

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой

подпись инициалы, фамилия
« ____ » _____ 20__ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология
код – наименование направления

Поиск генетических предикторов резистентности к антитромбоцитарным
препаратам у пациентов с ИБС

тема

Руководитель _____ доцент, канд. биол. наук Т.Н. Субботина
подпись, дата должность, ученая степень

Выпускник _____ К.С. Семащенко
подпись, дата

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Поиск генетических предикторов резистентности к антитромбоцитарным препаратам у пациентов с ИБС» содержит 71 страницу текстового документа, 10 иллюстраций, 10 таблиц и 84 использованных источников.

АСПИРИНРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, ИШЕМИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ СЕРДЦА, НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *SELP*, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.

Цель исследования – поиск генетических предикторов резистентности к антитромбоцитарным препаратам у пациентов с ИБС.

Исходя из поставленной цели, были выделены следующие задачи:

1. Провести анализ на наличие полиморфизмов в генах *SELP* и его лиганда *SELPLG*, в генах тромбоцитарных рецепторов и цитохрома P450 у пациентов с ИБС.

2. Изучить ассоциацию генетических полиморфизмов с развитием ИБС и с резистентностью к АСК и клопидогрелу у пациентов с ИБС.

3. Провести анализ экспрессии мРНК гена Р-селектина у пациентов с ИБС и контрольной группы, а также у пациентов с ИБС до АКШ и через 7 дней после операции.

4. Оценить уровень экспрессии мРНК гена Р-селектина в зависимости от наличия изучаемых полиморфизмов.

Актуальность бакалаврской работы заключается в том, что в результате исследования генетических полиморфизмов, а также оценки уровня экспрессии гена *SELP* могут быть найдены предикторы резистентности к антитромбоцитарным препаратам (АСК и клопидогрелу), которые могут определять пациентов высокого риска резистентности к антиагрегантам. На сегодняшний день нет четких ассоциаций конкретных полиморфизмов с проявлением резистентности к антитромбоцитарным препаратам. В связи с этим данная проблема остается чрезвычайно актуальной для кардиологии.

В ходе работы было проанализировано 186 человек (153 пациента и 33 здоровых доноров) на наличие полиморфизмов rs6131, rs6133, rs6136 гена *SELP*, rs2228315 гена *SELPLG*, rs2046934, rs1126643, rs5918, rs6065, rs4244285 в генах *P2RY12*, *ITGA2*, *ITGB3*, *GP1BA*, *CYP2C19*, соответственно. Носительство минорных аллелей полиморфизмов в изучаемых генах не ассоциировано с проявлением резистентности к антитромбоцитарным препаратам. Кроме того, у 28 человек (19 пациентов и 9 здоровых доноров) был оценен относительный уровень экспрессии гена *SELP*. При сравнении относительного уровня экспрессии мРНК *SELP* между группой пациентов с ИБС и группой доноров были выявлены статистически значимые отличия ($p=0,048$). Прием антиагрегантных средств подавляет экспрессию Р-селектина.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	8
1.1 Ишемическая болезнь сердца	8
1.1.1 Антитромбоцитарная терапия при ИБС	9
1.1.1.1 Ацетилсалициловая кислота.....	9
1.1.1.2 Клопидогрел	10
1.1.1.3 Резистентность к антитромбоцитарным препаратам	12
1.2 Возможные генетические предикторы сердечно-сосудистых осложнений	14
1.2.1 Р-селектин.....	14
1.2.1.1 Полиморфизмы в генах Р-селектина и его лиганда	17
1.1.2 Рецептор фибриногена GPIIb-IIIa	20
1.2.3 Рецептор коллагена GPIa-IIa.....	22
1.2.4 Рецептор фактора Виллебранда GPIb-V-IX	23
1.2.5 Тромбоцитарный АДФ-рецептор P2Y12.....	24
1.2.6 Цитохром P450, изофермент CYP2C19*2	25
1.2.7 Экспрессия Р-селектина	27
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	31
2.1 Объект исследования	31
2.2 Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ Литех)	33
2.3 Выделение ДНК из клинического материала набором «ДНК-сорб-В» (ООО ИнтерЛабСервис)	34
2.4 Выделение тромбоцитов из цельной крови	36
2.5 Выделение РНК из тромбоцитов с использованием реагента «Рибо-преп» (ООО ИнтерЛабСервис)	37
2.6 Измерение концентрации РНК с использованием набора реагентов QuantiT TM ssRNA AssayKit (Invitrogen)	38
2.7 Оценка качества выделенной РНК.....	39
2.8 Проведение ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени ...	41
2.8.1 Проведение аллель-специфичной ПЦР с использованием комплекта реагентов для амплификации «ПЦР-Комплект» (Синтол) с детекцией результатов в режиме реального времени.....	41

2.8.2 Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов «SNP-ЭКСПРЕСС-РВ» (НПФ Литех) с детекцией результата в режиме реального времени на приборе CFX96 (Bio-Rad)	43
2.8.3 Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов для амплификации «SNP-ЭКСПРЕСС» с электрофоретической детекцией продуктов амплификации (НПФ Литех)	45
2.8.4 Проведение ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ООО БИОЛАБМИКС)	46
2.9 Расчет относительного уровня экспрессии мРНК <i>SELP</i>	48
2.10 Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза	49
2.11 Статистическая обработка данных.....	50
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	55

ВВЕДЕНИЕ

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является главной причиной инвалидизации и смертности населения всех развитых стран. Согласно статистическим данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в Российской Федерации (РФ) имеет место значительное превышение показателей смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе ИБС.

Основными причинами развития ИБС являются атеросклероз, спазм коронарных артерий, которые вызывают сужение просвета коронарных сосудов, приводя к недостаточному питанию кислородом кардиомиоцитов. Кроме того, среди причин возникновения заболевания могут быть нарушения обмена липопротеидов, изменения агрегационных свойств крови, генетические нарушения. В настоящее время все чаще обсуждают роль тромбоцитов как иницирующих агентов в развитии ИБС. Активация тромбоцитов – ключевой момент, определяющий выраженность нарушений кровоснабжения органов и тканей.

Важную роль в лечении ИБС играет приём антитромботических средств. Наиболее часто применяемый препарат – ацетилсалициловая кислота (АСК). Сообщается, что АСК недостаточно подавляет агрегацию тромбоцитов в каждом четвертом случае, то есть имеется высокая распространённость «аспиринорезистентности». На резистентность к АСК могут влиять клинические, клеточные и генетические факторы.

Развивающийся на фоне атеросклероза повышенный уровень воспаления может способствовать неполноценному ответу кровяных пластинок на действие АСК у пациентов с ИБС, что уменьшает эффективность лечения и повышает риск развития неблагоприятных событий. В связи с этим все чаще обсуждаются полиморфизмы в гене Р-селектина, потому как Р-селектин может способствовать развитию ИБС, повышенного воспалительного ответа, что в конечном итоге может привести к развитию резистентности к АСК. Молекула Р-селектина относится к группе молекул межклеточной адгезии. Он хранится в

α -гранулах тромбоцитов и экспрессируется на их поверхности после стимуляции соответствующими агонистами. Его роль заключается в поддержании начального роллинга лейкоцитов и тромбоцитов на эндотелии. Помимо этого, он опосредует адгезию лейкоцитов к активированному эндотелию в процессе острого воспаления. Считается, что полиморфизмы в гене Р-селектина могут приводить к развитию ИБС, инсультов и ранних инфарктов миокарда. А повышенную экспрессию мРНК Р-селектина связывают с высоким риском развития тромбоза и атеросклероза.

На развитие резистентности к антитромбоцитарным препаратам могут влиять и полиморфизмы в генах тромбоцитарных рецепторов, которые играют роль в процессах адгезии, активации и агрегации тромбоцитов. К таковым генам относят: ген АДФ-рецептора тромбоцитов *P2RY12*, ген рецептора к коллагену *ITGA2*, ген рецептора к фибриногену *ITGB3*, ген тромбоцитарного рецептора фактора Виллебранда *GP1BA* и ген цитохрома *P450 CYP2C19*2*. Однако однозначного мнения о четкой ассоциации генетических полиморфизмов и резистентности к антиагрегантам в настоящий момент нет.

Таким образом, цель работы – поиск генетических предикторов резистентности к антитромбоцитарным препаратам у пациентов с ИБС.

Исходя из поставленной цели, были выделены следующие задачи:

1. Провести анализ на наличие полиморфизмов в генах *SELP* и его лиганда *SELPLG*, в генах тромбоцитарных рецепторов и цитохрома P450 у пациентов с ИБС.

2. Изучить ассоциацию генетических полиморфизмов с развитием ИБС и с резистентностью к АСК и клопидогрелу у пациентов с ИБС.

3. Провести анализ экспрессии мРНК гена Р-селектина у пациентов с ИБС и контрольной группы, а также у пациентов с ИБС до АКШ и через 7 дней после операции.

4. Оценить уровень экспрессии мРНК гена Р-селектина в зависимости от наличия изучаемых полиморфизмов.

Работа проведена на базе Научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований СФУ.

Исследование выполняется при финансовой поддержке Сибирского федерального университета, Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта: № 18-415243003 «Персонализация антитромбоцитарной терапии пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) в зависимости от уровня экспрессии гена Р-селектина, выраженности межклеточного взаимодействия и воспаления».

1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1.1 Ишемическая болезнь сердца

Согласно статистическим данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в Российской Федерации (РФ) имеет место значительное превышение показателей смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе ишемических болезней сердца (ИБС) [1].

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) — заболевание, характеризующееся полным или частичным нарушением кровоснабжения миокарда вследствие поражения коронарных артерий.

Основными этиологическими причинами развития ИБС являются:

1. Спазм коронарных артерий. Он обусловлен локальным повышением тонуса сосудистой стенки. Наиболее частой причиной спазма является тромбоксан А₂ (ТХА₂), выделяемый тромбоцитами, количество которого при атеросклерозе в области бляшки повышено [2].

2. Атеросклероз коронарных артерий. Накопление холестерина в стенке артерии приводит к формированию и увеличению размеров атеросклеротической бляшки. В дальнейшем, под воздействием системных неблагоприятных факторов (повышение артериального давления, значительная физическая нагрузка) происходит трансформация бляшки от стабильной до нестабильной. Впоследствии нарушается целостность фиброзной покрышки бляшки и активируется каскад коагуляции крови, запускается механизм активации и агрегации тромбоцитов [3]. Активация тромбоцитов осуществляется тромбином, АДФ, коллагеном, ТХА₂. В результате чего на мембрану тромбоцита перемещается рецептор GPIIb/IIIa, который связывает между собой активированные тромбоциты через фибриновые мостики [4]. В итоге на поверхности нестабильной атеросклеротической бляшки формируется тромб.

Таким образом, активация тромбоцитов – ключевой момент, определяющий выраженность нарушений кровоснабжения органов и тканей. Поэтому антитромбоцитарная терапия является одним из главных компонентов медикаментозной терапии.

1.1.1 Антитромбоцитарная терапия при ИБС

При лечении сердечно-сосудистых заболеваний, кроме ведения здорового образа жизни, огромное значение имеет медикаментозная терапия. В этот перечень входят гипотензивные, липидснижающие (в основном статины) и антитромботические средства. Назначение антитромбоцитарных препаратов является обязательным элементом лечения множества сердечно-сосудистых заболеваний [5].

1.1.1.1 Ацетилсалициловая кислота

Наиболее часто применяемый препарат – ацетилсалициловая кислота (АСК). Салициловая кислота была известна еще со времен Гиппократа. Ее использовали для «облегчения лихорадки». В 1897г. немецкий химик синтезировал более безопасное вещество – ацетилсалициловую кислоту, которую впоследствии назвали аспирином. В 70-х годах изучение аспирина вновь стало обширным, так как было выяснено, что аспирин блокирует синтез простагландинов.

В гемостазе в период агрегации тромбоцитов происходит выброс индукторов агрегации с последующей активацией мембранных фосфолипаз. Активированные фосфолипазы разрушают клеточные мембраны с высвобождением арахидоновой кислоты, что приводит к запуску арахидонового каскада активации тромбоцитов с образованием ТХА₂ [6].

Отделенная от фосфолипида арахидоновая кислота выходит в цитоплазму клетки. Там она может превращаться двумя путями: **циклооксигеназный путь** подразумевает под собой превращение арахидоновой кислоты в простагландины H₂ и G₂ под действием тромбоцитарной циклооксигеназы

(ЦОГ-1). Далее из простагландинов H₂ и G₂ образуются тромбоксаны A₂ и B₂. Образовавшиеся простагландины, TXA₂ совместно с аденозиндифосфатом (АДФ) и фактором активации тромбоцитов (ФАТ), которые выделяются из гранул тромбоцитов, запускают необратимую агрегацию циркулирующих тромбоцитов и закрытие участка повреждения тромбоцитарной «пробкой». **Липоксигеназный путь** заканчивается образованием лейкотриенов или других эйкозаноидов.

Аспирин, связываясь с активным центром циклооксигеназы, ацетилирует остаток серина в 529 положении, что приводит к необратимому ингибированию молекулы фермента, прекращая синтез TXA₂ – молекулы, участвующей в активации и агрегации тромбоцитов. В результате наблюдается уменьшение воспаления, а также подавление агрегации кровяных пластинок.

По данным мета-анализа, исследовавшего около 200 тысяч пациентов с предрасположенностью к сердечно-сосудистым осложнениям, ученые Antithrombotic Trialists Collaboration [7] сделали вывод, что продолжительный прием аспирина (75-325 мг/сут) снижает частоту развития таких заболеваний как инсульт, инфаркт миокарда, а также сокращает риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, только аспирин рекомендован для первичной профилактики сердечно-сосудистых осложнений.

1.1.1.2 Клопидогрел

Клопидогрел, производное тиенопиридина, является пролекарством, которое всасывается в кишечнике и активируется в печени. Превращение клопидогрела в его активный метаболит требует двух последовательных окислительных стадий. Первая стадия приводит к образованию 2-оксоклопидогрела с последующим превращением в активный метаболит (рис.1). Биотрансформация в печени происходит под действием системы микросомальных ферментов цитохрома P450 с участием ее 5 изоформ: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4/5 [8]. В исследовании Kazui et

al. [9] пришли к выводу, что CYP2C19 вносит значительный вклад в обе окислительные стадии.

Активный метаболит клопидогрела содержит тиоловую группу, которая связывается со свободным цистеином на рецепторе P2RY12 и необратимо блокирует связывание ADP и активацию рецептора. Как только эта блокировка произошла, тромбоциты остаются нефункциональными в течение всей их жизни, составляющей приблизительно 7–10 дней. [8].

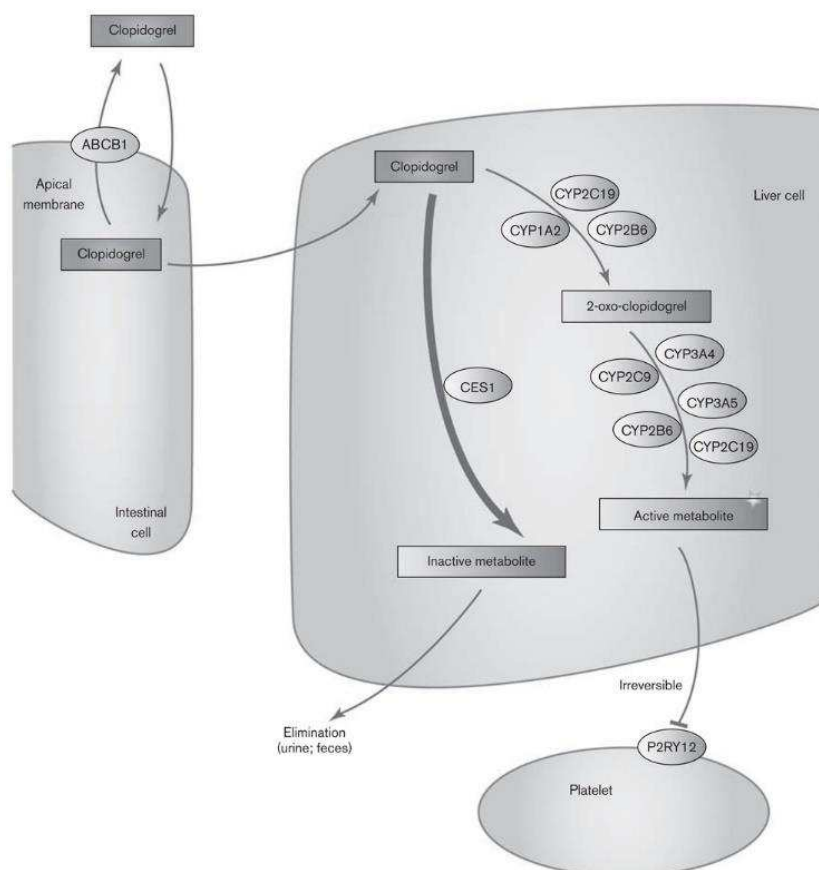


Рисунок 1 – Метаболизм и механизм действия клопидогрела [8].

Нынешняя стандартная пероральная антиагрегантная терапия для пациентов с ИБС представляет собой комбинацию аспирина и ингибитора тиенопиридина P2Y12 - клопидогрела. Одновременный прием данных препаратов гарантирует взаимное усиление их действия за счет ингибирования разных путей индукции агрегации тромбоцитов: тромбоксан A₂-зависимого и АДФ-зависимого [10]. Однако некоторые люди оказываются не чувствительны к действию антитромбоцитарных препаратов. Даже на фоне двойной антиагрегантной терапии (ДАТ) у некоторых пациентов сохраняется высокая

агрегация тромбоцитов, что может повышать риск развития тромботических осложнений после хирургического вмешательства.

1.1.1.3 Резистентность к антитромбоцитарным препаратам

К основным причинам резистентности к антитромбоцитарным препаратам относят клинические и биохимические факторы [11]. Клиническая резистентность объясняется как неспособность препарата предотвратить тромботические события у определенного пациента. Под биохимической резистентностью понимают неполное подавление агрегации тромбоцитов на фоне приема антиагрегантов, которое было зафиксировано по результатам лабораторных тестов.

На сегодняшний день выделяют следующие причины резистентности к аспирину [12]:

1. Увеличение количества лейкотриенов и эйкозаноидов, которые приводят к подавлению синтеза простаглицлина в эндотелиоцитах.
2. Полиморфизмы гена COX.
3. Полиморфизм гена гликопротеина GP IIb/IIIa, которые могут приводить к гиперагрегации тромбоцитов.
4. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) и АСК одновременно, потому как оба лекарства конкурируют за активный центр фермента.

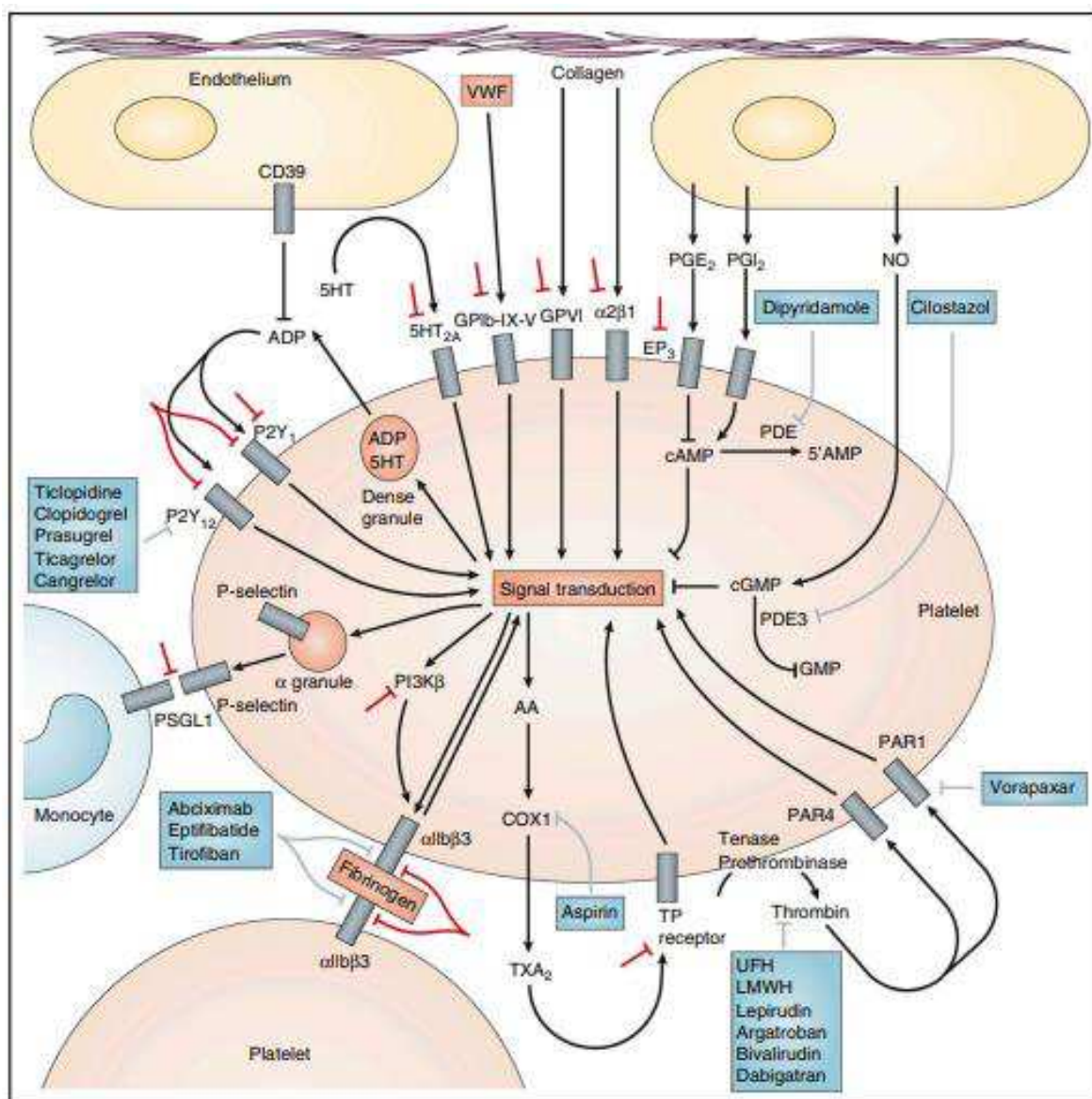
Основные механизмы устойчивости к клопидогрелу остаются неизвестными. Предыдущие исследования показывают, что генетические факторы могут в значительной степени способствовать изменчивости активности тромбоцитов.

Поскольку клопидогрел является пролекарством, для активации которого требуется двухэтапный процесс окисления в печени, полиморфизмы генов, кодирующих метаболические ферменты, участвующие в биотрансформации клопидогрела, могут быть основными факторами, влияющими на чувствительность к данному препарату [13]. Считается, что полиморфизм

CYP2C19 является одним из наиболее важных и изученных механизмов резистентности к клопидогрелу. Известно, как минимум 25 аллелей данного гена, при этом CYP2C19*1 является нормальной аллелью дикого типа. Аллели CYP2C19*2, *3, *4, *5, *6, *7 и *8 приводят к потере ферментативной активности CYP2C19. В систематическом мета-анализе 11 959 пациентов носители аллеля потери функции CYP2C19*2 имели на 30% повышенный риск тромбоза стента и смертности по сравнению с не носителями [14].

Полиморфизмы рецепторов тромбоцитов, отвечающих за связывание с метаболитом клопидогрела, также могут вносить вклад в развитие резистентности. Определенное значение в повышении тромботической активности и, возможно, резистентности к АСК могут иметь нуклеотидные полиморфизмы гена *P2RY12*. Так, H2 гаплотип рецепторов *P2RY12* ассоциируется с более выраженным ингибированием цАМФ под действием АДФ, что ведет к повышению риска тромботических осложнений.

Все эти факторы в конечном итоге приводят к недостаточному подавлению агрегации тромбоцитов, что может повышать риск тромботических осложнений (рис. 2).



Антиагреганты, одобренные FDA, показаны в синих прямоугольниках; новые антиагреганты показаны красными полосами.

Рисунок 2 – Молекулярные мишени антиагрегантов [15]

1.2 Возможные генетические предикторы сердечно-сосудистых осложнений

1.2.1 P-селектин

В кровяном русле активированные тромбоциты способны формировать с лейкоцитами лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты, которые способствуют перемещению последних в зону повреждения и обеспечению там иммунных реакций. Активированные тромбоциты прикрепляются к лейкоцитам

посредством экспрессии Р-селектина и других рецепторов на поверхности кровяных пластинок.

Р-селектин относится к группе молекул межклеточной адгезии – селектинам. Они являются гликопротеинами и экспрессируются на тромбоцитах, некоторых типах лейкоцитов и эндотелии. Молекулы селектинов пронизывают клеточную мембрану и имеют N-концевой домен, который обладает лектиноподобными свойствами, то есть способностью связываться с углеводными конечными группами лигандов. После N-концевого домена располагается последовательность, гомологичная эпидермальному фактору роста, а также короткие консенсусные повторы, сходные с таковыми в комплементсвязывающих белках (рис. 3) [16].

Селектины представляют собой трансмембранные, Ca^{2+} -зависимые лектины, которые обеспечивают роллинг лейкоцитов по поверхности сосудов, первый этап адгезии при воспалении и иммунном ответе.

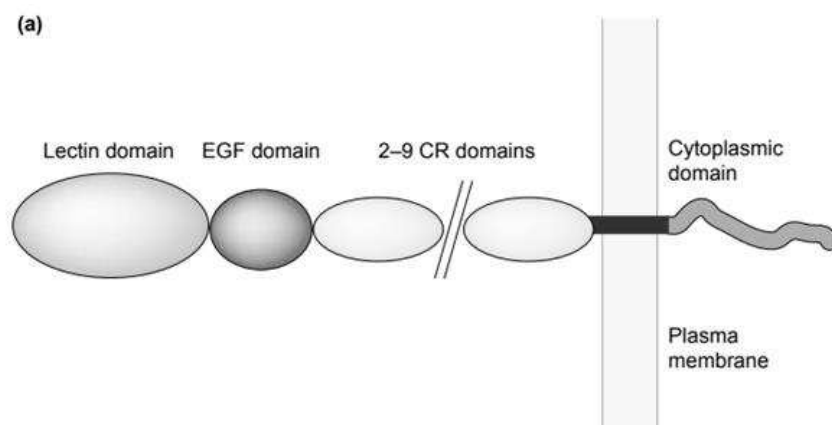


Рисунок 3 – Структура селектинов [17]

Различают три подгруппы селектинов: L-, E-, Р-селектины. На поверхности эндотелия могут находиться Р- и E-селектины, а L-селектин экспрессируется на мембране лейкоцитов.

Р-селектин экспрессируется мегакариоцитами и эндотелиальными клетками. Он хранится в α -гранулах тромбоцитов и телах Вейбеля – Палада эндотелиальных клеток. Молекула мобилизуется на поверхность тромбоцита в течение нескольких минут после стимуляции агонистами, такими как тромбин, АДФ, гистамин и адреналин, где и опосредует свои функции. Р-селектин

связывает лейкоциты, в частности, нейтрофилы с эндотелием, регулирует экспрессию тромбоцитарных интегринов, принимает участие в начальных этапах адгезивных взаимодействий в очагах воспаления [16]. Помимо этого, его роль заключается в поддержании начального роллинга лейкоцитов и тромбоцитов на эндотелии [18].

Авторами статьи [19] было показано, что Р-селектин-углеводные связи обладают высокой прочностью на растяжение и могут быть основным механизмом стабилизации агрегатов тромбоцитов. Р-селектин может иметь важное значение при тромбозе артерий, где агрегация тромбоцитов играет важную роль.

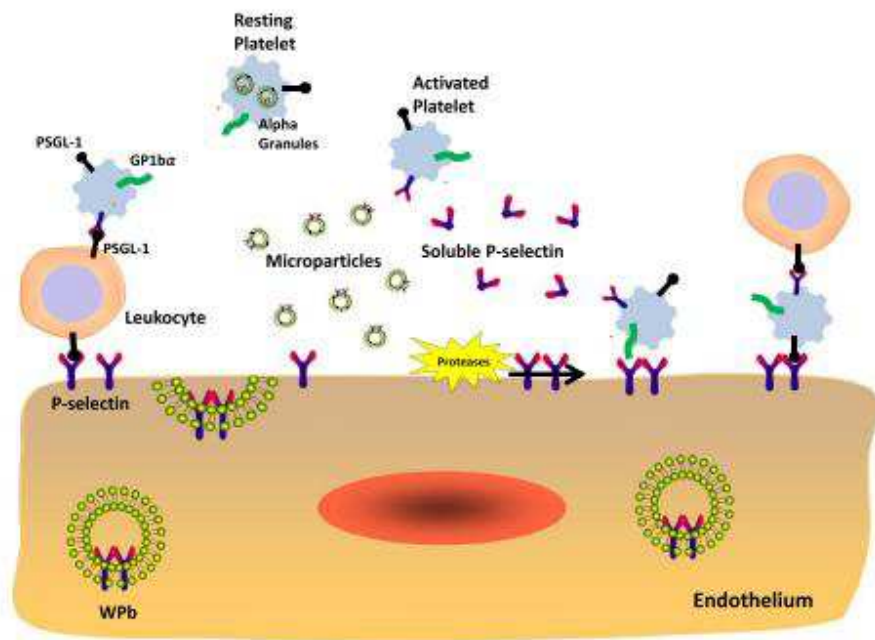
Р-селектин существует в двух формах: мембранно-связанной и растворимой. Растворимые формы селектинов были обнаружены в плазме. Некоторыми авторами была идентифицирована альтернативно сплайсированная форма Р-селектина, в которой отсутствует трансмембранный домен. Кроме того, сообщалось, что у мышей растворимый Р-селектин может возникать при отщеплении мембранно-связанной формы от поверхности клетки [20].

Также отмечалось, что у пациентов с воспалительными и тромботическими расстройствами обычно регистрируется 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 [21].

Р-селектин осуществляет свои функции посредством взаимодействия со своим гликопротеиновым лигандом-1 (PSLG-1), расположенным почти на всех лейкоцитах. PSLG-1 является димерной молекулой, богатой N- и O-гликанами. Это взаимодействие участвует в начальных этапах связывания лейкоцитов во время воспаления, а также в образовании и стабилизации тромба. PSGL-1 может связываться со всеми тремя членами семейства, но лучше всего связывает с Р-селектином [22].

Роль Р-селектина в клетке представлена на рис. 4.

P-selectin



Thrombosis

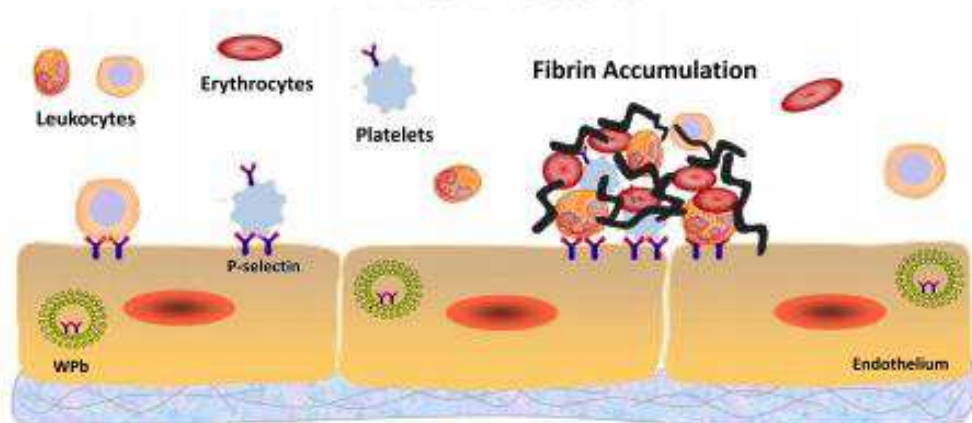


Рисунок 4 – Роль Р-селектина в тромбозе [23].

1.2.1.1 Полиморфизмы в генах Р-селектина и его лиганда

Ген *SELP*, кодирующий молекулу Р-селектина, локализован на хромосоме 1q21-q24 и содержит 17 экзонов [22]. Ген является высокополиморфным.

В одном из исследований был проведен скрининг гена *SELP*, где было обнаружено 13 полиморфизмов, ассоциированных с развитием ИБС [24]. В нашем исследовании было рассмотрено 3 наиболее значимых полиморфизма, приводящих к аминокислотным заменам: *Thr715Pro*, *Val640Leu*, *Ser290Asn*. 3 миссенс-мутации расположены в tandemных доменах. Предполагается, что

тандемный повторный домен может играть функциональную роль во взаимодействиях Р-селектина и лейкоцитов.

Полиморфизм A2266C (Thr715Pro; rs6136) в гене *SELP*

Авторы статей [25, 26, 27] считают, что полиморфизм rs6136, приводящий к замене аминокислоты треонина на пролин, вызывает конформационную перестройку белка Р-селектина, которая может оказывать влияние на его секрецию. Структурное изменение белка может привести к уменьшению экспрессии и/или пролиферации Р-селектина, тем самым развивая меньшее количество клеточных взаимодействий.

Однако авторами статьи [24] было высказано предположение, что замена Pro715 может обладать защитными свойствами, снижая риск развития ССЗ. Это подтвердилось в исследованиях других авторов [20, 28], которые предсказали благотворное влияние данного полиморфизма на выживаемость после острых тромботических событий, а также показали низкий уровень растворимого sP-селектина у лиц с аллелем Pro715. Также и у Herrera-Maya с соавт. [29] было отмечено, что полиморфизмы S290N и T715P связаны с более низким риском развития острого коронарного синдрома в мексиканской популяции. Кроме того, оба полиморфизма были связаны с более низкими уровнями Р-селектина в плазме. А в исследовании Burkhardt с соавт. [30] показали, что основной аллель А связан с ревматоидным артритом, а также с повышенным уровнем экспрессии мРНК *SELP*.

Результаты исследований [38, 40, 31] показывают, что данный полиморфизм, а также SNP S290N, V640L должны быть генотипированы в любом исследовании, исследующем роль гена *SELP* в этиологии болезни сердца.

Частота встречаемости генотипов А/А, А/С, С/С в общей европейской популяции составляет 82%, 17%, 0,6%, соответственно [32].

Полиморфизм G1918T (Val640Leu; rs6133) в гене *SELP*

Аминокислотная замена расположена в области консенсусных повторов Р-селектина, которая играет функциональную роль во взаимодействии Р-селектина со своим лигандом [22].

Предполагается, что полиморфизм может являться предиктором возникновения ИБС у белых людей, изменяя аффинность связывания Р-селектина с лигандом [33]. В исследованиях J. В. Marteau с соавт. [40] и А. Р. Reiner с соавт. [34] было показано, что полиморфизм V640L (rs6133) снижает уровень sP-селектина в плазме и является функционально вредным в развитии атеросклероза, однако функциональная значимость полиморфизма не ясна.

Авторы других исследований говорят, что V640L связан с развитием таких заболеваний, как тромбоэмболический инсульт совместно с полиморфизмами в гене интерлейкина-4, системная красная волчанка, ИБС, но в совокупности с другими полиморфизмами – S290N, T715P [22, 45, 35, 36].

Частота встречаемости разных вариантов генотипов G/G, G/T, T/T в европейской популяции составляет 78%, 20%, 2%, соответственно [32].

Полиморфизм G992A (Ser290Asn; rs6131) в гене *SELP*

Нуклеотидная замена полиморфного маркера rs6131 приводит к изменению аминокислотной последовательности белка в области, обеспечивающей взаимодействие *SELP* с лигандом. Исходя из этого, авторы статей [43], [37], предполагают, что полиморфизм rs6131 определяет более эффективное лейкоцитарно-тромбоцитарно-эндотелиальное взаимодействие, что приводит к выраженному воспалительному процессу в области атеросклеротической бляшки. Так же, как и T715P полиморфизм S290N был связан с более низким риском развития острого коронарного синдрома в мексиканской популяции, а также с более низким уровнем Р-селектина в плазме [29].

Помимо этого, группа исследователей [43] представила результаты, которые показывают согласованное взаимодействие между полиморфизмами S290N и N562D, предполагая, что одновременное присутствие аминокислот

N290 и N562 может изменять функцию белка Р-селектина и приводить к повышенному риску ИМ.

Частота встречаемости разных вариантов генотипов G/G, G/A, A/A в общей европейской популяции составляет 67%, 29%, 4%, соответственно [32].

Полиморфизм G186A (Met62Ile; rs2228315) в гене *SELPLG*

Ген человеческого PSGL-1 локализован в хромосоме 12q24, содержит два экзона, один интрон приблизительно 9 кб, расположенный на 5 п.о. выше по потоку от кодона инициации ATG, а полная кодирующая область содержится в экзоне 2. Также ген имеет промоторы, не содержащие ТАТА. Этот ген кодирует гликопротеин, который функционирует как высокоаффинный контррецептор для молекул клеточной адгезии Р-, Е- и L-селектина. Сам белок играет важную роль в переносе лейкоцитов во время воспаления путем образования агрегатов лейкоцитов с активированным тромбоцитам или эндотелий-экспрессирующим селектинам.

Предполагается, что полиморфизм Met62Ile связан с развитием ИБС.

Полиморфизм M62I гена *SELPLG* расположен рядом с SELP-связывающим доменом. Хотя функциональные механизмы полиморфизма M62I неизвестны, близость этого варианта к домену связывания предполагает, что он влияет на связывание молекулы Р-селектина [38].

В другом исследовании авторы показали половой дифференциал ассоциации M62I с развитым атеросклерозом. Женщины - носители минорной аллели - имели значительный риск развития атеросклероза сонной артерии. Еще более выражено наблюдалось у людей с редким A/A генотипом. Также авторы утверждают, что минорная аллель может способствовать повышению уровня экспрессии PSGL-1 [39].

Частота встречаемости разных вариантов генотипов G/G, G/A, A/A в общей популяции составляет 87%, 12%, 1%, соответственно [32].

1.1.2 Рецептор фибриногена GPIIb-IIIa

Комплекс GPIIb-IIIa относится к семейству интегриновых рецепторов тромбоцитов, который способен связывать молекулу фибриногена, тем самым способствуя агрегации кровяных пластинок, образуя «фибриновые мостики» между тромбоцитами. Комплекс GPIIb-IIIa может выполнять свою роль только на поверхности активированных тромбоцитов. Считается, что взаимодействие GPIIb-IIIa с фактором Виллебранда необходимо для эффективной агрегации тромбоцитов в условиях высоких скоростей кровяного тока с последующим формированием в зоне повреждения тромба [4]. GPIIb/IIIa – основной тромбоцитарный рецептор, молекулярные дефекты которого могут приводить к гиперагрегации тромбоцитов.

Комплекс состоит из двух субъединиц: α - и β - цепи, который нековалентно связаны между собой. Субъединицы кодируются разными генами, расположенными на 17-й хромосоме.

Полиморфизм T176C (Leu33Pro; rs5918) в гене *ITGB3*

Ген *ITGB3* кодирует гликопротеин IIIa (GPIIIa), бета-субъединицу комплекса рецепторов тромбоцитарной мембраны GPIIb-IIIa. Расположен на длинном плече 17-й хромосомы (17q21.32) и содержит 15 экзонов. Было показано, что экзоны и интроны всего гена *ITGB3* высокополиморфны.

Считается, что точечная мутация T176C гена *ITGB3*, вызывающая замену лейцина-33 на пролин, приводит к конформационной перестройке N-терминальной дисульфидной петли GPIIIa, которая необходима для связывания фибриногена.

Предполагается, что этот SNP является фактором риска многих типов заболеваний, таких как ИМ, ИБС, диабет 2 типа, астма и т.д. Тромбоциты, несущие субъединицу $\beta 3$ интегрина $\alpha IIb\beta 3$ с пролином в положении 33, характеризуются повышенной АДФ-индуцированной агрегацией, при этом наблюдается перестройка цитоскелета тромбоцитов, а также усиление сигнальных функций комплекса IIb-IIIa. Таким образом, тромбоциты, несущие Pro33, имеют более низкий порог активации, поэтому его носители обладают

повышенным риском тромбообразования с такими последствиями, как инсульт, ИМ [40, 41].

Распределение генотипов T/T, T/C, C/C в европейской популяции по разным источникам составляет 76%, 22%, 2%, соответственно [32].

1.2.3 Рецептор коллагена GPIa-IIa

Мембранный гликопротеин тромбоцитов Ia-IIa является первичный рецептором для коллагена типа I и IV. Комплекс состоит из двух нековалентно связанных субъединиц: $\alpha 2$ – и $\beta 1$ – цепей. $\alpha 2$ -субъединица содержит домен I, который имеет гомологию с A-доменами vWF, белками комплемента и т.д. Считается, что эти домены играют важную роль в клеточной адгезии. На поверхности тромбоцитов располагается небольшое количество этого рецептора, но его число даже в норме довольно изменчиво, что отражает восприимчивость кровяных пластинок взаимодействовать с коллагеном [42].

Полиморфизм C807T (Phe253Phe; rs1126643) в гене *ITGA2*

Ген *ITGA2* кодирует альфа-субъединицу трансмембранного рецептора коллагена GPIa-IIa. Кодированный белок образует гетеродимер с бета-субъединицей и обеспечивает адгезию тромбоцитов и других типов клеток к внеклеточному матриксу. Ген *ITGA2* расположен на 5-й хромосоме (5q11.2) и состоит из 30-ти экзонов.

Полиморфизм C807T расположен на 7 экзоне в промоторной области гена *ITGA2*. Нуклеотидная замена приводит к изменению количества рецептора на поверхности тромбоцита. В нескольких исследованиях сообщалось, что у людей с вариантом 807C наблюдается низкая плотность рецептора $\alpha_2\beta_1$ на тромбоцитах, тогда как вариант 807T ассоциирован с более высокой плотностью [43]. Предполагается, что это приводит к повышению агрегационной активности тромбоцитов, а это, в свою очередь, ведет к повышенному тромбообразованию.

Полиморфизм C807T связан с тромбозами, артериальными и атеросклеротическими заболеваниями. Кроме того, сообщалось, что он связан

ИМ, ишемическим инсультом, а также с риском развития рака молочной железы и колоректального рака [58, 44]. Также в работе [59] было отмечено, что пациенты с раком носоглотки, несущие генотип ТТ, имели более низкую выживаемость и были более подвержены метастазированию по сравнению с пациентами с генотипом СС. В исследовании [58] было показано, носительство минорной аллели Т увеличивает риск развития ССЗ, а также риск ишемического инсульта у азиатов.

Стоит отметить, что носительство Т аллели гена *ITGA2* C807T имеет важное влияние на резистентность к АСК. В своем мета-анализе Weng с соавт. сообщили, что генетический дефект в гене *ITGA2* может увеличить риск нечувствительности к аспирину, особенно в китайской популяции [45].

Частота встречаемости разных вариантов генотипов С/С, С/Т, Т/Т в общей европейской популяции составляет 33%, 54%, 13%, соответственно [45].

1.2.4 Рецептор фактора Виллебранда GPIb-V-IX

Гликопротеиновый комплекс GPIb-V-IX тромбоцитов участвует в адгезии и активации тромбоцитов за счет связывания их с эндотелием посредством фактора Виллебранда (vWF). Полный рецепторный комплекс является гептамером, который включает нековалентную ассоциацию альфа- и бета-субъединиц с GPIX и GPV тромбоцитов. В комплексе каждая субъединица содержит один или несколько tandemных богатых лейцином повторов, состоящих примерно из 24 аминокислотных остатков, окруженных консервативными дисульфидно-петлевыми структурами.

Контакт молекулы фактора Виллебранда с субэндотелиальным слоем приводит к конформационной перестройке vWF, тем самым увеличивая сродство фактора Виллебранда к своему рецептору на поверхности тромбоцитов. Связывание комплекса GP Ib-IX-V с vWF способствует начальной адгезии тромбоцитов к субэндотелию сосудов после повреждения сосудов, а также инициирует сигнальные события в тромбоцитах, которые приводят к усиленной активации тромбоцитов, тромбозу и гемостазу [4, 57].

Полиморфизм C482T (rs6065; Thr145Met) в гене *GP1BA*

Ген *GP1BA*, кодирующий α -субъединицу тромбоцитарного рецептора для фактора Виллебранда (комплекс GPIb-V-IX), локализован на 17-й хромосоме (17p13.2) и включает в себя два экзона.

Полиморфизм C482T расположен в области связывания белкового комплекса GPIb-V-IX с лигандами и может влиять на взаимодействие рецептора с фактором Виллебранда, что может привести к повышенному тромбообразованию.

Присутствие варианта Met145 связано с повышенным риском развития ИМ, ИБС [46]. В исследовании Pruissen с соавт. сообщил о связи полиморфизма с симптоматическим стенозом сонной артерии [47]. А Fujiwara с соавт. в своей работе предположили, что данный полиморфизм участвует в развитии резистентности к аспирину [48].

Распределение генотипов C/C, C/T, T/T в общей европейской популяции составляет 83%, 16%, 1%, соответственно [32].

1.2.5 Тромбоцитарный АДФ-рецептор P2Y₁₂

Аденозитдифосфат (АДФ) является одним из важнейших медиаторов гемостаза. Эта молекула, высвобождаясь из плотных гранул активированных тромбоцитов и поврежденных эритроцитов, стимулирует агрегацию тромбоцитов за счет связывания с пуринэргическими рецепторами на поверхности тромбоцитов. А это, в свою очередь, способствует активации комплекса GPIIb-IIIa с последующим связыванием фибриногена [49, 50].

Трансдукция сигнала АДФ происходит через его взаимодействие с двумя пуринэргическими рецепторами: G_q-связанный рецептор P2Y₁ и G_i-связанный рецептор P2Y₁₂. Стимуляция рецептора P2Y₁ отвечает за изменение формы тромбоцитов, повышение уровня внутриклеточного кальция и временную агрегацию тромбоцитов. А рецептор P2Y₁₂ отвечает за более устойчивую агрегацию тромбоцитов за счет ингибирования аденилатциклазы, что приводит к снижению уровней циклического АМФ [49]. Ингибирование P2Y₁₂-

рецепторов тромбоцитов приводит к подавлению агрегации, секреции и высвобождению из тромбоцитов факторов коагуляции, а также уменьшает прокоагулянтный и провоспалительный потенциал тромбоцитов.

Полиморфизм rs2046934 в гене *P2Y12*

Ген *P2Y12*, состоящий из трех экзонов, располагается на длинном плече 3-й хромосомы (3q25.1). Считается, что полиморфизмы в гене АДФ-рецептора могут быть связаны с высоким риском развития ИМ, тромбоза стента, а также нестабильной стенокардией [51]. Полиморфизм rs2046934 расположен в интронной области гена и не связан с дефектом кодирующей последовательности.

В своем исследовании Fontana с соавт. [52] с помощью секвенирования идентифицировали 4 SNP и 1 инсерцию в гене *P2Y12*. Поскольку они находились в полном неравновесном сцеплении, они определили H1 в качестве основного гаплотипа и H2 – минорного гаплотипа. Гаплотип H2 ассоциировался с повышенной максимальной агрегацией тромбоцитов в ответ на АДФ. Это было связано с различиями в механизме, регулирующем ингибирование цАМФ АДФ. Повышение агрегации тромбоцитов у пациентов с вариантом H2 приводит к повышенному риску атеротромбоза, развитию атеросклероза и сниженному ответу на действие антиагрегантов.

Staritz с соавт. было высказано предположение, что носители минорного гаплотипа чаще имели резистентность к клопидогрелу [53]. Также в работах [54, 55] отметили ассоциации полиморфизмов в гене *P2Y12* с нечувствительностью к клопидогрелу у китайских пациентов с ишемическим инсультом.

Частота встречаемости гаплотипов H1/H1, H1/H2, H2/H2 по разным источникам составляет 75,9%, 22%, 2,1%, соответственно.

1.2.6 Цитохром P450, изофермент CYP2C19*2

Цитохромы P450 являются гемопroteинами, играющими роль в метаболизме лекарств и ксенобиотиков. Данное семейство ферментов

катализируют перенос атома кислорода от молекулярного кислорода на широкий спектр биологических субстратов, причем второй атом кислорода восстанавливается двумя электронами до молекулы воды. Преимущественно ферменты располагаются на гладком ЭПР гепатоцитов и наружных мембранах митохондрий, где они и осуществляют реакции биотрансформации лекарств, стероидов и канцерогенов.

Известно около 250 различных видов цитохрома P450, из них примерно 50 локализованы в организме человека и только шесть — CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 — ответственны за метаболизм лекарственных препаратов [56].

Поскольку клопидогрел является пролекарством, для активации которого требуется двухэтапный процесс окисления в печени, полиморфизмы генов, кодирующих метаболические ферменты, участвующие в биотрансформации клопидогрела, могут быть основными факторами, влияющими на чувствительность к данному препарату [13]. Считается, что полиморфизм в гене *CYP2C19* является одним из наиболее важных и изученных механизмов резистентности к клопидогрелу, так как именно CYP2C19 играет главную роль в трансформации пролекарства.

Полиморфизм G681A (rs4244285) в гене *CYP2C19*

Ген *CYP2C19* расположен на 10-й хромосоме (10q23.33) и включает в себя 9 экзонов. Предполагается, что пациенты, несущие полиморфизм в гене *CYP2C19*, являются медленными метаболиторами клопидогрела, что может повлечь за собой повышение риска тромботических событий после острого коронарного синдрома и чрескожных коронарных вмешательств [57].

Наиболее распространенным полиморфизмом в гене *CYP2C19*, приводящим к снижению ферментативной активности, является замена гуанина в 681 положении на аденин в 5 экзоне. Считается, что такая замена приводит к созданию аберрантного сайта сплайсинга [58]. Кроме того, сообщается, что минорная аллель А в полиморфизме rs4244285 приводит к сдвигу рамки считывания мРНК, в результате чего синтезируется измененный белок с низкой

ферментативной активностью. Всё это приводит к снижению антиагрегантному эффекту клопидогрела, а значит, и к более высокому риску тромботических событий [59].

В недавнем исследовании [60] авторы пришли к выводу, что полиморфизм G681A в гене *CYP2C19* ассоциирован с повышенной АДФ-индуцируемой агрегацией тромбоцитов на фоне приема клопидогрела, что определяет риск формирования резистентности к клопидогрелу у пациентов с ИБС.

Частота встречаемости генотипов G/G, G/A, A/A в общей европейской популяции составляет 72%, 27%, 1%, соответственно [32].

В настоящее время еще не до конца изучено, в какой степени генетические полиморфизмы определяют агрегацию тромбоцитов у лиц, получающих двойную антитромбоцитарную терапию. По литературным данным связь полиморфных маркеров генов-кандидатов с эффективностью терапии зачастую противоречива. В связи с этим актуален поиск и дальнейшее исследование генетических предикторов эффективности применения антиагреганта. Проводя генетическое тестирование предрасположенности к резистентности к антитромбоцитарным препаратам у пациентов с диагнозом ИБС, можно приблизиться к формату персонализированной медицины, которая будет основана на индивидуальных генетических особенностях пациента.

1.2.7 Экспрессия Р-селектина

Анализ экспрессии генов позволяет изучать возникновение или активность образования продукта гена из его кодирующего гена. Это чувствительный индикатор биологической активности, в котором изменение паттерна экспрессии генов отражается в изменении биологического процесса.

Все системы определения экспрессии генов (выявление уровня представленности транскриптов) можно разделить на два способа:

1. Абсолютный подход количественной оценки уровня экспрессии гена заключается в том, что количество выхода гена определяется на основе

стандартной кривой. Другими словами, определяется число копий исследуемой мРНК, исходя из заданных значений числа копий контрольных образцов в биологической пробе.

2. Относительный подход измерения уровня экспрессии основан на использовании референсных транскриптов (гены домашнего хозяйства – «housekeeping gene»). Определяется отношение числа копий мРНК к числу копий референсных генов.

Для количественного анализа экспрессии генов с помощью ПЦР-РВ необходимо использовать внутренний контроль для нормализации полученных данных. Наиболее часто для этой цели используют транскрипты GAPDH, β -актина, гистона H3 и ряд других. Это так называемые гены «домашнего хозяйства», которые постоянно экспрессируются во всех клетках организма при нормальных и патофизиологических условиях, независимо от типа ткани, стадии развития, состояния клеточного цикла или внешнего сигнала. С помощью внутренних контрольных образцов решается важная задача, а именно определение ложноотрицательных результатов, возникающих вследствие ошибок экспериментатора или ингибирования амплификации [61].

В настоящее время ученых стало все больше привлекать исследование экспрессии P-селектина при различных заболеваниях. Однако чаще проводят анализ экспрессии P-селектина, расположенного на поверхности тромбоцитов, с помощью метода проточной цитометрии. Данный метод направлен на количественное определение поверхностных маркеров клеток. Суть метода заключается в следующем: клетки метят специальными флуорохромами и пропускают через проточную ячейку совместно с потоком жидкости. Далее каждую отдельную клетку облучают лазером и затем регистрируют интенсивность свечения. Метод проточной цитометрии позволяет разделить клетки на популяции и субпопуляции, оценить их функциональное состояние, а также определить уровень экспрессии определенных генов. В нашей работе оценивается уровень экспрессии мРНК P-селектина. Хотя уровни мРНК не обязательно пропорциональны выработке функциональных белков, в

нескольких исследованиях [62, 63] была показана корреляция между экспрессией мРНК Р-селектина и функциональным белком.

В работах разных авторов изучалось влияние повышенной/пониженной экспрессии Р-селектина. Так, авторы статьи [64] пришли к выводу, что у пациентов с заболеваниями периферических артерий повышена экспрессия данного белка. В других статьях [65] сообщается о связи повышенной экспрессии Р-селектина и атеросклероза.

В своей работе Мо с соавт. [66] проводили исследование на мышах, которым был смоделирован тромбоз глубоких вен (ТГВ). Проводили оценку уровня экспрессии мРНК Р-селектина, VCAM-1 (васкулярной молекулы клеточной адгезии, участвующей в адгезии лейкоцитов и развитии атеросклероза) и PSGL-1 с помощью ОТ-ПЦР, а также применялся вестерн-блоттинг для оценки экспрессии белка Р-селектина, VCAM-1 и PSGL-1 на стенке нижней полой вены. Исследователи отметили, что экспрессия мРНК Р-селектина и других молекул значительно увеличилась в крови после операции по сравнению с фиктивной группой. Кроме того, мРНК PSGL-1, VCAM-1 и Р-селектина сверхэкспрессируются через 6 ч после ТГВ, достигают пика через 24 ч и снижаются через 72 ч. Также и экспрессия белков Р-селектина, VCAM-1 и PSGL-1 была повышена в венозной стенке после операции. И эти белки сверхэкспрессируются через 6 ч после ТГВ, достигают максимума через 48 ч и снижаются через 72 ч. Все эти повышения экспрессии были связаны с тромбозом. Авторы также предполагают, что данные молекулы могут регулировать адгезию моноцитов и эндотелиальных клеток путем активации NF-κB сигнального пути.

В исследовании Molenaar с соавт. [67] проводили количественную оценку экспрессии мРНК Р-селектина на модели атеросклеротической мыши. Было показано, что уровень экспрессии мРНК Р-селектина был сильно повышен в атеросклеротической аорте. Кроме того, экспрессия Р-селектина увеличивалась с возрастом и являлась более специфическим маркером прогрессирования поражения, чем молекулы адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектин.

Помимо всего прочего, сообщалось, что эндогенный NO ингибирует экспрессию гена Р-селектина и ICAM-1 при остром воспалении [68].

Разными авторами проводились исследования по влиянию антитромбоцитарных препаратов на экспрессию Р-селектина. Так, некоторыми исследователями было показано, что прием аспирина снижает экспрессию Р-селектина и полностью тормозит образование $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов, так как аспирин нарушает взаимодействие между агрегатами и Р-селектином, который связывает между собой тромбоциты и Т-лимфоциты [69]. Однако наблюдались противоречивые мнения. В работе Колесник с соавт. [70] был отмечен повышенный уровень Р-селектина в плазме у пациентов, получавших аспирин на фоне сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и диабета.

Что касается применения клопидогрела и прасугрела, то данные препараты значительно ингибируют экспрессию Р-селектина на тромбоцитах. Вероятно, это связано с тем, что они блокируют рецепторы АДФ, тем самым уменьшают агрегацию тромбоцитов, вызывают снижение продукции тромбина и высвобождения маркеров воспаления [71, 72].

Таким образом, принимая во внимание все вышеперечисленные исследования, можно полагать, что молекула Р-селектина представляет особый научный интерес в изучении воспалительных процессов, атеросклероза, ИБС.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Исследование было выполнено на базе Научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований СФУ в г. Красноярске. В анализ было включено 153 пациента, среди которых 30 женщин (19,6%) и 123 мужчины (80,4%) с диагнозом ИБС, поступивших на лечение в ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» (г. Красноярск). Средний возраст – $60,67 \pm 7,38$. У всех пациентов атеросклеротическое поражение коронарных артерий, подтвержденное коронароангиографией. В группу контроля вошли 33 здоровых доноров: 11 женщин (33,3%) и 22 мужчин (66,7%). Средний возраст группы контроля – $48,2 \pm 9,8$ лет.

Всем пациентам при поступлении сотрудниками лаборатории Федерального центра сердечно-сосудистой хирургии (г. Красноярск) проводились следующие лабораторные исследования: развернутый анализ крови на гематологическом анализаторе SYSMEX XT-1800i, Roche (Швейцария), биохимический анализ крови на анализаторе Furuno SA – 400 (Япония), анализ крови на гемостаз (активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, фибриноген) на коагулометрическом анализаторе ACL 9000 (США), агрегация тромбоцитов на оптическом агрегометре Chronolog 490 (США) с индукторами: АДФ 5 мМ и Арахидоновой кислотой (АК) 1 мМ. Резистентность к АСК определялась при уровне агрегации тромбоцитов $>20\%$ после инкубации, обогащенной тромбоцитами плазмы с АСК и индукции с арахидоновой кислотой. Резистентность к клопидогрелу определялась как степень уменьшения максимальной интенсивности агрегации тромбоцитов под действием 5 мМ АДФ по отношению к исходному значению (на фоне отмены клопидогрела минимум за 5 суток до АКШ) по формуле: (Амплитуда агрегации исходная / Амплитуда агрегации на 8-10 сутки после АКШ) / Амплитуда агрегации исходная * 100%. При значениях $> 40\%$ пациенты определялись как резистентные к терапии клопидогрелом.

Минимум за 5 дней до АКШ отобранным пациентам была отменена антиагрегантная терапия. После АКШ 94 пациента находилось на терапии ацилсалициловой кислотой (100 мг кишечнорастворимая форма), 59 – на двойной антитромбоцитарной терапии (100 мг кишечнорастворимой формы АСК + 75 мг клопидогрела).

Наблюдение за пациентами осуществлялось в период стационарного лечения – $12,3 \pm 3,4$ дней, в двух точках: до АКШ при поступлении и на восьмые-десятые сутки после оперативного вмешательства.

Выбор генов-кандидатов и SNP был основан на тщательном обзоре существующей литературы.

Для анализа полиморфизмов в генах *SELP*, *SELPLG*, *ITGA2*, *ITGB3*, *GP1BA*, *P2Y12*, *CYP2C19*2* в качестве объекта исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови пациентов с диагнозом ИБС (стабильная стенокардия). Окончательный диагноз устанавливали на основании критериев ВОЗ.

Взятие крови производилось из локтевой вены путем пункции в вакутейнер с двукальевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА-К2) (5 мл для молекулярно-генетических исследований). Общее количество обследованных на наличие полиморфизмов в генах Р-селектина и его лиганда, тромбоцитарных рецепторов и цитохрома P450 составило 186 человек (153 больных ИБС и 33 донора).

Для анализа полиморфизмов rs6136 гена *SELP*, rs2228315 гена *SELPLG*, rs5819 гена *ITGB3*, rs6065 гена *GP1BA*, rs4244285 гена *CYP2C19*2*, rs1126643 гена *ITGA2*, rs2046934 гена *P2RY12* выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили с использованием комплекта реагентов «SNP-экспресс» (НПФ Литех). Далее с образцами выделенной ДНК была проведена ПЦР с использованием комплектов реагентов для амплификации «SNP-экспресс» (НПФ Литех) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации, а также «SNP-экспресс-РВ» и «SNP-экспресс-РВ» в формате SHOT (НПФ Литех) с детекцией результата в режиме реального времени.

Для анализа полиморфизмов rs6131, rs6133 гена *SELP* геномная ДНК из лейкоцитов цельной крови выделялась с использованием набора реагентов «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс). Далее с образцами выделенной ДНК была проведена аллель-специфичная ПЦР с использованием комплекта реагентов для амплификации «ПЦР-Комплект» (Синтол) и детекцией результатов в режиме реального времени. Для работы были использованы и оптимизированы аллель-специфичные праймеры, заимствованные из статьи [76].

Для оценки уровня экспрессии гена Р-селектина объектом исследования послужила мРНК, выделенная из тромбоцитов цельной крови с помощью набора реагентов «Рибо-преп» (ООО ИнтерЛабСервис), пациентов с диагнозом ИБС и здоровых доноров. Взятие крови производилось из локтевой вены с помощью вакуумных пробирок VACUETTE. В качестве антикоагулянта использовался 3,8% цитрат натрия.

Измерение концентрации мРНК проводили с использованием набора реагентов Quant-iT™ ssRNA AssayKit и флуориметра Qubit 3 (Invitrogen). Далее с образцами выделенной мРНК была проведена совмещенная с обратной транскрипцией ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов «БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ» (ООО БИОЛАБМИКС). В исследование включено 19 пациентов (средний возраст – $61,42 \pm 6,56$ лет), с подтвержденным диагнозом ИБС, и 9 здоровых доноров (средний возраст – $50,86 \pm 9,35$).

2.2 Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ Литех)

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» НПФ Литех проводится по следующей методике:

1. В пробирку типа «Эппендорф» с замком внести 1000 мкл цельной крови. Если кровь расслоилась в процессе хранения, то перед внесением ее необходимо перемешать переворачиванием пробирки до однородности.

2. Процентрифугировать пробирку с кровью со скоростью 3000 об/мин при комнатной температуре в течение 5 мин. После центрифугирования кровь разделится на плазму и форменные элементы.

3. С помощью пипетки отобрать плазму, не затронув лейкоциты.

4. Поместить закрытую пробирку в холодильник на -20°C до полного замораживания клеток (в течение 1 ч).

5. Полностью разморозить содержимое пробирки при комнатной температуре.

6. В пробирку добавить реактив «ДНК-экспресс-кровь». Его объем должен быть равен объему оставшихся в пробирке форменных элементов и плазмы (в примере объем остатка равен 550 мкл, суммарный объем остатка и реактива составил, таким образом, 1100 мкл). Перемешать на вортексе.

7. Прогреть содержимое пробирки в течение 15 минут при 98°C в термостате.

8. Процентрифугировать пробирку при 8000-14000 об/мин в течение 15 сек. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (НПФ Литех).

2.3 Выделение ДНК из клинического материала набором «ДНК-сорб-В» (ООО ИнтерЛабСервис)

Объем исследуемого материала для выделения ДНК – 250 мкл.

1. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8°C) прогреть при температуре 65°C до полного растворения кристаллов.

2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок. Внести в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора. Промаркировать пробирки.

3. В пробирки с лизирующим раствором внести по 100 мкл проб, используя наконечники с аэрозольным барьером.

4. Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65°C (если Вы работаете с плазмой крови, прогревать пробу не

нужно). Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге. Если проба растворилась не полностью, процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс об/мин и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новую пробирку.

5. Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

6. Осадить сорбент в пробирках с помощью центрифугирования при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

7. Добавить в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

8. Добавить в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

9. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 8, удалить надосадочную жидкость полностью.

10. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

11. В пробирки добавить по 50 мкл TE-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

12. Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

2.4 Выделение тромбоцитов из цельной крови

1. Образец венозной крови отбирается в пробирку с 3,8% цитратом натрия, поскольку ЭДТА может разрушить мембрану тромбоцитов.

2. Откручиваем пробки на центрифуге при 1200 об/мин 6 мин. Температура в центрифуге должна составлять 12-16°C для лучшего выхода тромбоцитов. После центрифугирования кровь разделится на 3 слоя: верхний слой – плазма, обогащенная тромбоцитами, средний слой – лейкоцитарная пленка, нижний слой – эритроциты.

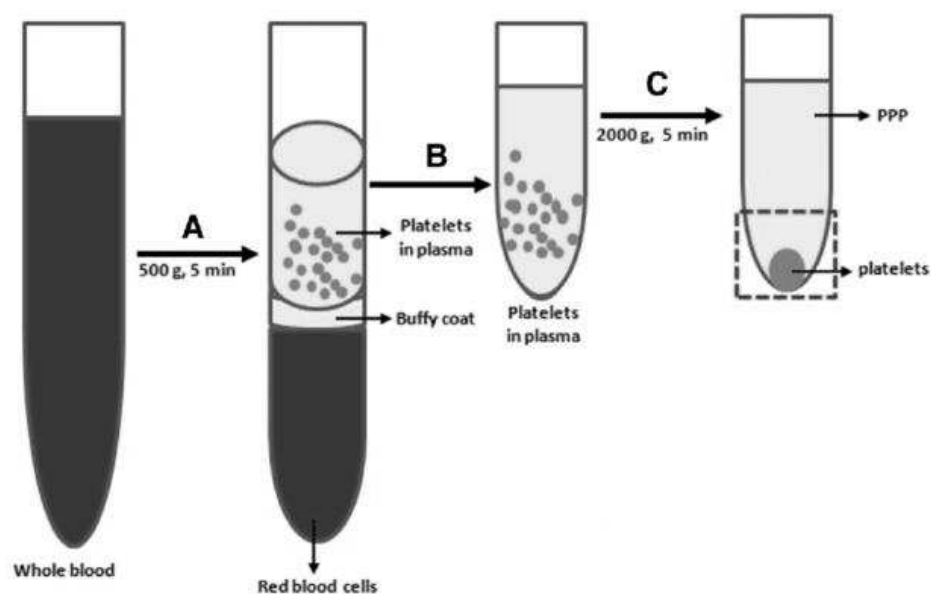


Рисунок 5 – Получение богатой тромбоцитами плазмы [73].

3. Перенести 1 мл богатой тромбоцитами плазмы в пробирку на 2 мл и добавить 100 мкл магнитных частиц Dynabeads CD45, предварительно отмытых в изолирующем буфере, состоящем из фосфатного буфера, 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 2мМ ЭДТА, рН – 7,4. Магнитные частицы необходимы для очищения образца от примеси лейкоцитов.

4. Инкубировать богатую тромбоцитами плазму и магнитные частицы 30 мин при температуре +2° - +8° при легком помешивании.

5. Поместить пробирку в магнитный штатив на 2 мин.

6. Отобрать супернатант в новую 1,5 мл пробирку, а частицы выбросить.

7. Откручиваем очищенную пробу в центрифуге при 3000 об/мин в течение 15 мин. В результате центрифугирования произойдет разделение: верхний слой (2/3 объема) – бедная тромбоцитами плазма, нижний слой (1/3 объема) – богатая тромбоцитами плазма, на дне – тромбоциты.

2.5 Выделение РНК из тромбоцитов с использованием реагента «Рибо-преп» (ООО ИнтерЛабСервис)

1. Раствор для лизиса (если он хранился при температуре от +2 до +8 °С) прогреть при температуре 65°С до полного растворения кристаллов.

2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками. Добавить в пробирки по 300 мкл раствора для лизиса. Промаркировать пробирки.

3. В пробирки с раствором для лизиса внести по 100 мкл подготовленных проб, используя наконечники с аэрозольным барьером.

4. Пробы тщательно перемешать на вортексе, процентрифугировать в течение 5 с на микроцентрифуге для удаления капель с внутренней поверхности крышки и прогреть 5 мин при 65°С в термостате.

5. Внести в пробирки по 400 мкл раствора для преципитации, перемешать на вортексе.

6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 5 мин при 13 тыс об/мин.

7. Осторожно удалить надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 200 мкл для каждой пробы.

8. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

9. Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.

10. Аккуратно удалить, не задевая осадка, надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.

11. Добавить в пробирки по 200 мкл раствора для отмывки 4, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.

12. Процентрифугировать при 13 тыс об/мин в течение 1-2 мин на микроцентрифуге.

13. Аккуратно удалить, не задевая осадка, надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник на 10 мкл для каждой пробы.

14. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

15. В пробирки внести по 50 мкл РНК-буфера. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65°С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

16. Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Очищенная РНК/ДНК может храниться до 24 ч при температуре от +2 до 8 °С и до года при температуре не выше минус 16 °С.

2.6 Измерение концентрации РНК с использованием набора реагентов Quant-iT™ ssRNA AssayKit (Invitrogen)

В образец вводится флуоресцентный зонд, который специфически связывает целевую молекулу, образуя флуоресцентный комплекс. Источник света возбуждает флуоресценцию, которая пропорциональна концентрации определяемого вещества. Прибор измеряет интенсивность свечения и рассчитывает концентрацию.

Измерение концентрации РНК с использованием набора реагентов Quant-iT™ ssRNA AssayKit и флуориметра Qubit 3 (Invitrogen) производилось согласно следующей методике:

1. Наставить пробирки на 0,5 мл в количестве (n), равном числу образцов РНК плюс 2 стандарта. Подписать на крышечках номера образцов и стандартов.
2. Приготовить Рабочую смесь: $1 \times n$ мкл Реагента + $199 \times n$ мкл Буфера.
3. Раскапать в пробирки:
 - А) для стандартов 190 мкл Рабочей смеси + 10 мкл Стандарта;
 - Б) для исследуемых образцов: 199 – 180 мкл Рабочей смеси + 1 – 20 мкл РНК;
4. Вortexировать 2–3 сек, сбросить капли.
5. Инкубировать 2 мин.
6. Включить Qubit в сеть. Если прибор находится в спящем режиме, нажать любую кнопку для перехода в рабочий режим.
7. Выбрать вид анализа (**dsRNA BR Assay**), нажав соответствующую кнопку.
8. Можем выбрать старую калибровку, нажав на «Run samples», или произвести калибровку заново, нажав на «**Read standards**».
9. Вставить Стандарт №1, нажать «**Read**», затем вставить Стандарт №2, нажать «**Read**». Программа автоматически построит калибровочный график
10. Вставить исследуемую пробу, нажать «**Read tube**». На экране появится концентрация образца. Записать результат. Убрать исследуемую пробу из прибора, вставить следующую и нажать «**Read tube**».

2.7 Оценка качества выделенной РНК

Качество и чистота ДНК/РНК относят к наиболее важным факторам молекулярно-генетического анализа. Наиболее распространенным методом оценки качества выделенных нуклеиновых кислот (НК) является электрофорез в акриламидном или агарозном геле. Для визуализации нуклеиновой кислоты в геле применяют различные методы: интеркалирующие красители (бромид

этидия), красители, связывающиеся непосредственно с НК, окраска серебром (нитрат серебра), радиоактивные изотопы.

Для оценки качества выделенной РНК рекомендуется использовать метод электрофореза в агарозном геле (на ТАЕ-буфере) с окрашиванием бромистым этидием. После проведения электрофореза рРНК будут видны четкие полосы, соответствующие 28S и 18S рРНК. При оптимальном качестве выделенной РНК соотношение интенсивности полос 28S и 18S рРНК составляет 2:1. При загрязнении или деградации образца выделенной РНК будет наблюдаться сдвиг соотношения в сторону 18S РНК [74].

Электрофорез РНК проводился по следующей методике:

1. Приготовить 1 % агарозный гель. Для приготовления геля в колбу вносят 0,3 г агарозы, 0,6 мл 50xТАЕ и доводят до 30 мл дистиллированной водой. Варить гель до полного растворения частиц агарозы.

2. Осторожно добавить 1,5 мкл бромистого этидия, перемешать смесь.

3. Залить полученную суспензию в форму для агарозы и установить гребенки.

4. После полного застывания геля (через 30-45 мин.), аккуратно удалить гребенки.

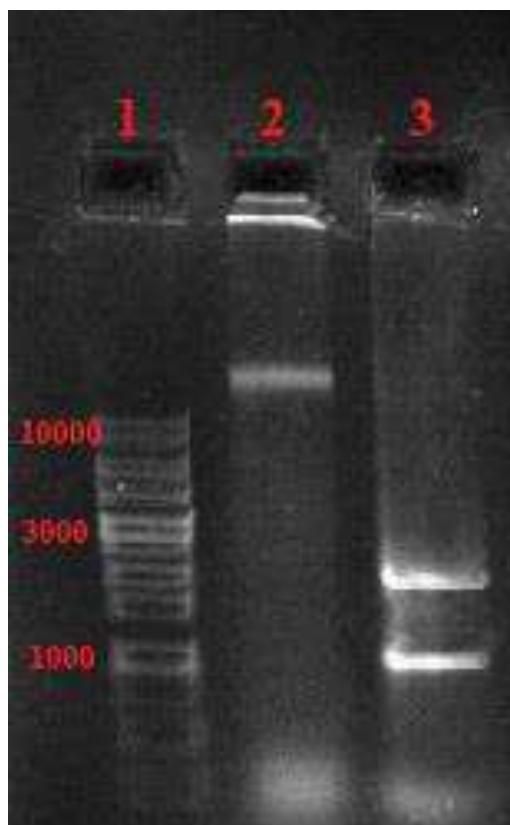
5. В первую лунку добавить 2 мкл маркера молекулярного веса. В остальные лунки нанести по 8 мкл РНК и поместить гель в камеру для электрофореза.

6. Добавить достаточное количество электрофорезного буфера, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.

7. Электрофорез проводить 20 – 30 минут при напряжении 5V/см (85V).

8. После завершения электрофореза переключают гель в камеру трансиллюминатора гель-документирующей системы. Просматривают гель в проходящем ультрафиолетовом свете. Фиксируют полученное изображение и оформляют результаты, используя гель-документирующую систему.

Пример электрофореза РНК представлен на рисунке 6.



1 – маркер молекулярного веса; 2 – образец РНК №1; 3 – образец РНК №2

Рисунок 6 – Электрофорез РНК в 1% геле.

Для визуализации РНК методом электрофореза в агарозном геле концентрация исследуемого образца НК должна составлять 100 – 1000 нг.

2.8 Проведение ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод молекулярной биологии, позволяющий синтезировать специфические фрагменты ДНК с использованием фермента ДНК-полимеразы. Детекция продуктов ПЦР в реальном времени обеспечивается включением в реакцию флуоресцентной метки, которая дает повышенную флуоресценцию пропорционально увеличению количества ДНК-продукта.

2.8.1 Проведение аллель-специфичной ПЦР с использованием комплекта реагентов для амплификации «ПЦР-Комплект» (Синтол) с детекцией результатов в режиме реального времени.

Для проведения метода используют специально синтезированные праймеры, на 3'-конце которых располагается переменный нуклеотид. С образцом выделенной ДНК параллельно проводятся две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Образовавшиеся продукты реакции, соответствующие мутантному аллелю и аллелю дикого типа, далее визуализируются с помощью различных методов [75].

Для проведения аллель-специфичной ПЦР с целью анализа полиморфизмов rs6131, rs6133 гена *SELP* были использованы праймеры, заимствованные из статьи Р. Vugert с соавт. [76], и представлены на рис. 7.

PSEL-290S-Fg	CACCTGGAAGCCCCAG	Exon 7	1 μM	208
PSEL-290N-Fa	CACCTGGAAGCCCCAA	Exon 7	1 μM	208
PSEL-S290N	TTGGACAGAATGGAGGTTGC	Intron 7	1 μM	
PSEL-562N-Fa ²	CTCCACCTGYCATTCTCTTGTA ²	Exon 11	2 μM	141
PSEL-562D-Fg ²	CTCCACCTGYCATTCTCTTG ²	Exon 11	2 μM	141
PSEL-N562D	AAGTAGAACTGCTTAGCAAGTAC	intron 11	1 μM	
PSEL-599V-Fg	CACCTCCTACTCCAGGGG	Exon 12	1 μM	278
PSEL-599L-Ft	CACCTCCTACTCCAGGGT	Exon 12	1 μM	278
PSEL-V599L	CAACATACAGGCACAATGGC	Intron 12	1 μM	

Рисунок 7 – Аллель-специфичные праймеры для анализа полиморфизмов rs6131, rs6133 в гене *SELP* [77].

Аллель-специфическая ПЦР проводилась по следующей методике:

1. Разморозить реактивы при температуре +4°C. После размораживания реактивы встряхнуть и центрифугировать.
2. При приготовлении реакционной смеси рекомендуются следующие объемы компонентов в расчете на одну пробирку:

№	Наименование	Объем, мкл
1	dNTP, 2,5 mM	2,5
2	10xПЦР буфер	2,5
3	MgCl ₂ , 25mM	2,5
4	Смесь праймеров, 10пкмоль/мкл каждого	0,5-1,0
5	SynTaq ДНК-полимераза, 5Е/мкл	0,2-0,5
6	dd H ₂ O	до 25,0
7	Образец ДНК	1,0-1,5 мкл

3. После приготовления реакционной смеси перенести пробирки в систему для проведения ПЦР-РВ в точном соответствии заданным ранее протоколом расположения образцов.

4. Задать программу амплификации со следующими параметрами:

Таблица 1 – Программа амплификации

Т, С°	Время	Циклы
95°	2 мин	1
95°	10 сек	10
65°	1 мин	
95°	10 сек	25
65°	1 мин (считывание)	
72°	20 сек	1

Программа амплификации была заимствована из статьи Р. Vugert с соавт. [77].

2.8.2 Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов «SNP-ЭКПРЕСС-РВ» (НПФ Литех) с детекцией результата в режиме реального времени на приборе CFX96 (Bio-Rad)

ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени проводилось по следующей методике:

1. Приготовить и расставить в указанном в протоколе измерений порядке бесцветные пробирки с оптическими крышками вместимостью 0,2 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца. Маркировка пробирок не допускается! Для каждой пробы готовятся 2 пробирки N (норма) и M (мутация).

2. Предварительно разморозить комплект реагентов для ПЦР. Пробирки с реагентами тщательно вортексировать, затем центрифугировать, чтобы сбросить капли с крышки.

3. Из компонентов комплекта приготовить рабочие смеси реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу:

- 17,5 мкл разбавителя,
- 2,5 мкл реакционной смеси,
- 0,2 мкл красителя SYBR Green.

0,2 мкл Таq-полимеразы (вносится в последнюю очередь и перед ее внесением смесь рекомендуется немного перемешать)

4. Готовятся 2 рабочие смеси: НОРМА – с реакционной смесью АЛЛЕЛЬ 1 и МУТАЦИЯ – с реакционной смесью АЛЛЕЛЬ 2.

5. Содержимое пробирок тщательно перемешать с помощью вортекса или пипетирования.

6. Внести в приготовленные пробирки по 20 мкл полученной рабочей смеси.

7. Добавить по 5 мкл ДНК в пробирки со смесями НОРМА и МУТАЦИЯ. В качестве ОКО вносится разбавитель, в качестве ПКО - положительный контрольный образец ДНК в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

8. Центрифугировать пробирки при 1500-3000 об/мин в течение 3-5 сек на микроцентрифуге-вортексе.

9. Заранее включить и подготовить систему для проведения ПЦР-РВ для прогрева.

10. Перенести пробирки в амплификатор в точном соответствии заданным ранее протоколом расположения образцов.

11. Задать программу амплификации со следующими параметрами:

Таблица 2 – Программа амплификации для прибора CFX-96

T, C°	Время	Циклы
93°	1 мин	1
93°	10 сек	35
64°	10 сек	
72°	20 сек (считывание)	

Детекция продуктов амплификации осуществляется прибором автоматически в каждом цикле амплификации. На основании этих данных управляющая программа строит кривые накопления флуоресцентного сигнала по каждому из заданных для образцов каналов.

2.8.3 Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов для амплификации «SNP-ЭКСПРЕСС» с электрофоретической детекцией продуктов амплификации (НПФ Литех)

Проведение амплификации:

1. Приготовить и пронумеровать пробирки для проведения амплификации вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) в соответствии с количеством анализируемых проб плюс отрицательный контроль. Для каждой пробы готовятся 2 пробирки (N (НОРМА) и P (ПАТОЛОГИЯ)).

2. Предварительно разморозить комплект реагентов для ПЦР. Пробирки с реагентами тщательно вортексировать, затем центрифугировать, чтобы сбросить капли с крышки.

3. Из компонентов комплекта приготовить рабочие смеси реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу:

17,5 мкл разбавителя,

2,5 мкл реакционной смеси,

0,2 мкл Taq-полимеразы (вносится в последнюю очередь)

Готовятся 2 рабочие смеси: с реакционной смесью НОРМА и с реакционной смесью ПАТОЛОГИЯ.

4. После добавления всех компонентов, смесь тщательно перемешать с помощью пипетирования.

5. Добавить по 20 мкл соответствующей рабочей амплификационной смеси во все соответствующие пробирки, подготовленные для амплификации.

6. Внести по 5 мкл ДНК в пробирку со смесями НОРМА и ПАТОЛОГИЯ. В качестве ОКО вносится разбавитель в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

8. Процентрифугировать пробирки при 1,5-3000 об/мин в течение 3-5 секунд на микроцентрифуге-вортексе.

9. Перенести пробирки в прогретый до температуры +94°C (установившаяся температура в режиме Пауза) программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе:

Таблица 3 – Программа амплификации для прибора CFX96

Т, С°	Время	Циклы
94°	Pause	
93°	1 мин	1
93°	10 сек	35
64°	10 сек	
72°	20 сек	
72°	1 мин	1
10°	Storage	

Визуализировать продукты амплификации с помощью электрофореза в 3% агарозном геле.

2.8.4 Проведение ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ООО БИОЛАБМИКС)

Обратная транскрипция (ОТ) – процесс синтеза копий ДНК (комплементарной ДНК, кДНК) на матрице одноцепочечной РНК. Данный процесс катализирует специальный фермент – обратная транскриптаза (ревертаза). Реакция обратной транскрипции ведет к образованию кДНК, которую используют как матрицу в ПЦР (рис.8).

При количественном определении мРНК ПЦР в реальном времени можно проводить либо в виде одностадийной реакции, где вся реакция от синтеза кДНК до амплификации ПЦР проводится в одной пробирке, либо в виде двухстадийной реакции, где происходит обратная транскрипция и амплификация ПЦР в отдельных пробирках. Одностадийная реакция предпочтительнее, так как позволяет снизить количество ошибок, допускаемых на двух стадиях.

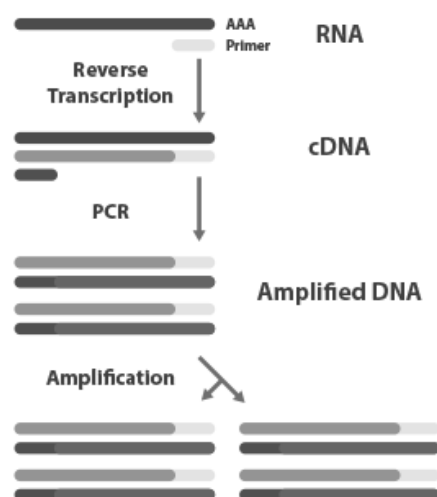


Рисунок 8 – Схема обратной транскрипции [77]

ОТ-ПЦР проводилась последующей методике:

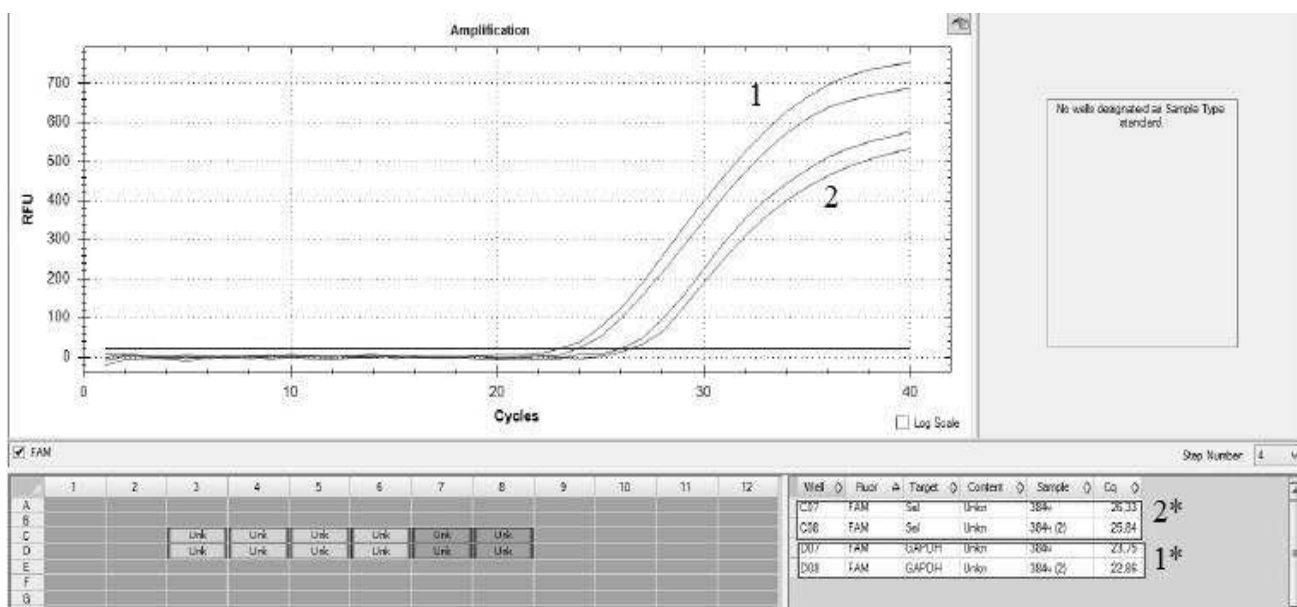
1. Разморозить 2× буфер для ОТ-ПЦР-РВ и тщательно перемешать.
2. Поместить тонкостенные пробирки для ПЦР в лед и добавить следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 25 мкл:

Компонент	Объем	Конечная концентрация
2x смесь для ОТ-ПЦР-РВ	12,5 мкл	1x
БиоМастер-микс	1 мкл	
Прямой праймер Обратный праймер	переменный	0,1 – 600 нМ
Зонд	переменный	0,1 – 300 нМ
РНК-матрица	переменный	1 пг – 1 мкг
Стерильная вода	До 25 мкл	

3. Осторожно перемешайте и сбросьте капли, используя центрифугу.
4. Проведите ПЦР, используя один из рекомендованных режимов:

Шаг	Температура, °С	Время инкубации	Количество циклов
Обратная транскрипция	45	30 мин	1
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	15 сек	40
Отжиг/элонгация	60	1 мин	

5. Результат проведения ПЦР отображается в виде кривых амплификации (рис. 9).



- 1 – кривые накопления флуоресценции гена *GAPDH* в двух повторах;
 2 – кривые накопления флуоресценции гена *SELP* в двух повторах;
 1* – циклы выхода кривой гена *GAPDH*;
 2* – циклы выхода кривой гена *SELP*
- Рисунок 9 – Пример результатов ОТ-ПЦР

В качестве референсного гена использовали *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase). Глицеральдегид-3-фостатдегидрогеназа является одним из наиболее часто используемых генов домашнего хозяйства при сравнении данных экспрессии. *GAPDH* участвует в процессах гликолиза и глюконеогенеза, а также в других повсеместно распространенных процессах, таких как репликация и репарация ДНК и апоптоз. *GAPDH* часто используется в качестве эндогенного контроля для количественного анализа ОТ-ПЦР, потому что его экспрессия постоянна в разные моменты времени и при различных экспериментальных манипуляциях.

ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с использованием специфических праймеров и TaqMan зондов для выявления мРНК генов *SELP* и *GAPDH* (ThermoFisherScientific) в двух технических повторах.

2.9 Расчет относительного уровня экспрессии мРНК *SELP*

Наиболее распространенным методом расчёта экспрессии генов является метод $2^{-\Delta C_t}$, разработанный в 2001 году К. Ливаком и Т. Шмиттгеном. Данный метод показывает относительную количественную оценку интересующего гена

в сравнении с референсным геном. Метод $2^{-\Delta Ct}$ предполагает равномерную эффективность ПЦР – амплификации во всех образцах равную 100%. Значение $2^{-\Delta Ct}$ равно эффективности ПЦР-амплификации (100%), в идеале количество продуктов амплификации с каждым циклом увеличивается вдвое. Значение Ct – это номер цикла ПЦР, при котором кривая реакции образца пересекает пороговую линию. Дельта обозначает разницу между циклами выхода кривой.

$$R = 2^{-\Delta Ct}$$

где $\Delta Ct = Ct$ (интересующий ген) – Ct (референсный ген).

2.10 Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза

Электрофорез проводился по следующей методике:

1. Приготовить 3% агарозный гель. Для приготовления геля в колбу вносят 0,9 г агарозы, 0,6 мл 50xTAE и доводят до 30 мл дистиллированной водой. Варить гель до полного растворения частиц агарозы.
2. Осторожно добавить 3 мкл бромистого этидия, перемешать смесь.
3. Залить полученную суспензию в форму для агарозы и установить гребенки.
4. После полного застывания геля (через 30-45 мин.), аккуратно удалить гребенки.
5. В первую лунку добавить 2 мкл маркера молекулярного веса. В остальные лунки нанести по 5 мкл ПЦР-продукта и поместить гель в камеру для электрофореза.
6. Добавить достаточное количество электрофорезного буфера так, чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1 мм.
7. Электрофорез проводить 15 – 30 минут при напряжении 100V.
8. После завершения электрофореза перекладывают гель в камеру трансиллюминатора гель-документирующей системы.

9. Просматривают гель в проходящем ультрафиолетовом свете. Фиксируют полученное изображение и оформляют результаты, используя геледокументирующую систему.

Пример результатов электрофореза представлен на рисунке 10.

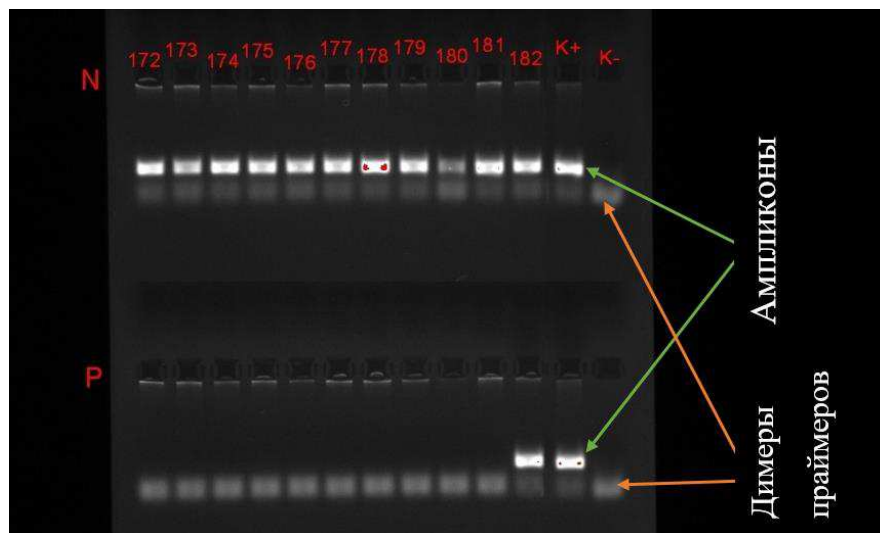


Рисунок 10 – Пример интерпретации результатов анализа

Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм. Под ними регистрируются димеры праймеров.

2.11 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов анализа нуклеотидных полиморфизмов в изучаемых генах, а также анализа экспрессии мРНК гена *SELP* производили с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics (Версия 20.0) и программы MS Excel for Windows (2016).

Статистические расчеты количественных показателей включали в себя описательные статистики: среднее значение (M) и стандартное отклонение (σ). Для качественных показателей вычислялись следующие показатели: число наблюдений и доля (в %) от общего количества пациентов или от количества пациентов в соответствующей подгруппе.

Для анализа количественных показателей экспрессии гена *SELP* проводилась проверка нормальности распределения значений с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Для сравнения средних значений двух

независимых выборок применялся критерий Манна-Уитни при несоответствии выборки нормальному закону распределения. Для сравнения средних значений двух зависимых выборок применялся критерий знаковых рангов Вилкоксона. Для категориальных переменных применяли χ^2 -тест. Для оценки риска развития резистентности при наличии минорной аллели изучаемых полиморфизмов производили оценку отношения шансов. За статистически значимый уровень достоверности принимали $p < 0,05$, статистическую тенденцию к достоверности – $0,05 < p < 0,1$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По данным оптической агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой до АКШ все пациенты были разделены на 2 группы: 132 (86,3%) пациента включены в группу чувствительных к АСК (АЧ) и 21 (13,7%) пациент в группу резистентных к АСК (АР). Группу пациентов на ДАТ составили 59 человек. По данным оптической АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов 10 пациентов (16,9%), находящихся на ДАТ, были резистентны к клопидогрелу.

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из проделанной работы, можно выделить основные выводы:

1. Статистически значимых отличий по распространенности полиморфизмов rs6136, rs6133, rs6136 в гене *SELP*, rs2228315 в гене *SELPLG*, rs1126643, rs5819, rs6065, rs4244285 и rs2046934 в генах *ITGA2*, *ITGB3*, *GP1BA*, *CYP2C19*2* и *P2RY12* между группой пациентов с диагнозом ИБС и группой доноров не выявлено.

2. Носительство минорных аллелей полиморфизмов rs6136, rs6133, rs6136 в гене *SELP*, rs2228315 в гене *SELPLG*, rs1126643, rs5819, rs6065, rs4244285 и rs2046934 в генах *ITGA2*, *ITGB3*, *GP1BA*, *CYP2C19*2* и *P2RY12* не ассоциировано с проявлением резистентности к антитромбоцитарным препаратам.

3. При сравнении АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов среди носителей распространенной и минорной аллелей полиморфизма rs6131 гена *SELP* были выявлены достоверные отличия ($p=0,01$).

4. При сравнении относительного уровня экспрессии мРНК *SELP* между группой пациентов с ИБС и группой доноров были выявлены статистически значимые отличия ($p=0,048$). Прием антиагрегантных средств подавляет экспрессию Р-селектина. Значимых отличий уровня экспрессии мРНК *SELP* среди групп пациентов до АКШ и после АКШ не обнаружено. Однако наблюдалось повышение уровня экспрессии у каждого пациента после операции по сравнению с соответствующим показателем до АКШ.

5. При сравнении уровня экспрессии гена *SELP* у носителей минорной аллели и носителей мажорной аллели полиморфизмов rs6131, rs6133, rs6136 в этом же гене в группе пациентов до АКШ статистически значимых отличий не обнаружено. Уровень экспрессии мРНК гена *SELP* не зависит от данных полиморфизмов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- CYP – цитохром P
- GP1BA – гликопротеин 1ba, рецептор фактора Виллебранда – GPIb/IX/V
- ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии
- ITGA2 – интегрин $\alpha 2/\beta 1$, рецептор коллагена – GPIa/IIa
- ITGB3 – интегрин $\beta 3$, рецептор фибриногена GPIb/IIIa
- P2RY12 – ADP-рецептор тромбоцитов
- PSGL-1 – P-селектин гликопротеиновый лиганд-1
- SELP – P-селектин
- SNP – Single-nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
- VCAM-1 – васкулярная молекула клеточной адгезии
- vWF – фактор фон Виллебранда
- АДФ – аденозиндифосфат
- АКШ – аортокоронарное шунтирование
- АР – резистентные к ацетилсалициловой кислоте
- АСК – ацетилсалициловая кислота
- АЧ – чувствительные к ацетилсалициловой кислоте
- ДАТ – двойная антиагрегантная терапия
- ИБС – ишемическая болезнь сердца
- ИМ – инфаркт миокарда
- НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция, совмещенная с обратной транскрипцией
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
- ТГВ – тромбоз глубоких вен
- ТхА₂ – тромбоксан А₂
- ЦОГ – циклооксигеназа
- ФАТ – фактор активации тромбоцитов

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бойцов, С. А. Сравнение показателей смертности от ишемической болезни сердца среди мужчин и женщин старше 50 лет в России и США / С.А. Бойцов [и др] // Российский кардиологический журнал. – 2017. – №. 6 (146). – С. 100-107.
2. Горбачев, В. В. Ишемическая болезнь сердца: учебное пособие / В.В. Горбачев - Минск: Издательство "Вышэйшая школа", 2008. – 337 с.
3. Литовский, И.А. Атеросклероз и гипертоническая болезнь: вопросы патогенеза, диагностики и лечения / И. А. Литовский, А. В. Гордиенко. – СПб.: СпецЛит, 2013. – 304 с.
4. Долгов, В.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В.В. Долгов, П.В. Свиринов. - Тверь: Издательство "Триада", 2005. – 227 с.
5. Кочетков, С. Ю. Исследование влияния комбинированного применения ацетилсалициловой кислоты и производных 3-гидроксипиридина и таурина на некоторые показатели гемостаза в эксперименте: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук: 14.03.06 / Кочетков Сергей Юрьевич. - Саранск, 2015. – 145 с.
6. Васильев, С.А. Клинико-лабораторная диагностика нарушений функций тромбоцитов / С.А. Васильев, А.Л. Мелкумян [и др.] – Москва: Принт, 2013. – 76 с.
7. Trialists' Collaboration A. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high-risk patients // British Medical Journal. – 2002. – Т. 324. – №. 7329. – С. 71-86.
8. Sangkuhl, K. Clopidogrel pathway / K. Sangkuhl, T. E. Klein [et al] // Pharmacogenetics and genomics. – 2010. – Т. 20. – №. 7. – С. 463-465.
9. Kazui, M. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically

active metabolite / M. Kazui, Y. Nishiya [et al] // Drug Metabolism and Disposition. – 2010. – Т. 38. – №. 1. – С. 92-99.

10. Steg, P. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC) / P.G. Steg, S.K. James, D. Atar [et al] // European Heart Journal. – 2012. – Vol. 33, № 20. – P. 2569-2619.

11. Bhatt, D. L. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy/ D.L. Bhatt, E. J. Topol // Nature Reviews Drug Discovery. – 2003. – Т. 2. – №. 1. – С. 15-28.

12. Танашян, М.М. Аспиринорезистентность: клинические и молекулярно-генетические методики оценки / М. М. Танашян, М.А. Домашенко, А.А. Раскуражев // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2016. – С. 41-46.

13. Liu, R. Associations of CYP3A4, NR1I2, CYP2C19 and P2RY12 polymorphisms with clopidogrel resistance in Chinese patients with ischemic stroke / R. Liu, Z. Zhou [et al] // Acta Pharmacologica Sinica. – 2016. – Т. 37. – №. 7. – С. 882-888.

14. Guirgis, M. Review of aspirin and clopidogrel resistance in peripheral arterial disease / M. Guirgis, P.Thompson [et al] // Journal of vascular surgery. – 2017. – Т. 66. – №. 5. – С. 1576-1586.

15. Michelson A. D. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease / A.D. Michelson // Nature Reviews Drug Discovery. – 2010. – Т. 9. – №. 2. – С. 154-169.

16. Ярилина, А.А. Роль молекул адгезии в патогенезе ревматоидного артрита / А.А. Ярилина // Научно-практическая ревматология. – 2000. – С. 61-68.

17. Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease / K. Ley // TRENDS in Molecular Medicine. – 2003, - P. 263-268.

-
18. Тугуз, А. Р. Полиморфизмы генов ITG и SEL, ассоциированные с бронхиальной астмой, осложнениями периферического и коронарного атеросклероза, аденокарциномой молочной железы у жителей Республики Адыгея / А.Р. Тугуз, Е.А. Татаркова [и др.] // Вестник АГУ. – 2015. - № 2. – С. 50-59.
19. Merten, M. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates / M. Merten, P. Thiagarajan // *Circulation*. – 2000. – Т. 102. – №. 16. – С. 1931-1936.
20. Carter, A. M. Soluble P-selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease / A.M. Carter, K. Anagnostopoulou [et al] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2003. – Т. 1. – №. 8. – С. 1718-1723.
21. Kappelmayer, J. The emerging value of P-selectin as a disease marker / J. Kappelmayer, B. Nagy [et al] // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2004. – Т. 42. – №. 5. – С. 475-486.
22. Kaur, R. Structural and functional impact of SNPs in P-selectin gene: A comprehensive in silico analysis / R. Kaur, J. Singh, M. Kaur // *Open Life Sciences* – 2017, - P. 19-33.
23. Schutzman, L. M. P-Selectin Is Critical for De Novo Pulmonary Arterial Thrombosis Following Blunt Thoracic Trauma / L.M. Schutzman, R.R. Rigor [et al] // *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. – 2019. – Т. 86. – №. 4. – С. 583-591.
24. Herrmann, S. The P-Selectin Gene is Highly Polymorphic: Reduced Frequency of the Pro715 Allele Carriers in Patients with Myocardial Infarction / S. Herrmann, S. Ricard, V. Nicaud // *Human Molecular Genetics*. – 1998, - P. 1277–1284.
25. Kappelmayer, J. The Interaction of Selectins and PSGL-1 as a Key Component in Thrombus Formation and Cancer Progression / J. Kappelmayer, B. Nagy // *BioMed Research International*. – 2017. – P. 36-42

-
26. Lee, D. S. Clinical and genetic correlates of soluble P-selectin in the community / D.S. Lee, M.G. Larson, K.L. Lunetta, J. Dupuis // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2008. – V. 6. – P. 20-31.
27. Kaur, R. Association of SELP Polymorphisms with Soluble P-Selectin Levels and Vascular Risk in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Case–Control Study / R. Kaur, J. Singh, R. Kapoor, M. Kaur // *Biochemical Genetics*. – 2018.
28. Marteau, J. B. P-selectin polymorphisms influences on P-selectin serum concentrations and on their familial correlation: the STANISLAS family study / J.B. Marteau, D. Lambert, B. Herbeth, B. Marie, S. Drosch, D.A. Tregouet // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2008. – V. 6. – P. 920–927.
29. Herrera-Maya, G. The Ser290Asn and Thr715Pro Polymorphisms of the SELP Gene Are Associated with A Lower Risk of Developing Acute Coronary Syndrome and Low Soluble P-Selectin Levels in A Mexican Population / G. Herrera-Maya, G. Vargas-Alarcón [et al] // *Biomolecules*. – 2020. – T. 10. – №. 2. – C. 270.
30. Burkhardt, J. Cellular adhesion gene SELP is associated with rheumatoid arthritis and displays differential allelic expression / J. Burkhardt, M. Blume [et al] // *PloS one*. – 2014. – T. 9. – №. 8.
31. Tregouet, D. A. Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction / D. A. Tregouet, S. Barbaux [et al] // *Human Molecular Genetics*. – 2002. – P. 2015-2023.
32. The European Bioinformatics Institute [Электронный ресурс]: База данных. – Режим доступа: <https://www.ebi.ac.uk/> (Дата обращения: 7.05.2020).
33. Volcik, K. A. Specific P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand-1 genotypes/haplotypes are associated with risk of incident CHD and ischemic stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study // Kelly A. Volcik, Christie M. Ballantyne, Josef Coresh, Aaron R. Folsom, Eric Boerwinkle // *Atherosclerosis*. – 2007. – V. 195. – P. 76–82.
34. Reiner, A.P. Soluble P-Selectin, SELP Polymorphisms and Atherosclerotic Risk in European-American and African-American Young Adults The Coronary Artery

Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study / Alexander P. Reiner, Christopher S. Carlson, Bharat Thyagarajan, Mark J. Rieder, Joseph F. Polak, David S. Siscovick, Deborah A. Nickerson, David R. Jacobs Jr, Myron D. Gross // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2008. – V. 28. – P. 1549-1555.

35. Zee, R. Y. L. Polymorphism in the P-selectin and interleukin-4 genes as determinants of stroke: a population-based, prospective genetic analysis / Robert Y.L. Zee, Nancy R. Cook, Suzanne Cheng, Rebecca Reynolds, Henry A. Erlich, Klaus Lindpaintner and Paul M. Ridker // *Human Molecular Genetics.* – 2004. – V. 13(4). – P. 389–396.

36. Morris, D. L. Variation in the upstream region of P-Selectin (SELP) is a risk factor for SLE / D. L. Morris, R. R. Graham, L-P Erwig, P. M. Gaffney, K. L. Moser, T. W. Behrens, T. J. Vyse, D. S. Cunninghame Graham // *Genes and Immunity.* – 2009. – V. 10. – P. 404–413.

37. Насибуллин, Т. Р. Ассоциации полиморфных маркеров генов факторов воспаления с инфарктом миокарда / Т. Р. Насибуллин, Р.И. Садикова, Я.Р. Тимашева и др. // *Генетика.* – 2014. – С. 236–242.

38. Volcik, K. A. SELP and SELPLG Genetic Variation Is Associated with Cell Surface Measures of SELP and SELPLG: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid MRI Study / K. A. Volcik, D. Catellier, A. R. Folsom // *Clinical Chemistry.* – 2009. – С. 1076–1082.

39. Živković, M. The sex-specific association of Met62Ile gene polymorphism in P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1) with carotid plaque presence: preliminary study // M. Živković, A. Kolaković, D. Radak, D. Dinčić, S. Radak, T. Djurić, A. Stanković // *Molecular Biology Reports.* – 2012. – V. 39 (6). – P. 6479–6485.

40. Васильева, О. В. Молекулярно-генетические аспекты кардиоваскулярных и цереброваскулярных заболеваний / О.В. Васильева, А.В. Полонников [и др.] // *Научно-практический журнал «Клинико-лабораторный консилиум.* – 2009. – №. 4. – С. 56-59.

-
41. Khatami, M. Common rs5918 (PIA1/A2) polymorphism in the ITGB3 gene and risk of coronary artery disease / M. Khatami, M.M. Heidari [et al] //Archives of medical sciences. Atherosclerotic diseases. – 2016. – Т. 1. – №. 1. – С. e9-e15.
42. Воронина, Е. Н. Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм / Е.Н. Воронина, М.Л. Филипенко [и др.] //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2006. – Т. 10. – №. 3. – С. 553-564.
43. Wu, G. Genetic polymorphism of ITGA2 C807T can increase the risk of ischemic stroke / G. Wu, Y. Xi [et al] // International Journal of Neuroscience. – 2014. – Т. 124. – №. 11. – С. 841-851.
44. Ban, E. Z. Association of hOGG1 Ser326Cys, ITGA2 C807T, TNF-A-308G> A and XPD Lys751Gln polymorphisms with the survival of Malaysian NPC patients / E.Z. Ban, M.- S. Lye [et al] //PloS one. – 2018. – Т. 13. – №. 6. – С. e0198332.
45. Weng, Z. The association of four common polymorphisms from four candidate genes (COX-1, COX-2, ITGA2B, ITGA2) with aspirin insensitivity: a meta-analysis / Z. Weng, X. Li [et al] //PLoS One. – 2013. – Т. 8. – №. 11.
46. Pina-Cabral, L. B. Myocardial infarction before and after the age of 45: Possible role of platelet receptor polymorphisms / L. B. Pina-Cabral, V. Carvalhais [et al] //Revista Portuguesa de Cardiologia. – 2018. – Т. 37. – №. 9. – С. 727-735.
47. Pruissen, D. M. O. Prothrombotic genetic variants and atherosclerosis in patients with cerebral ischemia of arterial origin / D. M. O. Pruissen, L. J. Kappelle [et al] //Atherosclerosis. – 2009. – Т. 204. – №. 1. – С. 191-195.
48. Fujiwara, T. Exploratory aspirin resistance trial in healthy Japanese volunteers (J-ART) using platelet aggregation as a measure of thrombogenicity / T. Fujiwara, M. Ikeda [et al] //The pharmacogenomics journal. – 2007. – Т. 7. – №. 6. – С. 395-403.
49. Barn, K. A brief review of the past and future of platelet P2Y12 antagonist /K. Barn, S.R. Steinhubl [et al] //Coronary artery disease. – 2012. – Т. 23. – №. 6. – С. 368-374.

50. Hollopeter, G. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs /G. Hollopeter, H. Yantzen [et al] //Nature. – 2001. – Т. 409. – №. 6817. – С. 202-207.

51. Li, J. Association between P2RY12 gene polymorphisms and adverse clinical events in coronary artery disease patients treated with clopidogrel: A systematic review and meta-analysis / J.Li, Y. Fu [et al] //Gene. – 2018. – Т. 657. – С. 69-80.

52. Fontana, P. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects / P. Fontana, A. Dupont [et al] //Circulation. – 2003. – Т. 108. – №. 8. – С. 989-995.

53. Staritz, P. Platelet reactivity and clopidogrel resistance are associated with the H2 haplotype of the P2Y12-ADP receptor gene /P. Staritz, K. Kurz [et al] //International journal of cardiology. – 2009. – Т. 133. – №. 3. – С. 341-345.

54. Liu, R. Associations of CYP3A4, NR1I2, CYP2C19 and P2RY12 polymorphisms with clopidogrel resistance in Chinese patients with ischemic stroke/ R. Liu, Z. Zhou [et al] //Acta Pharmacologica Sinica. – 2016. – Т. 37. – №. 7. – С. 882-888.

55. Yang, H. H. Associations of P2Y12R gene polymorphisms with susceptibility to coronary heart disease and clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel / H.H. Yang, Y. Chen [et al] //Cardiovascular therapeutics. – 2016. – Т. 34. – №. 6. – С. 460-467.

56. Дудникова, Э. В. Роль цитохрома P450 и его изоформ в фармакотерапии воспалительных заболеваний верхнего отдела желудочнокишечного тракта у детей / Э.В. Дудникова, Н.У. Азиева //Медицинский вестник Юга России. – 2016. – №. 1.

57. Hokimoto, S. Impact of CYP2C19 Polymorphism and Proton Pump Inhibitors on Platelet Reactivity to Clopidogrel and Clinical Outcomes Following Stent Implantation / S. Hokimoto, M. Mizobe, T. Akasaka // Thrombosis Research. – 2014. – Т.133. – №4. – С. 599-605.

58. Buzoianu, A. D. Screening for CYP2C19*2, *3 and *4 gene variants in a Romanian population study group / A.D. Buzoianu, A.P. Trifa, R.A. Popp [et al] //Farmacia. – 2010. – Т. 58. – №. 6. – С. 806-817.

59. Simon, T. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events / T. Simon, C. Verstuyft, M. Mary-Krause [et al] //New England journal of medicine. – 2009. – Т. 360. – №. 4. – С. 363-375.

60. Муслимова, Э. Ф. Ассоциация полиморфизмов генов ITGB3, P2RY12, CYP2C19 с функциональной активностью тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца на фоне двухкомпонентной антиагрегантной терапии / Э.Ф. Муслимова, С.А. Афанасьев [и др.] // Терапевтический архив. – 2017. – Т. 89. – №. 5. – С. 74-78.

61. Ребриков, Д. В. ПЦР «в реальном времени» / Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов. – Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2009. – Т. 2. – 226 с.

62. Armstead, V. E. Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide / V.E. Armstead, A.G. Minchenko [et al] //American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 1997. – Т. 273. – №. 2. – С. H740-H746.

63. Eguchi, H. Endothelial injuries of coronary arteries distal to thrombotic sites: role of adhesive interaction between endothelial P-selectin and leukocyte sialyl LewisX / H. Eguchi, H. Ikeda [et al] //Circulation research. – 1999. – Т. 84. – №. 5. – С. 525-535.

64. Zeiger, F. P-Selectin expression, platelet aggregates, and platelet-derived microparticle formation are increased in peripheral arterial disease // F. Zeiger, S. Stephan, [et al] // Blood Coagulation and Fibrinolysis. – 2000, - V. 11. – P. 723-728.

65. Koyama, H. Platelet P-Selectin Expression Is Associated With Atherosclerotic Wall Thickness in Carotid Artery in Humans / H. Koyama, T. Maeno [et al] // Circulation. – 2003. – V. 108. – P. 524-529.

-
66. Mo, J. Expression of P-selectin, VCAM-1, and PSGL-1 in traumatic deep venous thrombosis / J. Mo, D. Zhang [et al] // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2016. – Т. 9. – №. 3. – С. 3403-3409.
67. Molenaar, T. J. M. P-selectin as a candidate target in atherosclerosis / T.J.M. Molenaar, J. Twiskl [et al] // *Biochemical pharmacology.* – 2003. – Т. 66. – №. 5. – С. 859-866.
68. Liu, P. NO modulates P-selectin and ICAM-1 mRNA expression and hemodynamic alterations in hepatic I/R / P. Liu, B. Xu [et al] // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* – 1998. – Т. 275. – №. 6. – С. H2191-H2198.
69. Солпов, А. В. Тромбоцитарно-лейкоцитарная адгезия в норме и патологии: автореф. дисс. на соискание ученой степени д-ра мед. наук: 14.03.03 / Солпов Алексей Владимирович. – Чита, 2015. – 48 с.
70. Колесник, М. Ю. Аспиринорезистентность и экспрессия рецепторов тромбоцитов у пациентов с хронической сердечной недостаточностью и сахарным диабетом 2 типа / М. Ю. Колесник, В. В. Сыволап // *Запорожский медицинский журнал.* – 2014. – №. 3. – С. 4-8.
71. Wagner, H. Prasugrel 5 mg inhibits platelet P-selectin and GPIIb–IIIa expression in very elderly and non elderly: results from the GENERATIONS trial, a pharmacodynamic study in stable CAD patients / H. Wagner, C. Lood [et al] // *Journal of thrombosis and thrombolysis.* – 2016. – Т. 42. – №. 3. – С. 369-375.
72. Nawaz, U. CLOPIDOGREL RESISTANCE AND ITS RELATION WITH AGE AND GENDER / U. Nawaz, M. Noor // *Pakistan Journal of Physiology.* – 2019. – Т. 15. – №. 1. – С. 25-28.
73. Liu, F. A novel kartogenin-platelet-rich plasma gel enhances chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and promotes wounded meniscus healing in vivo / F. Liu, H. Xu, H. Huang // *Stem Cell Research & Therapy.* – 2019. – V. 10. – P. 1-12.

74. Ребриков, Д. В. Применение современных молекулярно-биологических методов для поиска и клонирования полноразмерных нуклеотидных последовательностей кДНК: Учебное пособие. / Д.В. Ребриков [и др]. – Москва: НИЯУ МИФИ, 2011. – 88 с.

75. ООО НПФ "Литех", Руководство по применению диагностических наборов для выявления полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР «SNP-ЭКСПРЕСС» производства НПФ "ЛИТЕХ" – Москва, 2011.

76. Bugert, P. Polymorphisms in the P-selectin (CD62P) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) genes and coronary heart disease // P. Bugert, M. Vosberg, M. Entelmann, J. Jahn [et al] // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. – 2004. – V. 42 (9). – P. 997-1004.

77. Panawala, L. Difference between PCR and RT-PCR / L. Panawala // Pediaa – 2017, – P. 1-10.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

С.И. Шимацкая
подпись инициалы, фамилия
« 3 » июля 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

код – наименование направления

Поиск генетических предикторов резистентности к антитромбоцитарным
препаратам у пациентов с ИБС

тема

Руководитель


подпись, дата

доцент, канд. биол. наук
должность, ученая степень

Т.Н. Субботина

Выпускник


подпись, дата

К.С. Семашенко

Красноярск 2020