

На правах рукописи

МЕСИТСКАЯ ДИНАРА ФЕРАТОВНА

**КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОГЕНЕТИКА КЛОПИДОГРЕЛЯ У
ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

14.01.05 - кардиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2016

Работа выполнена в ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук

Копылов Филипп Юрьевич

Официальные оппоненты:

Панченко Елизавета Павловна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Институт клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова, руководитель лаборатории клинических проблем атеротромбоза

Затейщиков Дмитрий Александрович – доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ "Городская клиническая больница № 51 ДЗ г. Москвы", заведующий первичным сосудистым отделением

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» России

Защита диссертации состоится «__» _____ 2016 года в «__» часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.05 ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова по адресу: 119034, Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации, www.mma.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук,
доцент

Брагина Анна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Несмотря на большой прогресс в диагностике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), они по-прежнему остаются наиболее распространенными и занимают первое место в структуре смертности и инвалидизации населения в развитых странах. По данным Федеральной службы государственной статистики Российской Федерации за период с января по декабрь 2014 года смертность от ССЗ в нашей стране составляет 49,8% от общей, причем, почти 20% из этого числа умирают в трудоспособном возрасте. В 83,8% случаев причиной смерти становится ишемическая болезнь сердца или инсульт [Отчет Федеральной службы государственной статистики Российской Федерации за период с января по декабрь 2014 года: http://www.gks.ru/free_doc/2014/demo/t3_3xls].

Согласно рекомендациям РКО и Европейского общества кардиологов в стандарты лечения пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС), как один из вариантов, входит двойная антитромбоцитарная терапия ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелем. Однако у некоторого количества пациентов на фоне приема двойной антиагрегантной терапии рецидивировали случаи сердечно-сосудистых осложнений, которые обусловлены существенной вариацией в ответе на терапию. Одной из причин этого феномена может быть резистентность (остаточная реактивность тромбоцитов) к антитромбоцитарным препаратам.

В настоящее время резистентность к антитромбоцитарным препаратам, ее причины, механизмы развития и возможные пути преодоления активно исследуются. Однако до сих пор нет полного согласия между исследователями относительно термина «резистентность к антиагрегантным препаратам» из-за недостаточной стандартизации методов мониторинга функции тромбоцитов и общепринятых пороговых значений, которые позволили бы классифицировать пациентов на отвечающих на терапию и резистентных [Kuliczkowski W и соавт., 2009].

В данном исследовании проведена попытка выявить количество резистентных пациентов методом определения динамики агрегации тромбоцитов на фоне приема клопидогреля (с помощью оптической агрегометрии), а также оценить взаимосвязь недостаточного ответа на терапию клопидогрелем с сердечно-сосудистыми исходами в течение 18 месяцев.

Актуальность работы заключается в необходимости изучения комбинированного влияния клинических факторов и полиморфизма большого количества генов на остаточную реактивность тромбоцитов на фоне терапии клопидогрелем и риск возникновения сердечно-сосудистых событий. Выявить группу риска пациентов и найти ранее не изученные факторы, влияющие на резистентность и возникновение сердечно-сосудистых событий.

Цель исследования: Изучить взаимосвязь клинических факторов и полиморфизма генов, участвующих во всасывании, метаболизме клопидогреля, кодирующих рецепторы к АДФ, и гена тромбоксан-синтетазы с агрегацией тромбоцитов и прогнозом у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Задачи исследования

1. Проанализировать частоту и выявить факторы риска возникновения сердечно-сосудистых событий у пациентов, принимающих клопидогрель в течение 18 месяцев наблюдения.
2. Определить агрегационную способность тромбоцитов методом оптической агрегометрии у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, чувствительных и резистентных к терапии клопидогрелем, до начала приема и на фоне постоянного его приема через 7-10 дней.
3. Выявить клинические факторы, связанные с остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне терапии клопидогрелем.
4. Изучить связь полиморфизмов генов, кодирующих транспортный белок ABCB1 (3435C→T), ферменты биотрансформации CYP2C9 (Arg144Cys C430T экзон 3 и Ile359Leu A1075C экзон 7), CYP2C19 (CYP2C19*2 - rs4244285, CYP2C19*3 - rs4986893 и CYP2C19*17 - rs12248560), рецепторов к АДФ

P2Y12 (T744C) и тромбоксан-синтетазы TBXAS1 (rs6962291) с агрегационными свойствами тромбоцитов.

Научная новизна исследования

Впервые выявлены ранее не изученные факторы риска возникновения остаточной реактивности тромбоцитов на фоне терапии клопидогрелем в соответствии со временем наступления сердечно-сосудистых событий.

Впервые в мировой литературе выявлена взаимосвязь полиморфизма гена тромбоксан-синтетазы с риском возникновения сердечно-сосудистых событий.

Впервые установлен вклад сочетания клинических показателей и полиморфизмов генов, ассоциированных с тромбоцитарной активностью (CYP2C9 и TBXAS1), в развитие резистентности к клопидогрелю.

Практическая значимость

Для выявления лиц с высоким риском сердечно-сосудистых событий в группе пациентов с мультифокальным поражением артерий или с ОКС, страдающих сахарным диабетом 1-го или 2-го типа, представляется целесообразным проведение генетического тестирования. У данной категории пациентов при наличии полиморфизмов, ассоциированных с остаточной реактивностью тромбоцитов, назначение двойной антиагрегантной терапии аспирином и клопидогрелем может оказаться недостаточно эффективным.

Положения, выносимые на защиту

1. Сердечно-сосудистые события достоверно чаще возникают у пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне терапии клопидогрелем.
2. Абсолютный риск возникновения сердечно-сосудистых событий у пациентов с АТ и ТТ генотипами TBXAS1 гена на 14,2 % выше по сравнению с пациентами с АА генотипом, которые в 100% случаев не имели первичные конечные точки.
3. Риск развития ПКТ достоверно ниже у пациентов с «диким» типом генотипа CYP2C9 по сравнению с пациентами со сниженной активностью CYP2C9 (отношение рисков [HR] = 0,437, 95% ДИ 0,193-0,991; p=0,048).

4. Риск развития ПКТ достоверно ниже у пациентов с отсутствием нарушений углеводного обмена по сравнению с пациентами с сахарным диабетом (отношение рисков [HR] = 0,439, 95% ДИ 0,194-0,996; p=0,049).
5. При анализе клинических факторов в однородных группах пациентов выявлена достоверная взаимосвязь нозологической формы и статуса углеводного обмена с остаточной реактивностью тромбоцитов. Данная взаимосвязь оставалась достоверной при проведении многофакторного анализа.
6. «Медленный» AA генотип CYP2C19*2 достоверно ассоциирован с АДФ-агрегацией через 7 дней приема клопидогреля и высоким риском возникновения резистентности к клопидогрелю. Пациенты с AA генотипом гена тромбоксан-синтетазы TBXAS1 оказались более чувствительны к терапии клопидогрелем, в то время как среди пациентов с AT и TT генотипом было достоверно больше резистентных пациентов.

Внедрение в практику. Практические рекомендации, разработанные в диссертации, используются в УКБ №1 Первого МГМУ имени И.М.Сеченова и в отделении реанимации и интенсивной терапии для больных с инфарктом миокарда Городской клинической больницы № 7 г. Москвы.

Апробация диссертации состоялась на заседании кафедры профилактической и неотложной кардиологии ИПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова УКБ №1 Первого МГМУ им. И.М. Сеченова 27 марта 2015 г., протокол № 3. Диссертация рекомендована к защите.

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на Российском национальном конгрессе кардиологов «Интеграция знаний в кардиологии» (Москва, 3-5 октября 2012 г.), II Московском международном форуме кардиологов (Москва, 26-28 марта 2013 г.) и Юбилейном XX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 15-19 апреля 2013 г.).

Публикации: По теме диссертационного исследования опубликовано 9 научных работ, в том числе 5 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки Российской Федерации.

Личный вклад автора. Подтверждается предоставленным актом проверки первичного материала, журналом клинических исследований 250 пациентов, отчетом о проведении исследования. Автор самостоятельно осуществляла набор, скрининг и ведение пациентов, госпитализированных в связи с дебютом или обострением ишемической болезни сердца. Всем пациентам автором лично дважды определялась АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов методом оптической агрегометрии (при поступлении и через 7 дней постоянного приема клопидогреля). Автором также проведены анализ, количественная оценка, систематизация и статистическая обработка полученного материала.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.05 «кардиология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 11, 12 и 14 паспорта кардиологии.

Структура и объем диссертации: Диссертация изложена на 128 страницах машинописи, иллюстрирована 12 таблицами и 71 рисунком, состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, описание материалов и методов исследования, собственные результаты и их обсуждение), выводов, практических рекомендаций и списка литературы из 103 источников, из них 17 отечественных и 86 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В проспективное исследование продолжительностью 18 месяцев было включено 250 пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями: 176 (70,4%) мужчин и 74 (29,6%) женщины. Перед включением в исследование пациенты подписали информированное согласие.

Критерии включения в исследование: пациенты в возрасте старше 18 лет, госпитализированные в стационар в связи с дебютом или обострением сердечно-сосудистых заболеваний, которым был назначен клопидогрель:
- острый коронарный синдром: нестабильная стенокардия или инфаркт миокарда;

- пациенты, которым планируется хирургическое лечение ишемической болезни сердца (ангиопластика и стентирование коронарных артерий);
- пациенты с мультифокальным атеросклерозом перед стентированием брахиоцефальных артерий и артерий нижних конечностей.

Критерии исключения из исследования:

- пациенты, принимавшие клопидогрель за 14 дней до включения в исследование;
- состояния, ассоциированные с повышенным риском кровотечений: острое кровотечение или геморрагический синдром, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки в стадии обострения, внутричерепное кровоизлияние, неспецифический язвенный колит, туберкулез, опухоли легких;
- беременность и период лактации;
- пациенты с выраженной почечной и печеночной недостаточностью;
- тяжелые психические расстройства;
- алкоголизм и снижение комплаентности.

Пациенты при поступлении классифицированы по основным нозологическим формам: 103 (41,2%) с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST, 126 (50,4%) с инфарктом миокарда без подъема сегмента ST и нестабильной стенокардией и 21 (8,4%) с мультифокальным атеросклерозом коронарных и периферических артерий.

Характеристика общей выборки пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1

Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатели	Число пациентов, n (%)
Возраст, лет	60,84±10
Пол (м)	176 (70,4%)
Ожирение 1-3 степени	83 (33,2%)
Сахарный диабет 2го типа	75 (30%)
Степень артериальной гипертензии	
II степень	36 (14,4%)
III степень	157 (62,8%)
Курение	104 (41,6%)

Прием ацетилсалициловой кислоты до госпитализации	71 (28,4%)
Риск развития ишемической болезни сердца	
1 – 2 фактора риска	28 (11,2%)
3 фактора риска	57 (22,8%)
4 и более факторов риска	165 (66%)

При поступлении всем пациентам была назначена терапия согласно действующим рекомендациям ВНОК (ныне РКО).

Исследование не было лимитировано назначением «оригинального» или «дженерического» клопидогреля. Двойную антитромбоцитарную терапию аспирином и клопидогрелем получали 234 (93,6%) пациента.

Все пациенты наблюдались не менее 18 месяцев, средний период наблюдения за пациентами составил 545 ± 19 дней. После включения в исследование плановые визиты пациентов проводились 1 раз в 3 месяца и по окончании срока наблюдения. При необходимости проводились телефонные опросы пациентов. Комбинированная первичная конечная точка включала: сердечно-сосудистую смерть, развитие нефатального инфаркта миокарда, случаи ранней постинфарктной стенокардии и тромбоз стента.

Исследование функции тромбоцитов

Забор крови для исследования производился сразу после поступления пациента в стационар (до приема клопидогреля) и через 7-10 дней после первичного определения агрегации тромбоцитов. Пробирки с кровью доставлялись в лабораторию в течение одного часа после забора. Стабилизированную кровь дважды центрифугировали для получения богатой тромбоцитами плазмы.

Агрегацию тромбоцитов исследовали в межклинической коагулологической лаборатории Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (заведующая лабораторией Нестерова Светлана Георгиевна) турбодиметрическим методом Борна, основанном на регистрации изменений светопропускания богатой тромбоцитами плазмы. В работе использовался анализатор агрегации тромбоцитов AP 2110 фирмы «SOLAR». В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовался раствор АДФ в конечной концентрации 10 мкмоль/литр. Агрегация тромбоцитов

измерялась как максимальное изменение (увеличение) светопропускания богатой тромбоцитами плазмы в процентах после добавления индуктора. При этом светопропускающая способность богатой тромбоцитами плазмы принималась за 0%, а в качестве контроля служила бедная тромбоцитами плазма этого же пациента, светопропускающая способность которой принималась за 100%. После добавления индуктора к богатой тромбоцитами плазме в процессе агрегации тромбоцитов ее светопропускающая способность стремится от 0 к 100%.

Определение резистентности к терапии клопидогрелем

Для оценки ответа на лечение клопидогрелем определяли снижение агрегации тромбоцитов на фоне индукции АДФ по отношению к исходному значению в процентах по формуле:

$$\frac{AT_{исх.} - AT_{врем.}}{AT_{исх.}} \times 100\%, \text{ где}$$

$AT_{исх.}$ – исходная агрегация тромбоцитов, $AT_{врем.}$ – агрегация тромбоцитов через 7-10 дней после первичного определения агрегации тромбоцитов, которое соответствует времени, прошедшему от начала терапии клопидогрелем.

При снижении $<10\%$, $10-29\%$, и $\geq 30\%$ пациентов рассматривали как резистентных, «частично резистентных» и чувствительных к терапии клопидогрелем соответственно [Müller I. и соавт., 2004].

За критерий резистентности к терапии клопидогрелем в нашей работе принято снижение агрегации менее чем на 10%.

Генетический анализ

Генетический анализ проводился на базе Института экологии человека и гигиены окружающей среды (заведующая лабораторией молекулярно-генетической диагностики, к.б.н. Аксенова Марина Геннадьевна) и лаборатории генно-инженерных систем ЗАО «Лагис» (заведующий научным отделом Кириллов Михаил Юрьевич). Для того чтобы убедиться в происхождении выборки пациентов, образцы были прогенотипированы по Alu-маркерам – *PV92* и *TPA25*, которые широко применяются в популяционных исследованиях. В

выборке распределение аллелей и генотипов данных маркеров подчинялось закону Харди-Вайнберга, что свидетельствует об однородности выборки.

В нашей работе исследован ряд генетических полиморфизмов, которые потенциально могут быть связаны с развитием резистентности к клопидогрелю:

1. Полиморфизм 3435C→T транспортного гена - ABCB1 (гликопротеин P);
2. Полиморфизм Arg144Cys C430T экзон 3 гена CYP2C9*2 и Ile359Leu A1075C экзон 7 CYP2C9*3 системы цитохрома P-450;
3. Полиморфизм гена CYP2C19*2 (rs4244285), CYP2C19*3 (rs4986893) и CYP2C19*17 (rs12248560) системы цитохрома P-450;
4. Полиморфизм T744C гена, кодирующего рецепторы тромбоцитов P2Y12;
5. Полиморфизм rs6962291 гена тромбоксан-синтетазы TBXAS1.

Исследование проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом [Sirotkina O. и соавт., 2005]. В основе метода ПЦР лежит процесс многократного увеличения копий (амплификации) определенных участков ДНК, осуществляемый с помощью фермента ДНК-полимеразы.

Статистический анализ

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакетов программ для статистического анализа STATISTICA (версия 10.0), SPSS (версия 20.0) и программы Excel for Windows.

Для оценки нормальности распределения проводился тест Колмогорова – Смирнова. Описание количественных признаков выполнено в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение в случае нормального распределения и в виде медианы с указанием 25 и 75 перцентиля в случае ненормального распределения. Для качественных показателей вычислялись следующие показатели: число наблюдений и доля (в %) от общего количества пациентов или от количества пациентов в соответствующей подгруппе.

Сравнение между независимыми подгруппами по количественным показателям проводилось с помощью теста Манна-Уитни или теста Крускала-Уолиса. В последнем случае при выявлении статистически достоверных различий

апостериорный анализ осуществлялся с использованием критерия Шеффе. Сравнение между независимыми подгруппами по качественным показателям осуществлялось с использованием критерия хи-квадрат. Соотношение между количественными показателями оценивалось с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Независимые предикторы проанализированы при помощи однофакторного анализа (ANOVA) и многофакторного дисперсионного анализа (MANOVA).

Время до наступления событий комбинированной первичной конечной точки (ПКТ) анализировалось с использованием метода Каплана-Мейера и регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса. Достоверность различия по времени до наступления событий комбинированной ПКТ оценивалась с использованием критериев Вилкоксона-Гехана и лог-рангового теста, или же критерия хи-квадрат.

Различия считались достоверными при уровне значимости более 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На фоне терапии клопидогрелем через 7 суток наблюдалось снижение средней агрегации тромбоцитов с $65,6 \pm 17,5\%$ до $45,3 \pm 20,2\%$. Согласно принятому критерию резистентности (снижение АДФ-агрегации менее 10%) все пациенты были разделены на чувствительных – 74% и резистентных к терапии клопидогрелем – 26%.

Показатель исходной АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов чувствительных к терапии клопидогрелем составил $66,9 \pm 15,6\%$, а у резистентных пациентов - $61,6 \pm 21,8\%$ ($p = 0,03$). Агрегация через 7 дней у чувствительных пациентов снизилась до $36,6 \pm 14\%$, в то время как у резистентных повысилась до $67,1 \pm 19,2\%$ ($p < 0,01$).

При подробном анализе различных групп (таблица 2) оказалось, что пациенты с острым коронарным синдромом (ОКС) более чувствительны к терапии антиагрегантными препаратами, чем стабильные пациенты с мультифокальным поражением артерий (МФА), в том числе коронарных (43% против 56,8%, $p < 0,01$). Кроме того, внутри группы ОКС пациенты с инфарктом миокарда с

подъемом сегмента ST (ИМспST) оказались менее чувствительны к терапии клопидогрелем, чем пациенты с инфарктом миокарда без подъема сегмента ST (ИМбпST) и нестабильной стенокардией (НС) (48,8% против 38,4%, $p<0,01$).

Пациенты, страдающие сахарным диабетом 1-го и 2-го типа менее чувствительны к антиагрегантной терапии, чем пациенты без диабета (51,6% против 42,5%, $p<0,01$).

Не выявлено взаимосвязи пола, степени артериальной гипертонии, статуса курения и массы тела со значением АДФ-агрегации тромбоцитов через 7 дней терапии клопидогрелем.

Таблица 2

Клинико-демографическая характеристика пациентов

Показатель	Исходная АДФ-агрегация	p	АДФ-агрегация через 7 дней	p
Пол:				
-мужчины	65±17,6%	}p=0,5	44,7±20,8%	}p=0,5
-женщины	66,7±17,3%		46,6±18,6%	
Возраст:				
-до 60 лет	66,8±16,8%	}p=0,3	45,3±21,2%	}p=0,9
-после 60 лет	64,5±18,1%		45,3±19,2%	
Диагноз:				
-ОКСспST	67±16,9%	}p=0,2 (ОКС vs МФА)	48,8±20,7%	}p<0,01 (ОКС vs МФА)
-ОКСбпST/НС	63,3±17,3%		38,4±15,7%	
-МФА	68,4±21,1%		58,6±24,5%	
Статус курения:				
-курающие	66,2±18,3%	}p=0,7	46,1±23,1%	}p=0,6
-некурающие	65,2±16,9%		44,7±17,8%	
Ожирение:				
-с ожирением	64,7±18,0%	}p=0,6	47,4±20,9%	}p=0,3
-без ожирения	65,9±17,3%		44,3±19,7%	
Сахарный диабет (1 и 2 типа):				
-с диабетом	65,6±18,4%	}p=0,9	51,6±21,9%	}p<0,01
-без диабета	65,6±17,1%		42,5±18,7%	
Гипертоническая болезнь (1, 2 и 3 степени):				
-с ГБ	66,3±17,8%	}p=0,2	46,2±20,4%	}p=0,2

-без ГБ Холестерин крови, ммоль/л:	62,8± 16,0%		41,8±19,1%	
-менее 5,5	65,4±18,6%	}p=0,9	44,6±18,5%	}p=0,6
-более 5,5	65,8±15,4%		45,3±20,8%	

Остаточная реактивность тромбоцитов в различных подгруппах не зависит от первоначальной дозы клопидогреля: 600 (при чрескожных коронарных вмешательствах), 300 или 75 мг. Прием аторвастатина (p=0,4) и омега-3 (p=0,3) не оказывает влияния на эффективность антиагрегантной терапии.

Кроме того, такие показатели как пол, статус курения, масса тела и количество факторов риска развития ИБС также не ассоциированы с остаточной реактивностью тромбоцитов.

Аналогично влиянию на уровень АДФ-агрегации через 7 дней терапии клопидогрелем, была получена взаимосвязь нозологической формы пациентов и остаточной реактивности тромбоцитов. Среди пациентов с ИМбпST или нестабильной стенокардией 15,5% оказались резистентными к терапии, с ИМспST – 30,9% и с МФА – 47,6%, p<0,05. Таким образом, относительно стабильные пациенты с МФА оказались менее чувствительными к антиагрегантной терапии, чем пациенты с ОКС (рисунок 1).

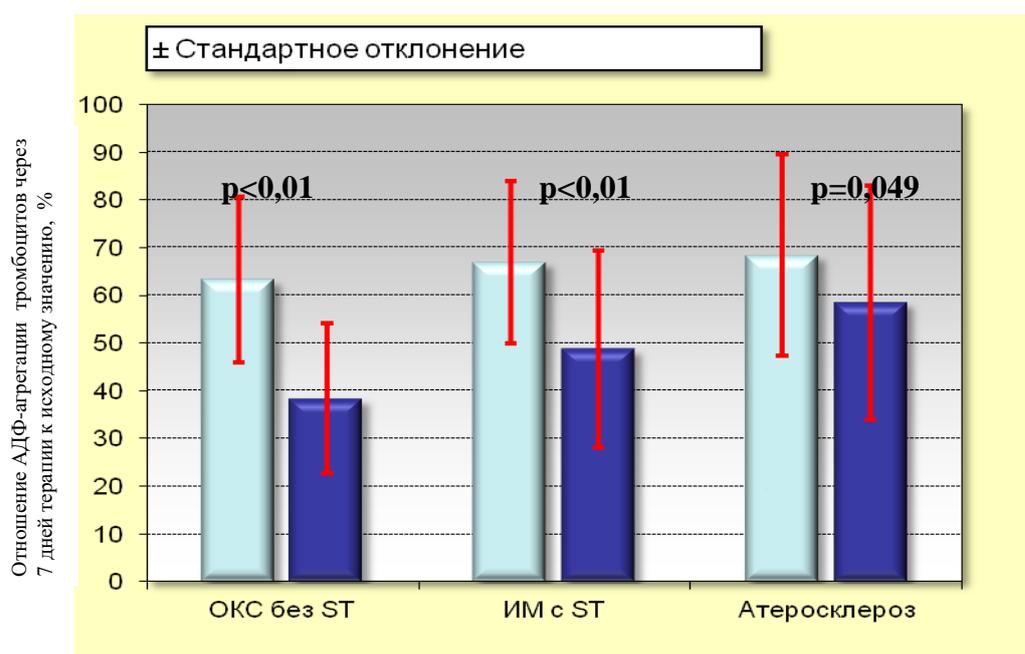


Рисунок 1. Остаточная реактивность тромбоцитов и нозологическая форма

Статус углеводного обмена также ассоциирован с чувствительностью к терапии клопидогрелем (рисунок 2): среди пациентов без СД только 19,6% оказались резистентными, в то время как, среди пациентов, страдающих СД 1-го и 2-го типов - 40,3%, $p < 0,001$.

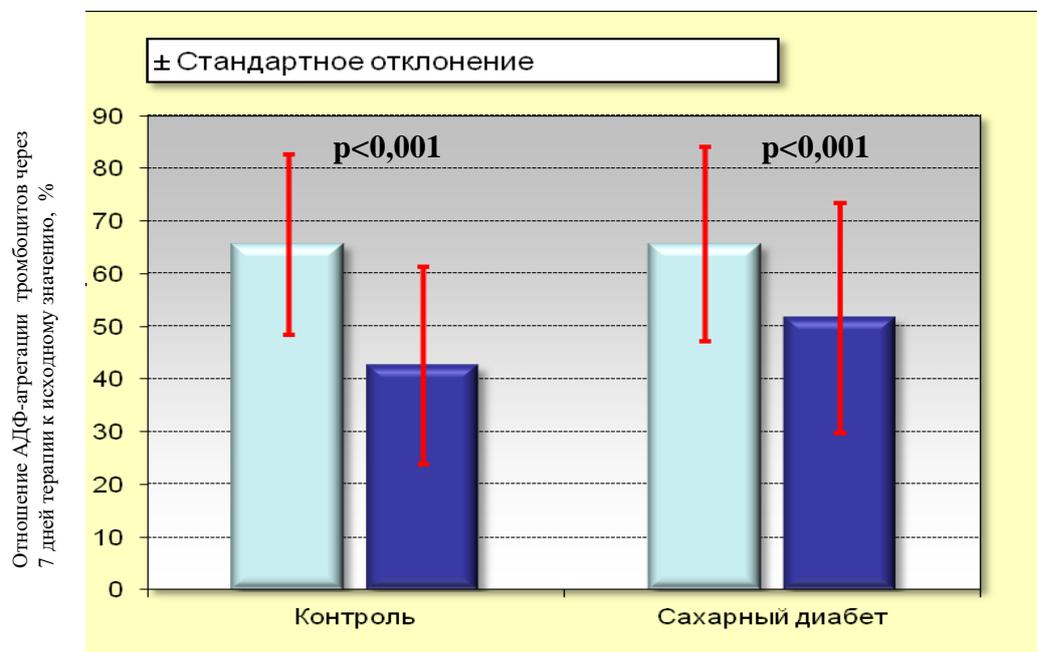


Рисунок 2. Остаточная реактивность тромбоцитов и статус углеводного обмена

Проанализированы гены, влияющие на всасывание (транспортный ген ABCB1), метаболизм (CYP2C9 и CYP2C19 гены системы цитохрома P-450), рецепторную чувствительность тромбоцитов (P2Y12) клопидогреля и ген тромбоксан-синтетазы (TBXAS1). Из большого количества исследованных полиморфизмов генов с остаточной реактивностью тромбоцитов достоверно ассоциирован AA генотип CYP2C19*2 цитохрома P-450 и AA генотип гена TBXAS1. AA генотип CYP2C19*2 гена замедляет превращение клопидогреля, являющегося пролекарством, в его активный метаболит. У пациентов с AA генотипом CYP2C19*2 гена был достоверно более высокий показатель АДФ-агрегации через 7 дней приема клопидогреля. При противопоставлении двух групп (AA против GA/GG), было получена достоверная взаимосвязь AA генотипа с риском возникновения резистентности к антитромбоцитарным препаратам.

Среди пациентов с АА генотипом гена тромбоксан-синтетазы было достоверно меньше резистентных пациентов, чем среди носителей АТ и ТТ генотипов.

Не получено достоверной взаимосвязи ни с показателем исходной агрегации и через 7 дней приема клопидогреля, ни с остаточной реактивностью тромбоцитов полиморфизмов транспортного ABCB1, CYP2C9 системы цитохрома Р-450 и рецепторного P2Y12 генов.

Для оценки взаимосвязи клинических и генетических факторов с остаточной реактивностью тромбоцитов выполнен многофакторный анализ. На первом этапе при однофакторном анализе (ANOVA) выявлены следующие факторы, влияющие на остаточную реактивность тромбоцитов: нозологическая форма, статус углеводного обмена и генотип тромбоксан-синтетазы.

При включении вышеуказанных трех показателей в многофакторный дисперсионный анализ (MANOVA) они достоверно сохраняют самостоятельную значимость.

Сердечно-сосудистые события (сердечно-сосудистая смерть, развитие нефатального инфаркта миокарда, случаи ранней постинфарктной стенокардии и тромбоз стента) достоверно чаще возникали у пациентов, резистентных к терапии клопидогрелем (рисунок 3).

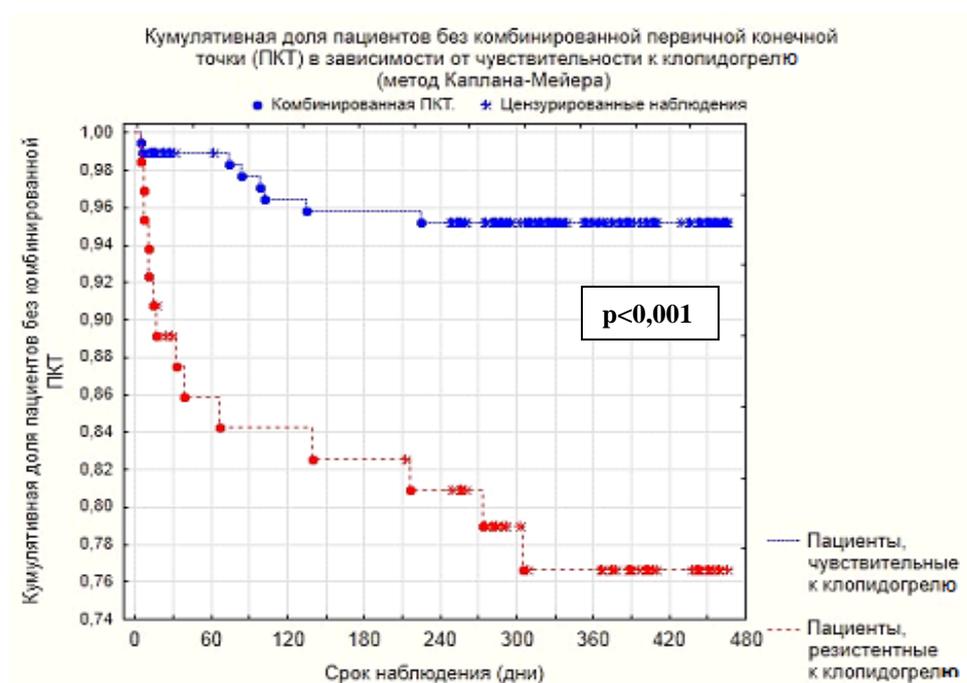


Рисунок 3. Оценка взаимосвязи остаточной реактивности тромбоцитов с риском возникновения ПКТ в течение 12 месяцев наблюдения

За 12 месяцев наблюдения выявлено 38 (15,2%) случаев ПКТ, среди которых 10 (4%) случаев смертельного исхода; за период наблюдения в 18 месяцев количество случаев ПКТ у пациентов возросло до 51 (20,4%), среди которых 11 (4,4%) смертей.

Среди пациентов без сердечно-сосудистых событий за 12 месяцев наблюдения 22% оказались резистентными к терапии клопидогрелем, а среди пациентов с первичной конечной точкой – 81,2%.

При анализе риска возникновения ПКТ в течение 12 месяцев наблюдения в различных клиничко-демографических подгруппах не была получена достоверная взаимосвязь с нозологической формой пациентов, полом, статусом курения или массой тела. Однако у пациентов с нормальным углеводным обменом достоверно ($p=0,049$) реже возникали сердечно-сосудистые события, чем у пациентов, страдающих сахарным диабетом. Среди пациентов, страдающих сахарным диабетом, за 12 месяцев у 16% зафиксированы случаи развития ПКТ, в то время как у пациентов с нормальным углеводным обменом только в 7% случаев (рисунок 4).

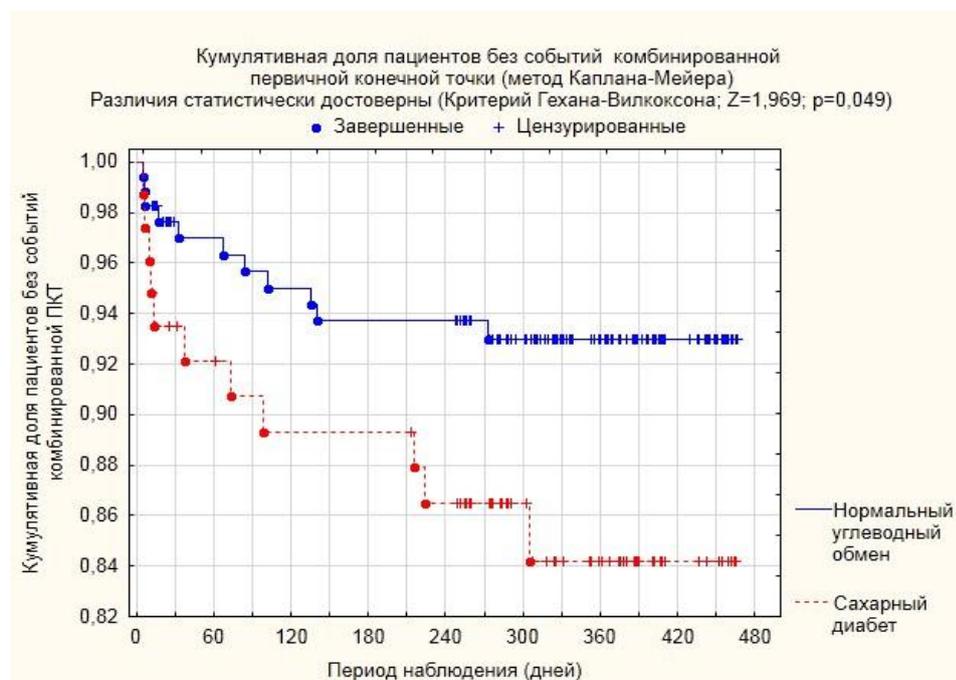


Рисунок 4. Оценка взаимосвязи статуса углеводного обмена с риском возникновения ПКТ за 12 месяцев

При анализе с помощью регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса, установлено, что риск развития ПКТ на 56,1% ниже у пациентов с отсутствием нарушений углеводного обмена по сравнению с пациентами с сахарным диабетом (отношение рисков [HR] = 0,439, 95% ДИ 0,194-0,996; $p=0,049$).

Наличие аллеля с утратой функции *2*3 CYP2C9 гена достоверно ассоциировано с риском развития первичной конечной точки (рисунок 5).



Рисунок 5. Оценка взаимосвязи генотипа CYP2C9 с риском возникновения ПКТ за 18 месяцев

При анализе с помощью регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса, установлено, что риск развития ПКТ достоверное ниже у пациентов с «диким» типом генотипа CYP2C9 по сравнению с пациентами со сниженной активностью CYP2C9 (отношение рисков [HR] = 0,437, 95% ДИ 0,193-0,991; $p=0,048$).

Не было получено достоверной взаимосвязи TT, TC или CC генотипов ABCB1 гена и GG или GT генотипов P2Y12 гена с риском возникновения сердечно-сосудистых событий в течение года.

Широко известный факт взаимосвязи AA генотипа CYP2C19 гена с риском развития сердечно-сосудистых исходов, не получил достоверного отражения в

данной работе из-за небольшого количества данного генотипа в популяции наших пациентов: AA генотип CYP2C19*2 цитохрома P-450 выявлен у 9 (3,6%) больных.

При анализе сердечно-сосудистых событий в течение 12 месяцев наблюдения не было получено достоверного влияния AA или TT генотипов гена тромбоксан-синтетазы на риск возникновения первичной конечной точки.

Через 18 месяцев было получено достоверное различие между пациентами с AA и AT-TT генотипами TBXAS1 в отношении риска возникновения первичной конечной точки. Более того, среди пациентов с AA генотипом не было ни одного сердечно-сосудистого события (рисунок 6).

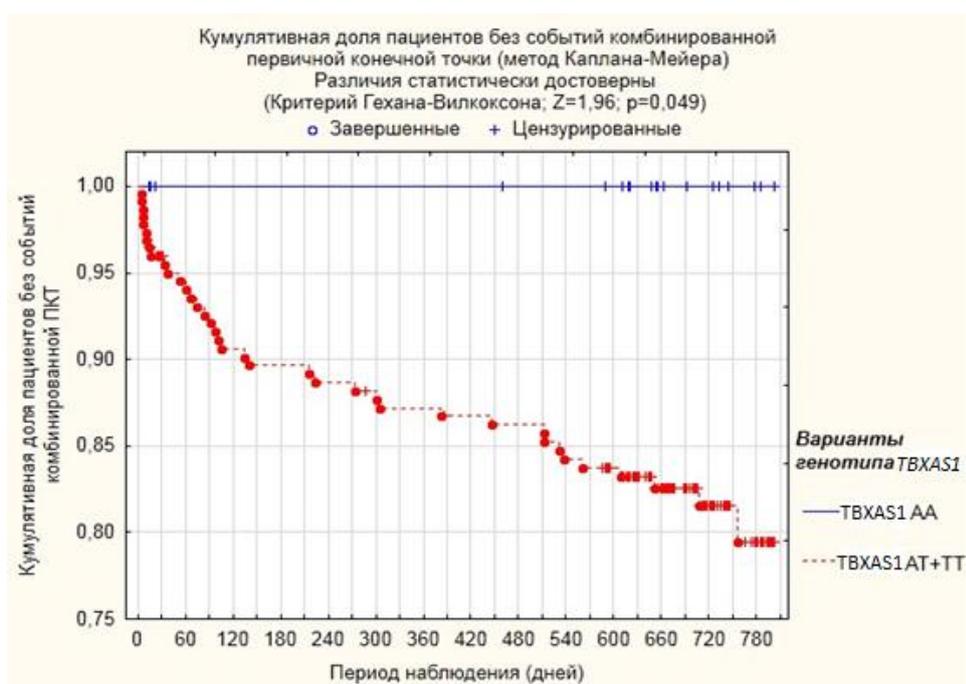


Рисунок 6. Оценка взаимосвязи полиморфизма гена тромбоксан-синтетазы с риском возникновения ПКТ за 18 месяцев

В связи с тем, что в группе пациентов с AA генотипом тромбоксан-синтетазы не выявлено ни одного случая ПКТ, невозможно рассчитать его влияние на выживаемость при помощи регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса.

Интересные факты были получены в отношении статуса курения. Анализ риска развития ПКТ у пациентов с различным полиморфизмом CYP2C9 гена и статусом курения достоверно показал, что среди никогда не куривших пациентов с аллелем с утратой функции больше (27%) случаев возникновения ССС по

сравнению с курильщиками с таким же генотипом - 7%. Такая же тенденция сохраняется и в течение 18 месяцев наблюдения.

Доля пациентов с ПКТ среди имеющих «дикий» тип СУР2С9 гена с нормальным углеводным обменом за 12 месяцев составила 5,7%, а среди пациентов, страдающих сахарным диабетом – 12%. Среди пациентов с аллелем с утратой функции СУР2С9 гена без диабета, доля лиц с ПКТ составила 11%, в то время как среди пациентов с сахарным диабетом - 25%. Через 18 месяцев доля пациентов с ПКТ среди, имеющих аллель с утратой функции СУР2С9 гена и страдающих сахарным диабетом составила 37%, что подтверждает доказанное ранее неблагоприятное влияние сахарного диабета на сердечно-сосудистые исходы.

В данном исследовании выявлено, что пациенты с АА генотипом ТВХАS1 гена в 100% случаев не имели ПКТ в течение 18 месяцев наблюдения вне зависимости от комбинации со статусом углеводного обмена, курением или количеством факторов риска ИБС.

Так, среди пациентов с АА генотипом гена ТВХАS1 и нормальным углеводным обменом или страдающих сахарным диабетом не было зафиксировано ни одного случая ПКТ за 18 месяцев наблюдения. В то время как среди пациентов с ТТ генотипом и нормальным углеводным обменом случаи ПКТ выявлены у 21%, а среди страдающих сахарным диабетом – у 29% пациентов.

Вне зависимости от количества факторов риска ИБС пациенты с АА генотипом ТВХАS1 не имели ни одного сердечно-сосудистого исхода. В то время как доля пациентов без ПКТ среди имеющих ТТ генотип составила 75%, при наличии менее 4 факторов риска, и 77% имея 4 и более факторов риска ИБС, хотя эти данные оказались недостоверными.

Выявлено также, что пациенты с АА генотипом ТВХАS1 независимо от варианта СУР2С9 гена не имели ни одного случая ПКТ за 18 месяцев наблюдения. Среди пациентов с АТ-ТТ генотипами ТВХАS1 гена и *1*1 СУР2С9 генотипом доля без ПКТ за 12 месяцев составила 92%, а при сочетании АТ-ТТ с генотипом со сниженной активностью – 84% (рисунок 7).

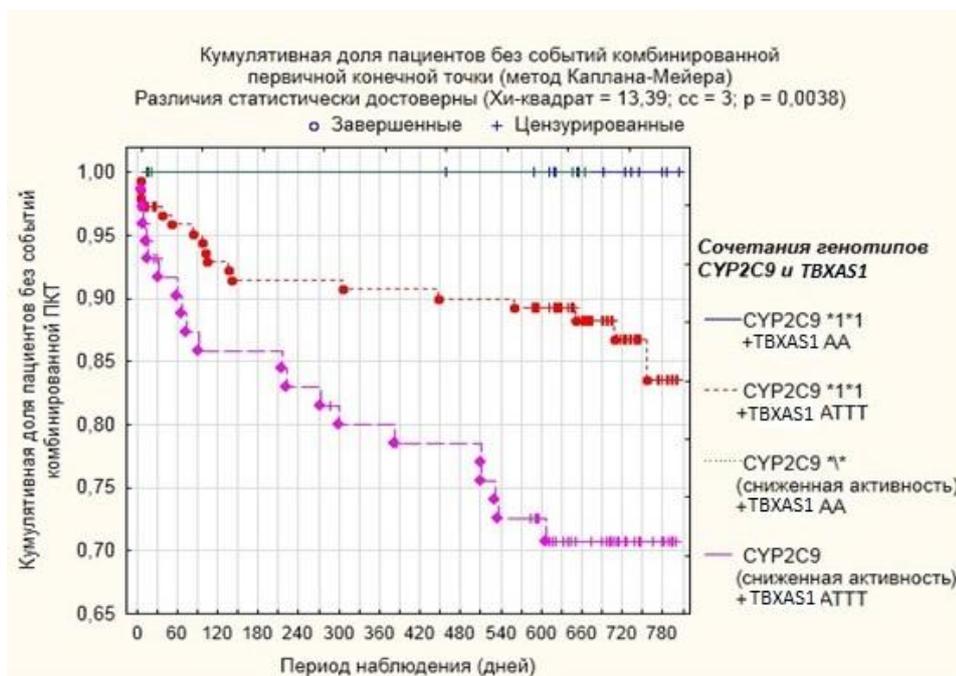


Рисунок 7. Оценка риска возникновения ПКТ за 18 месяцев при сочетании полиморфизмов TBXAS1 и CYP2C9 генов

Известно, что аденозиндифосфат (АДФ) является одним из наиболее важных паракринных медиаторов тромбоцита. АДФ через P2Y1 и P2Y12 рецепторы при помощи киназы, регулирующей уровень внеклеточного кальция и фосфолипазы A2 запускает цикл арахидоновой кислоты с образованием тромбоксана A2. Образование тромбоксана A2 из эндопероксидов осуществляется тромбоксан-синтетазой. Секретируемые с началом активации тромбоцитов АДФ, серотонин и тромбоксан A2, в свою очередь, активируют близлежащие тромбоциты, что запускает процесс тромбообразования в сосудах.

Таким образом, при анализе факторов, влияющих на повышение агрегации тромбоцитов и на сужение сосудов с помощью тромбоксана A2 (рисунок 8) при блокаде P2Y12 рецепторов клопидогрелем и цикла арахидоновой кислоты ацетилсалициловой кислотой, можно предположить, что наличие «медленного» А аллеля гена тромбоксан-синтетазы TBXAS1 является значимым протективным фактором при вторичной профилактике ИБС.

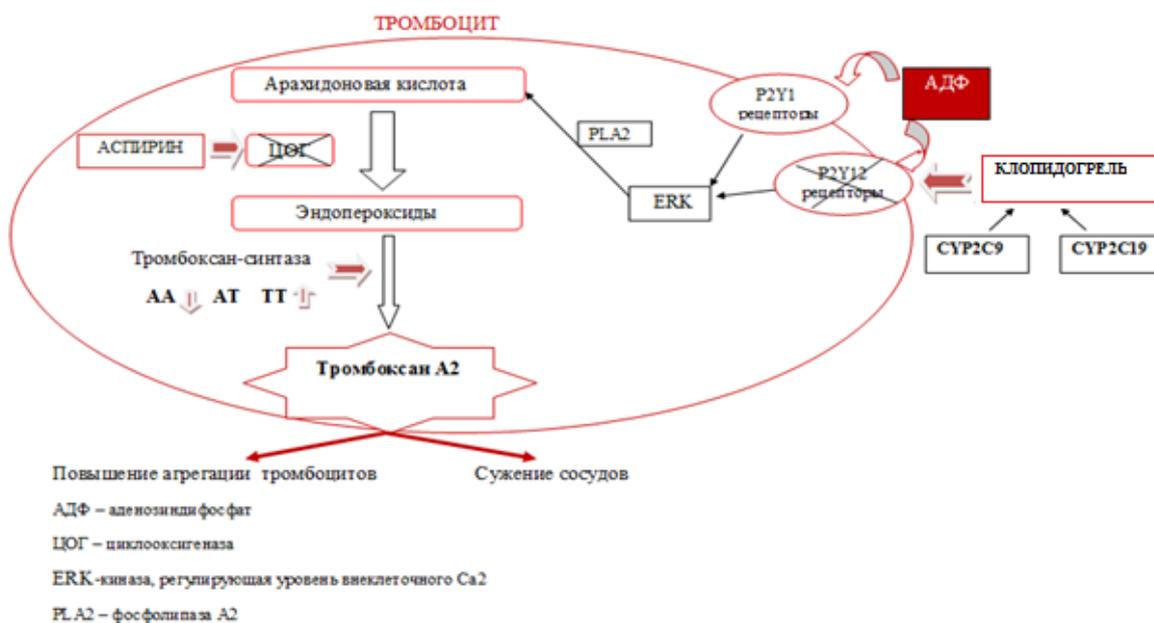


Рисунок 8. Факторы, влияющие на метаболизм тромбоксана A2

Выводы

1. Сердечно-сосудистые события (сердечно-сосудистая смерть, развитие нефатального инфаркта миокарда, случаи ранней постинфарктной стенокардии и тромбоз стента) достоверно ($p < 0,01$) чаще возникают у пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне терапии клопидогрелем. На риск развития сердечно-сосудистых событий влияют статус углеводного обмена (отношение рисков = 0,439; 95% ДИ 0,194-0,996; $p = 0,049$) и генотип CYP2C9 (отношение рисков = 0,437; 95% ДИ 0,193-0,991; $p = 0,048$). Абсолютный риск возникновения сердечно-сосудистых событий у пациентов с AT и TT генотипами TBXAS1 гена на 14,2 % выше по сравнению с пациентами с AA генотипом, которые в 100% случаев не имели первичные конечные точки.
2. Согласно принятому критерию резистентности (снижение АДФ-агрегации менее 10%) в исследуемой популяции выявлено 26% пациентов, резистентных к клопидогрелю. Показатель исходной АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов чувствительных к терапии клопидогрелем составил 67%, а у резистентных пациентов - 62%. Агрегация через 7 дней у чувствительных пациентов достоверно ($p < 0,01$) снизилась до 37%, в то время как у резистентных достоверно ($p < 0,01$) повысилась до 67%.

3. При анализе клинических факторов в однородных группах пациентов выявлена достоверная взаимосвязь нозологической формы и статуса углеводного обмена с остаточной реактивностью тромбоцитов. Пациенты с ОКС более чувствительны к терапии антиагрегантными препаратами, чем стабильные пациенты с мультифокальным поражением артерий, в том числе коронарных (43% против 56,8%, $p < 0,01$). Пациенты, страдающие сахарным диабетом 1-го и 2-го типа менее чувствительны к антиагрегантной терапии, чем пациенты без диабета (51,6% против 42,5%, $p < 0,01$).
4. «Медленный» АА генотип CYP2C19*2 достоверно ассоциирован с АДФ-агрегацией через 7 дней приема клопидогреля и высоким риском возникновения резистентности к клопидогрелю. Пациенты с АА генотипом гена тромбоксан-синтетазы TBXAS1 оказались более чувствительны к терапии клопидогрелем, в то время как среди пациентов с АТ и ТТ генотипом было достоверно больше резистентных пациентов, $p < 0,01$. Не получено достоверного влияния на показатели исходной агрегации, агрегацию через 7 дней приема клопидогреля и на возникновение резистентности полиморфизмов транспортного ABCB1, CYP2C9 системы цитохрома Р-450 и рецепторного P2Y12 генов.

Практические рекомендации

1. У пациентов с мультифокальным поражением артерий или с ОКС, страдающих сахарным диабетом 1-го или 2-го типа, представляется целесообразным проведение генетического тестирования для выявления лиц с высоким риском сердечно-сосудистых событий.
2. При наличии А/Т (rs 6962291) полиморфизма гена тромбоксан-синтетазы TBXAS1 и полиморфизмов Arg144Cys C430T экзон 3 CYP2C9*2 и Ile359Leu A1075C экзон 7 CYP2C9*3 гена системы цитохрома Р-450 назначение двойной антиагрегантной терапии аспирином и клопидогрелем может оказаться недостаточно эффективным.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Меситская Д.Ф.**, Никитина Ю.М., Копылов Ф.Ю., Сыркин А.Л. Резистентность к клопидогрелю у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями // *Материалы конгресса Российского национального конгресса кардиологов «Интеграция знаний в кардиологии»*. – Москва, 3-5 октября 2012 г. – С. 300.
2. **Меситская Д.Ф.**, Никитина Ю.М., Копылов Ф.Ю. Факторы, влияющие на резистентность к терапии клопидогрелем у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями // *Научная программа Московского международного Форума кардиологов*. – Москва, 26-28 марта 2013 г. – С. 118.
3. **Меситская Д.Ф.** Влияние полиморфизма транспортного гена и генов системы цитохрома P450 на резистентность к терапии клопидогрелем // *Сборник материалов конференции Российского союза молодых ученых. Всероссийская научно-практическая конференция «Аспирантские и докторантские чтения: Моделирование научного исследования – форсайт-технологии»*. - Москва, 29 марта 2013 г. - С. 55-56.
4. **Меситская Д.Ф.**, Никитина Ю.М., Копылов Ф.Ю. Клиническая фармакогенетика клопидогреля у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями // *Сборник материалов Юбилейного XX Российского национального конгресса «Человек и лекарство»*. - Москва, 15-19 апреля 2013 г. – С. 184-185.
5. **Меситская Д.Ф.**, Никитина Ю.М., Копылов Ф.Ю. Резистентность к клопидогрелю: все ли мы знаем? // *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. – 2013. - том 6, №1. – С. 27-33.
6. **Меситская Д.Ф.**, Никитина Ю.М., Копылов Ф.Ю. Современная антитромботическая терапия // *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. – 2013. - том 6, №4. – С. 19-24.
7. **Меситская Д.Ф.**, Никитина Ю.М., Ломакин О.В., Щекочихин Д.Ю., Копылов Ф.Ю. Влияние на прогноз оригинального и генерического клопидогрела в зависимости от различных полиморфизмов генов // *Терапевтический архив*. – 2014. – том 86, №9. – С. 77-82.
8. Копылов Ф.Ю., **Меситская Д.Ф.**, Никитина Ю.М., Аксенова М.Г., Добровольский А.В., Ломакин О.В., Черный О.В. Положительное влияние гена тромбксансинтазы А низкой активности на прогноз при ишемической болезни сердца // *Терапевтический архив*. – 2015. - №3. – С. 59-65.
9. **Меситская Д.Ф.**, Никитина Ю.М., Копылов Ф.Ю., Сыркин А.Л., Аксенова М.Г., Кириллов М.Ю., Добровольский А.В. Клинические и фармакогенетические факторы, влияющие на резистентность к клопидогрелю у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями // *Клиническая медицина*. – 2015. – том 93, №2. – С. 40-46.

Список используемых сокращений

АГ – артериальная гипертония

АДФ – аденозиндифосфат

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС - ишемическая болезнь сердца

МФА - мультифокальный атеросклероз

ОКС - острый коронарный синдром

ОКСбпST - острый коронарный синдром без подъема сегмента ST на ЭКГ

ОКСспST - острый коронарный синдром с подъемом сегмента ST на ЭКГ

ПКТ - первичная конечная точка

СД - сахарный диабет

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТВХАС1 - тромбоксан -синтетаза