

Постгеномные аспекты резистентности к ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ишемической болезнью сердца

Гринштейн Ю. И.¹, Косинова А. А.^{1,4}, Мальцева А. Н.¹, Субботина Т. Н.^{2,3}, Семашенко К. С.², Левагина П. И.², Шаврина Е. О.⁴, Савченко А. А.⁴

Цель. Изучение уровня экспрессии мРНК гена Р-селектина (*SELP*) и уровня межклеточного взаимодействия у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) до и после коронарного шунтирования (КШ) при резистентности к ацетилсалициловой кислоте (АСК).

Материал и методы. В исследование было включено 65 пациентов с ИБС, которым планировалось проведение КШ. Всем участникам определены экспрессия *SELP*, уровень агрегатов тромбоцитов с лейкоцитами, уровень экспрессии Р-селектина на агрегатах. Резистентность к АСК определялась при уровне агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой $\geq 20\%$ хотя бы в одной пробе. Все исследования проводились до и на 8-10-е сут. после КШ.

Результаты. Среди пациентов 29,4% (30 человек) были резистентными к АСК хотя бы в одной точке, 7,8% (8 человек) приобрели устойчивость после КШ. У резистентных к АСК выше уровень *SELP* (0,41 у.е. [0,28; 0,48] vs 0,32 [0,23; 0,39], $p=0,037$), абсолютного содержания агрегатов моноцит+тромбоцит (24,70 у.е. [9,69; 39,90] vs 10,15 у.е. [5,27; 30,63], $p=0,037$) и относительного количества агрегатов тромбоцит+тромбоцит CD62P (7,37% [3,43; 35,49] vs 4,84% [0,90; 9,63], $p=0,045$). Выявлена отрицательная корреляционная связь между экспрессией *SELP* и относительным содержанием агрегатов моноцит+тромбоцит ($r=-0,349$, $p=0,013$) на 8-10-е сут. после КШ. По итогам многофакторного регрессионного анализа установлено, что уровень экспрессии мРНК гена *SELP* является предиктором развития резистентности к АСК до КШ (отношение шансов 404,48; 95% доверительный интервал: 1,68-97461,63).

Заключение. Повышение экспрессии *SELP* ассоциировано с увеличением агрегационной активности тромбоцитов, что способствует недостаточному ответу тромбоцитов на антитромботическую терапию у пациентов с КШ. Уровень экспрессии мРНК гена *SELP* может рассматриваться как предиктор развития резистентности к АСК.

Ключевые слова: резистентность к ацетилсалициловой кислоте, Р-селектин, *SELP*, коронарное шунтирование.

Отношения и деятельность: нет.

¹ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск; ²ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, Красноярск; ³ФГБНУ Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России, Красноярск; ⁴ФГБНУ

Федеральный исследовательский центр "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук", Красноярск, Россия.

Гринштейн Ю. И. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой терапии Института последипломного образования, ORCID: 0000-0001-8847-235X, Косинова А. А. — к.м.н., ассистент, кафедра терапии Института последипломного образования; с.н.с. лаборатории цифровых управляемых лекарств и тераностики, ORCID: 0000-0002-7412-2516, Мальцева А. Н. — аспирант, кафедра терапии Института последипломного образования, ORCID: 0000-0002-7368-2423, Субботина Т. Н. — д.б.н., доцент кафедры медицинской биологии, руководитель Научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований, ORCID: 0000-0001-7790-5033, Семашенко К. С. — лаборант-исследователь Научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований, ORCID: 0000-0002-8735-2716, Левагина П. И. — лаборант-исследователь Научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований, ORCID: 0009-0002-1984-1849, Шаврина Е. О. — лаборант-исследователь лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, ORCID: 0000-0001-8467-865X, Савченко А. А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, ORCID: 0000-0001-5829-672X.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): mn19np@gmail.com

АСК — ацетилсалициловая кислота, ИБС — ишемическая болезнь сердца, КШ — коронарное шунтирование, ФК — функциональный класс.

Рукопись получена 29.10.2023

Рецензия получена 18.03.2024

Принята к публикации 21.05.2024



Для цитирования: Гринштейн Ю. И., Косинова А. А., Мальцева А. Н., Субботина Т. Н., Семашенко К. С., Левагина П. И., Шаврина Е. О., Савченко А. А. Постгеномные аспекты резистентности к ацетилсалициловой кислоте у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Российский кардиологический журнал*. 2024;29(10):5667. doi: 10.15829/1560-4071-2024-5667. EDN NQSBXT

Postgenomic aspects of resistance to acetylsalicylic acid in patients with coronary artery disease

Grinshtein Yu. I.¹, Kosinova A. A.^{1,4}, Maltseva A. N.¹, Subbotina T. N.^{2,3}, Semashchenko K. S.², Levagina P. I.², Shavrina E. O.⁴, Savchenko A. A.⁴

Aim. To study the expression level of the P-selectin gene (*SELP*) mRNA and the level of intercellular interaction in patients with coronary artery disease (CAD) before and after coronary artery bypass grafting (CABG) in patients with resistance to acetylsalicylic acid (ASA).

Material and methods. The study included 65 patients with CAD who were scheduled to CABG. *SELP* expression, the platelet-leucocyte aggregate level, and the level of P-selectin expression on aggregates were determined in all participants. Resistance to ASA was defined as platelet aggregation with arachidonic acid $\geq 20\%$ in at least one sample. All studies were performed before and on the 8th-10th day after CABG.

Results. Among patients, 29,4% (n=30) were resistant to ASA (ASA-R) at least at one point, while 7,8% (n=8) acquired resistance after CABG. ASA-R had a higher

level of *SELP* (0,41 [0,28; 0,48] vs 0,32 [0,23; 0,39], $p=0,037$), absolute content of monocyte-platelet aggregates (24,70 [9,69; 39,90] vs 10,15 [5,27; 30,63], $p=0,037$) and relative amount of platelet-platelet CD62P aggregates (7,37% [3,43; 35,49] vs 4,84% [0,90; 9,63], $p=0,045$). A negative correlation was found between *SELP* expression and the relative content of monocyte-platelet aggregates ($r=-0,349$, $p=0,013$) on days 8-10 after CABG. Multivariate regression analysis found that the level of *SELP* gene mRNA expression is a predictor of ASA resistance before CABG (odds ratio 404,48; 95% confidence interval 1,68-97461,63).

Conclusion. Increased *SELP* expression is associated with an increase in platelet aggregation activity, which contributes to an insufficient platelet response to antithrombotic therapy in patients with CABG. The level of *SELP* gene mRNA expression can be considered as a predictor of ASA resistance.

Keywords: resistance to acetylsalicylic acid, P-selectin, *SELP*, coronary artery bypass grafting.

Relationships and Activities: none.

¹Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk; ²Siberian Federal University, Krasnoyarsk; ³Federal Siberian Research Clinical Center, Krasnoyarsk; ⁴Krasnoyarsk Science Center, Krasnoyarsk, Russia.

Grinshtein Yu. I. ORCID: 0000-0001-8847-235X, Kosinova A. A. ORCID: 0000-0002-7412-2516, Maltseva A. N.* ORCID: 0000-0002-7368-2423, Subbotina T. N. ORCID: 0000-0001-7790-5033, Semashchenko K. S. ORCID: 0000-0002-8735-

2716, Levagina P. I. ORCID: 0009-0002-1984-1849, Shavrina E. O. ORCID: 0000-0001-8467-865X, Savchenko A. A. ORCID: 0000-0001-5829-672X.

*Corresponding author: mn19np@gmail.com

Received: 29.10.2023 **Revision Received:** 18.03.2024 **Accepted:** 21.05.2024

For citation: Grinshtein Yu. I., Kosinova A. A., Maltseva A. N., Subbotina T. N., Semashchenko K. S., Levagina P. I., Shavrina E. O., Savchenko A. A. Postgenomic aspects of resistance to acetylsalicylic acid in patients with coronary artery disease. *Russian Journal of Cardiology*. 2024;29(10):5667. doi: 10.15829/1560-4071-2024-5667. EDN NQSBXT

Ключевые моменты

- Изучение причин резистентности к ацетилсалициловой кислоте (АСК) остается актуальным вопросом.
- У пациентов с ишемической болезнью сердца после коронарного шунтирования при повышении уровня экспрессии мРНК гена *SELP* увеличивается уровень лейкоцит-тромбоцитарных агрегатов, в т.ч. экспрессирующих Р-селектин.
- Повышение агрегационной активности тромбоцитов и экспрессии гена *SELP* ассоциировано с возникновением резистентности к АСК.
- Ген *SELP* может быть предиктором развития резистентности к АСК.

Проблема развития повторных сердечно-сосудистых событий после коронарной реваскуляризации остаётся актуальной, несмотря на проводимую вторичную профилактику. Отсутствие ответа и сохранение высокой реактивности тромбоцитов на терапии ацетилсалициловой кислотой (АСК) варьирует от 5% до 60% в зависимости от способа выявления данного феномена [1, 2]. В настоящее время нет стандартизованных тестов для оценки функции тромбоцитов в реальной клинической практике. В частности, обсуждается персонализированный подход в оценке геморрагического/ишемического риска при назначении антитромбоцитарной терапии [3]. Большое внимание уделяется поиску предикторов развития резистентности к антитромбоцитарным препаратам, в частности, к АСК, для управления кардиоваскулярными рисками. В качестве предикторов нами ранее описаны генетические факторы — полиморфизмы rs6133, rs6131, rs6136, rs2228315 гена Р-селектина (*SELP*) [4], клеточные — дезорганизация межклеточного взаимодействия и повышение количества тромбоцит-лейкоцитарных и тромбоцит-тромбоцитарных агрегатов [4] и молекулярные — изменение метаболической

Key messages

- Studying the causes of resistance to acetylsalicylic acid (ASA) remains a pressing issue.
- In patients with coronary artery disease after coronary artery bypass grafting, with an increase in the level of *SELP* gene mRNA expression, the level of leukocyte-platelet aggregates, including those expressing P-selectin, increases.
- An increase in platelet aggregation activity and *SELP* gene expression is associated with resistance to ASA.
- The *SELP* gene can be a predictor of resistance to ASA.

активности тромбоцитов по продукции активных форм кислорода [5].

Однако существует структура, играющая важную роль в "проявлении признака" (экспрессии) генов, малоизученная в развитии резистентности к АСК — мРНК. Это чувствительный индикатор биологической активности, в котором изменение паттерна экспрессии генов отражается в изменении биологического процесса.

Предполагаемая гипотеза нашего исследования — у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) уровень экспрессии *SELP* и количество межклеточных агрегатов могут быть маркерами развития недостаточного ответа тромбоцитов на АСК после коронарного шунтирования (КШ).

Поэтому целью работы стало изучение уровня экспрессии мРНК *SELP* и уровня межклеточного взаимодействия у пациентов с ИБС до и после КШ при резистентности к АСК.

Материал и методы

В проспективное когортное исследование было включено 65 пациентов с ИБС, у которых по данным коронароангиографии было подтверждено атеросклеротическое поражение коронарных артерий и проведено аорто- или маммарокоронарное шун-

Таблица 1

Общая клинико-лабораторная характеристика пациентов и в зависимости от наличия резистентности к АСК до КШ

Параметр	Все пациенты (n=65)	чАСК (n=50)	рАСК (n=15)	p-уровень
Пол, n (%)				0,512
— мужской	48 (73,8)	38 (76,0)	10 (33,3)	
— женский	17 (26,2)	12 (24,0)	5 (66,7)	
Возраст (годы), Ме [25; 75]	64,0 [60,0; 67,5]	63,5 [60,0; 67,3]	65 [60,0; 69,0]	0,596
Табакокурение, %	33,8	38,0	20,0	0,231
Ожирение, %	47,7	50,0	40,0	0,565
Артериальная гипертензия, %	93,8	94,0	93,3	0,660
Сахарный диабет, %	33,8	34,0	33,3	1,000
Стабильная стенокардия, II ФК, %	47,7	44,0	60,0	0,379
Стабильная стенокардия, III ФК, %	41,5	46,0	26,7	0,239
Инфаркт миокарда в анамнезе, %	61,5	66,0	46,7	0,230
Количество тромбоцитов, 10 ⁹ /л	227,0 [184,5; 259,0]	221,0 [178,5; 268,5]	230,0 [201,0; 255,0]	0,686
Количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л	7,6 [6,7; 8,5]	7,7 [6,7; 8,5]	7,2 [5,5; 8,9]	0,533
Общий холестерин, ммоль/л	4,4 [3,8; 5,5]	4,4 [3,8; 5,9]	4,3 [3,5; 4,9]	0,235
ЛНП, ммоль/л	2,6 [2,1; 2,3]	2,7 [2,1; 3,4]	2,2 [1,6; 2,9]	0,462
Креатинин, мкмоль/л	113,0 [100,0; 126,5]	115,0 [105,0; 127,3]	95,0 [89,0; 114,0]	0,003
Количество поражённых атеросклерозом коронарных артерий	3,0 [2,0; 4,0]	3,0 [2,0; 4,3]	3,0 [2,0; 3,0]	0,412
Количество шунтов	2,0 [1,5; 3,0]	2,0 [1,0; 3,0]	2,0 [2,0; 3,0]	0,383
КШ с ИК, %	73,8	70,0	86,7	0,317
Длительность ИК, мин	65,0 [21,5; 98,0]	72,0 [60,0; 115,0]	85,0 [67,5; 102,0]	0,242
Время общей анестезии, мин	250,0 [200,0; 317,5]	270,0 [134,0; 322,5]	290,0 [210,0; 325,0]	0,250
Послеоперационные осложнения в общем, %	26,1	24,0	33,3	0,512
ОИМ, %	1,5	2,0	0,0	1,000
ОНМК, %	7,7	8,0	6,7	1,000
Кровотечения, %	3,1	2,0	6,7	0,411
Плеврит с плевральной пункцией, %	16,9	14,0	26,7	0,435

Примечание: количественные данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона — Ме [25%; 75%]; качественные показатели оформлены в виде n (%), где n — число больных в каждой из представленных групп.

Сокращения: рАСК — резистентные к ацетилсалициловой кислоте пациенты, чАСК — чувствительные к ацетилсалициловой кислоте пациенты, ИК — искусственное кровообращение, КШ — коронарное шунтирование, ЛНП — липопротеиды низкой плотности, ОИМ — острый инфаркт миокарда, ОНМК — острое нарушение мозгового кровообращения, ФК — функциональный класс.

тирование на базе Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии г. Красноярск (ФЦССХ).

Протокол исследования одобрен этическим комитетом КрасГМУ им. В.Ф. Войно-Ясенецкого. Исследование проведено согласно стандартам надлежащей практики и принципам Хельсинкской декларации. Все пациенты подписали информированное согласие об участии в исследовании. Лечение проводилось согласно действующим рекомендациям Российского кардиологического общества (Стабильная ишемическая болезнь сердца, 2020г)¹. Основные группы использованных лекарственных препаратов: антиагреганты (АСК и клопидогрел), ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента/блокаторы рецепторов ангиотензина II, бета-адреноблокаторы, блокаторы кальциевых каналов, статины, диуретики.

Критерии включения пациентов: гемодинамически значимые стенозы ≥2 коронарных артерий при

коронароангиографии, стабильная стенокардия напряжения II-IV функциональных классов (ФК) согласно Канадской классификации, подписанное информированное согласие. Критерии исключения: обострение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, хроническая болезнь почек (скорость клубочковой фильтрации <60 мл/мин/1,73 м²), повышение уровня трансаминаз в 3 и более раз, непереносимость или невозможность приема клопидогрела и АСК. В ходе исследования 2 пациента были исключены досрочно, первый — по причине отмены оперативного вмешательства, второй — ввиду летального исхода в послеоперационном периоде (развитие острого инфаркта миокарда).

В числе участников исследования 47% имели II ФК стабильной стенокардии, 42,4% — III ФК при многососудистом поражении коронарного русла. Медиана возраста пациентов составила 64,0 [60,0; 67,5] года. Характеристика пациентов представлена в таблице 1.

¹ https://scardio.ru/content/Guidelines/2020/Clinic_rekom_IBS-unlocked.pdf.

Для снижения риска геморрагических осложнений за 5 дней до КШ отменялись антиагреганты в соответствии с принятыми стандартами лечения ФЦССХ г. Красноярск. АСК в дозировке 100 мг назначалась с 1-х сут., клопидогрел 75 мг — с 3-х сут. при перенесенном остром коронарном синдроме <1 года назад. 42 пациента находились на монотерапии АСК, 23 — на двойной антиагрегантной терапией — АСК (100 мг) + клопидогрел (75 мг). Также пациенты получали: ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента/антагонисты ренин-ангиотензиновых рецепторов, ингибиторы протонной помпы, бета-адреноблокаторы, статины, антагонисты кальция, нестероидные противовоспалительные средства и наркотические анальгетики в раннем послеоперационном периоде, при наличии сахарного диабета — сахароснижающую терапию.

До и на 8-10-е сут. после КШ выполнялись следующие обследования: развернутый и биохимический анализы крови, оптическая агрегатометрия, определение резистентности к АСК, проточная цитометрия и определение уровня *SELP*.

Для исследований периферическая кровь из локтевой вены забиралась в пробирку с 3,2% цитратом натрия. Оптический агрегометр CHRONO-LOG 490 применялся для оценки агрегации с использованием индуктора — арахидоновая кислота 1 мМ до и после инкубации с 10 мкл АСК *in vitro*.

Резистентность к АСК устанавливали при уровне агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой $\geq 20\%^2$ хотя бы в одной точке наблюдения: при инкубации плазмы пациента с АСК *in vitro* до КШ без антиагрегантной терапии и на 8-10-й день после операции на фоне антиагрегантной терапии.

С помощью проточного цитометра Navios (BeckmanCoulter, США) измерялось относительное (%) и абсолютное (у.е.) количество межклеточных агрегатов с использованием моноклональных антител: тромбоциты (CD41), моноциты (CD14, CD16), уровень экспрессии Р-селектина на тромбоцитах (CD62P). Применялся забуференный 10% раствор формалина для снижения повышенной агрегации ввиду транспортировки образцов крови в лабораторию для проведения проточной цитометрии.

Для оценки относительного уровня экспрессии *SELP* использовали РНК, выделенную из тромбоцитов цельной крови с помощью набора реагентов "Рибо-преп" (ООО ИнтерЛабСервис). Предварительно готовили богатую тромбоцитами плазму, магнитные частицы Dynabeads CD45 (ThermoFisherScientific) использовали для очищения образца от примеси лейкоцитов. Концентрации образцов РНК измеряли с использованием набора реагентов Quant-iT™

ssRNA AssayKit и флуориметра Qubit 3 (Invitrogen). С выделенными образцами мРНК (в составе тотальной РНК) проводили совмещенную с обратной транскрипцией ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов "БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ" (ООО Биолабмикс). ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с использованием специфических праймеров и TaqMan зондов для выявления мРНК *SELP* и *GAPDH* (ThermoFisherScientific) в двух технических повторях. Расчет относительного уровня экспрессии *SELP* осуществляли методом $2^{-\Delta C_t}$, позволяющим провести относительную количественную оценку интересующего гена в сравнении с референсным геном.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics (версия 20.0). Для описания полученных данных вычислялись медиана (Me) и интерквартильный размах (25 и 75 процентиля). Для качественных показателей использовались число наблюдений и доля (в процентах) от всех участников или количества пациентов в соответствующей подгруппе. Статистическая значимость различий между показателями независимых выборок оценивалась по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для категориальных переменных применялся критерий χ^2 . Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Для корреляционного анализа использовался коэффициент Спирмена r . Связь считалась статистически значимой при $p < 0,05$. Для прогнозирования вклада каждого из факторов в развитии резистентности к АСК применен метод логистического регрессионного анализа, где использовались бинарные переменные: 0 — чувствительность к АСК, 1 — резистентность к АСК. Введены предикторы: курение, сахарный диабет, ожирение, мультифокальный атеросклероз и экспрессия *SELP*. Модель считалась статистически значимой при $p < 0,05$ согласно критерию χ^2 Вальда. Для оценки результатов прогнозирования использовался ROC-анализ. Количественная интерпретация проводилась по ROC-кривым с оценкой показателя AUC (Area under ROC curve — площадь под ROC-кривой): от 0,9 до 1 — отличное качество модели, 0,8-0,9 — очень хорошее, 0,7-0,8 — хорошее, 0,6-0,7 — среднее, 0,5-0,6 — неудовлетворительное качество модели.

Результаты

По итогам проведенного исследования 23,1% (15 человек) были резистентными к АСК до КШ, 29,4% (30 человек) имели устойчивость к АСК хотя бы в одной точке. 7,8% (8 человек) определялись как чувствительные к АСК до КШ, но приобрели резистентность к АСК на 8-10-е сут. после КШ. У 10,8% (11 пациентов) резистентность к АСК определялась как до КШ, так и на 8-10-й день после КШ.

² Гринштейн Ю. И., Филоненко И. В., Савченко А. А., Савченко Е. А., Гринштейн И. Ю. Способ диагностики резистентности к ацетилсалициловой кислоте. Патент на изобретение RU 2413953 C1, 10.03.2011.

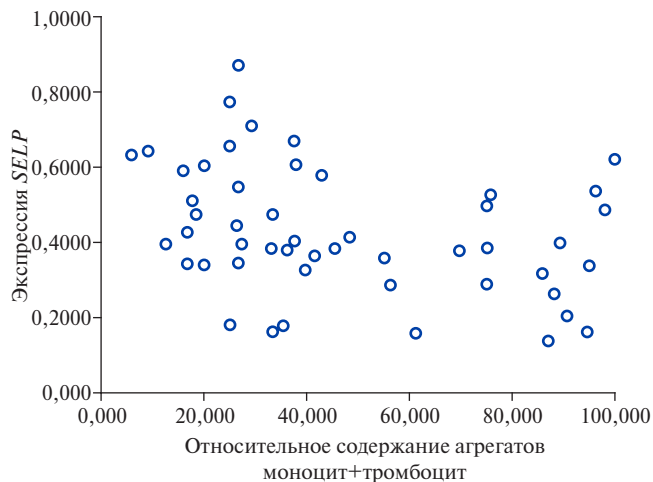


Рис. 1. Корреляционные взаимосвязи между уровнем экспрессии *SELP* и относительным содержанием агрегатов моноцит+тромбоцит (%) у всех пациентов с ИБС на 8-10-е сут. после КШ.

Все пациенты с ИБС разделены на две группы сравнения по наличию резистентности до КШ.

Оценка межклеточных агрегатов и уровня экспрессии *SELP* в зависимости от чувствительности к АСК показала следующие результаты. У резистентных к АСК пациентов до КШ выявлено статистически значимое повышение уровня экспрессии *SELP* (0,41 [0,28; 0,48] vs 0,32 [0,23; 0,39], $p=0,037$), а также увеличение абсолютного содержания агрегатов моноцит+тромбоцит (24,70 у.е. [9,69; 39,90] vs 10,15 у.е. [5,27; 30,63], $p=0,037$) и возрастание относительного количества агрегатов тромбоцит+тромбоцит CD62P (7,37% [3,43; 35,49] vs 4,84% [0,90; 9,63], $p=0,045$).

Мы разделили всех пациентов с ИБС на две группы в зависимости от уровня экспрессии мРНК *SELP* по значению медианы до (0,332 у.е.) и на 8-10-е сут. после КШ (0,396 у.е.). До КШ статистически значимых отличий по количеству клеточных агрегатов в группах не регистрировалось. Во второй точке зафиксировано более высокое количество агрегатов нейтрофил+тромбоцит при уровне *SELP* 0,396 у.е. и выше (85,80 у.е. [33,15; 182,00] и 30,40 у.е. [14,08; 130,00], соответственно, $p=0,030$). То же происходит во второй точке наблюдения с относительным количеством агрегатов нейтрофил+тромбоцит CD62P (88,71% [74,03; 100,00] vs 73,47% [52,18; 89,79], соответственно, $p=0,014$).

При измерении уровня агрегационной активности тромбоцитов с арахидоновой кислотой у всех пациентов с ИБС со значением $\geq 50\%$ статистически значимо повышался относительный уровень агрегатов моноцит+тромбоцит (43,28% [27,24; 71,25] vs 40,51% [23,96; 62,36], $p=0,024$).

При проведении корреляционного анализа установлена отрицательная связь между уровнем экс-

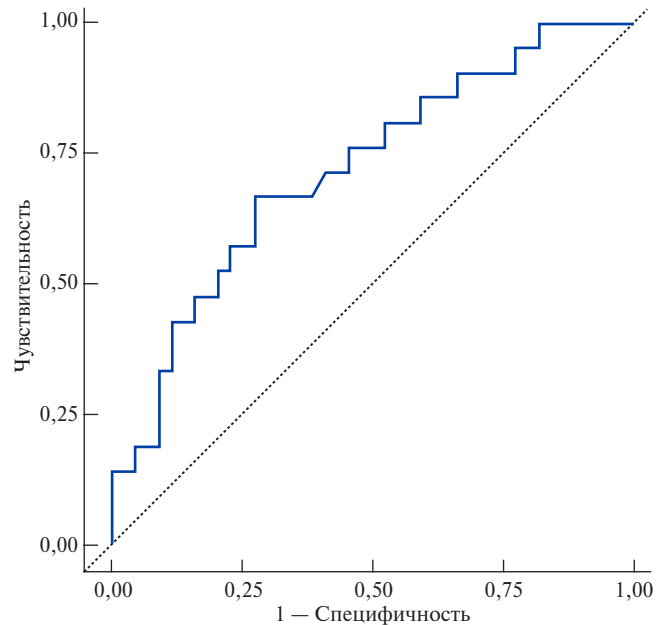


Рис. 2. ROC-кривая результатов прогнозирования при помощи регрессионной модели развития резистентности к АСК у пациентов с ИБС в зависимости от уровня экспрессии гена *SELP* до КШ.

прессии *SELP* и относительным содержанием агрегатов моноцит+тромбоцит ($\rho=-0,349$, $p=0,013$) на 8-10-е сут. после КШ у всех пациентов с ИБС (рис. 1).

Учитывая многофакторный механизм развития резистентности к АСК, мы провели логистический регрессионный анализ для оценки значимости предполагаемых клиничко-генетических предикторов в возникновении резистентности к АСК до КШ (табл. 2).

Статистически значимым предиктором, повышающим вероятность развития резистентности к АСК до КШ, является уровень экспрессии *SELP* (отношение шансов 404,48; 95% доверительный интервал: 1,68-97461,63).

Регрессионная модель развития резистентности к АСК представлена следующим уравнением:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(2,594 + 6,000x_1)}}$$

где: p — вероятность развития у пациента резистентности к АСК, x_1 — уровень экспрессии *SELP*, e — основание натурального логарифма 2,72.

Модель является статистически значимой ($p<0,001$) и согласуется с исходными данными по критерию Хосмера-Лемешева (0,795).

Представленная модель даёт самый высокий коэффициент детерминации — 0,125, что отражает статистически значимую вероятность развития резистентности к АСК при повышении экспрессии *SELP* в 12,5% случаев. Специфичность — 42,9%, чувствительность — 86,4%, площадь под кривой — 0,719 (рис. 2).

Модели с другими показателями, такими как: относительное и абсолютное содержание тромбоцитов CD62P и агрегатов нейтрофил+тромбоцит,

Таблица 2

**Сводные данные по логистической регрессионной модели
прогнозирования развития резистентности к АСК у пациентов с ИБС**

Предикторы	Коэффициент регрессии (В)	Сред. ош.	Вальд	р	Exp (В)	95% доверительный интервал для EXP(В)	
						Нижняя	Верхняя
Курение	-0,92	0,75	1,50	0,22	0,40	0,09	1,74
Сахарный диабет	-0,36	0,69	0,28	0,60	0,70	0,18	2,68
Ожирение	-0,62	0,66	0,90	0,34	0,54	0,15	1,94
Мультифокальный атеросклероз	-0,03	0,93	0,00	0,98	0,97	0,16	5,99
Экспрессия <i>SELP</i> до КШ	6,00	2,80	4,60	0,03	404,48	1,68	97461,63
Константа	-2,59	1,14	5,22	0,02	0,08		

Сокращения: КШ — коронарное шунтирование, Сред. ош. — среднеквадратичная ошибка, Exp (В) — отношение шансов.

моноцит+тромбоцит, тромбоцит+тромбоцит, а также с экспрессией Р-селектина на данных агрегатах, в т.ч. на 8-10-е сут. после КШ — оказались статистически незначимыми.

Обсуждение

Изучение уровня экспрессии мРНК гена адгезивной молекулы Р-селектина и образование лейкоцит-тромбоцитарных агрегатов представляет несомненный интерес в плане их возможного влияния на эффективность антитромбоцитарной терапии у пациентов с ИБС, в т.ч. после КШ.

Согласно нашим данным, при увеличении экспрессии мРНК гена *SELP* статистически значимо возрастает абсолютное количество агрегатов нейтрофил+тромбоцит и относительное количество агрегатов нейтрофил+тромбоцит CD62P после КШ. Возможно, это связано с применением искусственного кровообращения, которое может вызывать активацию тромбоцитов и системный воспалительный ответ. В одном из исследований, описывающих функциональную активность тромбоцитов у пациентов, подвергшихся КШ, установлено, что количество тромбоцит-тромбоцитарных и тромбоцит-моноцитарных агрегатов, а также уровень экспрессии Р-селектина тромбоцитами были выше в первые сутки и через 1 мес. после операции в сравнении с показателями до КШ, повышенное количество тромбоцит-моноцитарных агрегатов снижалось через 3 мес. после КШ. Из возможных причин развития данного феномена предполагается также развитие воспалительного ответа вследствие применения искусственного кровообращения и уменьшение активности воспаления спустя 3 мес. после оперативного вмешательства [6].

Хотя уровни мРНК не обязательно пропорциональны выработке функциональных белков, в нескольких исследованиях была показана корреляция между экспрессией мРНК Р-селектина и функциональным белком [7, 8].

В настоящем исследовании выявлено, что при повышении уровня агрегационной активности тромбо-

цитов с арахидоновой кислотой после КШ статистически значимо повышается относительное количество агрегатов моноцит+тромбоцит. При повреждении эндотелия возникает активация тромбоцитов, в просвет сосуда активно поступают вещества, способствующие рекрутингу лейкоцитов и образованию между ними межклеточных связей [9]. Чаще всего тромбоциты образуют агрегаты с моноцитами и нейтрофилами [10, 11]. Согласно литературным данным, тромбоцит-моноцитарные агрегаты могут быть более чувствительным маркером воспаления и активации тромбоцитов после КШ, чем уровень Р-селектина [6].

По результатам нашего исследования у резистентных к АСК пациентов до КШ выше уровни *SELP*, агрегатов тромбоцит+тромбоцит CD62P и моноцит+тромбоцит.

Как правило, более высокий уровень активированных тромбоцитов с экспрессированным на них Р-селектином, большее количество тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов и повышенный уровень растворимого Р-селектина в периферической крови чаще регистрируется у пациентов с воспалительными и тромбоцитарными расстройствами [12]. Song C, et al. обнаружили высокую экспрессию Р-селектина при ИБС, а также связь между тяжестью ИБС и уровнем Р-селектина [13], а в другом исследовании у здоровых пожилых лиц уровень экспрессии Р-селектина представлен в качестве маркера неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [14]. Но в то же время в российском исследовании не было установлено статистически значимого увеличения Р-селектина при ИБС [15].

Нами также составлена прогностическая модель развития резистентности. При включении клинико-лабораторных предикторов, уровня экспрессии *SELP*, количества межклеточных агрегатов в модель, статистическую значимость продемонстрировал лишь уровень экспрессии *SELP*. Причем его вклад в развитие резистентности составляет 12,5%.

Изучение экспрессии *SELP*, количества межклеточных агрегатов может помочь в прогнозировании развития резистентности к АСК и как следствие по-

слеоперационных осложнений после КШ. Будущие исследования должны дать валидизацию оценки лейкоцит-тромбоцитарных комплексов, экспрессии *SELP* и перспективу внедрения результатов в кардиологическую практику.

Ограничения исследования. Небольшой объем выборки. Дальнейшие исследования необходимы для уточнения предикторов недостаточного ответа тромбоцитов на АСК с целью персонификации антитромбоцитарной терапии у пациентов после КШ.

Заключение

С увеличением экспрессии *SELP* статистически значимо возрастает абсолютное количество агрегатов нейтрофил+тромбоцит и относительное количество

агрегатов нейтрофил+тромбоцит CD62P после КШ. При повышении уровня агрегационной активности тромбоцитов с арахидоновой кислотой после КШ статистически значимо повышается относительное количество агрегатов моноцит+тромбоцит. Более высокий уровень *SELP*, абсолютного количества агрегатов моноцит+тромбоцит, а также относительного содержания агрегатов тромбоцит+тромбоцит CD62P ассоциированы с резистентностью к АСК. Уровень экспрессии *SELP* является предиктором развития резистентности к АСК.

Отношения и деятельность: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература/References

1. Puchin'yan NF, Furman NV, Dolotovskaya PV, et al. High residual platelet reactivity during dual antiplatelet therapy, detected by optical aggregometry, and the incidence of atherothrombotic complications after stenting of coronary arteries in patients with coronary heart disease in real clinical practice. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2016;12(4):385-90. (In Russ.) Пучиньян Н.Ф., Фурман Н.В., Долотовская П.В. и др. Высокая остаточная реактивность тромбоцитов на фоне двойной антиагрегантной терапии, выявленная методом оптической агрегометрии, и частота развития атеротромботических осложнений после стентирования коронарных артерий у больных ишемической болезнью сердца в реальной клинической практике. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. 2016;12(4):385-90. doi:10.20996/1819-6446-2016-12-4-385-390.
2. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, et al. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007;167(15):1593-9. doi:10.1001/archinte.167.15.1593.
3. Kobalava ZhD, Pisaryuk AS, Filkova AA, et al. Platelet phenotypes and practical aspects of platelet function testing in cardiology. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2023;19(6):614-27. (In Russ.) Кобалава Ж.Д., Писарюк А.С., Филькова А.А. и др. Фенотипы тромбоцитов и практические аспекты методов тестирования функции тромбоцитов в кардиологии. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. 2023;19(6):614-27. doi:10.20996/1819-6446-2023-2981. EDN KAAWKP.
4. Grinstein Yul, Kosinova AA, Maltseva AN, et al. Disruption of platelet-leukocyte interaction and increased levels of p-selectin as possible causes of resistance to acetylsalicylic acid in patients with coronary artery disease before and after coronary bypass surgery. *Creative cardiology*. 2023;17(2):237-46. (In Russ.) Гринштейн Ю.И., Косинова А.А., Мальцева А.Н. и др. Нарушение тромбоцит-лейкоцитарного взаимодействия и повышение уровня Р-селектина как возможные причины резистентности к ацетилсалициловой кислоте у пациентов до и после коронарного шунтирования. *Креативная кардиология*. 2023;17(2):237-46. doi:10.24022/1997-3187-2023-17-2-237-246.
5. Kosinova AA, Mongush TS, Grinstein Yul, et al. 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;10(10):22-8. (In Russ.) Косинова А.А., Монгуш Т.С., Гринштейн Ю.И. и др. 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;10(10):22-8. doi:10.15829/1560-4071-2019-10-22-28.
6. Grinshtein YI, Savchenko AA, Kosinova AA, et al. Resistance to Acetylsalicylic Acid in Patients with Coronary Heart Disease Is the Result of Metabolic Activity of Platelets. *Pharmaceuticals*. 2020;13(8):178. doi:10.3390/ph13080178.
7. Ivert T, Dalén M, Ander C, et al. Increased platelet reactivity and platelet-leukocyte aggregation after elective coronary bypass surgery. *Platelets*. 2019;30(8):975-81. doi:10.1080/09537104.2018.1542122.
8. Armstead VE, Minchenko AG, Schuhl RA, et al. Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. *Am J Physiol*. 1997;273(2 Pt 2):740-6. doi:10.1152/ajpheart.1997.273.2.H740.
9. Eguchi H, Ikeda H, Murohara T, et al. Endothelial injuries of coronary arteries distal to thrombotic sites: role of adhesive interaction between endothelial P-selectin and leukocyte sialyl Lewis X. *Circ Res*. 1999;84(5):525-35. doi:10.1161/01.res.84.5.525.
10. Sviridova S, Somonova O, Kashiya Sh, et al. The role of platelets in inflammation and immunity. *Research'n Practical Medicine Journal*. 2018;5(3):40-52. (In Russ.) Свиридова С.П., Сомонова О.В., Кашия Ш.П. и др. Роль тромбоцитов в воспалении и иммунитете. *Исследования и практика в медицине*. 2018;5(3):40-52. doi:10.17709/2409-2231-2018-5-3-4.
11. Vitkovsky YuA, Kuznick BI, Solpov AV. Pathogenetic significance of lymphocyte-to-platelet adherence. *Medical Immunology (Russia)*. 2006;8(5-6):745-53. (In Russ.) Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. *Медицинская иммунология*. 2006;8(5-6):745-753. doi:10.15789/1563-0625-2006-5-6-745-75.
12. Pircher J, Engelmann B, Massberg S, et al. Platelet-Neutrophil Crosstalk in Atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 2019;119(8):1274-82. doi:10.1055/s-0039-1692983.
13. Song C, Wu G, Chang S, et al. Plasma P-selectin level is associated with severity of coronary heart disease in Chinese Han population. *The Journal of international medical research*. 2020;48(6):300060519896437. doi:10.1177/0300060519896437.
14. Batko-Szwaczka A, Francuz T, Kosowska A, et al. Predictors of Adverse Outcomes in Healthy Aging Adults: Coronary Artery Disease, Lower Educational Status and Higher P-Selectin Levels. *Clin Interv Aging*. 2022;5(17):1173-85. doi:10.2147/CIA.S363881.
15. Logatkina AV, Terekhov IV, Bondar SS, Nikiforov VS. Diagnostic significance of soluble adhesion molecules and costimulatory molecules of immune cells in the patients with ischemic heart disease. *Medical Immunology (Russia)*. 2019;21(6):1169-78. (In Russ.) Логаткина А.В., Терехов И.В., Бондарь С.С., Никифоров В.С. Диагностическая ценность растворимых молекул адгезии и костимуляторных молекул иммунокомпетентных клеток у больных ишемической болезнью сердца. *Медицинская иммунология*. 2019;21(6):1169-78. doi:10.15789/1563-0625-2019-6-1169-1178.