

## Изучение ассоциации полиморфизмов T715P (RS6136), M62I (RS2228315), S290N (RS6131), V640L (RS6133) в гене Р-селектина и его лиганда с резистентностью к ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ишемической болезнью сердца после коронарного шунтирования

Косинова А. А.<sup>1</sup>, Монгуш Т. С.<sup>1,2</sup>, Гончаров М. Д.<sup>1,2</sup>, Субботина Т. Н.<sup>3</sup>, Семашенко К. С.<sup>3</sup>, Кочмарёва Г. Ю.<sup>3</sup>, Гринштейн Ю. И.<sup>1</sup>

**Цель.** Изучить ассоциацию полиморфизмов T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133) в гене Р-селектина с резистентностью к ацетилсалициловой кислоте (АСК) у пациентов с ишемической болезнью сердца после коронарного шунтирования (КШ).

**Материал и методы.** В исследование включено 90 пациентов в возрасте 61,5±6,9 года (70 мужчин и 20 женщин) с II-IV функциональным классом (ФК) стенокардии напряжения, согласно Канадской классификации. Атеросклеротический характер поражения коронарных артерий подтвержден коронароангиографией. Пациенты прекращали прием антиагрегантов до КШ минимум за 5 сут. Исследование агрегации проводилось на оптическом агрегометре с использованием индукторов АДФ в концентрации 5 мМ и арахидоновая кислота 1 мМ до КШ, на 1-3 сут. и на 8-10 сут. после оперативного лечения. Образцы ДНК были исследованы на наличие полиморфизмов T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133) в гене Р-селектина с помощью ПЦР в реальном времени при использовании аллель-специфичных праймеров.

**Результаты.** При сравнении АЧТВ, уровня фибриногена, агрегационной активности тромбоцитов с индукторами АДФ (5 мМ) и арахидоновая кислота (1 мМ) не было найдено отличий среди групп пациентов с гомозиготными и гетерозиготными вариантами генотипов изучаемых полиморфизмов как до, так и на 1-3, 8-10 сут. после КШ. Группы пациентов, имеющие гомозиготные варианты генотипов (T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133)), как по распространенной, так и по редкой аллели, статистически не отличались по наличию резистентности к АСК от соответствующих групп с гетерозиготными генотипами. В первые 10 дней послеоперационного периода в исследуемой группе у 4 пациентов наблюдались тромботические события (4,4%): острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения. По частоте неблагоприятных событий в первые 10 дней после КШ между группами пациентов, имеющих гомозиготные варианты исследуемых генотипов (T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133)) по распространенной аллели и группами с гетерозиготными вариантами соответствующих генотипов также не было выявлено статистически значимых отличий.

**Заключение.** Полиморфизмы rs6133, rs6163, rs2228315, rs6131 в гене Р-селектина тромбоцитов не ассоциированы с резистентностью к АСК и не ассоциированы с повышенной агрегационной активностью тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца. Редкие аллели Т, С, G, А изучаемых полиморфизмов не приводят к увеличению рисков неблагоприятных событий в первые 10 дней после КШ.

**Ключевые слова:** rs6133, rs6136, rs2228315, rs6131, ацетилсалициловая кислота, Р-селектин.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красно-

ярского 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 Р-селектина, выраженности межклеточного взаимодействия и воспаления".

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск; <sup>2</sup>ФГБУ Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии Минздрава России, Красноярск; <sup>3</sup>ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет (СФУ), Красноярск, Россия.

Косинова А. А.\* — к.м.н., ассистент кафедры терапии, ORCID: 0000-0002-7412-2516, Монгуш Т. С. — соискатель кафедры терапии, врач-кардиолог, ORCID: 0000-0003-4530-8730, Гончаров М. Д. — соискатель кафедры терапии, врач лабораторной диагностики, ORCID: 0000-0001-5583-7412, Субботина Т. Н. — к.б.н., зав. научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований, ORCID: 0000-0001-7790-5033, Семашенко К. С. — студентка 3 курса бакалавриата Института фундаментальной биологии и биотехнологии, ORCID: 0000-0002-8735-2716, Кочмарёва Г. Ю. — магистрантка 2 курса магистратуры Института фундаментальной биологии и биотехнологии, ORCID: 0000-0001-7570-0835, Гринштейн Ю. И. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой терапии ИПО, ORCID: 0000-0002-4621-1618.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): alexandrakosinova@gmail.com

АДФ — аденозиндифосфат, АСК — ацетилсалициловая кислота, АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, ИБС — ишемическая болезнь сердца, КШ — коронарное шунтирование, ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Рукопись получена 11.03.2019

Рецензия получена 19.04.2019

Принята к публикации 25.04.2019



**Для цитирования:** Косинова А. А., Монгуш Т. С., Гончаров М. Д., Субботина Т. Н., Семашенко К. С., Кочмарёва Г. Ю., Гринштейн Ю. И. Изучение ассоциации полиморфизмов T715P (RS6136), M62I (RS2228315), S290N (RS6131), V640L (RS6133) в гене Р-селектина и его лиганда с резистентностью к ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ишемической болезнью сердца после коронарного шунтирования. *Российский кардиологический журнал*. 2019;24(10):22–28  
doi:10.15829/1560-4071-2019-10-22-28

## Association of T715P (RS6136), M62I (RS2228315), S290N (RS6131), V640L (RS6133) polymorphisms in the P-selectin gene and its ligand with acetylsalicylic acid resistance in patients with coronary artery disease after coronary artery bypass grafting

Kosinova A. A.<sup>1</sup>, Mongush T. S.<sup>1,2</sup>, Goncharov M. D.<sup>1,2</sup>, Subbotina T. H.<sup>3</sup>, Semashchenko K. S.<sup>3</sup>, Kochmareva G. Yu.<sup>3</sup>, Grinshteyn Yu. I.<sup>1</sup>

**Aim.** To study the association of T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133) polymorphisms in the P-selectin gene with resistance to acetylsalicylic acid (ASA) in patients with coronary artery disease after coronary artery bypass grafting (CABG).

**Material and methods.** The study included 90 patients aged 61.5±6.9 years (70 men and 20 women) with II-IV functional class (FC) angina pectoris, according to the Canadian Cardiovascular Society grading. The atherosclerotic nature of coronary artery disease is confirmed by coronary angiography. Patients stopped taking antiplatelet agents before CABG for at least 5 days. The aggregation study was carried out with an optical aggregometer using ADP inducers (5 μM) and arachidonic acid (1 μM) before CABG, on 1-3 and 8-10 days after surgical treatment.

DNA samples were examined for the presence of T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133) polymorphisms in the P-selectin gene using real-time PCR with allele-specific primers.

**Results.** When comparing aPTT, fibrinogen level, platelet aggregation activity with ADP inducers (5 μM) and arachidonic acid (1 μM), no differences were found among groups of patients with homozygous and heterozygous variants of the studied polymorphisms genotypes, both before and on 1-3, 8-10 days after CABG. Regarding presence of ASA resistance, patient groups with homozygous variants of genotypes (T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133)) did not statistically differ in prevailing or rare alleles from the corresponding groups with heterozygous genotypes. In the first 10 days of the postoperative period, thrombotic events (4.4%) were observed in 4 patients in the study group: acute myocardial infarction, acute cerebrovascular accident. Regarding frequency of adverse events in the first 10 days after CABG, between groups of patients with homozygous variants of the studied genotypes (T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133)) in prevailing allele and groups with heterozygous variants of the corresponding genotypes there were also no statistically significant differences.

**Conclusion.** Rs6133, rs6163, rs2228315, rs6131 polymorphisms in the platelet P-selectin gene are not associated with ASA resistance and are not associated with increased platelet aggregation activity in patients with coronary artery disease. The rare T, C, G, A alleles of the studied polymorphisms do not lead to an increase in the risks of adverse events in the first 10 days after CABG.

**Key words:** rs6133, rs6136, rs2228315, rs6131, acetylsalicylic acid, P-selectin.

**Conflicts of Interest:** nothing to declare.

**Funding.** The study was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research, the Government of the Krasnoyarsk Territory, the Krasnoyarsk Regional Science Fund as part of a scientific project: № 18-415-243003 "Characterization of antiplatelet therapy of patients with coronary artery disease (CAD) depending on the level of expression of the P-selectin gene, the pronouncement of intercellular interaction and inflammation".

<sup>1</sup>Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk; <sup>2</sup>Federal Center for Cardiovascular Surgery, Krasnoyarsk; <sup>3</sup>Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia.

Kosinova A. A. ORCID: 0000-0002-7412-2516, Mongush T. S. ORCID: 0000-0003-4530-8730, Goncharov M. D. ORCID: 0000-0001-5583-7412, Subbotina T. H. ORCID: 0000-0001-7790-5033, Semashchenko K. S. ORCID: 0000-0002-8735-2716, Kochmareva G. Yu. ORCID: 0000-0001-7570-0835, Grinshteyn Yu. I. ORCID: 0000-0002-4621-1618.

**Received:** 11.03.2019 **Revision Received:** 19.04.2019 **Accepted:** 25.04.2019

**For citation:** Kosinova A. A., Mongush T. S., Goncharov M. D., Subbotina T. H., Semashchenko K. S., Kochmareva G. Yu., Grinshteyn Yu. I. Association of T715P (RS6136), M62I (RS2228315), S290N (RS6131), V640L (RS6133) polymorphisms in the P-selectin gene and its ligand with acetylsalicylic acid resistance in patients with coronary artery disease after coronary artery bypass grafting. *Russian Journal of Cardiology*. 2019;24(10):22–28  
doi:10.15829/1560-4071-2019-10-22-28

Известно, что воспалительный компонент играет ключевую роль в патогенезе атеросклероза, включая привлечение и адгезию циркулирующих лейкоцитов к эндотелию сосудов. Повышенный уровень воспаления может приводить к недостаточному ответу тромбоцитов на ацетилсалициловую кислоту (АСК) у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), что снижает эффективность вторичной профилактики и повышает риск кардиоваскулярных событий [1].

В связи с этим представляется перспективным обсуждение полиморфизмов в гене Р-селектина, которые могут быть кандидатами в развитии ИБС, в повышенном воспалительном ответе и как следствие резистентности к АСК с высоким риском неблагоприятных событий. Р-селектин, член семейства адгезивных молекул селектина, инициирует активацию лейкоцитов и их взаимодействие с медиаторами воспаления и эндотелием сосудов, тромбоцитов с эндотелием и лейкоцитов с тромбоцитами [2]. Ряд исследований подтверждает ключевую роль

Р-селектина в формировании атеросклеротического поражения, тромбозе и изменениях артериальной стенки [3]. Повышенный уровень экспрессии Р-селектина рассматривается как лабораторный предиктор неблагоприятных исходов у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) без подъема сегмента ST [4] и у пациентов ОКС с подъемом сегмента ST после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) [5]. По данным авторов, повышение уровня Р-селектина на 10-е сут. является предиктором развития тромбоза стента в отдаленном периоде. Увеличение концентрации Р-селектина у больных в остром периоде инфаркта миокарда (ИМ) достоверно ассоциировалось с тяжелыми сосудистыми осложнениями в последующие 3 месяца [6].

Известно, что Р-селектин кодируется геном *SELP*, расположенным на хромосоме 1q21-q24, охватывающем >50 kb, и содержит 17 экзонов, 16 из которых кодируют структурно различные области [7]. Ген является высокополиморфным.

Группа исследователей под руководством Herrmann S. предположила, что увеличение уровня Р-селектина в плазме может привести к развитию ИБС. Проведя анализ последовательности гена, учеными были выявлены 13 полиморфизмов, которые могут быть ассоциированы с ИБС [8]. В частности, такими полиморфизмами являются T715 (rs6163), M62I (rs2228315), S290N (rs6131). Поскольку в литературе имеются предположения о возможности влияния этих полиморфизмов, наряду с некоторыми другими на изменении аффинности связывания Р-селектина с Р-селектин лигандом 1 [9], мы предположили, что данные полиморфизмы могут быть причиной недостаточного ответа тромбоцитов на АСК.

Таким образом, целью нашего исследования было изучение ассоциации полиморфизмов T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133) в гене Р-селектина тромбоцитов с резистентностью к АСК у пациентов после коронарного шунтирования.

### Материал и методы

Исследование выполнено на базе Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии г. Красноярск. В исследование включено 90 пациентов (70 мужчин и 20 женщин) с II-IV функциональным классом (ФК) стенокардии напряжения, согласно Канадской классификации. Из них 52 (57,8%) пациента с II ФК, 36 (40%) пациентов с III ФК и 2 (2,2%) с IV ФК стенокардии напряжения, в возрасте от 42 до 78 лет (средний возраст  $61,5 \pm 6,9$  года), с атеросклеротическим поражением коронарных артерий, подтвержденным коронароангиографией. Уровень холестерина составил  $4,63 \pm 1,43$  ммоль/л. Активными курильщиками были 37,7% пациентов, 26,6% имели сахарный диабет, 28,9% — ожирение.

Пациентам выполнялось аорто/маммарокоронарное шунтирование: 76 пациентам (84,5%) в условиях искусственного кровообращения, 14 пациентам (15,5%) на работающем сердце.

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

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 стабильной стенокардии согласно существующим рекомендациям российского кардиологического общества [10]. Пациенты прекращали прием антиагрегантов до КШ минимум за 5 сут. В послеоперационном периоде с первых суток всем пациентам назначалось 100 мг кишечнорастворимой формы АСК, из них 54 пациента получали терапию АСК, 36 пациентов комбинированную антиагрегантную терапию: АСК + клопидогрель (75 мг/сут.).

В качестве материала исследования использовалась периферическая кровь, полученная путем пункции локтевой вены. Кровь, предназначенная для исследования агрегации тромбоцитов, забиралась в пробирку с 3,8% цитратом натрия в соотношении крови и реагента 9:1. Для генетических исследований венозная кровь собиралась в пробирку, где в качестве антикоагулянта использовался ЭДТА-К2 в концентрации 1,2 мг/мл крови. Взятие крови производилось с помощью закрытой вакуумной системы Vac-Tube. Исследование агрегации проводилось на оптическом агрегометре “CHRONO-LOG 490”, США с использованием индукторов АДФ в концентрации 5  $\mu$ М и арахидоновая кислота 1  $\mu$ М до КШ, на 1-3 сут. и на 8-10 сут. после оперативного лечения. Резистентность к АСК определялась при уровне агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой более 20% хотя бы в одной точке наблюдения (недостаточный ответ тромбоцитов согласно инструкции к индуктору, разработанному “НПО Ренам”) на дезагрегантной терапии после КШ или при инкубации обогащённой тромбоцитами плазмы пациента с АСК *in vitro* до начала лечения АСК и проведения оперативного вмешательства (патент РФ № 2413953 “Способ диагностики резистентности к ацетилсалициловой кислоте”, Гринштейн Ю. И. и др.).

Для анализа полиморфизмов в гене Р-селектина V640L (rs6133), S290N (rs6131) ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови с использованием реагента “АмплиПрайм ДНК-Сорб-В” (ООО “ИнтерЛабСервис”, Москва). Далее с образцами выделенной ДНК была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием комплекта реагентов для амплификации “ПЦР-Комплект” (“Синтол”, Москва) с детекцией результатов в режиме реального времени. Для анализа полиморфизма V640L (rs6133) были использованы аллель-специфичные праймеры, заимствованные из статьи Bugert P, et al., 2004 (F1: 5'-CACTTCCTACTCCAGGGG-3'; F2: 5'-CACTTCCTACTCCAGGGT-3' и R: 5'-CAACATA-CAGGCACAATGGC-3') [11]. Для анализа полиморфизма S290N (rs6131) были использованы аллель-специфичные праймеры, заимствованные из статьи Bugert P, et al., 2004 (F1: 5'-CACCTGGAAGCCC-CCAG-3'; F2: 5'-CACCTGGAAGCCCCCAA-3' и R: 5'-TTGGACAGAATGGAGGTTGC-3') [11].

Таблица 1

**Распространенность выявленных вариантов генотипов по изучаемым полиморфизмам в группах пациентов с ИБС чувствительных и резистентных к АСК**

Полиморфизм	Генотип	Частота встречаемости среди пациентов с ИБС (чувствительные к АСК), n=90, n (%)	Частота встречаемости среди пациентов с ИБС (резистентные к АСК), n (%)	ОШ, [95% ДИ]	Значение p
V640L (rs6133)	GG	66 (86,8%)	10 (13,2%)	1,970 [0,232-16,741]	0,820
	GT	13 (92,9%)	1 (7,1%)		
T715P (rs6136)	AA	64 (90,1%)	7 (9,9%)	0,410 [0,106-1,584]	0,421
	AC	15 (78,9%)	4 (21,1%)		
M62I (rs2228315)	AA	68 (86,1%)	11 (13,9%)	1,618 [0,188-13,916]	0,913
	AG	10 (90,9%)	1 (9,1%)		
S290N (rs6131)	GG	54 (84,4%)	10 (15,6%)	2,222 [0,452-10,920]	0,292
	GA	22 (91,7%)	2 (8,3%)		
	AA	2 (100%)	0		

**Сокращения:** ОШ — отношение шансов, ДИ — доверительный интервал.

Таблица 2

**Характеристика некоторых показателей гемостаза среди пациентов с ИБС в зависимости от генотипа по полиморфизмам rs6133, rs6136**

Признак	rs6133			rs6136		
	Генотип GG (n=76)	Генотип GT (n=14)	Значение p	Генотип AA (n=71)	Генотип AC (n=19)	Значение p
АЧТВ до КШ, сек	26,7±3,2	27,9±3,4	0,248	26,5±3,2	28,4±2,8	0,063
Фибриноген до КШ, г/л	2,9±0,6	2,9±0,7	0,888	2,9±0,6	3,2±0,6	0,057
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мМ АДФ до КШ	47,9±17,3	46,9±17,1	0,813	48,2±17,2	46,1±17,6	0,707
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислотой до КШ	49,3±21,4	52,2±18,4	0,826	50,1±21,4	48,7±19,7	0,768
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мМ АДФ на 1-3 сут. после КШ	44,7±16,8	43,3±19,0	0,728	45,8±18,0	41,9±15,9	0,347
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислотой на 1-3 сут. после КШ	24,9±20,5	34,2±23,9	0,220	27,0±20,7	25,4±23,5	0,668
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мМ АДФ на 8-10 сут. после КШ	29,9±13,8	39,4±21,2	0,099	31,8±14,2	30,1±16,2	0,455
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислотой на 8-10 сут. после КШ	11,2±10,5	10,2±11,0	0,836	11,5±13,4	9,2±8,8	0,858

**Примечание:** критерий Манна-Уитни.

**Сокращения:** АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, КШ — коронарное шунтирование.

С целью анализа полиморфизмов T715P (rs6136) в гене Р-селектина и M62I (rs2228315) в гене гликопротеинового лиганда Р-селектина ДНК из лейкоцитов цельной крови выделяли с использованием реагентов “ДНК-экспресс-кровь” (ООО НПФ “Литех”, Москва). Исследование полиморфизмов T715P и M62I проводили с использованием соответствующих коммерческих наборов реагентов для выявления полиморфизмов в геноме человека (ООО НПФ “Литех”, Москва).

**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,  $\sigma$  — 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  $\chi^2$ -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. Для анализа выборки применена общая модель наследования. Отношение шансов (ОШ) и относительный риск считали статистически значимым, если в границы их 95% доверительного интервала (ДИ) не попадает 1. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости 95% ( $p < 0,05$ ).

Таблица 3

**Характеристика некоторых показателей гемостаза среди пациентов с ИБС в зависимости от генотипа по полиморфизмам rs2228315, rs6131**

	rs2228315			rs6131		
	Генотип AA (n=79)	Генотип AG (n=11)	Значение p	Генотип GG (n=64)	Генотип GA+AA (n=26)	Значение p
АЧТВ до КШ, сек	26,9±3,3	27,2±2,5	0,740	26,4±2,9	28,2±3,6	0,058
Фибриноген до КШ, г/л	2,9±0,6	2,9±0,4	0,692	2,9±0,6	2,9±0,6	0,785
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мМ АДФ до КШ	48,7±16,6	39,6±19,2	0,141	51,4±16,3	38,4±16,0	0,055
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислотой до КШ	50,1±21,3	45,8±18,4	0,238	49,8±21,5	49,6±19,9	0,777
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мМ АДФ на 1-3 сут. после КШ	46,6±17,4	33,9±15,5	0,056	45,6±18,1	43,5±16,6	0,975
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислотой на 1-3 сут. после КШ	28,1±21,6	17,2±15,4	0,153	27,2±21,2	25,6±21,5	0,585
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 5 мМ АДФ на 8-10 сут. после КШ	32,2±15,0	25,7±8,9	0,191	31,6±15,4	30,8±12,5	0,964
Агрегация тромбоцитов (амплитуда) с 1 мМ арахидоновой кислотой на 8-10 сут. после КШ	11,7±13,0	6,4±7,3	0,290	12,2±13,5	8,3±9,5	0,170

Примечание: критерий Манна-Уитни.

Сокращения: АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, КШ — коронарное шунтирование.

Таблица 4

**Ассоциация редких аллелей полиморфизмов rs6133, rs6136, rs2228315, rs6131 гена Р-селектина с сердечно-сосудистыми событиями в течение первых 10 дней после КШ**

Генотип	Количество пациентов с тромботическими событиями	ОШ	95% ДИ	Значение p
V640L (rs6133), GG	4	1,802	0,092-35,293	0,681
V640L (rs6133), GT	0			
T715P (rs6136), AA	2	0,354	0,033-1,884	0,354
T715P (rs6136), AC	2			
M62I (rs2228315), AA	3	0,403	0,044-4,232	0,734
M62I (rs2228315), AG	1			
S290N (rs6131), GG	2	0,394	0,051-2,911	0,643
S290N (rs6131), GA	2			

Сокращения: ОШ — отношение шансов, ДИ — доверительный интервал.

**Результаты**

Распространенность выявленных вариантов генотипов по изучаемым полиморфизмам в группах пациентов с ИБС чувствительных и резистентных к АСК представлены в таблице 1.

Частота гомозиготного генотипа GG полиморфизма rs6133 составила 84,6%; гетерозиготного генотипа GT — 15,4%; гомозиготного генотипа AA полиморфизма rs6136 — 78,8%, гетерозиготного генотипа AC — 21,1%. 87,8% пациентов имели гомозиготный генотип AA, 12,2% гетерозиготный генотип AG полиморфизма rs2228315. 71,1% пациентов имели гомозиготный генотип по распространенной аллели GG и 2,2% были носителями гомозиготного генотипа по редкой аллели AA полиморфизма rs6131.

Среди пациентов с гомозиготным вариантом генотипа GG полиморфизма rs 6133 13,2% были резистентными к АСК, по сравнению с 7,1% среди группы пациентов с генотипом GT (ОШ=0,410, 95% ДИ

[0,232-16,741], p=0,820). Среди пациентов с гомозиготным вариантом генотипа AA полиморфизма rs6136 9,9% были резистентными к АСК против 21,1% среди группы пациентов с генотипом AC (ОШ=0,410, 95% ДИ [0,106-1,584], p=0,421). 13,9% резистентных к АСК пациентов встречалось среди пациентов с гомозиготным вариантом генотипа AA и 9,1% среди пациентов с гетерозиготным вариантом генотипа AG полиморфизма rs2228315 (ОШ=1,618, 95% ДИ [0,188-13,916], p=0,913). Пациенты, имевшие генотип GG полиморфизма rs6131, в 15,6% случаев являлись резистентными к АСК по сравнению с 8,3% случаев среди пациентов с генотипом GA (ОШ=0,394, 95% ДИ [0,051-2,911], p=0,643).

Можно отметить, что на данном этапе работы не выявлено статистически достоверных отличий по распространенности выявленных вариантов генотипов по изучаемым полиморфизмам в группах пациентов с ИБС чувствительных и резистентных к АСК.

При сравнении АЧТВ, уровня фибриногена, агрегационной активности тромбоцитов с индукторами АДФ (5  $\mu$ М) и арахидоновая кислота (1  $\mu$ М) не было найдено отличий между группами пациентов с гомо- и гетерозиготными вариантами генотипов изучаемых полиморфизмов как до, так и на 1-3, 8-10 сут. после КШ (табл. 2, 3). Редкие аллели полиморфизмов rs6133, rs6136, rs2228315, rs6131 не ассоциированы с повышенной агрегационной активностью тромбоцитов после КШ.

В первые 10 дней послеоперационного периода в исследуемой группе у 4 пациентов наблюдались тромботические события (4,4%): 3 — острое нарушение мозгового кровообращения и 2 — периоперационные ИМ. У одного пациента произошли оба события одновременно.

Не установлено разницы по количеству сердечно-сосудистых событий в раннем послеоперационном периоде (первые 10 дней после коронарного шунтирования) между группами пациентов с гомо- и гетерозиготными вариантами генотипов полиморфизмов rs6133, rs6136, rs2228315, rs6131 гена Р-селектина (табл. 4). Редкие аллели полиморфизмов rs6133, rs6136, rs2228315, rs6131 гена Р-селектина не приводят к увеличению рисков неблагоприятных событий в первые 10 дней после КШ. Однако данные результаты следует учитывать с осторожностью ввиду небольшой выборки и количества анализируемых исходов.

При анализе сочетания генотипов по четырем изучаемым полиморфизмам в когортах резистентных и чувствительных к АСК пациентов было показано, что чаще других встречаются варианты, включающие либо только распространенные виды аллелей по всем четырем изучаемым полиморфизмам в гомозиготном состоянии, либо варианты, содержащие одну из четырех редких аллелей также в гомозиготном состоянии: (по порядку полиморфизмов S290N (rs6131), V640L (rs6133), M62I (rs2228315), T715P (rs6136)) GGAC, GGAA, GGA, AGAA и GTAA — 10 резистентных пациентов с ИБС до КШ (11,1%) и те же варианты у 64 чувствительных к АСК пациентов (71,1%). Другие варианты сочетания генотипов, содержащие более одной из четырех редких аллелей в гомозиготном состоянии: AGGC, GTAC, ATGC, AGGA, GTGA, AGAC — встречаются лишь у 1 резистентного к АСК пациента и у 15 чувствительных к АСК пациентов. При сравнении групп пациентов чувствительных и резистентных к АСК не было выявлено значимых отличий по комплексам генотипов изучаемых полиморфизмов (ОШ=2,34, 95% ДИ [0,28-19,75],  $p=0,723$ ).

### Обсуждение

Распределение генотипов G/G, G/T, T/T полиморфизма V640L (rs6133) в европейско-американской популяции по базе данных The European

Bioinformatics Institute составляет 77%, 21%, 1%, соответственно [12]. Частота распределения генотипов полиморфизма S290N (rs6131) G/G, G/A и A/A среди белокожих пациентов с ИБС составила 65%, 30% и 5%, согласно данным исследования Volcik K, et al. [13]. Au C, et al. следующие частоты распределения генотипов для кавказоидов (112 пациентов с венозными тромбозами) по S290N (rs6131) G/G, G/A и A/A: 62,1%, 31,9% и 6%, по T715P rs6136 A/A, A/C и C/C: 85,3%, 13,8% и 0,9%, соответственно [14]. Распределение генотипов G/G, G/A и A/A полиморфизма M62I (rs2228315) в общей популяции составляет 68%, 26% и 5%, соответственно [15].

По данным литературы информация об ассоциации изучаемых полиморфизмов с сердечно-сосудистыми заболеваниями разноречива.

Исследования с участием полиморфизма V640L (rs6133) в гене Р-селектина были проведены в том числе на когортах пациентов после КШ [15], с коронарной болезнью сердца и ИМ [9]. Метаанализ Zhou DH, et al., включавший 9 контролируемых исследований, 3154 пациента с ИБС, 1608 пациентов с ИМ, 17304 здоровых добровольцев, отмечал отсутствие ассоциации полиморфизма rs6133 среди азиатов и кавказоидов с коронарной болезнью сердца и ИМ, но указывал на патогенетическую ассоциацию с ИБС и ИМ полиморфизмов гена Р-селектина: 1969G/A (rs1800805), 1817T/C (rs1800808), 2123C/G (rs1800807), Thr715Pro (rs6136) и Ser290Asp (rs6131) [9]. Однако при изучении полиморфизма rs6133 (G1918T, V640L) в составе гаплотипов обнаружены противоположные результаты. Volcik KA, et al. показали, что V640L совместно с полиморфизмами S290N, N562D, T715P у 17592 пациентов с атеросклерозом оказывает влияние на развитие ИБС [13].

Согласно исследованию ARIC (15792 включенных участников) редкая аллель А полиморфизма M62I (rs2228315) ассоциирована со снижением концентрации гранулоцитарных и моноцитарных комплексов в крови и уменьшением риска развития ишемического инсульта среди афроамериканцев по сравнению с белокожими (ОШ=0,73, 95% ДИ 0,55-0,97) [13].

В то же время в более позднем исследовании Schmalbach B, et al., но на меньшем количестве пациентов (79 пациентов с острым ишемическим инсультом и 151 здоровый донор) анализ 26 единичных полиморфизмов в 6 генах-кандидатах высокого уровня тромбоцит-лейкоцитарного взаимодействия, в том числе Р-селектина, полиморфизм rs2228315 был слабо ассоциирован с ишемическим инсультом и активацией тромбоцитов. Более того, ассоциация не подтвердилась при регрессионном анализе [16].

В литературе нам не встретилось работ, изучающих ассоциацию полиморфизмов T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133) с резистентностью к антитромбоцитарным препаратам.

По результатам нашего исследования полиморфизмы гена молекулы клеточной адгезии Р-селектина T715P (rs6136), M62I (rs2228315), S290N (rs6131), V640L (rs6133), опосредующей воспалительный процесс не ассоциированы с резистентностью тромбоцитов к АСК. Полученные результаты еще раз подчеркивают комплексный характер функционирования системы гемостаза, в которой принимают участие тромбоциты, лейкоциты, эндотелий, большое количество медиаторов и активных веществ. Работа одного или нескольких полиморфизмов гена адгезивной молекулы в сложном каскаде гемостаза и воспаления может быть компенсирована работой множеством других.

### Заключение

Полиморфизмы rs6133, rs6163, rs2228315, rs6131 в гене Р-селектина тромбоцитов не ассоциированы с резистентностью к АСК у пациентов с ИБС после коронарного шунтирования. Полиморфизмы rs6133, rs6163, rs2228315, rs6131 не ассоциированы с повышенной агрегационной активностью тромбоцитов как до, так и после КШ. Редкие аллели Т, С, G, А

полиморфизмов rs6133, rs6163, rs2228315, rs6131 гена Р-селектина не приводят к увеличению рисков неблагоприятных событий в первые 10 дней после КШ как при анализе ассоциаций с единичным полиморфизмом, так и при анализе их комбинаций. Требуются дальнейшие исследования на больших выборках с учетом клинико-лабораторных характеристик пациентов.

**Финансирование.** 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 Р-селектина, выраженности межклеточного взаимодействия и воспаления”.

**Конфликт интересов:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Литература/References

- McCullough PA, Vasudevan A, Sathyamoorthy M, et al. Urinary 11-Dehydro-Thromboxane B2 and Mortality in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol.* 2017;119(7):972-7. doi:10.1016/j.amjcard.2016.12.004.
- Merten M, Thiagarajan P. P-selectin and arterial thrombosis. *Z Kardiol.* 2004;93:855-63. doi:10.1007/s00392-004-0146-5.
- Molenaar TJM, Twisk J, de Haas SAM, et al. P-selectin as a candidate target in atherosclerosis. *Biochem Pharm.* 2003;66:859-66.
- Berns SA, Schmidt EA, Yuhno ES, et al. Effect of endothelial dysfunction on the prognosis in patients with acute coronary syndrome without ST elevation. *Cardiology.* 2015;4(55):14-8. (In Russ.) Бернс С. А., Шмидт Е. А., Юхно Е. С., и др. Влияние дисфункции эндотелия на прогноз у больных с острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST, *Кардиология* 2015;4(55):14-8.
- Berns SA, Schmidt EA, Kiprina ES, et al. Predictors of adverse coronary events in patients with acute coronary syndrome with ST-segment elevation, undergone percutaneous coronary interventions. *Cardiology.* 2010;7(50):21-5. (In Russ.) Бернс С. А., Шмидт Е. А., Киприна Е. С., и др. Предикторы неблагоприятных коронарных событий у больных острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам. *Кардиология* 2010;7(50):21-5.
- Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, et al. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation.* 2003;107:2908-13. doi:10.1161/01.CIR.0000072771.11429.83.
- Kaur R, Singh J, Kaur M, et al. Structural and functional impact of SNPs in P-selectin gene: A comprehensive in silico analysis. *Open Life Sciences.* 2017;12(1):19-33. doi:10.1515/biol-2017-0003.
- Herrmann S, Ricard S, Nicaud V, et al. The P-Selectin Gene is Highly Polymorphic: Reduced Frequency of the Pro715 Allele Carriers in Patients with Myocardial Infarction *Human Molecular Genetics.* 1998;7:1277-84.
- Zhou DH, Wang Y, Hu WN, et al. SELP genetic polymorphisms may contribute to the pathogenesis of coronary heart disease and myocardial infarction: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2014;41(5):3369-80. doi:10.1007/s11033-014-3199-1.
- Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, 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/eh296.
- Bugert P, Vosberg M, Entelmann M, et al. Polymorphisms in the P-selectin (CD62P) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) genes and coronary heart disease. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(9):997-1004. doi:10.1515/CCLM.2004.202.
- Retrieved from The European Bioinformatics Institute: <https://www.ebi.ac.uk/> (Дата обращения: 10.05.19).
- Volcik KA, Catellier D, Folsom AR, et al. SELP and SELPLG Genetic Variation Is Associated with Cell Surface Measures of SELP and SELPLG: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid MRI Study. *Clinical Chemistry.* 2009;55(6):1076-82. doi:10.1373/clinchem.2008.119487.
- Ay C, Jungbauer LV, Kaider A. P-selectin gene haplotypes modulate soluble P-selectin concentrations and contribute to the risk of venous thromboembolism. *Thrombosis and Haemostasis.* 2008;99(11):899-904. doi:10.1160/th07-11-0672.
- Podgoreanu MV, White WD, Morris RW, et al. Perioperative Genetics and Safety Outcomes Study (PEGASUS) Investigative Team. Inflammatory gene polymorphisms and risk of postoperative myocardial infarction after cardiac surgery. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):I275-81. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001032.
- Schmalbach B, Stepanow O, Jochens A, et al. Determinants of platelet-leukocyte aggregation and platelet activation in stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2015;39(3-4):176-80. doi:10.1159/000375396.