

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра защиты и современных технологий мониторинга лесов

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой

_____ И.Е. Ямских

«_____»-_____ 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование генетических полиморфизмов резистентности к
антиромбоцитарным препаратам у пациентов с ИБС

Направление подготовки 04.06.01 – Биология
Профиль 06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Научный
руководитель

подпись, дата

канд-т биол. наук
Т.Н. Субботина

Выпускник

подпись, дата

Г.Ю. Кочмарева

Рецензент

подпись, дата

профессор, д-р мед. наук
Ю.И. Гринштейн

Красноярск 2019

АННОТАЦИЯ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) – это группа болезней сердца и кровеносных сосудов, в которую входят гипертония, ишемическая болезнь сердца (ИБС), нарушения мозгового кровообращения, сердечная недостаточность и др. ССЗ являются основной причиной смертности во всем мире – ежегодно от ССЗ умирает больше людей, чем от какой-либо другой болезни.

Аортокоронарное шунтирование (АКШ) улучшает симптоматику и прогноз пациентов с ИБС. Несмотря на свои положительные эффекты, главной проблемой АКШ остаются тромботические и тромбоэмболические осложнения в послеоперационном периоде.

Ведущая роль в профилактике осложнений после АКШ принадлежит антитромбоцитарным препаратам (антиагрегантам), ингибирующим функцию тромбоцитов. Чаще всего в качестве основных препаратов используют ацилсалициловую кислоту (АСК) и клопидогрел. Однако у некоторых пациентов может наблюдаться такой феномен, как резистентность (нечувствительность) к антитромбоцитарным препаратам. Пациенты с резистентностью имеют повышенный риск неблагоприятных кардиоваскулярных событий и могут также иметь высокий риск развития несостоятельности шунтов после АКШ. Недостаточный уровень подавления тромбоцитов на лечении АСК и клопидогрелом, определяемый высокой реактивностью тромбоцитов, является одним из факторов риска возникновения тромботических событий.

Обсуждается много причин возникновения резистентности к антитромбоцитарным препаратам, однако на данный момент эта проблема изучена недостаточно. Важная роль в развитии резистентности принадлежит возможным генетическим факторам, таким как полиморфизмы в генах, кодирующих компоненты тромбоцитарных рецепторов, и некоторых ферментов, опосредующих процессы адгезии и агрегации кровяных пластинок. Исследование генетических полиморфизмов является немаловажным этапом для дальнейшего прогнозирования, коррекции и профилактики клинических проявлений у пациентов с диагнозом ИБС. Однако однозначного мнения о четкой ассоциации полиморфизмов и резистентности к антитромбоцитарным препаратам в настоящий момент нет.

Таким образом, цель работы – провести исследование генетических полиморфизмов резистентности к антитромбоцитарным препаратам у пациентов с ИБС.

Анализ нуклеотидных полиморфизмов проводился с использованием метода ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации, а также детекцией результатов в режиме реального времени. На выборке из 129 человек с диагнозом ИБС было показано, что частота встречаемости минорной аллели в исследуемых генах среди пациентов составила: P2RY12 (rs2046934) –

15,9%, ITGA2 (rs1126643) – 38,8%, ITGB3 (rs5918) – 17,4%, GP1BA (rs6065) – 17,1%, CYP2C19 (rs4244285) – 11,2%.

Ключевые слова: АОРТОКОРОНАРНОЕ ШУНТИРОВАНИЕ, АСПИРИНРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, ИШЕМИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ СЕРДЦА, НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Исследование генетических полиморфизмов резистентности к антитромбоцитарным препаратам у пациентов с ИБС» содержит 54 страницы текстового документа, 7 иллюстраций, 11 таблиц и 65 использованных источников.

АОРТОКОРОНАРНОЕ ШУНТИРОВАНИЕ, АСПИРИНРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, ИШЕМИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ СЕРДЦА, НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.

Цель работы – провести исследование генетических полиморфизмов резистентности к антитромбоцитарным препаратам у пациентов с ИБС.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Провести анализ на наличие полиморфизмов в генах, ассоциированных по литературным данным с возможным проявлением резистентности к антитромбоцитарным препаратам;
2. Сравнить уровень агрегации тромбоцитов в группах с различными вариантами генотипов по изучаемым полиморфизмам в генах тромбоцитарных рецепторов и цитохрома P450;
3. Изучить ассоциацию разных вариантов генотипов по изучаемым полиморфизмам с резистентностью к ацетилсалициловой кислоте (АСК) и клопидогрелу у пациентов с ИБС после КШ;
4. Изучить ассоциацию наличия полиморфизмов с проявлением тромботических событий у пациентов с ИБС.

Актуальность диссертационной работы заключается в том, что в результате исследования генетических полиморфизмов 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 159 человек (129 пациентов и 30 здоровых доноров) на наличие полиморфизмов rs2046934, rs1126643, rs5918, rs6065, rs4244285 в генах P2RY12, ITGA2, ITGB3, GP1BA, CYP2C19, соответственно.

ABSTRACT

The master's thesis on the topic "The research of genetic polymorphisms of resistance to antiplatelet drugs in patients with IHD" contains 54 pages of a text document, 7 illustrations, 11 tables and 65 sources used.

AORTOCORONARY SHUNTING, ASPIRINRESISTANCE, ISCHEMIC HEART DISEASE, NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS, POLYMERASE CHAIN REACTION, CARDIOVASCULAR DISEASES.

The aim of the work is to conduct a study of genetic polymorphisms of resistance to antiplatelet drugs in patients with ischemic heart disease.

Based on the goal, the following tasks were formulated:

1. To analyze for the presence of genetic polymorphisms in genes associated with the literature data with the possible manifestation of resistance to anti-platelet drugs;

2. To compare the level of platelet aggregation in groups with different variants of genotypes for the polymorphisms in the genes of platelet receptors and cytochrome P450;

2. To study the association of different variants of genotypes for the polymorphisms with resistance to acetylsalicylic acid (ASA) and clopidogrel in patients with IHD after aortocoronary shunting;

4. To study the association of polymorphisms with the manifestation of thrombotic events in patients with IHD.

The relevance of the thesis is that as a result of the study of genetic polymorphisms, can be found predictors of resistance to antiplatelet drugs (ASA and clopidogrel), which can determine patients at high risk of resistance to antiplatelet agents. To date, there are no clear associations of specific polymorphisms with the manifestation of resistance to antiplatelet drugs. In this regard, this problem remains extremely relevant for cardiology.

In the work, 159 people (129 patients and 30 healthy donors) were analyzed for the presence of rs2046934, rs1126643, rs5918, rs6065, rs4244285 polymorphisms in the P2RY12, ITGA2, ITGB3, GP1BA, CYP2C19 genes, respectively.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	8
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	10
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Ишемическая болезнь сердца. Роль антитромбоцитарной терапии в профилактике сердечно-сосудистых событий.....	10
1.2 Механизм резистентности к антитромбоцитарным препаратам. Основные причины феномена резистентности.....	14
1.3 Возможные генетические предикторы сердечно-сосудистых осложнений.....	16
1.3.1 Полиморфизм rs5918 гена рецептора фибриногена GP IIIa (ITGB3)...	21
1.3.2 Полиморфизм rs1126643 гена рецептора коллагена GP Ia/IIa (ITGA2).	19
1.3.3 Полиморфизм rs6065 гена рецептора фактора Виллебранда (GPIBA).	19
1.3.4 Полиморфизм rs2046934 гена АДФ-рецептора тромбоцитов P2RY12..	21
1.3.5 Полиморфизм rs4244285 гена цитохрома P450, изофермента CYP2C19*2	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	27
2.1 Объект исследования.....	27
2.2 Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с использованием комплекта реагентов «SNP-экспресс», НПФ «Литех».....	30
2.3 Подготовка образцов крови перед выделением ДНК с использованием реагента «ГЕМОЛИТИК», «АмплиСенс».....	29
2.4 Выделение ДНК из клинического материала с использованием комплекта реагента «ДНК-сорб-В», «АмплиСенс»	30
2.5 Измерение концентрации ДНК с использованием комплекта реагентов Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit и флуориметра Qubit, «Invitrogen».....	31
2.6 Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов «SNP-ЭКСПРЕСС-РВ», НПФ «Литех», с детекцией результата в режиме реального времени на приборе CFX96 (Bio-Rad).....	32

2.7 Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов для амплификации «SNP-ЭКСПРЕСС», НПФ «Литех», с электрофоретической детекцией продуктов амплификации.....	34
2.8 Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза.....	Ошибка! Закладка не определена.
2.9 Статистический анализ.....	37
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ	38
3.1 Клинико-лабораторные особенности пациентов резистентных и чувствительных к АСК и клопидогрелу	38
3.2 Нуклеотидные полиморфизмы как возможная причина резистентности к АСК и клопидогрелу.....	40
3.2.1 Полиморфизмы генов как возможная причина резистентности к АСК у пациентов с ИБС	40
3.2.2 Полиморфизмы генов как возможная причина резистентности к клопидогрелу у пациентов с ИБС на двойной антитромбоцитарной терапии (АСК+клопидогрел).....	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	48
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	49

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности и инвалидизации людей во всем мире. В общей структуре смертности населения Российской Федерации ССЗ составляют 56%, среди которых около 85% связаны с ишемической болезнью сердца (ИБС) и цереброваскулярными заболеваниями [1].

ИБС вызывается сужением просвета коронарных сосудов, что приводит к недостаточному поступлению кислорода к сердечной мышце. Аортокоронарное шунтирование (АКШ) – операция, которая позволяет восстановить кровоток в артериях сердца путём обхода места сужения коронарного сосуда с помощью шунтов (сосудистых протезов). Своевременная операция коронарного шунтирования предотвращает необратимые изменения сердечной мышцы, улучшает сократимость миокарда и повышает качество и продолжительность жизни. Однако главной проблемой АКШ остаются тромботические и тромбоэмболические осложнения в послеоперационном периоде.

В недавних рандомизированных исследованиях был продемонстрирован уровень смертности от инсульта 2,0% [2], инфаркта миокарда 3,3-9,8% [2, 3] через 1 месяц после АКШ, а несостоятельность шунтов спустя год в пределах 10,9-26,4% [4]. В исследовании Gasevic D. и соавт., включавшем 6416 пациентов после острого инфаркта миокарда (ОИМ) и реваскуляризации, среди тех, кому было сделано коронарное шунтирование, на 30 сутки умерло около 4,7% китайцев, 2,2% южноазиатов и 4,1% белокожих [5].

Несостоятельность шунтов в первый год после операции чаще связана с тромбогенными осложнениями. В основе патогенеза развития тромбов ведущую роль играет активация тромбоцитов, при участии которых и развиваются эпизоды атеротромбоза, в том числе и у пациентов, которым было выполнено АКШ. Активация тромбоцитов – ключевой момент в патогенезе сердечно-сосудистых осложнений, определяющий выраженность нарушений кровоснабжения органов и тканей (сердце, головной мозг, периферические сосуды) [6].

Ацилсалициловая кислота (АСК) – один из широко используемых антиагрегантных препаратов, предупреждает развитие повторного инфаркта миокарда, инсульта, внезапной коронарной смерти. Но у ряда больных аспирин является неэффективным. Пациенты с резистентностью к АСК имеют повышенный риск неблагоприятных кардиоваскулярных событий и могут также иметь высокий риск развития несостоятельности шунтов после АКШ [7].

Резистентность к антитромбоцитарным препаратам может быть связана с генетическими факторами – полиморфизмами в генах, кодирующих компоненты тромбоцитарных рецепторов, опосредующих процессы адгезии и агрегации кровяных пластинок. К ним относят полиморфизмы в генах: АДФ-рецептора тромбоцитов P2RY12 (139 С→Т, rs2046934), рецептора к коллагену ITGA2 (807 С→Т, rs1126643), рецептора к фибриногену ITGB3 (176 Т→С,

rs5918), тромбоцитарного рецептора фактора Виллебранда GP1BA (Thr145Met, rs6065) и гене цитохрома P450 CYP2C19*2 (681 G→A, rs4244285). Однако однозначного мнения о четкой ассоциации генетических полиморфизмов и резистентности к антиагрегантам в настоящий момент нет, что связано с отсутствием стандартизации тестов функциональной активности тромбоцитов, с различием применяемых диагностических критериев резистентности к АСК.

Таким образом, цель работы – провести исследование генетических полиморфизмов резистентности к антитромбоцитарным препаратам у пациентов с ИБС.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Провести анализ на наличие полиморфизмов в генах, ассоциированных по литературным данным с возможным проявлением резистентности к антитромбоцитарным препаратам;
2. Сравнить уровень агрегации тромбоцитов в группах с различными вариантами генотипов по изучаемым полиморфизмам в генах тромбоцитарных рецепторов и цитохрома P450;
3. Изучить ассоциацию разных вариантов генотипов по изучаемым полиморфизмам с резистентностью к ацетилсалициловой кислоте (АСК) и клопидогрелу у пациентов с ИБС после КШ;
4. Изучить ассоциацию наличия полиморфизмов с проявлением тромботических событий у пациентов с ИБС.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ишемическая болезнь сердца. Роль антитромбоцитарной терапии в профилактике сердечно-сосудистых событий

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) – одна из ведущих причин смерти в развитых странах. Заболевание характеризуется нарушением кровоснабжения миокарда вследствие поражения коронарных артерий. По данным Госкомстата, в 2014 г. по России смертность от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) составила 53,5%, причем более чем в половине случаев причиной смерти стала ИБС [8]. Заболевание может протекать длительное время без развития осложнений, однако смертность при хронической ИБС сопоставима со смертностью среди пациентов, перенесших острый инфаркт миокарда (ОИМ) [9]. На данный момент в Российской Федерации отмечается рост количества пациентов с данным заболеванием. От 18 до 57% больных ИБС имеют сопутствующее атеросклеротическое поражение других сосудистых бассейнов [10].

Основной причиной развития ишемических заболеваний сердечно-сосудистой системы является атеросклероз. В многочисленных исследованиях утверждается, что развитие атеросклероза сопряжено с образом жизни, наличием некоторых особенностей обмена веществ и заболеваний или патологических состояний, которые в совокупности определяют как факторы риска ИБС. Самыми значимыми факторами риска являются: возраст, курение, сахарный диабет, ожирение, наличие ИБС у близких родственников, низкая физическая активность. Серьезным фактором риска возникновения ССЗ является злоупотребление алкоголем. Вероятность развития заболевания повышается при комбинации двух, трех и более перечисленных факторов риска, особенно при малоподвижном образе жизни [11].

Характерной особенностью сосудистого процесса при атеросклерозе является активация клеток в стенке сосуда, находящихся на его границе, в составе крови. Это касается тромбоцитов и моноцитов. Повышенная способность тромбоцитов взаимодействовать друг с другом и поверхностью других клеток, образовывать межклеточные соединения различного объема является признаком их активизации и указывает на риск тромбообразования [12].

В процессе тромбообразования тромбоцит проходит 4 стадии (рисунок 1):

1. активация;
2. секреция – высвобождение активных биологических веществ (тромбоксанов, аденозиндифосфата (АДФ), серотонина, гликопротеидных (ГП) рецепторов – Ша/Пb);
3. агрегация;
4. адгезия [13].

Эти процессы особенно активно проявляются при дестабилизации коронарного кровотока. В основе тромбообразования лежат механизмы, стимулирующие агрегационную активность тромбоцитов и эритроцитов, ускоренный ток крови в суженном атеросклеротической бляшкой участке сосуда, что способствует повреждению эндотелия и «обнажению» коллагена, одного из главных факторов агрегации и адгезии тромбоцитов. Тромбоциты вступают в контакт с субэндотелиальным слоем, в частности с самим коллагеном, образуют отростки с образованием тромбоцитарных уплотнений и адгезируются на этих участках, образуя тромб. Активация тромбоцитов осуществляется катехоламинами, тромбином, АДФ, серотонином, коллагеном, тромбоксаном 2 – продуктом метаболизма арахидоновой кислоты. В результате активации тромбоцитов происходят высвобождение из последних биологически активных веществ (АДФ, серотонина) и дестабилизации мембраны тромбоцита с образованием ГП рецепторов IIIa/IIIb под действием АДФ и тромбоксана 2. Агрегация тромбоцитов происходит при активации и взаимодействии ГП рецепторов IIIa/IIIb через образование фибриновых мостиков между тромбоцитами. Адгезия тромбоцитарных конгломератов к поврежденной стенке сосудов контролируется фактором Виллебранда (ФВ).

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

Ацетилсалициловая кислота (АСК) или аспирин – наиболее доступный и широко используемый антитромбоцитарный препарат, который применяется для первичной и вторичной профилактики тромбозов [14]. Антиагрегантный эффект АСК достигается за счет постоянного ингибирования фермента циклооксигеназы (ЦОГ) – находящегося в тромбоцитах фермента, участвующего в синтезе простагландинов и тромбоксанов. ЦОГ имеет 2 различные изоформы: ЦОГ-1, конститутивная изоформа, присутствует в большинстве клеток, ЦОГ-2 экспрессируется в ответ на воспалительные раздражители. АСК необратимо ингибирует ЦОГ-1, блокируя превращение арахидоновой кислоты в тромбоксан A_2 (рисунок 1); таким образом, он блокирует основной фактор активации тромбоцитов [15]. В результате нарушается трансформация арахидоновой кислоты в простагландин H_2 , из которого в свою очередь не образуется тромбоксан A_2 . При прекращении образования тромбоксана A_2 , мощного индуктора агрегации тромбоцитов, снижается способность тромбоцитов к агрегации. С другой стороны, АСК может подавлять синтез простагландина в эндотелии, который имеет сосудорасширяющие свойства и угнетает адгезию и агрегацию тромбоцитов. Тромбоксан A_2 и простагландин имеют противоположные влияния на агрегацию, но антитромботический эффект ингибирования тромбоксана доминирует над влиянием подавления простагландина [16].

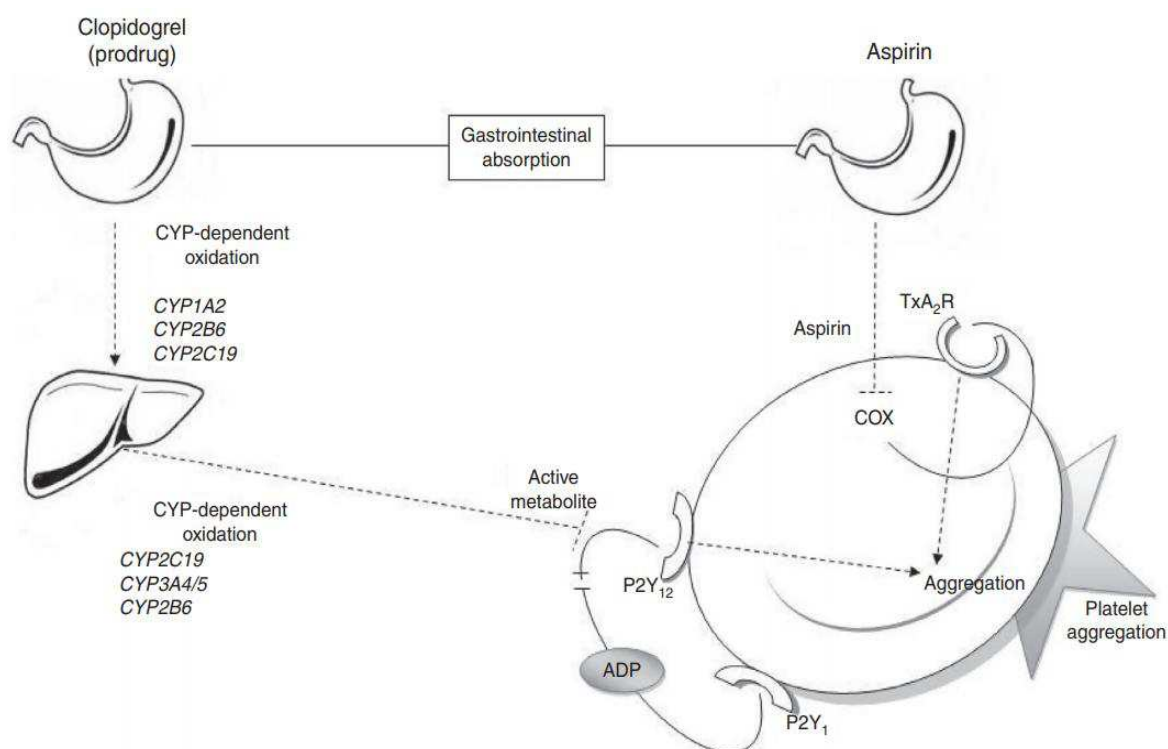


Рисунок 1 – Связь между антитромбоцитарными препаратами и агрегацией тромбоцитов [14]

Согласно современным представлениям, все больные ИБС при отсутствии противопоказаний должны принимать препараты АСК в дозе 75–150 мг/сут. независимо от наличия симптомов [17]. По результатам метаанализа различных рандомизированных исследований, включивших в себя около 135 тыс. пациентов, было показано, что при назначении АСК достигалось 25% снижение риска развития сердечно-сосудистых осложнений. Также было доказано, что применение высоких доз АСК (500–1500 мг) не имеет преимуществ со стороны терапевтической эффективности перед средними (160–325 мг) и низкими (75–150 мг) дозами. В исследовании US-American Physicians Health Study прием АСК у пациентов со стабильной стенокардией привел к снижению количества первичных инфарктов миокарда в среднем на 87% ($p < 0,001$), тогда как среди больных, не страдавших стабильной стенокардией, при употреблении данного препарата оно составило 44% [18]. Что касается применения АСК у больных ИБС, подвергшихся чрескожному коронарному вмешательству (ЧКВ), то использование данного препарата актуально во всех случаях.

Двойная антитромбоцитарная терапия (ДАТ) аспирином и ингибиторами рецепторов P2Y₁₂ – стандарт профилактики атеротромботических событий у пациентов с острым коронарным синдромом и после ЧКВ согласно Европейским и Американским рекомендациям. В рамках комбинированной антитромбоцитарной терапии наиболее изучаемым из вариантов является комбинация АСК с клопидогрелом. Фармакологические преимущества ДАТ заключаются в ингибировании сразу двух важнейших физиологических путей

индукции агрегации тромбоцитов: тромбоксан-А2-зависимого и аденозиндифосфатзависимого [19].

Клопидогрел – пролекарство, относится к группе тиенопиридинов и обладает отличным от АСК механизмом антитромбоцитарного действия. Биотрансформация клопидогрела в активный тиольный метаболит проходит в печени под действием системы микросомальных ферментов цитохрома Р450 с участием ее изоформ: СУР1А2, СУР2В6, СУР2С9, СУР2С19, СУР3А4, СУР3А5 [20]. При этом главную роль в метаболизме клопидогрела занимает изоформа СУР2С19, которая участвует в трансформации препарата как в его промежуточный (2-оксиклопидогрель), так и в активный (тиольное производное) метаболит.

Клопидогрел ингибирует связывание аденозиндифосфата (АДФ) с P2Y₁₂ рецепторами тромбоцитов, что препятствует стимулирующему действию на них АДФ и последующей активации гликопротеиновых рецепторов GP IIb/IIIa (рисунок 2). В результате чего необратимо изменяются АДФ-рецепторы тромбоцита, при этом тромбоциты остаются нефункциональными на протяжении всей своей жизни, а восстановление нормальной функции происходит по мере обновления тромбоцитов.

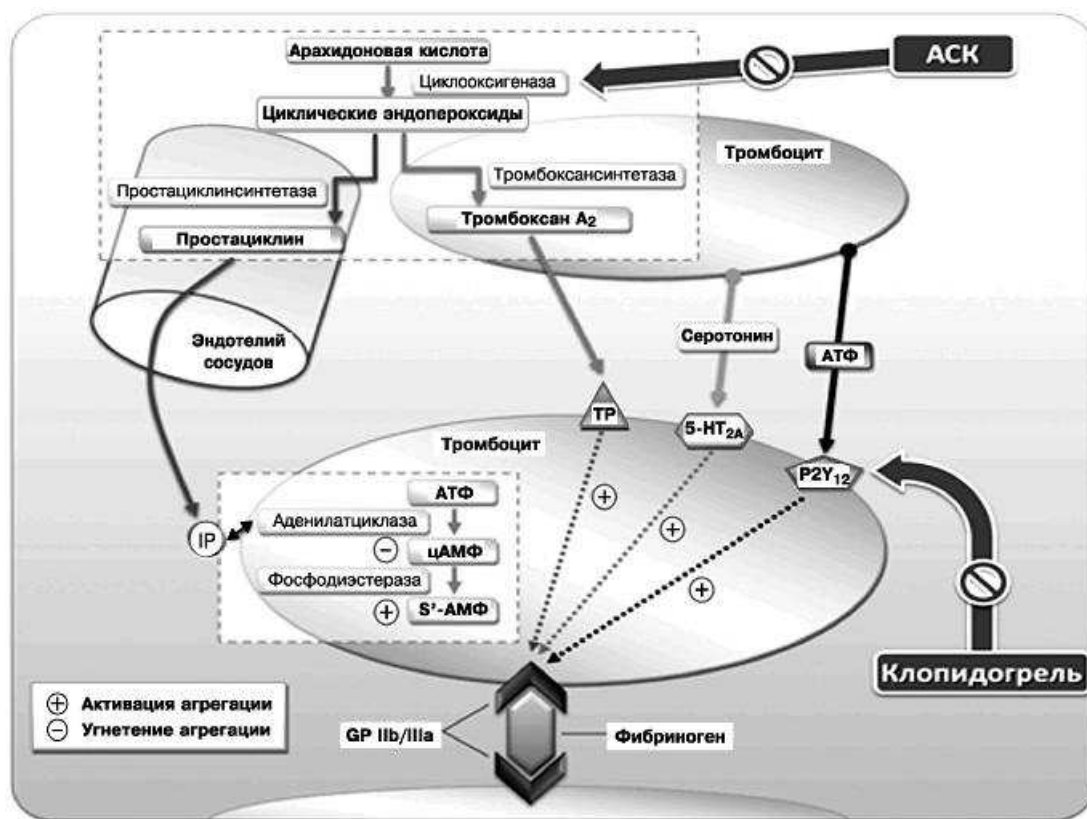


Рисунок 2 – Механизмы антиагрегантного действия АСК и клопидогрела [21]

Клопидогрел применяют в сочетании с малыми или средними дозами АСК, так как отмечается синергизм действия этой комбинации в подавлении агрегации тромбоцитов посредством подавления цикла арахидоновой кислоты и АДФ-индуцированной активации тромбоцитов, а также в уменьшении

коллаген- и тромбининдуцированной агрегации. Двойная антитромбоцитарная терапия (АСК + клопидогрел) позволила в 1990-х годах во многом справиться с острыми осложнениями ангиопластики и коронарного стентирования, снизив частоту развития тромбоза стента до уровня менее 1% [22].

Как описано выше, клопидогрел блокирует рецепторы P2RY12 и препятствует зависимой от АДФ активации тромбоцитов, а АСК ингибирует циклооксигеназу-1 тромбоцитов и эндотелиальных клеток, что приводит к подавлению образования мощного проагреганта тромбоксана А2. Разные пути влияния данных препаратов на активность тромбоцитов обеспечивают взаимное усиление их действия, эффективность комбинации показана в клинических исследованиях. Тем не менее, у отдельных пациентов даже на фоне ДАТ сохраняется высокая агрегационная активность тромбоцитов, что обуславливает риск развития тромботических осложнений после эндоваскулярного вмешательства [23].

1.2 Механизм резистентности к антитромбоцитарным препаратам. Основные причины феномена резистентности

Антитромбоцитарный эффект лекарственных препаратов различен для всех людей. Существует вариабельность, как среди больных, так и среди здоровых добровольцев при лабораторной оценке агрегации тромбоцитов на фоне терапии АСК и клопидогрелом. У некоторых людей блокирующие свойства лекарственных средств в отношении агрегации тромбоцитов могут быть минимальными либо со временем утрачиваются [24].

По разным источникам резистентность к АСК колеблется в пределах от 5% до 45% [25], к клопидогрелу – от 20% до 45% [26] в зависимости от применяемого метода и категории больных, а резистентность к обоим препаратам отмечается в 6-8% случаях [27]. Подобная вариабельность может объясняться отсутствием стандартизации методов диагностики, а также наличием у исследуемых сопутствующей патологии, способной повлиять на состояние тромбоцитарных рецепторов. На сегодняшний день отсутствуют единые критерии определения резистентности, так же как нет единого метода ее выявления, что затрудняет поиск путей преодоления этого состояния.

К основным причинам резистентности к антитромбоцитарным препаратам относят клинические, клеточные и генетические факторы. К первой группе относятся низкая приверженность пациента лечению, назначение неадекватных доз, низкая адсорбция в тонком кишечнике, одновременный прием с нестероидными противовоспалительными препаратами [28]. Клеточные факторы, влияющие на эффективность АСК, включают недостаточное подавление функции ЦОГ-1 тромбоцитов, а также повышенную экспрессию м-РНК ЦОГ-2 тромбоцитов и эндотелиальных клеток. Резолвины, метаболиты омега-3-полиненасыщенных жирных кислот, образующиеся в результате ацетилирования ЦОГ-2 под действием АСК, оказывают противовоспалительное действие. При дефиците этих веществ терапевтический эффект АСК может снижаться. Также к этой группе относятся:

эритроцитиндуцированная активация тромбоцитов, усиленное поступление в кровотоки не подвергнутых воздействию аспирина тромбоцитов, возрастающая чувствительность тромбоцитов к аденозиндифосфату (АДФ) и коллагену, большой размер тромбоцитов, увеличение количества тромбоцитов в крови, повышение уровня фактора Виллебранда в плазме, увеличение концентрации тромбина в плазме после аортокоронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения. Клеточные факторы, объясняющие развитие резистентности к клопидогрелу, включают количество рецепторов P2Y₁₂ на поверхности тромбоцитов, уровень высвобождающегося АДФ, а также активацию тромбоцитов посредством альтернативных путей.

Резистентность к АСК может быть связана с генетическими факторами – полиморфизмами генов рецепторов тромбоцитов: гликопротеина (GP) IIb/IIIa, GP Ia, к коллагену, к тромбоксану (Tx), к фактору Виллебранда, нуклеотидные полиморфизмы ферментов: ЦОГ-1, ЦОГ-2, TX A₂-синтазы [29].

Связь аспиринарезистентности с наличием полиморфизмов гена, кодирующего ЦОГ-1, место приложения действия аспирина, вполне логично объясняется. Однако результаты, полученные рядом исследователей, не дают полную картину для подтверждения этой гипотезы. В недавних исследованиях показано, что резистентность к АСК у ряда людей может быть независимой как от полиморфизма гена ЦОГ-1 так и ЦОГ-2 [30].

Полиморфизмы рецепторов тромбоцитов, отвечающих за связывание с метаболитом клопидогрела, также может лежать в основе резистентности. Определенное значение в повышении тромботической активности и, возможно, резистентности к АСК могут иметь нуклеотидные полиморфизмы гена P2Y₁₂. Так, H2 гаплотип рецепторов P2Y₁₂ ассоциируется с более выраженным ингибированием ц-АМФ под действием АДФ, что потенциально ведет к повышению риска тромботических осложнений.

Один из эффективных подходов к изучению роли генетических механизмов развития ССЗ связан с выделением группы генов с потенциально наибольшим вкладом в патогенез заболевания – это, так называемые, гены-кандидаты. Одним из основных механизмов патогенеза ИБС является нарушение функциональных свойств эндотелия, что в дальнейшем приводит к изменению тонуса сосудистой стенки и дальнейшему развитию и прогрессированию патологического процесса. В связи с этим большой интерес представляют гены, продукты которых участвуют в регуляции сосудистого тонуса. Поиск и изучение генетических маркеров, определяющих индивидуальную чувствительность пациентов к лекарственным препаратам, в перспективе позволит выделить группы наибольшего риска, прогнозировать вероятность тромботических осложнений и своевременно корректировать терапию у больных ИБС.

1.3 Возможные генетические предикторы сердечно-сосудистых осложнений

1.3.1 Полиморфизм rs5918 гена рецептора фибриногена GP IIIa (ITGB3)

Важнейшая особенность при активации тромбоцитов – модификация комплекса рецепторов мембранных гликопротеидов (GP) IIb/IIIa. В результате конформационных изменений комплекс приобретает способность к связыванию фибриногена, тем самым образуя мостики между активированными тромбоцитами. Вследствие этого происходит агрегация кровяных пластинок, которая заканчивается формированием в зоне повреждения сосудистой стенки тромбоцитарного тромба.

GP IIb/IIIa является основным тромбоцитарным рецептором, молекулярные дефекты которого могут приводить к гиперагрегации тромбоцитов. Комплекс экспрессируется тромбоцитами, основным лигандом его служит фибриноген. Состоит комплекс из двух субъединиц (альфа- и бета-цепи), нековалентно связанных между собой (рисунок 3). Субъединицы IIb и IIIa кодируются разными генами, расположенными близко друг к другу на 17-й хромосоме. Ген ITGB3 (GPIIIa), расположенный на длинном q-плече 17-й хромосомы (17q21.32), кодирует белковую компоненту рецептора фибриногена, бета-субъединицу комплекса рецептора адгезивного белка тромбоцитарной мембраны GP IIb/IIIa. Данный рецептор обеспечивает взаимодействие тромбоцитов с фибриногеном плазмы крови, в результате чего происходит агрегация тромбоцитов и образование тромба [31].

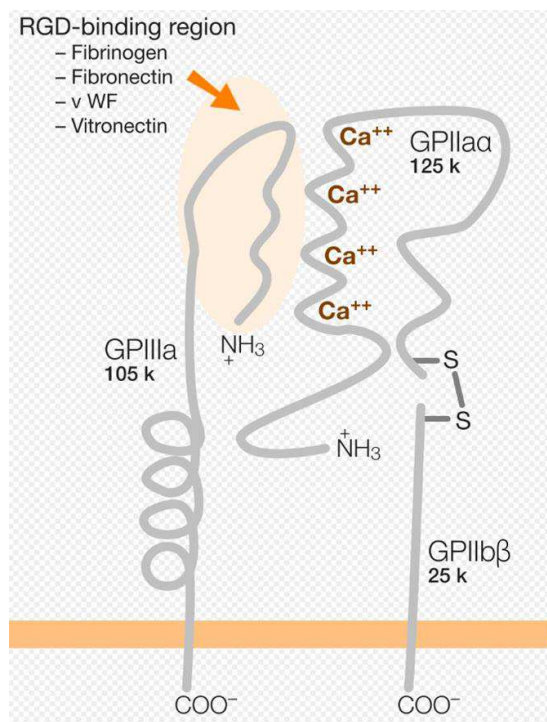


Рисунок 3 – Структура тромбоцитарного рецептора фибриногена [32]

Ген ITGB3 состоит из 14-ти экзонов. В 1989 году была описана точечная мутация T1565C во втором экзоне гена ITGB3, приводящая к замене лейцина (Leu) на пролин (Pro) в 33-м положении белка GPIIb (rs5918), что влечет за собой конформационное изменение N-терминальной дисульфидной петли GPIIb, относящейся к сайту связывания фибриногена.

У носителей варианта Pro-33 отмечается повышенная АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов в экспериментах *in vitro*, при этом наблюдается усиление сигнальных функций комплекса IIb/IIIa и перестройки цитоскелета тромбоцитов. Тромбоциты, несущие ITGB3 Pro-33, имеют более низкий порог активации (т.е. более склонны к агрегации).

Аллель C обнаруживается у 14% населения европейских стран, а распределение трех вариантов генотипов в общей популяции по разным источникам следующее TT - 74%, CT - 24% и CC - 2%.

Отмечается, что при варианте 1565C гена ITGB3 риск тромбозов повышен в 2,7 раз [33]. По некоторым источникам частота распространения в европейской популяции составляет 85% и 15% для вариантов Leu-33 и Pro-33 соответственно. В популяции Северо-Западного региона России частота Leu-33 и Pro-33 составила 88% и 12% соответственно. При этом вариант Pro-33 ассоциировался с высокими показателями функциональной активности тромбоцитов и встречался чаще у пациентов, перенесших инфаркт миокарда в молодом возрасте. Относительный риск развития инфаркта миокарда возрастает у носителей данной аминокислотной замены вдвое. Также имеются данные, что при данном варианте гена повышается образование тромбина и ослабляется действие аспирина в качестве дезагреганта. Так, Undas и соавт. [34] при анализе здоровых студентов мужского пола, в возрасте от 21 до 24 лет, используя контролируемый метод для получения микрососудистого повреждения, обнаружили, что вариант Pro-33 был связан с усилением генерации тромбина и нарушением антитромботического действия аспирина в месте микрососудистого повреждения.

В литературе также имеются исследования, описывающие взаимосвязь полиморфизма гена тромбоцитарных рецепторов rs5918 с возникновением больших сердечно-сосудистых событий в течение года после ЧКВ. 200 пациентов с симптомной ИБС были обследованы на наличие 1565C аллели и затем наблюдались в течение года на фоне двойной антитромбоцитарной терапии АСК и клопидогрелом. Нормальный (TT), гетерозиготный (CT), гомозиготный по минорной аллели (CC) варианты встречались с частотой 72%, 27,5% и 0,5%, соответственно. Наличие 1565C аллели не сопровождалось возникновением больших неблагоприятных событий в течение года после ЧКВ [35].

Отсутствие однозначности в полученных результатах исследований не позволяет сделать вывод о том, что носительство минорной аллели rs5918 является определяющим в чувствительности тромбоцитов к АСК, но все же не стоит исключать его из возможных генетических предикторов сердечно-сосудистых осложнений.

1.3.2 Полиморфизм rs1126643 гена рецептора коллагена GP Ia/IIa (ITGA2)

Мембранный гликопротеин тромбоцитов Ia/IIa играет важную роль в функции тромбоцитов как первичный рецептор для коллагена. Комплекс GPIa/IIa экспрессируется эпителиальными клетками и несет ключевую функцию при адгезии тромбоцитов к коллагену. Основным лигандом ITGA2 является коллаген. Адгезия тромбоцитов влечет за собой конформационные изменения тромбоцитов, что является причиной трансформации поверхностных рецепторов в активное состояние. Интегрин $\alpha 2$ (GPIa) является $\alpha 2$ – цепью с массой 165 кД, а GPIIa – $\beta 1$ – цепью с массой 145 кД. Плотность этого рецептора на внешней мембране тромбоцитов по сравнению с другими низка и составляет от 800 до 3000 молекул на тромбоцит. Однако даже в норме количество гетеродимера на мембране тромбоцитов может сильно варьировать, что коррелирует со способностью тромбоцитов связываться с коллагеном.

Ген ITGA2 расположен на 5-й хромосоме (5q23-31) и состоит из 30-ти экзонов. Ген кодирует альфа-субъединицу (GPIa) трансмембранного рецептора коллагена и родственных ему белков. Кодированный белок образует гетеродимер с бета-субъединицей ($\alpha 2/\beta 1$) и опосредует адгезию тромбоцитов и других типов клеток с внеклеточным матриксом.

Полиморфизм ITGA2 C807T (rs1126643) выявлен в промоторной (регуляторной) области гена ITGA2 в 7 экзоне. Тип наследования полиморфизма: аутосомно-доминантный. Сущность полиморфизма заключается в том, что происходит замена нуклеотида С на Т в 807 позиции гена. Эта замена является синонимичной и не приводит к изменению аминокислотной последовательности в белке (Phe224Phe). Молчащая нуклеотидная замена С807Т в седьмом экзоне гена ITGA2 оказывает существенное влияние на число копий комплекса GPIa/IIa на мембране тромбоцита, но не вызывает изменений структуры молекулы интегрин [36]. Несмотря на то, что такая нуклеотидная замена не приводит к изменению последовательности в белке, имеются значительные корреляции между данным полиморфизмом и уровнем экспрессии рецептора на тромбоцитах. Установлено, что вариант 807С связан с низким уровнем рецептора $\alpha 2\beta 1$, а вариант 807Т ассоциирован с более высоким уровнем интегрин. В настоящее время молекулярная основа регуляции уровня рецептора до конца не ясна. Возможно, что аллель 807Т находится в неравновесном сцеплении с другими функциональными полиморфизмами в гене ITGA2.

Отмечается, что при варианте 807Т увеличивается плотность рецептора на поверхности тромбоцита, а это в свою очередь приводит к повышению агрегационной активности тромбоцитов и появлению склонности к тромбообразованию. Полиморфизмы семейства генов интегринов, в частности, интегрин альфа-2 (ITGA2) и интегрин бета-3 (ITGB3), связаны с тромбозами, артериальными и атеросклеротическими заболеваниями. Также полиморфизм rs1126643 связан с инфарктом миокарда, инфарктом головного мозга, патологиями беременности. Было обнаружено, что данный полиморфизм

коррелирует с инсультом у молодых женщин, и, таким образом, Т-аллель может быть ассоциирована с предрасположенностью молодых женщин к мозговому инсульту. Точно так же, в ходе исследования на полиморфизм С807Т ITGA2 у молодых близнецов обнаружили, что 807Т аллель чаще встречается у близнецов с инсультом, чем у пациентов без инсульта. Тем не менее, в некоторых исследованиях не было обнаружено корреляции между полиморфизмом ITGA2 С807Т и частотой развития ишемического инсульта [37]. Также отмечается, что полиморфизм гена в значительной степени связан с увеличением риска рака простаты (OR = 1,52; P = 0,0088) [38].

На данный момент определение полиморфизма гена интегрин альфа-2 (ITGA2) относится к генетическому лабораторному анализу, который назначается для выявления повышенного риска развития тромбообразования. Получение данных обследования генотип СС свидетельствует о нормальной адгезии тромбоцитов, СТ – об усилении процессов образования первичного тромба, ТТ – указывает на чрезмерную способность к адгезии кровяных пластинок [39]. Показано, что носительство минорной Т аллели увеличивает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (OR=3), а так же риск ишемического инсульта (OR=1,5) [40].

Генотип 807Т ассоциирован с более высокой плотностью рецепторов на поверхности тромбоцитов, в то время, как гетерозиготные пациенты имеют промежуточные значения количества рецепторов. По разным источникам у населения европейских стран аллель Т обнаруживается в среднем у 32% в популяции. Распределение трех вариантов генотипов в общей популяции: СС - 50%, СТ - 42% и ТТ - 8%.

Стоит отметить, что носительство Т аллели гена тромбоцитарных рецепторов GPIa С807Т имеет важное влияние на резистентность к АСК и может быть маркером генетической предрасположенности резистентности к аспирину [41]. Было проанализировано 200 пациентов китайского происхождения с высоким риском атеросклероза, принимавших аспирин (100 мг/сут) в течение 7 дней, метод оценки функции тромбоцитов – агрегатометрия, индуцированная АДФ и арахидоновой кислотой (АК). Ассоциацию полиморфизма С807Т и ишемического инсульта у азиатов описали Wu G. и соавт. в метаанализе 15 исследований 2242 пациентов и 2408 человек из контрольной группы, но со слов авторов, данная ассоциация не обнаружена в кавказской популяции [42].

1.3.3 Полиморфизм rs6065 гена рецептора фактора Виллебранда (GPIbA)

Гликопротеин Ib – рецептор поверхности мембраны тромбоцитов, массой 143 кДа, является гетеродимером, включающим в себя альфа и бета цепи, которые связаны дисульфидными связями. GPIb играет важную роль в агрегации и клеточной адгезии тромбоцитов и выполняет свою функцию в составе комплекса, включающего 4 полипептида: GPIb α , GPIb, GPIX и GPV. Комплекс является гептамером, состоящим из одной молекулы GPV и

нековалентно ассоциированными с ней двумя молекулами GPIb и двумя молекулами GPIIb/IIIa (рисунк 4). Основной характерной чертой всех субъединиц данного комплекса является наличие лейцин-богатых повторов.

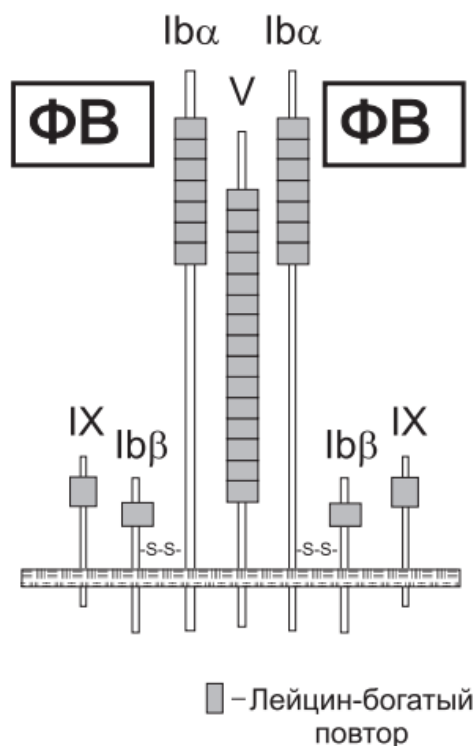


Рисунок 4 – Схема гликопротеинового комплекса GPIb/IX/V [13].

Комплекс GPIb/IX/V является основным тромбоцитарным рецептором для фактора Виллебранда (ФВ), а его плотность составляет около 25 тысяч молекул на тромбоцит. Данный рецептор обеспечивает прикрепление тромбоцитов к субэндотелию за счет взаимодействия ФВ с N-концевым доменом (1-282) GPIb α .

Фактор Виллебранда – гликопротеин плазмы крови, который выполняет две основные функции. С одной стороны он обеспечивает прикрепление кровяных пластинок к поврежденным местам кровеносных сосудов. Специфические рецепторы к фактору Виллебранда выявлены как в мембране кровяных пластинок, так и в субэндотелии. С другой стороны фактор участвует в связывании и стабилизации VIII фактора *in vivo* и *in vitro* (защита VIII фактора от инактивации протеином - С и Ха-фактором) [43]. Ген рецептора фактора Виллебранда GPIbA относится к семейству гликопротеиновых рецепторов, расположен на коротком плече 17 хромосомы (17p13.2), состоит из 2-х экзонов. Ген GPIbA кодирует альфа-субъединицу тромбоцитарного рецептора для фактора Виллебранда (комплекса GP Ib-IX-V). На сегодняшний день описаны полиморфные варианты гена в двух локусах, имеющие разные аминокислотные последовательности в «тяжелой» цепи комплекса (GPIb α). К полиморфизмам данного гена относятся следующие варианты: -5T >C (rs2243093), Thr145Met (rs6065).

Полиморфизм GP1BA -5T >C (rs 2243093) проявляется однонуклеотидной заменой тимина (Т) на цитозин (С) в нетранслируемой области гена GP1BA, в результате чего происходит аминокислотная замена Val28Ala. Данный вариант приводит к нарушению регуляторной последовательности, что оказывает влияние на эффективность трансляции. Наличие аллели С увеличивает количество комплекса GP1b, обнаруживаемое на мембранах тромбоцитов. Таким образом, аллель С, увеличивая экспрессию GP1b на поверхности тромбоцита, повышает риск тромбообразования в артериальном русле. Распределение генотипов СС, СТ и ТТ в общей популяции по разным источникам составляет в среднем 0-9%, 17-41% и 54-79% соответственно [44].

При полиморфизме гена GP1BA (rs6065) происходит замена цитозина (С) на тимин (Т) в 482 позиции гена. При этом происходит замена Thr (треонина) на Met (метионин) в позиции 145 в белке GP1b α . Замена С482Т локализована в области связывания белкового комплекса GP1b-IX-V с лигандами и может влиять на взаимодействие этого рецептора с фактором Виллебранда, что может предрасполагать к тромбообразованию. Распределение аллелей по европейской популяции: С - 91,5%, Т - 8,5% (The genome Aggregation Database (gnomAD)).

Указанный полиморфизм часто наблюдается совместно с различным числом tandemных повторов гена GP1BA, определяющим длину активной «ножки» субъединицы 1b. Большая длина ножки обеспечивает более эффективное связывание с лигандом и закрепление тромбоцита на поврежденной эндотелиальной поверхности. Данный полиморфизм предполагает функциональную перестройку и более высокоактивное состояние рецепторного белка и у больных с тромботическими осложнениями наблюдается чаще, чем у здоровых лиц [45].

1.3.4 Полиморфизм rs2046934 гена АДФ-рецептора тромбоцитов P2RY12

Аденозиндифосфат (АДФ) – один из важнейших медиаторов гемостаза. АДФ, высвобожденный из поврежденных сосудов и эритроцитов, индуцирует агрегацию тромбоцитов посредством связывания с пуриnergическими рецепторами на поверхности тромбоцитов. Это способствует активации интегринa GP1Ib-IIIa и последующего связывания фибриногена [46].

АДФ-рецептор, участвующий в агрегации, называемый P2RY12, связывается с G-белком и влияет на ингибирование аденилатциклазы, что предотвращает накопление цАМФ. Таким образом, P2RY12 играет ключевую роль в агрегации тромбоцитов, которая происходит при воздействии АДФ.

Данный тип рецепторов ассоциирован с G-белком и семь раз перешнуровывает мембрану тромбоцита. Тромбоциты человека имеют на своей поверхности два вида рецепторов АДФ: P2RY1 и P2RY12. Gq-связанный P2RY1 рецептор отвечает за переходное увеличение цитоплазматического Ca²⁺, изменение формы тромбоцитов, тогда как Gi-связанный P2RY12 рецептор опосредует ингибирование аденилатциклазы и усиливает агрегацию тромбоцитов (рисунок 5).

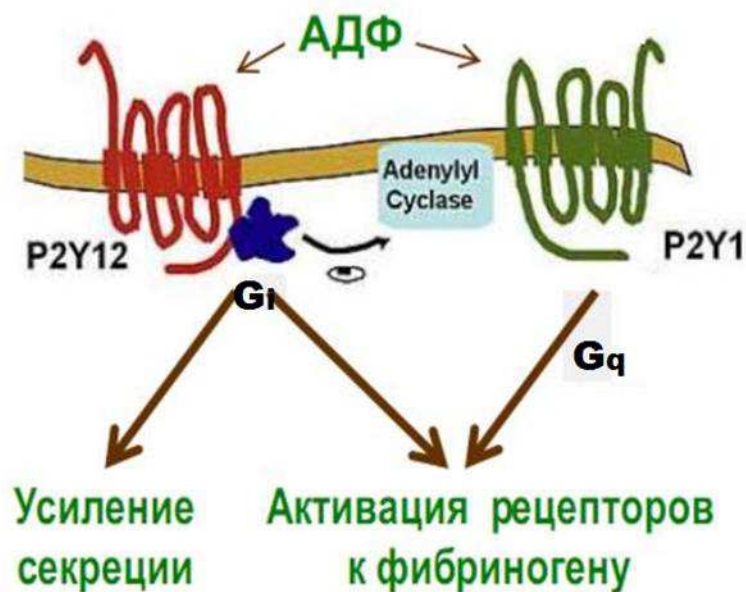


Рисунок 5 – АДФ-рецепторы тромбоцитов P2RY12и P2RY1

Рецепторы P2RY12 играют важную роль в активации тромбоцитов, (включая агрегацию, секрецию и высвобождение из тромбоцитов факторов коагуляции, конформационные изменения мембраны тромбоцитов). Ингибирование P2RY12-рецепторов тромбоцитов обеспечивает подавление перечисленных эффектов, уменьшает прокоагулянтный и провоспалительный потенциал тромбоцитов.

Ген, кодирующий рецептор P2RY12, локализован на хромосоме 3 (3q21-q25), состоит из трех экзонов и двух интронов. Экспрессируется в тромбоцитах человека. Полиморфизм P2RY12-рецепторов сопряжен с интронной частью гена и не связан с дефектом кодирующей последовательности.

Вариант дикого типа гаплотипа назван H1, а измененного гаплотипа назван H2. При анализе кодирующей области были обнаружены две нуклеотидные замены в 18-м и 36-м положении от стартового кодона синтеза белка ATG: C18T и G36T. Причем замена G36T находится в сцеплении с тремя полиморфизмами в интроне и образует гаплотип H1/H2. Эти однонуклеотидные замены не изменяют аминокислотной последовательности белка. Тем не менее, они ассоциированы с повышением (G36T) или понижением (C18T) функциональной активности тромбоцитов.

Получены данные о наличии обратного сцепления – аллели 18T соответствует аллель 36G и, наоборот, аллели 18C соответствует аллель 36T. Наличие гаплотипа T18G36 ассоциировано с уменьшением риска развития инфаркта миокарда вдвое. Кроме того, отмечалось уменьшение скорости АДФ – индуцированной агрегации тромбоцитов у носителей генотипов 18СТ и 18ТТ по сравнению с генотипом 18СС. H2 гаплотип гена P2Y12 ассоциирован с повышенной АДФ – агрегацией тромбоцитов и связан с повышенным риском атеротромбоза, развития атеросклероза и сниженным ответом на действие антиагрегантов.

Существуют исследования, в которых доказана роль взаимосвязи данного полиморфизма с развитием острых тромботических нарушений в связи с ослабленным ответом на антитромбоцитарную терапию, выявлена роль в развитии периферических артериальных тромбозов, а также инфаркта миокарда и острого коронарного синдрома.

В исследовании Staritz P. и соавт. сообщается, что носители минорной аллели в гомозиготном состоянии гена АДФ-рецепторов P2RY12 чаще имели резистентность к клопидогрелу (ОШ 5,42, 95% ДИ 1,82-16,11) [47]. Также в работах Liu, R. и соавт. [48], Yang, H. и соавт. [49] были найдены ассоциации полиморфизмов гена P2RY12 с резистентностью к клопидогрелу у китайских пациентов с ишемическим инсультом. По мнению авторов, полиморфизмы в анализируемом гене могут быть связаны с риском развития ИБС и эффективностью лечения клопидогрелом при ИБС. Schettert I. T. и соавт. в крупном исследовании MASS II (540 пациентов) за 3 года наблюдения не нашли связи гаплотипов H1/H1 и H1/H2 с повышением риска сердечно-сосудистых событий. Частота встречаемости гаплотипов H1H1, H1H2 и H2H2 по разным источникам составляла соответственно 75,9%, 22% и 2,1% среди европейского населения [50].

1.3.5 Полиморфизм rs4244285 гена цитохрома P450, изофермента CYP2C19*2

Цитохром P450 (цитохром P450-зависимая монооксигеназа, CYP) представляет собой протогем, содержащий апопротеин и гемовую группу. В состав последней входит гем типа b, присоединенный к апопротеину тиолятной связью при участии остатка цистеина. Железо в протогеме имеет координационные связи с четырьмя атомами азота четырех пиррольных колец [51]. Его название указывает на то, что он окрашен и что максимум поглощения комплекса с окисью углерода лежит в области 450 нм, что и определило его название.

Цитохром P450 имеет множество изоформ – изоферментов. По классификации Nebert (1987) их принято разделять на семейства и подсемейства. Семейства цитохромов P450 обозначаются римскими цифрами (CYP1, CYP2, CYP3), подсемейства – римскими цифрами и латинской буквой (A, B, C, D, E) [52].

На сегодняшний день известно около 250 различных видов цитохрома P450, из них примерно 50 – в организме человека и только шесть – CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 – участвуют в метаболизме лекарственных препаратов.

К примеру, после перорального приема клопидогрел быстро всасывается. В гепатоцитах он превращается в активный метаболит под влиянием изоферментов цитохрома P450, основным из которых в этом процессе и является CYP2C19. Образовавшийся активный метаболит клопидогрела попадает в системный кровоток и блокирует АДФ-рецепторы тромбоцитов

(P2RY12), вызывая антиагрегантный эффект и профилактику тромботических осложнений [53].

Ген CYP2C19, кодирующий структуру соответствующего фермента CYP2C19, локализуется на хромосоме 10 (10q24.1 – q24.3) и кодирует 490 аминокислот. Несколько полиморфизмов этого гена могут быть связаны со снижением активности фермента. Основная “вредная” аллель, CYP2C19*2, является результатом замены гуанина (G) в аденин (A) в положении 681 в экзоне 5 (rs4244285), что приводит к образованию aberrантного сайта сплайсинга, представляет собой наиболее частый дефект CYP2C19 во всех популяциях [54]. CYP2C19*3 (636G>A) считается наиболее важной аллелью, в которой точечная мутация в экзоне 4 приводит к преждевременному стоп-кодону и, следовательно, к нефункциональному белку [55]. CYP2C19*2 и CYP2C19*3 являются наиболее распространенными аллелями, кодирующими ферменты с пониженной активностью.

Таким образом, отмечается, что люди, гомозиготные по CYP2C19*2 и CYP2C19*3 аллелям считаются медленными метаболиторами, в то время как пациенты с CYP2C19*1 аллелью классифицируются как быстрые метаболиторы. Недавно был открыт новый вариант CYP2C19*17 аллелей, который связан с повышенной активностью фермента и называется сверхбыстродействующим метаболитором [56]. Сообщалось, что аллель CYP2C19*17 связана с высокой активностью CYP2C19 и идентифицирована у 18–28% в европейской популяции, у 17–18% африканцев и у 0,3–4% азиатской популяции. CYP2C19*17 представляет собой -806 C> T однонуклеотидный полиморфизм, который вызывает специфическое связывание ядерного белка с 5'-фланкирующей областью. Это связывание приводит к увеличению транскрипции генов и высокой активности ферментов.

Распространенность фенотипа CYP2C19 со слабым метаболизмом составляет 2-5% среди кавказцев и африканцев и около 15% у азиатов. Было предложено, что аллели CYP2C19*2 и *3 объясняют от 50% до 90% фенотипа со слабым метаболизмом. Частоты аллелей CYP2C19 среди населения Ирана составляли 21,4%, 1,7% и 27,1% для аллелей CYP2C19*2, CYP2C19*3 и CYP2C19*17 соответственно [57].

Как описывалось выше, в образование активного метаболита клопидогрела, ингибирующего связывание АДФ с рецепторами тромбоцитов P2RY12 и тем самым угнетающего агрегацию тромбоцитов, вовлечен белок CYP2C19. Замена G681A в гене CYP2C19 (rs4244285) определяет изменение рамки считывания мРНК и синтез белка с низкой метаболической активностью, что приводит к более слабому антиагрегантному эффекту клопидогрела, и более высокому риску сердечно-сосудистых осложнений, таких как тромбоз стентов и острые коронарные синдромы.

Имеется множество исследований, посвященных роли цитохрома P450 в метаболизме клопидогрела при его назначении больным при инфаркте миокарда после имплантации коронарного стента [58]. Клопидогрел является пролекарством, который должен быть преобразован в активный метаболит. В генах, кодирующих изоформы CYP, которые участвуют в активировании

клопидогрела, обнаружено несколько полиморфизмов (3A4/5, 2C19, 2B6, и 1A2). Проведены фармакологические исследования связи между функциональными вариантами этих генов и антитромбоцитарным эффектом клопидогрела (его влиянием на агрегацию тромбоцитов). Эти исследования показали, что основным генотипом, определяющим фармакодинамическую реакцию на клопидогрел у здоровых людей, является CYP2C19 [59].

Seiji Hokimoto и соавт. [58] провели исследования на 174 пациентах с определением CYP2C19 генотипа, измерением агрегации тромбоцитов и оценкой отношения между генотипом CYP2C19 и реактивностью тромбоцитов в течение 24 часов после введения клопидогрела и риск сердечно-сосудистых событий в течение 18 месяцев наблюдения. Было выявлено, что у пациентов с пониженной функцией CYP2C19 из-за генетического полиморфизма, обуславливающего медленный метаболизм клопидогрела, имеют более высокий уровень сердечно-сосудистых событий (смерть, инфаркт миокарда, инсульт), чем пациенты с нормальной функцией CYP2C19. Следовательно, у больных с медленным метаболизмом клопидогрела должны быть рассмотрены альтернативные стратегии лечения. Распространенность лиц, имеющих полиморфизм CYP2C19, обуславливающий метаболизм по медленному типу, значительно выше в Восточной Азии, в том числе японской, чем у людей в западных странах.

В последние годы влияние варианта CYP2C19*2 на сердечно-сосудистые события описано многими исследователями. В некоторых самых ранних из этих работ сообщалось, что пациенты, получавшие клопидогрел, у которых была хотя бы одна копия аллели CYP2C19*2, имели значительно более высокую вероятность развития серьезного побочного сердечно-сосудистого события по сравнению с людьми, которые были гомозиготными по CYP2C19*1 аллели.

Частота генотипов по CYP2C19, соответствующих медленным метаболитам (генотипы CYP2C19*1/*2 и CYP2C19*2/*2), в российской популяции составляет 11,4%, что сопоставимо с европейскими этническими группами [60]. Однако у российских пациентов с ИБС генотипы CYP2C19, связанные с медленным метаболизмом, могут встречаться с частотой до 27,3% [61]. Аллель CYP2C19*3, носительство которой также ассоциировано с угнетением образования активного метаболита клопидогрела, в российской популяции встречается очень редко, менее чем в 1% случаев.

В недавних исследованиях при исследовании полиморфизмов генов, ассоциированных с развитием ССЗ было выявлено, что у пациентов после АКШ при наличии комбинации редких аллелей генов ITGB3 (rs5918) и CYP2C19*2 или CYP2C19*2 и ITGA2 (rs1126643), а также редкой аллели гена CYP2C19*2 чаще встречались инфаркт миокарда и острое нарушение мозгового кровообращения по сравнению с наличием других генетических комбинаций. Найденная зависимость носительства комбинации мутантных аллелей является возможным предиктором сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов после АКШ [62].

В настоящее время до сих пор остается неясным, в какой степени генетические полиморфизмы определяют агрегацию тромбоцитов у лиц, получавших антитромбоцитарные препараты, такие как аспирин и клопидогрел. Литературные данные о связи различных полиморфных маркеров генов-кандидатов с эффективностью терапии основными классами антитромбоцитарных препаратов зачастую являются противоречивыми. В связи с этим в настоящее время актуален поиск и дальнейшее исследование генетических предикторов эффективности и применения того или иного антиагреганта.

Важно понимать, что присутствие «неблагоприятной» полиморфной аллели является вероятным показателем, значение которого нельзя переоценивать – знания о генотипе в данном случае не имеют самостоятельной роли, а являются компонентом комплексного исследования пациента.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что генетическое тестирование предрасположенности к резистентности к антитромбоцитарным препаратам у больных ИБС позволит приблизиться к формату персонализированной медицины, основному на применении схем лечения с учетом индивидуальных генетических особенностей пациента, персонализированный выбор антиагрегантов, прогнозирование развития резистентности к тем или иным препаратам.

Несмотря на то, что тромбоцит – один из главных участников тромбоза, механизм тромбообразования – комплексный, и оценка функции тромбоцита не дает однозначного прогноза у конкретного пациента из-за влияния многих других факторов. Персонализация в том и заключается, чтобы оценить риск у конкретного пациента не одним тестом, а комплексным подходом, учитывая особенности конкретного больного. Пока у пациентов с ИБС однозначно не доказана эффективность использования тестов по определению активности тромбоцитов для корректировки антитромбоцитарной терапии. Основными трудностями на пути персонализации антитромбоцитарной терапии остаются выбор метода оценки активности тромбоцитов на терапии, отсутствие стандартизации данных методов, влияние многих факторов на резистентность к антитромбоцитарной терапии. Возможно, изолированное измерение функциональной активности тромбоцитов и корректировка терапии на ее основе не принесет желаемого снижения случаев тромбозов, но изучение ее в комплексе с другими характеристиками – эндотелиальной функцией, генетической предрасположенностью, выраженностью атеросклероза, активностью иммунной системы позволит найти правильный путь к персонализированной медицине.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Исследование было выполнено на базе НПЛМГМИ СФУ в г. Красноярске. В анализ включено 129 пациентов (108 (83,7%) мужчин и 21 (16,3%) женщина) с диагнозом ИБС, поступивших на лечение в Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Красноярск). Средний возраст – $66\pm 6,68$ лет. У всех пациентов атеросклеротическое поражение коронарных артерий, подтвержденное коронароангиографией.

Всем пациентам при поступлении выполнялся развернутый анализ крови на гематологическом анализаторе SYSMEX XT-1800i, Rocher (Швейцария) и биохимический анализ крови на анализаторе Furuno SA – 400 (Япония), анализ крови на гемостаз (активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, концентрация фибриногена) осуществлялась на коагулометрическом анализаторе ACL 9000, США, агрегация тромбоцитов на оптическом агрегометре Chronolog 490, США с индукторами: АДФ $5\ \mu\text{M}$ и Арахидоновой кислотой (АК) $1\ \text{mM}$.

Анализируемым пациентам была отменена антитромбоцитарная терапия минимум за 5 дней до АКШ и лабораторного обследования. После АКШ 69 пациентов находились на терапии ацилсалициловой кислотой (АСК) (100 мг кишечнорастворимая форма), 60 – на двойной антитромбоцитарной терапии (100 мг кишечнорастворимой формы АСК + 75 мг клопидогрела). В группу контроля вошли 30 доноров (22 мужчины (73,3%) и 8 женщин (26,7%)). Средний возраст $48,2\pm 9,8$.

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

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.

У пациентов забиралась кровь из локтевой вены путем пункции в вакутейнер с двукалиевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА-К2) (5 мл для молекулярно-генетических исследований). Оценка агрегации тромбоцитов определялась *in vitro* на оптическом агрегометре Chronolog 490 (США) с индуктором арахидоновая кислота ($1\ \text{mM}$) до КШ, на 1-3 сутки, 8-10 сутки после АКШ. Резистентность к АСК определялась при уровне агрегации тромбоцитов $>20\%$ после инкубации обогащенной тромбоцитами плазмы с АСК и индукции

с арахидоновой кислотой. Общее количество обследованных составило 159 человек (129 больных ИБС и 30 доноров).

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили с использованием комплекта реагентов «SNP-экспресс» НПФ «Литех», а также реагента «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс»). Измерение концентрации ДНК проводили с использованием набора реагентов Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit и флуориметра Qubit (Invitrogen). Далее с образцами выделенной ДНК была проведена ПЦР с использованием комплектов реагентов для амплификации «SNP-экспресс», «SNP-экспресс-РВ» и «SNP-экспресс-РВ» в формате SHOT (НПФ Литех) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации и детекцией результата в режиме реального времени соответственно. Выбор генов-кандидатов и SNP был основан на тщательном обзоре существующей литературы. Было идентифицировано 5 основных SNP с предполагаемым влиянием на фенотип пациента. В группе пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, получавших антитромбоцитарную терапию, мы исследовали взаимосвязь наличия выбранных нуклеотидных полиморфизмов с проявлением резистентности к АСК и клопидогрелу.

Образцы ДНК были исследованы на наличие полиморфизмов в генах, кодирующих компоненты тромбоцитарных рецепторов, опосредующих процессы адгезии и агрегации кровяных пластинок: ген АДФ-рецептора тромбоцитов P2RY12 (139 С→Т, rs2046934); ген рецептора к коллагену ITGA2 (807 С→Т, rs1126643); ген рецептора к фибриногену ITGB3 (176 Т→С (Leu33Pro), rs5918), ген тромбоцитарного рецептора фактора Виллебранда GP1BA (482 С→Т; Thr145Met, rs6065), а также гена цитохрома P450 CYP2C19*2 (G681A, rs4244285).

2.2 Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с использованием комплекта реагентов «SNP-экспресс», НПФ «Литех»

Исследуемым материалом для анализа является цельная венозная кровь.

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с использованием реагента «ДНК-экспресс-кровь» научно-производственной фирмы «Литех» проводилось 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 переверачиванием пробирки до однородности.

2. Закрывать пробирку и центрифугировать со скоростью 3000 об/мин, при комнатной температуре в течение 5 мин. После центрифугирования кровь разделится на плазму и форменные элементы. На поверхности осадка форменных элементов расположен тонкий слой лейкоцитов.

3. Аккуратно удалить пипеткой плазму, не захватив при этом лейкоциты.

Примечание: полное удаление плазмы без захвата лейкоцитов практически невозможно. Поэтому следует оставить в пробирке тонкий слой плазмы (рисунок 6).



Рисунок 6 – Этап удаления плазмы без захвата лейкоцитов

4. Закрывать пробирку и выдерживать ее при -20°C (в морозильной камере) до полного замораживания форменных элементов (в течение 1 часа).

5. Полностью разморозить содержимое пробирки при комнатной температуре.

6. Внести в пробирку 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). Закрывать пробирку, защелкнуть замочек.

7. Содержимое пробирки в течение 10 сек. тщательно перемешать на встряхивателе (вортексе).

8. Установить пробирку в предварительно прогретый до 98°C термостат и выдерживать течение 15 минут. По окончании дать остыть примерно до 70°C .

9. Установить пробирку в высокоскоростную микроцентрифугу замком в сторону оси. Центрифугировать со скоростью 12000-14000 об/мин, при комнатной температуре в течение 1 минуты. Полученный таким образом супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК.

Примечание: Если необходимо сохранить выделенную ДНК для дальнейшего использования, супернатант следует перенести в отдельную пробирку типа «Эппендорф» и хранить при -20°C (в морозильной камере) до 1 года. Перед проведением анализа образец необходимо полностью разморозить при комнатной температуре и перемешать.

2.3 Подготовка образцов крови перед выделением ДНК с использованием реагента «ГЕМОЛИТИК», «АмплиСенс»

Реагент «ГЕМОЛИТИК» («АмплиСенс») предназначен для селективного лизиса эритроцитов крови при предобработке клинического материала (цельной периферической и пуповинной крови).

Принцип метода основан на действии осмотического давления на клетки крови. Раствор гемолитика является гипотоническим по отношению к эритроцитам, и осмотическое давление приводит к разрыву клеточной мембраны. Для проведения анализа используется свежая цельная кровь

1. Подписать пробирки (на крышке пробирки № пробы; на боковой поверхности: № пробы, фамилия пациента, дата выделения ДНК). Если необходимо, выделить отдельную пробирку для отрицательного контрольного

образца (ОКО), на ней подписать «ОКО» и дату, отставить эту пробирку в сторону. В пробирки (во все, кроме «ОКО») добавить по 1000 мкл гемолитика (одним наконечником). Затем внести в пробирки с гемолитиком по 250 мкл исследуемой цельной крови (кровь предварительно перемешать пипетированием (если она находится в «эппендорфе») или переворачиванием 5-6 раз (если она находится в «вакутейнере»)), закрыть крышку и перемешать на вортексе.

2. Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин, еще раз перемешать и оставить еще на 5 мин.

3. Центрифугировать на микроцентрифуге при 8 тыс. об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать, не задевая осадка, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов). При необходимости можно повторить отмывку гемолитиком. Полученный осадок лейкоцитов должен быть немедленно лизирован.

2.4 Выделение ДНК из клинического материала с использованием комплекта реагента «ДНК-сорб-В», «АмплиСенс»

Выделение ДНК из цельной крови с использованием реагента «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс») проводилось по следующей методике:

1. Достать из набора «ДНК-сорб-В» Лизирующий раствор и Раствор для отмывки 1 и поставить на нагревающую поверхность термостата, на термостате выбрать «Режим 1» и температуру 65°C.

2. Внести в каждую пробирку с осадком лейкоцитов после отмывки гемолитиком по 300 мкл лизирующего раствора (одним наконечником).

3. Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге.

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

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

6. Добавить в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1 (одним наконечником), 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.

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

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

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

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

11. Центрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

2.5 Измерение концентрации ДНК с использованием комплекта реагентов Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit и флуориметра Qubit, «Invitrogen»

Действие этого метода основано на том, что специфичный флуоресцентный краситель связывается только с молекулой-мишенью в данном случае с ДНК, и определяет точную концентрацию ДНК в образце.

Измерение концентрации ДНК с использованием набора реагентов Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit и флуориметра Qubit («Invitrogen») производилось согласно следующей методике:

1. Разморозить все реагенты при комнатной температуре.
2. Наставить пробирки на 0,5 мл в количестве (n), равном числу образцов ДНК плюс 2 стандарта. Подписать на крышечках номера образцов и стандартов.
3. Приготовить Рабочую смесь: 1×n мкл Реагента + 199×n мкл Буфера
4. 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 ДНК
5. Вортексировать 2-3 сек, сбросить капли.
6. Инкубировать 2 мин.
7. Включить Qubit в сеть. Если прибор находится в спящем режиме, нажать любую кнопку для перехода в рабочий режим.
8. Выбрать вид анализа (dsDNA HS Assay), используя кнопки ↑ и ↓. Нажать GO.
9. Произвести калибровку:
 - а) выбрать старую калибровку – Use last calibration. Нажать GO.ИЛИ
 - б) произвести калибровку заново:
 - вставить Стандарт №1, нажать GO;

- вставить Стандарт №2, нажать GO.

10. Вставить исследуемую пробу, нажать GO. На экране появится число.

11. Рассчитать концентрацию ДНК в исходном образце: выбрать Calculate sample concentration используя кнопки ↑ и ↓, нажать GO.

12. Записать результат.

13. Убрать исследуемую пробу из прибора, вставить следующую и нажать GO.

2.6 Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов «SNP-ЭКСПРЕСС-PB», НПФ «Литех», с детекцией результата в режиме реального времени на приборе CFX96 (Bio-Rad)

В основе метода лежит количественное определение содержания продукта ПЦР в реакционной смеси в каждом цикле реакции. Детекция продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (РВ) стала возможной благодаря введению в реакцию флуоресцирующих реактивов, сообщающих об увеличении количества ДНК пропорциональным увеличением флуоресцентного сигнала. К флуоресцирующим веществам, используемым для этой цели, относятся красители, связывающие ДНК, и флуоресцентно меченные праймеры или зонды.

Система детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени CFX96 (Bio-Rad, США) представляет собой программируемый термостат (амплификатор), сопряженный с оптической системой детекции флуоресцентного сигнала по 6 каналам через крышки пробирок. Система позволяет проводить ПЦР анализ до 5 мишеней в 96 пробах одновременно и регистрировать сигнал от образцов по заданным каналам в каждом цикле. По окончании реакции управляющая программа строит кривые накопления фонового сигнала от каждого образца в каждом из задействованных каналов, по которым в дальнейшем и производится анализ результатов.

ПЦР проводили с использованием набора реагентов «SNP-ЭКСПРЕСС-PB» (НПФ «Литех», Москва).

Система «SNP-ЭКСПРЕСС-PB» представляет собой комплект реагентов для выявления полиморфизмов в геноме человека.

С образцом выделенной ДНК параллельно проводятся две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфических праймеров. Результаты анализа позволяют дать три типа заключений:

- гомозигота по аллели 1;
- гетерозигота;
- гомозигота по аллели 2.

Проведение амплификации:

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. Для каждой пробы готовятся 2 пробирки аллель 1 (норма) и аллель 2 (патология).

2. За 20-30 минут до приготовления рабочей амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для ПЦР из морозильника, разморозить содержимое. Пробирки с реакционной смесью и полностью размороженным раствором разбавителя тщательно перемешать вортексированием.

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 Taq-полимеразы

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

4. После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.

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

6. Внести по 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. выделение ДНК) в пробирку с рабочей амплификационной смесью НОРМА и в пробирку с рабочей амплификационной смесью ПАТОЛОГИЯ. В качестве отрицательного контрольного образца вносится разбавитель, в качестве положительного контроля - положительный контрольный образец ДНК в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

7. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1500-3000 об/мин, при комнатной температуре (+18...+25°C) на микроцентрифуге-вортексе.

8. Создать протокол расположения образцов.

Для работы с наборами «SNP-ЭКСПРЕСС-РВ» используется канал FAM.

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

9. Перенести пробирки в систему для проведения ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени в точном соответствии заданным ранее протоколом расположения образцов.

10. Запустить программу амплификации последующему протоколу:

Таблица 1 – программа амплификации для прибора CFX96 (ПЦР-РВ)

<i>T, C°</i>	<i>время</i>	<i>циклы</i>
93°	1 мин	1
93°	10 сек	35
64°	10 сек	
72°	20 сек (считывание)	

2.7 Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов для амплификации «SNP-ЭКСПРЕСС», НПФ «Литех», с электрофоретической детекцией продуктов амплификации

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. За 20-30 минут до приготовления рабочей амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для ПЦР из морозильника, разморозить содержимое. Пробирки с реакционной смесью и полностью размороженным раствором разбавителя тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

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

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

4. После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.

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

6. Добавить во все пробирки по 1 капле (около 25 мкл) минерального масла.

7. Внести по 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. выделение ДНК) в пробирку с рабочей амплификационной смесью НОРМА и в пробирку с рабочей амплификационной смесью ПАТОЛОГИЯ под слой масла. В качестве отрицательного контрольного образца вносится разбавитель в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

8. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 секунд при 1,5–3000 об/мин при комнатной температуре (+18...+25°C) 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 2 – программа амплификации для прибора CFX96

<i>T, C°</i>	<i>время</i>	<i>циклы</i>
94°	Pause	
93°	1 мин	1
93°	10 сек	35
64	10 сек	
72°	20 сек	
72°	1 мин	1
10°	Storage	

2.8 Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза

Электрофорез ДНК – это аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по размеру (длине) и форме (в случае, если ДНК образует вторичные структуры, например шпильки). Силы электрического поля, прикладываемого к образцам, заставляют фрагменты ДНК мигрировать через гель. Сахарофосфатный остов молекул ДНК заряжен отрицательно и поэтому цепи ДНК двигаются от катода, заряженного отрицательно, к положительному аноду. Более длинные молекулы мигрируют медленнее, так как задерживаются в геле, более короткие молекулы двигаются быстрее. К образцам обычно добавляют низкомолекулярный кислый краситель (например, динитрофенол, бромфеноловый синий), чтобы визуализировать ход электрофореза в процессе. Краситель также необходим для того, чтобы определить, когда стоит остановить процесс. Электрофорез проводится в камере, заполненной буферным раствором. Чаще всего используются буферы, содержащие ЭДТА, трис- и борную кислоту: ТАЕ и ТВЕ. Буфер необходим для повышения ионной силы раствора, в котором будет происходить разделение молекул ДНК под действием приложенного электрического поля. После разделения (иногда краситель вносят в расплавленную агарозу) фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, агарозные гели обычно красят бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах. Для электрофоретического анализа ДНК обычно используют агарозные (для относительно длинных молекул ДНК) и полиакриламидные (для высокого разрешения коротких молекул ДНК, например, в случае секвенирования) гели.

Принцип разделения продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза:

1. Залить в аппарат для электрофореза ТАЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ в 50 раз (рН=8,3).

2. К 3,0 г агарозы добавить 2 мл 50х ТАЕ буфера и 100 мл дистиллированной воды (**3% гель**)

3. Приготовленную смесь расплавить на электрической плите или в СВЧ-печи. Добавить к 100 мл расплавленной агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия. Перемешать.

4. Охладить расплавленную агарозу до температуры 50-60°C и залить в планшет для заливки геля. Для получения в агарозном геле карманов для нанесения образцов установить на планшет гребенку, используя зажим типа «бульдог».

Примечание: толщина гребенки и толщина геля должны обеспечивать объем карманов не менее 20-25 мкл. После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза.

5. Нанести в карманы геля по 15-20 мкл амплификата в последовательности соответствующей нумерации проб.

6. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/См геля. Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта 1,5-2 см (полосы ампликонов будут опережать полосу красителя, оптимальное время разгонки – 15 минут).

Визуализация результатов электрофореза

7. Вынуть гель из формы и перенести его на стекло УФ-трансиллюминатора.

ВАЖНО! С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном.

8. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа (визуальную детекцию проводить только с защитным экраном, либо в очках, не пропускающих УФ излучение). Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм (Рисунок 7).

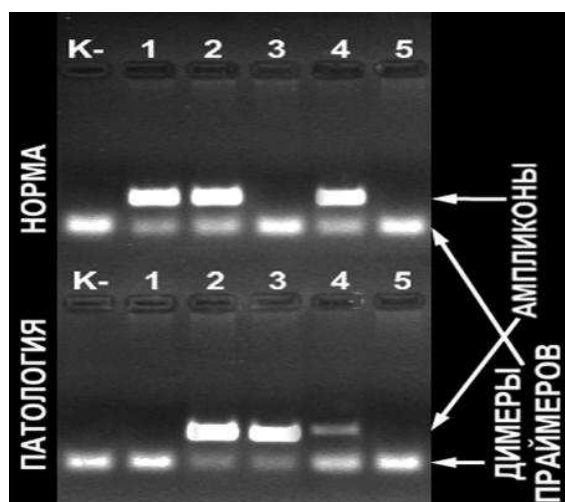


Рисунок 7 – Пример интерпретации результатов анализа

2.9 Статистический анализ

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ SPSS Statistics (Версия 20.0) и программы MS Excel for Windows (2010).

Для количественных показателей вычислялись следующие показатели описательной статистики: среднее значение, стандартное отклонение, квартили, минимальное и максимальное значение. Описательные статистики представлены как $M \pm \sigma$, где M – средняя арифметическая величина вариационного ряда, σ – ошибка среднего. Для качественных показателей вычислялись следующие показатели: число наблюдений и доля (в %) от общего количества пациентов или от количества пациентов в соответствующей подгруппе. Проверка нормальности распределения значений переменных в группах наблюдения проводилась с использованием критерия Колмагорова-Смирнова.

Достоверность различий между двумя независимыми выборками оценивалась по критерию Манна-Уитни при несоответствии выборки нормальному закону распределения. При соответствии выборки нормальному закону распределения различия между независимыми выборками проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Сравнение между двумя зависимыми выборками проводилось с помощью теста Уилкоксона. Для категориальных переменных применяли χ^2 -тест. Для оценки риска развития резистентности при наличии минорной аллели изучаемых полиморфизмов производили оценку отношения шансов в таблицах сопряженности 2×2 с расчетом доверительных интервалов по стандартной методике с помощью четырехпольной таблицы. Формула расчета отношения шансов: $(ОШ) = (a/b)/(c/d)$. За статистически значимый уровень достоверности принимали $p < 0,05$, статистическую тенденцию к достоверности – $0,05 < p < 0,1$.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Клинико-лабораторные особенности пациентов резистентных и чувствительных к АСК и клопидогрелу

Нужно отметить, что лабораторные данные по развернутому и биохимическому анализу крови для всех пациентов и группы здоровых лиц нами непосредственно не выполнялись, а были любезно предоставлены сотрудниками кардиологического отделения Красноярской межрайонной клинической больницы № 20 им. Берзона г. Красноярск.

На первом этапе была определена агрегация тромбоцитов на оптическом агрегометре с индукторами: АДФ 5 μ М и Арахидоновой кислотой (АК) 1 мМ. Резистентность к АСК определялась при уровне агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой более 20% хотя бы в одной точке наблюдения (недостаточный ответ тромбоцитов) на дезагрегантной терапии после АКШ или при инкубации обогащённой тромбоцитами плазмы пациента с АСК *in vitro* до начала лечения АСК и проведения оперативного вмешательства.

Резистентность к клопидогрелу определялась как степень уменьшения максимальной интенсивности агрегации тромбоцитов под действием 5 μ М 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.

По данным оптической агрегации тромбоцитов с арахидоновой кислотой, до АКШ все пациенты были разделены на 2 группы: 81 (81,8%) пациент включен в группу чувствительных к АСК (АЧ) и 18 (18,2%) пациентов в группу резистентных к АСК (АР).

При клинико-анамнестической и лабораторной характеристике пациентов не наблюдалось значимых отличий между группами АР и АЧ по возрасту, полу, уровню гемоглобина, количеству форменных элементов крови, уровню тощакового сахара крови, креатинина, показателей липидного спектра до АКШ. Резистентные к АСК пациенты чаще имели сахарный диабет (22,2% против 16,0%) и являлись курильщиками (38,9% против 27,2%), но в данных отличиях статистической достоверности нет. Результаты представлены в таблице 3.

Изъято 8 страниц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы:

1. Определены генетические предикторы резистентности к АСК, которые могут определять пациентов высокого риска резистентности к антиагрегантам.
2. Отличий по агрегационной активности тромбоцитов у носителей минорной аллели и носителей нормального варианта генотипа изучаемых полиморфизмов не обнаружено ($p > 0,05$).
3. Выявлены достоверные отличия по распространенности генетических вариантов полиморфизмов rs2046934 гена P2RY12 ($p = 0,0002$) и rs1126643 гена ITGA2 ($p = 0,001$) между группами пациентов с ИБС и здоровых доноров.
4. Выявлены статистически значимые отличия по распространенности генетических вариантов полиморфизма rs2046934 гена P2RY12 среди аспирирезистентных (АР) и аспиричувствительных (АЧ) пациентов ($p = 0,003$).

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- СУР – цитохром Р
GP – гликопротеин
GP1BA – гликопротеин 1ba, рецептор фактора Виллебранда – GPIb/IX/V
GWAS (Genome-Wide Association Studies) – полногеномный поиск ассоциаций
ITGA2 – интегрин $\alpha 2/\beta 1$, рецептор коллагена – GPIa/IIa
ITGB3 – интегрин $\beta 3$, рецептор фибриногена GPIIb/IIIa
P2RY12 – ADP-рецептор тромбоцитов
SNP - Single-nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
АДФ – аденозиндифосфат
АК – арахидоновая кислота
АКШ – аорто-коронарное шунтирование
АР – резистентные к ацетилсалициловой кислоте
АСК – ацетилсалициловая кислота
АТП – антитромботические препараты
АЧ – чувствительные к ацетилсалициловой кислоте
ДИ – доверительный интервал
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ОИМ – острый инфаркт миокарда
ОШ – отношение шансов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ТхА – тромбоксан А
ЦОГ – циклооксигеназа
ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оганов, Р. Сосудистая коморбидность: Общие подходы к профилактике и лечению / Р.Г. Оганов // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 4-7.
2. Serruys, P. Percutaneous Coronary Intervention versus Coronary-Artery Bypass Grafting for Severe Coronary Artery Disease / P. Serruys, M. Morice, A. Kappetein et al. // New England Journal of Medicine. – 2009. – Vol. 360, № 10. – P. 961-972.
3. Alexander, J. Efficacy and safety of edifoligide, an E2F transcription factor decoy, for prevention of vein graft failure following coronary artery bypass graft surgery - PREVENT IV: A randomized controlled trial / J. Alexander, G. Hafley, R. Harrington et al. // Jama-Journal of the American Medical Association. – 2005. – Vol. 294, № 19. – P. 2446-2454.
4. Desai, N. A randomized comparison of radial-artery and saphenous-vein coronary bypass grafts / N. Desai, E. Cohen, C. Naylor et al. // New England Journal of Medicine. – 2004. – Vol. 351, № 22. – P. 2302-2309.
5. Gasevic, D. Outcomes following percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting surgery in Chinese, South Asian and white patients with acute myocardial infarction: administrative data analysis / D. Gasevic, N.A. Khan, H. Qian et al. // BMC Cardiovascular Disorders. – 2013. – Vol. 13, № 121. – P. 30-38.
6. Васькина, Е. Маркеры активации тромбоцитов и их влияние на функциональное состояние шунтов после проведения операции аорто-коронарного шунтирования пациентам с эссенциальной артериальной гипертензией / Е.А. Васькина, М.В. Викторова, М.Г. Пустоветова, и др. // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. 14, № 2. – С. 171-172.
7. Довгалевский, П. Клиническая значимость резистентности к аспирину у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями / П.Я. Довгалевский, Н.В. Фурман, Н.Ф. Пучиньян // Рациональная фармакотерапия в Кардиологии. – 2006. – №3. – С. 46-47.
8. Демографический ежегодник России, 2015. <http://www.gks.ru>. Demograficheskiy ezhegodnik Rossii, 2015. <http://www.gks.ru> (In Russ.).
9. Timmis, A. Prognosis of stable angina pectoris: why we need larger population studies with higher endpoint resolution / A. Timmis, G. Feder, H. Hemingway // Heart. – 2007. – Vol. 93. – P. 786-791.
10. Бокерия, Л. Сердечно-сосудистая хирургия / Л.А. Бокерия, Р.Г. Гудкова // Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения. – 2011 – С. 192.
11. Дидигова, Р. Современные взгляды на этиологию и диагностику ишемической болезни сердца / Р.Т. Дидигова, А.М. Инарокова, М.Я. Имагожева // Лечебное дело. – 2011. – № 4. – С. 12.
12. Сумароков, А. Ацетилсалициловая кислота – антиагрегантное и противовоспалительное средство в терапии и профилактике сердечно-

- сосудистых заболеваний / А.Б. Сумароков // Справочник поликлинического врача. – 2013. – № 10. – С. 16-21.
13. Воронина, Е. Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм / Е.Н. Воронина, М.Л. Филипенко, Д.С. Сергеевичев // Вестник ВОГиС. – 2006. – Том 10, № 3. – С. 554-556.
 14. Шилов, А. Ацетилсалициловая кислота – антиагрегант для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний / А.М. Шилов // Трудный пациент. – 2013. – № 11(4). – С. 3–8.
 15. Gallego-Fabrega, C. Drug resistance and secondary treatment of ischaemic stroke: The genetic component of the response to acetylsalicylic acid and clopidogrel / C. Gallego-Fabrega, J. Krupinski, I. Fernandez-Cadenas // Neurologia. – 2015. – Vol. 30, № 9. – P. 566-573.
 16. Roberge, S. The role of aspirin dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis / S. Roberge, K. Nicolaides, S. Demers, J. Hyett, N. Chaillet, E. Bujold // American Journal of Obstetrics and Gynecology. – 2017. – Vol. 216, № 2. – P. 111—116.
 17. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease. The Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. <http://eurheartj.oxfordjournals.org/content/early/2013/08/28/eurheartj.eht>.
 18. Ridker, P. Low-dose aspirin therapy for chronic stable angina. A randomized, placebo–controlled clinical trial / P.M. Ridker, J.E. Manson, J.M. Gaziano et al // Ann. Intern. Med. – 1991. – Vol. 114, № 10. – P. 835-839.
 19. Steg, P. Authors Task Force M. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation / P.G. Steg, S.K. James, D. Atar et al. // European Heart Journal. – 2012. – Vol. 33, № 20. – P. 2569-2619.
 20. Fintel, D. Oral antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: overview of current and emerging treatment options / D.J. Fintel // Vasc. Hlth Risk Manag. – 2012. – Vol. 8. – P. 77-89.
 21. Маев, И. Лекарственное взаимодействие ингибиторов протонной помпы и клопидогреля при их совместном приеме / И.В. Маев, А.А. Самсонов, В.А. Годило-Годлевский // Клиническая медицина. – 2013. – № 5. – С. 17.
 22. Popma, C. Lack of concordance between local investigators, angiographic core laboratory, and clinical event committee in the assessment of stent thrombosis: results from the TRACER angiographic substudy / C.J. Popma, S. Sheng, S. Korjian S et al. // Circ. Cardiovasc. Interv. – 2016. – Vol. 9, № 5. – P. 3-14.
 23. Montalescot, G. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology / G. Montalescot, U. Sechtem, S. Achenbach et al. // European Heart Journal. – 2013. – Vol. 34. – P. 2949-2954.
 24. Guirgis, M. Review of aspirin and clopidogrel resistance in peripheral arterial disease / M. Guirgis, P. Thompson, S. Jansen // Journal of Vascular Surgery. – 2017. – Vol. 66, № 5. – P. 1576-1586.

25. Lee, P. Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease / P. Lee, W. Chen, W. Ng et al. // *The American Journal of Medicine*. – 2005. – Vol. 118. – P. 723–727.
26. Gurbel, P. The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting / P.A. Gurbel, K.P. Bliden, K.M. Hayes, U.S. Tantry // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2005. – Vol. 45. – P. 1392-1396.
27. Gori, A. Incidence and clinical impact of dual nonresponsiveness to aspirin and clopidogrel in patients with drug-eluting stents / A. Gori, R. Marcucci, A. Migliorini et al // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2008. – Vol. 52, № 9ю – P. 734-739.
28. Мартынов, А. Истинная резистентность и псевдорезистентность к аспирину / А.И. Мартынов, Е.В. Акатова, И.В. Урлаева и др. // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. – 2013. – Т. 9, № 3. – С. 301-305.
29. Siller-Matula, J. Personalized antiplatelet treatment after percutaneous coronary intervention: The MADONNA study / J.M. Siller-Matula, M. Francesconi, C. Dechant et al. // *International Journal of Cardiology*. – 2013. – Vol. 167, № 5. – P. 2018-2023.
30. Takahashi, S. Platelet responsiveness to in vitro aspirin is independent of COX-1 and COX-2 protein levels and polymorphisms / S. Takahashi, M. Ushida, R. Komine et al. // *Thrombosis Research*. – 2008. – Т. 121, № 4. – P. 509-517.
31. Васильева, О. Молекулярно-генетические аспекты кардиоваскулярных и цереброваскулярных заболеваний / О.В. Васильева, А.В. Полонников, В.П. Иванов // *Клинико-лабораторный консилиум*. – 2009 – № 4. – С. 56-59.
32. Takada, Y. The Integrins / Y. Takada, X. Ye, S. Simon // *Genome Biol*. – 2007. – Vol. 8, № 5. – P. 215.
33. Чикова, Е. Наследственные факторы риска тромбофилии у женщин западно-сибирского региона: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / Е.Д. Чикова, Г.А. Цветовская, Г.И. Лифшиц // *Молекулярная диагностика*. – 2010. – С. 166.
34. Undas, A. Pl (A2) polymorphism of beta(3) integrins is associated with enhanced thrombin generation and impaired antithrombotic action of aspirin at the site of microvascular injury / A. Undas, K. Brummel, J. Musial et al. // *Circulation*. – 2001. – Vol. 27, № 104. – P. 2666-2672.
35. Syros, G. Role of PLA2 polymorphism on clinical events after percutaneous coronary intervention / G. Syros, R. Mehran, G. Weisz et al. // *Acute cardiac care*. – 2009. – Vol. 11, № 2. – P. 88-91.
36. Гергесова, Е.Е. Функции тромбоцитов, полиморфизм генов Leu33-Pro GpIIa, C807-T GpIa и система АВ0 в норме и патологии / Е.Е. Гергесова // *Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии: материалы V Всероссийской конференции*. – 2011. – С. 129-130.
37. Lu, J. Polymorphism in Integrin ITGA2 is Associated with Ischemic Stroke and Altered Serum Cholesterol in Chinese Individuals / J. Lu, Z. Lu, S. Zhang // *Balkan Med Journal*. – 2014. –Vol. 31, № 1. – P. 55-59.

38. FitzGerald, L. Identification of a prostate cancer susceptibility gene on chromosome 5p13q12 associated with risk of both familial and sporadic disease / L.M. FitzGerald, B. Patterson, R. Thomson // *European Journal Human Genetics*. – 2009. – Vol. 17, № 3. – P. 368-377.
39. Leone, A. Glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and increased risk of recurrent acute coronary syndromes: a five year follow up / A.M. Leone, V. Stefano, F. Burzotta et al. // *Heart*. – 2004. – Vol. 90, № 5. – P. 567-569.
40. Nikolopoulos, G. Integrin, alpha 2 gene C807T polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis / G.K. Nikolopoulos et. al. // *Thromb Res*. – 2007. – Vol 119, № 4. – P. 501-510.
41. Su, J. Association of P2Y12 gene promoter DNA methylation with the risk of clopidogrel resistance in coronary artery disease patients / J. Su, X. Li, Q. Yu et al. // *BioMed research international*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 450-458.
42. Wu, G. Genetic polymorphism of ITGA2 C807T can increase the risk of ischemic stroke / G. Wu, Y. Xi, L. Yao et al. // *International Journal of Neuroscience*. – 2014. – Vol. 124, № 11. – P. 841-851.
43. Пантелеев, М. Практическая коагулология / М.А. Пантелеев, С.А. Васильев, Е.И. Синауридзе // *Практическая медицина*. – 2012. – С. 146-150.
44. Голдобин, В. Атеротромботический инсульт: клинические показатели и параметры тромбоцитарного гемостаза у пациентов в остром периоде / В.В. Голдобин, Е.Г Ключева // *Саратовский научно-медицинский журнал*. – 2012. – Т. 4, № 8. – С. 954-957.
45. Сироткина, О. Молекулярно-генетические механизмы активации тромбоцитов и чувствительности к антиагрегантным препаратам у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями / О.В. Сироткина // *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*. – 2010. – Т. 1, № 4. – С. 69-76.
46. Hollopeter, G. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs / G. Hollopeter, H. Jantzen, D. Vincent // *Nature*. – 2001. – №409. – P. 202-207.
47. Staritz, P. Platelet reactivity and clopidogrel resistance are associated with the H2 haplotype of the P2Y(12)-ADP receptor gene / P. Staritz, K. Kurz, M. Stoll et al. // *International Journal of Cardiology*. – 2009. – Vol. 133, № 3. – P. 341-345.
48. Liu, R. Associations of CYP3A4, NR1I2, CYP2C19 and P2RY12 polymorphisms with clopidogrel resistance in Chinese patients with ischemic stroke / R. Liu, Z. Zhou, Y. Chen // *Acta Pharmacol Sin*. – 2016. – Vol. 37, № 7. – P. 882-888.
49. Yang, H. Associations of P2Y12R gene polymorphisms with susceptibility to coronary heart disease and clinical efficacy of antiplatelet treatment with clopidogrel / H. Yang, Y. Chen, C. Gao et al. // *Cardiovasc Ther*. – 2016. – Vol. 34, № 6. – P. 460-467.
50. Schettert, I. Association between platelet P2Y12 haplotype and risk of cardiovascular events in chronic coronary disease / I.T. Schettert, A.C. Pereira, N.H. Lopes et al. // *Thrombosis Research*. – 2006. – Vol. 118, № 6. – P. 679-683.

51. Omura, T. Recollection of the early years of the research on cytochrome P450 / T. Omura // Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. – 2011. – Vol. 87, № 10. – P. 617-640.
52. Seripa, D. Pharmacogenetics of cytochrome P450 (CYP) in the elderly / D. Seripa, A. Pilotto, F. Panza et al. // Ageing Research Reviews. – 2010. – Vol. 9, № 4. – P. 457-474.
53. Simon, T. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events / T. Simon // N Engl J Med. – 2009. – Vol. 360. – P. 365.
54. Buzoianu, A. Screening for CYP2C19*2, *3 and *4 gene variants in a Romanian population study group / A. Buzoianu, A. Trifa, R. Popp et al. // Farmacia. – 2010. – Vol. 58. – P. 806–818.
55. Yin, T. Pharmacogenomics of clopidogrel: evidence and perspectives / T. Yin, T. Miyata // Thromb Res. – 2011. – Vol. 128, № 4. – P. 307-316.
56. Lima, J. Association of CYP2C19 Polymorphisms and Lansoprazole-Associated Respiratory Adverse Effects in Children / J.J. Lima, J.E. Lang, E.B. Mougey et al. // Journal of Pediatrics. – 2013. – Vol. 163, № 3. – P. 686-691.
57. Dehbozorgi, M. Prevalence of the CYP2C19*2 (681 G>A), *3 (636 G>A) and *17 (–806 C>T) alleles among an Iranian population of different ethnicities / M. Dehbozorgi, B. Kamalidehghan, I. Hosseini et al // Mol Med Rep. – 2018. – Vol. 17, № 3. – P. 4195–4202.
58. 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. – Vol. 133, № 4. – P. 599-605.
59. Дудникова, Э. Роль дефензинов в развитии патологического процесса: новые подходы к диагностике и лечению / Э.В. Дудникова, А.С. Бадьян // Медицинский вестник Юга России. – 2015. – № 2. – С. 9-14.
60. Gaikovitch, E. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population / E.A. Gaikovitch // Eur J Clin Pharmacol. – 2003 – Vol. 59, № 4. – P. 303-312.
61. Комаров, А. Факторы, определяющие клиническую эффективность клопидогрела и прогноз у больных со стабильной формой ишемической болезни сердца / А.Л. Комаров, Е.П. Панченко, А.Е. Донников и др. // Кардиология. – 2011. – №2. – С. 8-18.
62. Grinshtein, Y. Possible Genetic Predictors of Cardiovascular Complications After Coronary Artery Bypass Surgery / Y. Grinshtein, A. Kosinova, I. Grinshtein et al. // Kardiologiya. – 2018. – Vol. 58, № 7. – P. 77-84.
63. Патрушев, Л. Искусственные генетические системы: Генная и белковая инженерия / Л.И. Патрушев // – 2004. – Т. 2. – С. 40-42.
64. Brar, S. Impact of Platelet Reactivity on Clinical Outcomes After Percutaneous Coronary Intervention A Collaborative Meta-Analysis of Individual Participant Data / S. S. Brar, J. ten Berg, R. Marcucci et al. // Journal of the American College of Cardiology. – 2011. – Vol. 58, № 19. – P. 1945-1954.


65. Campo, G. Prospective Evaluation of On-Clopidogrel Platelet Reactivity Over Time in Patients Treated With Percutaneous Coronary Intervention Relationship With Gene Polymorphisms and Clinical Outcome / G. Campo, G. Parrinello, P. Ferraresi et al. // Journal of the American College of Cardiology. – 2011. – Vol. 57, № 25. – P. 2474-2483.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра защиты и современных технологий мониторинга лесов

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

 И. Е. Ямских
« 27 » - июля 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование генетических полиморфизмов резистентности к
антитромбоцитарным препаратам у пациентов с ИБС

Направление подготовки 04.06.01 – Биология
Профиль 06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Научный
руководитель




к. б. н. Т.Н. Субботина

Выпускник



Г.Ю. Кочмарева

Рецензент



профессор, д-р мед. наук
Ю.И. Гринштейн

Красноярск 2019