

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT ARMS - REALTIME - PCR ĐỂ XÁC ĐỊNH ĐA HÌNH GEN CYP2C19 VÀ ITGB3 LIÊN QUAN ĐẾN KHÁNG CLOPIDOGREL VÀ ASPIRIN Ở BỆNH NHÂN MẠCH VÀNH

Nguyễn Thị Minh Ngọc¹, Triệu Tiến Sang², Nguyễn Thị Trang^{1*}

TÓM TẮT: Hiện nay, bệnh mạch vành là nguyên nhân chính gây tử vong và tàn phế ở các nước phát triển. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra các đa hình CYP2C19*2, CYP2C19*3 gen CYP2C19 và PIA1/PIA2 (Leu33Pro) gen ITGB3 có liên quan đến sự đề kháng clopidogrel và aspirin. DNA được tách từ 40 bệnh nhân sẽ được sử dụng kỹ thuật ARMS-real - time PCR để xác định các đa hình gen CYP2C19*2, CYP2C19*3 và PIA1/PIA2 (Leu33Pro). Khi phân tích đa hình gen CYP2C19 (CYP2C19*2 và CYP2C19*3) phát hiện 21 người (52,5%) có mang đột biến gen, trong đó có 14 người (35%) là mang gen dị hợp tử và 4 người (10%) mang đồng hợp tử đột biến CYP2C19*2 và 3 người mang gen dị hợp CYP2C19*3. Với đa hình PIA1/PIA2 gen ITGB3 phát hiện 4 người mang gen dị hợp tử (10%). Như vậy, tỷ lệ phát hiện các đa hình gen trên khá cao ở nhóm bệnh nhân điều trị kép clopidogrel và aspirin. Trong bài báo này, chúng tôi hoàn chỉnh quy trình kỹ thuật ARMS – Realtime PCR và ứng dụng để xác định các đa hình gen CYP2C19 và ITGB3 trong chẩn đoán tính kháng thuốc clopidogrel và aspirin ở bệnh nhân mạch vành

Từ khóa: Bệnh mạch vành, CYP2C19, kháng clopidogrel, ITGB3, kháng aspirin.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh mạch vành (BMV) là nguyên nhân chính gây tử vong và tàn phế ở các nước phát triển. Mặc dù, bệnh mạch vành tần suất tử vong có giảm trong 4 thập kỷ trước tại Mỹ và các quốc gia khác, nhưng nó vẫn chiếm 1/3 nguyên nhân tử vong chung ở những người trên 35 tuổi [1], ước tính có khoảng một nửa nam giới và nữ giới tuổi trung niên tại Mỹ có biểu hiện BMV [2]. Tại Việt Nam, BMV đang ngày càng gia tăng rõ rệt gây nhiều thay đổi trong mô hình bệnh tim mạch.

Trong thực hành lâm sàng clopidogrel là thuốc chống kết tập tiểu cầu lựa chọn thứ hai sau aspirin, nhưng hiện nay cũng có nhiều nghiên cứu cho thấy việc kết hợp đồng thời hai loại thuốc này trong một số tình huống chọn lọc có hiệu quả cao hơn việc dùng đơn độc [3]. Một số nghiên cứu

sau chứng minh điều này: Nghiên cứu CAPRIE (1996); CURE (2001), PCI-CURE (2001); CLARITY-TIMI 28; COMMIT-CCS 2.

Cơ chế đề kháng aspirin và clopidogrel hiện nay được nghiên cứu và chấp nhận nhiều nhất là đa hình kiểu hình gen di truyền. Nhiều kiểu đa hình di truyền đã được xác định có liên quan với đề kháng aspirin như đa hình gene COX1, đa hình PLA1/A2 của gen mã hóa GPIIb của gen ITGB3, đa hình gen quy định thụ thể ADP P2Y1 trên tiểu cầu, vWF và thụ thể collagen...[4]

Với đề kháng clopidogrel, đa dạng về kiểu hình của gen CYP2C19 được đề cập nhiều nhất. Có ít nhất 17 kiểu allele của gen này liên quan với kiểu hình có thể làm tăng, giảm hoặc cân bằng R-130964 liên quan đến tủy hoang dại. Allele của tủy hoang dại được ký hiệu *1 và kiểu gen hoang dại ký hiệu CYP2C19*1/*1 hoạt động bình thường. CYP2C19*2 và CYP2C19*3 không có chức năng, các kiểu allele khác liên quan đến bất hoạt hoặc giảm chuyển hóa thuốc như CYP2C19*4,*5,*6,*7 và *8, tuy nhiên các

¹ Đại học Y Hà Nội

² Học viện Quân y

* Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Nguyễn Thị Trang

Email: trangtrang1182@yahoo.com

Ngày nhận bài: 15/5/2017

Ngày phản biện: 16/5/2017

Ngày chấp nhận đăng: 20/6/2017

kiểu allen này tần suất xuất hiện ít hơn CYP2C19*2 và *3 là kiểu gen chính gây giảm chức năng allen ở người da trắng (85%) và người châu Á (99%). Những bệnh nhân có tình trạng chuyển hóa thuốc kém do mất chức năng cả 2 allen, tình trạng chuyển hóa trung gian khi chỉ mất 1 allen. Bệnh nhân đề kháng aspirin hay đề kháng clopidogrel do đa hình di truyền cần sử dụng các thuốc kháng tiểu cầu khác trong phòng ngừa nguyên phát và thứ phát bệnh lý tim mạch. Kiểu gen này phụ thuộc nhiều vào chủng tộc [5]. Chính vì vậy việc phát hiện nhanh kiểu gen liên quan đề kháng aspirin và clopidogrel bằng kỹ thuật PCR là rất cần thiết.

Mục tiêu nghiên cứu: Hoàn chỉnh quy trình và ứng dụng để xác định các đa hình gen CYP2C19*2 (G681A), CYP2C19*3 (G636A) và Leu33Pro (T1565C) gen ITGB3 bằng kỹ thuật ARMS - PCR ở bệnh nhân mạch vành đã đặt stent.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: 40 bệnh nhân mạch vành (được chẩn đoán mắc hội chứng vành cấp: nhồi máu cơ tim, đau thắt ngực không ổn định) đã được đặt stent ĐMV qua da và có chỉ định điều trị clopidogrel và aspirin tại Khoa Khám bệnh - Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 6/2016-12/2016.

Nghiên cứu xác định đột biến gen được thực hiện tại Trung tâm tư vấn Di truyền - Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu: DNA được tách chiết từ máu ngoại vi (chống đông EDTA) bằng kit tách DNA Express của hãng Lytech (Nga).

Sử dụng kỹ thuật ARMS - Realtime - PCR để xác định các đa hình gen CYP2C19 (CYP2C19*2 và CYP2C19*3) và PIA1/PIA2 (Leu33Pro) gen ITGB3 với trình tự mỗi (Lytech, Nga):

Bảng 2.1. Trình tự mỗi

Đa hình	Trình tự mỗi
CYP2C19*2 (G681A)	FP 5' – CCCACTATCATTGATTATTTCTCG – 3'
	ASP 5' – CCCACTATCATTGATTATTTCTCA-3'
	RP 5' – ACGCAAGCAGTCACATAACTA – 3'
CYP2C19*3 (G636A)	FP 5' – GGATTGTAAGCACCCCCAGG – 3'
	ASP 5 – GGATTGTAAGCACCCCCAGA – 3'
	RP 5' – TCACCCCATGGCTGTCTAGG – 3'
Leu33Pro (T1565C)	FP 5' – GCTCCAATGTACGGGGTAAAC – 3'
	ASP 5' – GCTCCAATGTACGGGGTAAAT – 3'
	RP 5' – GGGGACTGACTTGAGTGACCT – 3'

Ghi chú: FP - Forward primer, ASP - Allele specific primer, RP- Reverse primer.

Kỹ thuật ARMS - Realtime - PCR được thực hiện trên máy CFX96 (BioRad, Mỹ) với chu trình luân nhiệt: 93°C - 1 phút, 35 chu kỳ (93°C - 10s, 64°C - 10s, 72°C - 20s), 72°C - 5 phút.

Sử dụng bộ kit DNA - express để tách chiết DNA và kỹ thuật ARMS - realtime - PCR nhân gen và phân tích đột biến là phương pháp tiết kiệm thời gian: trung

binh 45 phút cho tách chiết DNA và 90 phút cho xác định đa hình gen. Như vậy kỹ thuật này có khả năng ứng dụng cao trong thực hành lâm sàng để xác định nhanh và chính xác kiểu gen của bệnh nhân trước khi đưa ra phác đồ cũng như liệu điều trị clopidogrel và aspirin.

ADN của 10 bệnh nhân lựa chọn ngẫu nhiên được phân tích đột biến bằng kỹ

thuật giải trình tự gen Sanger.

Các số liệu được thu thập và xử lý trên phần mềm SPSS 16.0.

2.3. Đạo đức nghiên cứu: Các số liệu và thông tin nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan đã được xác nhận và chấp thuận bởi cơ sở nghiên cứu. Những thông tin về bệnh nhân được giữ bí mật và chỉ phục vụ công tác nghiên cứu.

3. KẾT QUẢ

3.1. Hoàn chỉnh quy trình kỹ thuật

ARMS - Realtime PCR

Toàn bộ tổng số 40 mẫu nghiên cứu được tách ADN bằng phương pháp ADN-express (thực hiện trên máy Lytech, Nga), tuy nhiên chúng tôi giảm thể tích máu và dung dịch tách ADN so với protocol hướng dẫn của hãng. Cụ thể, lượng máu ngoại vi là 200 μ l và dung dịch tách ADN là 200 μ l, thay vì 550 μ l máu ngoại vi và 550 μ l dung dịch tách ADN như trong protocol. Tiến hành kiểm tra độ tinh sạch đạt chuẩn thu được kết quả sau

Bảng 3.1. Kết quả đo nồng độ và độ tinh sạch ADN theo phương pháp ADN-express

Mẫu	Nồng độ ADN ng/ μ l	Độ tinh sạch	Mẫu	Nồng độ AND ng/ μ l	Độ tinh sạch
1	795,2	1,9	21	1117,3	1,78
2	948,8	1,75	22	553,6	1,83
3	616,1	1,94	23	903,3	1,79
4	554,9	1,84	24	386,9	1,20
5	831,8	1,70	25	640,6	1,88
6	633,3	1,87	26	345,1	1,95
7	1006,3	1,91	27	903,7	1,86
8	1199,0	1,82	28	855,4	1,77
9	683,9	1,79	29	298,6	1,74
10	876,3	1,73	30	367,9	1,83
11	830,4	1,75	31	543,6	1,90
12	849,5	1,83	32	567,8	1,82
13	888,7	1,86	33	609,2	1,75
14	828,3	1,81	34	773,8	1,94
15	310,9	1,89	35	467,2	1,76
16	906,1	1,88	36	1016,8	1,84
17	515,3	1,80	37	804,5	1,95
18	446,7	1,72	38	678,6	2,0
19	671,8	1,76	39	588,9	1,83
20	453,5	1,89	40	470,7	1,71
Nồng độ DNA trung bình			Độ tinh sạch trung bình		
693,51 $\pm$ 227,94			1,81 $\pm$ 0,12		

Nhận xét: Lượng ADN thu được từ các mẫu tương đối cao và ổn định với nồng độ cao nhất đạt 1199,0 ng/ μ l, thấp nhất đạt 298,6 ng/ μ l; độ tinh sạch cao nhất là 2,0 thấp nhất là 1,70. Như vậy, việc giảm thể tích kit tách

và thể tích máu so với protocol hãng cung cấp vừa tiết kiệm được hóa chất mà vẫn đảm bảo đủ nồng độ DNA cũng như độ tinh sạch của DNA để tiến hành phản ứng PCR, góp phần giảm chi phí giá thành của xét nghiệm.

3.2. Tỷ lệ phát hiện đa hình gen Realtime - PCR CYP2C19 và ITGB3 bằng kỹ thuật

Bảng 3.2. Tỷ lệ phát hiện đa hình gen CYP2C19
và ITGB3 ở nhóm nghiên cứu

Chỉ số Giới	Gen CYP2C19		Gen ITGB3
	Đa hình CYP2C19*2	Đa hình CYP2C19*3	Đa hình PLA1/PIA2
Nam	16 (47,1%)	1 (2,5%)	3 (8,8%)
Nữ	2 (33,3%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)
Chung	21 (52,5%)		4 (10%)

Nhận xét: Kết quả ở bảng trên cho thấy, tỷ lệ các đa hình gen CYP2C19*2 và CYP2C19*3 ở nhóm nghiên cứu là tương đối lớn: có 52,5% bệnh nhân mang ít nhất 1 alen CYP2C19 làm giảm chức năng chuyển hóa clopidogrel. Bên cạnh đó cũng có 10% bệnh nhân

có đa hình gen ITGB3 liên quan đến đề kháng aspirin.

3.3. So sánh kết quả của kỹ thuật giải trình tự gen với kết quả của kỹ thuật realtime-PCR

So sánh kết quả của 2 kỹ thuật được trình bày dưới bảng sau

Bảng 3.3. So sánh kết quả realtime - PCR với giải trình tự gen

Mẫu	Kết quả 2 kỹ thuật giống nhau	Kết quả 2 kỹ thuật khác nhau	Mẫu	Kết quả 2 kỹ thuật giống nhau	Kết quả 2 kỹ thuật khác nhau
1	X		6	X	
2	X		7	X	
3	X		8	X	
4	X		9	X	
5	X		10	X	

Nhận xét: Kết quả xác định đa hình gen CYP2C19 và ITGB3 ở hai kỹ thuật là hoàn toàn giống nhau.

3.4. Tỷ lệ các đa hình gen CYP2C19 và ITGB3 ở nhóm nghiên cứu

Bảng 3.4. Kết quả xác định kiểu gen CYP2C19 và ITGB3 ở nhóm nghiên cứu

Gen	Tần số kiểu gen		
	Bình thường (%)	Dị hợp tử (%)	Đồng hợp tử đa hình (%)
CYP2C19*2 (G681A)	n = 22 (55%)	n = 14 (35%)	n = 4 (10%)
CYP2C19*3 (G636A)	n = 37 (92,5%)	n = 3 (7,5%)	n = 0 (0%)
PIA1/PIA2 (T1565C)	n = 36 (90%)	n = 4 (10%)	n = 0 (0%)

Nhận xét: Kết quả trên cho thấy, số bệnh nhân mang alen CYP2C19*2 chiếm tới 45%, chủ yếu có kiểu gen dị hợp tử

(35%), kiểu gen đồng hợp tử chiếm 10%. Có 7,5% bệnh nhân mang alen CYP2C19*3, đều có kiểu gen dị hợp tử.

Có 10% bệnh nhân mang alen PIA2 - đều có kiểu gen dị hợp tử.

4. BÀN LUẬN

Ngày nay, phương pháp ARMS-Realtime-PCR ngày càng được áp dụng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới đối với những bệnh có các đột biến điểm đã được biết trước. Phản ứng này dùng các mồi đặc hiệu có trình tự đầu 3' bổ sung với alen đột biến và một mồi chung ngược chiều với với mồi đặc hiệu alen. Sự có mặt của đột biến được thể hiện bằng sản phẩm ADN khuếch đại với các kích thước khác nhau đã biết trước. Đột biến được xác định kiểu gen bằng ARMS-realtime-PCR. Như vậy, để xác định được đột biến điểm, chúng ta phải thiết kế 3 mồi. Trong đó một mồi được sử dụng chung cho cả mẫu bình thường và mẫu có đột biến, có thể là mồi xuôi hoặc mồi ngược. Hai mồi còn lại có trình tự giống nhau, trừ vị trí nucleotid ở đầu tận cùng 3'. Mồi bình thường có trình tự nucleotid ở đầu tận cùng 3' bổ sung với trình tự ADN bình thường. Mồi đột biến có nucleotid ở đầu tận cùng 3' bổ sung với trình tự ADN có loại đột biến điểm đó. Theo nguyên tắc này, mồi bình thường chỉ khuếch đại đoạn ADN bình thường mà không khuếch đại đoạn ADN có đột biến, và ngược lại mồi đột biến chỉ khuếch đại đoạn ADN có đột biến mà không khuếch đại đoạn ADN bình thường. Do đó, phương pháp này chỉ thành công khi thiết kế được mồi đặc hiệu hoàn toàn với ADN đích ở đầu 3'. Sau khi thử nghiệm bộ kit ARMS-realtime-PCR của hãng Lytech, Nga và so sánh với kết quả giải trình tự gen, nhận thấy kỹ thuật ARMS-PCR không chỉ cho kết quả chính xác, mà còn rút ngắn thời gian xét nghiệm, quy trình kỹ thuật đơn giản. Bằng cách giảm thể tích kit tách DNA và thể tích máu tương ứng, chúng tôi nhận thấy vẫn có thể đạt nồng độ DNA và độ tinh sạch đảm bảo cho kỹ thuật ARMS - Realtime - PCR và giảm được giá thành xét nghiệm.

Bệnh mạch vành ngày càng gia tăng và chiếm tỉ lệ lớn trong các bệnh tim mạch nói riêng và mô hình bệnh tật nói chung. Liệu pháp chống kết tập tiểu cầu đóng vai trò thiết yếu trong điều trị hội chứng vành cấp và các thủ thuật can thiệp mạch vành qua da. Hiện nay, phương pháp điều trị phối hợp aspirin và clopidogrel được xem như liệu pháp kháng tiểu cầu chuẩn cho các bệnh lý này. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra sự đề kháng với aspirin và clopidogrel, làm giảm hiệu quả điều trị. Theo nghiên cứu của Boris T. và cs (2009), tỷ lệ không đáp ứng với aspirin dao động từ 5 - 60%, với clopidogrel 6 - 25% và cả hai thuốc là 10,4% [6]. Ở Việt Nam, Đỗ Quang Huân (2013) khi khảo sát 174 bệnh nhân mạch vành thấy tỷ lệ không đáp ứng với aspirin là 21,3%, với clopidogrel là 26,4% [7]. Như vậy, nghiên cứu về các yếu tố liên quan đến sự đề kháng clopidogrel và aspirin, đặc biệt yếu tố di truyền là rất cần thiết trong việc phòng và điều trị bệnh mạch vành.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 52,5% số bệnh nhân có mang ít nhất 1 alen CYP2C19 làm giảm khả năng chuyển hóa clopidogrel (CYP2C19*2 hoặc CYP2C19*3). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Liu Mao và cs (2013): có khoảng 55% người châu Á mang ít nhất 1 alen làm giảm hoạt tính của enzym CYP2C19 [8]. Trong đó, chủ yếu là các bệnh nhân có kiểu gen dị hợp CYP2C19*2 (14 bệnh nhân - 35%) và 3 bệnh nhân mang kiểu gen dị hợp CYP2C19*3 (7,5%). Như vậy, kiểu gen chuyển hóa ở mức trung bình (intermediate metabolizers) clopidogrel chiếm tỷ lệ tương đối lớn. Kiểu gen chuyển hóa kém (poor metabolizers) - đồng hợp CYP2C19*2 và đồng hợp CYP2C19*3 có 4 bệnh nhân (chiếm tỉ lệ 10% số bệnh nhân nghiên cứu). Theo khuyến cáo của Hội dược lý lâm sàng và điều trị Hoa Kỳ (ASCPT) năm 2013 về sử dụng thuốc chống ngưng tập tiểu cầu dựa

trên kiểu gen CYP2C19 [9], thì các BN có kiểu gen CYP2C19 chuyển hóa trung gian hoặc chuyển hóa kém cần xem xét tăng liều clopidogrel hoặc điều trị thay thế prasugrel, ticagrelor...

Ngoài ra, nghiên cứu của chúng tôi còn ghi nhận 4 bệnh nhân mang đa hình Leu33Pro gen ITGB3 (chiếm 10% số bệnh nhân nghiên cứu), tất cả các bệnh nhân đó đều có kiểu gen dị hợp tử PIA1/PIA2. Không có bệnh nhân mang kiểu gen đồng hợp tử PIA2/PIA2. Theo nghiên cứu của Sperr W. R. và cs (1998) trên người Châu Âu cho thấy 20 - 30% nhóm nghiên cứu mang kiểu gen PIA1/PIA2 và 1 - 3% mang kiểu gen PIA2/PIA2 [10]. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng kiểu gen PIA1/PIA2 và PIA2/PIA2 làm tăng phản ứng hoạt hóa thrombin hơn so với kiểu gen đồng hợp tử PIA1/PIA1, do đó làm giảm tác dụng chống kết tập tiểu cầu của aspirin, hay nói cách khác, người có mang alen PIA2 sẽ tăng khả năng kháng thuốc aspirin hơn. Nghiên cứu của Jussi M. và cs (2000) ở người Phần Lan cho thấy trong nhóm nghiên cứu có 73,1% mang kiểu gen PIA1/PIA1, 24,2% PIA1/PIA2 và 2,7% PIA2/PIA2 [11]. Nghiên cứu cũng chỉ ra mối liên quan chặt chẽ giữa alen PIA2 và sự gia tăng các biến cố tim mạch như huyết khối động mạch hoặc đột quỵ.

Với những kết quả nghiên cứu trên của chúng tôi, bước đầu cho thấy tỉ lệ mang đa hình gen CYP2C19 làm giảm khả năng chuyển hóa clopidogrel và đa hình gen ITGB3 làm giảm đáp ứng với aspirin ở nhóm bệnh nhân mạch vành Việt Nam là tương đối lớn, cần có sự quan tâm cần thiết từ phía các bác sĩ lâm sàng trước khi điều trị phác đồ chống kết tập tiểu cầu kép.

5. KẾT LUẬN

Tỉ lệ bệnh nhân mang đa hình gen CYP2C19 *2 và CYP2C19*3 ở nghiên cứu là 52,5%, tỉ lệ bệnh nhân mang đa hình Leu33Pro gen ITGB3 là 10%. Như vậy số

bệnh nhân có khả năng đáp ứng với clopidogrel và aspirin kém là tương đối lớn, cần có sự xác định kiểu gen để cân nhắc liều lượng thuốc, hoặc thay thế thuốc cho phù hợp trong phác đồ điều trị của từng bệnh nhân sau đặt stent ĐMV.

Kỹ thuật ARMS - realtime - PCR là phương pháp xác định đa hình gen nhanh chóng, chính xác và chi phí phù hợp với điều kiện Việt Nam, có khả năng ứng dụng tốt trong lâm sàng.

6. KIẾN NGHỊ

Qua kết quả nghiên cứu bước đầu về hoàn chỉnh và ứng dụng kỹ thuật ARMS - realtime - PCR để xác định đa hình gen CYP2C19 và ITGB3 ở bệnh nhân mạch vành, nhận thấy cần đưa xét nghiệm này trở thành thường quy để xác định kiểu gen liên quan đến chuyển hóa thuốc clopidogrel và aspirin trước khi điều trị cho nhóm bệnh nhân này.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện tại trường Đại học Y Hà Nội, trong thời gian từ tháng 6/2016 - tháng 2/2017, với sự hỗ trợ của các đồng nghiệp tại Bộ môn Y sinh học - Di truyền.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Rosamond W, Flegal K, Furie K et al. (2008) Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* ;117: e25-146.
2. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM et al. (2010) Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* ;121: 948-954.
3. Carlo Patrono, Barry Collier, Garret A. FitzGerald et al (2004). Platelet-Active Drugs: The Relationships Among Dose, Effectiveness, and Side Effects. *CHEST* 2004; 126:234S-2264S.
4. Newman PJ., Derbes RS., Aster RH. (1989). The human platelet alloantigens, PI(A1) and PI(A2), are associated with a

leucine(33)/proline(33) amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. J. Clin. Invest. 83: 1778-1781.

5. Mega JL., Close SL., Wiviott SD. et al (2009). Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. N Engl J Med, 360(4), pp. 354-362.

6. Boris TL., Mareike Sausemuth HI., Evangelos G. et al (2009). Dual Antiplatelet Drug Resistance Is a Risk Factor for Cardiovascular Events after Percutaneous Coronary Intervention. Clinical Chemistry. 55: 1171-1176.

7. Đỗ Quang Huân, Hồ Tấn Thịnh (2013). Tỷ lệ không đáp ứng với điều trị thuốc chống kết tập tiểu cầu trên bệnh nhân được can thiệp động mạch vành qua da. Tạp chí Y học thực hành (878), số 8/2013, tr 9-13.

8. Liu Mao et al (2013). Cytochrome

CYP2C19 polymorphism and risk of adverse clinical events in clopidogrel-treated patients: A meta-analysis based on 23035 subjects. Archives of Cardiovascular Disease. 106: 517-527.

9. Scott S. A., Sangkuhl K., Stein C. M. et al (2013). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. Clin Pharmacol Ther. 94(3), p. 317-323.

10. Sperr W. R., Huber K., Roden M. et al (1998). Inherited platelet glycoprotein polymorphisms and a risk for coronary heart disease in young central Europeans. Thromb Res. 90: 117-123.

11. Jussi Mikkelsen, Markus Perola et al (2000). Glycoprotein IIIa PIA1/A2 polymorphism and sudden cardiac death. Journal of American College of Cardiology. Vol 36, No 4, p 1317 - 1323.

SUMMARY

ARMS - REALTIME - PCR APPLICATION FOR DETERMINE POLYMORPHISM OF CYP2C19 AND ITGB3 GENE IN CLINICAL DIAGNOSTIC CLOPIDOGREL AND ASPIRIN RESISTANCE IN PATIENTS PLACED CORONARY STENT

Nguyen Thi Minh Ngoc¹, Trieu Tien Sang², Nguyen Thi Trang¹

¹Ha Noi Medical University

²Vietnam Military Medical University

Coronary artery disease (CAD) is the most common type of heart disease. It is the leading cause of death in the World in both men and women. Numerous studies have shown that the polymorphisms of CYP2C19*2, CYP2C19*3 gene CYP2C19 and PIA1/PIA2 (Leu33Pro) of the ITGB3 gene are associated with clopidogrel and aspirin resistance. DNA was extracted from 40 patients. Using ARMS - realtime - PCR technique to identify polymorphisms CYP2C19*2, CYP2C19*3 gene CYP2C19 and PIA1/PIA2 (Leu33Pro) gene ITGB3. **Results:** In 40 samples, carriers of at least one CYP2C19 loss-of-function approximately 52,5% of the study population. CYP2C19*2: 10% homozygous genotype, 35% heterozygous genotype and 55% wild type. CYP2C19*3: 7,5% heterozygous genotype and 92.5% wild type. Carriers of the Leu33Pro polymorphism of ITGB3 gene approximately 10% of the study population. **Conclusions:** Initial description of polymorphisms of CYP2C19*2, CYP2C19*3 gene CYP2C19 and PIA1/PIA2 (Leu33Pro) gene ITGB3 have been found to be high rate in patient group used clopidogrel and aspirin dual therapy. In this article, we describe commonly used ARMS-realtime - PCR as well as the application of these technology to the genetic diagnosis of resistance aspirin and clopidogrel.

Keywords: coronary artery disease, CYP2C19, clopidogrel, ITGB3, aspirin resistance.