c, Aaron R. Folsomd, Eric Boerwinkle. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 195 (2007) e76–e82.

25. Robert Y.L. Zee^{1,*}, Nancy R. Cook¹ , Suzanne Cheng² , Rebecca Reynolds² , Henry A. Erlich² , Klaus Lindpaintner³ and Paul M. Ridker Polymorphism in the P-selectin and interleukin-4 genes as determinants of stroke: a population-based, prospective genetic analysis. *Human Molecular Genetics*, Vol. 13, No. 4. 389-396.

26. Grinshtein Y.I., Kosinova A.A., Grinshtein I.Y., Subbotina T.N., Savchenko A.A. The prognostic value of combinations of genetic polymorphisms in the ITGB3, ITGA2, and CYP2C19*2 genes in predicting cardiovascular outcomes after coronary bypass grafting. Testing and Molecular Biomarkers. 2018;22(4):259-265. DOI:10.1089/gtmb.2017.0177