

Реактивность тромбоцитов на фоне двойной антиагрегантной терапии после стентирования коронарных артерий: генетический полиморфизм и клинические варианты

Е.З. Голухова, М.Н. Рябинина, Н.И. Булаева, М.В. Григорян, М.Ч. Кубова

ФГБУ «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» (директор – академик РАН и РАМН Л.А. Бокерия) РАМН; Рублевское шоссе, 135, Москва, 121552, Российская Федерация

Голухова Елена Зеликовна, д. м. н., профессор, чл.-корр. РАМН, заведующий отделением;

Рябинина Мария Николаевна, врач-кардиолог, н. с., e-mail: ryabinina.marija@yandex.ru;

Булаева Наида Ибадулаевна, врач-кардиолог, с. н. с.;

Григорян Марина Вруйровна, врач-кардиолог, н. с.;

Кубова Маида Чиназовна, врач-кардиолог, н. с.

Цель. Оценка эффективности антиагрегантной терапии у больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) перед ангиопластикой коронарных артерий с учетом генетического полиморфизма CYP2C19*2 и CYP2C19*3.

Материал и методы. В исследование включено 55 пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца в возрасте от 36 до 75 лет (средний возраст $59 \pm 9,68$ года). Оценка эффективности двойной антиагрегантной терапии проводилась при помощи световой АДФ-индуцированной агрегометрии тромбоцитов с концентрацией АДФ 5 мкмоль/л, с помощью VerifyNow и тромбоэластографии (ТЭГ) «Platelet Mapping» с помощью анализатора «ТЭГ 5000». Генотипирование CYP2C19*2 и CYP2C19*3 проводили по принципу аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) согласно протоколу исследователя. Сроки наблюдения в среднем составили 2 года.

Результаты. «Большие кардиальные события»: острый инфаркт миокарда, прогрессирование стенокардии, тромбоз стента с развитием ОИМ с подъемом сегмента ST и без подъема сегмента ST, тромбоз стента с клиникой нестабильной стенокардии были зафиксированы у 11 пациентов. В нашем исследовании у пациентов «большие кардиальные события» не зависели от клинических факторов (от веса, пола, наличия сахарного диабета, выраженности атеросклероза коронарных артерий). На развитие осложнений влияли лабораторные факторы: значение агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ выше 48% ($p=0,027$), значение PRU (P2Y12 reaction units) выше 225 по данным VerifyNow ($p=0,00046$). При проведении генотипирования нормальный генотип (GG) был выявлен у 39 пациентов, 14 пациентов оказались гетерозиготными по А-аллелю G681A полиморфизма CYP2C19 (GA), 2 – гомозиготными по А-аллелю G681A полиморфизма CYP2C19 (AA). Все 55 пациентов имели нормальный генотип CYP2C19*3 (Trp212Ter) гена CYP2C19. В ходе выполненного анализа убедительных данных о влиянии различных видов генотипа CYP2C19*2 на число «больших кардиальных событий» получено не было ($p=0,38$). Наличие различных вариантов генотипа CYP2C19*2 значительно влияет на среднее значение агрегации тромбоцитов ($F(1,51)=5,75, p=0,02$), появление осложнений также зависит от уровня агрегации ($F(1,51)=10,52, p=0,002$), и взаимодействие этих двух факторов статистически значимо ($F(1,51)=5,57, p=0,022$). Среднее значение PRU незначимо зависит от наличия различных вариантов генотипа CYP2C19*2 ($p=0,057$); при этом наличие осложнений зависит от уровня PRU и при оценке их совместного влияния на «большие кардиальные события» выявлена значимая связь ($p=0,041$). Средние значения уровня PRU у пациентов с гетерозиготным и гомозиготным носительством CYP2C19*2 по сравнению с таковыми у пациентов с нормальным генотипом возрастает и увеличивает риск «больших» кардиальных событий.

Выводы. Клинические факторы могут не оказывать влияние на развитие «больших кардиальных событий». Лабораторная резистентность по данным световой агрегометрии и VerifyNow увеличивает риск ишемических событий. У пациентов с гетерозиготным и гомозиготным носительством CYP2C19*2 средние показатели активности тромбоцитов выше по сравнению с пациентами с нормальным генотипом. Повышение значений агрегации тромбоцитов по данным световой агрегометрии и значений PRU по данным VerifyNow на фоне полиморфизма гена CYP2C19*2 увеличивало риск «больших кардиальных событий».

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца; генетический полиморфизм; антиагрегантная терапия; агрегация тромбоцитов.

The platelet reactivity after percutaneous coronary intervention in patients with double antiplatelet therapy: impact of genetic polymorphisms

E.Z. Golukhova, M.N. Ryabinina, N.I. Bulaeva, M.V. Grigoryan, M.Ch. Kubova

A.N. Bakoulev Scientific Center for Cardiovascular Surgery of Russian Academy of Medical Sciences; Rublevskoe shosse, 135, Moscow, 121552, Russian Federation

Golukhova Elena Zelikovna, doctor of medical sciences, professor, corresponding member of Russian Academy of Medical Sciences, chief of department;

Ryabinina Mariya Nikolaevna, cardiologist, scientific associate, e-mail: ryabinina.marija@yandex.ru;

Bulaeva Naida Ibadulaevna, cardiologist, chief scientific associate;

Grigoryan Marina Vruyrovna, cardiologist, scientific associate;

Kubova Maida Chinazovna, cardiologist, scientific associate

Objective. To assess antiplatelet therapy efficacy considering the CYP2C19*2 and CYP2C19*3 genetic testing before percutaneous coronary intervention (PCI) in patients with stable coronary artery disease (SCAD).

Material and methods. 55 SCAD-patients aged 36 to 75 years (mean age 59 ± 9.68 years) were studied pre- and postoperatively, mean follow-up was 2 years. Beside conventional investigations, antiplatelet therapy efficacy was assessed by Thromboelastography (TEG) and panel Platelet Mapping with arachidonic acid and ADP-induced platelet aggregation and light transmission aggregometry. Detecting a genetic polymorphism in CYP2C19*2 and CYP2C19*3 were held using allele-specific polymerase chain reaction at the end of follow-up period.

Results. Among study group – 11 patients had MACE (major adverse cardiac events). According to the study, high levels of ADP-induced platelet aggregation (more than 48%, $p=0,027$) and PRU (more than 225, $p=0,00046$) influenced on the development of complications. Our analysis revealed a normal genotype (GG) in 39 patients, heterozygous polymorphisms CYP2C19 (GA) G681A allele were detected in 14 patients, and 2 patients has homozygous polymorphisms CYP2C19 (AA) G681A allele. All 55 patients in our study had normal CYP2C19*3 (Trp212Ter) genotype of CYP2C19 gene. We revealed a statistically significant influence of various genotypes of CYP2C19*2 (GG, GA, AA) on the average values of platelet aggregation ($F(1,51)=5,75, p=0,02$). Also a reliable relationship between MACE and the platelet aggregation according to the LTA ($F(1,51)=10,52, p=0,002$) was obtained. The interaction of these two factors was significant ($F(1,51)=5,57, p=0,022$). In our study there was no significant relationship between the different genotypes CYP2C19*2 and the average values of PRU ($p=0,057$), however, their joint impact on MACE was statistically significant ($p=0,041$).

Conclusion. Patients with high on-treatment platelet reactivity had a significantly increased risk of having MACE. The platelet reactivity was higher in patients with heterozygous and homozygous carriers of CYP2C19*2 versus normal genotype.

Key words: ischemic heart disease; genetic polymorphism; antiplatelet therapy; platelet aggregation.

Тромбоцитарная активация и агрегация играют ключевую роль в развитии ишемических событий при остром коронарном синдроме и при проведении чрескожных коронарных вмешательств (ЧКВ) [1]. Двойная антитромбоцитарная терапия с применением аспирина и клопидогрела у пациентов с острым коронарным синдромом и при ЧКВ заметно снижает число неблагоприятных ишемических событий.

В последние годы в литературе уделяется большое внимание такому понятию, как резистентность к антитромбоцитарным препаратам. По данным ряда авторов, диапазон резистентности к аспирину варьирует в пределах 5–45%, а к клопидогрелу – 4–30% [2, 3]. С середины 90-х годов прошлого века стали появляться исследования,

показавшие гетерогенность ответа тромбоцитов на ингибирующие свойства аспирина [3–5], позже стали проводиться исследования в отношении резистентности к клопидогрелу [6–10]. Причины резистентности к аспирину и клопидогрелу гетерогенны и многокомпонентны. Это и клинические факторы (вес, возраст, снижение дозы или преждевременная отмена препарата, плохая всасываемость, влияние лекарственных средств, диабет и другие) и клеточные механизмы (ускоренное образование пула тромбоцитов, снижение метаболической активности, нарушение регуляции P2Y12 или P2Y1, нарушение активации P2Y1, недостаточное подавление катехолиндуцированной активации тромбоцитов) и другие причины. Несмотря на многочисленные работы, кли-

ническое значение полиморфизма генов как причины резистентности к антиагрегантной терапии в настоящее время остается недостаточно изученным. Существуют различные генетические варианты, но большую доказательную базу имеет полиморфизм гена CYP2C19. В проводившихся исследованиях и метаанализах изучали различные генетические варианты, но только система CYP2C19 (аллели 2 и 3) ассоциировалась с варибельным ответом на антиагреганты у здоровых добровольцев. Было выявлено, что у пациентов, являющихся носителями аллельных вариантов CYP2C19*2 и CYP2C19*3, отмечается слабый антиагрегантный эффект клопидогрела в связи с нарушением образования его активного метаболита в печени, что обуславливает генетически детерминированную резистентность к данному препарату [1].

Целью нашего исследования явилось определение критериев эффективности антиагрегантной терапии и влияния генетического полиморфизма CYP2C19*2, CYP2C19*3 на развитие «больших кардиальных событий» у пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца (ИБС) после ЧКВ.

Материал и методы

Исследование выполнено на базе отделения неинвазивной аритмологии и хирургического лечения комбинированной патологии НЦССХ им А.Н. Бакулева РАМН, генетические исследования выполнены на базе лаборатории «Литех».

В исследование включено 55 пациентов (48 мужчин и 7 женщин) со стабильной ишемической болезнью сердца в возрасте от 36 до 75 лет (средний возраст составил $59 \pm 9,68$ года). В таблице 1 представлена клиничко-анамнестическая характеристика пациентов.

Стенокардия напряжения II ФК отмечалась у 16 пациентов, III ФК – у 38. У 52 пациентов отмечена артериальная гипертония различной степени тяжести. У 29 пациентов – инфаркт миокарда в анамнезе. У 14 пациентов ранее проводилось чрескожное коронарное вмешательство.

Среди сопутствующей патологии стоит обратить внимание на наличие сахарного диабета у 15 пациентов. Индекс массы тела (ИМТ) составлял от 20 до 41 кг/м^2 , средний – $29,52 \pm 4,95 \text{ кг/м}^2$.

В среднем у пациентов отмечалась тенденция к повышению уровня холестерина: $5,05 \pm 1,54$. Курение в анамнезе было отмечено у 33 пациентов.

У всех пациентов была сохранная систолическая функция левого желудочка и в среднем составила $61,62 \pm 4,82\%$ при нормальных размерах камер сердца.

Всем пациентам была выполнена коронарография, по данным которой из 55 пациентов у 10 (18,2%) было однососудистое поражение, у 19 (34,5%) – двухсосудистое, у 26 (47,3%) – многососудистое поражение коронарных артерий. После проведения коронарографии и подтверждения стеноза

Таблица 1

Общая характеристика больных

Показатель	Значение
Общее число пациентов, <i>n</i> (%)	55 (100)
Мужчины, <i>n</i> (%)	48 (87,3)
Женщины, <i>n</i> (%)	7 (12,7)
Возраст, годы (M±SE)	$59,02 \pm 9,68$
Вес, кг (M±SE)	$88,77 \pm 14,83$
Индекс массы тела, кг/м^2 (M±SE)	$29,52 \pm 4,95$
Курение, <i>n</i> (%)	33 (60)
Сахарный диабет, <i>n</i> (%)	15 (27,3)
Артериальная гипертония, <i>n</i> (%)	52 (94,5)
Инфаркт миокарда до стентирования, <i>n</i> (%)	29 (52,7)
Стентирование в анамнезе, <i>n</i> (%)	14 (25,5)
Нарушения ритма, <i>n</i> (%)	10 (18,2)
Лабораторные показатели перед стентированием	
гемоглобин, г/л	$144,96 \pm 13,74$
тромбоциты, 10^9 клеток/л	$249,67 \pm 60,79$
сахар крови, ммоль/л	$5,74 \pm 1,88$
креатинин, мкмоль/л	$89,38 \pm 14,86$
общий холестерин, ммоль/л	$5,05 \pm 1,54$
липопротеины высокой плотности (ЛПВП), ммоль/л	$0,88 \pm 0,22$
липопротеины низкой плотности (ЛПНП), ммоль/л	$2,87 \pm 1,16$
триглицериды (ТГ), ммоль/л	$1,72 \pm 2,2$

коронарных артерий пациенты были отобраны для участия в исследовании.

Критерии включения: стабильная стенокардия II–IV ФК с подтвержденным стенозирующим атеросклерозом коронарных артерий, требующим проведения коронарной ангиопластики.

Критерии исключения: информация о непереносимости аспирина и клопидогрела, острый коронарный синдром, недавние травмы или обширные хирургические вмешательства в течение 1 мес до исследования, тяжелые хронические заболевания внутренних органов, число тромбоцитов менее $100\ 000/\text{мм}^3$, гематокрит менее 30%, гемоглобин менее 100 г/л, отказ пациента от исследования.

Дизайн исследования

Все пациенты при поступлении в клинику получали антиагрегантную терапию в виде нагрузочной дозы: аспирин в дозе 250–325 мг и клопидогрел в дозе 600 мг. Далее проводилась оценка эффективности антиагрегантной терапии с помощью нескольких методов (тромбоэластографии, VerifyNow и световой агрегации тромбоцитов по Борну).

Значение агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ (световая агрегометрия) оценивалось в 6 временных точках: в день перед операцией, сразу после операции, через 1, 3, 6, 12 мес после операции. Оценка функции тромбоцитов с помощью тромбоэластографии и VerifyNow проводилась в день перед операцией, не ранее чем через 24 ч после приема насыщающей дозы клопидогрела.

Всем пациентам было выполнено ЧКВ с имплантацией стентов с лекарственным покрытием («Cypher» фирмы «Cordis, Johnson & Johnson» (США) и «Taxis» фирмы «Boston Scientific»).

Сроки наблюдения составили от 1,5 до 2,5 года, средний срок наблюдения – $2 \pm 9,3$ года.

После завершения наблюдения (при последнем визите) у всех пациентов была взя-

та кровь для проведения генетического анализа на определение полиморфизма CYP2C19*2 и CYP2C19*3.

Конечные точки – «большие кардиальные события»: летальный исход от сердечно-сосудистых причин, острый инфаркт миокарда, рецидив стенокардии, повторное эндоваскулярное вмешательство, тромбоз стента.

Методы исследования

Кровь для оценки эффективности антиагрегантной терапии забирали утром натощак путем пункции кубитальной вены, самотеком через иглу. Оценка функции тромбоцитов в цельной крови методом тромбоэластографии с помощью теста Platelet Mapping с добавлением индукторов арахидоновой кислоты и АДФ выполнялась в течение 1 ч с момента забора крови. Определение агрегации тромбоцитов с помощью тестов VerifyNow проводили непосредственно у постели больного.

Оценка эффективности двойной антиагрегантной терапии проводилась при помощи таких методов, как:

1. Световая АДФ-индуцированная агрегометрия тромбоцитов с концентрацией АДФ 5 мкмоль/л с помощью анализатора агрегации тромбоцитов счетчика «230 LA» (НПФ «Биола», Россия). Исследовали агрегацию тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ.

2. VerifyNow («Accumetrics», США) с набором картриджей на действие аспирина и клопидогрела (арахидоновая кислота и P2Y₁₂). При данном методе исследовали такие показатели, как: PRU (P2Y₁₂ reaction units), процент ингибирования P2Y₁₂, ARU (aspirin reaction units).

3. Тромбоэластография (ТЭГ) «Platelet Mapping» с помощью анализатора «ТЭГ 5000» («Haemoscope», США) определяли максимальную амплитуду (МА), агрегацию с арахидоновой кислотой (%), агрегацию с АДФ (%).

Генотипирование производили с помощью наборов «SNP-экспресс-РВ» производства НПФ «Литех» «Клопидогрел 1»

и «Клопидогрел 2» на приборе «iCycler IQ5» («BioRad», США) на базе лаборатории «Литех» согласно протоколу производителя. Работа наборов основана на принципе аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР). С образцом выделенной ДНК параллельно проводились две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров.

Диагноз ИБС был установлен на основании клинико-инструментального обследования, включающего регистрацию ЭКГ в покое («Kenz Cardico» 302, Япония), проведение пробы с физической нагрузкой («Schiller-AF104 PC», Германия), ЭхоКГ («Philips» iE33, Нидерланды), селективную коронарографию («Intergis V3000», «Intergis BH3000» фирмы «Philips» (Нидерланды), «XRE» фирмы «ADC» (США)).

Статистическая обработка данных

Исследуемая группа пациентов соответствовала нормальному распределению. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием программ Excel и Statistica 7.0, с помощью которой выполнялось также графическое представление данных. Средние показатели представлены как $M \pm \sigma$, где M – средняя арифметическая величина вариационного ряда, а σ – ошибка среднего. Достоверность различия средних величин оценивали по t -критерию Стьюдента. Достоверность различия качественных показателей оценивали параметрическим методом с использованием критерия Пирсона χ^2 . Зависимость переменных определена с помощью дисперсионного анализа ANOVA. С последующим анализом *post-hoc* и парным сравнением групп по Ньюману–Келсу с применением поправки Бонферрони. Оценку отдаленных результатов проводили с помощью актуарных кривых, построенных по методу Kaplan–Meier. Достоверным различие величин и кривых Kaplan–Meier считали при $p < 0,05$. Факторы риска считались значимыми также при $p < 0,05$.

Таблица 2

Характер и число «больших кардиальных событий»

«Большие кардиальные события»	Число пациентов, n (%)
Отсутствовали	44 (80)
Острый инфаркт миокарда	1 (1,8)
Прогрессирование стенокардии	2 (3,6)
Тромбоз стента с ОИМ с подъемом сегмента ST	3 (5,4)
Тромбоз стента без ОИМ, без подъема сегмента ST	3 (3,6)
Тромбоз стента с клиникой нестабильной стенокардии	2 (3,6)

Результаты

В ходе нашего исследования были зафиксированы «большие кардиальные события»: острый инфаркт миокарда, прогрессирование стенокардии, тромбоз стента с развитием ОИМ с подъемом сегмента ST, тромбоз стента с развитием острого инфаркта миокарда без подъема сегмента ST, тромбоз стента с клиникой нестабильной стенокардии – у 11 пациентов из 55 (табл. 2).

Влияние клинических факторов на развитие «больших кардиальных событий»

В нашем исследовании частота наступления «больших кардиальных событий» не зависела от клинических факторов (веса, пола, наличия сахарного диабета, курения и выраженности атеросклероза коронарных артерий). Однако надо отметить, что у трех пациентов из 11 осложнения произошли на фоне преждевременной отмены клопидогрела в сроки до 1 года, остальные пациенты получали двойную антиагрегантную терапию более 1 года. При приеме клопидогрела опасность тромбоза снижается к концу 1-го года наблюдения, на 2-й год тромбоз не является основным видом осложнений. Статистическая обработка подтверждает тенденцию к падению количества тромбозов стентов со временем (максимально правдоподобный $\chi^2(2)=7,35$; $p=0,025$). После 2 лет наблюдения чаще встречалась стенокардия

и острый инфаркт миокарда на фоне прогрессирования атеросклероза в нативных коронарных артериях.

Влияние лабораторных факторов на развитие «больших кардиальных событий»

В нашем исследовании анализировали показатели функции тромбоцитов: агрегацию тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ (по данным световой агрегометрии), МА (ТЭГ) – максимальную амплитуду; агрегацию с арахидоновой кислотой % (ТЭГ); агрегацию с АДФ (ТЭГ); PRU (VerifyNow); процент ингибирования

P2Y12 (VerifyNow); ARU – aspirin reaction units (VerifyNow). Как видно из таблицы 3, при проведении дисперсионного анализа выявлена значимая связь между тремя лабораторными показателями функции тромбоцитов и частотой возникновения «больших кардиальных событий». Чаше осложнения отмечались у пациентов при агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ выше $48 \pm 4,6\%$ ($p=0,028$) – по данным световой агрегометрии, при уровне PRU выше $225 \pm 21,2$ ($p<0,001$) и ингибировании P2Y12 ниже $27,3 \pm 4,18\%$ ($p=0,007$) по данным VerifyNow (рис. 1). По данным

Таблица 3

Средние показатели функции тромбоцитов и развитие кардиальных осложнений после ЧКВ у пациентов со стабильной ИБС

Осложнения	Значение	ТЭГ			Агрегация с 5 мкмоль/л АДФ *						VerifyNow		
		МА, мм	АрхК, %	АДФ, %	до	после	через 1 мес	через 3 мес	через 6 мес	через 12 мес	PRU	ARU	% инг. P2Y12
Нет	Среднее	60,1	25,00	24,20	38,42	51,29	41,5	38,62	36,95	36,86	146,3	382,0	45,77
	±m	0,60	2,74	2,15	1,81	1,95	1,63	1,51	1,70	2,23	8,92	6,62	3,12
Есть	Среднее	59,2	30,55	40,28	48,09	59,36	49,0	28,33	24,67	24,33	225,4	407,8	27,36
	±m	1,82	9,01	8,47	4,60	3,44	10,0	16,17	12,45	12,73	21,27	15,9	4,18
ANOVA	F	0,42	0,62	7,23	5,11	3,59	1,90	2,42	4,06	2,96	14,61	2,81	7,77
	p (F)	0,52	0,434	0,010	0,028	0,064	0,18	0,134	0,056	0,100	<0,001	0,100	0,007

* Агрегация с 5 мкмоль/л АДФ относительных единиц по данным световой агрегометрии.

Примечание. m – ошибка среднего; ТЭГ – тромбоэластограмма; МА – максимальная амплитуда; АрхК – агрегация с арахидоновой кислотой; АДФ – агрегация с АДФ; PRU – P2Y12 reaction units; % инг. P2Y12 – процент ингибирования рецепторов P2Y12; ARU – aspirin reaction units; F – критерий Фишера; p (F) – значимость различия.

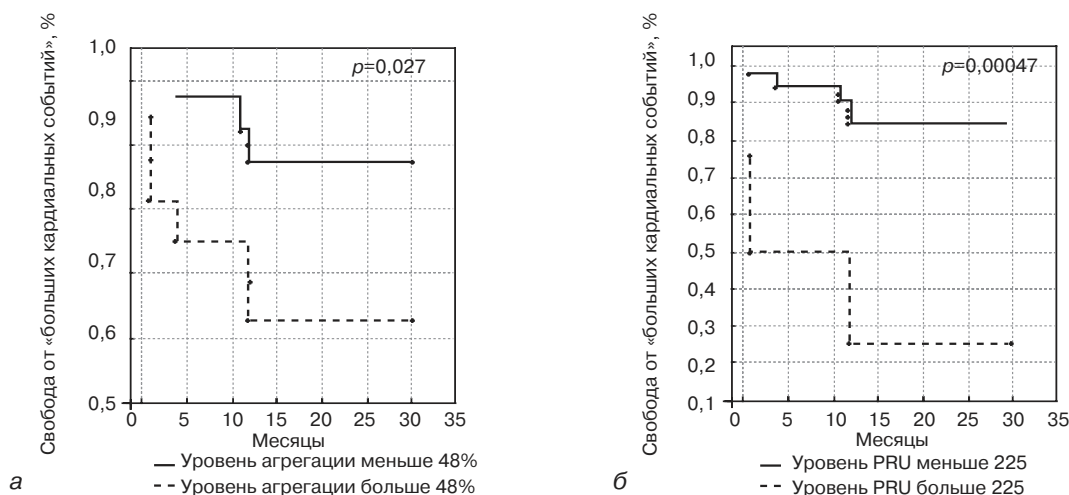


Рис. 1. Актуарная свобода от «больших ишемических событий» у пациентов со стабильной ИБС после ЧКВ в зависимости от:

а – уровня агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ по данным световой агрегометрии; б – уровня PRU по данным VerifyNow

тромбоэластографии также отмечена значимая связь между значениями АДФ и развитием осложнений ($p=0,01$). Однако актуарная свобода от «больших кардиальных событий» у пациентов при значениях агрегации тромбоцитов с АДФ (ТЭГ) выше 40% и ниже 40% статистически не различалась ($p=0,07$).

Актуарная свобода от «больших кардиальных событий» была достоверно ниже у пациентов с уровнем агрегации с 5 мкмоль/л более 48% ($p=0,027$) по данным световой агрегометрии и у пациентов с уровнем PRU более 225 ($p=0,00046$) по данным VerifyNow.

Взаимосвязь клинико-лабораторных факторов

В нашем исследовании показатели функции тромбоцитов – агрегация с 5 мкмоль/л АДФ, агрегация с АДФ% (ТЭГ), МА (максимальная амплитуда), агрегация с арахидоновой кислотой (ТЭГ), PRU, процент ингибирования рецепторов P2Y₁₂ не зависели от факторов риска, а именно от пола, курения, наличия сахарного диабета, гипертонии, уровня холестерина. Также не отмечено значимых различий показателей функции тромбоцитов в зависимости от наличия или отсутствия у пациентов перенесенного инфаркта миокарда в анамнезе. Показатели функции тромбоцитов не зависели от исходного количества тромбоцитов, кроме МА (максимальной амплитуды), которая значимо коррелирует с этим показателем ($p=0,016$).

Влияние генетических факторов на развитие «больших кардиальных событий»

После завершения основного этапа исследования (во время последнего визита) у всех пациентов была взята кровь для проведения генотипирования полиморфизма CYP2C19*2 и CYP2C19*3 путем аллель-специфичной ПЦР, в результате которого были выделены 3 группы пациентов:

1. CYP2C19*2 (GG) – нормальный генотип.

2. CYP2C19*2 (GA) – гетерозиготное носительство по А-аллелю.

3. CYP2C19*2 (AA) – гомозиготное носительство по А-аллелю.

В нашем исследовании нормальный генотип был выявлен у 39 пациентов (70,9±6%), 14 (25,5±6%) оказались гетерозиготными по А-аллелю G681A полиморфизма CYP2C19 (GA) и 2 (3,6±3%) – гомозиготными по А-аллелю G681A полиморфизма CYP2C19 (AA). Полиморфизм гена CYP2C19*2 значимо влиял на несколько средних показателей, а именно агрегацию с АДФ $p(t)=0,007$ (ТЭГ), агрегацию с 5 мкмоль/л АДФ до стентирования $p(t)=0,05$ (световая агрегометрия), на значения PRU $p(t)=0,022$ (VerifyNow). Все показатели приведены в период до стентирования после получения нагрузочной дозы клопидогрела.

Как видно из таблицы 4, в ходе выполненного дисперсионного анализа убедительных данных о влиянии различных видов генотипа CYP2C19*2 на число «больших кардиальных событий» получено не было (максимально правдоподобный $\chi^2(12)=12,83$; $p=0,38$).

Взаимосвязь клинико-лабораторных и генетических факторов

Из всех показателей, анализируемых в нашем исследовании, наиболее значимое влияние на «большие кардиальные события» оказали два – агрегация с 5 мкмоль/л АДФ и PRU (табл. 5, 6).

У пациентов с нормальным генотипом (GG) и наличием осложнений отмечена тенденция к увеличению значений агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ (рис. 2). У данной группы пациентов влияние значений степени агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ на возможное появление послеоперационных осложнений статистически незначимо. Однако при наличии мутации в гене CYP2C19*2 (GA+AA) среднее значение агрегации тромбоцитов возрастает, при этом наибольшее значение

Таблица 4

Влияние генетических вариантов CYP2C19*2 на развитие «больших кардиальных событий»: таблица сопряженности

Генетические варианты	«Большие кардиальные события»						Итого
	Нет	ОИМ	Стенокардия	Тромбоз+ ОИМ с ST	Тромбоз+ ОИМ без ST	Тромбоз+ стенокардия	
G/G	33	0	2	2	1	1	39
%	84,62	0	5,13	5,13	2,56	2,56	
G/A	10	1	0	1	1	1	14
%	71,43	7,14	0	7,14	7,14	7,14	
A/A	1	0	0	1	0	0	2
%	50,00	0	0	50,00	0	0	
Всего...	44	1	2	4	2	2	55

Примечание. GG – нормальный генотип; GA – гетерозиготное носительство по A-аллелю; AA – гомозиготное носительство по A-аллелю.

Таблица 5

Вероятности случайных различий между комбинациями уровней факторов – уровня агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ, полиморфизма гена CYP2C19*2 и развития «больших кардиальных событий» (по тесту Ньюмена–Келлса)

Группа	Средние значения агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль АДФ			
	Группа 1 37,52±2,13	Группа 2 41,13±3,49	Группа 3 37,67±5,26	Группа 4 60,60±1,72
	<i>p</i> (F)	<i>p</i> (F)	<i>p</i> (F)	<i>p</i> (F)
1	–	0,808	0,979	0,001
2	0,808	–	0,553	0,002
3	0,979	0,553	–	0,001
4	0,001	0,002	0,001	–

Примечание. Группа 1 – нет полиморфизма гена CYP2C19*2 и нет осложнений; группа 2 – нет полиморфизма гена CYP2C19*2 и есть осложнения; группа 3 – есть полиморфизм гена CYP2C19*2 и нет осложнений; группа 4 – есть полиморфизм гена CYP2C19 и есть осложнения.

Таблица 6

Вероятности случайных различий между комбинациями уровней факторов – уровня PRU, полиморфизма гена CYP2C19*2 и развития «больших кардиальных событий» (по тесту Ньюмена–Келлса)

Группа	Средние значения PRU			
	Группа 1 147±11	Группа 2 144±12	Группа 3 187±20	Группа 4 271±30
	<i>p</i> (F)	<i>p</i> (F)	<i>p</i> (F)	<i>p</i> (F)
1	–	0,879726	0,135138	0,000065
2	0,879726	–	0,158258	0,000225
3	0,135138	0,158258	–	0,023401
4	0,000065	0,000225	0,023401	–

См. примечание к таблице 5.

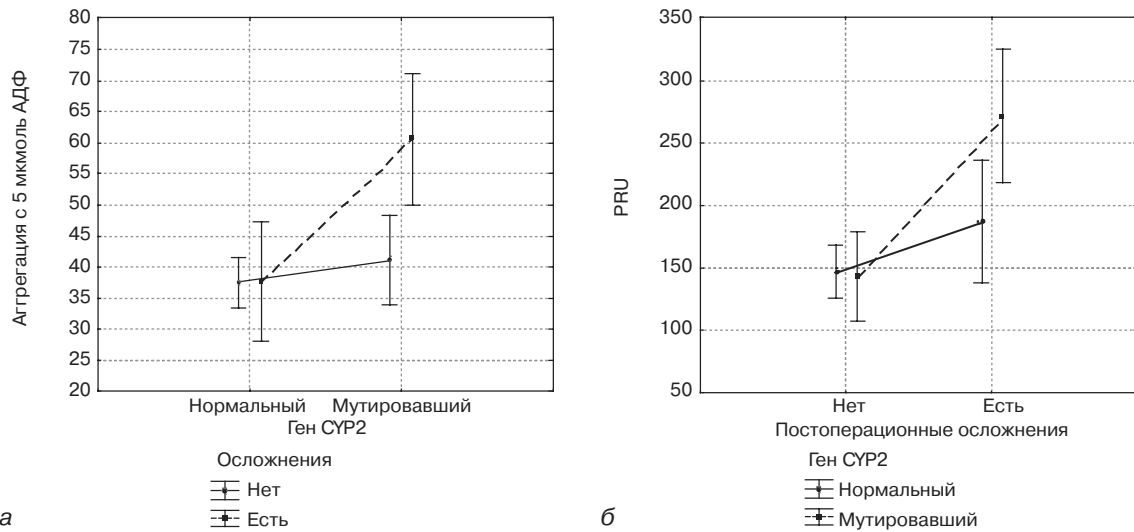


Рис. 2. Совместное влияние на «большие кардиальные события» значений полиморфизма CYP2C19*2 гена CYP2C19 и:

а – агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ; б – PRU

наблюдается в группе с «большими кардиальными событиями».

Значение PRU незначительно зависит от наличия различных вариантов генотипа CYP2C19*2 ($p=0,057$); при этом наличие осложнений зависит от уровня PRU ($p<0,001$). При оценке совместного влияния значений PRU и наличия мутации в гене CYP2C19*2 (GA+AA) на «большие кардиальные события» выявлена значимая связь ($p=0,041$). Средние показатели PRU у пациентов с гетерозиготным и гомозиготным носительством CYP2C19*2 в сравнении с пациентами с нормальным генотипом возрастают, увеличивая риск «больших кардиальных событий».

Обсуждение

В нашем исследовании не было получено значимой связи между клиническими факторами (весом, полом, наличием сахарного диабета, курением, выраженностью атеросклероза коронарных артерий) и частотой возникновении «больших кардиальных событий» при проведении чрескожного коронарного вмешательства у пациентов с хронической ИБС. Эти данные отличаются от данных мировой литературы, вероятнее всего, в связи с малым чис-

лом наших собственных наблюдений. Однако надо отметить, что у трех пациентов в нашем исследовании осложнения произошли на фоне преждевременной отмены клопидогрела, остальные получали двойную антиагрегантную терапию более 1 года. По данным литературы, у пациентов, досрочно прекративших прием антиагрегантных препаратов, в 50% случаев развились неблагоприятные события [11]. Согласно данным английского регистра MINAP-GPRD, у пациентов, прекративших прием клопидогрела в течение 12 мес после острого коронарного синдрома, риск развития нефатального инфаркта миокарда и смерти возрастает в 2,62 раза (95% ДИ: 2,17–3,17) по сравнению с пациентами, продолжающими его прием [12].

В нашем исследовании продемонстрировано, что на возникновение «больших кардиальных событий» оказывали влияние лабораторные данные, свидетельствующие о повышенной реактивности тромбоцитов: значение агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ выше 48% ($p=0,027$), значение PRU выше 225 по данным VerifyNow ($p=0,00046$). При этом на уровень значений показателей функции тромбоцитов не оказывали влияние

факторы риска. Эти результаты согласуются с данными международных исследований у стабильных больных после проведения чрескожного коронарного вмешательства. В исследовании POPULAR повышенная реактивность тромбоцитов приравнена к основным факторам риска ишемических событий. По результатам этого исследования только три теста достоверно коррелировали с неблагоприятными ишемическими исходами: трансмиссионная агрегометрия, VerifyNow, Plateletworks. Высокая реактивность тромбоцитов соответствовала значениям: более 42,9% с 5 мкмоль/л АДФ ($p < 0,001$) по данным световой агрегометрии, PRU более 236 по данным VerifyNow ($p < 0,001$), более 80,5 по данным Plateletworks ($p = 0,005$) [13].

Для определения причин лабораторной резистентности был проведен генетический анализ во время последнего визита пациента. Как известно, клопидогрел – это неактивный метаболит. Чтобы стать активным лекарством, клопидогрел проходит несколько превращений с участием различных ферментов [14]. Гены CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4/5 и CYP1A2 играют незначительную роль в трансформации клопидогрела [1, 15]. По сравнению с ними CYP2C19 играет ключевую роль в метаболизме клопидогрела [1, 16]. В ряде работ изучалось влияние генетического полиморфизма CYP2C19 на антиагрегантное действие клопидогрела и клинические исходы при различных вариантах генотипа. Наличие полиморфизма CYP2C19*2 приводило к снижению ферментативной активности. Другие виды генетического полиморфизма CYP2C19 (*3–*8), которые могут приводить к снижению ферментативной активности, встречаются реже (менее 1%), поэтому их клиническое значение менее значимо [1]. В исследовании показано, что у носителей аллельных вариантов CYP2C19*2 и CYP2C19*3, получающих клопидогрел, выше риск сердечно-сосудистых событий в сравнении с пациентами,

не несущими данные аллельные варианты [17]. При изучении данных пациентов, перенесших реваскуляризацию миокарда, было выявлено, что носительство 2 аллелей CYP2C19*2 ассоциировалось с увеличением смертности от сердечно-сосудистых событий в 2,4 раза по сравнению с контрольной группой и в 3,4 раза при проведении чрескожных коронарных вмешательств [1]. Действительно, наличие у пациентов CYP2C19*2 аллели может являться независимым фактором, приводящим к снижению действия клопидогрела и увеличению на этом фоне числа неблагоприятных ишемических событий. Однако в нашем исследовании убедительных данных о независимом влиянии генотипа CYP2C19*2 на число «больших коронарных событий» получено не было. По результатам нашей работы, у пациентов с гетерозиготным и гомозиготным носительством CYP2C19*2 средние значения функций тромбоцитов, определяемые различными методами, были выше по сравнению с пациентами с нормальным генотипом CYP2C19*2. Но наличие генетического полиморфизма объясняет наличие высоких значений агрегации только у 5,2–12% из всех пациентов с высокой агрегацией на фоне двойной антиагрегантной терапии [1].

В нашем исследовании повышение значений агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ по данным световой агрегометрии и значений PRU по данным VerifyNow на фоне полиморфизма гена CYP2C19*2 увеличивало риск «больших коронарных событий».

В настоящее время выполнен ряд исследований, сравнивающих фармакогенетический подход к выбору антиагрегантов с традиционными методами тестирования при терапии клопидогрелом. Эксперты Американской ассоциации сердца отмечают, что целесообразность применения генетического или функционального тестирования для индивидуального подбора или коррекции антиагрегантной терапии пока не определена [17, 18].

По результатам нашей работы, оценка реактивности тромбоцитов – более достоверный метод оценки ответа на клопидогрел, чем генотипирование. Показано влияние лабораторных факторов на развитие «больших кардиальных событий», в то же время изолированное определение носительства аллельного варианта CYP2C19*2 в качестве фактора риска неблагоприятного прогноза «больших кардиальных событий» не является обоснованным. Мы предлагаем оценивать реактивность тромбоцитов с помощью световой агрегометрии, VerifyNow и ТЭГ до проведения вмешательства на коронарных артериях, особенно в группах высокого риска (у пациентов с ранее подтвержденными тромбозами стентов, со сложной коронарной анатомией, многососудистым поражением и пациентам, которым клопидогрел планируется использовать как единственный антиагрегант).

При выявлении лабораторной резистентности по данным световой агрегометрии, VerifyNow и ТЭГ рекомендуем проводить дополнительный поиск причин неэффективности антиагрегантной терапии. Увеличение средних показателей агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ и PRU на фоне полиморфизма CYP2C19*2 увеличивает риск «больших кардиальных событий». Поэтому следующим этапом должно применяться генотипирование как дополнительный метод определения причин резистентности к антиагрегантной терапии. В случае лабораторной резистентности на фоне генетического полиморфизма гена CYP2C19*2 обоснована смена клопидогрела на другой антиагрегант, метаболизм которого не связан с системой CYP (тикагрелор и др.). При отсутствии генетического полиморфизма необходимо проанализировать другие вероятные причины высокой остаточной реактивности тромбоцитов, роль которых была недооценена – прежде всего влияние противовоспалительных факторов, гиперхолестеринемии, взаимодействие с другими лекарственными средствами и др.

Выводы

1. У пациентов со стабильной ИБС увеличение средних значений показателей функции тромбоцитов на фоне двойной антиагрегантной терапии (агрегация тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ и PRU) может свидетельствовать об увеличении риска «больших кардиальных событий» после ЧКВ.

2. Убедительных данных, свидетельствующих о наличии независимого влияния различных видов генотипа CYP2C19*2 на число «больших кардиальных событий», не получено. Изолированное определение носительства аллельного варианта CYP2C19*2 в качестве фактора риска неблагоприятного прогноза «больших кардиальных событий» не представляется обоснованным.

3. У пациентов с гетерозиготным и гомозиготным носительством CYP2C19*2 повышение значений агрегации тромбоцитов с 5 мкмоль/л АДФ и значений PRU увеличивало риск «больших кардиальных событий». *Выполнение генетического анализа обоснованно у пациентов с подтвержденной лабораторной резистентностью.*

Литература

1. Trenk D., Kristensen S.D., Hochholzer W., Neumann F.-J. High on-treatment platelet reactivity and P2Y12 antagonist in clinical trials. *Thromb. Haemost.* 2013; 109 (2): 1–11.
2. Gum P.A., Kottke-Marchant K., Welsh P.A. et al. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41: 961–5.
3. Muller I., Besta F., Schulz C. et al. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb. Haemost.* 2003; 89 (5): 783–7.
4. Gurbel P., Bliden K., Hiatt B., O'Connor C. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation.* 2003. 107 (23): 2908–13.
5. Herlitz J., Toth P.P., Naesdal J. Low-dose aspirin therapy for cardiovascular prevention: quantification and consequences of poor compliance or discontinuation. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 2010; 2: 125–41.
6. Barragan P., Bouvier J.L., Roquebert P.Q. et al. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of

- vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* 2003; 59: 295–302.
7. Воробьева И.И., Рыжкова Е.В., Васильева Е.Ю., Шпектор А.В. Влияние системного воспаления на эффект антиагрегантной терапии у больных с острым коронарным синдромом. *Креативная кардиология.* 2012; 1: 5–14.
 8. Церетели Н.В., Иошина В.И. Актуальная проблема: антиагрегантная терапия при чрескожных коронарных вмешательствах. *Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН.* 2009; 10: 203–14.
 9. Mobley J., Bress S., Wortham D. et al. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am. J. Cardiol.* 2004; 93 (4): 456–8.
 10. Muller I., Besta F., Schulz C. et al. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb. Haemost.* 2003; 89 (5): 783–7.
 11. Herlitz J., Toth P.P., Naesdal J. Low-dose aspirin therapy for cardiovascular prevention: quantification and consequences of poor compliance or discontinuation. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 2010; 2: 125–41.
 12. Boggon R., van Staa T.P., Timmis 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; 32 (19): 2376–86.
 13. Gurbel P.A., Tantry U.S. Platelet function testing and genotyping improve outcome in patients treated with antithrombotic agents. *Circulation.* 2012; 125: 1276–87.
 14. Sangkuhl K., Shuldiner A.R., Klein T.E., Altman R.B. Clopidogrel pathway. *Pharmacogenet. Genomics.* 2010; 20 (7): 463–5.
 15. Clarke T.A., Waskell L.A. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug. Metab. Dispos.* 2003; 31: 53–9.
 16. Kazul M., Nishiya Y., Ishizuka T., Hagihara K., Farid N.A., Okazaki O., Ikeda T., Kurihara A. 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.* 2003; 31: 53–9.
 17. Сычев Д.А. Фармакогенетическое тестирование: клиническая интерпретация результатов. М.; 2011: 1–84.
 18. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patient's presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 2011; doi:10.1093/eurheartj/ehr236.

References

1. Trenk D., Kristensen S.D., Hochholzer W., Neumann F.-J. High on-treatment platelet reactivity and P2Y12 antagonist in clinical trials. *Thromb. Haemost.* 2013; 109 (2): 1–11.
2. Gum P.A., Kottke-Marchant K., Welsh P.A. et al. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41: 961–5.
3. Muller I., Besta F., Schulz C. et al. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb. Haemost.* 2003; 89 (5): 783–7.
4. Gurbel P., Bliden K., Hiatt B., O'Connor C. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation.* 2003. 107 (23): 2908–13.
5. Herlitz J., Toth P.P., Naesdal J. Low-dose aspirin therapy for cardiovascular prevention: quantification and consequences of poor compliance or discontinuation. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 2010; 2: 125–41.
6. Barragan P., Bouvier J.L., Roquebert P.Q. et al. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* 2003; 59: 295–302.
7. Vorobyeva I.I., Ryzhova E.V., Vasil'eva E.Yu., Shpektor A.V. Impact of systemic inflammation on efficacy of antiplatelet therapy in patients with acute coronary syndrome. *Kreativnaya Kardiologiya.* 2012; 1: 5–14.
8. Ceretelli N.V., Ioshina V.I. Current problems: antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention. *Bulleten' Nauchnogo Tsentra Serdechno-Sosudistoy Khirurgii imeni A.N. Bakuleva Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk.* 2009; 10: 203–14.
9. Mobley J., Bress S., Wortham D. et al. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am. J. Cardiol.* 2004; 93 (4): 456–8.
10. Muller I., Besta F., Schulz C. et al. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb. Haemost.* 2003; 89 (5): 783–7.
11. Herlitz J., Toth P.P., Naesdal J. Low-dose aspirin therapy for cardiovascular prevention: quantification and consequences of poor compliance or discontinuation. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 2010; 2: 125–41.
12. Boggon R., van Staa T.P., Timmis 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; 32 (19): 2376–86.

13. Gurbel P.A., Tantry U.S. Platelet function testing and genotyping improve outcome in patients treated with antithrombotic agents. *Circulation*. 2012; 125: 1276–87.
14. Sangkuhl K., Shuldiner A.R., Klein T.E., Altman R.B. Clopidogrel pathway. *Pharmacogenet. Genomics*. 2010; 20 (7): 463–5.
15. Clarke T.A., Waskeil L.A. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug. Metab. Dispos*. 2003; 31: 53–9.
16. Kazul M., Nishiya Y., Ishizuka T., Hagiwara K., Farid N.A., Okazaki O., Ikeda T., Kurihara A. 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*. 2003; 31: 53–9.
17. Sychev D.A. Pharmacogenetic testing: clinical interpretation of the results. Moscow; 2011: 1–84.
18. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patient's presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J*. 2011; doi:10.1093/eurheartj/ehr236.