

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CYP2C19 У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ С ПОДЪЕМОМ СЕГМЕНТА ST (данные регистра острого коронарного синдрома г. Кемерово)

А.М. Кочергина¹, кандидат медицинских наук, В.В. Кашталап^{1,2}, доктор медицинских наук,
Л.А. Гордеева³, кандидат биологических наук, Н.А. Кочергин¹,
О.Л. Барбараш^{1,2}, член-корреспондент РАН, профессор

¹Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАН,
Российская Федерация, 650002, Кемерово, ул. Сосновый бульвар, д. 6;

²Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России,
Российская Федерация, 650070, Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22А;

³Институт экологии человека СО РАН,
Российская Федерация, 650065, Кемерово, Ленинградский проспект, д. 10

E-mail: noony88@mail.ru

Цель исследования: изучить распространенность и клиническое значение полиморфизма гена CYP2C19 у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) с подъемом сегмента ST в г. Кемерово.

Материал и методы. В исследование включены 159 пациентов, госпитализированных в клинику с ОКС с элевацией сегмента ST, подвергнутых первичному чрескожному коронарному вмешательству (ЧКВ) со стентированием инфарктзависимой артерии. В соответствии с наследованием аллелей гена CYP2C19, кодирующих разные по функциональному признаку ферменты, пациенты обследуемой группы были разделены на 2 подгруппы: медленные и нормальные метаболизаторы.

Результаты. Носительство медленных аллелей генов метаболизма клопидогрела обнаружено у 20 (12,57%) обследованных: CYP2C19*2 (rs4244285) – у 18, а CYP2C19 *3 (rs4986893) – у 2. Сравнимые группы были сопоставимы по возрасту, полу больных, распространенности артериальной гипертензии, сахарного диабета, постинфарктного кардиосклероза, курения. Пациентам, включенным в исследование, в рамках оказания помощи было выполнено ЧКВ со стентированием коронарной артерии. Тромбоз стента, повлекший летальный исход, обнаружен у пациента с нормальным генотипом. Показатели госпитальной летальности в сравниваемых группах были одинаковыми.

Заключение. Полученные нами результаты не дают возможности утверждать, что генетически детерминированная устойчивость к клопидогрелу широко распространена среди пациентов с ОКС в Кемерово и оказывает влияния на его исходы и осложнения. Аллель CYP2C19*3 имеет наиболее широкое распространение среди лиц азиатского происхождения, поэтому в исследуемой выборке, представленной европеоидами, указанная аллель ожидаемо встречалась крайне редко.

Ключевые слова: фармакогенетика, клопидогрел, инфаркт миокарда

CLINICAL SIGNIFICANCE OF GENE CYP2C19 POLYMORPHISM IN STEMI PATIENTS (DATA FROM THE KEMEROVO REGISTRY OF THE ACUTE CORONARY SYNDROME)

А.М. Kochergina¹, V.V. Kashtalap^{1,2}, L.A. Gordeeva³, N.A. Kochergin¹, O.L. Barbarash^{1,2}

¹State Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases under the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Sosnovyi boul., 6, Kemerovo, 650000, Russian Federation;

²Kemerovo State Medical University, Voroshilova street, 22 A, Kemerovo, 650070, Russian Federation;

³State Research Institute of Human Ecology, Leningradskiy prospect, 10, Kemerovo, 650065, Russian Federation

E-mail: noony88@mail.ru

Aim is to evaluate distribution and clinical significance of gene CYP2C19 polymorphism in ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) patients.

Materials and methods. A total of 159 patients were included in this study. All of them underwent primary PCI. According to CYP2C19 inheritance, patients were divided into two groups: «poor» metabolizers and «normal» metabolizers.

Results. Poor metabolizing genotype was found in 20 patients (12,57%): CYP2C19*2 (rs4244285) – in 18 cases, a CYP2C19 *3 (rs4986893) – in 2 cases. Both groups were matched by age, gender, diabetes, active smoking. Hospital mortality rate was the same in both groups. Stent thrombosis occurred in patient with normal metabolizers subgroup.

Conclusion. The accepted data give no insurance that both resistance clopidogrel is widely spread among STEMI patients in Kemerovo and it provides any clinical impact on STEMI complications and outcomes. Allele *CYP2C19* * 3 is the most widely distributed among people of Asian descent, therefore, in the sample presented by Caucasians, this allele is expected to occur extremely rare

Key words: pharmacogenetics; clopidogrel; myocardial infarction

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что эффективность клопидогрела имеет генетически детерминированную вариабельность. Антитромбоцитарный эффект клопидогрела очень важен с прогностической позиции для пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС), особенно в случаях, когда выполнено чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) с имплантацией стента. Имеются убедительные литературные данные, свидетельствующие о том, что лица, являющиеся носителями медленных аллелей гена *CYP2C19* (*CYP2C19**2 и *CYP2C19**3), дольше метаболизируют молекулы клопидогрела в активную форму и, следовательно, имеют пониженную чувствительность к препарату либо нечувствительны к нему. Отсутствие терапевтического эффекта при приеме препарата ассоциировано с повышенным риском тромбозов стентов и, как следствие, повторных обострений ишемической болезни сердца. В то же время данные о распространенности аллелей гена *CYP2C19* получены на выборке, являющейся этнически несопоставимой с населением Кузбасса. Так, наиболее обширные исследования по распространенности полиморфных маркеров гена *CYP2C19* проведены в Японии. Недавно Д.А. Сычевым и соавт. показано, что на территории Российской Федерации, вероятно, вследствие многонациональности населения, существуют значительные колебания в частоте встречаемости аллелей *CYP2C19**2 и *CYP2C19**3.

Предварительные результаты многоцентрового исследования ПРОТОКОЛ, проводимого на популяции жителей Сибири и Дальнего Востока, позволили получить информацию о частоте встречаемости медленных аллелей *CYP2C19**2 и *CYP2C19**3 в указанных регионах.

Цель исследования: изучить распространенность и клиническую значимость полиморфных маркеров гена *CYP2C19* (rs4244285; rs4986893) у пациентов с ОКС с подъемом сегмента ST в г. Кемерово.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе ФГБНУ НИИ КПССЗ. В него были включены 159 пациентов, госпитализированных в клинику с ОИМ с элевацией сегмента ST, подвергнутых первичному ЧКВ со стентированием инфарктзависимой артерии. Критериями включения были: типичный болевой ангинозный синдром давностью не более 24 ч, сопровождающийся элевацией сегмента ST на ЭКГ; выполненное по результатам экстренной коронароангиографии первичное ЧКВ инфарктзависимой артерии с восстановлением коронарного кровотока до степени III по классификации TIMI [1]. В ходе госпитализации выполняли стандартный комплекс лабораторных и

инструментальных исследований, а также брали образцы крови для выделения ДНК.

Средний возраст включенных в исследование пациентов составил $58,92 \pm 10,83$ года, преобладали мужчины (72,95%). Ранее перенесли инфаркт миокарда (ИМ) 22 (13,83%) пациента, сахарный диабет типа 2 (СД2) отмечен у 22 (13,83%), артериальная гипертензия (АГ) — у 120 (75,47%); 65 (40,8%) являлись активными курильщиками. Госпитальная летальность составила 6 (3,77%) пациентов. Тромбоз стента, имплантированного в период настоящей госпитализации, зарегистрирован в 1 (0,62%) случае.

В соответствии с наследованием полиморфных маркеров гена *CYP2C19*, кодирующих разные по функциональному признаку ферменты, группа обследованных была разделена на 2 подгруппы: 1) медленные и промежуточные метаболизаторы; 2) экстенсивные метаболизаторы.

Всем пациентам до поступления в катетеризационную лабораторию назначали нагрузочную (600 мг) дозу клопидогрела; до вмешательства (на догоспитальном этапе либо при поступлении) вводили нефракционированный гепарин (болус из расчета 60 ЕД/кг). В послеоперационном периоде все пациенты получали двойную антитромбоцитарную терапию, включая ацетилсалициловую кислоту (75–150 мг/сут) и клопидогрел (75 мг/сут), статины (аторвастатин 20 мг/сут), β -блокаторы (метопролол сукцинат) и ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ИАПФ, эналаприл).

В госпитальном периоде у пациентов были взяты образцы крови, из которых в последующем выделена ДНК и проведено генотипирование. Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови осуществляли с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом. Образцы ДНК хранили при температуре -20°C .

Типирование мутаций гена *CYP2C19* (с.681G>A, *CYP2C19**2, rs4244285; с.636G>A, *CYP2C19**3, rs4986893) проводили методом асимметричной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием флуоресцентно-меченого олигонуклеотидного зонда с последующим плавлением амплификационных продуктов и анализом кривых плавления в режиме реального времени. В работе использовали коммерческие тест-системы ООО «СибДНК» (Новосибирск) в соответствии с рекомендациями производителя. Каждый образец амплифицировали с использованием пары специфических праймеров и зонда (см. табл. 1), несущих «гаситель» на 3'-конце и флуоресцентных красителей (FAM или R6G) на 5'-конце. Результаты интерпретировали, исходя из анализа графиков накопления флуоресценции. Реакции амплификации проводили с помощью амплификатора CFX-96 (Bio-Rad, США) при следующих условиях:

начальная денатурация 3' при 96°C; затем 45 циклов, включающих денатурацию при 96°C – 6", отжиг праймеров при 62°C – 6" и последующую элонгацию при 55°C – 30" (каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала в диапазоне, соответствующем интервалу флуоресценции флуорофора R6G). Общий объем реакционной смеси составил 20 мкл.

Для статистической обработки использовали стандартный пакет прикладных программ Statistica 8.0. Две независимые группы по количественному признаку сравнивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Применены методы непараметрической статистики. Качественные значения представляли в абсолютных числах (n) и процентах (%); при оценке статистической значимости различий качественных показателей строили таблицы сопряженности с последующим расчетом критерия χ^2 Пирсона. Нормальность распределения проверялась с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Уровень критической значимости (p) принят равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ распределения частот аллелей и генотипов гена *CYP2C19* (*c.681G>A*, *CYP2C19*2*, rs4244285; *c.636 G>A*, *CYP2C19*3*, rs4986893) в изучаемой группе показал отсутствие отличий между наблюдаемыми и ожидаемыми частотами при равновесии Харди–Вайнберга ($p>0,05$).

Носительство медленных аллелей гена *CYP2C19* обнаружено у 20 обследованных с ОКС с подъемом сегмента ST (12,57%): *CYP2C19*2* (rs4244285) – у 18, *CYP2C19*3* (rs4986893) – у 2 пациентов. Для последующего анализа пациенты были разделены на 2 группы: 1) медленные и промежуточные метаболизаторы – носители генотипов *CYP2C19*2/*2*, *CYP2C19*1/*2* и *CYP2C19*1/*3*; 2) экстенсивные метаболизаторы – носители генотипа *CYP2C19*1/*1*.

Клинико-anamnestическая характеристика групп представлена в табл. 2.

Сравниваемые группы были сопоставимы по возрасту, полу, наличию АГ, СД, постинфарктного кардиосклероза, распространенности курения. Пациенты, включенные в настоящее исследование, в рамках оказания помощи получили ЧКВ со стентированием коронарной артерии. Тромбоз стента, повлекший летальный исход, обнаружен у пациента с нормальным генотипом. По-

казатели госпитальной летальности в сравниваемых группах были одинаковыми.

Изоферменты *CYP2C19* (S-мефенитонин гидроксилаза) являются представителями группы ферментов семейства цитохрома P450. Ген *CYP2C19*, кодирующий изоферменты *CYP2C19*, локализован в 10-й хромосоме, локус 10q24. Данный локус входит в состав большого генного кластера *CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8*, ответственного за метаболизм клопидогрела. В настоящее время выявлено 25 полиморфных вариантов гена *CYP2C19*. Наибольшее влияние на метаболическую активность оказывают аллели *CYP2C19*2* и *CYP2C19*3* (замены соответственно *c.681G>A*, rs4244285; *c.636 G>A*, rs4986893), более чем в 90% случаев связанные с пониженной активностью фермента [2]. Одно из первых крупных исследований по фармакогенетике клопидогрела – PLATO, результатом которого явилась рекомендация о замене клопидогрела на тикагрелор у носителей медленных аллелей (последний является активным метаболитом и не зависит от ферментной системы биотрансформации лекарственных средств). Появившиеся данные о клинико-прогностической значимости полиморфных вариантов гена *CYP2C19* вызвали интерес у некоторых исследователей в России. Так, рядом авторов под руководством Д.А. Сычева [3] получены данные о распространенности полиморфных маркеров гена *CYP2C19* среди 11 этнических групп

Таблица 1

ПРАЙМЕРЫ И ЗОНДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *CYP2C19*

Аллель	Праймеры	Последовательность праймеров	Последовательность зондов
<i>CYP2C19*2</i> (rs4244285)	Прямой	5'- ACCAGAGCTTGGCATATTG-3'	5'-FAM-CCGGGAAATA ATCAATGA-BHQ-3
	Обратный	5'-CGAGGGTTGTTGATGTCCA-3'	
<i>CYP2C19*3</i> (rs4986893)	Прямой	5'-GTGCTCCCTGCAATGTGA-3'	5'-R6G-TAAGCACCC CCTGGATC-BHQ-3'

Таблица 2

КЛИНИКО-АНАМНЕСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНДИВИДУАЛЬНОСТИ; n (%)

Показатель	Медленные и промежуточные метаболизаторы (n=20)	Экстенсивные метаболизаторы (n=139)	Уровень значимости
Средний возраст, годы	61,26±11,77	58,66±10,84	0,3226
Мужской пол	14 (70)	97 (69,78)	0,9840
СД2	2 (10)	20 (14,38)	0,5965
Активное курение	10 (50)	55 (41,35)	0,4654
АГ	15 (75)	105 (75,53)	0,9590
ИМ в анамнезе	5 (25)	17 (12,78)	0,1466
Стенокардия в анамнезе	8 (40)	20 (14,38)	0,5965
Тромбоз стента	0	1 (0,71)	0,7059
Госпитальная летальность	1 (5)	5 (3,59)	0,9235

в РФ, проанализировано также влияние на эффективность и безопасность антиагрегантной терапии клопидогрелом. Распространенность аллеля CYP2C19*2, по данным указанных исследований, была выше среди представителей монголоидной расы. Наибольшая частота генотипа CYP2C19*2/*2 наблюдалась среди калмыков, наименьшая — среди ингушей (соответственно 25,0 и 8,0%). Носительство аллеля CYP2C19*3 изучалось не во всех исследованиях; наибольшая его частота составила 21,2% среди татар.

Этими же авторами опубликованы данные о частоте встречаемости полиморфных маркеров гена CYP2C19 при острых формах ИБС по сравнению с показателем у здоровых добровольцев (контроль). Согласно полученным результатам, достоверных различий между пациентами с ОКС и контрольной группой не обнаружено [4].

В настоящее время имеются данные о встречаемости и клинико-прогностической значимости указанных аллелей, полученные в одноцентровых исследованиях на малой выборке больных. Так, в одной из работ показано [5], что у 21,4% больных ОКС встречаются измененные генотипы CYP2C19, причем достоверно чаще медленные аллели обнаружены у мужчин-курильщиков [5].

В то же время предварительные результаты исследования ПРОТОКОЛ показывают отсутствие влияния полиморфных маркеров гена CYP2C19 на антиагрегантное (тест Verify Now) действие клопидогрела, что позволило сделать вывод [6] о сомнительном влиянии этих генов в патогенезе тромбозов стентов при ОКС.

Резистентность к антитромбоцитарным препаратам, связанная с носительством медленных аллелей гена CYP2C19, является дополнительным неблагоприятным фактором, устранение которого способно улучшить показатели летальности, ассоциированные с фатальным тромбозом стентов [7].

В настоящем исследовании получены данные о частоте встречаемости медленных аллелей гена CYP2C19, ответственных за метаболизм клопидогрела у больных с ОКС с подъемом сегмента ST в Кемерово. Однако результатов, подтверждающих клиническую значимость носительства аллелей CYP2C19*2 и CYP2C19*3 у обследованных в отношении ранних тромбозов стентов и любых кровотечений, не получено. Лишь у 1 пациента с генотипом CYP2C19*2/*2 развился тромбоз стента, повлекший летальный исход.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты не позволяют утверждать, что генетически детерминированная устойчивость к клопидогрелу широко распространена среди пациентов с ОКС в г. Кемерово и оказывает влияние на исходы и осложнения ОКС.

Аллель CYP2C19*3 наиболее распространен среди лиц азиатского происхождения, поэтому в исследуемой выборке, представленной европеоидами, указанная аллель ожидаемо встречалась редко.

Носительство полиморфных маркеров CYP2C19*2 и CYP2C19*3 обнаружено у 20 (12,57%) обследованных. При сравнении пациентов, относящихся к медленным и промежуточным метаболитаторам (генотипы CYP2C19*2/*2, CYP2C19*1/*2 и CYP2C19*1/*3), а также пациентов из подгруппы экстенсивных метаболитаторов (генотип CYP2C19*1/*1) не обнаружено различий по клинико-анамнестическим показателям, исходам госпитализации и частоте тромбоза стентов. Выводы о клинической значимости носительства указанных полиморфных маркеров не могут быть сделаны в связи с малым количеством наблюдений.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям. Договор №8461ГУ2/2015 от 16.12.2015 (код 0016614), конкурс УМНИК 2-15-5.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Antman E.M., Anbe D.T., Armstrong P.W. ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of patients with acute myocardial infarction). J. Am. Coll. Cardiol. 2004; 44: 1–211.
2. Кнауэр Н.Ю., Лифшиц Г.И., Воронина Е.Н., Коледа Н.В., Гуськова Е.В. Информативность генетических маркеров для оптимизации персонализированной терапии клопидогрелом. Кардиология. 2013; 8: 72–5. (Knauder N.Ju., Lifshits G.I., Voronina E.N., Koleda Informative of Genetic Factors for Optimization of Personalized Therapy With Clopidogrel. Kardiologiya. 2013; 8: 72–5 (in Russian))
3. Мирзаев К.Б., Сычев Д.А., Андреев Д.А. Этнические особенности в Российской Федерации полиморфизма гена CYP2C19, ассоциированного с нарушением ответа на клопидогрел. Молекулярная медицина. 2014; 1: 13–21.
4. Мирзаев К.Б., Сычев Д.А., Каркищенко В.Н., Грачев А.В., Князева Г.П., Казаков Р.Е., Карасев А.В. Частота полиморфных маркеров CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 среди русской популяции и сравнение распространенности CYP2C19*2 у пациентов с ишемической болезнью сердца, получающих терапию клопидогрелом, и здоровых добровольцев. Биомедицина. 2013; 1 (1): 117–22. (Mirzaev K.B., Sychev D.A., Karkishhenko V.N., Grachev A.V., Knjazeva G.P., Kazakov R.E., Karasov A.V. CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17 allele and genotype frequencies in clopidogrel-treated patients with coronary heart disease from the Russian population. Biomedicina. 2013; 1 (1): 117–22 (in Russian))
5. Галаявич А.С., Валеева Д.Д., Миннетдинов Р.Ш., Архипова А.А., Ахметов И.И., Галаяч Р.А. Полиморфизм гена CYP2C19 у больных инфарктом миокарда, применяющих клопидогрел. Кардиология. 2012; 4: 20–5. (Galjavič A.S., Valeeva D.D., Minnetdinov R.Sh., Arhipova A.A., Ahmetov I.I., Galjavi R.A. CYP2C19 Gene Polymorphism in Patients With Myocardial Infarction Who Use Clopidogrel. Kardiologiya. 2012; 4: 20–5 (in Russian))
6. Лифшиц Г.И., Апарцин К.А. Проспективное многоцентровое наблюдательное исследование ПРОТОКОЛ: Персонализированная терапия клопидогрелом при стентировании по поводу Острого Коронарного синдрома с учетом генетических полиморфизмов. Качественная клиническая практика. 2015; 1: 78–86. (Lifshits G.I., Apartsin K.A. Prospective multicenter observational the personalized therapy with clopidogrel for stenting in acute coronary syndrome regarding the genetic polymorphisms (PROTOCOL) study. Kachestvennaja klinicheskaja praktika. 2015; 1: 78–86 (in Russian))
7. Giusti B., Gori A.M., Marcucci R., Saracini C., Sestini L., Paniccia R. Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis. Am. J. Cardiol. 2009; 103 (6): 806–11. Epub 2009. Jan 24.

Поступила 22 июня 2015 г.