

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ НЕПРЕРЫВНОГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Мирзаев Карин Бадавиевич

**Персонализация антиагрегантной терапии у пациентов
с сердечно-сосудистыми заболеваниями на основе молекулярных
биомаркеров**

14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология

14.01.04 - Внутренние болезни

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Сычев Дмитрий Алексеевич

доктор медицинских наук, профессор
Андреев Денис Анатольевич

Москва - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ АНТИАГРЕГАНТНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И ПОДХОДЫ К ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ТЕРАПИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	20
1.1. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и социально- экономическое бремя для систем здравоохранения	20
1.2. Значение тромбоцитов в патогенезе тромботических осложнений сердечно- сосудистых заболеваний и методы оценки их активности	23
1.3. Проблема вариабельности ответа на антиагрегантную терапию ингибиторами P2Y ₁₂ -рецепторов	35
1.4. Проблема прогнозирования индивидуального ответа на антиагрегантную терапию ингибиторами P2Y ₁₂ -рецепторов.....	40
1.4.1. Фармакогенетика ингибиторов P2Y ₁₂ -рецепторов.....	40
1.4.2. Фармакоэпигенетика ингибиторов P2Y ₁₂ -рецепторов.....	57
1.4.3. Фармакометаболизм ингибиторов P2Y ₁₂ -рецепторов	63
1.5. Распространенность в Российской Федерации некоторых клинически значимых фармакогенетических биомаркеров прогнозирования индивидуального ответа на антиагрегантную терапию	69
1.6. Преимущества биоинформатических методов для разработки алгоритмов прогнозирования индивидуального ответа на антиагрегантную терапию.....	86
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	89
2.1. Дизайн исследования и характеристика клинических подгрупп, включенных в исследование	89
2.2. Описание методов измерения остаточной активности тромбоцитов	96
2.2.1. Методика оптической детекции измерения агрегации тромбоцитов тромбоцитов на приборе VerifyNow	96

2.2.2. Методика измерения агрегации тромбоцитов светоптическим агрегометром Helena BioSciences	97
2.2.3. Методика определения носительства фармакогенетических биомаркеров (ПЦР в реальном времени, экзомное секвенирование)	98
2.2.4. Методика секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS)	99
2.2.5. Методика определения уровня циркулирующих в плазме микро-РНК (количественная ПЦР)	100
2.2.7. Методика измерения минимальной равновесной концентрации тикагрелора и клопидогрела с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией	102
2.2.8. Методика измерения метаболической активности системы изоферментов CYP3A4/CYP3A5 с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией	103
2.3. Статистическая обработка результатов	104
2.3.1. Методы основного статистического анализа результатов исследования....	104
2.3.2. Методы биоинформатического анализа и машинного обучения для прогнозирования индивидуального ответа антиагрегантную терапию ингибиторами P2Y ₁₂ -рецепторов	105
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТИКАГРЕЛОРА И КЛОПИДОГРЕЛА У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ НАРУШЕНИЯМИ	107
3.1. Клинико-демографическая и лабораторно-инструментальная характеристика изучаемых групп	107
3.1.1. Пациенты с ОКС, получающие двойную антиагрегантную терапию АСК и тикагрелором или клопидогрелом.....	107
3.1.2. Пациенты с ОКС и фибрилляцией предсердий, получающие антиагрегантную терапию клопидогрелом в сочетании с ривароксабаном.....	113

3.1.3. Пациенты с ишемическим инсультом, получающих антиагрегантную терапию клопидогрелом	116
3.2. Изучение вариабельности фармакологического ответа на ингибиторы P2Y ₁₂ -рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.....	119
3.2.1. Оценка агрегации тромбоцитов пациентов на фоне применения клопидогрела у пациентов с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями	119
3.2.2. Оценка вариабельности динамики остаточной агрегации тромбоцитов на фоне применения клопидогрела у пациентов с острым ишемическим инсультом.....	122
3.2.3. Определение терапевтического диапазона агрегации тромбоцитов на фоне применения тикагрелора у пациентов с острым коронарным синдромом.....	124
3.3. Оценка возможности фармакогенетических биомаркеров прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y ₁₂ -рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями	125
3.3.1. Оценка влияния носительства фармакогенетических маркеров на антиагрегантное действие клопидогрела у пациентов с ОКС	126
3.3.2. Оценка влияния фармакогенетических маркеров на антиагрегантное действие клопидогрела и клинические исходы при его совместном применении с ривароксабаном	129
3.3.3. Оценка влияния носительства отобранных в исследовании фармакогенетических маркеров на антиагрегантное действие клопидогрела у пациентов с ишемическим инсультом	132
3.3.4. Оценка влияния носительства отобранных в исследовании фармакогенетических маркеров на антиагрегантное действие тикагрелора у пациентов с острым коронарным синдромом	135
3.3.5. Поиск новых фармакогенетических маркеров развития кровотечений при совместном применении клопидогрела и ривароксабана с применением экзомного секвенирования у пациентов с геморрагическими осложнениями	137

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ РОЛИ ФАРМАКОЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ И ФАРМАКОМЕТАБОЛОМНЫХ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРОВ P2Y12- РЕЦЕПТОРОВ	140
4.1. Оценка возможности фармакоэпигенетических биомаркеров прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y12 рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями	140
3.6. Оценка возможности фармакометаболомных биомаркеров прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y12 рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.....	145
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОПУЛЯЦИОННО-ЭТНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	148
5.1. Здоровые добровольцы, включенные в популяционно-этническое исследование	148
5.2. Изучение частоты носительства клинически значимых фармакогенетических маркеров, ассоциированных с индивидуальными особенностями фармакологического ответа на ингибиторы P2Y12-рецепторов, в различных этнических группах Российской Федерации (мультиэтнический фармакогенетический анализ)	150
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ОТВЕТА НА ИНГИБИТОРЫ P2Y12-РЕЦЕПТОРОВ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО- СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ	159
6.1. Результаты регрессионного анализа по выявлению значимых факторов прогнозирования ответа на ингибиторы P2Y12-рецепторов.....	159
6.2. Результаты биоинформатического анализа по выявлению значимых факторов прогнозирования ответа на ингибиторы P2Y12-рецепторов.....	159
6.3. Схема персонализации применения ингибиторов P2Y12-рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями	162
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	165

ВЫВОДЫ.....	172
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	175
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	176
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	178

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) в настоящее время занимают лидирующее позиции среди причин смертности во многих странах мира. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2017 год ежегодно от ССЗ умирает 17,5 миллионов человек в мире или 31 % случаев смерти в процентном отношении [ВОЗ, 2017]. По данным Европейского общества кардиологов за 2019 год (European Society of Cardiology - ESC) в странах членах ESC на ССЗ приходится 3,1 миллион летальных исходов в год [Timmis A, et al., 2020]. Из них ИБС и инсульт составляют 44% и 21% среди всех причин смерти среди мужчин и 38 % и 26% среди женщин, соответственно [Timmis A, et al., 2020]. По данным Росстата за 2018 год суммарная смертность от ССЗ в Российской Федерации составляет 856,1 тысячи человек, что составляет 46,8 % от всех причин смертности за указанный год [Росстат, 2019]. Из них на ИБС приходится 453,3 тысяч человек, в том числе на инфаркт миокарда 56,9 тысяч, и на цереброваскулярные заболевания 263,6 тысяч человек [Росстат, 2019].

В патогенезе развития инфаркта миокарда, чаще всего, лежат разрыв или эрозия атеросклеротической бляшки, что сопровождается тромбообразованием и дистальной эмболизацией и окклюзией коронарной артерии [Kerry L. et al., 2018]. Тромбоциты играют важную роль в патогенезе тромботических осложнений: инфаркта миокарда (ИМ), ишемического инсульта и окклюзии периферических артерий [Prabhu S et al., 2011]. Антитромбоцитарная терапия, включающая блокатор P2Y₁₂-рецептора, является важным компонентом лечения больных с инфарктом миокарда и ишемическим инсультом [Collet JP, et al., 2020]. Одной из клинических проблем в процессе лечения пациентов с ССЗ является вариабельность ответа на блокаторы P2Y₁₂-рецепторов. По данным зарубежных авторов, число больных со сниженным ответом к блокаторам P2Y₁₂-рецепторов достигает 20-40%, а доля пациентов, кровотечениями – до 11% [Brandt et al., 2007]. В подобной вариабельности ответа на антиагреганты большое значение придается генетическим, метаболомным и эпигенетическим факторам.

На эффективность клопидогрела могут влиять гены, кодирующие транспортеры, ферменты метаболизма, участвующие в биоактивации клопидогрела, а так же белки на поверхности тромбоцитов: ABCB1, CES1, PON1, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A5, CYP3A4, P2RY12 и ITGB3 [Mega et al., 2010]. Метаболизм тикагрелора в печени осуществляется ферментами CYP3A4 и CYP3A5, причем в отличие от клопидогрела он не требует активации для осуществления антиагрегантного эффекта [Varenhorst et al., 2015, Zhou et al., 2011]. Перспективными для изучения фармакогенетики тикагрелора могут стать гены, кодирующие : ферменты CYP3A4 и CYP3A5, транспортер OATPB1, и УДФ-глюкуронилтрансфераза 2B7. [Varenhorst et al., 2015]. На сегодня проведено относительно небольшое количество фармакогенетических исследований по тикагрелору. В полногеномном ассоциативном анализе (GWAS), проведенном на участниках крупного исследования PLATO (PLATelet inhibition and patients Outcome), было доказано влияние полиморфизмов генов CYP3A4, SLCO1B1 и UGT2B7 на фармакокинетические параметры тикагрелора. Но данные ассоциации носили умеренный характер, и достоверных связей полиморфизмов генов с клинической эффективностью и безопасностью тикагрелора выявлено не было [Varenhorst et al., 2015]. Все приведенные факты указывают, что важно учитывать не только генетику, но и другие индивидуальные биомаркеры пациента. Несмотря на многочисленные исследования в области персонализации фармакотерапии антитромботическими препаратами на основе прогнозирования фармакокинетики на уровне ферментов биотрансформации и транспортеров, вопрос подбора эффективной и безопасной антиагрегантной терапии остается актуальным. Соответственно важное значение имеет изучение новых перспективных маркеров повышения эффективности и безопасности лечения атнтитромбоцитарными препаратами.

Новым перспективным инструментом персонализации терапии антитромбоцитарными препаратами у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями является исследование эпигенетических маркеров: некодирующих РНК, таких как микроРНК (microRNA) и их роли в регуляция экспрессии генов и

прогнозировании эффективности и безопасности лекарственных средств. Недавние исследования показали, что различные формы микроРНК могут быть использованы как новый эпигенетический биомаркер прогнозирования индивидуального фармакологического ответа на антиагреганты: плазменный уровень специфических микроРНК в крови связан со степенью активации тромбоцитов, что может быть использовано в качестве биомаркера при оценке эффективности антиагрегантной терапии. В работе Chen et al. были изучены специфические маркёры микроРНК тромбоцитов, ассоциированные с возникновением и развитием резистентности к клопидогрелу: экспрессия микроРНК-26а в тромбоцитах значимо повышена у пациентов недостаточным ответом на терапию клопидогрелом. МикроРНК-223 может регулировать экспрессию рецептора P2Y₁₂ и снижение уровня микроРНК-223 связано с нарушением ответа на клопидогрел. Таким образом микроРНК-223 может служить новым маркёром при оценке уровня ингибирования рецептора P2Y₁₂. Специфичные микроРНК ингибируют трансляцию белков семейства CYP P450 путем воздействия на одноименные гены, что приводит у нарушению фармакологического ответа препаратов, метаболизирующихся соответствующим изоферментом семейства CYP P450 [Vachirayonstien and Yan, 2016, Pan et al., 2009 Vuppalanchi et al., 2013]. К примеру, miR-130b влияет на экспрессию сразу нескольких ферментов: CYP2C9, CYP2A6, CYP2C19 [Rieger et al., 2015]. Кроме того, обнаружено, что уровни CYP2C19 в клетках печени демонстрировали негативную корреляцию с уровнем микроРНК hsa-miR-29a-3p.

Перспективным направлением персонализации терапии антитромбоцитарными препаратами может стать также исследование прогностической роли фармакометаболических маркеров, в том числе концентрации лекарственных препаратов и их метаболитов, концентрации эндогенных субстратов изоферментов цитохрома P-450 и их метаболитов в различных биологических жидкостях [Arrhen YM 2012; Luo X, 2009;]. В исследовании Lau WC, и др., среди больных, перенесших ОКС с ЧКВ и здоровых добровольцев, была выявлена значимая обратная корреляция между активностью изофермента

CYP3A4, измеренной методом эритромицинового дыхательного теста, и остаточной активностью тромбоцитов [$r=-0,6$; $p=0,003$]. Перспективным неинвазивным методом оценки активности CYP3A4 является оценка отношения концентрации 6-бета-гидрокортизола к свободному кортизолу в утренней моче [S. Micuda 2007]. В предыдущих исследованиях было показано, что уровень 6-бета-гидрокортизол значимо ассоциирован с гидроксилазной активностью CYP3A4 и содержанием данного изофермента в печени [Ged et al. 1989]. С учетом того, что CYP3A4 является значимым изоферментом в биотрансформации клопидогрела и тикагрелора, измерение отношения концентрации 6-бета-гидрокортизола к кортизолу в утренней моче, как маркер степени индукции или ингибирования фермента CYP3A4, может внести важный вклад в прогнозирование фармакокинетики и клинической эффективности ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Таким образом, проблема персонализации антитромботической терапии является недостаточно разработанной и необходимо проводить комплексное исследование, включающее измерение активности изоферментов цитохрома P450, генотипирование, оценку фармакокинетических и фармакодинамических параметров лекарственного препарата, а также анализ уровня экспрессии генов на основе циркулирующей микроРНК.

Степень разработанности проблемы

На сегодняшний день отсутствуют доказанные инструменты и алгоритмы, позволяющие с высокой точностью предсказывать ответ на антиагрегантную терапию у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Несмотря на отдельные успехи в области фармакогенетики ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов, данные маркеры не могут объяснить в полной мере вариабельность ответа на отдельные препараты и существует нехватка исследований по поиску и валидации новых омиксных биомаркеров: фармакоэпигенетических, фармакометаболических. Кроме того, с учетом накопления большого количества данных по характеристике пациентов (клинические, демографические, генетические, эпигенетические,

метаболомные и тд.) для обработки этих данных требуется применением методов машинного обучения.

Организация и проведение подобных исследований позволит разработать комплексный подход к прогнозированию ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Цель исследования

Повышение эффективности и безопасности антиагрегантной терапии путем персонализации применения ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями на основе фармакогенетических, фармакоэпигенетических, фармакометаболомных биомаркеров.

Задачи исследования

1. Изучить вариабельность фармакологического ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с острым коронарным синдромом, перенесших чрескожное коронарное вмешательство, пациентов с острым коронарным синдромом в сочетании с неклапанной фибрилляцией, пациентов с ишемическим инсультом:
 - 1.1. Оценить распространенность и «выхода» показателя агрегации тромбоцитов пациентов за пределы «терапевтического диапазона» на фоне применения клопидогрела у пациентов с острым коронарным синдромом, острым коронарным синдромом в сочетании с неклапанной фибрилляцией, ишемическим инсультом.
 - 1.2. Спрогнозировать «терапевтический диапазон» агрегации тромбоцитов на фоне применения тикагрелора и распространенность «выхода» показателя агрегации тромбоцитов за пределы терапевтического диапазона у пациентов с острым коронарным синдромом.
2. Оценить возможности фармакогенетических биомаркеров прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с острым коронарным синдромом, перенесших

чрескожное коронарное вмешательство, пациентов с острым коронарным синдромом в сочетании с неклапанной фибрилляцией предсердий, пациентов с ишемическим инсультом.

3. Провести поиск новых фармакогенетических маркеров риска развития кровотечений при комбинированном применении клопидогрела и ривароксабана у пациентов острым коронарным синдромом в сочетании с неклапанной фибрилляцией предсердий.
4. Изучить частоту носительства клинически значимых фармакогенетических биомаркеров, ассоциированных с индивидуальными особенностями фармакологического ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов в различных этнических группах Российской Федерации (мультиэтнический фармакогенетический анализ).
5. Оценить возможности фармакоэпигенетических биомаркеров (микроРНК) прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с острым коронарным синдромом, перенесших чрескожное коронарное вмешательство:
6. Оценить возможности фармакометаболических биомаркеров (плазменной концентрации клопидогрела, тикагрелора и его метаболита, уровня активности изоферментов CYP3A4/CYP3A5) прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с острым коронарным синдромом, перенесших чрескожное коронарное вмешательство, пациентов с острым коронарным синдромом в сочетании с неклапанной фибрилляцией предсердий:
7. Разработать схему прогнозирования индивидуального фармакологического ответа ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов на основе биоинформатических методов анализа.

Научная новизна

В исследовании впервые:

- 1) выявлены новые фармакогенетические биомаркеры, ассоциированные с кровотечениями у пациентов с острым коронарным синдромом в сочетании с неклапанной фибрилляцией предсердий, получающих антиагрегантную и антикоагулянтную терапию;
- 2) доказана ассоциация ряда микроРНК с концентрацией тикагрелора и его метаболита в плазме у пациентов острым коронарным синдромом;
- 3) предложены новые границы терапевтического окна для оценки ответа на тикагрелор у пациентов с острым коронарным синдромом;
- 4) доказана ассоциация новых фармакогенетических биомаркеров с неблагоприятными клиническими исходами у пациентов с острым коронарным синдромом в сочетании с неклапанной фибрилляцией предсердий;
- 5) впервые разработан алгоритм прогнозирования ответа на тикагрелор у пациентов с острым коронарным синдромом и алгоритм прогнозирования риска смерти от всех причин на основе технологии машинного обучения для выявления наиболее значимых клинико-демографических фармакогенетических, фармакоэпигенетических, фармакометаболических факторов у пациентов с острым коронарным синдромом в сочетании с фибрилляцией предсердий;
- 6) предложена схема персонализации назначения ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов

Практическая значимость работы

Результаты исследования вносят важный вклад в совершенствование подходов к прогнозированию антиагрегантного ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов, в том числе использованию новых перспективных омиксных биомаркеров предикции ответа. Полученные в исследовании результаты могут быть использованы для разработки рекомендаций по созданию комплексных алгоритмов персонализации лечения больных с показаниями для ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов. Данные алгоритмы могут быть успешно встроены в

существующие медицинские информационные системы (МИС) и выступать в качестве полезного инструмента системы поддержки принятия решения (СППР). Внедрение подобных алгоритмов через синхронизацию с МИС в позволит подходить более индивидуализированно к лечению каждого больного с сердечно-сосудистой патологией, с учетом его генетических, расово-этнических, клинικο-демографических, фенотипических особенностей. В конечном счете, это позволит повысить эффективность и безопасность лечения больных сердечно-сосудистыми заболеваниями. Кроме перечисленных преимуществ, персонализированная или индивидуализированная терапия позволит избежать тяжелого социально-экономического бремени немалых расходов на коррекцию последствий неэффективности препарата или развития осложнений лекарственной терапии.

Методология и методы исследования

Для оценки эффективности терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов применялись светооптические методы оценки агрегации тромбоцитов: прикроватной оценки активности тромбоцитов — VerifyNow P2Y₁₂ («Accumetrics», США) и стандартный турбодиметрический метод (Helena BioSciences Europe, Великобритания). В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали АДФ.

Риск сердечно-сосудистых осложнений оценен международными валидизированными шкалами: сердечно-сосудистых осложнений - по шкале GRACE, риск кровотечений - по шкале CRUSADE, BARC. Тяжесть неврологической симптоматики у пациентов с инсультом будет оценена по шкале инсульта Национального института здоровья (National Institutes of Health Stroke Scale – NIHSS), степень нетрудоспособности – по шкале Рэнкина (UK-TA Study), индекс мобильности – по шкале Ривермид, степень риска повторного инсульта по шкале риска повторных сердечно-сосудистых осложнений (The Essen Stroke Risk Score -ESRS).

Определение аллелей ABCB1 (rs1045642), ABCG2 (rs2231142), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367), CYP2C19 (*2 - rs4244285, *3 - rs4986893, *17 -

rs12248560), CYP2B6 (rs2279343), CES1 (rs2244613), PON1 (rs662), PEAR1 (rs57731889, rs822442, rs41273215), IGTB3 (rs5918T), P2Y12 (rs3732759, rs2046934), CYP4F2 (rs2108622), B4GALT2 (rs1061781)? SLCO1B1 (rs4149056), UGT2B7 (rs61361928) для клинической и популяционно-этнической части проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с учетом простоты метода и приемлемой чувствительности и специфичности.

Определение микроРНК miR-126, микроРНК -150, микроРНК -223, микроРНК -142, микроРНК -34а, микроРНК -29а-3р проводилось методом количественно полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Этническую принадлежность участников популяционно-этнической части исследования устанавливали с помощью метода самоидентификации. Критерием включения являлось самоопределение не менее чем в двух поколениях: участник и оба родителя были представителями одной этнической группы. В исследование не включали потомков межэтнических браков.

Определение минимальной равновесной концентрации тикагрелора, метаболита тикагрелора, клопидогрела и активности системы изоферментов CYP3A4/5 проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс спектрометрической детекцией (ВЭЖХ МС/МС) путем оценки уровней препарата в плазме перед очередной дозой через 5 периодов полувыведения и концентрации 6-β-гидрокортизола к концентрации кортизола в утренней моче, соответственно.

Прогностическая оценка клинико-демографических, лабораторно-инструментальных фармакогенетических, фармакоэпигенетических и фармакометаболических параметров эффективности и безопасности терапии ингибиторами P2Y12-рецепторов использованы установленные методы статистики (параметрические и непараметрические). Используемые модели машинного обучения для предсказания агрегации и клинических исходов: регрессионной линейной модели, регрессионной модели случайного леса, пуассоновской регрессии, Support Vector, Machine, Random Forest, Gradient Boosting algorithms, CatBoost.

Положения, выносимые на защиту

1. Фармакогенетическое тестирование по маркеру rs4244285 гена CYP2C19 и rs2046934 гена P2Y12, прогнозирует резистентность к клопидогрелу у пациентов с острым коронарным синдромом и ишемическим инсультом, соответственно. Фармакогенетическое тестирование по маркеру rs2108622 гена CYP4F2 и rs41273215 гена PEAR1 прогнозирует геморрагические осложнения на фоне клопидогрела у пациентов с ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий. Полученные данные позволяют использовать фармакогенетическое тестирование по данным маркерам для прогнозирования эффективности клопидогрела с целью персонализации антитромбоцитарной терапии указанных сердечно-сосудистых заболеваний.
2. Выявлены методом секвенирования нового поколения однонуклеотидные замены в генах CES1 (rs3826193, rs3826192, rs62028647, rs3826191, rs74019278, rs76828834), P2Y12 (rs6785930) и ABCG2 (rs2231148), ассоциированные с развитием кровотечений антитромботической терапии (клопидогрел+ривароксабан) у пациентов с острым коронарным синдромом в сочетании с фибрилляцией предсердий, что подтверждает целесообразность изучения фармакогенетического тестирования по данным маркерам для прогнозирования безопасности антитромботической терапии (клопидогрел+ривароксабан) у пациентов с острым коронарным синдромом в сочетании с фибрилляцией предсердий.
3. Частота клинически значимых аллелей ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP2C19 (rs4244285, rs4986893, rs12248560), CYP2C9 (rs1799853, rs1057910), CES1 (rs2244613), CYP4F2 (rs2108622), SLCO1B1 (rs4149056) демонстрирует, что носительство маркеров, ассоциированных с резистентностью к клопидогрелу и тикагрелору – неоднородно. Для выявления основного паттерна распространенности конкретных аллелей в дальнейших исследованиях требуется построение геногеографических карт, что позволит выявить популяционно-этнические особенности

чувствительности к ингибиторам P2Y₁₂-рецепторов в различных этнических группах Российской Федерации.

4. Установлено, что оценка плазменного уровня микроРНК-126, микроРНК-150, микроРНК-223, прогнозирует остаточную реактивность тромбоцитов на фоне тикагрелора, но не клопидогрела, что подтверждает целесообразность использования данных маркеров при разработке схем персонализации терапии ингибиторам P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с ОКС.
5. Выявлено отсутствие ассоциации фармакологического ответа на клопидогрел и тикагрелор с минимальной равновесной концентрацией тикагрелора, метаболита тикагрелора, клопидогрела, активностью системы CYP3A4/5, что свидетельствует о нецелесообразности использования данных фармакометаболических маркеров для прогнозирования эффективности и безопасности терапии ингибиторам P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с ОКС.

Внедрение в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую работу НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Личный вклад соискателя

Автор непосредственно участвовал в планировании исследования, осмотре пациентов и проспективном наблюдении, наборе биоматериала, анализе фармакогенетических, фармакоэпигенетических, фармакометаболических биомаркеров, анализе и интерпретации результатов исследования.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Диссертационное исследование «Персонализация антиагрегантной терапии у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями на основе молекулярных биомаркеров» соответствует формуле специальности 14.03.06. - Фармакология, клиническая фармакология и областям исследований: п. N 4 «Исследование

взаимодействий между организмом и лекарственными средствами, изучение их фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция фармакологических параметров с биологических моделей на человека», п. N 6 «Исследование фармакодинамики лекарственных средств в клинике, включая оценку чувствительности возбудителей, вызывающих различные заболевания у человека, к химиопрепаратам», п. N 7 «Исследование фармакокинетики лекарственных средств у здоровых добровольцев и пациентов», п. N 14 – «Исследование нежелательного действия лекарственных средств, разработка методов их профилактики и коррекции»; п. N 18 – «Разработка и оптимизация методов фармакотерапии и профилактики заболеваний у различных групп пациентов с учетом их индивидуальных особенностей, включая исследование приверженности фармакотерапии (комплаентности)»; соответствует формуле специальности 14.01.04 - Внутренние болезни и области исследований: п. N 4. «Изучение механизмов действия, эффективности и безопасности лекарственных препаратов и немедикаментозных способов воздействия»

Научные публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 23 печатные работы, в том числе:

- Научных статей, отражающих основные результаты диссертации – 20 статей, из них:
- в изданиях из перечня Университета/ Перечня ВАК при Минобрнауки – 3 статьи.
- в изданиях, включенных в международные базы данных: Scopus – 17 статей.
- Обзорных статей – 2, а также 1 письмо.

Структура и объем диссертации

Объем диссертационной работы составляет 214 страниц машинописного текста, в том числе 34 таблицы и 39 рисунков. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов собственного исследования, обсуждения полученных результатов, заключения,

выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Список литературы включает 300 источников.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ АНТИАГРЕГАНТНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И ПОДХОДЫ К ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ТЕРАПИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и социально-экономическое бремя для систем здравоохранения

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) в настоящее время занимают лидирующее позиции среди причин смертности во многих странах мира. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2017 год ежегодно от ССЗ умирает 17,5 миллионов человек в мире или 31 % случаев смерти в процентном отношении [1]. На 2019 год эта цифра, согласно опубликованным данным, может достигать уже 18,6 миллионов смертей в год с наиболее высокими показателями смертности от ССЗ в странах Восточной Европы и Центральной Азии [2]. При этом заболевания сердца составляют около 16 % от всех случаев смертности по общемировой статистике [1], а число смертей от цереброваскулярных заболеваний в мире в 2019 составляет 6,6 миллионов человек [2].

Сердечно-сосудистые заболевания составляют 45% смертей в Европе и 37 % смертельных исходов в странах Европейского союза [3]. По данным Европейского общества кардиологов за 2019 год (European Society of Cardiology - ESC) в странах членах ESC на ССЗ приходится 3,1 миллион летальных исходов в год [4]. Из них ИБС и инсульт составляют 44% и 21% среди всех причин смерти среди мужчин и 38 % и 26% среди женщин, соответственно [4]. Число вновь выявленных случаев ИБС и инсульта в странах членах ESC за 2017 год составляет 3,6 и 2,3 миллионов случаев, соответственно [4], или 176,3 и 143,4 случая на 100 000 населения, соответственно.

В Соединенных Штатах Америки (США) от осложнений ССЗ в 2018 году умерло 868 662 человек [5]. Из них на ИБС и инсульт приходится 365 914 и 147 810 смертей в год, соответственно [5]. По данным США за 2018 год на ИБС и инсульт

приходится 42,1 % и 17 % смертей от ССЗ, соответственно [5]. Согласно отчетам по смертности от инсульта в США за 2016 год, в среднем от инсульта умирает 1 человек каждые 3 минуты 33 секунды [5]. Число пациентов с ИБС и инсультом в США за 2015-2018 годы составляет 20,1 и 7,6 миллионов случаев, соответственно [5].

По данным Росстата за 2018 год суммарная смертность от ССЗ в Российской Федерации составляет 856,1 тысячи человек, что составляет 46,8 % от всех причин смертности за указанный год [6]. Из них на ИБС приходится 453,3 тысяч человек, в том числе на инфаркт миокарда 56,9 тысяч, и на цереброваскулярные заболевания 263,6 тысяч человек [6]. Число пациентов с ИБС и цереброваскулярными заболеваниями в Российской Федерации за 2018 год составляет 7 817,8 тысяч, в том числе на инфаркт миокарда 161,3 тысяч, и 7 209,5 тысячи случаев, соответственно [6]. Из них число вновь выявленных случаев ИБС, инфаркт миокарда и цереброваскулярных заболеваний составляет 1042,8, 161,3 и 1137,2 тысячи случаев, соответственно [6], что в пересчете на 100 тысяч населения составляет 710,2, 138,2 и 974,2.

С учетом высоких показателей смертности и заболеваемости, ССЗ ложатся серьезным социально-экономическим бременем на системы здравоохранения различных стран мира. По данным за 2016 в странах Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) на ССЗ составляют не менее 10% расходов системы здравоохранения [4,7]. Кроме того, на ССЗ приходится наибольший объем расходов при оказании стационарной помощи и лекарственном обеспечении [4,7].

Согласно данным за 2015 год расходы на ССЗ в странах Европейского союза составляют 210 миллиардов евро, в том числе 111 миллиардов евро прямых расходов системы здравоохранения и 99 миллиардов евро расходов, связанных с потерей трудоспособности и уходом за больными ССЗ [4]. Из них расходы на лечение ИБС и цереброваскулярных заболеваний составляют около 59 и 45 миллиардов евро [4]. Расходы на лечение ССЗ в странах Европейского союза в расчете на душу населения варьируются от 48 тысяч до 365 тысяч евро. В Англии, Франции и Германии прямые и косвенные расходы на ССЗ за 2018 год составляют

почти 6%, 10% и 13% общего бюджета системы здравоохранения и равны 15,8 миллиардов фунтов стерлингов, 15,1 и 34,7 миллиардов евро в год, соответственно [4].

В США на прямые и косвенные расходы на ССЗ за 2017 год составляют 363,4 миллиардов долларов, из них на болезни сердца приходится 219 миллиардов долларов [5].

В Российской Федерации прямые и косвенные расходы экономические потери от ССЗ за 2016 год равны 2,7 триллионам рублей, в том числе прямые расходы 220 миллиардов рублей [8,9]. Из них 1 триллион рублей на ИБС, 424 миллиарда рублей на инсульты и 213,2 миллиарда на инсульты [8,9]. Коэффициенты смертности населения от ССЗ в трудоспособном возрасте в Российской Федерации по данным за 2018 год составляет 147,0 на 100 тысяч населения. Из них на различные формы ИБС, в том числе инфаркт миокарда и цереброваскулярные заболевания приходится 66,2, 11,8 и 29,2 на 100 тысяч населения, соответственно. ССЗ составляют

Таким образом ССЗ, особенно различные формы ИБС и цереброваскулярные заболевания, являются актуальной серьезной проблемой современной медицины в связи с высокой смертностью, заболеваемостью, потерей трудоспособности и тяжелым социально-экономическим бременем, которые они несут для большинства систем здравоохранения стран мира. Как показывают опубликованные отчетные данные, показатели смертности, заболеваемости, в том числе число вновь выявленных случаев ССЗ в Российской Федерации превышают аналогичные средние показатели по другим европейским странам за 2017-2018 годы. Повышение эффективности и безопасности фармакотерапии ССЗ заболеваний, является краеугольным камнем в борьбе с ССЗ и профилактике развития их осложнений, что в конечном счете может способствовать увеличению продолжительности и повышению качества жизни пациентов с данной группой нозологий. Кроме того, максимальная эффективная фармакотерапия с минимальным количеством нежелательных лекарственных реакций может снизить расходы системы здравоохранения на ССЗ и коррекцию их осложнений, связанных

с неэффективностью терапии, повторными сердечно-сосудистыми событиями и госпитализациями, а также с неблагоприятными побочными реакциями.

1.2. Значение тромбоцитов в патогенезе тромботических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний и методы оценки их активности

В патогенезе атеросклеротического поражения сосудистой стенки и развитии тромботических осложнений при ССЗ тромбоциты могут играть важнейшую роль [10]. Тромбоциты представляют собой циркулирующие в кровотоке безядерные фрагменты мегакариоцитов костного мозга с периодом жизни 7-10 дней [11]. Основная роль тромбоцитов в системе гемостаза – это запуск механизмов гемостаза для остановки кровотечения при повреждении эндотелия сосудов – первичный (сосудисто-тромбоцитарный) гемостаз, а также участие в генерации тромбина во вторичном (плазменном) гемостазе [11]. Это важная роль тромбоцитов обеспечивается за счет основных функций тромбоцитов: адгезия, активация, агрегация, секреция.

В норме неповрежденный эндотелий сосудов препятствует агрегации тромбоцитов, за счет отсутствия контакта с тромбогенными агентами субэндотелиального матрикса (коллагеном, фибриногеном, фактором фон Виллебранда, тканевым фактором и др.), а так же секреции оксида азота и простациклина [11]. В случае повреждения эндотелия, в том числе при разрыве атеросклеротической бляшки, и контакта тромбоцитов с субэндотелиальным матриксом и запускается процесс адгезии тромбоцитов к поврежденному участку и их активации, что приводит в конечном итоге к тромботическим осложнениям. Адгезия тромбоцитов происходит при помощи связывания коллагена, фактора фон Виллебранда и фибриногена с соответствующим трансмембранным белком на поверхности тромбоцитов: гликопротеин Ia/IIa (GP Ia/IIa), гликопротеин Ib/ X и IIb / III (GP Ib/IX, GP IIb/III) и гликопротеин IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) [12]. Взаимодействие коллагена с гликопротеином VI на поверхности тромбоцитов также приводит к секреции таких активаторов тромбоцитов, как тромбин, АДФ, тромбоксан A₂ и адреналин и последующей активации тромбоцитов. Указанные вещества приводят

к активации соседних тромбоцитов и дополнительной секреции новых объемов активаторов тромбоцитов. Запуск внутриклеточных механизмов активации тромбоцитов опосредован через рецепторы, связанные с G-белками и изменением активности циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) путем 2 основных механизмов: гидролиз фосфоинозитидов и синтез эйкозаноидов [11,12]. Активированные тромбоциты взаимодействуют с фибриногеном путем связывания через рецептор гликопротеин IIb/IIIa и образованием «фибриновых мостиков» [13]. Связывание гликопротеина IIb/IIIa с фибриногеном и последующее изменение его структуры приводит к индукции агрегации тромбоцитов и формированию тромбоцитарного тромба (тромбоцитарных агрегатов) [12]. Активированные тромбоциты могут секретировать оксид азота для предотвращения чрезмерной агрегации тромбоцитов, а также другие соединения с различными метаболическими эффектами: тромбоцитарный фактор роста, серотонин, бета-тромбоглобулин и др. [12,14].

В развитии острых тромботических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний событий важную роль играет разрыв атеросклеротической бляшки и последующий тромбоз с окклюзией сосуда [12]. Согласно результатам патологических исследований, атеротромбоз в коронарных артериях – является наиболее частым инициирующим событием при развитии острого ишемического коронарного события [12,13]. При этом, если при развитии острого инфаркта миокарда играет наиболее важную роль разрыв атеротромботической бляшки, то при ишемическом инсульте чаще наблюдается тромбоз *in-situ*, кардиоэмболия и артерио-артериальная эмболия [15].

Разрыв атероматозной бляшки с обнажением субэндотелиального матрикса или появлении зоны атеросклеротически измененного участка эндотелия приводит к адгезии, активации и агрегации тромбоцитов, согласно механизмам описанным выше [15]. Крупные тромбоцитарные агрегаты формируют основное ядро увеличивающейся тромботической массы в области разрыва атеросклеротической бляшки или поврежденного эндотелия [12]. Помимо наличия специфических сайтов для связывания факторов свертывания (II, VIII, V, IX, XI), мембраны

активированных тромбоцитов являются также источниками прокоагулянтных фосфолипидов, необходимых для создания на их поверхности комплексов активирующих Ха фактор и протромбин [15,16]. В результате стремительного увеличения размера тромбоцитарного тромба («белый» тромб) возникает снижение объема кровотока на данном отрезке сосуда и распространение выше и ниже разрыва атеросклеротической бляшки тромбоцитарного сгустка, включающего уже, помимо тромбоцитов и фибрина, большое количество эритроцитов и лейкоцитов («красный» тромб) [12]. Роль важную роль тромбоцитов при тромботических осложнениях подтверждается рядом других особенностей [12]: 1) в более чем 80% случаев у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) определяются высокие уровни тромбоцитарного тромбоксана A2 [12]; 2) у пациентов с ОКС в первые месяцы выявляются высокие уровни Р- селектина, играющего важную роль в адгезии тромбоцитов [12,17]; 3) секреция оксида азота, препятствующего агрегации тромбоцитов, снижается у пациентов с ОКС [12] 4) для пациентов с острыми ишемическими событиями характерно наличие более крупных тромбоцитов с повышенной реактивностью [12,18,19].

Таким образом, описанные функциональные особенности тромбоцитов и их роль в развитии тромботического процесса демонстрируют важнейшую роль адекватного подавления активности тромбоцитов лекарственными препаратами с различными механизмами антиагрегантного действия с целью профилактики осложнений ССЗ:

- 1) Ингибиторы циклооксигеназы 1-типа (ЦОГ-1): ацетилсалициловая кислота
- 2) Блокаторы P2Y₁₂-рецепторов: клопидогрел, тикагрелор, прасутгрел, кангрелор, элиногрел
- 3) Ингибиторы рецепторов, активируемых протеазами (PAR): ворапаксар, атопаксар
- 4) Антагонисты гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa: абциксимаб, эптифибатид, тирофибан
- 5) Ингибиторы фосфодиэстеразы (ФДЭ): дипиридамол, цилостазол.

Из перечисленных групп наиболее важное значение для профилактики тромботических осложнений при ОКС и ишемическом инсульте имеют ингибиторы ЦОГ-1 и блокаторы P2Y₁₂-рецепторов, методы оценки антиагрегантного действия которых будут обсуждаться ниже.

Современные методы оценки активности тромбоцитов, в том числе для мониторинга фармакодинамического ответа на антиагрегантные лекарственные средства, основаны на различных принципах: 1) методы классической световой агрегометрии тромбоцитов, в том числе основанные на рассеянии лазерного излучения; 2) агрегометрия измерением электрического сопротивления (импедансная); 3) методы, основанные на проточной цитометрии и другие [20]. Среди основных конкретных методик измерения активности тромбоцитов можно выделить следующие: световая трансмиссионная агрегометрия (LTA - light transmission aggregometry), проточная цитометрия, лазерная агрегометрия тромбоцитов, анализатор функции тромбоцитов (PFA - Platelet Function Assay 100/200), Impact, тромбозластография (TEG - Thrombelastography, ROTEM - Rotation Thromboelastometry), VerifyNow, Multiplate, Plateletworks, измерение вазодилататор-стимулированного фосфопротеина (VASP-P Vasodilator-stimulated Phosphoprotein-phosphorylation). Принципы работы указанных систем измерения активности тромбоцитов возможности применения для мониторинга фармакодинамического (ФД) действия антиагрегантных лекарственных средств представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Методы тестирования активности тромбоцитов и значение для мониторинга фармакодинамического действия антиагрегантных лекарственных средств (адаптировано из [25, 27, 28])

Метод	Принцип работы	Влияние уровня тромбоцитов и/или гематокрита	Оценка ФД основных антиагрегантов при лечении ИИ и ИМ
LTA	Золотой стандарт среди методов измерения активности тромбоцитов. Центрофугированная обогатненная тромбоцитами плазма оценивается в фотоспектрометре, который позволяет измерить светопропускную способность при агрегации тромбоцитов после добавления различных индукторов (АДФ, коллаген, адреналин, арахидоновая кислота и др.)	Нет	Ацетилсалициловая кислота (АСК) Ингибиторы P2Y ₁₂
VerifyNow	Прикроватная оценка агрегации тромбоцитов путем измерения светопропускной способности агрегатов тромбоцитов на шариках с фибриногеном	Да	АСК Ингибиторы P2Y ₁₂
PFA-100/200	Оценка адгезии и агрегации тромбоцитов на пластинах с индукторами агрегации при высоком напряжении сдвига	Да	АСК
Multiplate	Оценка агрегации тромбоцитов путем измерения изменений электрического сопротивления на электрода с адгезией тромбоцитов	Да	АСК Ингибиторы P2Y ₁₂
Impact	Оценка адгезии и агрегации тромбоцитов на пластинах с индукторами агрегации при высоком напряжении сдвига	Да	АСК Ингибиторы P2Y ₁₂

Продолжение Таблицы 1

Метод	Принцип работы	Влияние уровня тромбоцитов и/или гематокрита	Оценка ФД основных антиагрегантов при лечении ИИ и ИМ
TEG/ROTEM	Комплексная динамическая оценка функции тромбоцитов и формирования кровяного сгустка с использованием цельной крови	Нет	Ингибиторы P2Y ₁₂
Flow cytometry	Оценка агрегации тромбоцитов путем лазерной агрегатов тромбоцитов, после инкубации моноклональными антителами с флуоресцентным красителем	Да	АСК Ингибиторы P2Y ₁₂
VASP-P	Оценка агрегации тромбоцитов на основе жидкостной цитометрии с фосфолированием вазодилататор-стимулированного фосфопротеина	Нет	Ингибиторы P2Y ₁₂
Примечание: LTA - light transmission aggregometry, PFA - Platelet Function Assay, TEG - Thrombelastography, ROTEM - Rotation Thromboelastometry, VASP-P - Vasodilator-stimulated Phosphoprotein-phosphorylation.			

Применительно к мониторингу антиагрегантного действия лекарственных средств перечисленные методы имеют различную клиническую ценность с рядом метод-специфичных преимуществ и недостатков. Так классическая световая трансмиссионная агрегометрия (LTA) не имеет стандартизированных референсных границ, требует специального обучения персонала и соблюдения строгих преаналитических и лабораторных условий для проведения анализа, больших объемов крови, метод имеет низкую чувствительность при измерении микроагрегатов тромбоцитов на ранней фазе агрегации и мониторинге агрегации при терапии антиагрегантами, особенно ингибиторами гликопротеина IIb / IIIa [21,22,23]. Эти ограничения лишь частично преодолены в анализаторе функции тромбоцитов (PFA-100/200), который оценивает агрегацию тромбоцитов при напряжении сдвига путем измерения снижения скорости кровотока и время для полного закрытия отверстия на мембране с индукторами агрегации [24].

Ограничением PFA-100/200 является низкая чувствительность при низком гематокрите и низком уровне тромбоцитов. Преимуществами методов жидкостной цитометрии, которые так же требуют больших трудозатрат, дорогостоящего оборудования и специализированного обучения персонала, является меньший объем требуемого образца и независимость от количества тромбоцитов и гематокрита [25]. Тромбоэластография и ротационная тромбоэластометрия так же имеют ряд характерных ограничений: представляют собой трудоемкий метод оценки функции тромбоцитов, имеют ценность преимущественно для оценки риска кровотечения и необходимости переливания крови в анестезиологии и хирургии, низкая ценность для мониторинга антиагрегантного действия лекарственных препаратов и особенно для АСК [24, 26].

Касательно применимости для оценки антиагрегантного действия лекарственных средств наибольшее значение имеют модифицированные упрощенные для применения в реальной практике методы VerifyNow, Multiplate, VASP [27]. Преимуществами данных методов является отсутствие необходимости в специальных лабораторных условиях и обучении персонала трудоемкой методике, небольшой объем необходимого образца, возможность прикроватного использования с коротким периодом получения результата исследования, наличие установленных границ активности тромбоцитов (условного «терапевтического окна») на основе регистров и клинических исследований, определяющих высокий риск тромботических и геморрагических событий – то есть границу для регистрации высокой остаточной реактивности тромбоцитов и низкой остаточной реактивности тромбоцитов, соответственно [27]. При этом результаты VerifyNow, хотя и отличаются спорной чувствительностью и специфичностью, в большей степени коррелируют с «золотым стандартом» измерения активности тромбоцитов и характеризуются низким коэффициентом вариации результатов измерения [25,27]. Преимуществами тестирования на Multiplate является более высокая ценность для прогнозирования риска тромбоза стента по сравнению с VASP, а так же более низкая стоимость исследования по сравнению с остальными методами [28]. Общим недостатком данных методов является выраженность результатов

измерения от количества тромбоцитов и, соответственно, низкая ценность при низком уровне тромбоцитов [28].

Прогностическая ценность оценки активности тромбоцитов для прогнозирования эффективности отдельных групп антиагрегантных лекарственных средств, в частности ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов, у пациентов со стабильной ИБС, инфарктом миокарда и ишемическим инсультом остается неясной. Так несмотря на то, что взаимосвязь высокой остаточной реактивности тромбоцитов и низкой остаточной реактивности тромбоцитов с соответствующими тромботическими и геморрагическими исходами была продемонстрирована в многочисленных исследованиях различного уровня доказательности [29,30,31], до сих пор остается дискуссионным вопрос принятия клинического решения по коррекции антиагрегантной терапии на основе измерения активности тромбоцитов [15, 25, 28]. Одним из ранних проспективных исследований среди пациентов с ИБС, показавших ассоциацию высокой остаточной реактивности тромбоцитов с тромботическими исходами на фоне терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов стало исследование Gurbel и соавт., где пациенты с более высокими показателями активности тромбоцитов (метод LTA) на фоне терапии клопидогрелом в дозе 300 мг нагрузочная и 75 мг поддерживающая после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) имели в 2,7 раза выше риск ишемических событий в течение 6 месяцев после начала терапии [32]. В дальнейшем аналогичные результаты по ассоциации высокой остаточной реактивности тромбоцитов с тромботическими исходами были продемонстрированы и с использованием методик VerifyNow, Multiplate, VASP [25]. Хотя и более ранние мета-анализы проведенных исследований подтверждали ассоциацию высокой остаточной реактивности тромбоцитов на фоне терапии клопидогрелом с тромботическими исходами [33, 34], в более позднем мета-анализе на 6 478 пациентах из 13 проспективных исследований со средним периодом наблюдения 12 месяцев показано, что данная взаимосвязь статистически значимо наблюдается только у пациентов с определенными факторами риска (возраст > 75 лет, ОКС при включении в

исследование, сахарный диабет и артериальная гипертензия) и была статистически незначима при отсутствии клинических факторов риска [35].

В отличие от клопидогрела, для двух других ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов – тикагрелора и прасугрела - может иметь более важное значение низкая остаточная реактивность тромбоцитов в связи с более выраженным антиагрегантным действием [36, 37]. При этом исследования по взаимосвязи между низкой остаточной реактивностью тромбоцитов и геморрагическими осложнениями имеют большее количество разнонаправленных результатов, по сравнению с высокой остаточностью реактивности тромбоцитов, что требует дополнительной оценки данной ассоциации [25, 29, 38]. Вместе с тем, представляют интерес результаты исследования TROPICAL-ACS, в котором было показано, что низкая остаточная реактивность тромбоцитов - является независимым сильным предиктором кровотечений (ОШ 1,74, ДИ 95% 1,18-2,56, $p = 0,005$) у пациентов с ОКС, как на фоне терапии прасугрелом, так и на фоне терапии клопидогрелом [39].

Проведенные ранее крупные проспективные исследования (GRAVITAS, TRIGGER-PCI, ARCTIC, ANTARCTIC, ADIRE) по оценке прогностической клинической ценности изменения стратегии антиагрегантной терапии (изменение дозы, смена лекарственного препарата) для преодоления высокой остаточной реактивности тромбоцитов у пациентов с различными формами ИБС на основе тестирования функции тромбоцитов не продемонстрировали эффективность данного подхода в отношении снижения числа тромботических осложнений [15, 25]. Вместе с тем, в проспективном исследовании TROPICAL-ACS пациентов ($n=2527$) с ОКС (контрольная группа: прием прасугрела в течение года после ОКС; основная группа: первая неделя после ОКС – прием прасугрела, затем прием клопидогрела на второй неделе, с последующей оценкой функции тромбоцитов на Multiplate; при высокой остаточной реактивности тромбоцитов перевод снова на прасугрел, а при нормальном антиагрегантном ответе прием клопидогрела в течение года) стратегия по де-эскалации терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов на основе тестирования функции тромбоцитов не уступает стандартной терапии

прасугрелом в отношении частоты первичной конечной точки сердечно-сосудистой смертности, инфаркта миокарда, инсульта или кровотечения BARC (Bleeding Academic Research Consortium) ≥ 2 [39]. При раздельном анализе частота тромботических и геморрагических осложнений статистически значимо не различалась [39]. Обнадеживающие результаты получены и в проспективном исследовании PATROL (n=1353) по эскалации антиагрегантной терапии с клопидогрела на тикагрелор у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST (1 группа: прием клопидогрела или тикагрелора в течение года после инфаркта миокарда у пациентов без высокой остаточной реактивности тромбоцитов; 2 группа: прием клопидогрела у пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов; 3 группа: перевод с клопидогрела на тикагрелор пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов; измерение активности тромбоцитов через 72 часа от начала терапии методом VASP). В группе терапии клопидогрелом у пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов частота комбинированной конечной точки в виде смерти от всех причин, смерти от ССЗ, инфаркта миокарда, ишемического инсульта, реваскуляризации была статистически значимо выше, чем в группе с эскалацией терапии и группе без высокой остаточной реактивности тромбоцитов. При этом частота серьезных кровотечений значимо не различалась [40]. Исходы у пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне тикагрелора в данном исследовании не изучались.

Согласно консенсусу международной группы экспертов из Северной Америки, Европы и Азии применение тестирования функции тромбоцитов не рекомендуется рутинно, но может быть полезно для прогнозирования риска тромботических и геморрагических осложнений у пациентов со стабильной ИБС и ОКС в определенных клинических ситуациях [41]. Особую роль в консенсусе отводится тестированию функции тромбоцитов для де-эскалации двойной антиагрегантной терапии с прасугрела и тикагрелора на клопидогрел [42]. Согласно рекомендациям Европейского общества кардиологов по лечению ОКС без подъема сегмента ST тестирование функции тромбоцитов может быть рассмотрено для де-

эскалации терапии с более сильных ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов прасугрела и тикагрелора на клопидогрел (класс IIb уровень A) [42].

В ранее проведенных исследованиях прогностической ценности оценки активности тромбоцитов для прогнозирования эффективности антиагрегантных лекарственных средств у пациентов с ишемическим инсультом и транзиторной ишемической атакой получены противоречивые результаты. В недавнем исследовании Fu Н. и соавт., среди пациентов с ишемическим инсультом, получающих антиагрегантную терапию клопидогрелом, высокая остаточная реактивность тромбоцитов была ассоциирована с повышением риска развития комбинированной конечной точки в виде ишемического инсульта, инфаркта миокарда или смерти в течение 6 месяцев (20,6% против 7,3%, $p=0,04$) [43]. Аналогичным образом в исследовании Cha J.K. и соавт. среди пациентов с ишемическим инсультом ($n=968$), высокая остаточная реактивность тромбоцитов была независимым фактором риска развития ишемического инсульта, инфаркта миокарда и смерти в течение 1 года (ОШ=1,97, ДИ 1,22–3,18, $p<0,01$) [44]. В этом же исследовании была показана различная прогностическая ценность высокой остаточной реактивности тромбоцитов в зависимости от подтипа острого ишемического инсульта [44]. В исследовании J.P. Depta и соавт., эскалации терапии у пациентов с ишемическим инсультом и транзиторной ишемической атакой ($n=324$) с недостаточным ингибированием активности тромбоцитов (АСК: $\geq 20\%$ с 0,5 мг/мл арахидоновой кислоты или $\geq 70\%$ с 5 мкмоль/л АДФ; клопидогрел: $\geq 40\%$ с 5 мкмоль/л АДФ) привело к статистически значимому повышению частоты комбинированной конечной точки смертность, любые ишемические события или кровотечения (ОШ 2,24; 95% ДИ 1,12–4,47; $p=0,02$) [45]. В аналогичном исследовании Xingyang Yi и соавт., ($n=812$) получены противоположные результаты: эскалации терапии АСК в виде увеличения дозы, смены или добавления другого лекарственного препарата значимо снижало частоту ишемических событий у пациентов с ишемическим инсультом [46]. В двух крупных мета-анализах среди пациентов с ишемическим инсультом и транзиторной ишемической атакой продемонстрирована статистически значимая

взаимосвязь высокой остаточной реактивности тромбоцитов на фоне лечения АСК или клопидогрелом с почти двукратным повышением риска развития повторных тромботических событий на фоне терапии любым из указанных антиагрегантов (в исследовании Lim S.T. и соавт., в отдельной подгруппе не ответивших на клопидогрел ассоциация была не значимой) [47, 48]. В тоже время, в недавнем первом мета-анализе, проведенном для оценки целесообразности коррекции антиагрегантной АСК и/или клопидогрелом терапии у пациентов ишемическим инсультом на основе оценки остаточной активности тромбоцитов, не продемонстрирована польза подобной стратегии в отношении снижения частоты ишемических и геморрагических осложнений [49].

Перспективность стратегии оптимизации антиагрегантной терапии на основании измерения активности тромбоцитов продемонстрирована и в особой группе пациентов получающих одновременно антиагрегантную и антикоагулянтную терапию, в частности среди пациентов с фибрилляцией предсердий в сочетании с ИБС с плановым чрескожным коронарным вмешательством (n= 503) [50]. В данном исследовании в группе поэтапного увеличения дозы клопидогрела при недостаточном подавлении активности тромбоцитов (доза клопидогрела увеличивалась на 25 мг на основании оценки активности тромбоцитов методом VASP каждые 3 месяца в течении года от начала терапии; при индексе реактивности тромбоцитов PRI (Platelet reactivity index) больше 50% - увеличение дозы на 25 мг, при PRI от 25 до 50% - продолжить текущую дозу, при PRI менее 25% - снижение дозы до 75%; максимальная доза в конце 1 года 175 мг) частота смерти сердечно-сосудистых причин, инфаркт миокарда, реваскуляризации, тромбоза стента и ишемического инсульта оказалась в два раза ниже, чем в группе стандартной стратегии без оценки активности тромбоцитов (2,5% против 5,0%, $p=0,02$) [50]. При этом, хотя и не было значимых различий по большим кровотечениям, частота малых кровотечений оказалась ниже в группе контроля активности тромбоцитов (15,3% против 9,7%, $p=0,03$) [50].

Консенсус по роли тестирования функции тромбоцитов для прогнозирования риска тромботических и геморрагических осложнений у пациентов с ишемическим инсультом, в отличие от пациентов со стабильной ИБС и ОКС, не разработан.

Таким образом, оптимизация антиагрегантной терапии с достижением полноценного ингибирования активации тромбоцитов с одной стороны и снижением риска кровотечений с другой - является важнейшим компонентом фармакотерапии ССЗ, направленной на профилактику тромботических осложнений.

1.3. Проблема вариабельности ответа на антиагрегантную терапию ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов

Несмотря на то, что антиагрегантные лекарственные препараты из группы ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов доказали свою эффективность в тщательно спланированных крупных рандомизированных контролируемых клинических исследованиях [36, 37] и обоснованно занимают ведущее место в клинических рекомендациях по лечению инфаркта миокарда и ишемического инсульта, до сих пор сохраняет актуальность проблема вариабельности (недостаточного или чрезмерного) ответа в виде резистентности к антиагрегантной терапии или геморрагических осложнений, соответственно.

С учетом отсутствия общепринятого термина для определения резистентности к АСК, широкого диапазона механизмов ее развития, неопределенной прогностической роли в отношении клинических исходов у пациентов с ССЗ, и, наконец, отсутствие однозначной позиции в пользу применения тестирования активности тромбоцитов для выявления аспиринорезистентности в актуальных клинических рекомендациях и экспертных консенсусах [51, 52, 53, 54, 55, 56], далее будет обсуждаться проблема вариабельности ответа к ингибиторам P2Y₁₂-рецепторов.

Под недостаточный ингибированием активности тромбоцитов или высокой остаточной реактивностью тромбоцитов понимают уровень активности тромбоцитов выше границ «терапевтического окна» (то есть, уровень, который

ассоциирован с повышенным риском тромботических осложнений несмотря на лечение антиагрегантным препаратом), установленных для конкретных методов измерения активности тромбоцитов на фоне приема ингибиторов P2Y12-рецепторов, согласно обновленным рекомендациям международного консенсуса [41]. Данным консенсусом так же установлены границы чрезмерного ингибирования активности тромбоцитов, которое ассоциировано с риском кровотечений на фоне антиагрегантным препаратом [41]. Соответствующие значения высокой и низкой остаточной реактивностью тромбоцитов указаны в таблице 3. При этом под клинической резистентностью к ингибиторам P2Y12-рецепторов, понимают развитие тромботических осложнений несмотря на назначенную в рекомендованной дозе антиагрегантную терапию [57].

Таблица 3 - Границы высокой и низкой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне приема ингибиторов P2Y12-рецепторов [41]

Методика тестирования	Высокая остаточная реактивность тромбоцитов	Низкая остаточная реактивность тромбоцитов
VerifyNow P2Y12	> 208 PRU	< 85 PRU
Multiplate Analyzer	> 46 U	< 18 U
VASP	> 50% PRI	< 16% PRI
TEG	> 47 mm	< 31 mm
Примечание: VASP (Vasodilator-stimulated Phosphoprotein-phosphorylation) – фосфорилирование вазодилататор-стимулированного фосфопротеина, TEG (Thrombelastography) – тромбоэластография.		

Доля пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне клопидогрела может варьировать в зависимости от метода измерения и может составлять от 25 до 40 % пациентов с ИБС, в том числе инфарктом миокарда [57, 58]. Аналогичная частота высокой остаточной реактивностью тромбоцитов наблюдается и среди пациентов с ишемическим инсультом, получающих антиагрегантную терапию клопидогрелом - около 32% пациентов [59]. Частота встречаемости высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на приема фоне

клопидогрела у пациентов с различными формами ИБС по данным исследований в Российской Федерации коррелируют с мировыми данными и составляет порядка 25-56% [60,61,62]. Частота высокой остаточной реактивности тромбоцитов на фоне приема более тикагрелора и прасугрела несколько ниже и составляют 3-15% и 1-3%, соответственно [63,64,65]. С учетом описанной выше доказанной ассоциации высокой остаточной реактивности тромбоцитов с тромботическими осложнениями, заслуживают внимания данные клинической практики по ишемическим событиям среди пациентов с ССЗ, получающих ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов. Согласно данным недавнего мета-анализа исследований по оценке эффективности и безопасности различных ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов, куда вошли 52 816 пациентов ОКС с ЧКВ, частота сердечно-сосудистой смерти, инфаркта миокарда и тромбоза стента составила 3,8%, 1,4% и 6,5%, соответственно [66]. По данным других авторов частота инфаркта миокарда, тромбоза стента и ишемического инсульта на фоне приема клопидогрела или тикагрелора в течение 1 года после ОКС может составлять 7,1%, 0,4%, 0,6% и 6,4%, 0,5%, 0,5%, соответственно [67]. По данным крупного корейского исследования среди 37 500 пациентов, получающих клопидогрел, 15 723 пациентов, получающих тикагрелор 3 974 пациентов, получающих прасугрел в расчете на 1000 пациентов в год частота ишемического инсульта, инфаркта миокарда и реваскуляризации составила: на фоне клопидогрела – 8,0, 41,7 и 45,9; на фоне тикагрелора – 5,1, 72,3 и 49,4; на фоне прасугрела – 3,7, 60,7 и 50,4, соответственно [68]. Соответственно, несмотря на более низкую частоту встречаемости высокой остаточной реактивности тромбоцитов при терапии на фоне терапии тикагрелором и прасугрелом, по сравнению с клопидогрелом, данные реальной клинической практики демонстрируют сопоставимую частоту ишемических событий при терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов.

Полученные ранее данные по частоте высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов., преимущественно, собраны из исследований по эффективности клопидогрела среди пациентов с ИБС, в том числе инфарктом миокарда. В то время как, данные

по частоте встречаемости высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне тикагрелора и прасугрела в исследованиях с использованием рекомендованных международного консенсусом (VerifyNow, Multiplate, VASP, TEG) - ограничены, в связи с нехваткой исследований по установлению корректных границ высокой и низкой остаточной реактивности тромбоцитов при их применении. В ранее проведенном мета-анализе исследований оценке влияния ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов среди 5 395 пациентов было показано, что уровень активности тромбоцитов измеренный методом VerifyNow – PRU - в среднем на 117 пунктов ниже при терапии клопидогрелом в дозе 75 мг 1 раз в сутки, по сравнению с тикагрелором и прасугрелом в дозе 90 мг 2 раза и 10 мг 1 раз в сутки [69]. Полученные данные подтверждают возможную некорректность «терапевтического окна» для ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов, концепция которого предложена в обновленном международном консенсусе опираясь на исследования по клопидогрелу [41]. Так в исследовании с целью определения возможных границ высокой остаточной активности тромбоцитов при приеме ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов (метод измерения VerifyNow), было показано, что среди 120 обследованных, получавших тикагрелор либо прасугрел, лишь у 1 пациента наблюдалось недостаточное подавление активности тромбоцитов [70].

Частота кровотечений на фоне приема ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов по данным различных исследований, в том числе мета-анализов, составляет от 1 до 11,6 % [66,67,71,72]. Частота геморрагических осложнений была так же проанализирована в исследовании реальной клинической практики среди 37 500 пациентов, получающих клопидогрел, 15 723 пациентов, получающих тикагрелор 3 974 пациентов, получающих прасугрел и в расчета на 1000 пациентов в год составила: 104,9, 125 и 89,8 соответственно [68]. Риск кровотечений при комбинированной антитромботической терапии у пациентов с ОКС и ФП, где препаратом выбора среди ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов является клопидогрел, может значительно возрастать [50]. В исследовании Gao F и соавт., частота больших и малых кровотечений у пациентов с ОКС с ЧКВ, принимающих дополнительно антикоагулянтную терапию, составила 2,8 и 8,8 %, соответственно

[73]. В аналогичном исследовании у пациентов с ФП, перенесших ЧКВ частота больших и малых кровотечений составила 3% и 15,3%, соответственно [50]. Среди кровотечений на фоне ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов, одними из частых являются кровотечения из желудочно-кишечного тракта, частота которых может достигать до 11,6 % в течении 2 летнего периода наблюдения [74]. При этом геморрагические осложнения являются самой частой причиной прекращения терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов – до половины случаев [75].

Среди модифицируемых и немодифицируемых факторов, ассоциированных с описанной выше вариабельностью ответа на различные ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов, можно выделить следующие: социально-демографические (низкая комплаентность), клинические (сахарный диабет, ХСН, различные состояния, ассоциированные с нарушением всасывания, почечная недостаточность), межлекарственные взаимодействия, генетические (полиморфизм генов, кодирующих различные компоненты фармакокинетических путей и фармакодинамических мишеней), транскриптомные (уровень мРНК, циркулирующей микроРНК) [76].

Таким образом, одной из важнейших проблем при терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов является выраженная вариабельность ответа на лечение, что зачастую приводит неблагоприятным клиническим последствиям – тромботическим и геморрагическим осложнениям, несмотря на соблюдение действующих клинических рекомендаций и официальной инструкции по применению лекарственного препарата. Наиболее перспективные фармакогенетические, фармакометаболические, фармакотранскриптомные биомаркеры для прогнозирования индивидуального ответа на антиагрегантную терапию ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов с целью снижения риска тромботического и геморрагического осложнений будут обсуждаться ниже.

1.4. Проблема прогнозирования индивидуального ответа на антиагрегантную терапию ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов

1.4.1. Фармакогенетика ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов

Фармакогенетика и фармакогеномика – область научных исследований по оценке влияния генетических особенностей пациента на эффективность и безопасность лекарственной терапии [77]. Предметом исследования фармакогенетики являются отдельные гены, кодирующие различные ферменты, транспортеры, мембранные каналы и мишени действия лекарственных средств. Наибольшее клиническое значение для персонализации терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов имеют фармакокинетические и фармакодинамические генетические биомаркеры, кодирующие, кодирующие транспортеры лекарственных средств и ксенобиотиков, изоферменты семейства цитохрома P-450, рецепторы на поверхности тромбоцитов, ферменты метаболизирующие производные арахидоновой кислоты, а также другие компоненты метаболических путей. Соответственно, знание особенностей фармакокинетически и фармакодинамики ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов лежит в основе отбора генов-кандидатов для фармакогенетических исследований (Рисунок 1). Для выявления новых, ранее неописанных, фармакогенетических маркеров служит метод секвенирования полного генома в рамках фармакогеномных исследований. При этом, для внедрения в практику фармакогенетических маркеров помимо получения положительных результатов ассоциативных исследований, необходимо так же подтверждение клинической валидности – способность фармакогенетического маркера прогнозировать ответ на лекарственный препарат и клинической полезности – способности фармакогенетического маркера улучшать клинические исходы (рекомендации рабочей группы по оценке геномных маркеров для клинической практики Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP)) [78].

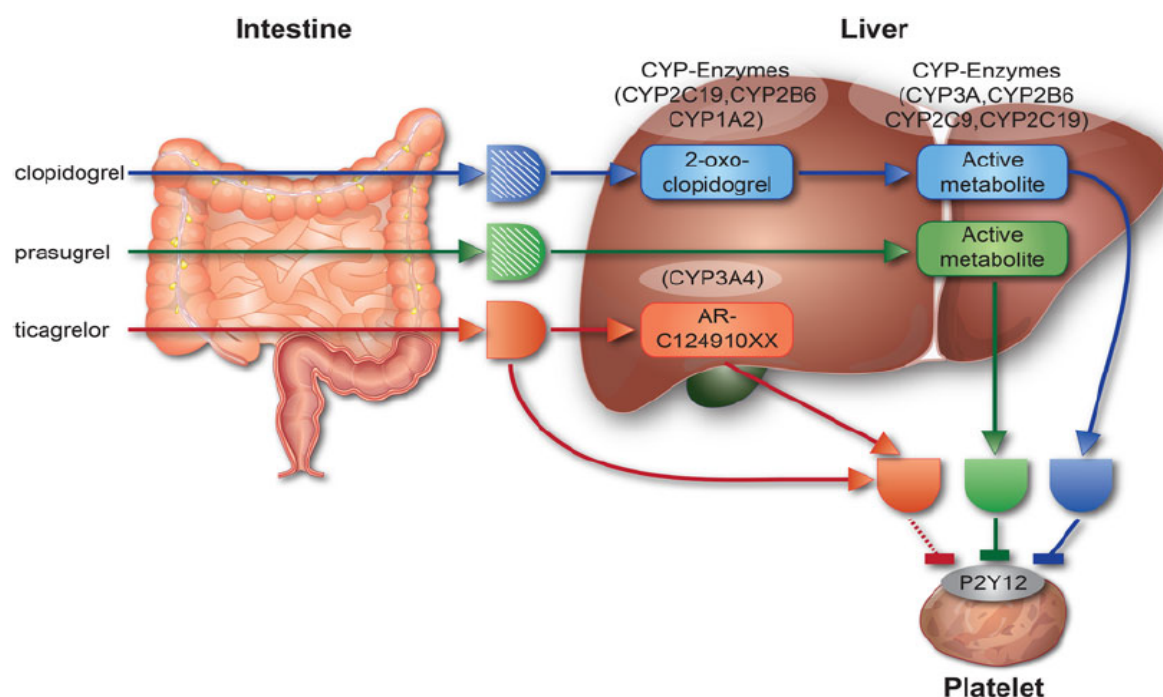


Рисунок 1 – Фармакокинетические различия ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов тромбоцитов [79]

Выборка наиболее клинически релевантных генов-кандидатов для ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов согласно результатам ранее проведенных ассоциативных исследований и данным крупнейшего научного on-line ресурса по фармакогенетике «PharmGkb» [80] представлена в Таблице 4.

Таблица 4 - Гены-кандидаты для фармакогенетического тестирования с целью персонализации терапии P2Y₁₂-рецепторами.

Препарат	Фармакокинетические гены-кандидаты	Фармакодинамические гены-кандидаты
Клопидогрел	ABCB1, CES1, PON1, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A5, CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6	P2RY12, PEAR1, ITGB3, ITGA2, B4GALT2, CYP4F2
Тикагрелор	CYP3A4, CYP3A5, SLCO1B1, CYP3A43, UGT2B7	P2RY12, PEAR1, CYP4F2
Прасугрел	CES1, CES2, CYP3A4, CYP3A5, CYP2B6, CYP2C19, CYP2C9	P2RY12, PEAR1

Клопидогрел – является ингибитором P2Y₁₂-рецепторов тромбоцитов тиенопиридинового ряда, который подвергается биоактивации в организме. На этапе абсорбции концентрацию клопидогрела может оказывать существенное влияние активность кишечного транспортера Р-гликопротеина, кодируемого геном *ABCB1* [81]. После всасывания большая часть препарата (85%) превращается в неактивный метаболит под воздействием фермента карбоксилэстеразы-1 [82], кодируемой геном *CES1*, а оставшаяся часть подвергается 2 ступенчатой биоактивации, где важнейшую роль играют на первом этапе изоферменты CYP1A2, CYP2B6 и CYP2C19, на втором этапе - CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4/5 и CYP2C19 [83]. Среди перечисленных изоферментов, кодируемых одноименными генами, основная роль в биоактивации клопидогрела отводится CYP2C19 и CYP3A4/5 [83]. Важную роль на втором этапе биоактивации клопидогрела играет также фермент параоксигеназа-1, кодируемый геном *PON-1* [84]. Соответственно, важное клиническое значение для прогнозирования вариабельности ответа на клопидогрел могут иметь следующие гены, кодирующие соответствующие компоненты метаболических путей: *ABCB1*, *CES1*, *CYP2C19*, *CYP2C9*, *CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *PON1*. Из генов, которые могут модулировать фармакодинамический ответ на клопидогрел, перспективными для изучения являются: *P2RY12* - кодирует АДФ-рецептор на поверхности тромбоцитов, *ITGB3* – кодирует гликопротеин IIa/IIIb тромбоцитов, *ITGA2* – кодирует гликопротеин Ia/IIa тромбоцитов, *PEAR1* – кодирует эндотелиальный рецептор тромбоцитов-1, *B4GALT2* – кодирует галактозилтрансферазу-2, экспрессируемую тромбоцитами, *CYP4F2* – кодирует изофермент лейкотриен-В (4)-омега-гидроксилазу-1 (Таблица 5).

Таблица 5 - Основные фармакогенетические маркеры клопидогрела и их роль нарушении ответа на препарат

Ген	Аллельные варианты	Ассоциация с антиагрегантным ответом на клопидогрел и неблагоприятными клиническими исходами на фоне терапии	Ссылка
<i>ABCB1</i>	<i>rs1045642</i>	- Результаты ассоциативных исследований - противоречивы - Генотип ТТ может быть ассоциирован с повышенным риском ишемических событий на фоне клопидогрела у пациентов ОКС по сравнению с генотипами СС + СТ	[85]
<i>CES1</i>	<i>rs2307240</i>	- Результаты ассоциативных исследований – противоречивы - Генотипы СТ + ТТ могут быть ассоциированы с более выраженным антиагрегантным действием клопидогрела у пациентов ОКС по сравнению с генотипом СС	[86]
<i>CYP2C19</i>	<i>CYP2C19*2 (rs4244285)</i> <i>CYP2C19*3 (rs4986893)</i> <i>CYP2C19*17 (rs12248560)</i>	- В большинстве проведенных ранее исследований доказана ассоциация <i>CYP2C19*2</i>, <i>CYP2C19*3</i> нарушением ответа на клопидогрел. Данные по <i>CYP2C19*17</i> – противоречивы. - Носительство <i>CYP2C19*2</i> и/или *3 может быть ассоциировано с более высоким риском ишемических событий, а <i>CYP2C19*17</i> с более высоким риском кровотечений на фоне клопидогрела у пациентов ИБС по сравнению с <i>CYP2C19 *1 / *1</i>.	[87, 88]
<i>CYP2C9</i>	<i>CYP2C9*2 (rs1799853)</i> <i>CYP2C9*3 (rs1057910)</i>	- Результаты ассоциативных исследований - противоречивы - Носительство <i>CYP2C9*2</i> и/или *3 может быть ассоциировано с более высоким риском ишемических событий на фоне клопидогрела у пациентов ИБС по сравнению с <i>CYP2C19 *1 / *1</i>	[89]

Продолжение Таблицы 5

Ген	Аллельные варианты	Ассоциация с антиагрегантным ответом на клопидогрел и неблагоприятными клиническими исходами на фоне терапии	Ссылка
<i>CYP3A5</i>	<i>CYP3A5*3</i> (<i>rs776746</i>)	- Результаты ассоциативных исследований - противоречивы - Носительство <i>CYP3A5*3</i> может быть ассоциировано с более высоким риском резистентности к терапии клопидогрелом у пациентов ишемическим инсультом по сравнению с <i>CYP2C19 *1 / *1</i>.	[90]
<i>CYP3A4</i>	<i>rs35599367</i> <i>rs2242480</i>	- Результаты ассоциативных исследований - противоречивы - Генотипы СТ + ТТ могут быть ассоциированы с более выраженным антиагрегантным действием клопидогрела у пациентов ИБС по сравнению с генотипом СС	[91]
<i>CYP1A2</i>	<i>rs2069514</i> <i>rs762551</i>	- Результаты ассоциативных исследований – противоречивы - Носительство генотипов АА + АС по <i>rs762551</i> и 1С/1С + 1А/1А по <i>rs2069514</i> может быть ассоциировано с более выраженным антиагрегантным действием клопидогрела и повышением риска кровотечений у пациентов ОКС по сравнению с нормальным генотипом	[92,93]
<i>CYP2B6</i>	<i>CYP2B6*5</i> (<i>rs3211371</i>) <i>CYP2B6*4</i> (<i>rs2279343</i>)	- Результаты ассоциативных исследований – противоречивы - Носительство <i>CYP2B6*5</i> может быть ассоциировано с более высоким риском резистентности к терапии клопидогрелом у пациентов с чрескожными коронарными вмешательствами по сравнению с <i>CYP2B6*1</i>	[94]

Продолжение Таблицы 5

Ген	Аллельные варианты	Ассоциация с антиагрегантным ответом на клопидогрел и неблагоприятными клиническими исходами на фоне терапии	Ссылка
<i>PON1</i>	<i>rs662</i>	- Результаты ассоциативных исследований – противоречивы - Генотипы СТ + ТТ могут быть ассоциированы с менее выраженным антиагрегантным действием клопидогрела и ишемическими событиями у пациентов ИБС/ ишемическим инсультом по сравнению с генотипом СС	[95, 96]
<i>P2RY12</i>	<i>rs2046934</i> <i>rs3732759</i> <i>rs6809699</i>	- Результаты ассоциативных исследований – противоречивы - Носительство минорных аллелей по <i>rs3732759</i>, <i>rs2046934</i> и <i>rs6809699</i> может быть ассоциировано с вариабельностью ответа на клопидогрел и неблагоприятными ишемическими и геморрагическими событиями на фоне терапии	[97, 98]
<i>PEAR1</i>	<i>rs12041331</i> <i>rs57731889</i> <i>rs41273215</i>	- Результаты ассоциативных исследований – противоречивы - Генотип ТТ по <i>rs57731889</i> и <i>rs41273215</i> и GG по <i>rs12041331</i> могут быть ассоциированы с более выраженным антиагрегантным действием клопидогрела и повышением риска кровотечений по сравнению с генотипом СС и АА	[99,100,101]
<i>ITGB3</i>	<i>rs5918</i>	- Результаты ассоциативных исследований – противоречивы - Генотипы ТС + СС могут быть ассоциированы с более выраженным антиагрегантным действием клопидогрела у пациентов ИБС по сравнению с генотипом ТТ	[102]

Продолжение Таблицы 5

Ген	Аллельные варианты	Ассоциация с антиагрегантным ответом на клопидогрел и неблагоприятными клиническими исходами на фоне терапии	Ссылка
<i>ITGA2</i>	<i>rs1126643</i> <i>rs1062535</i>	- Результаты ассоциативных исследований – противоречивы - Носительство минорных аллелей по <i>rs1126643</i> и <i>rs1062535</i> может быть ассоциировано ассоциированы с менее выраженным антиагрегантным действием клопидогрела и ишемическими событиями у пациентов ИБС	[103]
<i>B4GALT2</i>	<i>rs1061781</i>	- Результаты ассоциативных исследований – противоречивы - Генотипы СТ + ТТ могут быть ассоциированы с более выраженным антиагрегантным действием клопидогрела у пациентов ИБС по сравнению с генотипом СС	[104]
<i>CYP4F2</i>	<i>rs2108622</i>	- Результаты фармакогенетических исследований – противоречивы - Генотипы СТ + СС могут быть ассоциированы с менее выраженным антиагрегантным действием клопидогрела и ишемическими событиями у пациентов ОКС по сравнению с генотипом ТТ	[105]

С учетом противоречивых результатов исследований для большинства фармакогенетических биомаркеров клопидогрела, за исключением гена *CYP2C19*, проблема поиска новых и дальнейшее изучение описанных выше клинически значимых маркеров прогнозирования ответа на клопидогрел сохраняет актуальность. Кроме того, недостаточно изучена проблема комбинированного влияния на антиагрегантный эффект клопидогрела носительства нескольких фармакогенетических биомаркеров одновременно.

Тикагрелор - ингибитор P2Y₁₂-рецепторов тромбоцитов тиаенопиридиновго ряда, подавляющий АДФ-индуцированную активацию тромбоцитов. Отличие механизма действия тикагрелора от тиаенопиридинов (клопидогрела и прасугрела) именно в обратимом связывании с аллостерическим центром P2Y₁₂-рецептора тромбоцитов [106]. Метаболизм тикагрелора в печени, с образованием активного метаболита AR-C124910XX и неактивного AR-C133913XX осуществляется на 95% изоферментами CYP3A4 и CYP3A5, кодируемых одноименными генами [107]. Кроме генов *CYP3A4* и *CYP3A5*, из фармакокинетических генетических маркеров перспективными для изучения фармакогенетики тикагрелора могут стать: ген *SLCO1B1*, кодирующий белок-переносчик OATPB1 и ген *UGT2B7*, кодирующий глюкуронилтрансферазу [108]. В полногеномном ассоциативном анализе (GWAS), проведенном на участниках крупного исследования PLATO (PLATelet inhibition and patients Outcome), было доказано влияние полиморфизмов генов CYP3A4, SLCO1B1 и UGT2B7 на фармакокинетические параметры тикагрелора. Но данные ассоциации носили умеренный характер, и достоверных связей полиморфизмов генов с антиагрегантной эффективностью и безопасностью тикагрелора выявлено не было [108]. Кроме того, имеются ограниченные данные по влиянию на эффективность терапии тикагрелором ряда других фармакодинамических генетических маркеров: PEAR1, CYP4F2 (Таблица 6). Соответственно, важное клиническое значение для прогнозирования вариабельности ответа на тикагрелор могут иметь следующие гены, кодирующие соответствующие компоненты метаболических путей: *CYP3A4*, *CYP3A43*, *SLCO1B1*, *UGT2B7*. Из генов, которые

могут модулировать фармакодинамический ответ на тикагрелор, перспективными для изучения являются те же гены, что и для клопидогрела: *P2RY12* (кодирует АДФ-рецептор на поверхности тромбоцитов), *ITGB3* (кодирует гликопротеин IIa/IIIb тромбоцитов), *PEAR1* (кодирует эндотелиальный рецептор тромбоцитов-1), *CYP4F2* (кодирует изофермент лейкотриен-В (4)-омега-гидроксилазу-1) (Таблица 6). Роль гена *B4GALT2*, кодирующего галактозилтрансферазу-2, экспрессируемую тромбоцитами, в нарушении ответа на тикагрелор, как и на прасугрел - недостаточно изучена.

Прасугрел - антиагрегант из группы тиенопиридинов третьего поколения, блокирующий P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов и имеющий более выраженное антиагрегантное действие по сравнению с клопидогрелом. Прасугрел, как и клопидогрел требует биоактивации в организме человека, где играют важную роль ферменты карбоксилэстераза-2, кодируемая геном *CES2* [109] и изоферменты системы цитохрома P450. В метаболизме прасугрела на уровне цитохрома P450 основную роль играют изоферменты *CYP3A5* и *CYP2B6*, в меньшей степени участвуют изоферменты *CYP2C9* и *CYP2C19* [110,111]. Соответственно, важное клиническое значение для прогнозирования вариабельности ответа на прасугрел могут иметь следующие гены, кодирующие соответствующие компоненты метаболических путей: *CES1*, *CES2*, *CYP3A4/5*, *CYP2B6*, *CYP2C19*, *CYP2C9*. Из генов, которые могут модулировать фармакодинамический ответ на прасугрел, перспективными для изучения являются: *P2RY12* (кодирует АДФ-рецептор на поверхности тромбоцитов), *ITGB3* (кодирует гликопротеин IIa/IIIb тромбоцитов), *ITGA2* (кодирует гликопротеин Ia/IIa тромбоцитов), *PEAR1* (кодирует эндотелиальный рецептор тромбоцитов-1).

В настоящее время недостаточно убедительных доказательств значимого влияния полиморфизма перечисленных генов на эффективность и безопасность терапии тикагрелором и прасугрелом, что требует проведения дальнейших фармакогенетических исследований.

Таблица 6 - Основные фармакогенетические маркеры тикагрелора и их роль нарушении ответа на препарат.

Ген	Аллельные варианты	Ассоциация с антиагрегантным ответом на клопидогрел и неблагоприятными клиническими исходами на фоне терапии	Ссылка
<i>SLCO1B1</i>	<i>rs113681054</i> <i>rs4149056</i>	- Результаты ассоциативных исследований - противоречивы - Генотипы ТТ может быть ассоциирован с более низкими концентрациями тикагрелора по сравнению с генотипами СС или СТ у пациентов с ОКС	[108]
<i>CYP3A43</i>	<i>rs62471956</i>	- Результаты ассоциативных исследований - противоречивы - Генотипы GG может быть ассоциирован с более низкими концентрациями тикагрелора по сравнению с генотипами AG или AA у пациентов с ОКС	[108]
<i>CYP3A5</i>	<i>CYP3A5*3</i> (<i>rs776746</i>)	Результаты ассоциативных исследований - противоречивы	[106]
<i>CYP3A4</i>	<i>rs35599367</i> <i>rs56324128</i>	- Результаты ассоциативных исследований - противоречивы - Генотип СТ может быть ассоциирован с более высокими концентрациями (по <i>rs56324128</i>) и более выраженным выраженным антиагрегантным действием (по <i>rs35599367</i>) тикагрелора у пациентов ИБС по сравнению с генотипом СС	[108, 112]
<i>UGT2B7</i>	<i>rs61361928</i>	- Результаты ассоциативных исследований - противоречивы - Генотип СТ может быть ассоциирован с более низкими концентрациями тикагрелора по сравнению с генотипом ТТ у пациентов с ОКС	[108]
<i>P2RY12</i>	<i>rs2046934</i> <i>rs3732759</i> <i>rs6809699</i>	Результаты ассоциативных исследований – противоречивы	[113]

Продолжение Таблицы 6

Ген	Аллельные варианты	Ассоциация с антиагрегантным ответом на клопидогрел и неблагоприятными клиническими исходами на фоне терапии	Ссылка
<i>PEAR1</i>	<i>rs12041331</i> <i>rs12566888</i> <i>rs4661012</i>	- Результаты ассоциативных исследований – противоречивы - Носительство минорных аллелей по <i>rs12041331</i> и <i>rs12566888</i> может быть ассоциировано с более выраженным антиагрегантным действием тикагрелора, а <i>rs4661012</i> с недостаточным антиагрегантным действием тикагрелора у здоровых добровольцев	[114]
<i>CYP4F2</i>	<i>rs2108622</i> <i>rs3093135</i>	- Результаты фармакогенетических исследований – противоречивы - Генотип АА по <i>rs3093135</i> может быть ассоциирован с более выраженным антиагрегантным действием тикагрелора и повышением риска кровотечений по сравнению с генотипом АТ + ТТ	[115]

Не смотря на множество опубликованных ассоциативных исследований по оценке влияния носительства различных фармакогенетических биомаркеров на антиагрегантный ответ и клинические исходы на фоне терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторы, для оценки полезности внедрения фармакогенетического тестирования в клиническую практику требуется проведение сравнительных исследований персонализированного с традиционным способом подбора антиагрегантной терапии. Оценка эффективности, безопасности и прогностической ценности персонализированного подхода к антиагрегантной терапии при ОКС проводилась ранее в ряде рандомизированных и нерандомизированных клинических исследований генотип-ориентированной антиагрегантной терапии, а также мета-анализах данных исследований. В подавляющем большинстве исследований изучалась роль персонализированного подхода к выбору ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов на основе генотипирования по гену CYP2C19.

В многоцентровом исследовании IGNITE Network (n=1815), где оценивались клинические исходы у пациентов, получающих двойную антиагрегантную терапию после ЧКВ, было проведено сравнение традиционного подхода с генотип-ориентированной антиагрегантной терапией. В группе генотип-ориентированной антиагрегантной терапии носителям медленных аллелей по гену CYP2C19 в гомо- и гетерозиготной форме назначались тикагрелор или прасугрел, а случае нормального генотипа – клопидогрел. В исследовании было продемонстрировано, что носители медленных аллелей CYP2C19, получающие клопидогрел, имеют более высокую частоту ишемических событий, по сравнению аналогичной группой, получавших тикагрелор или прасугрел [116]. Аналогичные результаты были получены в исследовании Университета Северной Каролины UNC-Chapel Hill, куда вошло 1063 пациентов [117]. Кроме того, в данном исследовании не обнаружено значимых различий по частоте кровотечений.

В проспективном многоцентровом исследовании (n=1445) GIANT (Genotyping to Adjust Thienopyridine Treatment After Primary PCI for STEMI) было проведено

сравнение традиционного подхода с генотип-ориентированной антиагрегантной терапией [118]. В группе генотип-ориентированной антиагрегантной терапии носителям медленных аллелей по гену CYP2C19 в гомозиготной форме назначался прасугрел, в случае гетерозиготного носительства – прасугрел или клопидогрел в дозе 150 мг в сутки, а в случае нормального генотипа – решение оставалось за врачом. Никаких значимых различий в ишемических и геморрагических исходах в исследовании не было выявлено.

Наиболее крупными рандомизированными клиническими исследованиями по оценке эффективности генотип-ориентированной антиагрегантной терапии с периодом наблюдения 12 месяцев и более являются: PHARMCLO (n=888) [119], TAILOR-PCI (n=5000) [120] и POPular-Genetics (n=2500) [121].

В многоцентровом исследовании PHARMCLO по оценке эффективности и безопасности генотип-ориентированной антиагрегантной терапии, проводилось сравнение традиционного подхода без генотипирования с назначением тикагрелора или прасугрела на основе тестирования по CYP2C19*2, CYP2C19*17, ABCB1 3435C>T у пациентов с ОКС. В группе традиционного подхода решение по выбору P2Y₁₂-рецепторов оставалось за врачом, при этом в данной группе прасугрел или тикагрелол получили 41,1% пациентов. По результатам исследования в группе генотип-ориентированной антиагрегантной терапии наблюдалась более низкая частота смерти от сердечно-сосудистой заболеваний, инфаркта миокарда, ишемического инсульта и крупных кровотечений по сравнению со стандартным лечением в течение 12 месяцев: 15,9% против 25,9%, соответственно, ($p < 0,001$). При раздельном анализе так же выявлено значимое снижение тромботических осложнений, при отсутствии статистически значимых различий по кровотечениям. Исследование было преждевременно завершено из-за нормативных требований к наборам для генотипирования от итальянского регулятора.

В аналогичном исследовании POPular-Genetics среди пациентов с ОКС, одним из важных отличий от исследования PHARMCLO является, что в группе традиционного подхода назначались исключительно тикагрелор или прасугрел. В группе генотип-ориентированной антиагрегантной терапии при выявлении

носительства аллелей CYP2C19*2 или *3 в гомо- или гетерозиготной форме, назначались тикагрелор или прасугрел, а в случае нормального генотипа – клопидогрел. По результатам исследования было продемонстрировано, что генотип-ориентированная антиагрегантная терапия не уступает в эффективности традиционному подходу, при этом позволяя снизить число геморрагических осложнений (преимущественно малых). Исследование продолжается.

В исследовании TAILOR-PCI (Tailored Antiplatelet Initiation to Lessen Outcomes due to Decreased Clopidogrel Response After Percutaneous Coronary Intervention) среди пациентов с ОКС и стабильной ИБС в группе традиционного подхода назначался клопидогрел в стандартной дозе. В группе генотип-ориентированной антиагрегантной терапии при выявлении носительства аллелей CYP2C19*2 или *3 в гомо- или гетерозиготной форме, назначался тикагрелор, а в случае нормального генотипа – клопидогрел. По результатам исследования показано, что генотип-ориентированная терапия позволяет снизить риск комбинированной точки смерти от сердечно-сосудистых заболеваний, инфаркта миокарда, тромбоза стента, ишемического инсульта или тяжелой рецидивирующей ишемии у пациентов носителей медленных аллелей и получающих тикагрелор, по сравнению с группой клопидогрела в первые 3 месяца после ЧКВ ($p=0,001$). Частота кровотечений в сравниваемых группах не различалась. Исследование продолжается в настоящее время.

В проведенном в 2019 году мета-анализе ($n=2371$) рандомизированных клинических исследований по оценке эффективности и безопасности генотип-ориентированной антиагрегантной терапии не было показано преимуществ данного подхода по сравнению со стандартным. Однако данный мета-анализ включал неоднородные группы пациентов: как стабильных пациентов, так и пациентов с ОКС [122]. В более поздних мета-анализах в 2020 [123] и 2021 [124], включавшим 4859 и 3656 пациентов, соответственно, были продемонстрированы преимущества генотип-ориентированного подхода в снижении риска комбинированной точки в виде смерти от сердечно-сосудистых заболеваний, инфаркта миокарда, тромбоза стента, ишемического инсульта. При этом в

последнем анализе M Galli и соавт. [124], показана так же большая безопасность генотип-ориентированного подхода в виде снижения риска малых кровотечений.

Результаты проспективных исследований и мета-анализов по генотип-ориентированной антиагрегантной терапии при ишемическом инсульте - ограничены [125]. При этом доступны результаты ряда ассоциативных исследований [126, 127, 128, 129, 130] преимущественно на азиатской популяции, в которых была продемонстрирована более высокая частота повторного инсульта [126, 127] и первичного инсульта [128, 129], в том числе среди пациентов с бессимптомным стенозом сонных артерий [130], а так же более высокие показатели агрегации у пациентов с носителями аллельных вариантов CYP2C19*2 или *3 по сравнению с нормальным генотипом CYP2C19*1. Кроме того, опубликован протокол первого крупного проспективного исследования по генотип-ориентированной антиагрегантной терапии при ишемическом инсульте, результаты которого еще не доступны [131].

После подтверждения клинической валидности и клинической полезности, необходимо наличие конкретных алгоритмов персонализации антиагрегантной терапии на основе фармакогенетических маркеров. Рутинное применение фармакогенетического тестирования для персонализации антиагрегантной терапии не поддерживается в клинических рекомендациях большинства кардиологических сообществ (Европейское общество кардиологов, Американская ассоциация сердца/Американская коллегия кардиологов, Российское кардиологическое общество) и международных экспертных консенсусах [41]. Однако целесообразность применения фармакогенетического тестирования указана в инструкции клопидогрела [132] и подтверждается позицией крупнейших регуляторов (Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA), Swiss Agency of Therapeutic Products (Swissmedic), Pharmaceuticals and Medical Devices Agency Japan (PMDA), Health Canada Santé Canada (HCSC)) у пациентов высокого риска тромботических или геморрагических событий может быть оправдано [133]. На сегодняшний день, существуют алгоритмы по подбору антиагрегантной терапии на основе фармакогенетических маркеров из

рекомендаций различных фармакогенетических консорциумов [134]: Руководство голландской рабочей группы по фармакогенетике, Рекомендации консорциума внедрению клинической фармакогенетики, Руководство французской национального объединения по фармакогенетике (Таблица 7).

Таблица 7 - Алгоритмы персонализации антиагрегантной терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов на основе фармакогенетических маркеров [41]

Объединение по фармакогенетике	Статус пациента по CYP2C19	Коррекция терапии антиагрегантной терапии
Рекомендации консорциума внедрению клинической фармакогенетики	Быстрый метаболизатор (*1/*17, *17/*17)	У пациентов с ОКС с ЧКВ стандартная доза клопидогрела согласно инструкции
	Нормальный метаболизатор (*1/*1)	У пациентов с ОКС с ЧКВ стандартная доза клопидогрела согласно инструкции
	Промежуточный метаболизатор (*1/*2, *1/*3, *2/*17)	У пациентов с ОКС с ЧКВ альтернативная терапия тикагрелором или прасугрелом, если нет противопоказаний
	Медленный метаболизатор (*2/*2, *2/*3, *3/*3)	У пациентов с ОКС с ЧКВ альтернативная терапия тикагрелором или прасугрелом, если нет противопоказаний

Продолжение Таблицы 7

Объединение по фармакогенетике	Статус пациента по CYP2C19	Коррекция терапии антиагрегантной терапии
Руководство голландской рабочей группы по фармакогенетике	Быстрый метаболизатор (*1/*17, *17/*17)	Коррекции терапии не требуется
	Промежуточный метаболизатор (*1/*2, *1/*3, *2/*17)	У пациентов с ЧКВ, ишемическим инсультом или ТИА: выбрать альтернативный вариант лечения - прасугрел, тикагрелор, или увеличить поддерживающую дозу клопидогрела и 150 мг в сутки нагрузочную и до 600 мг. По другим показаниям: коррекции терапии не требуется.
	Медленный метаболизатор (*2/*2, *2/*3, *3/*3)	У пациентов с ЧКВ, ишемическим инсультом или ТИА: избегать назначения клопидогрела. Выбрать прасугрел, тикагрелор, ацетилсалициловую кислоту / дипиридамола. По другим показаниям: определить уровень остаточной активности тромбоцитов на фоне клопидогрела и рассмотреть альтернативный препарат для не ответчиков - прасугрел или тикагрелор.
Руководство французского национального объединения по фармакогенетике	Быстрый метаболизатор (*1/*17, *17/*17)	Коррекции терапии не требуется
	Промежуточный метаболизатор (*1/*2, *1/*3, *2/*17)	Выбрать альтернативный препарат, не метаболизирующийся CYP2C19: прасугрел или тикагрелор
	Медленный метаболизатор (*2/*2, *2/*3, *3/*3)	Выбрать альтернативный препарат, не метаболизирующийся CYP2C19: прасугрел или тикагрелор

Анализ алгоритмов персонализации антиагрегантной терапии представленных выше демонстрирует, что большинство рекомендаций направлены

на подбор антиагрегантной терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов на основе фармакогенетических маркеров по CYP2C19. Наиболее частая опция по коррекции антиагрегантной терапии в рекомендациях различных фармакогенетических консорциумов заключается в выборе альтернативного ингибитора P2Y₁₂-рецепторов и реже – в увеличении дозы клопидогрела.

Рекомендации по персонализации антиагрегантной терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов на основе других фармакогенетических маркеров – не представлены в литературе. Кроме того, недостаточно изученными возможности деэскалации терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов на основе фармакогенетического тестирования.

Помимо, продемонстрированной в генотип-ориентированных исследованиях, клинической полезности, применение фармакогенетического тестирования для персонализации антиагрегантной терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов может быть экономически целесообразно, что было показано в ранее проведенных фармакоэкономических исследованиях среди пациентов с ОКС, стабильной ИБС и ишемическим инсультом [135, 136, 137, 138].

1.4.2. Фармакоэпигенетика ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов

Несмотря на обнадеживающие результаты исследований в области персонализации фармакотерапии антитромботическими препаратами на основе фармакогенетики ферментов биотрансформации и транспортеров ЛС, проблема подбора максимально эффективной и безопасной терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов остается не решенной. Соответственно важное значение имеет изучение новых перспективных маркеров повышения эффективности и безопасности лечения антиагрегантными препаратами из группы ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов. Новым перспективным инструментом персонализации терапии антиагрегантными препаратами у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями может стать исследование таких эпигенетических маркеров, как микроРНК (microRNA) и их роли в прогнозировании эффективности и безопасности лекарственных средств.

МикроРНК представляют собой короткие некодируемые фрагменты РНК из 21–25 нуклеотидов, которые могут регулировать экспрессию генов за счет связывания с 3'-нетранслируемой областью участков мРНК с дальнейшим подавлением процесса трансляции [139]. В организме микроРНК могут выявляться во внутриклеточном содержимом, в различных биологических жидкостях (циркулирующие микроРНК), а так же экзосомах [140,141]. Большая часть микроРНК содержится в внутри интронных и экзонных областей и лишь небольшая в межгенных областях [142]. За процесс транскрипции микроРНК отвечает фермент РНК-полимераза II и III. На первом этапе синтезируется примикроРНК, из которой под влиянием фермента РНК-эндонуклеазы III типа - Drosha образуется пре-микроРНК. После попадания в цитоплазму, другой эндонуклеазой III типа - Dicer распознается 3-концевой участок пре-микроРНК с формированием двухцепочечных комплексов совместно с РНК-связывающим белком [142]. В дальнейшем после разделения нитей формируется зрелая микроРНК, которая в составе РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC - RNA Induced Silencing Complex) связывается с соответствующей областью целевых мишеней мРНК тонко регулируя экспрессию гена [142].

Несмотря на то, что в тромбоцитах не содержится ядра и ДНК, тем не менее тромбоциты сохранили способность трансляции содержащейся в них мРНК, что подтверждается корреляцией между протеомом и транскриптомом тромбоцитов [143]. Перечисленные особенности привлекли внимание к микроРНК, как перспективному биомаркеру маркеру оценки функционального состояния тромбоцитов и мониторинга эффективности антиагрегантов. В ранее проведенных исследованиях изучалась роль микроРНК, как маркера прогнозирования нарушения ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов 2 различными путями: 1) влияние на экспрессию генов, кодирующих различные тромбоцитарные белки, тем самым отражая их активацию, адгезию, фармакодинамические параметры антиагрегантов и тд.; 2) влияние на экспрессию генов, кодирующих фармакокинетические компоненты, участвующие в абсорбции, метаболизме, распределении и выведении ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов (системы ADME) там

самым отражая влияние на фармакокинетические параметры антиагрегантов. Так в нескольких ранее проведенных исследованиях изучалась роль микроРНК, как биомаркера агрегации тромбоцитов и прогностического маркера для мониторинга ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов. В исследовании Willeit и соавт. было показано, значимое снижение уровней плазменных микроРНК-126, микроРНК-150, микроРНК-191 и микроРНК-223 в плазме на фоне терапии ацетилсалициловой кислотой и прасутгрелом по сравнению уровнем до начала терапии и терапией без прасутгрела [144]. В тоже время в исследовании В. Jäger с соавт., прекращение терапии клопидогрелом, прасутгрелом или тикагрелором не приводило к значимому изменению уровня циркулирующих микроРНК -126, микроРНК-150, микроРНК-191 и микроРНК-223 [145]. В ряде исследований было продемонстрировано значимое изменение уровней отдельных микроРНК при эскалации терапии с клопидогрела на тикагрелор или прасутгрел. Так в исследовании А. Carino и соавт., было показано, что уровень циркулирующих микроРНК-126, микроРНК-223 и микроРНК-150 значимо снижаются, а микроРНК-96, наоборот, повышается через 24 часа после перехода с клопидогрела на тикагрелор у пациентов ОКС [146]. Аналогичные циркулирующим микроРНК данные по ассоциации с антиагрегантным действием ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов получены и по микроРНК в тромбоцитах. В работе Chen и соавт. было показано, что экспрессия микроРНК-26а в тромбоцитах была значительно повышена у пациентов с резистентностью к клопидогрелу после стентирования коронарных сосудов [147]. В исследовании Liu соавт., у пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов на фоне клопидогрела отмечались пониженные уровни микроРНК-223 и микроРНК-126, а также повышенный уровень микроРНК-150 [148]. Противоречивые результаты были получены в ряде других исследований среди пациентов с ИБС, в том числе с ОКС, где изучалась ассоциация антиагрегантного действия и клинической эффективности ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов с уровнем микроРНК-223, микроРНК-150, микроРНК-126, микроРНК-96, микроРНК-142, микроРНК-605, микроРНК-15а, микроРНК-339-3 р, микроРНК-365, miR-495, miR-98 [149,150] (Таблица 8).

Таблица 8 – Тромбоцитарные микроРНК, продемонстрировавшие взаимосвязь с нарушением ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов

МикроРНК	Функция	Ссылка
микроРНК-223	Регулирует экспрессию гена P2Y ₁₂ , кодирующего АДФ-рецепторы тромбоцитов	[151, 152, 153, 154]
микроРНК-26a	Регулирует экспрессию гена VASP, кодирующего стимулируемый вазодилататором фосфопротеин	[147]
микроРНК-150	Модулятор продукции и активации тромбоцитов	[144, 146]
микроРНК-126	Регулирует экспрессию гена P2Y ₁₂ , кодирующего АДФ-рецепторы тромбоцитов, может управлять процессом генерации тромбина тромбоцитами	[144, 146, 148]
микроРНК-96	Регулирует экспрессию гена везикул-ассоциированного мембранного протеина тромбоцитов VAMP8, играющего важную роль в секреции везикул и активации тромбоцитов	[146]

На рисунке 2 представлены микроРНК продемонстрировавшие взаимосвязь с антиагрегантным действием ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов и ацетилсалициловой кислоты.

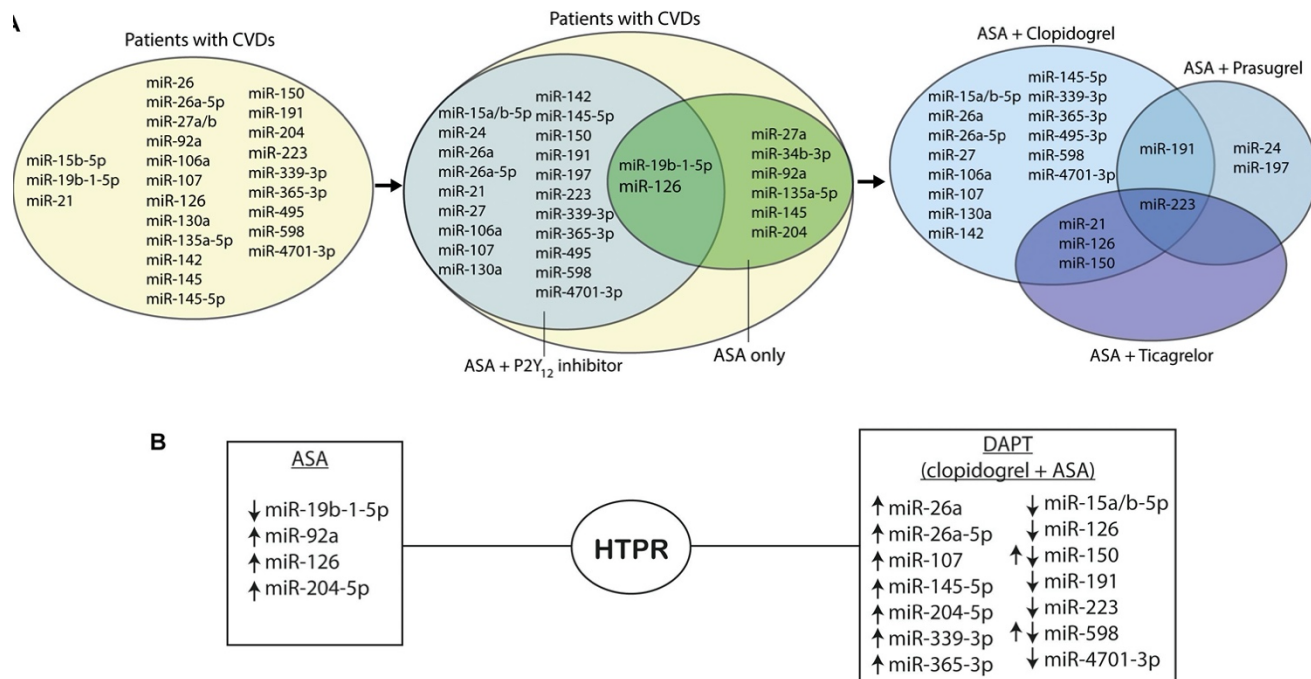


Рисунок 2 – МикроРНК продемонстрировавшие взаимосвязь с антиагрегантным действием ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов и ацетилсалициловой кислоты [149]

Различные семейства микроРНК, помимо влияния на экспрессию генов, кодирующих тромбоцитарные белки, также могут влиять эффективность и безопасность терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов через воздействие на экспрессию генов, кодирующих изоферменты семейства цитохрома P450 и транспортеры лекарственных средств [155, 156, 157, 158]. Участие изоферментов цитохрома P450 и транспортеров лекарственных средств в фармакокинетике клопидогрела, тикагрелора и прасугрела было представлено в предыдущем разделе. В исследовании Q. Tang и соавт., в условиях *in vitro* на гепатоцитах была продемонстрирована ассоциация высокого уровня микроРНК-142 с низкой экспрессией генов CYP3A4 и CYP3A5, а также с фармакокинетическими параметрами субстрата изоферментов CYP3A4/CYP3A5 – клопидогрела: отмечалась обратная корреляция уровня микроРНК-142 с концентрацией метаболитов клопидогрела после нагрузочной дозы 300 мг [159]. В другом исследовании W. Zhou и соавт., было показано, что микроРНК-605 значительно снижает экспрессию гена CYP2B6, кодирующего одноименный изофермент, метаболизирующий клопидогрел [160].

Для гена CYP2C19, кодирующего наиболее значимый в метаболизме клопидогрела изофермент, так же была доказана взаимосвязь с уровнем различных микроРНК. Так в исследовании Sharma и соавт., на индийской популяции для miR-1343-3p и miR-6783-3p была показана ассоциация с носительством аллеля CYP2C19*2 и вероятным подавлению экспрессии CYP2C19 с формированием нефункционального усеченного белка у пациентов с ОКС, получающих клопидогрел [161]. Аналогичная ассоциация была получена в исследовании Peng и соавт., в китайской популяции в среди пациентов с ОКС, получающих клопидогрел между носительством аллеля CYP2C19*2 и пониженным уровнем микроРНК-223, микроРНК-221, микроРНК-21 [154]. В исследовании Yu D и соавт., отмечалась обратная корреляция уровня микроРНК-29a-3p и экспрессией CYP2C19 клетках печени HepaRG [162]. В экспериментальных исследованиях на гепатоцитах взаимосвязь с экспрессией клинически значимых генов, кодирующих фармакокинетические компоненты абсорбции, метаболизма, распределения и выведения ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов показана и для других микроРНК (Таблица 9). Однако набор значимых микроРНК для конкретных изоферментов цитохрома P450 и транспортеров лекарственных средств характеризуется выраженной вариабельностью и низкой воспроизводимостью в исследованиях, что возможно обусловлено одним из недостатков микроРНК, как биомаркера – влияния множества внешних и внутренних факторов на уровень на преаналитическом и аналитическом этапе. В таблице 9 представлены микроРНК, регулирующие экспрессию гена, согласно экспериментальному исследованию на тканях печени с ассоциацией $p < 0,05$ до $p < 0,001$ [157].

Таблица 9 - МикроРНК, регулирующее экспрессию ряда генов системы ADME, имеющих важное значение для фармакокинетики тикагрелора, клопидогрела, прасугрела

Ген, кодирующий одноименный изофермент/транспортёр, связанный фармакокинетикой ингибиторов P2Y12-рецепторов	МикроРНК, регулирующее экспрессию соответствующего гена, согласно экспериментальным исследованиям на тканях печени
ABCB1	микроРНК-34а
SLCO1B1	микроРНК-132, микроРНК-142-3р, микроРНК-150, микроРНК-221, микроРНК-21, микроРНК-223, микроРНК-34а, микроРНК-27а
CYP2C19	микроРНК-132, микроРНК-142-3р, микроРНК-185, микроРНК-29а, микроРНК-200а, микроРНК-21, микроРНК-34а, микроРНК-27а, микроРНК-31
CYP2C9	микроРНК-204, микроРНК-28, микроРНК-15а
CYP3A4/5	микроРНК-34а, микроРНК-221
CYP2B6	микроРНК-605, микроРНК-142-3р, микроРНК-221, микроРНК-223
CYP1A2	микроРНК-132, микроРНК-21
UGT2B7	микроРНК-132, микроРНК-21

Таким образом, анализ циркулирующих и тромбоцитарных микроРНК с разработкой и клинической валидацией новых алгоритмов персонализации антиагрегантной терапии на основе данного фармакоэпигенетического маркера может внести важный вклад в совершенствование подходов к подбору антитромбоцитарных лекарственных средств из группы P2Y12-рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

1.4.3. Фармакометаболизм ингибиторов P2Y12-рецепторов

Фармагеномные маркеры, описанные выше, не всегда дают возможность прогнозировать фенотип пациента и ответ на лекарственную терапию. В реальной клинической практике нередко наблюдается феномен «феноконверсии», когда генотип не предсказывает фенотип и текущее состояние пациента, из-за

вмешательства дополнительных внешних и внутренних факторов: сопутствующие заболевания и фармакотерапия, окружающая среда, деятельность микробиоты, демографические факторы и т. д. Заполнить данный недостаток фармагенетики можно комбинированным использованием методов фармакометаболизма, которая более точно отражает текущий метаболический профиль пациента со всеми сопутствующими факторами. Фармакометаболизм – это область научных исследований, направленных на изучение подходов к прогнозированию индивидуальных различий фенотипов лекарственного ответа, основанные на использовании как исходных метаболических профилей до начала лечения, так и эффектов лекарственной терапии в течение длительного времени [163]. Различия профилей экзогенных и эндогенных метаболитов – является следствием имеющихся фармакокинетических и фармакодинамических различий пациентов и, соответственно, могут быть использованы для прогнозирования ответа на лекарственный препарат [164]. Основные исследования в области фармакометаболизма связаны с измерением: 1) экзогенных соединений, в том числе лекарственных средств и их метаболитов; 2) выявления эндогенных метаболитов для прогнозирования фармакокинетических и фармакодинамических признаков лекарственных средств; 3) выявления эндогенных метаболитов с целью мониторинга прогрессирования заболевания и мониторинга фармакотерапии у пациентов [165]. К наиболее часто используемым методам в фармакометаболических исследованиях относятся: жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ЖХ-ХМС), газовая хроматография с масс-спектрометрией (ГХ-ХМС) (ГХМ), спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) [165, 166, 167]. При этом измерения маркеров проводится либо целенаправленно, когда заранее выбранные метаболиты относятся к определенным химическим соединениям или метаболическим путям, либо нецеленаправленно, когда оценивается весь профиль без предшествующего отбора маркеров [165]. Последний вариант чаще используется для выявления новых ранее не описанных метаболомных маркеров. Для поиска фармакометаболических биомаркеров прогнозирования их фармакокинетики и фармакодинамики, а также

эффективности/безопасности лекарственных средств в виде клинических исходов, применяется оценка метаболического профиля до лечения и после/на фоне лечения конкретным лекарственным препаратом. По результатам подобных исследований могут быть выделены маркеры выбора дозы или препарата до лечения или же маркеры исходов уже на фоне лечения. В исследовании Arwa M. Amin и соавт. исследовались фармакометаболические маркеры в плазме у пациентов с ИБС перенесших чрескожное коронарное вмешательство и высокой остаточной реактивностью тромбоцитов (метод VerifyNow) на фоне двойной антиагрегантной терапии клопидогрел + АСК. Метаболиты оценивали до введения препарата и через 6 часов после 600 мг клопидогрела. По результатам анализа было выявлено, что наиболее выраженные нарушения у пациентов с резистентностью к клопидогрелу были выявлены в метаболических путях образования аминокислот, метаболизма азота и метаболизма глицин-серин-треонина [168]. С резистентностью к клопидогрелу были ассоциированы метаболические фенотипы инсулинорезистентности, сахарного диабета второго типа, ожирения, кишечной микробиоты и сердечной недостаточности [168]. Аналогичные результаты были получены автором и в исследовании фармакометаболического профиля мочи у той же группы пациентов, где автор особо выделил ассоциацию метаболитов кишечной микробиоты с резистентностью к клопидогрелу [169].

Важным направлением фармакометаболических исследований является фенотипическое профилирование по системам биотрансформации лекарственных средств, где оценка эндогенных метаболитов имеет ряд преимуществ перед применением целевых лекарственных средств или их коктейлей для оценки активности изоферментов цитохрома P450: неинвазивность, меньшие финансовые и временные потери, возможность применения в особых уязвимых группах пациентов [165]. Так для прогнозирования активности изофермента CYP3A4, метаболизирующего более 50% применяемых в настоящее время лекарственных средств, ранее были разработаны как неинвазивные (6 β -гидроксикортизол/кортизоловый [170], холестероловый [171]), так и инвазивные тесты (эритромициновый [172], мидозоламовый [173], хининовый [174]). При этом

изофермент CYP3A4 характеризуется выраженной индивидуальной вариабельностью активности (почти 20-кратной) связанной с влиянием генетических, демографических, этнических и других факторов [175, 176, 177, 178, 179]. Важно отметить, что у изоферментов CYP3A4 и CYP3A5 на более чем 80% совпадают аминокислотный состав и субстраты данных изоферментов, и, соответственно, можно говорить об при оценке активности системы CYP3A4/CYP3A5 – двух наиболее важных изоферментов системы CYP3A [180]. В исследовании Lau WC и соавт., у пациентов с ИБС и ЧКВ на фоне клопидогрела была ранее продемонстрирована обратная корреляция между уровнем остаточной активности тромбоцитов и активностью изофермента CYP3A4, измеренной эритромициновым тестом [179]. Однако данное исследование проводилось среди здоровых добровольцев, что затрудняет экстраполяцию данных на пациентов с ОКС, ишемическим инсультом.

6 β -гидрокортизол/кортизоловый тест, основанный на оценке соотношения 6 β -гидрокортизола, который образуется под влиянием CYP3A4, к кортизолу в утренней моче - является одним из перспективных неинвазивных тестов оценки активности CYP3A4, у пациентов на фоне приема антитромбоцитарных лекарственных средств из группы P2Y₁₂-рецепторов. Однако в настоящее время его прогностическая ценность остается предметом дискуссии с учетом разнонаправленных результатов ранее проведенных исследований [177, 181, 182]. Основным недостатком данного теста является значительная индивидуальная вариабельность уровня кортизола и низкая ценность при сборе утренней мочи, вместо суточной [170]. В настоящее время в литературе недостаточно исследований посвященных оценке активности CYP3A4 неинвазивными тестами для прогнозирования фармакокинетики и эффективности ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов.

Ранее были проведены так же исследования по измерению концентрации клопидогрела и его метаболитов в качестве биомаркера, косвенно характеризующего степень ингибирования агрегации тромбоцитов и эффективность антиагрегантов [183, 184, 185]. В исследовании Frelinger A. и соавт.,

было показано, что концентрация активного метаболита значимо коррелирует с уровнем остаточной реактивности тромбоцитов на фоне клопидогрела [186]. В исследовании Karaźniewicz-Łada M и соавт., была продемонстрирована ассоциация с H4 метаболита клопидогрела с максимальной агрегацией тромбоцитов на фоне клопидогрела у пациентов с ОКС и ЧКВ [187]. Кроме того, для концентрации активного метаболита клопидогрела была продемонстрирована ассоциация с носительством минорных аллелей гена ABCB1, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4/5, PON1, SLC14A2, N6AMT1, NR1I2 [188, 189, 190, 191]. Оценка фармакокинетических маркеров для прогнозирования ответа на клопидогрел имеет ряд ограничений [184]. Прежде всего это низкие концентрации и нестабильность активных тиоловых метаболитов клопидогрела. Данные ограничение частично преодолеваются использованием различных стабилизирующих соединений после взятия плазмы на исследование кинетики [184, 192] и использованием сверхвысокопроизводительной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией точностью с чувствительностью выявления концентраций 0,5–250 нг / мл. Другим подходом к преодолению ограничений является измерение самого пролекарства и неактивного метаболита для косвенной оценки уровня активного метаболита и его фармакодинамических эффектов [193, 194, 195]. Соответственно, использование сверхвысокопроизводительной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией для оценки активных метаболитов клопидогрела и измерение исходного соединения вместе с более стабильными метаболитами с целью прогнозирования эффективности терапии и клинических исходов, может дать важную дополнительную информацию для разработки комплексных подходов к персонализации терапии клопидогрелом [196].

В исследованиях по измерению концентрации тикагрелора и его метаболитов в качестве биомаркера прогнозирования ингибирования агрегации тромбоцитов и клинической эффективности получены противоречивые результаты. При этом на концентрацию тикагрелора и его метаболитов в плазме могут оказывать влияние различные демографические, клинические, фармакологические и генетические факторы, особенно в у условиях ОКС, когда всасывание тикагрелора может быть

замедлено [197, 198, 199]. В исследовании P Adamski и соавт., где оценивалось изменение фармакокинетических параметров тикагрелора у пациентов ОКС, было показано, что пациенты с ОКС с подъемом ST, сахарным диабетом и получившие морфин имеют более низкие показатели отношения концентрации активного метаболита AR-C124910XX к концентрации тикагрелора, по сравнению с пациентами без этих факторов [198]. Данные особенности нарушения кинетики тикагрелора могут приводить к недостаточному подавлению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Кроме того, были отмечены более высокие показатели этого отношения у курильщиков, по сравнению с некурящими. Влияние полиморфизмов генов CYP3A4, CYP3A43, SLCO1B1 и UGT2B7 на фармакокинетические параметры тикагрелора, было ранее установлено полногеномном ассоциативном анализе на участниках крупного исследования PLATO (PLATelet inhibition and patients Outcome) [108]. При этом различные аллельные варианты генов CYP3A4, CYP3A43 и UGT2B7 были ассоциированы со сниженной концентрацией, а аллельные варианты гена SLCO1B1 – с повышенной. Данная ассоциация была воспроизведена и для аллелей CYP3A4*1G CYP3A5*3 среди здоровых добровольцев китайской популяции [200]. В другом исследовании Qian Zhu и соавт., здоровых добровольцах китайской популяции была установлена значимая положительная корреляция активного метаболита тикагрелора AR-C124910XX, но не самого препарата, с показателями остаточной агрегации тромбоцитов [201]. Кроме того в исследовании было установлено, что у носителей аллельного варианта CYP2C19*3 отмечается более высокая максимальная концентрация тикагрелора, а у носителей CYP2C19*2 и SLCO1B1 388A>G А – пониженная максимальная концентрация активного метаболита тикагрелора AR-C124910XX [201].

Таким образом, с учетом противоречивых результатов ранее проведенных исследований, проблема персонализации антитромботической терапии на основе измерения биомаркеров является недостаточно разработанной и необходимы комплексные исследование, включающее измерение активности изоферментов цитохрома P450, генотипирование, оценку фармакокинетических и

фармакодинамических параметров препарата, а также анализ уровня экспрессии генов на основе циркулирующей микроРНК.

1.5. Распространенность в Российской Федерации некоторых клинически значимых фармакогенетических биомаркеров прогнозирования индивидуального ответа на антиагрегантную терапию

Фармакологический ответ организма на приём того или иного лекарственного препарата определяется множеством факторов: возраст, пол, вес, сопутствующие заболевания, образ жизни, культура, раса/этническая группа, курение, диета пациента, свойства препарата, оптимальная доза и межлекарственные взаимодействия [202]. В тоже время до 50% вариабельности фармакологического ответа может определяться генетической изменчивостью организма. В Российской Федерации проживает множество этнических групп отличных от русской, относящихся к европеоидной или монголоидной расе. Изучение вопросов носительства полиморфных аллелей фармакологически важных генов в различных популяциях представляется актуальным с точки зрения оптимизации проведения фармакогенетических исследований и внедрения подобного тестирования в клиническую практику в различных регионах России. Расширение знаний в области фармакогенетики позволило установить расово-этнические особенности распространённости генетических биомаркёров. Данный аспект может играть важную роль при принятии клинических решений, особенно в такой многонациональной стране как Россия с её мульти-этническими регионами Северного Кавказа, Поволжья, Крыма, Сибири и Дальнего Востока.

Поволжский регион России исторически являлся территорией интенсивного межэтнического и культурного взаимодействия групп различного этнического происхождения. Здесь проживают народы тюркской и финно-угорской групп. Наиболее многочисленным народом Поволжского региона, помимо русского, являются татары численностью более 4 миллионов человек. Основным регионом проживания татар в России остаются республики Татарстан и Башкортостан. Антропологически татары на 80% относятся к европеоидной расе и на 20% - к

монголоидной. Анализ вариации митохондриальной ДНК поволжских татар показал, что в их генофонде фиксируется преобладание западно-евразийских гаплогрупп мтДНК [203, 204]. Таким образом, проживание на границе между Европой и Азией отразилось на генофонде этноса и сохранило следы смешения двух рас – одной с Запада и другой с Востока [205]. На сегодняшний день в рамках фармакогенетических исследований основных маркёров у татар были изучены CYP2C9*2,*3 [206], CYP2C19*2,*17 [207], CYP2D6*4 [208], ведутся работы по изучению маркёров препаратов, используемых в психиатрии [209, 210].

Другим этнически неоднородным регионом России является Кавказ. Горный ландшафт местности способствует географической изолированности и сохранению лингвистических и этно-конфессиональных различий между популяциями регионами. Здесь проживают представители черкесского этноса (адыгейцы, кабардинцы, черкесы), карачаевцы, балкарцы, осетины, чеченцы, многочисленные народы Дагестана. Изучение распространенности основных фармакогенетических маркёров показывает наличие этнических различий среди коренных групп данного региона между собой и в сравнении с русской этнической группой [211, 212, 213].

На сегодняшний день профиль клинически значимых фармакогенетических маркеров остается недостаточно изученным среди этнических групп в мультинациональных регионах России: Северный Кавказ, Поволжье, Дальний Восток.

Таким образом, в России изучение частоты носительства полиморфных генов является важным этапом имплементации фармакогенетического тестирования в практику. Так, решение о необходимости фармакогенетического тестирования для персонализации терапии может приниматься в зависимости от этнической принадлежности пациента, что исключает необходимость избыточного необоснованного назначения тестирования пациентов. Проведение широких популяционных фармакогенетических исследований необходимо для выявления частоты носительства полиморфных генов и определения этнических групп, у которых проведение фармакогенетического тестирования будет для снижения

нежелательных реакций и/или увеличения эффективности фармакотерапии будет экономически обоснованно.

1) Ген *CYP2C19*

Ген *CYP2C19* изофермента насчитывает 35 аллельных вариантов [214]. В качестве полиморфных маркеров при фармакогенетическом тестировании используются 3 аллели: *2, *3, кодирующие фермент со сниженной активностью, и *17, изменение в промоторной зоне, приводящее к образованию большего количества фермента. Особо следует отметить, что возможно одновременное наличие двух этих мутаций. В таком случае у человека будет повышена экспрессия в клетке фермента со сниженной активностью [215]. Частота носительства аллельного варианта *CYP2C19**2 может достигать 53,9% у представителей этнических групп Океании и довольно редко встречается у представителей Европеоидной расы – 14,6%. Аллельный вариант *CYP2C19**3 не так широко распространён в мировой популяции: частота носительства у представителей этнических групп Океании достигает 14,5%, у азиатов - 4-5%, и довольно редко встречается среди других этнических групп. Обратная тенденция наблюдается для аллельного варианта *CYP2C19**17: он мало встречается в Океании – 4,1%, но широко распространён у Европеоидов – 21,3% [216].

Фермент цитохрома *CYP2C19* участвует в метаболизме сразу нескольких важных классов лекарственных препаратов: бензодиазепины, антидепрессанты, ингибиторы протонной помпы (ИПП), антиагрегант клопидогрел [217, 218, 219, 220].

Частота распространенности аллельных вариантов *CYP2C19**2, *CYP2C19**3 и *CYP2C19**17, установленные в ходе работ российских исследователей [221,222,223,224,225,226,227], представлены на рисунках 3-5.

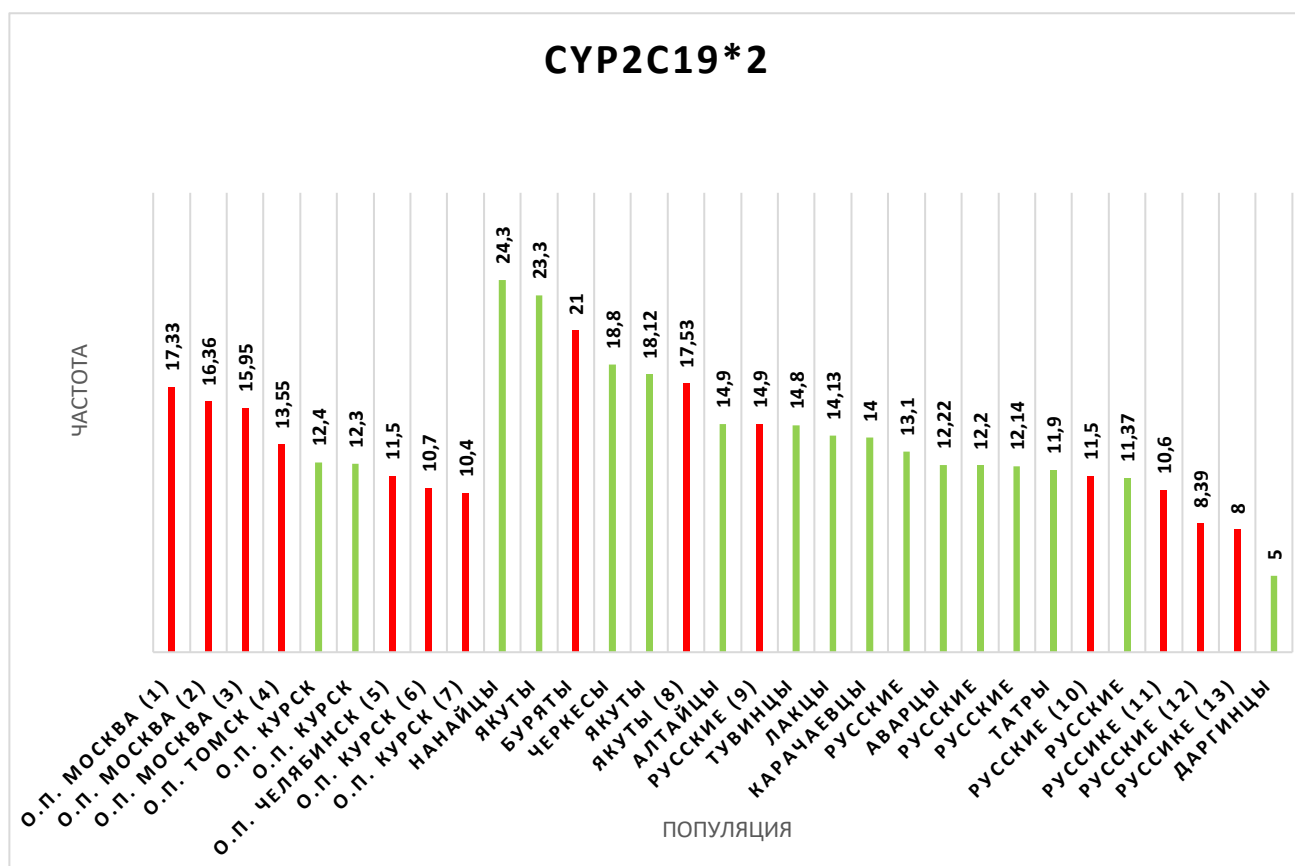


Рисунок 3 - Частота распространённости аллельного варианта CYP2C19*2 в российской популяции

Примечания: О.П. – Общая популяция. Зелёным цветом выделены исследования на здоровых добровольцах. Красным цветом выделены исследования, в которых тестирование проводилось у пациентов с различными заболеваниями, а именно:

1, 2, 4, 6 – ИБС

3 - Пациенты до чрескожного коронарного вмешательства

5 – приём клопидогрела, диагноз не указан

7 – эссенциальная гипертензия

8, 9, 10, 11, 12, 13 – ОКС

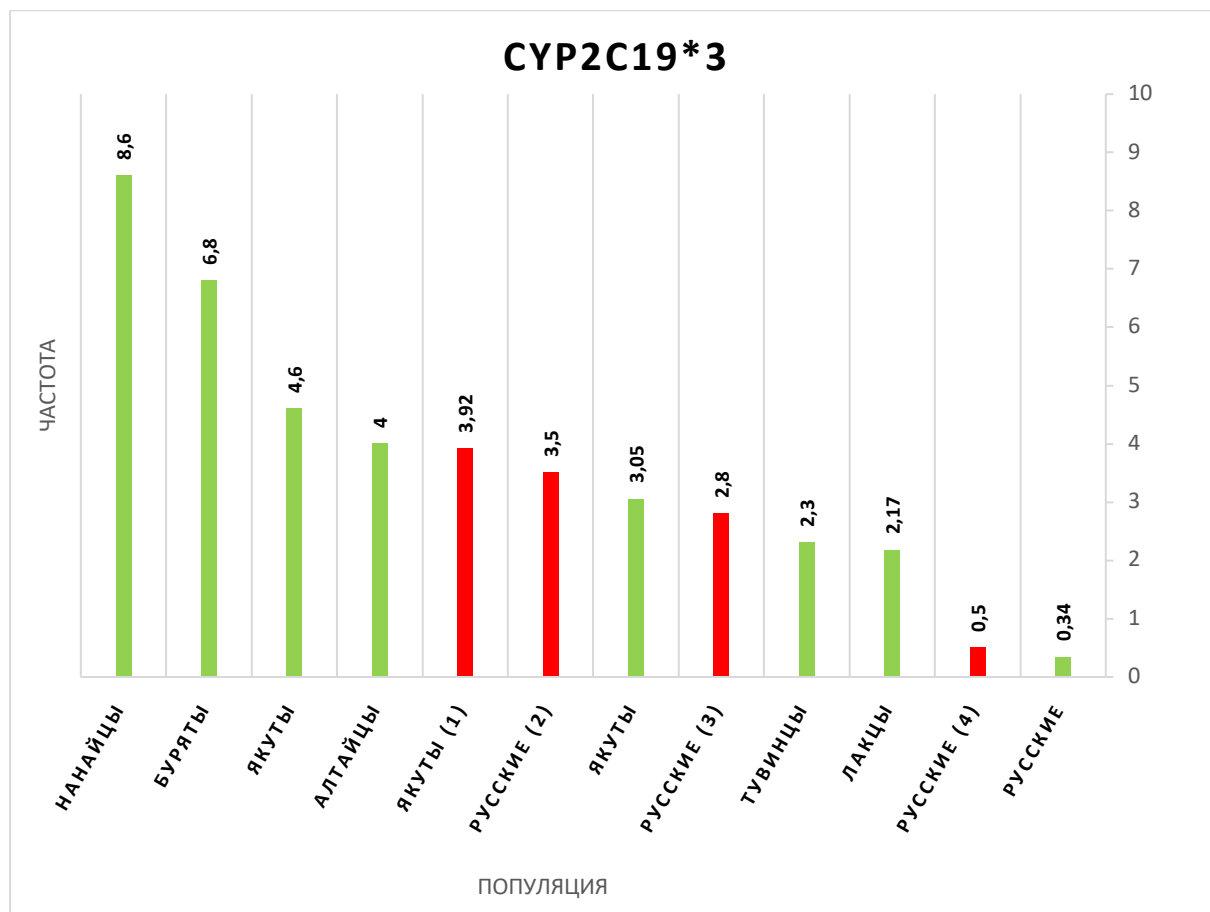


Рисунок 4 - Частота распространённости аллельного варианта CYP2C19*3 в российской популяции

Примечания: Зелёным цветом выделены исследования на здоровых добровольцах. Красным цветом выделены исследования, в которых тестирование проводилось у пациентов с различными заболеваниями, а именно: 1-4 – ОКС

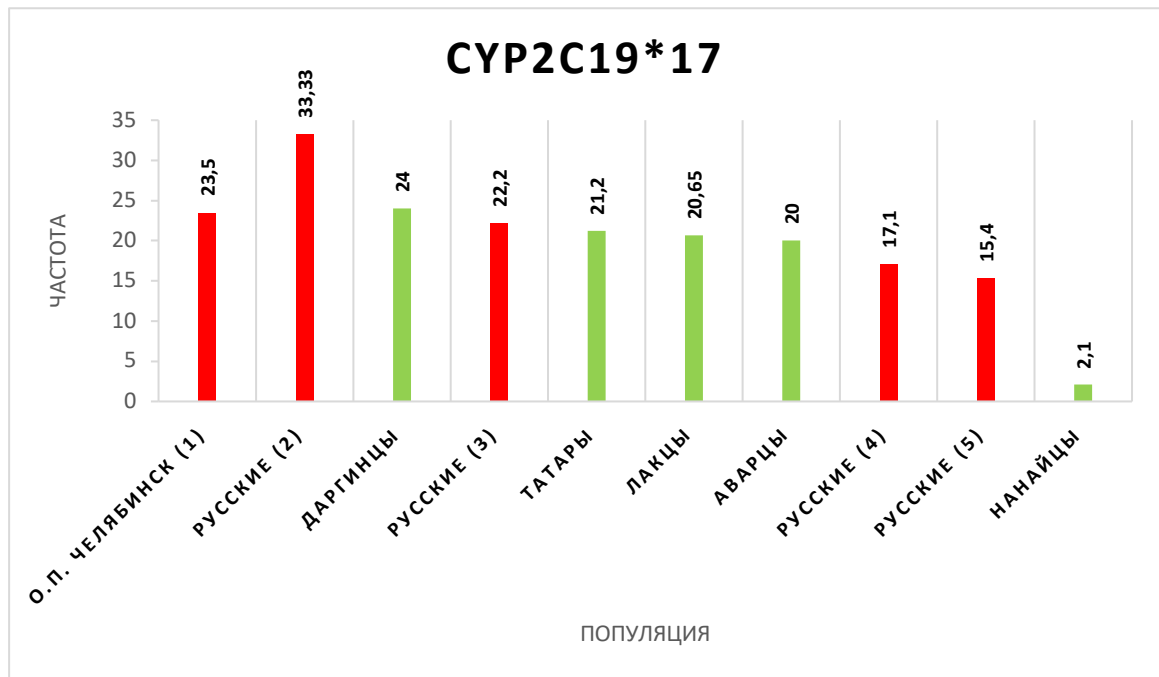


Рисунок 5 - Частота распространённости аллельного варианта *CYP2C19*17* в российской популяции

Примечания: О.П. – Общая популяция. Зелёным цветом выделены исследования на здоровых добровольцах. Красным цветом выделены исследования, в которых тестирование проводилось у пациентов с различными заболеваниями, а именно:

1 - приём клопидогрела, диагноз не указан

2-5 – ОКС

Анализ работ российских исследователей выявил широкую распространенность в популяции аллельных вариантов *CYP2C19*2* и *CYP2C19*17*, в то время как *CYP2C19*3* встречается реже и преимущественно у представителей монголоидной расы (Рисунок 6). Частота распространённости полиморфизмов данного гена согласуется с общемировыми данными для соответствующих рас.

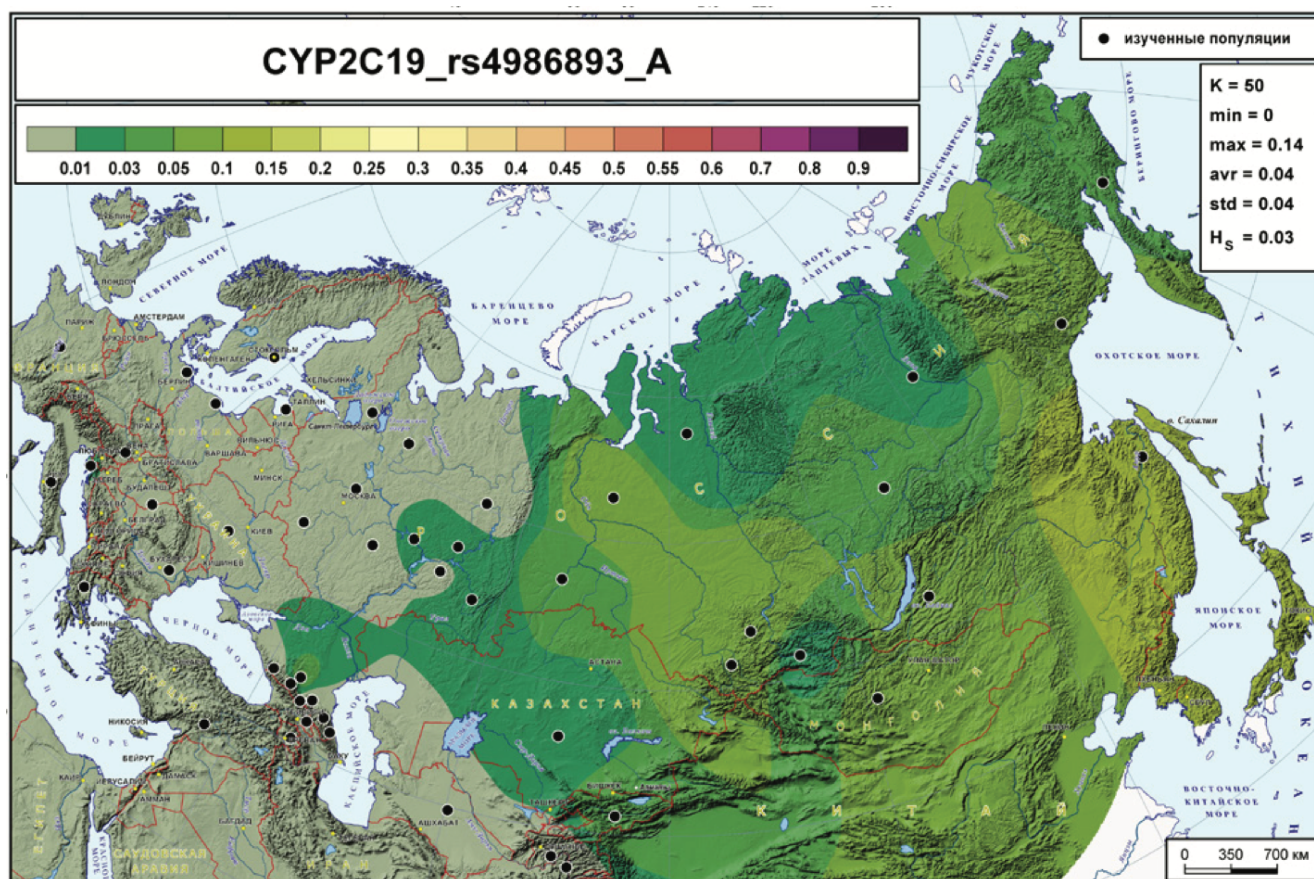


Рисунок 6 - Фармакогенетическая карта распространности аллельного варианта *CYP2C19*3* (Источник: Е. В. Балановская, В. С. Петрушенко, С. М. Кошель, Э. А. Почешхова, Д. К. Черневский, К. Б. Мирзаев и соавт. [269])

Что касается клинического применения, Muslimova и соавт. выявили у пациентов с ишемической болезнью сердца ассоциацию между носительством аллеля 681A гена *CYP2C19* и повышенной степенью агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ [224]. Golukhova и соавт., изучали остаточную активность тромбоцитов у пациентов, получающих двойную антиагрегантную терапию. Частота носительства аллеля *CYP2C19*2* в группе пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов была значительно выше по сравнению с группой с нормальной реактивностью тромбоцитов (40,0 против 20,3%; $p = 0,0035$) [223]. Golukhova и соавт., изучили чувствительность к клопидогрелу в зависимости от носительства полиморфных вариантов *CYP2C19* у пациентов, перенесших ЧКВ. Реактивность тромбоцитов оказалась выше у пациентов с гетерозиготными и гомозиготными генотипами *CYP2C19*2* по сравнению с диким генотипом [222]. Vokeria и

соавт.,использовали фармакогенетическое тестирование для подбора антиагрегантной терапии у пациентов с ИБС [221].

2) Ген CYP2C9

Ген цитохрома CYP2C9 насчитывает более 60 аллельных вариантов [227] однако в реальной клинической практике наибольшую роль играют аллели *2, *3, *5, *6, *8 и *11, носительство которых ассоциировано со сниженной функцией фермента. Частота носительства данных аллельных вариантов неодинакова у представителей различных рас. CYP2C9*2 наиболее распространен среди европейцев - 12,60% и практически не встречается среди представителей Восточной Азии - 0,06%. CYP2C9*3 распространен у представителей Южной и Центральной Азии - 10,17% [228] Так как на территории нашей страны проживают представители, как европеоидной, так и монголоидной расы, необходимо принимать во внимание оба этих аллельных варианта. CYP2C9 участвует в метаболизме ряда важных лекарственных препаратов с низким терапевтическим индексом, а именно: варфарин, клопидогрел, флувастатин, аценокумарол, ибупрофен, - соответственно необходимо учитывать носительство медленных аллелей гена CYP2C9, кодирующего одноименный изофермент, во избежание нежелательных лекарственных явлений при назначении перечисленных лекарственных препаратов [230]. Частота распространенности аллельных вариантов CYP2C9*2 и CYP2C9*3, установленные в ходе работ российских исследователей [207, 211, 212, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239] представлены на рисунках 7-9.

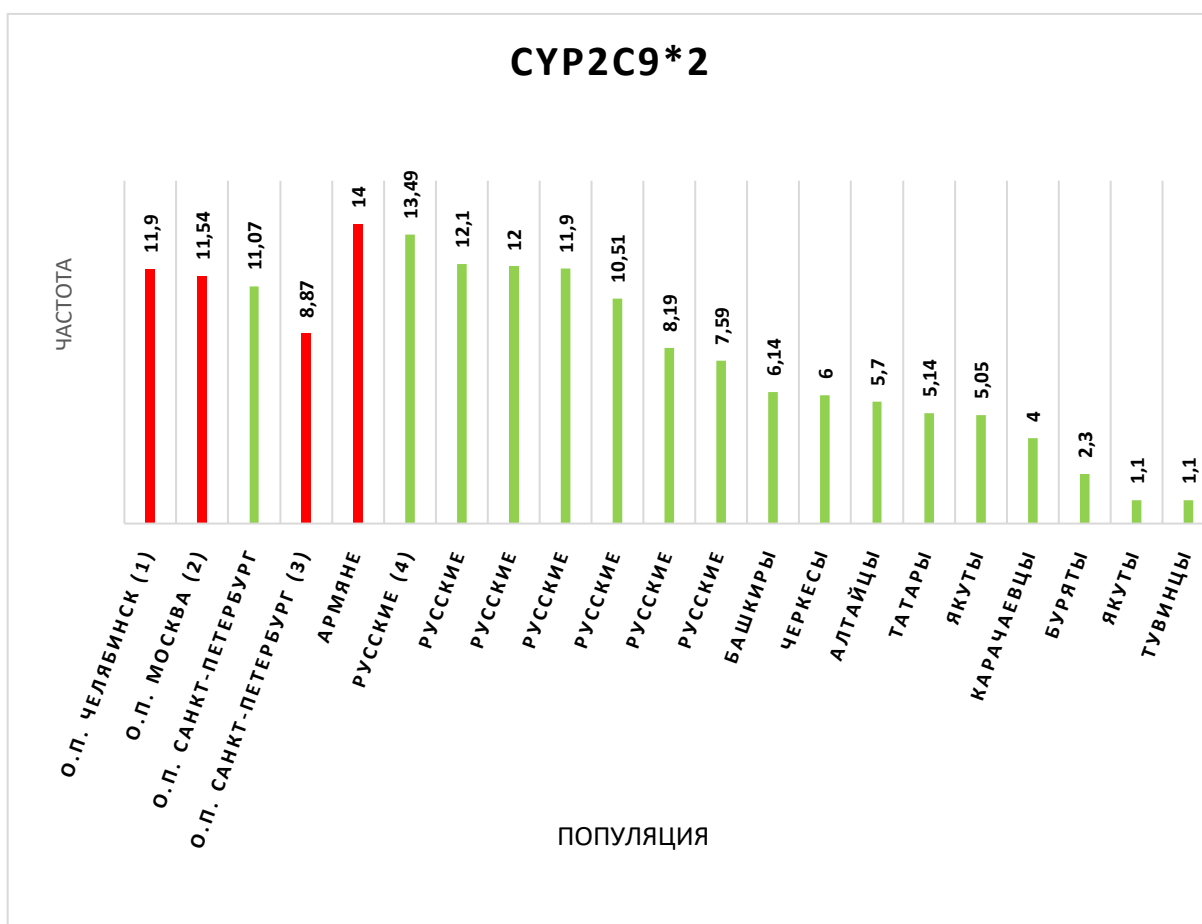


Рисунок 7 - Частота распространённости аллельного варианта CYP2C9*2 в российской популяции

Примечания: О.П. – Общая популяция. Зелёным цветом выделены исследования на здоровых добровольцах. Красным цветом выделены исследования, в которых тестирование проводилось у пациентов с различными заболеваниями, а именно:

1 – приём варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий (73,0 %), протезированием сердечного клапана (14,4 %), сочетанием фибрилляции предсердий и протезированного клапана (6,3 %) и тромбозы различной локализации (6,3 %);

2 - приём варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий, тромбозом глубоких вен, механическими клапанами сердца.

3 - приём варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий, механическими клапанами сердца, тромбозами различных локализаций.

4 - приём варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий.

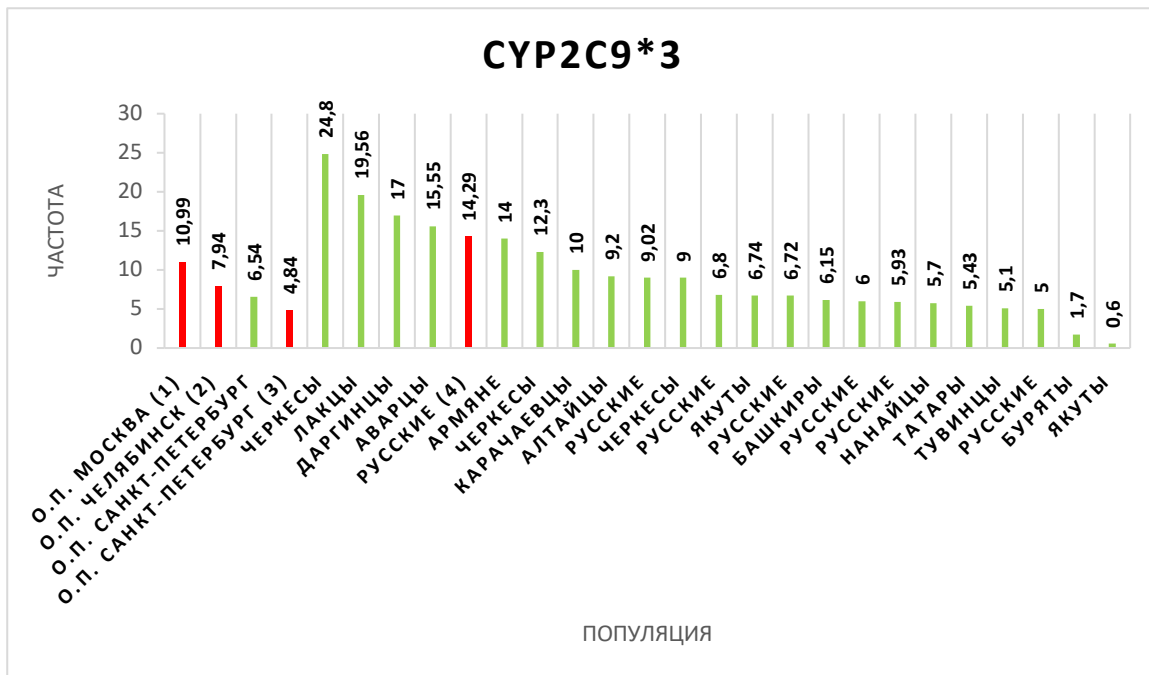


Рисунок 8 - Частота распространённости аллельного варианта CYP2C9*3 в российской популяции

Примечания: О.П. – Общая популяция. Зелёным цветом выделены исследования на здоровых добровольцах. Красным цветом выделены исследования, в которых тестирование проводилось у пациентов с различными заболеваниями, а именно:

1 - приём варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий, тромбозом глубоких вен, механическими клапанами сердца.

2 – приём варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий (73,0 %), протезированием сердечного клапана (14,4 %), сочетанием фибрилляции предсердий и протезированного клапана (6,3 %) и тромбозы различной локализации (6,3 %);

3 - приём варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий, механическими клапанами сердца, тромбозами различных локализаций.

4 - приём варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий.

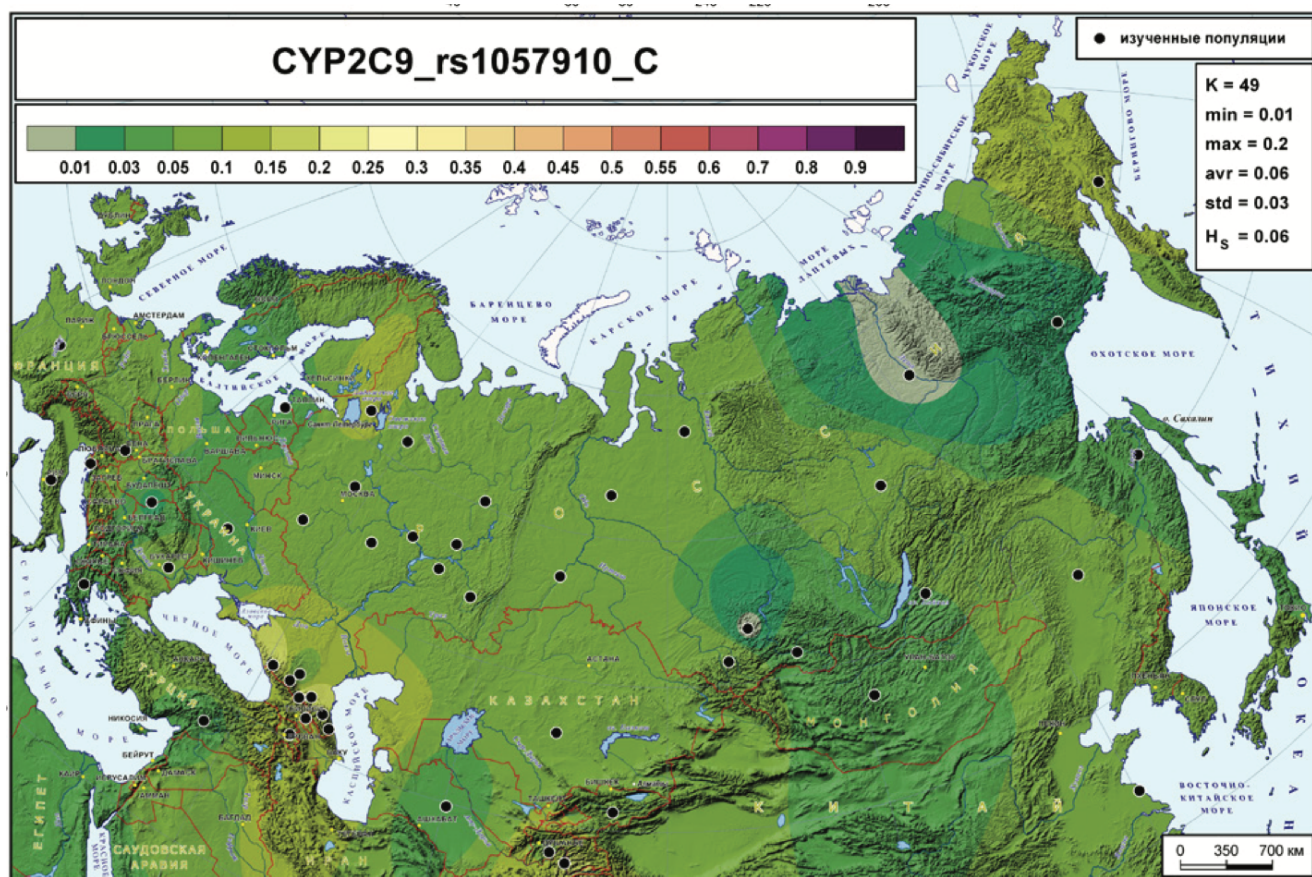


Рисунок 9 - Фармакогенетическая карта распространности аллельного варианта *CYP2C9*3* (Источник: Е. В. Балановская, В. С. Петрушенко, С. М. Кошель, Э. А. Почешхова, Д. К. Черневский, К. Б. Мирзаев и соавт. [269])

Анализ российских работ показывает, что частота аллельных вариантов *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* имеет свои особенности. Так, *CYP2C9*2* аллельный вариант превалирует у русских и армян, как представителей европеоидной расы, и редко встречается у представителей монголоидной расы, а именно: якутов, бурятов, тувинцев. Однако, не наблюдается обратной тенденции для аллельного варианта *CYP2C9*3*, как заявлено в литературе. Что важно, данный аллельный вариант распространен и у представителей народностей Кавказа: черкесов, лакцев, аварцев и даргинцев, - что указывает обоснованность применения генетического тестирования у данной группы пациентов. Анализ результатов выявил и характерную особенность нашей страны: частота распространности аллельных вариантов как среди русских, так и в общей популяции, меняется в зависимости от региона. Вероятно, это обусловлено миграцией населения и межнациональными браками.

3) Ген CYP4F2

CYP4F2 окисляя инактивирует витамин K₁, а так же кодирует изофермент лейкотриен-В (4)-омега-гидроксилазу-1 [240]. Различные аллельные варианты данного гена были ассоциированы с резистентностью к клопидогрелу и тикагрелору [105]. Частота носительства данного полиморфизма среди европейских популяций в среднем составляет 20-44% [241]: среди итальянцев - 32,9% [242], у литовцев – 26,14% [243], в русской популяции составляет 25,27% [230]. У белых американцев частота составляет 34,2% [244]. В азиатских популяциях частота носительства *CYP4F2**3 в целом схожа с европейскими: среди китайцев – от 20,50 до 28,31% [245], у японцев 27,7% [246], чуть выше частота аллеля отмечается у корейцев – 41,6% [247].

4) Ген CYP3A5

Изофермент CYP3A5 вместе с CYP3A4, у которых аминокислотный состав совпадает на 84%, составляют 30% изоферментов системы цитохрома P450 в печени и метаболизируют суммарно около 50% лекарственных средств, в том числе клопидогрела и тикагрелора [90, 106]. Ген CYP3A, кодирующий одноименный изоферменты, расположены на хромосоме 7q22.1 вместе с другими генами, ответственными за выработку изоферментов CYP3A. Ген CYP3A5 – является высокополиморфным и имеет более 25 различным аллельных вариантов [248, 249]. Из функционально дефектных аллелей наиболее распространенным является CYP3A5 *3 (rs776746). Частота данного аллельного варианта существенно различается между популяциями. Как было описано ранее частота *CYP3A5* *3 составляет до 73,3% азиатской и латиноамериканской популяции, до 30% среди негроидной, до 95% в европеоидной [248, 249]. По данным отечественных исследований частота CYP3A5 *3 (rs776746) составляет 95% среди русских и 91% среди нанайцев [250].

5) Ген Р-гликопротеина ABCB1

Р-гликопротеин представляет собой белок из семейства ABC транспортеров, кодируемый геном ABCB1. Субстратами гликопротеина Р являются многие широко применяемые лекарственные средства: антиагреганты, сердечные гликозиды, антагонисты кальция, статины, блокаторы H1-гистаминовых рецепторов, макролиды, некоторые цитостатики, антиретровирусные препараты и другие [251]. Данный транспортёр располагается на мембране эритроцитов, регулируя процесс всасывания и выделения лекарственного препарата, а также на мембране клеток, формирующих гематоэнцефалический барьер, напрямую регулируя проникновение вещества в головной мозг другие [252]. Ген данного транспортёра имеет множество различных вариантов, в том числе сказывающихся на функции транспортера. На сегодняшний день открыто 1279 SNP в области гена ABCB1, 62 из которых являются кодирующими [253]. Наиболее важным из них является *ABCB1 (rs1045642)*, который ответственен за развитие побочных реакций препарата и за предрасположенность к развитию целого ряда заболеваний. Полиморфизм *ABCB1 (rs1045642)* широко распространён в мировой популяции: частота составляет 43% - у французов [254], 48% - у испанцев [255], 49% - у поляков [256]. Гораздо ниже частота в африканских популяциях - 17% [257], у азиатов данный показатель примерно соответствует европейскому – около 40% [258]. Анализ работ российских исследователей показал высокую распространенность аллельного варианта *ABCB1 3435C>T*, как в общей популяции, так и в отдельных этнических группах, что отражено на рисунках 10 и 11.

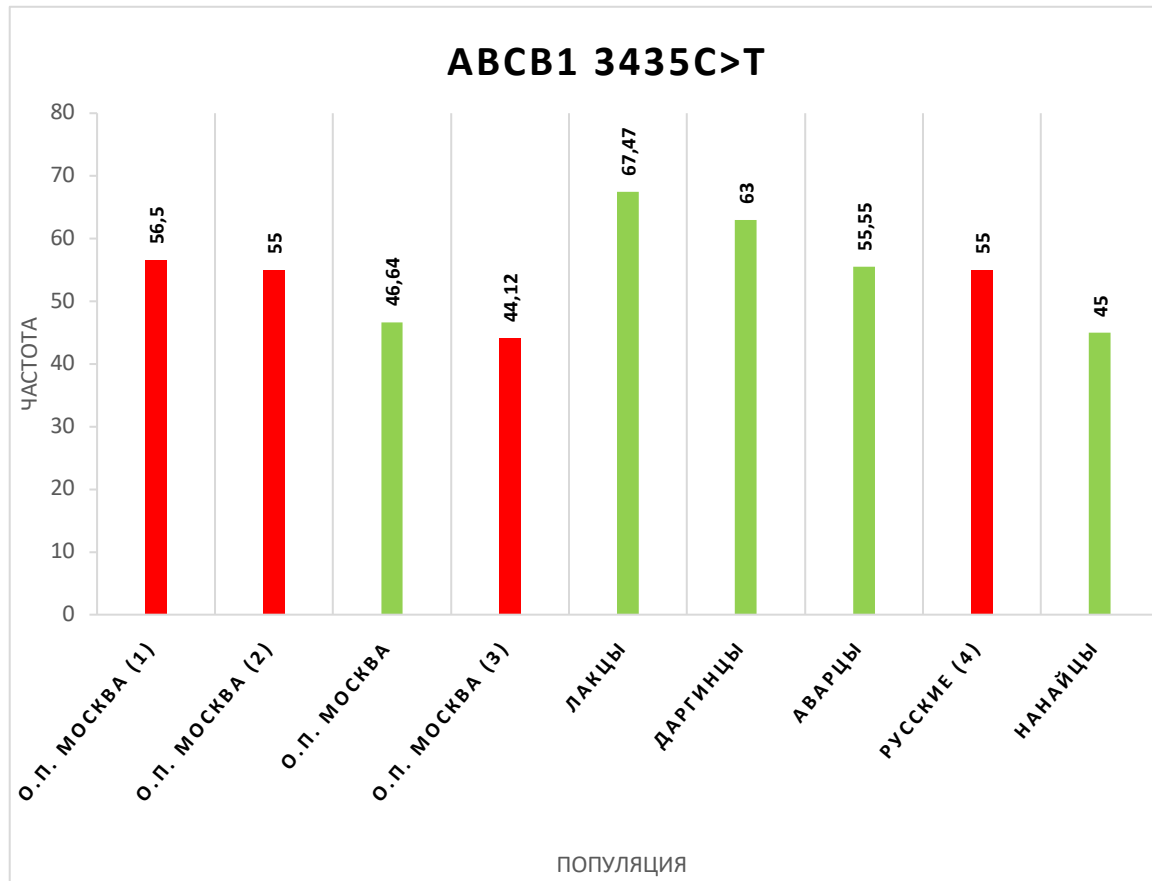


Рисунок 10 - Частота распространённости аллельного варианта *ABCB1 3435C>T* в российской популяции

Примечания: О.П. – Общая популяция. Зелёным цветом выделены исследования на здоровых добровольцах. Красным цветом выделены исследования, в которых тестирование проводилось у пациентов с различными заболеваниями, а именно:

- 1 – Артериальная гипертензия I-II стадии
- 2 – Клапанная фибрилляция предсердий
- 3 – Фибрилляция предсердий и острый инсульт
- 4 – Фибрилляция предсердий

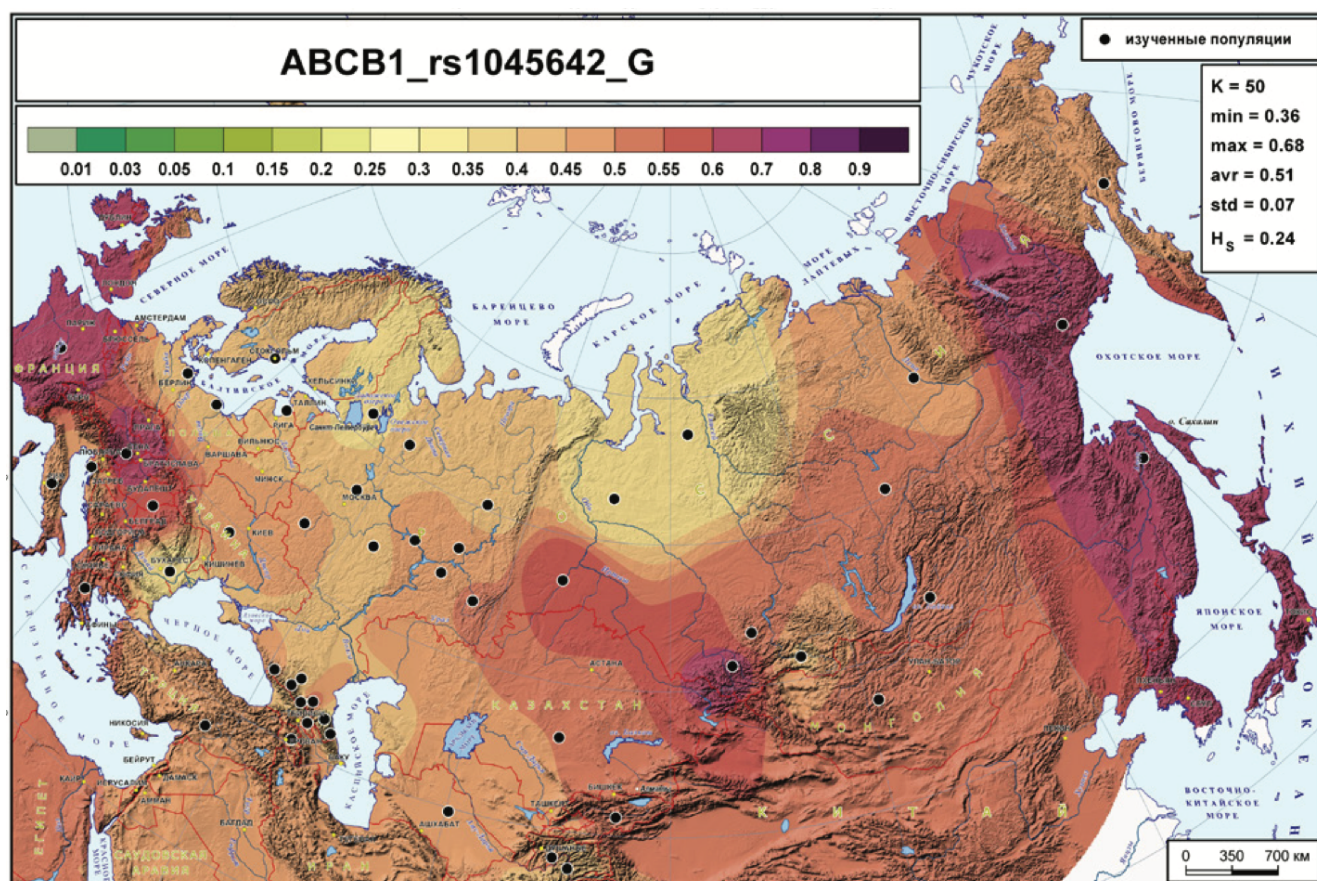


Рисунок 11 - Фармакогенетическая карта распространности аллельного варианта ABCB1 (rs1045642) (Источник: Е. В. Балановская, В. С. Петрушенко, С. М. Кошель, Э. А. Почешхова, Д. К. Черневский, К. Б. Мирзаев и соавт. [269])

6) Ген SLCO1B1

Ген *SLCO1B1*, кодирует полипептид, транспортирующий органические анионы через мембрану клетки. *SLCO1B1* играет важную роль в транспорте статинов путём выведения их печенью в желчь [259]. Аллельные варианты гена *SLCO1B1* могут так же вносить важный вклад в изменение фармакокинетики тикагрелора, как было описано выше. По Российской Федерации имеются данные по частоте распространности аллельного варианта *SLCO1B1* +521T>C среди русских [260], якутов [260, 261], нанайцев [239] лакцев, аварцев и даргинцев [212]. Анализ работ российских исследователей показал высокую распространность аллельного варианта *SLCO1B1* +521T>C, как в общей популяции, так и в отдельных этнических группах [259, 260, 261, 262, 263]. Особо следует отметить одинаково

высокую распространённость данного аллельного варианта у нанайцев и русских (Рисунок 12).

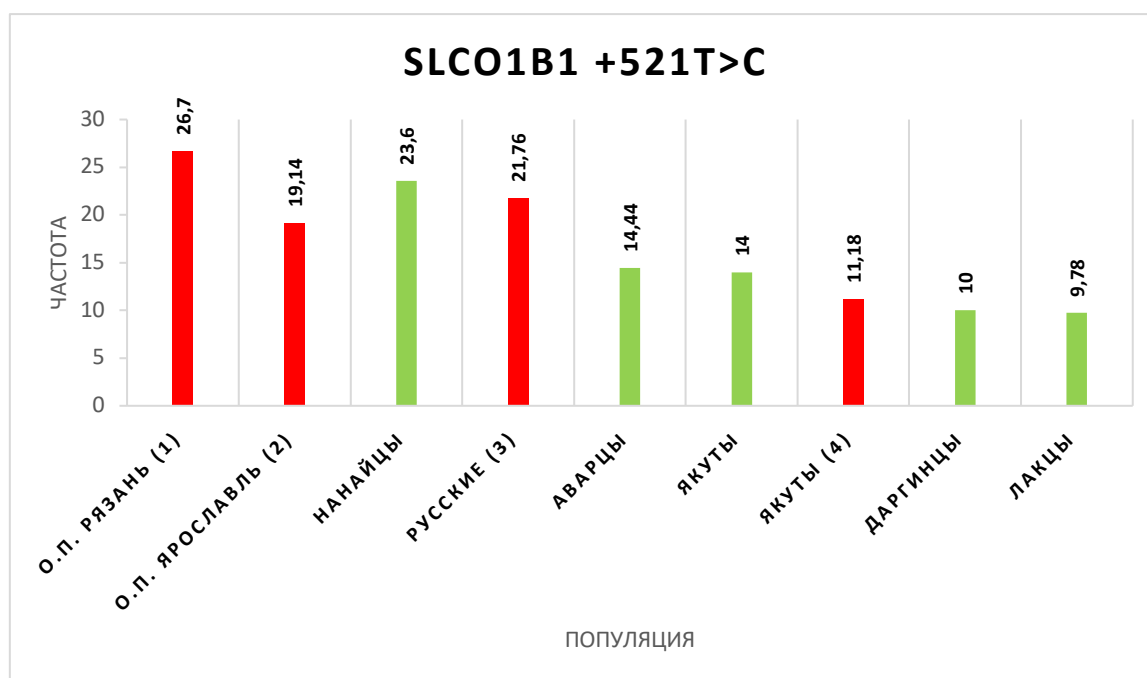


Рисунок 12 - Частота распространённости аллельного варианта *SLCO1B1* +521T>C в российской популяции

Примечания: О.П. – Общая популяция. Зелёным цветом выделены исследования на здоровых добровольцах. Красным цветом выделены исследования, в которых тестирование проводилось у пациентов с различными заболеваниями, а именно:

1, 2 - Приём статинов

3, 4 – Гиперхолестеринемия

7) Ген CES1

Фермент карбоксилэстераза 1 типа (CES1) участвует в метаболизме осельтамивира, эналаприла, симвастатина, клопидогрела, дабигатрана этексилата, капецитабина и других ЛП [264]. Отмечается значительная межиндивидуальная вариабельность терапевтического эффекта препаратов субстратов CES1. Генетически вариации CES1 могут быть связаны с межиндивидуальными различиями фармакологического ответа данных препаратов. Наиболее активно изучается полиморфизм гена CES1 - *rs2244613*. Полиморфизм *rs2244613* кодирует фермент со сниженной метаболической активностью [265].

Ранее Sychev D.A. и соавт. изучили особенности распределения данного аллеля среди различных этнических групп в России [28]. Интересно, что в России среди народов, относящихся к европеоидной расе, частота *rs2244613* колебалась от 25,5% до 40,3% (Рисунок 13). У монголоидов частота составляла $\geq 60\%$ [266]. Abdullaev и соавт., изучили частоту носительства полиморфного маркера гена *CES1* (*rs2244613*) у представителей трех этнических групп республики Дагестан (аварцы, даргинцы, лакцы) и русских. Частота минорного аллеля С у даргинцев (40,0%) и аварцев (38,3%), но не лакцев (29,3%) была достоверно выше, чем у русских (28,3%; $p < 0,05$) [267]. Mirzaev установили связь между носительством полиморфного маркера *rs2244613* гена *CES1* и уровнем остаточной агрегации тромбоцитов на фоне клопидогрела у пациентов, перенесших ОКС и чрескожное коронарное вмешательство. Остаточная реактивность тромбоцитов у носителей полиморфного маркера *rs2244613* была выше, чем у пациентов, не имеющих данный аллельный вариант: $183,23 \pm 37,24$ и $154,3 \pm 60,36$ PRU, соответственно ($p = 0,01$) [268].

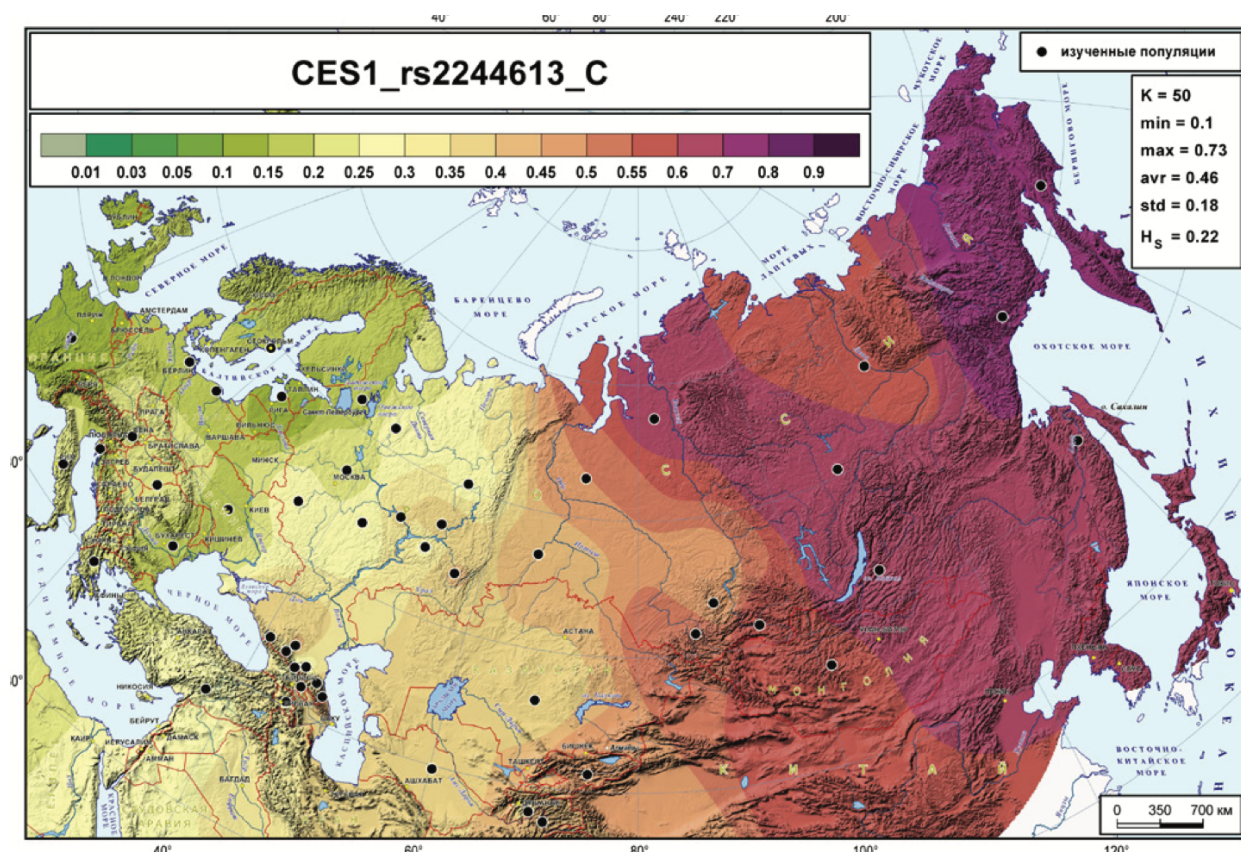


Рисунок 13 - Фармакогенетическая карта распространности аллельного варианта *CES1* (rs2244613) (Источник: Е. В. Балановская, В. С. Петрушенко, С. М. Кошель, Э. А. Почешхова, Д. К. Черневский, К. Б. Мирзаев и соавт. [269])

1.6. Преимущества биоинформатических методов для разработки алгоритмов прогнозирования индивидуального ответа на антиагрегантную терапию

В настоящее время с учетом описанной выше доказанной ассоциации высокой остаточной реактивности тромбоцитов на фоне антиагрегантной терапии с неблагоприятными тромботическими исходами продолжается поиск различных биомаркеров и способов их оценки для прогнозирования недостаточного ответа на лечение. При этом исследования по отдельным маркерам таким, как генетические (фармакогенетическое тестирование), фармакодинамические (тестирование агрегации тромбоцитов) – получены противоречивые результаты [29,30,31,119, 120,121]. Кроме того, не определены оптимальные пороговые значения тестирования, оптимальное время, комбинированная оценка тестов и др. Перспективным подходом к решению данной проблемы для выявления «ответчиков» и «неответчиков» до начала лечения является применение различных

методов обработки «больших данных» и высокопроизводительных нейросетевых вычислений, учитывающих многочисленные клинико-демографические, генетические, фармакометаболические, фармакоэпигенетические факторы пациентов, которые могут оказывать влияние на фармакологический ответ [270].

При этом, методами традиционной статистически затруднительно оценивать одновременного влияние множества указанных факторов, в том числе оценивать нелинейные зависимости между всеми переменными [270]. В случае же использования систем искусственного интеллекта (Artificial Neural Networks (ANNs)) и других методов машинного обучения (Machine Learning Systems (MLSs)), где применяются методики автоматического извлечения набора данных и многократных циклов «обучения» на самой базе данных, возможна оценка более глубоких взаимосвязей в сложнейших живых системах [270, 271]. Так в исследовании GM Podda и соавт., были использованы различные методы машинного обучения для прогнозирования резистентности к клопидогрелу (высокой остаточной реактивности) [270]. Базой для расчетов в исследовании послужила выборка ($n=1503$) пациентов с ОКС без подъема ST, перенесших ЧКВ (50 %) и получающих АСК 100 мг + клопидогрел 75 мг в сут. Тестирование агрегации тромбоцитов проводилось до лечения, перед выпиской и через 1 месяц. В исследовании также оценивались клинико-демографические и генетические факторы [270]. Для сравнения с традиционными методами статистики в исследовании применялись следующие методы машинного обучения: Artificial Neural Networks, SMO algorithm, Naïve Bayes algorithm, logistic regression, random forest, lazy IBK, meta bagging [270]. По результатам исследования ни одна модель не смогла с высокой точностью предсказать попадание в группу резистентных к клопидогрелу. Самой точной оказалась модель Artificial Neural Networks, которая предсказывала фенотип ответа на клопидогрел в 63% случаев (95% ДИ 59–66). [271]. Недостаточную точность прогнозирования высокой остаточной реактивности тромбоцитов на фоне клопидогрела у пациентов с ОКС авторы связали с выраженной вариабельностью фармакодинамического ответа и не учетом других неизвестных факторов, которые могут оказывать влияние на

функциональное состояние тромбоцитов. Подобные исследования для тикагрелора и прасутрела ранее не проводились.

Кроме установление значимых факторов риска высокой остаточной реактивности тромбоцитов, для внедрения в практику необходима разработка и автоматизация конкретных уравнений, включающих наиболее значимые факторы. В исследовании Miura и соавт., на японской популяции была выведена формула предикции показателя остаточной реактивности тромбоцитов – PRU (метод VerifyNow), в которую вошли следующие клинико-демографические факторы с различными коэффициентами: гематокрит, полиморфизм гена CYP2C19, полиморфизм гена ABCB1, дислипидемия, прием ингибиторов протонной помпы [272]. Коэффициент R^2 у модели составил 47,5 %. Данную формулу модифицировали в исследовании на латиноамериканской популяции, где набор значимых факторов изменился и в финальную модель вошли: полиморфизм гена PON1, полиморфизм гена CYP2C19, дислипидемия. Коэффициент R^2 у модели составил 27 % [273]. В исследовании на российской популяции так же было показано, что первоначальная модель Miura и соавт., не предсказывает показатель остаточной реактивности тромбоцитов у пациентов с ОКС и ЧКВ [274], что диктует необходимость разработка алгоритмов на популяции российских пациентов с учетом генетического разнообразия.

Таким образом, представленный анализ литературы демонстрирует важную роль тромбоцитов в развитии тромботических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний, подтверждает наличие проблем с выраженной вариабельностью ответа на антиагрегантную терапию ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов и отсутствие убедительных биомаркеров прогнозирования ответа на терапию, и, наконец, необходимость разработки комплексных автоматизированных подходов к предикции клинической эффективности и безопасности данной группы препаратов учитывающих клинико-фармакологические, демографические, фармакогенетические, фармакометаболические, фармакоэпигенетические особенности пациентов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования и характеристика клинических подгрупп, включенных в исследование

Настоящее исследование включает клиническую часть, популяционно-этническую часть и биоинформатическую часть. Проведение исследования было одобрено независимым этическим комитетом ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России. Все участники исследования подписали письменное добровольное информированное согласие.

В клиническую часть исследования включено 467 пациентов.

Подробнее разделение пациентов на группы представлено на Рисунке 14.

Участники исследования



Рисунок 14 – Участники клинической и популяционно-этнической части исследования.

Ниже приведено подробное описание каждой группы, выделенной в рамках диссертационного исследования.

1) Проспективное исследование на 122 пациентах с ишемическим инсультом в острой фазе, получающие клопидогрел, госпитализированные в региональный сосудистый центр ГБУЗ “Иркутская ордена «Знак Почета» областная клиническая больница” г. Иркутск (Рисунок 15);

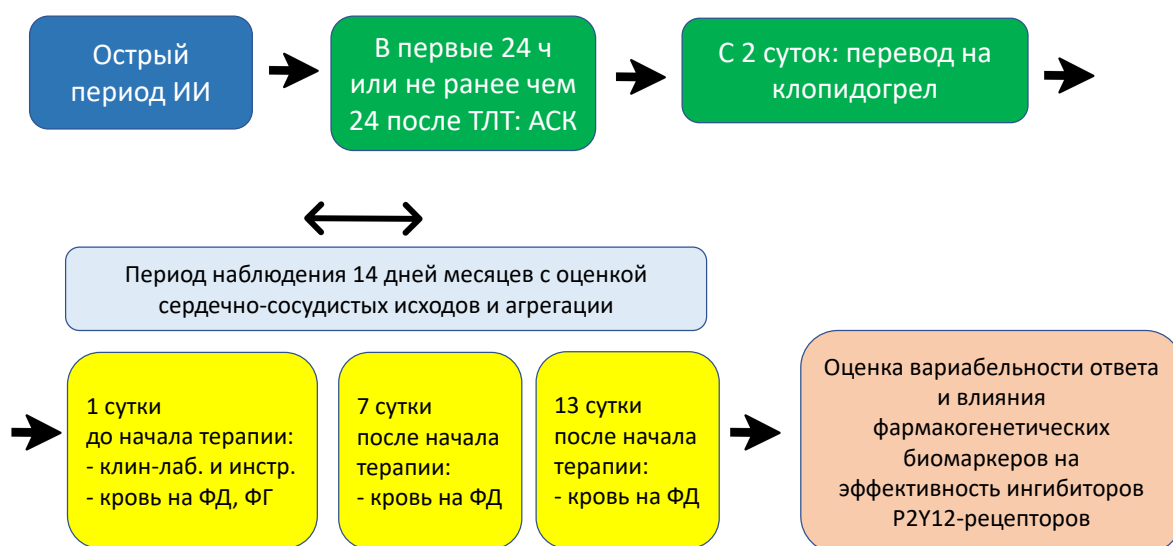


Рисунок 15 – Группа пациентов с ишемическим инсультом в острой фазе, получающие клопидогрел.

Критерии включения:

- некардиоэмболический ишемический инсульт;
- возраст 18–74 лет;
- прием клопидогрела в суточной дозе 75 мг для лечения и вторичной профилактики ишемического инсульта;
- информированное согласие на участие в письменной форме.

Критерии исключения:

- повышенная чувствительность к клопидогрелу или любому из вспомога-тельных веществ препарата;
- беременность и период лактации;
- детский возраст до 18 лет;
- менее 24 ч после тромболитической терапии;

- тромбоцитопения (менее $150 \cdot 10^9$);
- активное кровотечение любой локализации;
- кардиоэмболический инсульт;
- геморрагический инсульт;
- заболевания, располагающие к кровотечению (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки в стадии обострения, неспецифический язвенный колит, туберкулез, опухоли легких, гиперфибринолиз);
- портальная гипертензия с варикозным расширением вен пищевода;
- печеночная недостаточность средней и тяжелой степени (классы В и С по шкале Чайлд – Пью);
- хроническая болезнь почек 4-5 стадии (скорость клубочковой фильтрации менее 30 мл/мин/1,73 м²; клиренс креатинина <30 мл/мин);
- гемофилия; геморрагический диатез; дефицит витамина К;
- дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы;
- наследственная непереносимость лактозы, дефицит лактазы и глюкозо-галактозная мальабсорбция;

2) Кросс-секционное исследование на 128 пациентах с острым коронарным синдромом с чрескожным коронарным вмешательством, получающие тикагрелор (90 мг 2 раза в сут) + АСК (75 мг в сут), госпитализированные в ГБК имени С.С. Юдина Департамента здравоохранения Москвы (Рисунок 16);

Критерии включения:

- Острый коронарный синдром с подъемом сегмента ST
- Острый коронарный синдром без подъема сегмента ST
- Чрескожное коронарное вмешательство (стентирование, баллонная ангиопластика)
- Прием клопидогрела/тикагрелора антиагрегантной терапии
- Информированное согласие на участие в письменной форме

Критерии исключения - пациенты с ОКС с ЧКВ:

- Повышенная чувствительность к клопидогрелу или вспомогательным компонентам препарата
- Прием прасугрела
- Тяжелая печеночная или почечная недостаточность (клиренс креатинина < 30 мл/мин),
- Геморрагический синдром, активное внутреннее кровотечение, внутричерепное кровоизлияние или тромбоцитопения
- Заболевания, предрасполагающие к кровотечению: язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки в стадии обострения, неспецифический язвенный колит, туберкулез, опухоли легких, гиперфибринолиз
- Редкая наследственная непереносимость лактозы, дефицит лактазы и глюкозо-галактозная мальабсорбция
- Беременность и период лактации
- Детский возраст до 18 лет

3) Кросс-секционное исследование на 115 пациентах с острым коронарным синдромом с чрескожным коронарным вмешательством, получающие клопидогрел (75 мг в сут) + АСК (75 мг в сут), госпитализированные в ГКБ № 1 им. Н.И. Пирогова и ГБК имени С.С. Юдина Департамента здравоохранения Москвы (Рисунок 16).

Критерии включения:

- Информированное согласие на участие в письменной форме
- Острый коронарный синдром менее 7 дней назад.

Критерии исключения:

- Беременность, период лактации.
- Активное внутреннее кровотечение.
- Цирроз печени с печеночной недостаточностью класса С по классификации Чайлд-Пью.
- Хроническая болезнь почек 5 стадии.

- Стеноз митрального клапана умеренной и тяжелой степени, механические клапаны сердца.
- Тяжелые психические расстройства. Аллергические реакции/непереносимость препаратов.

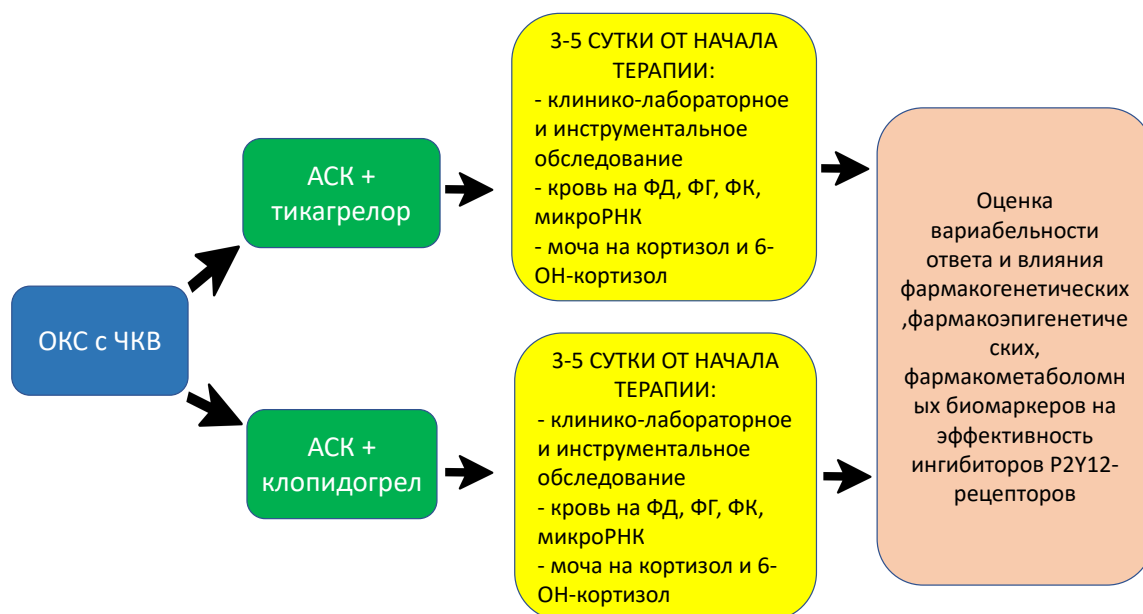


Рисунок 16 – Группа пациентов с ОКС, получающие тикагрелор или клопидогрел + АСК.

4) Проспективное исследование 102 пациентов с острым коронарным синдромом и фибрилляцией предсердий, которым было проведено чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ), получающих клопидогрел (75 мг в сут) + АСК (75 мг в сут) + ривароксабан (15-20 мг в сут) или клопидогрел (75 мг в сут) + ривароксабан (15-20 мг в сут). Пациенты данной группы включены на базе ГКБ имени С.С. Юдина Департамента здравоохранения Москвы (Рисунок 17);

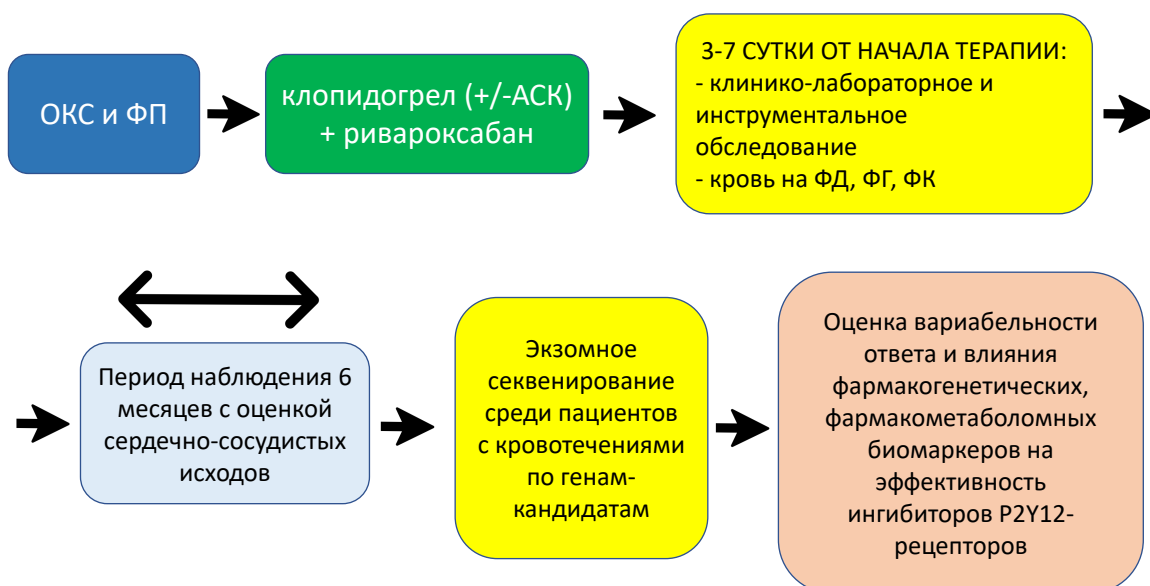


Рисунок 17 – Группа пациентов с ОКС и ФП, получающие клопидогрел+ривароксабан или клопидогрел+АСК+ривароксабан.

Критерии включения:

- Информированное согласие на участие в письменной форме
- Острый коронарный синдром менее 7 дней назад
- Фибрилляция предсердий неклапанного персистирующая, постоянная), документально зарегистрированная, требующая назначения антикоагулянтной терапии (≥ 2 баллов для мужчин и ≥ 3 баллов для женщин по шкале CHA₂DS₂-VASc).
- Впервые выявленная фибрилляция предсердий, не требующая назначения антикоагулянтов.

Критерии исключения:

- Беременность, период лактации.
- Активное внутреннее кровотечение.
- Цирроз печени с печеночной недостаточностью класса С по классификации Чайлд-Пью.
- Хроническая болезнь почек 5 стадии.
- Стеноз митрального клапана умеренной и тяжелой степени, механические клапаны сердца.

- Тяжелые психические расстройства. Аллергические реакции/непереносимость препаратов.

Риск сердечно-сосудистых осложнений оценен у пациентов с ОКС по шкале GRACE, риск кровотечений по шкале CRUSADE, BARC. Тяжесть неврологической симптоматики у пациентов с инсультом оценивали по шкале инсульта Национального института здоровья (National Institutes of Health Stroke Scale – NIHSS) степень нетрудоспособности – по шкале Рэнкина (UK-TA Study), индекс мобильности – по шкале Ривермид, степень риска повторного инсульта по шкале риска повторных сердечно-сосудистых осложнений (The Essen Stroke Risk Score - ESRS).

5) Популяционно-этническая часть исследования (здоровые добровольцы).

В популяционно-этническую часть исследования включено 2 409 условно здоровых участников пациентов из 15 этнических групп Российской Федерации из 3 мультинациональных регионов: Северный Кавказ, Поволжье, Дальний Восток (Рисунок 18).

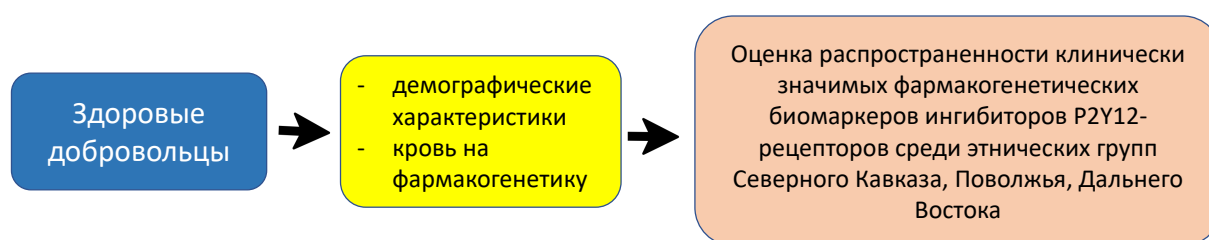


Рисунок 18 – Схема проведения популяционно-этнического исследования.

Этническую принадлежность участников популяционно-этнической части исследования устанавливали с помощью метода самоидентификации. Критерием включения являлось самоопределение не менее чем в двух поколениях: участник и оба родителя были представителями одной этнической группы. В исследование не включали потомков межэтнических браков.

2.2. Описание методов измерения остаточной активности тромбоцитов

2.2.1. Методика оптической детекции измерения агрегации тромбоцитов тромбоцитов на приборе VerifyNow

Забор цельной крови из локтевой вены для измерения агрегации тромбоцитов осуществлялся на 3-5 сутки после ОКС. Для забора крови использовались вакуумные пробирки Greiner Bio-One Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия) на 2 мл с 3,2% цитратом натрия. Исследование проводилось в течение 1 часа после взятия образца цельной венозной крови. У пациентов, получавших ингибиторы гликопротеина IIb-IIIa, агрегация оценивалась не ранее 5–6 дней после окончания внутривенного введения препарата. Измерение остаточной реактивности тромбоцитов осуществлялось на тест-системе для прикроватной оценки активности тромбоцитов —VerifyNow P2Y12 («Accumetrics», США). В результате тестирования определяется абсолютная степень агрегации тромбоцитов единицах реакции (PRU) и процентах ингибирования (IP). PRU рассчитывается по скорости и степени агрегации тромбоцитов, стимулированной АДФ. Процент ингибирования (PI) показывает изменение от начальной агрегации, и рассчитывается исходя из результата PRU и базового результата. Базовый результат является независимым измерением, основанным на скорости и степени агрегации тромбоцитов при стимуляции рецепторов тромбина (PAR-1 и PAR-4). Оптимальные границы «терапевтического окна» для каждого метода, указаны в актуальной инструкции прибора [275] и основаны на результатах предыдущих исследований. При этом, оптимальным диапазоном остаточной активности тромбоцитов, при использовании прибора VerifyNow является не более 208 и не менее 95 PRU. Соответственно, при PRU больше 208 существенно возрастает риск тромботических осложнений, и при PRU меньше 85, соответственно, кровотечений [27, 275].

2.2.2. Методика измерения агрегации тромбоцитов светоптическим агрегометром Helena BioSciences

Исследование индуцированной агрегации тромбоцитов осуществлялось на четырехканальном светоптическом агрегометре (Helena BioSciences Europe, Великобритания). В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовались наборы реактивов: адреналин и АДФ (ООО «Технология-Стандарт», Россия). Методика стандартизировалась в лаборатории гемостаза ГБУЗ «Иркутская округа «Знак Почета» областная клиническая больница». Референсные значения ОРТ с добавлением АДФ – 65–75%. Обработка результатов осуществлялась автоматически с помощью программного обеспечения модульной системы анализатора удаленного доступа, установленного на персональный компьютер гемостазиологической лаборатории. Первый забор крови из вены производили в острый период ИИ в первые сутки госпитализации. Последующие заборы венозной крови для определения агрегации тромбоцитов осуществлялись на седьмые и тринадцатые сутки госпитализации.

Первую пробирку с кровью центрифугировали при 1 000 об/мин в течение 5 мин; получали БТП, которую переносили в другую пробирку и хранили до проведения исследования. Обедненную тромбоцитами плазму (ОТП) получали в процессе центрифугирования второй пробирки с цельной кровью при 3 000 об/мин в течение 15 мин. Полученную ОТП в дальнейшем использовали для калибровки агрегометра. Центрифугирование проводилось не позднее одного часа после взятия образца венозной крови, а отбор плазмы на исследование – сразу после центрифугирования. При этом не допускался анализ плазмы крови с гемолизом, имеющей сгустки, или полученной более двух часов назад.

Для подготовки проб каждого пациента к проведению исследования адреналин-индуцированной агрегации в кювету с 0,4 мл БТП вносилось 0,05 мл раствора адреналина (конечная концентрация адреналина – 10 мкг/мл); для АДФ-индуцированной агрегации в кювету с 0,4 мл БТП дополнительно вносилось 0,05 мл раствора АДФ (конечная концентрация АДФ – 2,5 мкг/мл). Полученные растворы БТП и индукторов агрегации перемешивались на лабораторной центрифуге при 600

об/мин. Затем подготовленные пробы помещались в открытый отдел модуля агрегометра. Предварительно в автоматическую систему анализатора вводились демографические параметры каждого пациента. Референсные значения ОРТ с добавлением АДФ – 65–75 %. Кроме того, оценивалось изменение ОРТ до и после приема препарата. Снижение максимальной АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов <10% - резистентность к клопидогрелу, 10-29% - условно резистентные и ≥30% - чувствительные [276].

2.2.3. Методика определения носительства фармакогенетических биомаркеров (ПЦР в реальном времени, экзомное секвенирование)

Для отбора генов-кандидатов в исследование использовали базу данных PharmGKB [80].

Для определения однонуклеотидных генетических полиморфизмов использовался метод ПЦР в реальном времени на ДНК- амплификаторах «Dtlite» компании «ДНК-Технология» (Россия) и CFX96 Touch Real Time System с ПО CFX Manager компании BioRad (США), 2014 года выпуска и наборы "SNP- Скрин" ЗАО «Синтол» (Россия). В эксперименте используются два аллель- специфичных зонда, которые позволяют детектировать сразу два аллеля исследуемого полиморфизма на двух каналах флуоресценции. Процесс выделения ДНК проводился с помощью реагентов для выделения геномной ДНК из цельной крови «ДНК-ЭКСТРАН-1» и «ДНК-сорб». Проведение аллель- специфичной ПЦР проводилось с выделенной геномной ДНК пациентов. С образцом выделенной ДНК параллельно проводятся две реакции амплификации с аллель-специфичными зондами.

Анализ и интерпретация результатов. Результаты анализа по определению однонуклеотидных генетических полиморфизмов, исходя из расположения кривых на графике, позволяют дать три типа заключений: нормальная гомозигота с генотипом X/X, гетерозигота с генотипом X/Y, мутантная гомозигота с генотипом Y/Y.

Для генотипирования использовали венозную кровь, собранную в вакуумные пробирки VACUETTE® (Greiner Bio-One, Австрия) с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА). Носительство полиморфных маркеров генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-Time PCR) с помощью готовых закрытых коммерческих наборов (ЗАО «Синтол», Россия; Thermo Fisher Scientific, USA) на амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Программа амплификации включает в себя этап инкубации при 95°C в течение 3 минут, затем денатурация при 95°C - 10 секунд и отжиг при 60°C - 30 секунд в течение 50 циклов. Сигнал флуоресценции развивался по соответствующему каналу: FAM, HEX или FAM и HEX.

2.2.4. Методика секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS)

По данным литературы на специализированном ресурсе PharmGKB [80] для поиска новых фармакогенетических маркеров риска кровотечений у пациентов с ОКС и ФП на фоне клопидогрела и ривароксабана было отобрано 5 генов: гены, которые могут привести к изменению кинетики клопидогрела - ABCB1, ABCG2, CES1, CYP3A4, и динамики клопидогрела - P2RY12. Выделение ДНК. ДНК выделяли из образцов цельной периферической венозной крови пациентов методом селективной преципитации с использованием высоких концентраций солей («высаливание»). Секвенирование. Скрининг мутаций у пациентов проводился методом высокопроизводительного полупроводникового параллельного секвенирования ДНК с использованием прибора Ion S5 (ThermoFisher). В процессе пробоподготовки использовали стандартный протокол приготовления библиотек AmpliSeq (ThermoFisher) с помощью набора реагентов Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 и пользовательской панели праймеров, включающей в себя экзоны и прилегающие к ним интронные участки генов ABCB1, ABCG2, CES1, CYP3A4, P2RY12, а также их 5'- и 3'-некодирующие участки. Анализ результатов секвенирования был проведен с использованием следующего программного обеспечения:

1) Torrent Suite, в составе (1.1. Base Caller для первичного базового анализа результатов секвенирования; 1.2. TMAP (Torrent Mapping Alignment Program) для выравнивания последовательностей прочтений относительно референсного генома (в качестве которого был использована 37 сборка NCBI 37/hg19); 1.3. Variation Caller для идентификации генетических вариантов);

2) ANNOVAR (аннотация функционального значения генетических вариаций, фильтрация известных полиморфизмов с использованием базы данных gnomAD);

3) IGV (Integrative Genomic Viewer) для экспертной фильтрации артефактов секвенирования и результатов выравнивания последовательностей, мутации в которых выявлены автоматическими средствами анализа.

Для определения потенциально значимых вариантов для каждой найденного варианта встречаемость в исследуемой группе сравнивалась со встречаемостью в выборке 15708 полных геномов здоровых людей, отсеквенированных методом NGS, из базы данных GnomAD [277]. Значение p-value было рассчитано с использованием χ -квадрат с поправкой на непрерывность (программа Statistica), в качестве поправки на множественность тестирования использовалась поправка FDR.

2.2.5. Методика определения уровня циркулирующих в плазме микро-РНК (количественная ПЦР)

1) Получение плазмы крови и выделение тотальной РНК из плазмы крови

Кровь для исследования отбирали в стерильные пробирки, содержащие ЭДТА. Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивали для перемешивания с антикоагулянтом, после чего кровь находилась при комнатной температуре не более 1 часа. Для получения плазмы пробирку центрифугировали в течение 10 мин при ускорении 2000g, после чего супернатант переносили в стерильные пробирки объемом 2 или 1,5 мл и хранили до использования при температуре -80°C. Выделение суммарной РНК, включая микроРНК, проводилось с использованием лизирующего реагента QIAzol (Qiagen). Реагент QIAzol добавляли к 500 мкл

плазмы в объемном соотношении 2:1 и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. После внесения в пробирку 0,5 мл хлороформа тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали еще 2-3 минуты. Полученный лизат центрифугировали 15 минут при 4°C на 12 000 g для разделения фаз и верхнюю водную фазу аккуратно отобрали и переносили в пробирку с 0,5 мл 100% изопропанола. Раствор тщательно перемешивали переворачиванием пробирки и замораживали при -20°C в течение не менее 1 часа, после чего пробирку сразу центрифугировали 10 минут на 12 000g при 4°C. Оставшийся после отбора супернатанта осадок на дне пробирки промывали 1 мл 75%-ного этанола с последующим центрифугированием на 12 000g в течение 5 минут при 4°C. Получившийся в результате осадок растворяли в 20 мкл воды, свободной от РНКаз, предварительно прогретой до 60°C, и инкубировали 5-10 минут при 60°C, после чего перемешивали для полного растворения и осаждали центрифугированием при комнатной температуре в течение 1 минуты. При дальнейшем использовании полученные пробы держали на льду. Для кратковременного хранения пробы замораживали на -20°C, для длительного – на -80°C. Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

2) Количественная оценка уровня экспрессии микроРНК методом ПЦР в реальном времени

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MiScript II RT Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендованным протоколом описанным в ранее проведенных исследованиях [144, 145, 146]. Для получения кДНК использовали 300 ng суммарной РНК, выделенной из каждого образца, которую вносили в реакционную смесь (4 мкл 5x буфера miScript HiFlex Buffer, 2 мкл 10X смеси нуклеотидов miScript Nucleics Mix, 1 мкл обратной транскриптазы miScript Reverse Transcriptase Mix и свободная от РНКаз вода до 20 мкл) и инкубировали 60 минут при 37 °C, с последующим увеличением температуры до 95 °C на 5 минут для инактивации транскриптазы. Содержимое каждой пробирки разводили 60 мкл

свободной от РНКаз водой для получения нужной концентрации кДНК. ПЦР в реальном времени выполнялась трех повторностях для каждой анализируемой микроРНК, а также искусственного экзогенного контроля, с использованием набора MiScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) и пресинтезированных праймеров miScript Primer Assay (Qiagen) в объеме реакционной смеси 12 мкл (2 мкл соответствующей кДНК, 5 мкл 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1 мкл 10x универсального праймера miScript Universal Primer, 1 мкл 10x miScript Primer Assay к исследуемым микроРНК и свободная от РНКаз вода до 12 мкл). ПЦР в реальном времени ставилась на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Геркулес, США) по рекомендованной производителем программе (15 минут при 95 °С для активации HotStarTaq DNA Polymerase и 40 трехступенчатых циклов (94 °С - 15 сек., 55 °С - 30 сек., 70 °С - 30 сек.)). Полученные значения экспрессии Cq для каждой из микроРНК были нормализованы относительно экзогенного контроля и анализировались в группах в соответствии с задачами исследования.

2.2.7. Методика измерения минимальной равновесной концентрации тикагрелора и клопидогрела с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией

Определение концентрации тикагрелора и клопидогрела в крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием [167, 184]. Для тикагрелора измерялись: тикагрелор + метаболит AR-C133913XX. Для клопидогрела: только само соединение в виде пролекарства, в связи нестабильностью и низкими концентрациями активного метаболита. Пробы анализировали на жидкостном хроматографе Agilent 1200 (в составе четырехканальный насос, дегазатор подвижной фазы, термостат хроматографических колонок). В работе использовалась колонка Agilent Extend-C18 (длина 100 мм; внутренний диаметр 2,1 мм; зернение 3,5 мкм). Разделение проводили при температуре колонки 40 °С. Подвижная фаза: р-р «А» (50 мл 0,1 М раствора ацетата аммония и 5 мл муравьиной

кислоты разбавляли водой деионизованной до общего объема 1л) и р-р «Б» (50 мл 0,1 М раствора ацетата аммония и 5 мл муравьиной кислоты разбавляли ацетонитрилом до общего объема 1л). Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме элюирования при соотношении компонентов «А» : «Б» 70:30. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,3 мл/мин. Объем вводимой пробы - 10 мкл. Анализ проводили в течение 7 мин. В работе использовали масс-спектрометр (тип тройной квадруполь) Agilent Triple Quad LC/MS 6410 с ионизацией электроспреем в режиме положительной ионизации. Регистрацию спектров проводили в режиме множественных молекулярных реакций. Давление газа распылителя 35 psi. Объемная скорость осушающего газа 11 л/мин, температура 350 °С. Значение напряжения фрагментации составляло 135 В, напряжения на ячейке соударений 25 В. Пробоподготовку проводили осаждением белков плазмы крови. Образцы плазмы размораживали при комнатной температуре. Далее 100 мкл плазмы переносили в пластиковые пробирки типа Eppendorf, добавляли 250 мкл смеси метанола с 0,1% соляной кислотой HCl в соотношении компонентов 9:1, перемешивали на встряхивателе Vortex, оставляли на 10 мин и перемешивали еще раз. После, полученные образцы центрифугировали со скоростью вращения 10 000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочный слой переносили в хроматографические вials и помещали на автосемплер хроматографа.

2.2.8. Методика измерения метаболической активности системы изоферментов CYP3A4/CYP3A5 с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией

Материал для исследования: 5 мл утренней мочи, собранные на 3-5 день в пробирки без консерванта и замороженной при температуре минус 20 градусов по Цельсию. Содержание 6-бета-гидрокортизола (6-ОНС) и кортизола (FC) определялось методом хромато-масс-спектрометрического анализа на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent G1978B Multimode Source for 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Inc., USA). Метаболическая активность CYP3A4

оценивалась по отношению 6-бета-гидрооксикортизол/кортизол в утренней моче. Метод разработан и валидизирован Смирновым В.В., 2010 г. [278] Проведение данного исследования рекомендовано фармацевтическим компаниям с целью оценки роли изоферментов цитохрома Р-450 в биотрансформации ЛС [279]. Метод основан на образовании метаболита эндогенного кортизола под влиянием изофермента CYP3A4. Более высокие значения 6-бета-гидрооксикортизол/кортизол свидетельствуют о высокой активности изофермента CYP3A4, и меньшие - о низкой. Для экстракции данных стероидов из мочи использовался метод жидко-жидкостной экстракции. Экстрагент - смесь этилацетат/изопропанол (85/15). Техника проведения. Экстракцию проводилась дважды из 2 мл мочи четырьмя миллилитрами экстрагента. После центрифугирования в течение 5 минут при скорости 3000 об/мин, отделялись и объединялись органические слои. Для улучшения экстракции к объединенному органическому слою добавляли 2 мл 1N раствора NaOH, пробу помещали на шейкер, и потом центрифугировали 5 минут при скорости 3000 об/мин. Объединенный органический слой упаривали на вакуумно-выпарительном аппарате. Для построения калибровочного графика были приготовлены пробы путем добавления растворов кортизола и 6-бета-гидрооксикортизола известных концентраций к моче здоровых добровольцев. Определение кортизола и 6-бета-гидрооксикортизола в моче проводилось на приборе Agilent G1978B Multimode Source for 6410 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Inc., USA). Объем вкола составлял 10 мкл. Состав подвижной фазы: 55% воды, подкисленной HCOOH (1мл муравьиной кислоты на 1 литр воды) и 45% ацетонитрила. Скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/минуту. Колонка: обращеннофазная Waters (5мкм; 4,6×150мм), температура колонки – 350 С. Длина волны ультрафиолетового детектора составила 246 нм. Масс-детектор работал в режиме сканирования в позитивной полярности. Тип ионизации: MM-ES + APCI.

2.3. Статистическая обработка результатов

2.3.1. Методы основного статистического анализа результатов исследования

Статистическая обработка результатов проводилась в SPSS Statistics 20.0.

Средние показатели представлены как $M \pm SD$, где M — среднее, SD — стандартное отклонение. Проверка нормальности распределения проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для оценки достоверности различий количественных показателей был применен однофакторный дисперсионный анализ - ANOVA, в случае ненормального распределения критерий Манна-Уитни или Крускала-Уолиса. Для установления различий категориальных показателей был применен критерий хи-квадрат Пирсона χ . Влияния значимых факторов на агрегацию тромбоцитов оценивалось методом логистической и линейной регрессии; в число ковариат были так же включены переменные, имеющие тенденцию к значимости различий между группами агрегации в вариационном анализе. Для проверки соблюдения равновесия Харди–Вайнберга применялся точный критерий Фишера. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

2.3.2. Методы биоинформатического анализа и машинного обучения для прогнозирования индивидуального ответа антиагрегантную терапию ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов

В рамках биоинформатической части исследования, проведенной совместно с Лабораторией биоинформатики НИУ ВШЭ, при помощи методов машинного обучения оценена роль демографических, клинических, генетических, метаболомных, эпигенетических маркеров в прогнозировании индивидуального ответа антиагрегантную терапию ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов. Предсказываемые переменные: агрегация тромбоцитов, концентрация препарата и клинические исходы. Предварительная обработка данных, включающая в себя заполнение пропусков в данных проведена с помощью алгоритма, связанного со снижением ранга матрицы признаков, корреляционный анализ для подбора гипотез о линейной взаимосвязи между признаками, исключение выбросов с помощью изолирующих деревьев решений и кластеризация. Кластеризация наблюдений проведена с помощью только независимых факторов для определения наличия структурных различий в выборке, а также проверки, связаны ли эти отличия с разницей в среднем уровне агрегации у пациентов. Из-за того, что выборка

включает в себя большое количество как количественных, так и качественных переменных, определение выбросов проведено не с помощью межквартильного интервала, а с помощью алгоритма Isolation Forest. Валидация проведена с помощью Leave-One-Out Cross-Validation. Использованные модели предсказания агрегации, концентрации препарата и клинических исходов: регрессионной линейной модели, регрессионной модели случайного леса, пуассоновской регрессии, Support Vector Machine, Random Forest, Gradient Boosting algorithms, CatBoost.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТИКАГРЕЛОРА И КЛОПИДОГРЕЛА У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ НАРУШЕНИЯМИ

3.1. Клинико-демографическая и лабораторно-инструментальная характеристика изучаемых групп

Клиническая, демографическая, лабораторная и инструментальная характеристика 467 пациентов представлена с разбивкой на основные клинико-нозологические подгруппы исследования: пациенты с ОКС (Таблицы 10-14), пациенты с ОКС в сочетании с ФП (Таблицы 15-17), пациенты с ИИ (Таблицы 18, 19).

3.1.1. Пациенты с ОКС, получающие двойную антиагрегантную терапию АСК и тикагрелором или клопидогрелом

В подгруппу пациентов, принимающих двойную антиагрегантную терапию АСК и тикагрелором было включено 128 пациентов с ОКС, перенесших ЧКВ (Таблица 10). Средний возраст: $59,5 \pm 10,9$ лет. Среди них: 107 пациентов мужского пола (83,6%) и 21 пациент женского пола (16,4%). В подгруппу пациентов, принимающих двойную антиагрегантную терапию АСК и клопидогрелом было включено 115 пациентов с ОКС, перенесших ЧКВ (Таблица 10). Средний возраст: $65,2 \pm 11,5$ лет. Среди них: 87 пациентов мужского пола (75,7%) и 28 пациентов женского пола (24,3%).

Клинические и демографические характеристики пациентов с ОКС, перенесших ЧКВ, получающих в составе двойной антиагрегантной терапии клопидогрел (300-600 мг нагрузочная, 75 мг поддерживающая) или тикагрелор (180 нагрузочная, 90 мг поддерживающая) представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Клинические и демографические характеристики пациентов, получающих антиагрегантную терапию тикагрелором или клопидогрелом в сочетании с АСК.

Демографические данные и клинические данные анамнеза	Подгруппа ОКС (тикагрелор)		Подгруппа ОКС (клопидогрел)	
	Число случаев	Процент, %	Число случаев	Процент, %
Мужчины	107	83,6	87	75,7
Женщины	21	16,4	28	24,3
Курение	53	41,4	24	20,9
Гиперлипидемия	26	20,3	28	24,3
Сахарный диабет	17	13,3	20	17,4
Артериальная гипертензия	90	70,3	106	92,2
Ишемический инсульт	8	6,3	5	6,3
Почечная недостаточность	3	2,3	2	1,7
Инфаркт миокарда	11	8,6	14	12,2
Поражение периферических артерий	2	1,6	5	4,3
Любая форма нарушения ритма сердца	9	7,0	22	19,1
Хроническая сердечная недостаточность II стадии и выше	26	20,3	35	30,4
Аневризма	8	6,3	2	1,7
Примечание: ОКС – острый коронарный синдром				

Среди пациентов с ОКС, получающих тикагрелор или клопидогрел, сахарный диабет был отмечен среди 13,3% и 17,4%, артериальная гипертензия - 70,2% и 92,2%, ишемический инсульт в анамнезе – 6,3% и 6,3%, почечная недостаточность различной степени 2,3: и 1,7%, инфаркт миокарда в анамнезе – 8,6% и 12,2%, хроническая сердечная недостаточность II стадии и выше – 20,3% и 30,4%, соответственно.

Ангиографические характеристики пациентов с ОКС, получающих антиагрегантную терапию тикагрелором или клопидогрелом представлены в Таблице 11.

Таблица 11 - Ангиографические характеристики пациентов, получающих антиагрегантную терапию тикагрелором или клопидогрелом в сочетании с АСК.

Ангиографические данные	Подгруппа ОКС (тикагрелор)		Подгруппа ОКС (клопидогрел)	
	Число случаев	Процент, %	Число случаев	Процент, %
Ствол ЛКА	11	8,6	7	6,0
ОА	42	32,8	40	35,4
ВТК	25	19,5	25	19,5
ПКА	64	50,0	43	37,4
ДВ	20	15,6	20	15,6
АТК	5	3,9	4	3,5
ПНА/ПМЖВ	91	71,1	63	55,8

Примечание:

ЛКА – левая коронарная артерия, ОА – огибающая артерия, ВТК – ветвь тупого края, ПКА - правая коронарная артерия, ДВ – диагональная ветвь, АТК- артерия тупого края, ПНА/ПМЖВ – передняя нисходящая артерия/передняя межжелудочковая ветвь

Такой важный ангиографический фактор повышенного риска неблагоприятных тромботических исходов, как поражение ствола ЛКА, наблюдался у 8,6% и 6,0% среди пациентов с ОКС, получающих тикагрелор или клопидогрел, соответственно.

Особенности сопутствующей фармакотерапии пациентов с ОКС, получающих антиагрегантную терапию тикагрелором или клопидогрелом представлены в Таблице 12.

Таблица 12 - Сопутствующая фармакотерапия пациентов, получающих антиагрегантную терапию тикагрелором или клопидогрелом.

Лекарственный препарат	Подгруппа ОКС (тикагрелор)		Подгруппа ОКС (клопидогрел)	
	Число случаев	Процент, %	Число случаев	Процент, %
Блокаторы кальциевых каналов	22	17,2	17	14,8
Диуретики	44	34,4	42	36,5
Ингибиторы протонной помпы	97	75,8	101	87,8
Статины	122	95,3	114	99,1
Бета-адреноблокаторы	115	89,8	114	92,1
иАПФ	81	63,3	86	74,8
Ингибиторы рецепторов ангиотензина	16	12,5	16	12,5
Примечание:				
ОКС – острый коронарный синдром, иАПФ- ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента				

Сопутствующая фармакотерапия пациентов с ОКС назначалась по решению лечащего врача на основе действующих клинических рекомендаций и стандартов лечения пациентов с ОКС и включала несколько групп лекарственных препаратов с потенциалом взаимодействия с ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов на уровне системы цитохрома P-450: блокаторы кальциевых каналов (17,4% - в группе тикагрелора и 14,8% - в группе клопидогрела), ингибиторы протонной помпы (75,8% - в группе тикагрелора и 87,8% - в группе клопидогрела), статины (95,3% - в группе тикагрелора и 99,1% - в группе клопидогрела).

После верификации диагноза у пациентов с ОКС, получающих тикагрелор или клопидогрел, инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST наблюдался среди 63,3% и 66,0%, инфаркт без подъема сегмента ST – 27,3% и 20,0%, нестабильная стенокардия – 9,4% и 13,9%, соответственно (Таблица 13).

Таблица 13 - Актуальный клинический диагноз пациентов, получающих антиагрегантную терапию тикагрелором или клопидогрелом.

Данные текущего заключительного диагноза	Подгруппа ОКС (тикагрелор)		Подгруппа ОКС (клопидогрел)	
	Число случаев	Процент, %	Число случаев	Процент, %
Инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST	81	63,3	76	66,0
Инфаркт миокарда без подъема сегмента ST	35	27,3	23	20,0
Нестабильная стенокардия	12	9,4	16	13,9
Примечание: ОКС – острый коронарный синдром				

Особенности лабораторно-инструментальных данных, в том числе прогностически значимые факторы риска ишемических или геморрагических осложнений у пациентов, получающих двойную антиагрегантную терапию, представлены в Таблице 14.

Таблица 14 - Лабораторные и инструментальные характеристики пациентов получающие двойную антиагрегантную терапию.

Данные лабораторных и инструментальных исследований	Подгруппа ОКС (тикагрелор)		Подгруппа ОКС (клопидогрел)	
	Среднее (М)	Стандартное отклонение (SD)	Среднее (М)	Стандартное отклонение (SD)
Уровень гемоглобина, г/л	144,68	15,51	139,62	17,51
Лейкоциты, 10^{12} /л	9,35	2,61	9,1	5,6
Тромбоциты, 10^9 /л	249,50	72,41	236,0	68,3
Общий холестерин, ммоль/л	5,33	1,33	5,1	1,1
ЛПНП, ммоль/л	3,11	1,21	3,02	1,09
Триглицериды, ммоль/л	1,92	1,14	1,07	0,66
Креатинин, мкмоль/л	107,11	31,11	103,8	26,08
Глюкоза, ммоль/л	6,50	1,78	5,2	1,87
Гематокрит, %	41,24	4,91	39,3	1,1
Фракция выброса левого желудочка, %	52,33	8,95	48,7	8,6
САД, мм рт ст	138,73	23,05	133,4	23,05
ДАД мм рт ст	82,67	12,94	78,2	12,94
ЧСС, ударов в минуту	74,18	13,74	76,6	10,4
Примечание: М – medium - среднее, SD - standard deviation — стандартное отклонение, ЛПНП – липопротеиды низкой плотности, ЧСС – частота сердечных сокращений, САД – систолическое артериальное давление, ДАД – диастолическое артериальное давление, ОКС – острый коронарный синдром				

3.1.2. Пациенты с ОКС и фибрилляцией предсердий, получающие антиагрегантную терапию клопидогрелом в сочетании с ривароксабаном

В подгруппу пациентов, принимающих двойную (АСК + клопидогрел + ривароксабан) или тройную (клопидогрел + ривароксабан) антитромботическую терапию было включено 103 пациента с ОКС с ЧКВ и без в сочетании с фибрилляцией предсердий. Средний возраст $72,8 \pm 9,8$ лет. Среди них: 56 (54,5%) пациентов мужского пола и 47 пациентов женского пола (45,5%). Характер антитромботической терапии: тройная - 76 (73,7%), двойная - 27 (26,3%) (Таблица 15).

Таблица 15 - Клинические и демографические характеристики пациентов с ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий.

Демографические и клинические данные анамнеза	Подгруппа ОКС + ФП	
	Число случаев	Процент, %
Мужчин	56	54,5
Женщин	47	45,5
Ожирение	51	49,5
Курение	9	8,7
Чрескожное коронарное вмешательство	33	32,0
Аорто-коронарное шунтирование	7	6,8
Инфаркт миокарда	48	46,6
Хроническая сердечная недостаточность II стадии и выше	37	35,9
Сахарный диабет	30	29,1
Любые кровотечения	20	19,4
Примечание: ОКС – острый коронарный синдром, ФП – фибрилляция предсердий		

Среди пациентов с ОКС и фибрилляцией предсердий частота встречаемости ожирения составила – 49%, курение – 8,7%, инфаркт миокарда в анамнезе – 46,6%, хроническая сердечная недостаточность II стадии и выше – 35,9%, сахарный диабет – 29,1%, любые кровотечения в анамнезе – 19,4%.

Данные текущего клинического диагноза и неблагоприятных исходов за 6 месяцев наблюдения представлены в Таблице 16.

Таблица 16 - Текущий диагноз и клинические исходы за 6 месяцев среди пациентов с ОКС и фибрилляцией предсердий

Данные текущего заключительного диагноза и клинических исходов за 6 месяцев	Подгруппа ОКС + ФП	
	Число случаев	Процент, %
Фибрилляция предсердий впервые выявленная	13	12,6
Фибрилляция предсердий пароксизмальная	53	51,5
Фибрилляция предсердий постоянная	37	35,9
Инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST	28	27,2
Инфаркт миокарда без подъема сегмента ST	52	50,5
Нестабильная стенокардия	23	22,3
Чрескожное коронарное вмешательство в текущую госпитализацию	76	73,8
Большие, малые или требующие медицинского наблюдения кровотечения	11	10,6
Сердечно-сосудистая смерть	4	3,9
Острое нарушение мозгового кровообращения, транзиторная ишемическая атака	2	2,0

Продолжение Таблицы 16

Данные текущего заключительного диагноза и клинических исходов за 6 месяцев	Подгруппа ОКС + ФП	
	Число случаев	Процент, %
Госпитальная смертность	3	2,9
Смерть на фоне почечной недостаточности	33	32,0
Примечание: ОКС – острый коронарный синдром, ФП – фибрилляция предсердий		

После верификации диагноза у пациентов с ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий, получающих клопидогрел в сочетании с ривароксабаном, инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST наблюдался среди 27,2%, инфаркт без подъема сегмента ST – 50,5%, нестабильная стенокардия – 22,3%, чрескожное коронарное вмешательство в текущую госпитализацию – 73,8, большие, малые или требующие медицинского наблюдения кровотечения – 10,6%, сердечно-сосудистая смерть – 3,9%, острое нарушение мозгового кровообращения/транзиторная ишемическая атака - 2%, госпитальная смертность – 2,9%, смерть на фоне почечной недостаточности – 32,2%. При этом средний уровень скорости клубочковой фильтрации (СКФ) составил $53,8 \pm 17,7$.

Средние балы по шкалам оценки риска неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, тромботических и геморрагических осложнений представлены в таблице 17. В исследуемой подгруппе ОКС + ФП высокий риск ИМ и смерти по шкале GRACE наблюдался в 30,1%, а высокий риск кардиальных осложнений по шкале SYNTAX - 13,6%.

Таблица 17 - Шкалы оценки риска осложнений у пациентов с ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий

Шкалы оценки риска осложнений	Подгруппа ОКС + ФП	
	Среднее (М)	Стандартное отклонение (SD)
SYNTAX	19,95	19,95±14,3
CRUSADE	11,4	11,4±5,1
Killip	1,43	1,43±0,74
CHA ₂ DS ₂ VASC	5,1	5,1±1,5
HAS-BLED	2,4	2,4±0,9
Примечание: ОКС – острый коронарный синдром, ФП – фибрилляция предсердий, SYNTAX - Synergy between Percutaneous Coronary Intervention with TAXUS, CRUSADE - Can Rapid risk stratification of Unstable angina patients Suppress ADverse outcomes with Early implementation of the ACC/AHA guidelines, CHA ₂ DS ₂ VASC HAS-BLED		

3.1.3. Пациенты с ишемическим инсультом, получающих антиагрегантную терапию клопидогрелом

В подгруппу пациентов с некардиоэмболическим ишемическим инсультом, получающих клопидогрел, был включен 121 пациент. Среди них: мужчины - 68 % женщины - 32 %. Всем пациентам была назначена антиагрегантная терапия клопидогрелом в дозе 75 мг, после смены с 125 мг АСК, назначенных в первые сутки госпитализации или не ранее 24 часов после проведения тромболиза (Таблица 18).

Таблица 18 – Клиническая и демографическая характеристика пациентов с ишемическим инсультом.

Показатель	Подгруппа с ишемическим инсультом	
	n	%
Мужчины	82	67,7
Женщины	39	32,2
Курение	54	44,6
Ишемическим инсульт первичный	92	77,3
Ишемическим инсульт повторный	27	22,7
Ожирение	39	32,2
Артериальная гипертензия	120	99,2
Гиперлипидемия	72	59,5
Перенесенный инфаркт миокарда в анамнезе	24	19,8
Транзиторная ишемическая атака в анамнезе	65	53,7
Заболевания периферических сосудов	19	15,7
Сахарный диабет	35	28,9
Хроническая сердечная недостаточность II стадии и выше	113	93,4
Шкала риска повторных сердечно-сосудистых событий в течение года (3 и более баллов ESRS)	108	89,3
Гемодинамически значимые поражения магистральных артерий головы	14	11,6
Тяжелые неврологические нарушения при поступлении (12 и более баллов по шкале NIHSS)	4	3,3

Продолжение таблицы 18

Показатель	Подгруппа с ишемическим инсультом	
	n	%
Выраженные и грубые нарушения жизнедеятельности при поступлении (более 4 баллов по шкале Рэнкина)	102	83,4
Внутримозговые кровотечения	2	1,7
Примечание: NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) - шкала инсульта Национального института здоровья ESRS (Essen Stroke Risk Score) – шкала риска повторных сердечно-сосудистых осложнений в течение года		

Среди пациентов с ишемическим инсультом частота встречаемости ожирения составила - 32,2%, артериальной гипертензии - 99,2%, гиперлипидемии - 59,5%, перенесенного инфаркта миокарда в анамнезе - 19,8%, транзиторной ишемической атаки в анамнезе - 53,7%, заболеваний периферических сосудов - 15,7%, сахарного диабета - 28,9%, хронической сердечной недостаточности - 93,4%.

Особенности лабораторно-инструментальных данных, в том числе прогностически значимые факторы риска ишемических или геморрагических осложнений у пациентов, получающих двойную антиагрегантную терапию, представлены в Таблице 19.

Таблица 19 - Лабораторные характеристики пациентов с ишемическим инсультом

Данные лабораторных и инструментальных исследований	Подгруппа с ишемическим инсультом	
	Среднее (M)	Стандартное отклонение (SD)
Уровень гемоглобина, г/л	145,87	23,1
Лейкоциты, 10^{12} /л	8,4	5,1
Тромбоциты, 10^9 /л	258,02	60,8

Продолжение Таблицы 19

Данные лабораторных и инструментальных исследований	Подгруппа с ишемическим инсультом	
	Среднее (М)	Стандартное отклонение (SD)
Общий холестерин, ммоль/л	5,0	1,3
ЛПНП, ммоль/л	2,9	1,3
Триглицериды, ммоль/л	1,8	1,2
Креатинин, мкмоль/л	92,4	21,2
Глюкоза, ммоль/л	6,2	2,4
Примечание: М – medium - среднее, SD - standard deviation — стандартное отклонение, ЛПНП – липопротеиды низкой плотности		

3.2. Изучение вариабельности фармакологического ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

3.2.1. Оценка агрегации тромбоцитов пациентов на фоне применения клопидогрела у пациентов с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями

Средние значения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов методом VerifyNow были полученные среди пациентов с ОКС, принимающих тикагрелор или клопидогрел в составе двойной антиагрегантной терапии, а также среди пациентов с ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий, принимающих клопидогрел в комбинированной антитромботической терапии, представлены в Таблице 21.

Таблица 21 – Показатели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов среди пациентов с ОКС и ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий

Показатели остаточной активности тромбоцитов	Подгруппа ОКС (тикагрелор)		Подгруппа ОКС (клопидогрел)		Подгруппа ОКС + ФП (клопидогрел)	
	М	SD	М	SD	М	SD
Базовое PRU, в абсолютных единицах	177,5	39,3	226,7	40,4	193,6	46,2
PRU, в абсолютных единицах	19,2	29,4	155,7	56,9	135,8	62,0
Процент ингибирования, %	89,5	15,5	32,0	21,9	30,5	27,8
Примечание: М – среднее; SD -стандартное отклонение; ОКС – острый коронарный синдром; ФП – фибрилляция предсердий						

Доля пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов ($PRU > 208$) и низкой остаточной реактивностью тромбоцитов ($PRU < 95$) среди пациентов с ОКС на фоне терапии клопидогрелом составила 23,6 % ($n=26$) и 17,2 ($n=19$), что соответствует данным литературы [57, 58]. Так доля пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов в исследовании Bonello L., среди пациентов с ИБС и в исследовании Fiolaki A., среди пациентов с ишемическим инсультом составила до 40% и 32%, соответственно [58, 59]. Аналогичные данные по доле резистентных к клопидогрелу пациентов получены и в исследованиях отечественных авторов: от 25 до 56% [60, 61, 62].

При оценке особенностей клинических, демографических и лабораторных характеристик пациентов с недостаточным ответом на клопидогрел ($PRU > 208$) при ОКС было выявлено, что в группе пациентов с резистентностью к клопидогрелу значимо выше среднее число лейкоцитов ($9,1 \pm 6,3$ против $9,9 \pm 2,05\%$; $p = 0,008$). В группе с чрезмерным подавлением активности тромбоцитов - низкой остаточной реактивностью тромбоцитов ($PRU < 95$): чаще встречалась хроническая сердечная недостаточность (63,2% против 19,8%; $p < 0,0003$), прием блокаторов кальциевых каналов (31,6% против 9,9%; $p = 0,012$), прием диуретиков

(57,9% против 30,8%; $p = 0,025$), ингибиторов протонной помпы (57,9% против 30,8%; $p = 0,009$). По другим характеристикам пациентов значимых различий не выявлено.

Среди пациентов с ОКС + ФП, получающих двойную (клопидогрел+ривароксабан) или тройную (АСК+клопидогрел+ривароксабан) антитромботическую терапию показатели высокой остаточной реактивности тромбоцитов и низкой остаточной реактивности тромбоцитов составили 12 (11,7%) и 25 (24,3%), что вероятно обусловлено, возможным дополнительным влиянием ривароксабана. Ривароксабан, будучи прямым ингибитором Ха фактора, напрямую не влияет на агрегацию тромбоцитов, вызванную коллагеном, АДФ, тромбоксаном А₂ или тромбином [281, 282]. В то же время, было показано, что ривароксабан, способный в физиологически значимых концентрациях практически полностью ингибировать образование тромбина, может, косвенно, существенно подавлять агрегацию тромбоцитов, связанную с тканевым фактором путем ингибирования генерации тромбина [283]. В ранее проведенных исследованиях была описана повышенная прокоагулянтная активность в острую фазу ОКС со значимым повышением образования тромбина у этих пациентов, которое может сохраняться несколько месяцев и после события, что способствует повышенному риску тромботических осложнений [284, 285, 286, 287, 288].

При оценке особенностей клинических, демографических и лабораторных характеристик пациентов с недостаточным ответом на клопидогрел ($PRU > 208$) при ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий было выявлено, что в группе пациентов с резистентностью к клопидогрелу значимо чаще встречались пациенты с высоким риском по шкале SYNTAX (8,3% против 7,7%; $p < 0,0001$). В группе с низкой остаточной реактивностью тромбоцитов чаще встречались пациенты с ХОБЛ (28,0% против 10,3%; $p=0,029$) и с концентрацией клопидогрела ниже порога определения (45,8% против 23,4%; $p=0,034$). По другим характеристикам пациентов значимых различий не выявлено.

Таким образом, в показатели вариабельности АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов ОКС и ОКС + ФП могут существенно

различаться из-за дополнительного влияния антикоагулянтной терапии. Если в случае ОКС без ФП основной проблемой вариабельности ответа является высокая резистентность к клопидогрелу – почти 1/3 пациентов в текущем исследовании, то в случае ОКС и ФП на первый план выходит высокая доля пациентов чрезмерным подавлением активности тромбоцитов – 24,3%. В то время как доля пациентов резистентных к клопидогрелу оказалась 2-3 раза ниже средних значений по данным литературы – 11,7%, что может стать одним из перспективных направлений для изучения способов преодоления резистентности к клопидогрелу у больных с ОКС.

3.2.2. Оценка вариабельности динамики остаточной агрегации тромбоцитов на фоне применения клопидогрела у пациентов с острым ишемическим инсультом

У пациентов с ишемическим значения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов были получены на приборе Helena, для которого отсутствуют общепринятые рекомендованные консенсусом экспертов границы «терапевтического окна», как для VerifyNow, и требуется стандартизация в локальной лаборатории границ нормальных значений активности тромбоцитов, которые в текущем исследовании составили – 65-75%. С учетом отсутствия стандартизированных границ отсечения для риска тромботических исходов и риска кровотечений, в литературе принято оценивать степень ингибирования активности тромбоцитов до и после начала приема клопидогрела: снижение максимальной АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов $<10\%$ - резистентность к клопидогрелу, $10-29\%$ - условно резистентные и $\geq 30\%$ - чувствительные [277]. С учетом небольшого объема выборки, для статистической обработки пациенты были разделены на различные группы неответчиков и ответчиков: 1) $<10\%$ vs $10-29\% + \geq 30\%$; 2) $10\% + 10-29\%$ vs $\geq 30\%$ (Таблица 22).

Таблица 22 - Доля пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов среди пациентов с ишемическим инсультом на фоне терапии клопидогрелом.

Группы по ответу на клопидогел	На 7 день	На 13 день
Снижение максимальной АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов <10%	n=119	n=121
	36 (30,3 %)	34 (28,6%)
Снижение максимальной АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов группы 10% + 10-29%	n=119	n=120
	72 (60,0%)	63 (52,5%)

Доля пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов среди пациентов с ишемическим инсультом на фоне терапии клопидогрелом (снижение максимальной АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов <10% по сравнению с уровнем до начала терапии) составила на 7 день - 30,3 % и на 13 день - 28,6% (Таблица 22).

При оценке особенностей клинических, демографических и лабораторных характеристик пациентов с недостаточным ответом на клопидогрел ($PRU > 208$) при ишемическом инсульте было выявлено, что в группе пациентов с резистентностью к клопидогрелу на 7 день было выявлено, что у пациентов с резистентностью к клопидогрелу чаще встречались пациенты с ХОБЛ чаще (28,0% против 10,3%; $p=0,029$), чаще пациенты с концентрацией клопидогрела ниже порога определения (45,8% против 23,4%; $p=0,034$), выше клиренс креатинина по Кокрофт-Голту (0,026) и ниже средний уровень липопротеинов высокой плотности ($p=0,047$). В группе оценки агрегации на 13 день значимо реже встречались пациенты, принимающие бета-адреноблокаторы (50,0% против 29,9%; $p=0,038$).

По другим характеристикам пациентов значимых различий не выявлено.

Таким образом, доля пациентов с резистентных к клопидогрелу (снижение максимальной АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов <10% по сравнению с уровнем до начала терапии) на 7 и 13 день составила почти около 1/3 пациентов, что коррелирует с данными литературы. При анализе совместно с группой условно резистентных (10-29%) доля таких пациентов может достигать 2/3 группы, что гораздо выше данных по литературе и вероятно говорит о целесообразности

данную группу условно резистентных при анализе объединять скорее с чувствительными ($\geq 30\%$), а не с резистентными ($< 10\%$). Дальнейшие расчеты выполнены с выделением групп $< 10\%$ - резистентные к клопидогрелу и $\geq 10\%$ и более.

3.2.3. Определение терапевтического диапазона агрегации тромбоцитов на фоне применения тикагрелора у пациентов с острым коронарным синдромом

Несмотря на то, что согласно официальной инструкции прибора и рекомендациям консенсуса экспертов набор VerifyNow P2Y12 рассчитан на измерение остаточной реактивности тромбоцитов на фоне терапии всеми ингибиторами P2Y12-тромбоцитов, зачастую средние показатели PRU для тикагрелора и прасугрела в реальной практике гораздо ниже рекомендованного «терапевтического окна» для клопидогрела: 95-208. Валидные значения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов на фоне тикагрелора методом VerifyNow в исследовании были получены среди 106 пациентов с ОКС и ЧКВ из 128. В текущем исследовании не выявлено пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов ($PRU > 208$), а число пациентов с низкой остаточной реактивностью тромбоцитов ($PRU < 95$) составило подавляющее большинство – 103 (97,1%) со средним значением PRU - 19,7. В дальнейшем анализе для статистических расчетов использованы абсолютные значения агрегации тромбоцитов на фоне тикагрелора с учетом некорректности границ отсечения для тромботических и геморрагических осложнений. Реальные границы «терапевтического окна» для тикагрелора, которые могут составлять после удаления выбросов соответствуют PRU 5-47 (Рисунок 19), что коррелирует данными пилотных исследований других авторов [70]. Число пациентов с PRU более 47 составило 10 человек, что составляет 7,8% от общего числа.

Статистическая оценка различий в клинических, демографических и лабораторных характеристиках пациентов с недостаточным ответом на тикагрелор при ОКС затруднительна с учетом малого размера в данной сравниваемой группе 10 пациентов, а полученные результаты не позволяют сделать какие-либо выводы

и свидетельствуют о тенденции: в группе пациентов с резистентностью к тикагрелору по предложенным границам чаще встречается женский пол (40,0% против 14,7%; $p=0,039$), прием блокаторов кальциевых каналов (50,0% против 14,7%; $p=0,005$), ниже уровень гемоглобина ($145,8 \pm 15,3$ против $130,3 \pm 11,1$; $p=0,001$).

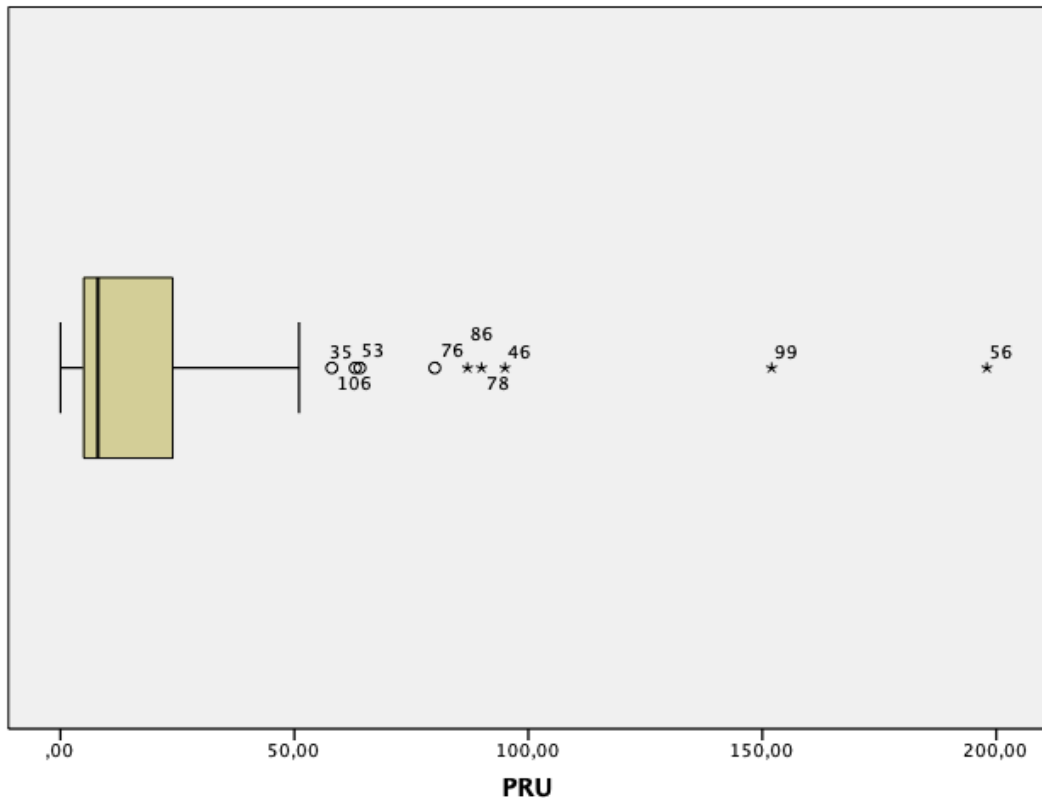


Рисунок 19 - Возможные границы «терапевтического окна» для тикагрелора

3.3. Оценка возможности фармакогенетических биомаркеров прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y12-рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

Выбор генов-кандидатов для оценки возможности фармакогенетических биомаркеров прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y12-рецепторов основан на ген-кандидат подходе с учетом особенностей фармакокинетики и фармадинамики клопидогрела и тикагрелора (Таблица 23).

Таблица 23 - Гены-кандидаты, которые могут играть важную роль в прогнозировании ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов

Препарат	Фармакокинетические гены-кандидаты	Фармакодинамические гены-кандидаты
Клопидогрел	ABCB1, ABCG2, CES1, PON1, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A5, CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6	P2RY12, PEAR1, ITGB3, B4GALT2, CYP4F2
Тикагрелор	CYP3A4, CYP3A5 SLCO1B1, UGT2B7	P2RY12, PEAR1, CYP4F2

Кроме ген-кандидат подхода, для тикагрелора так же проведена оценка влияния ряда классических фармакокинетических маркеров резистентности к антиагрегантной терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов: ABCB1 (rs1045642), CYP2C19 (*2 (rs4244285), *3 (rs4986893), *17 (rs12248560)), CES1 (rs2244613), PON1 (rs662), IGTV3 (rs5918T). Целью данного анализа являлось проверка наличия независимой прогностической роли данных генетических маркеров без учета конкретного препарата.

3.3.1. Оценка влияния носительства фармакогенетических маркеров на антиагрегантное действие клопидогрела у пациентов с ОКС

Из изучаемых фармакогенетических маркеров ABCB1 (rs1045642), ABCG2 (rs2231142), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367), CYP2C19 (*2 - rs4244285, *3 - rs4986893, *17 - rs12248560), CYP2B6 (rs2279343), CES1 (rs2244613), PON1 (rs662), PEAR1 (rs57731889, rs822442, rs41273215), IGTV3 (rs5918T), P2Y12 (rs3732759, rs2046934), CYP4F2 (rs2108622), B4GALT2 (rs1061781) – таблица 24) показавшим влияние на антиагрегантное действие клопидогрела у пациентов с ОКС оказались маркеры - CYP2C19*2 (rs4244285), CYP2C19*17 (rs12248560) и PEAR1 (rs41273215). При этом частота ABCB1 (rs1045642), CYP2C19 (rs4244285, rs4986893, rs12248560) и CYP4F2 (rs2108622) оценивалась среди всей выборки, а

частота остальных маркеров в пилотном исследовании среди 31 пациента с ОКС, получающих клопидогрел.

Таблица 24 – Носительство изучаемых фармакогенетических маркеров в подгруппе ОКС, принимающих клопидогрел и оценка на соответствие равновесию Харди-Вайнберга

Полиморфизм	Генотип	n	Хи-квадрат	p
ABCB1 (rs1045642)	CC	27	10,49	0,005
	CT	72		
	TT	13		
CYP2C19 (rs4244285)	GG	90	0,034	0,982
	GA	21		
	AA	1		
CYP2C19 (rs4986893)	GG	31	-	-
	GA	0		
	AA	0		
CYP2C19 (rs12248560)	CC	72	0,061	0,804
	CT	32		
	TT	3		
CYP3A5 (rs776746)	AA	0	-	-
	AG	0		
	GG	31		
B4GALT2 (rs1061781)	CC	27	0,147	0,928
	CT	4		
	TT	0		
CYP3A4 (rs35599367)	CC	31	-	-
	CT	0		
	TT	0		
PON1 rs662	CC	17	2,637	0,267
	CT	14		
	TT	0		
P2Y12 (rs3732759)	AA	16	0,997	0,607
	AG	14		
	GG	1		

Продолжение Таблицы 24

Полиморфизм	Генотип	n	Хи-квадрат	p
ABCG2 (rs2231142)	CC	26	0,238	0,887
	CA	5		
	AA	0		
IGTB3 (rs5918)	CC	22	0,71	0,701
	CT	8		
	TT	0		
P2Y12 (rs2046934)	GG	22	0,066	0,967
	GA	8		
	AA	1		
PEAR1 (rs57731889)	CC	29	0,034	0,982
	CT	2		
	TT	0		
PEAR1 (rs41273215)	CC	26	0,238	0,887
	CT	5		
	TT	0		
CES1 (rs2244613)	CC	22	0,893	0,639
	CA	9		
	AA	0		
CYP3A4 (rs2242480)	GG	22	3,365	0,185
	GA	7		
	AA	3		
CYP4F2 (rs2108622)	CC	57	4,930	0,02
	CT	52		
	TT	3		
CYP2B6 (rs2279343)	AA	3	21,02	<0,05
	AG	28		
	GG	0		

Распределение аллелей и генотипов в группе ОКС, получающих клопидогрел, соответствовало закону Харди-Вайнберга за исключением следующих маркеров: ABCB1 (rs1045642), CYP4F2 (rs2108622) и CYP2B6 (rs2279343).

Среди носителей аллели CYP2C19*2 (генотипы G/A+A/A), ассоциированного с повышенной активностью фермента CYP2C19 и резистентностью к

клопидогрелу, отмечалась более высокая доля пациентов с недостаточным подавлением активности тромбоцитов (PRU более 208), по сравнению с носителями генотипа CC (40,0% vs 14,9%, ($p=0,011$)) и более низкий уровень процента адекватно ингибированных тромбоцитов (в %): $33,7 \pm 22$ vs $23,4 \pm 19,9$, $p = 0,037$.

Среди носителей аллели CYP2C19*17 (генотипы CT+TT) отмечалась более высокая доля пациентов с чрезмерным подавлением активности тромбоцитов (PRU менее 95), по сравнению с носителями генотипа CC: 9,7% vs 31,4%, $p=0,005$.

Среди носителей аллели T (генотипы CT+TT) по PEAR1 (rs41273215) так же отмечалась более высокая доля пациентов с чрезмерным подавлением активности тромбоцитов (PRU менее 95) в, по сравнению с носителями генотипа CC (34,8% vs 100%, ($p=0,032$)) и более низкий уровень активности тромбоцитов, по сравнению с носителями генотипа CC: PRU $53 \pm 22,6$ vs $124,2 \pm 53,5$ ($p = 0,012$). Однако число пациентов носителей генотипов CT+TT по PEAR1 (rs41273215) невелико ($n=3$) для формирования однозначных выводов и эти найденные тенденции требуют подтверждения на большей выборке.

3.3.2. Оценка влияния фармакогенетических маркеров на антиагрегантное действие клопидогрела и клинические исходы при его совместном применении с ривароксабаном

Из изучаемых фармакогенетических маркеров (ABCB1 (rs1045642, rs4148738), ABCG2 (rs2231142), CYP1A2 (rs2069522), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367, rs2242480), CYP2C19 (rs4244285, rs4986893, rs12248560), CYP2B6 (rs2279343), CES1 (rs2244613), PON1 (rs662), PEAR1 (rs57731889, rs822442, rs41273215), IGTB3 (rs5918T), P2Y12 (rs3732759, rs2046934), CYP4F2 (rs2108622), B4GALT2 (rs1061781) – таблица 25) показавшим влияние на антиагрегантное действие клопидогрела и клинические исходы у пациентов с ОКС и ФП оказались маркеры - CYP2C19*17, PON1 (rs662), CYP4F2 (rs2108622), B4GALT2 (rs1061781).

Таблица 25 – Носительство изучаемых фармакогенетических маркеров в подгруппе ОКС + ФП, принимающих клопидогрел, и оценка на соответствие равновесию Харди-Вайнберга

Полиморфизм	Генотип	n	Хи-квадрат	p
CYP2C19 (rs4244285)	GG	86	0.00013	0.99994
	GA	32		
	AA	3		
CYP2C19 (rs4986893)	GG	117	0.03418	0.98306
	GA	4		
	AA	0		
CYP2C19 (rs12248560)	CC	69	0.96378	0.61762
	CT	42		
	TT	10		
CYP3A5 (rs776746)	AA	0	0.61813	0.73413
	AG	16		
	GG	103		
CYP4F2 (rs2108622)	CC	74	0.5002	0.77872
	CT	41		
	TT	8		
ABCB1 (rs1045642)	CC	22	1.82462	0.4016
	CT	68		
	TT	32		
ABCB1 (rs4148738)	CC	22	0.59637	0.74216
	CT	64		
	TT	35		
PON1 (rs662)	CC	58	2.40729	0.3001
	CT	46		
	TT	17		
IGTB3 (rs5918)	CC	79	0.50234	0.77789
	CT	36		
	TT	6		
P2Y12 (rs2046934)	GG	99	27.75562	<0,05
	GA	15		
	AA	9		
PEAR1 (rs822442)	CC	35	36.77334	<0,05
	CA	86		
	AA	0		

Продолжение Таблицы 25

Полиморфизм	Генотип	n	Хи-квадрат	p
PEAR1 (rs41273215)	CC	94	0.48761	0.78364
	CT	28		
	TT	1		
CES1 (rs2244613)	CC	70	8.63501	<0,05
	CA	36		
	AA	16		
CYP3A4 (rs2242480)	GG	96	0.59741	0.74178
	GA	25		
	AA	1		
B4GALT2 (rs1061781)	CC	110	1.37667	0.50241
	CT	11		
	TT	1		
CYP1A2 (rs2069522)	TT	71	0.00352	0.99824
	TC	1		
	CC	0		
PEAR1 (rs57731889)	1	98	1.57398	0.45521
	2	25		
	3	0		
P2Y12R (rs3732759)	AA	43	0.39411	0.82114
	AG	61		
	GG	17		
ABCG2 (rs2231142)	CC	94	0.22495	0.89362
	CA	25		
	AA	1		
CYP2B6 (rs2279343)	AA	118	0.05294	0.97388
	AG	5		
	GG	0		

Распределение аллелей и генотипов в группе ОКС + ФП, получающих клопидогрел, соответствовало закону Харди-Вайнберга за исключением следующих маркеров: P2Y12 (rs2046934), PEAR1 (rs822442), CES1 (rs2244613).

В данной подгруппе носители генотипов СТ+ТТ по CYP2C19*17, кодирующих изофермент CYP2C19 с повышенной активностью и связанных с риском кровотечений на фоне клопидогрела, имели более высокие показатели

ингибирования тромбоцитов ($37,8\% \pm 28,9$ по сравнению с $25,0\% \pm 25,9$; $p = 0,013$) и, следовательно, более низкие значения PRU ($121,4 \pm 63,5$ против $147,1 \pm 59,0$; $p = 0,044$) по сравнению с не носителями. Данный аллельный вариант был статистически значимо ассоциирован так же с риском общегоспитальной смертности (0% в среди СС против 6,7 % среди СТ+ТТ; $p = 0,046$) и сердечно-сосудистой смертью (0% против 8,9%; $p = 0,021$). Пациенты с генотипами СТ+ТТ по PON1 (rs662) имели значимо более низкую смертность на фоне почечной недостаточности 28,3% против 63,6% ($p=0,017$). Генотипы СТ+ТТ по полиморфному маркеру CYP4F2 (rs2108622), были статистически значимо ассоциированы с большей частотой значимых кровотечений на фоне комбинированной антитромботической терапии: 3,5 % против 20,9 % ($p=0,006$). Кроме того, у пациентов с генотипами СТ+ТТ по PEAR1 (rs41273215) была в 3 раза выше частота значимых кровотечений: 23,8% против 7,6% ($p=0,035$). У носителей генотипов СТ+ТТ по B4GALT2 (rs1061781) статистически значимо была ниже частота смертности на фоне почечной недостаточности: 35,0% против 0,0%, $p=0,031$, в тоже время этот полиморфизм статистически значимо ассоциировался с увеличением частоты инсультов и транзиторных ишемических атак: 1,1 % против 11,1 % ($p=0,041$). Однако число пациентов носителей генотипов СТ+ТТ гена B4GALT2 (rs1061781) невелико ($n=9$) для формирования однозначных выводов и эти найденные тенденции требуют подтверждения на большей выборке.

3.3.3. Оценка влияния носительства отобранных в исследовании фармакогенетических маркеров на антиагрегантное действие клопидогрела у пациентов с ишемическим инсультом

Из изучаемых фармакогенетических маркеров (ABCB1 (rs1045642, rs4148738), ABCG2 (rs2231142), CYP1A2 (rs2069522), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs2242480), CYP2C19 (rs4244285, rs4986893, rs12248560), CYP2B6 (rs2279343), CES1 (rs2244613), PON1 (rs662), PEAR1 (rs57731889, rs822442, rs41273215), IGTB3 (rs5918T), P2Y12 (rs3732759, rs2046934), CYP4F2 (rs2108622), B4GALT2 (rs1061781) – таблица 26) показавшим влияние на антиагрегантное действие

клопидогрела у пациентов ишемическим инсультом оказался маркер - P2Y12 (rs2046934).

Таблица 26 – Носительство изучаемых фармакогенетических маркеров в подгруппе ишемического инсульта, принимающих клопидогрел и оценка на соответствие равновесию Харди-Вайнберга

Полиморфизм	Генотип	n	Хи-квадрат	p
CYP2C19 (rs4244285)	GG	86	0,00013	0,999
	GA	32		
	AA	3		
CYP2C19 (rs4986893)	GG	117	0,03418	0,983
	GA	4		
	AA	0		
CYP2C19 (rs12248560)	CC	69	0,96378	0,617
	CT	42		
	TT	10		
CYP3A5 (rs776746)	AA	0	0,61813	0,734
	AG	16		
	GG	103		
CYP4F2 (rs2108622)	CC	74	0,5002	0,778
	CT	41		
	TT	8		
ABCB1 (rs1045642)	CC	22	1,82462	0,401
	CT	68		
	TT	32		
ABCB1 (rs4148738)	CC	22	0,59637	0,742
	CT	64		
	TT	35		
PON1 (rs662)	CC	58	2,40729	0,300
	CT	46		
	TT	17		
IGTB3 (rs5918)	CC	79	0,50234	0,777
	CT	36		
	TT	6		

Продолжение Таблицы 26

Полиморфизм	Генотип	n	Хи-квадрат	p
P2Y12 (rs2046934)	GG	99	27,75562	<0,05
	GA	15		
	AA	9		
PEAR1 (rs822442)	CC	35	36,77334	<0,05
	CA	86		
	AA	0		
PEAR1 (rs41273215)	CC	94	0,48761	0,783
	CT	28		
	TT	1		
CES1 (rs2244613)	CC	70	8,63501	<0,05
	CA	36		
	AA	16		
CYP3A4 (rs2242480)	GG	96	0,59741	0,741
	GA	25		
	AA	1		
B4GALT2 (rs1061781)	CC	110	1,37667	0,502
	CT	11		
	TT	1		
CYP1A2 (rs2069522)	TT	71	0,00352	0,998
	TC	1		
	CC	0		
PEAR1 (rs57731889)	1	98	1,57398	0,45521
	2	25		
	3	0		
P2Y12R (rs3732759)	AA	43	0,39411	0,821
	AG	61		
	GG	17		
ABCG2 (rs2231142)	CC	94	0,22495	0,893
	CA	25		
	AA	1		
CYP2B6 (rs2279343)	AA	118	0,05294	0,973
	AG	5		
	GG	0		

Распределение аллелей и генотипов в группе ишемического инсульта, получающих клопидогрел, соответствовало закону Харди-Вайнберга за исключением следующих маркеров: P2Y12 (rs2046934), PEAR1 (rs822442), CES1 (rs2244613).

Среди пациентов с ишемическим инсультом - носителей генотипа GA+AA по P2Y12 (rs2046934) значимо чаще на 13 день терапии резистентность к клопидогрелу (снижение максимальной агрегации после начала лечения менее 10%), по сравнению с носителями генотипов GG: 45,8 % vs 23,7 %, $p=0,031$.

При этом, наблюдались статистически значимые различия агрегации тромбоцитов в зависимости от носительства фармакогенетических маркеров в 1 день до приема клопидогрела ABCB1 (rs1045642), CES1 (rs2244613), PEAR1 (rs822442, 41273215), CYP4F2 (rs2108622), что следует учитывать при оценке прогностической роли данных маркеров для прогнозирования резистентности тромбоцитов.

3.3.4. Оценка влияния носительства отобранных в исследовании фармакогенетических маркеров на антиагрегантное действие тикагрелора у пациентов с острым коронарным синдромом

Ни один из изучаемых в исследовании фармакогенетических маркеров (ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP3A4 (rs35599367, rs2242480), CYP2C19 (rs4244285, rs4986893, rs12248560), CYP2B6 (rs2279343), CES1 (rs2244613), UGT2B7 (rs61361928), PON1 (rs662), PEAR1 (rs822442, rs41273215), IGTB3 (rs5918T), P2Y12 (rs2046934), CYP4F2 (rs2108622) не оказывал значимого влияния на антиагрегантное действие тикагрелора (таблица 27).

Таблица 27 – Носительство изучаемых фармакогенетических маркеров в подгруппе ОКС, принимающих тикагрелор и оценка на соответствие равновесию Харди-Вайнберга

Полиморфизм	Генотип	n	Хи-квадрат	p
CYP2C19 (rs4244285)	GG	99	0.010	0.994
	GA	27		
	AA	2		
CYP2C19 (rs4986893)	GG	127	0.001	0.999
	GA	1		
	AA	0		
CYP2C19 (rs12248560)	CC	69	3.109	0.211
	CT	41		
	TT	13		
CYP3A5 (rs776746)	AA	1	0.003	0.998
	AG	20		
	GG	107		
UGT2B7 (rs61361928)	TT	122	0.002	0.998
	TC	1		
	CC	0		
ABCB1 (rs1045642)	CC	24	0.560	0.755
	CT	58		
	TT	46		
CYP3A4 (rs35599367)	CC	120	0.018	0.990
	CT	3		
	TT	0		
PON1 (rs662)	CC	8	1.496	0.473
	CT	57		
	TT	58		
IGTB3 (rs5918)	CC	92	2.915	0.232
	CT	26		
	TT	5		
P2Y12 (rs2046934)	GG	84	0.077	0.961
	GA	29		
	AA	2		
PEAR1 (rs822442)	CC	1	104	<0,05
	CA	118		
	AA	4		

Продолжение Таблицы 27

Полиморфизм	Генотип	n	Хи-квадрат	p
PEAR1 (rs41273215)	CC	99	1.949	0.377
	CT	28		
	TT	0		
CES1 (rs2244613)	CC	68	10.54	<0,05
	CA	56		
	AA	0		
CYP3A4 (rs2242480)	GG	91	2.750	0.252
	GA	32		
	AA	0		
SLCO1B1 (T521C)	TT	76	0.711	0.700
	TC	43		
	CC	9		

Распределение аллелей и генотипов в группе ишемического инсульта, получающих тикагрелор, соответствовало закону Харди-Вайнберга за исключением следующих маркеров: PEAR1 (rs822442) и CES1 (rs2244613).

3.3.5. Поиск новых фармакогенетических маркеров развития кровотечений при совместном применении клопидогрела и ривароксабана с применением экзоного секвенирования у пациентов с геморрагическими осложнениями

В группе пациентов с ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий с геморрагическими осложнениями (2-3 тип кровотечений по шкале BARC n=12), которые были секвенированы по перспективным генам-кандидатам (5 генов: гены, которые могут привести к изменению кинетики клопидогрела - ABCB1, ABCG2, CES1, CYP3A4, и динамики клопидогрела - P2RY12), значимые отклонения по сравнению с популяционными частотами показали 10 вариантов нуклеотидной последовательности: 1 в гене ABCG2, 8 в гене CES1 и 1 в гене P2Y12 (Таблица 28).

Таблица 28 - Фармакогенетические биомаркеры развития кровотечений (2-3 тип кровотечений по шкале BARC) при совместном применении клопидогрела и ривароксабана у пациентов с ОКС в сочетании с ФП по данным секвенирования нового поколения

Ген	РА	АА	Тип замены	Rs	Частота в настоящей выборке	Частота в GnomAD
CES1	C	T	Э, Н	rs3826192	0,916	0,320
CES1	T	C	Э, Н	rs3826193	0,833	0,246
CES1	G	A	Э, С	rs3826191	0,916	0,329
CES1	A	G	И	rs62028646	0,9167	0,4055
CES1	G	A	Э, Н	rs62028647	0,916	0,41
CES1	T	C	Э, С	rs74019278	0,916	0,417
CES1	T	C	Э, С	rs76828834	0,916	0,418
ABCG2	A	G	И	rs2231157	0,75	0,335
P2RY12	G	A	Э, Н	rs6785930	0,666	0,276
Примечание: РА – референсная аллель, АА – альтернативная аллель, Э – экзонная, С – синонимичная, Н -несинонимичная, И – интронная						

Среди найденных значимых замен на экзонную область приходится: 3 несинонимичные (rs3826193, rs3826192, rs62028647) и 3 синонимичные (rs3826191, rs74019278, rs76828834) по гену CES1 и 1 синонимичная rs6785930 по гену P2Y12. Вариант, показавший значимое отклонение от популяционных частот в гене ABCG2 (rs2231148) находится в интронной области. Среди найденных замен, клиническое значение с изменением активности кодируемого белка могут иметь экзонные несинонимичные. В ранее проведенных исследованиях взаимосвязь с риском кровотечений у пациентов с ОКС и фибрилляцией предсердий данных замен не описана. Реальная прогностическая значимость (повышение риска кровотечений или протективная роль) найденных аллельных вариантов в будущих исследованиях будет уточнена на большей выборке пациентов со сравнением

полученных данных с пациентами аналогичных клинических групп без кровотечений.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ РОЛИ ФАРМАКОЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ И ФАРМАКОМЕТАБОЛОМНЫХ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРОВ P2Y12- РЕЦЕПТОРОВ

4.1. Оценка возможности фармакоэпигенетических биомаркеров прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y12 рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

Выбор микроРНК для оценки возможности фармакогенетических биомаркеров прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y12-рецепторов основан на кандидатном подходе с учетом данных экспериментальных исследований на тканях печени по оценке влияния различных микроРНК на экспрессию соответствующих генов ADME для ингибиторов P2Y12-рецепторов клопидогрела и тикагрелора (Таблица 29) [144-154].

Таблица 29 – МикроРНК, регулирующее экспрессию соответствующего генов ADME для ингибиторов P2Y12-рецепторов отобранные по данным экспериментальных исследований на тканях печени [144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154]

Ген	МикроРНК, регулирующее экспрессию соответствующего гена
ABCB1	микроРНК-34a
SLCO1B1	микроРНК-142-3p, микроРНК-150, микроРНК-223, микроРНК-34a
CYP2C19	микроРНК-142-3p, микроРНК-29a
CYP3A4/5	микроРНК-34a
CYP2B6	микроРНК-142-3p, микроРНК-223

Помимо генов ADME-системы, микроРНК могут так же оказывать влияние на экспрессию генов, кодирующих различные рецепторы и структуры тромбоцитов и, соответственно, оказывать влияние на эффективность и безопасность терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов клопидогрелом и тикагрелором. МикроРНК отобранные в исследовании по данному принципу представлены в Таблице 30.

Таблица 30 - МикроРНК, регулирующее экспрессию различных мишеней в структуре тромбоцитов, отобранные по данным экспериментальных исследований [144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154]

МикроРНК	Функция
микроРНК-223	Регулирует экспрессию гена P2Y ₁₂ , кодирующего АДФ-рецепторы тромбоцитов
микроРНК-150	Модулятор продукции и активации тромбоцитов
микроРНК-126	Регулирует экспрессию гена P2Y ₁₂ , кодирующего АДФ-рецепторы тромбоцитов, может управлять процессом генерации тромбина тромбоцитами

Оценка взаимосвязи уровня циркулирующих в плазме микроРНК miR-126, miR-150, miR-223, miR-142, miR-34a, miR-29a-3p с антиагрегантным действием тикагрелора.

Из изучаемых микроРНК прямую корреляцию средней силы с активностью тромбоцитов у больных с ОКС на фоне приема тикагрелора (n=35) продемонстрировали miR-126 ($r=0,541$, $p<0,001$) и miR-223 ($r=0,543$, $p<0,001$) (Рисунок 20, 21).

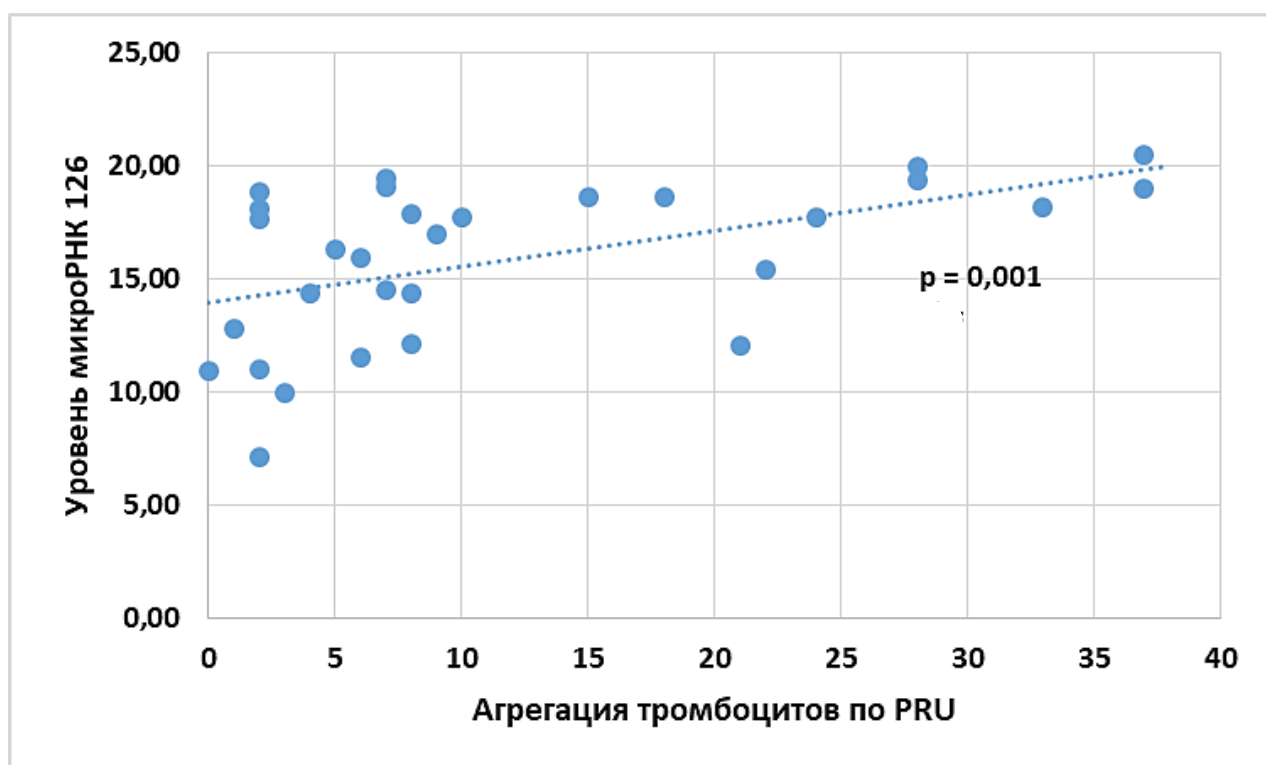


Рисунок 20 - Корреляция между уровнем микроРНК-126 и активностью тромбоцитов у больных с ОКС на фоне тикагрелора

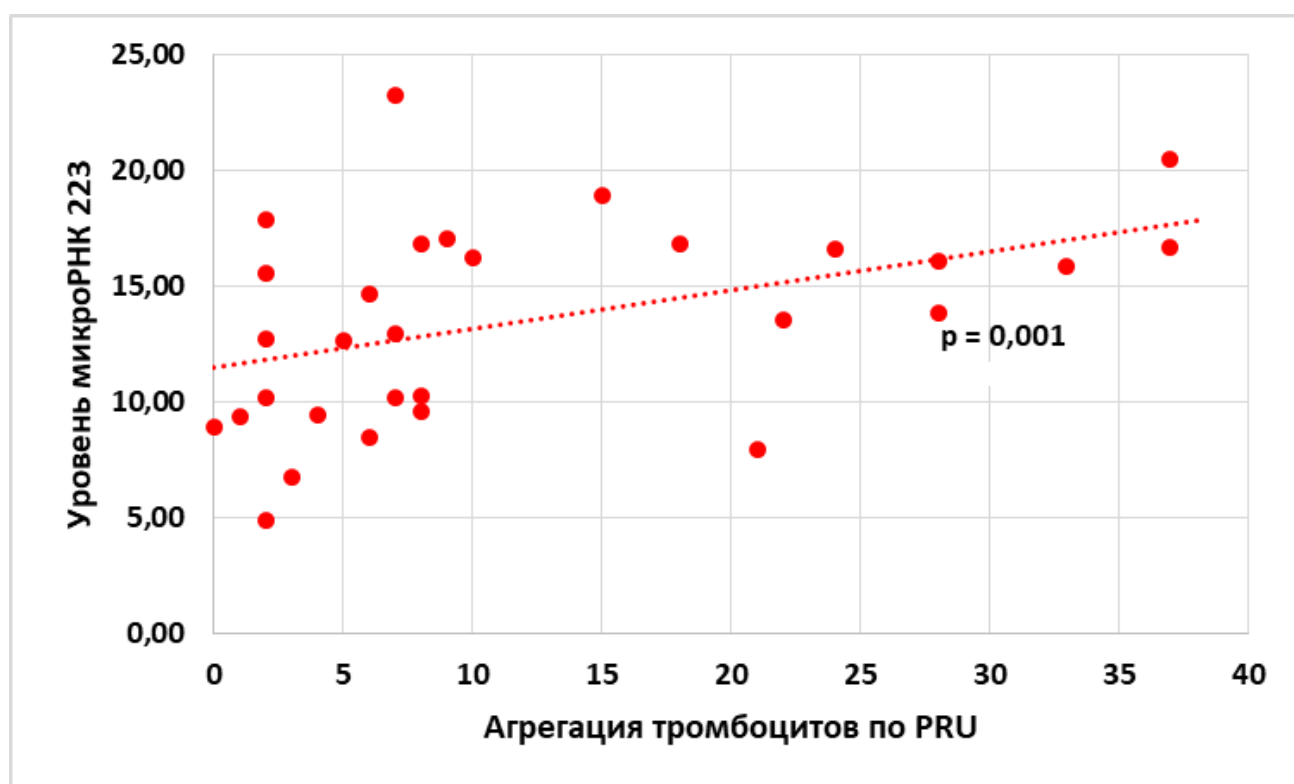


Рисунок 21 - Корреляция между уровнем микроРНК-223 и активностью тромбоцитов у больных с ОКС на фоне тикагрелора

Ранее в экспериментальных исследованиях (Таблица 8) показано, что микроРНК-223 модулирует уровень экспрессии P2Y₁₂-рецепторов на поверхности тромбоцитов, а микроРНК-126 - модулирует тромбоцит-опосредованную генерацию тромбина [157]. Соответственно, микро-РНК-223 и микроРНК-126 за счет регуляции экспрессии рецептора P2Y₁₂ и регуляции генерации тромбина, могут влиять на антиагрегантный эффект тикагрелора и выступать перспективным маркером персонализации терапии данным ингибитором P2Y₁₂-рецепторов.

При дополнительном анализе из изучаемых микроРНК обратную корреляцию средней и слабой силы с концентрацией тикагрелора и его метаболита у больных с ОКС (n=35) продемонстрировали микроРНК-29а ($r = - 0,520$) и микроРНК-150 ($r = -0,432$), соответственно (Рисунки 22, 23).

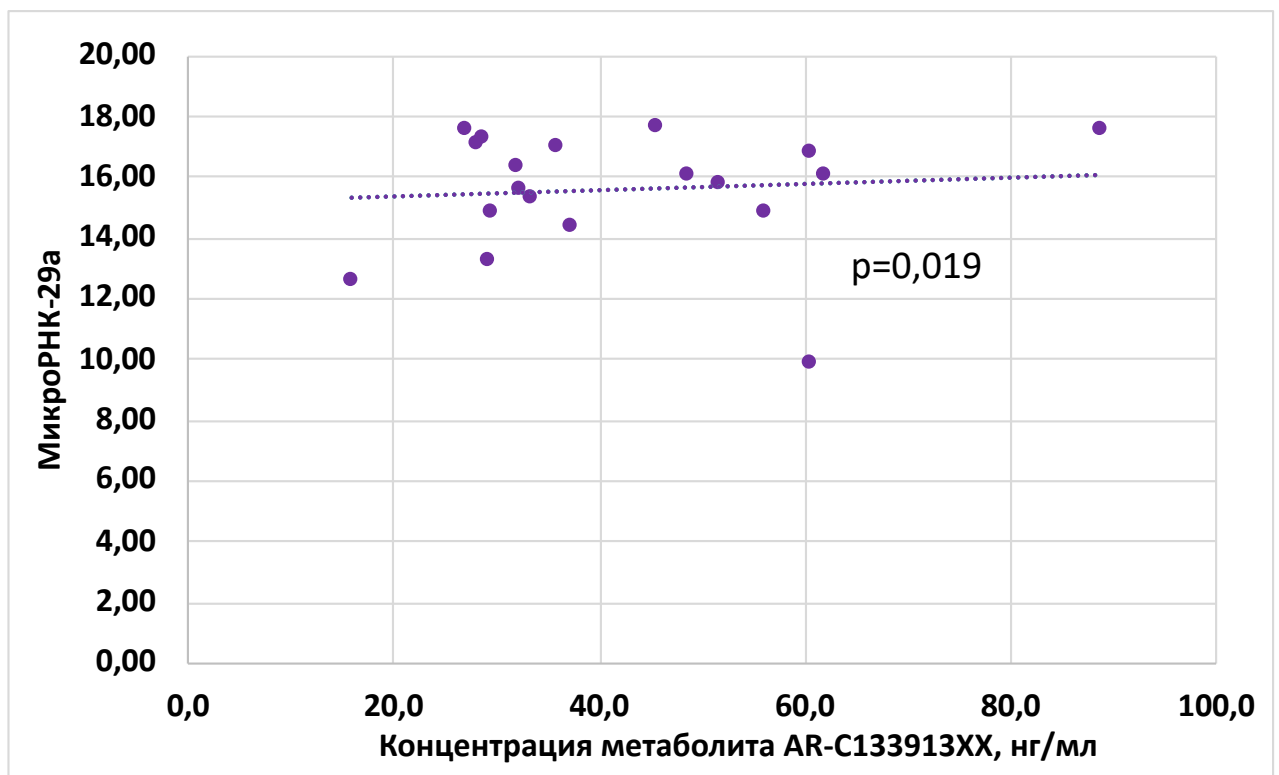


Рисунок 22 - Корреляция между уровнем микроРНК-29а и концентрацией метаболита тикагрелора у больных с ОКС на фоне тикагрелора

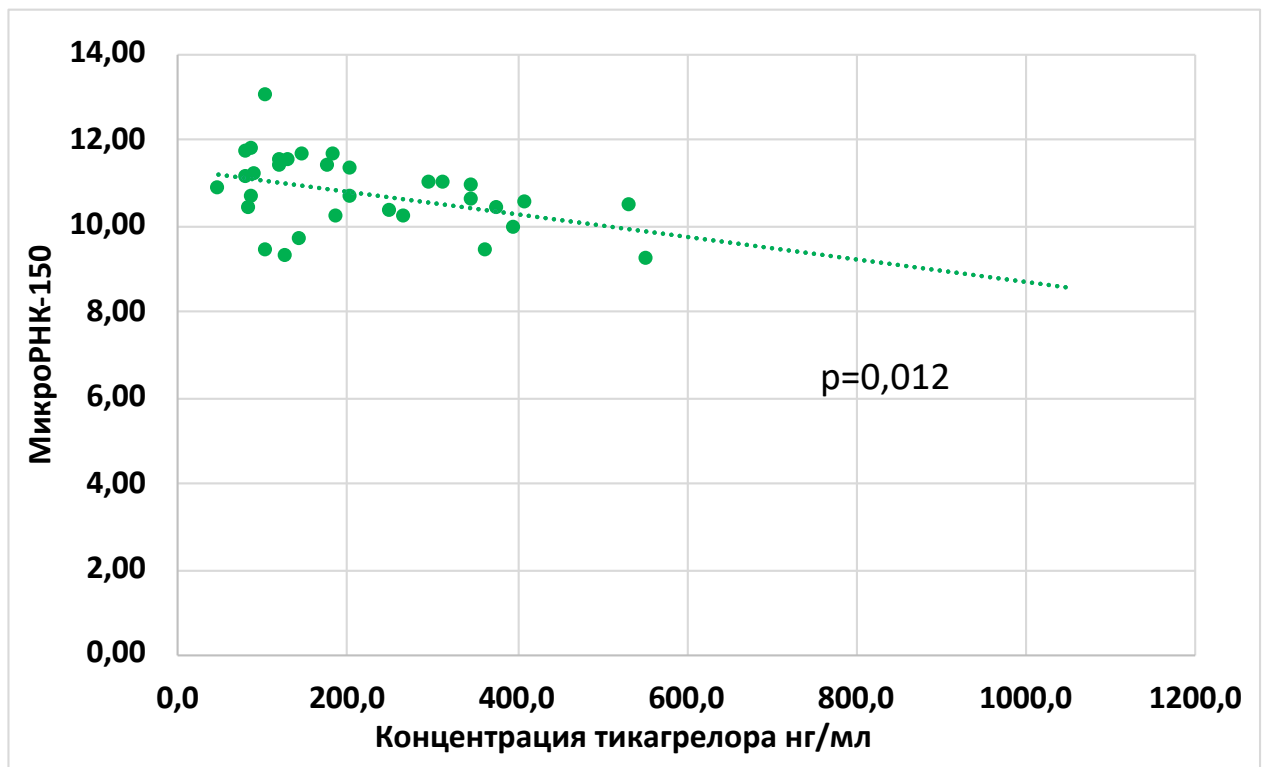


Рисунок 23 - Корреляция между уровнем микроРНК-150 и концентрацией тикагрелора у больных с ОКС

Ранее в экспериментальных исследованиях (Таблица 8) показано, что микроРНК-29а модулирует уровень экспрессии изофермента CYP2C19 и транспортера SLC16A1 клетках печени [157]. Таким образом, микроРНК-29а счет регуляции экспрессии транспортеров семейства SLC может влиять на антиагрегантный эффект тикагрелора и выступать перспективным эпигенетическим маркером персонализации терапии данным ингибитором P2Y12-рецепторов.

Для оценки прогностической роли изучаемых микроРНК был проведен регрессионный анализ (Таблица 31). Зависимая переменная: PRU – показатель уровня активности тромбоцитов. Предикторы: микроРНК-34а, микроРНК-150, микроРНК-142, микроРНК-29а-3р, микроРНК-223, микроРНК-126.

Таблица 31 – МикроРНК значимо прогнозирующие уровень остаточной реактивности тромбоцитов на фоне терапии тикагрелором

Ковариаты	Нестандартизованные коэффициенты		р	95,0% доверительный интервал	
				Нижняя граница	Верхняя граница
	В	Стд. Ошибка			
микроРНК -142	-1,508	0,733	0,050	-3,017	0,002
микроРНК -150	-13,450	6,140	0,038	-26,095	-0,804

По результатам регрессионного анализа микроРНК-150 и микроРНК-142 оказались независимыми предикторами в группе ОКС (n=34), что подтверждает перспективность дальнейшего изучения микроРНК-150 и микроРНК-142 в качестве перспективных для внедрения в клиническую практику биомаркеров,

В отличие от тикагрелора, микроРНК miR-126, miR-150, miR-223, miR-142, miR-34a, miR-29a-3p не показали какой-либо значимой взаимосвязи с антиагрегантным действием клопидогрела в группе ОКС (n=34). Оценка микроРНК в группе ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий и группе ишемического инсульта в текущем исследовании не проводилась.

3.6. Оценка возможности фармакометаболических биомаркеров прогнозировать индивидуальный фармакологический ответ при применении ингибиторов P2Y₁₂ рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

Минимальная равновесная концентрация тикагрелора и метаболита была измерена среди 128 пациентов с ОКС (Таблица 32). Минимальная равновесная концентрация клопидогрела была измерена среди 34 пациентов с ОКС (Таблица 32). Показатели активности активности CYP3A4/5 - метаболическое отношение 6-бета-гидрокортизол/кортизол среди пациентов с ОКС на фоне терапии клопидогрелом и тикагрелором составили $2,9 \pm 2,3$ и $2,3 \pm 1,6$ нг/мл и соответственно.

Таблица 32 - Фармакокинетические показатели ингибиторов P2Y₁₂ рецепторов у пациентов с ОКС и ОКС с ФП

Фармакокинетические показатели	Среднее (M)	Стандартное отклонение (SD)
Концентрация тикагрелора в плазме, нг/мл	517,47	523,48
Концентрация метаболита в плазме AR-C133913XX, нг/мл	70,96	42,64
Концентрация клопидогрела в плазме, нг/мл	1,776	1,1

При оценке ассоциаций исследуемых фармакометаболических биомаркеров (минимальной равновесной концентрации тикагрелора и клопидогрела, уровня активности CYP3A4/5 по метаболическому отношению 6-бета-гидрокортизол/кортизол) с уровнем активности тромбоцитов - значимой взаимосвязи не обнаружено. Значимые корреляции были продемонстрированы только в дополнительном анализе для уровней микроРНК-29а и микроРНК-150 с показателями агрегации тромбоцитов (результаты представлены в разделе описания результатов оценки микроРНК). Кроме того, для клопидогрела значимые корреляции были продемонстрированы с фармакогенетическими маркерами: у пациентов с концентрацией клопидогрела ниже порога определения 0,05 нг/мл гораздо реже встречались генотипы GA+AA P2Y₁₂ (rs2046934), чем нормальный генотип GG (29,3% vs 4%, $p=0,009$), что скорее является случайной ассоциацией, так как ген P2Y₁₂, кодирует рецептор P2Y₁₂ и не влияет на фармакокинетические параметры. Дополнительно, отмечалась тенденция к более высокой частоте носительства генотипов СТ+ТТ по CYP2C19*17, кодирующих изофермент CYP2C19 с повышенной активностью и ассоциированных с риском кровотечений на фоне клопидогрела, среди пациентов с концентрацией клопидогрела ниже порога определения: 58,6% vs 37,5% ($p=0,053$). Данные результаты отчасти можно объяснить более интенсивным метаболизмом клопидогрела под влиянием изофермента CYP2C19 при носительстве аллельного варианта CYP2C19*17. В исследовании активности системы изоферментов CYP3A4/3A5 у больных с ОКС

на клопидогреле была установлена значимая слабая обратная корреляция с уровнем микроРНК-142 ($r = -0,361$, $p = 0,04$), что соответствует данными литературы (Рисунок 24).

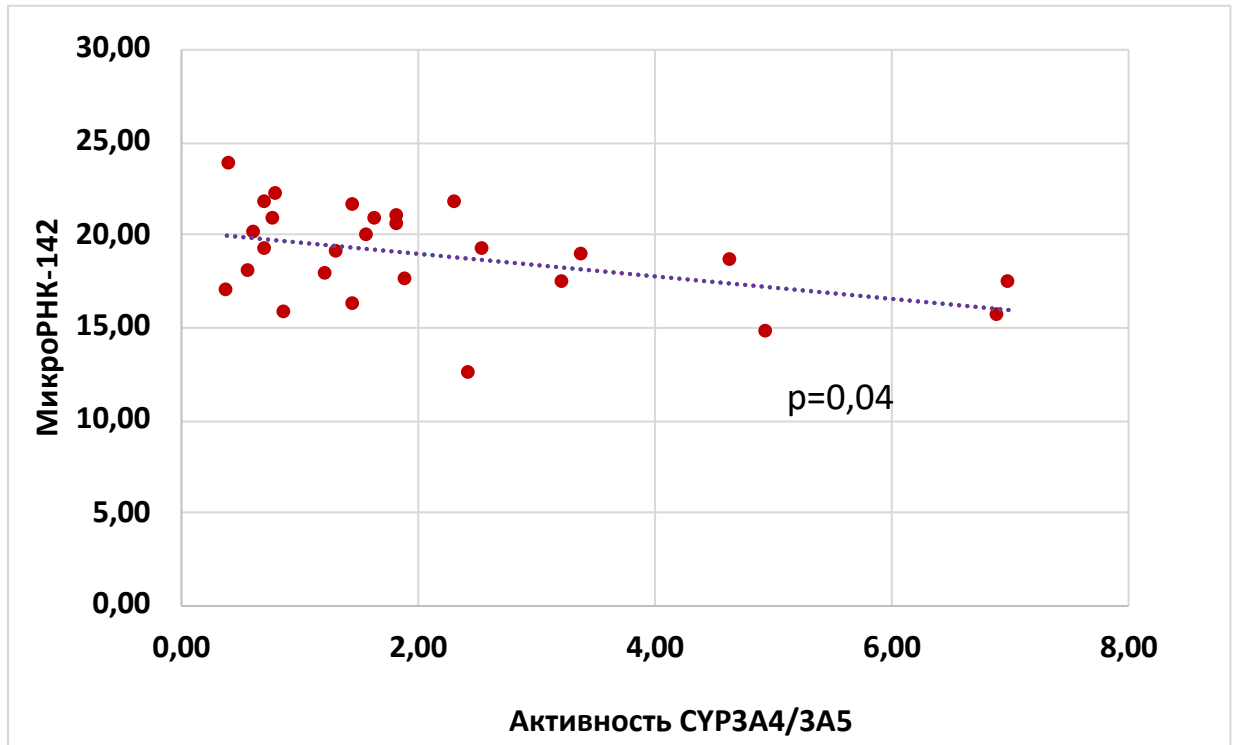


Рисунок 24 – Корреляция между уровнем микроРНК-142 и активностью системы изоферментов CYP3A4/3A5 у больных с ОКС на фоне приема клопидогрела

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ПОПУЛЯЦИОННО-ЭТНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1. Здоровые добровольцы, включенные в популяционно-этническое исследование

В популяционно-этническое исследование отобранных клинически значимых фармакогенетических маркеров ответа на P2Y₁₂-рецепторы (ABCB1, CES1, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A5, SLCO1B1) включено 2 406 условно здоровых добровольцев старше 18 лет (min - 18, max - 72), проживающих в нескольких многонациональных регионах РФ (Таблица 33): Северный Кавказ, Поволжье, Дальний Восток, Прибайкалье. Выбор указанных биомаркеров связан с важной ролью полиморфизма генов ABCB1, CES1, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A5, SLCO1B1 в нарушении антиагрегантного действия клопидогрела и/или тикагрелора через влияние на фармакокинетику или фармакодинамику указанных блокаторов P2Y₁₂-рецепторов, а так же выраженными межэтническими различиями носительства согласно ведущему ресурсу по фармакогенетическим исследованиям - PharmGkb [249].

Таблица 33 - Участники популяционно-этнического исследования и регион набора материала

Этническая группа	N	Места преимущественного проживания, где проводился набор биоматериала
Аварцы	118	Республика Дагестан
Даргинцы	121	Республика Дагестан
Лакцы	116	Республика Дагестан
Кумыки	127	Республика Дагестан
Лезгины	123	Республика Дагестан

Продолжение Таблицы 33

Этническая группа	N	Места преимущественного проживания, где проводился набор биоматериала
Кабардинцы	204	Республика Кабардино-Балкария
Балкарцы	200	Республика Кабардино-Балкария
Осетины	239	Республика Северная Осетия
Марийцы	206	Чувашская республика
Мордовцы	204	Республика Мордовия
Татары	141	Чувашская Татарстан
Чуваши	238	Чувашская республика
Буряты	114	Иркутская область, Республика Бурятия
Русские	134	Иркутская область
Нанайцы	115	Хабаровский край

Возрастно-половые характеристики исследуемых этнических групп:

- 200 балкарцев, средний возраст $46,6 \pm 18,7$ года, из них 93 (46,5%) мужчины и 107 (53,5%) женщин;
- 204 кабардинца, средний возраст $47,3 \pm 17,8$ года, из них 88 (43,1%) мужчин и 116 (56,9%) женщин;
- 114 бурят, средний возраст $42,8 \pm 15,4$ года, из них 34 (29,8%) мужчины и 80 (70,2%) женщин;
- 206 марийцев, средний возраст $43,8 \pm 14,8$ года, из них 35 (17,0%) мужчин и 171 (83,0%) женщина;
- 238 чувашей, средний возраст $39,5 \pm 12,3$ года, из них 34 (14,3%) мужчины и 204 (85,7%) женщины;
- 115 нанайцев, средний возраст $43,5 \pm 12,7$ года, из них 14 (20,0%) мужчин и 56 (80,0%) женщин;
- 141 татарин, средний возраст $47,9 \pm 13,9$ года, из них 29 (20,6%) мужчин и 112 (79,4%) женщин;

- 239 осетин, средний возраст $28,0 \pm 11,7$ года, из них 66 (27,6%) мужчин и 173 (72,4%) женщины;
- 118 аварцев, средний возраст $34,8 \pm 12,8$ года, из них 67 (56,7%) мужчин и 51 (43,2%) женщина;
- 121 даргинец, средний возраст $28,5 \pm 9,3$ года, из них 42 (34,7%) мужчины и 79 (65,2%) женщины;
- 127 кумыков, средний возраст $36,5 \pm 5,4$ года, из них 25 (19,6%) мужчин и 102 (80,3%) женщин;
- 116 лакцев, средний возраст $24,1 \pm 17,9$ года, из них 73 (62,9%) мужчин и 43 (79,4%) женщин;
- 123 лезгина, средний возраст $31,0 \pm 14,7$ года, из них 66 (27,6%) мужчин и 173 (37,06%) женщины;
- 204 мордвина, средний возраст $46,0 \pm 12,9$ года, из них 110 (53,9%) мужчин и 94 (46,07%) женщины;
- 134 русских, средний возраст $42,2 \pm 12,0$ года, из них 26 (19,4%) мужчин и 110 (80,6%) женщин.

5.2. Изучение частоты носительства клинически значимых фармакогенетических маркеров, ассоциированных с индивидуальными особенностями фармакологического ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов, в различных этнических группах Российской Федерации (мультиэтнический фармакогенетический анализ)

Выбор генов-кандидатов для популяционно-этнической части исследования по аналогии с клинической частью основан на ген-кандидат подходе с учетом особенностей фармакокинетики и фармакодинамики клопидогрела и тикагрелора (Таблица 34). Всего было проанализировано 10 клинически значимых маркеров по 7 генам-кандидатам среди 14 этнических групп Российской Федерации (Северный Кавказ, Поволжье, Дальний Восток, Прибайкалье).

Таблица 34 - Гены-кандидаты для популяционно-этнической части исследования, которые могут играть важную роль в прогнозировании ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов

Препарат	Фармакокинетические гены-кандидаты	Фармакодинамические гены-кандидаты
Клопидогрел	ABCB1, CES1, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A5	CYP4F2
Тикагрелор	CYP3A5, SLCO1B1	CYP4F2

Распределение частоты носительства клинически значимых фармакогенетических маркеров, ассоциированных с индивидуальными особенностями фармакологического ответа на ингибиторы P2Y₁₂ рецепторов в различных этнических группах Российской Федерации представлено на рисунках 25-35. Анализ трендов распространенности данных аллельных вариантов позволит спрогнозировать большую подверженность к риску резистентности к ингибиторам P2Y₁₂-рецепторов и нежелательным лекарственным реакциям в определенных популяциях и разработать в дальнейшем персонализированные региональные алгоритмы антиагрегантной терапии сердечно-сосудистыми заболеваниями.

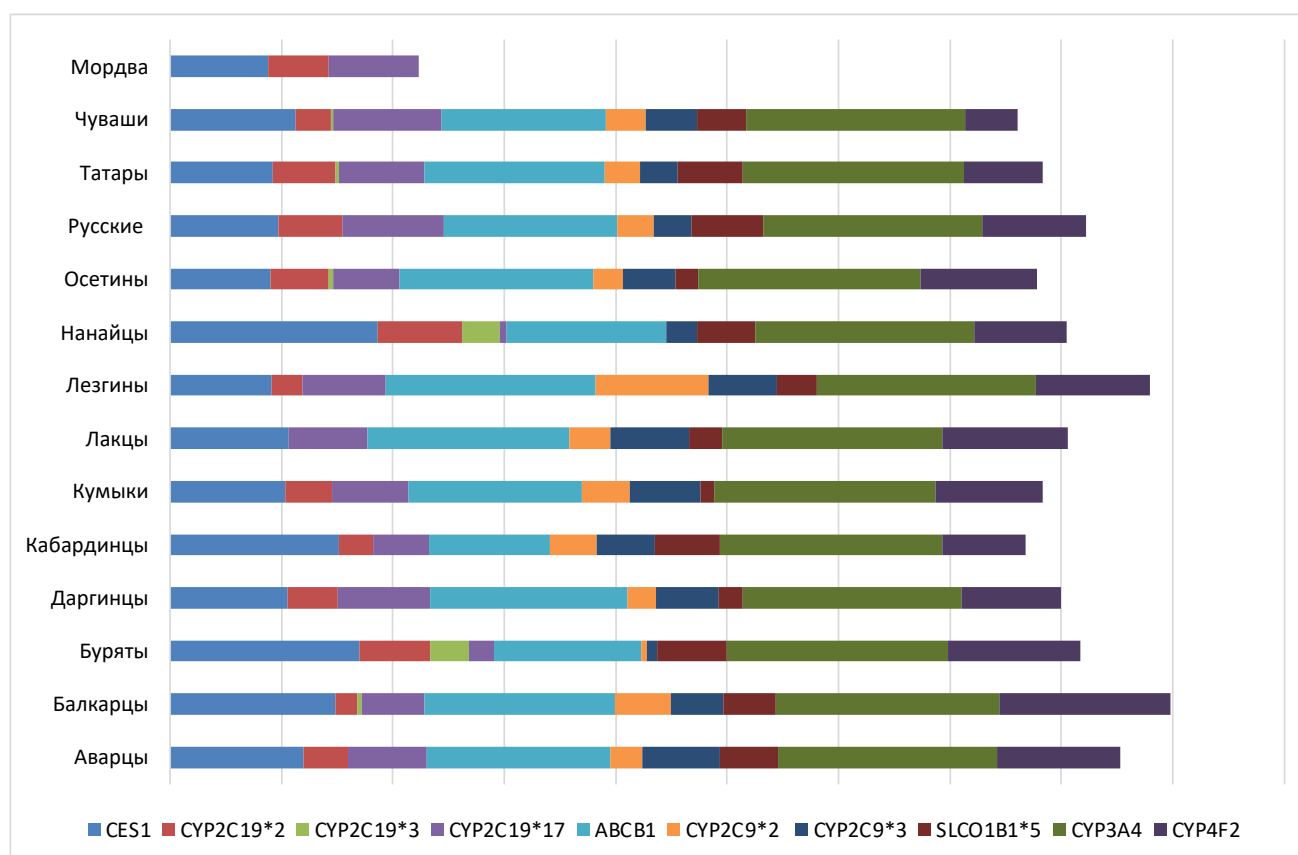


Рисунок – 25 Носительство клинически значимых минорных аллелей (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

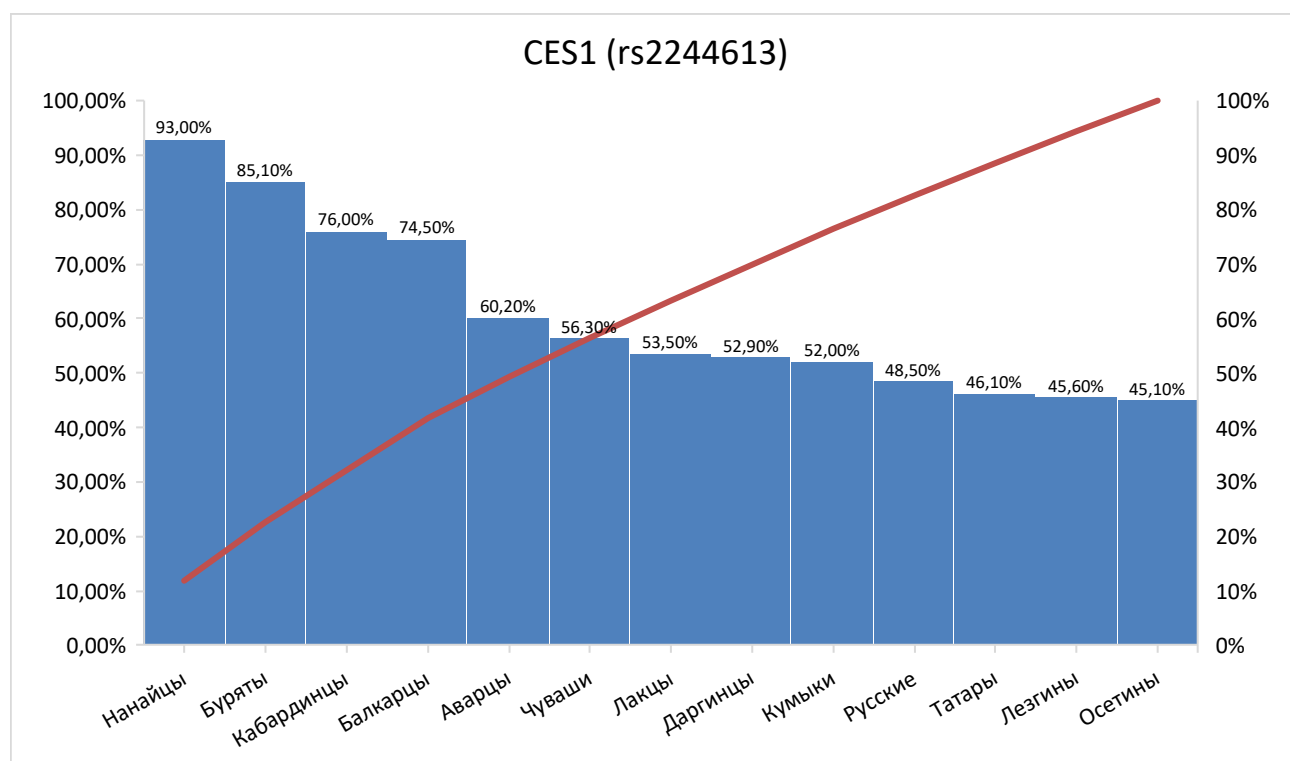


Рисунок 26 – Носительство проблемных генотипов по CES1 (rs2244613) (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

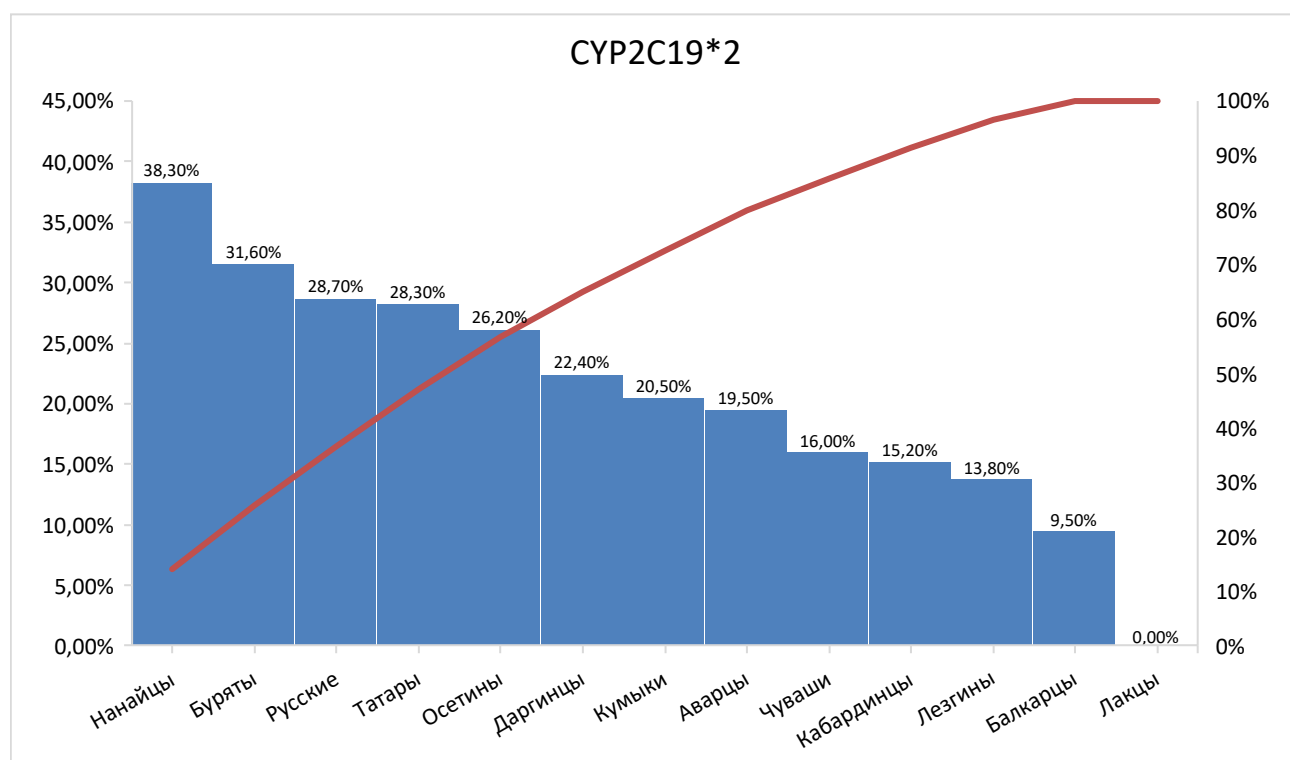


Рисунок 27– Носительство проблемных генотипов по CYP2C19*2 (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

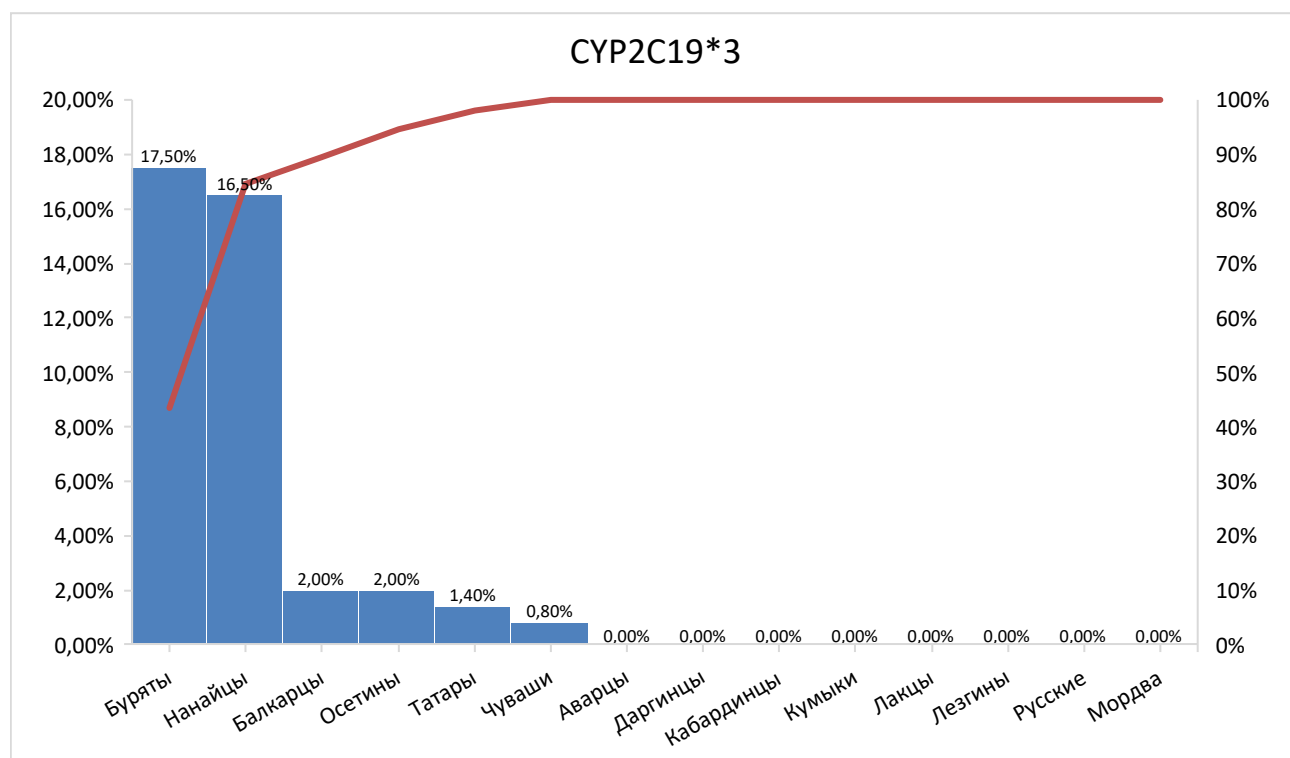


Рисунок 28 – Носительство проблемных генотипов по CYP2C19*3 (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

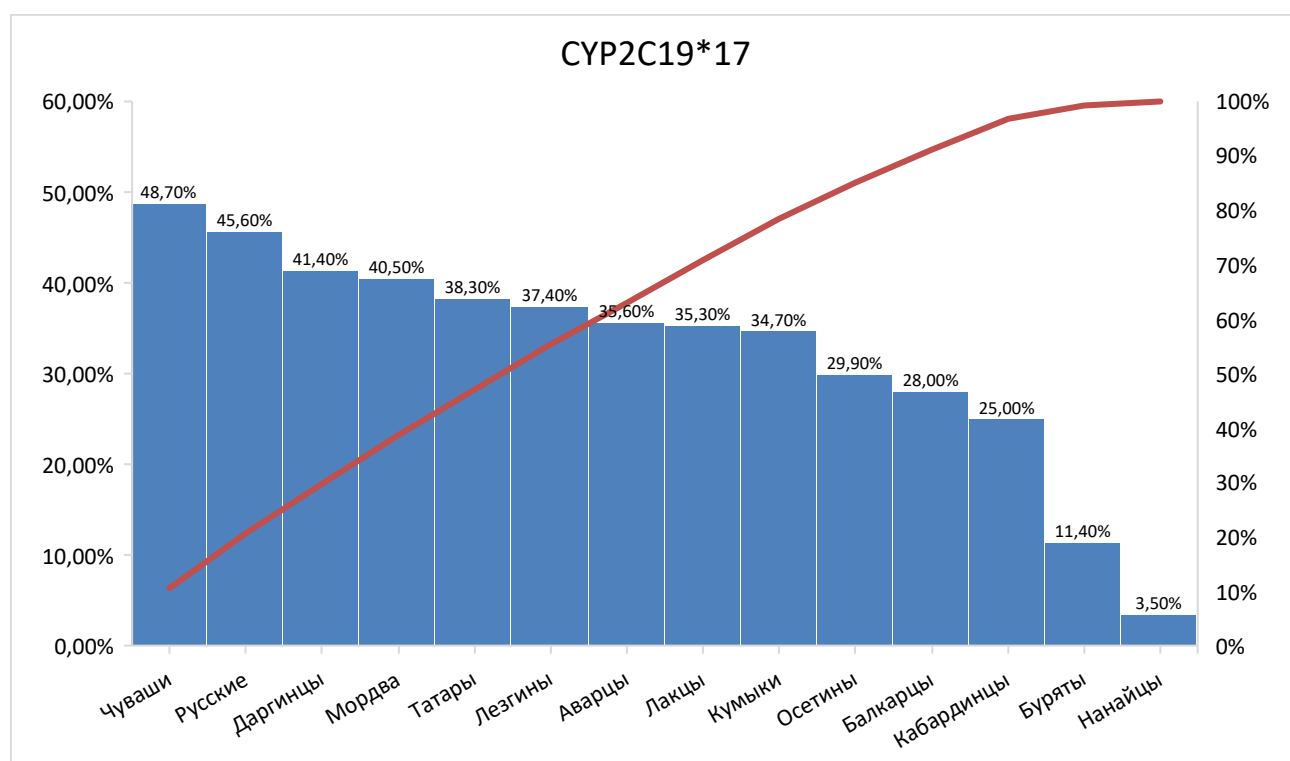


Рисунок 29 – Носительство проблемных генотипов по CYP2C19*17 (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

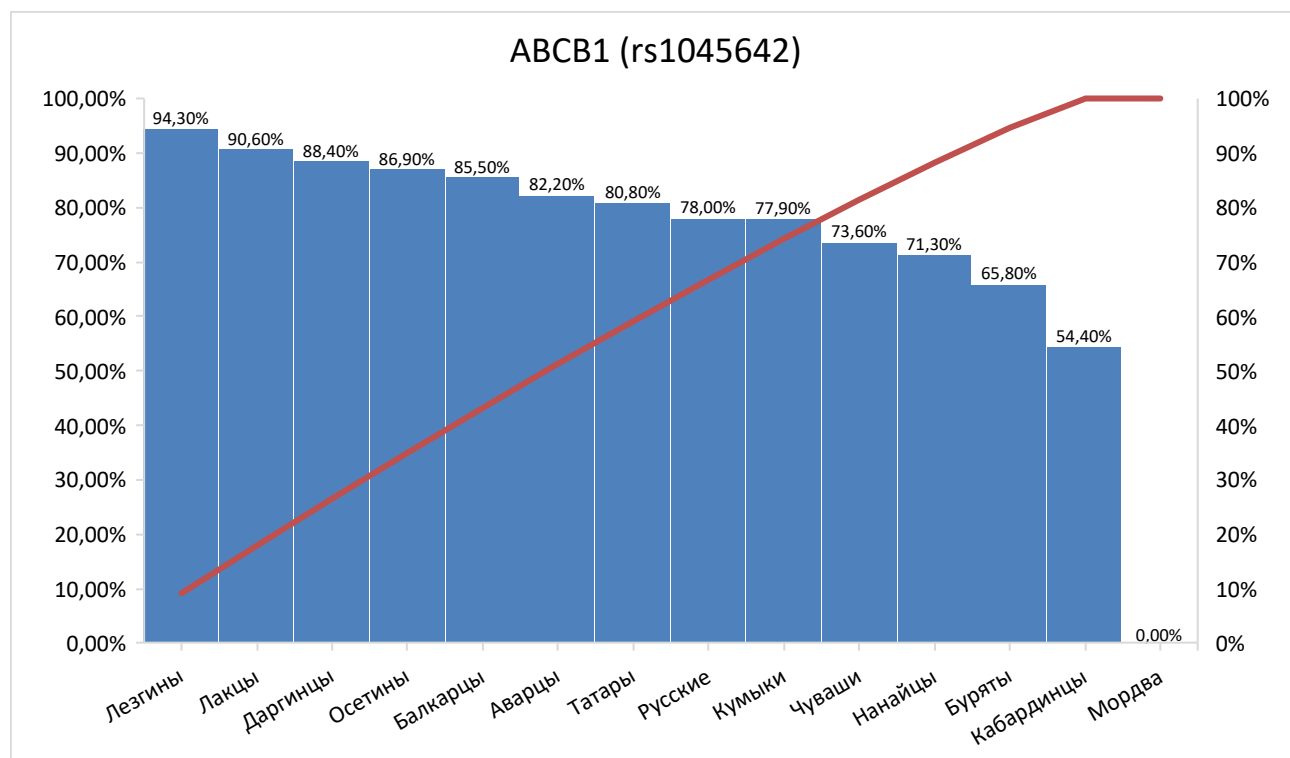


Рисунок 30 – Носительство проблемных генотипов по ABCB1 (rs1045642) (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

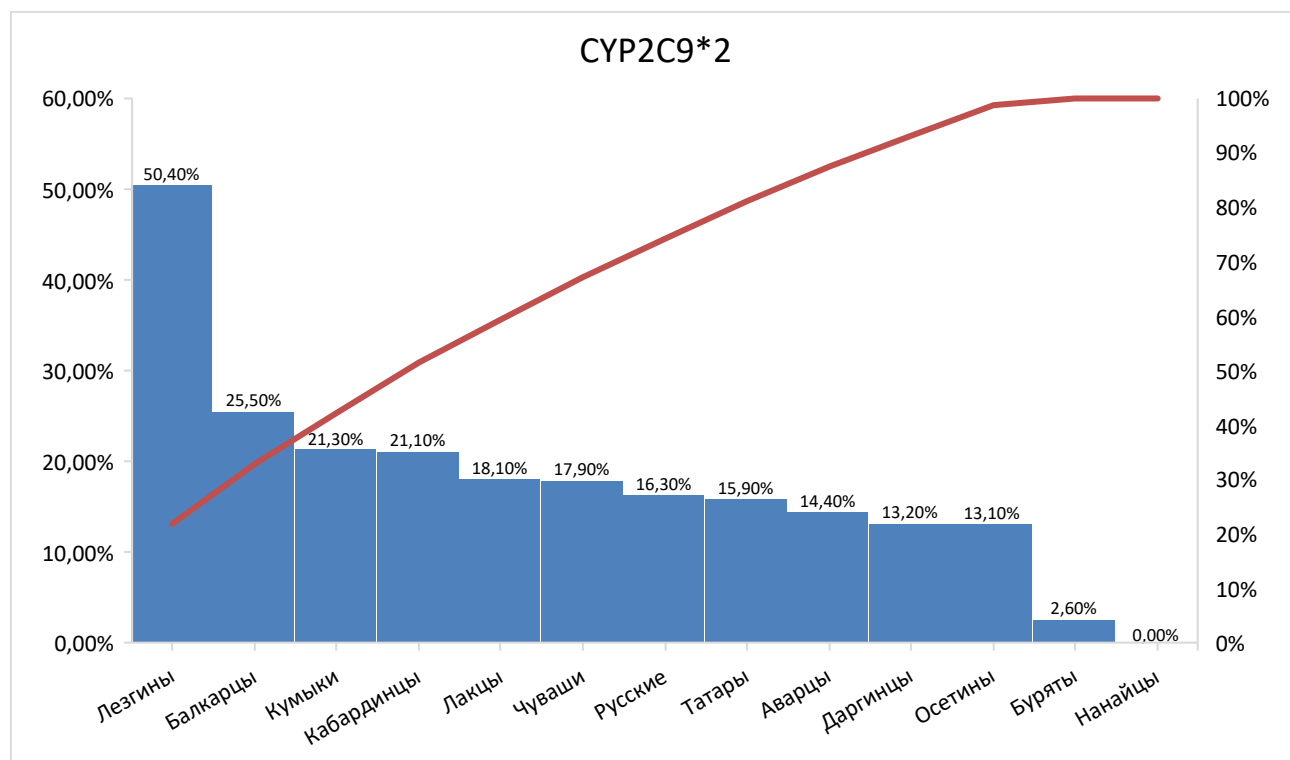


Рисунок 31 – Носительство проблемных генотипов по CYP2C9*2 (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

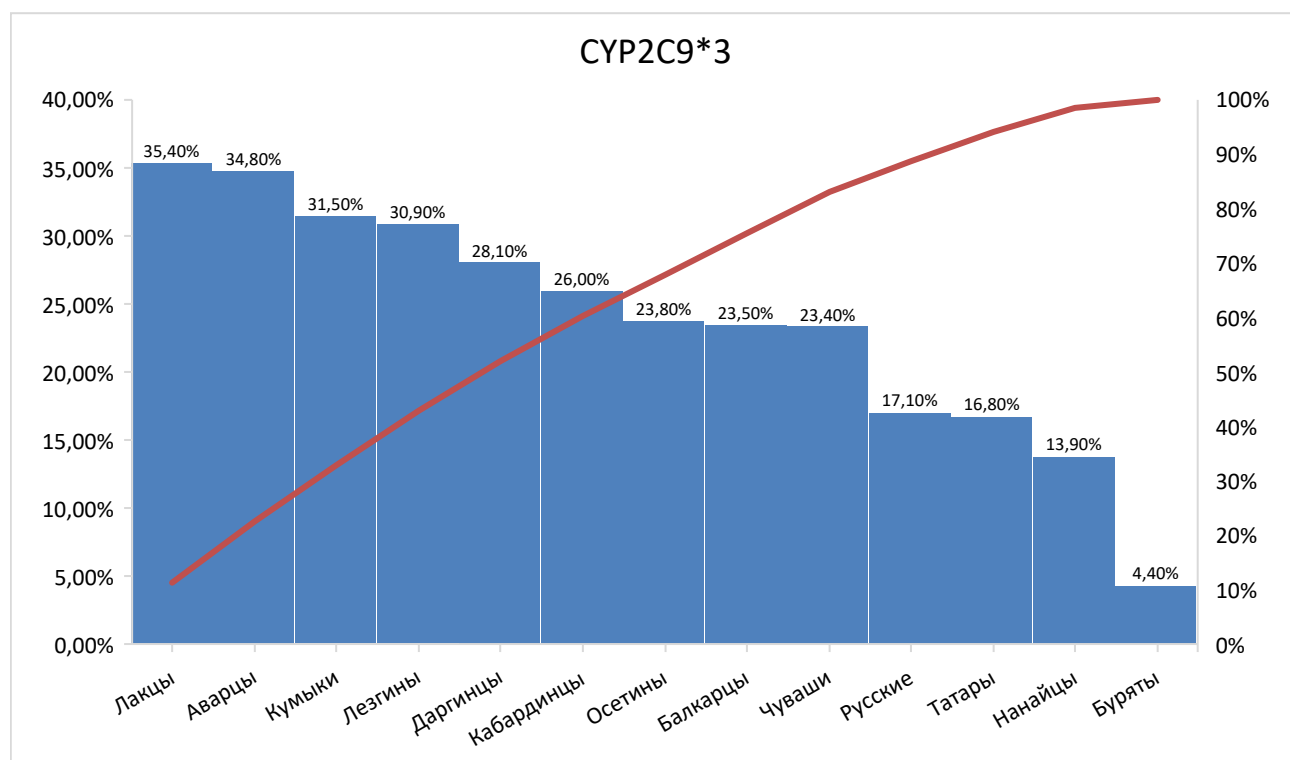


Рисунок 32 – Носительство проблемных генотипов по CYP2C9*3 (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

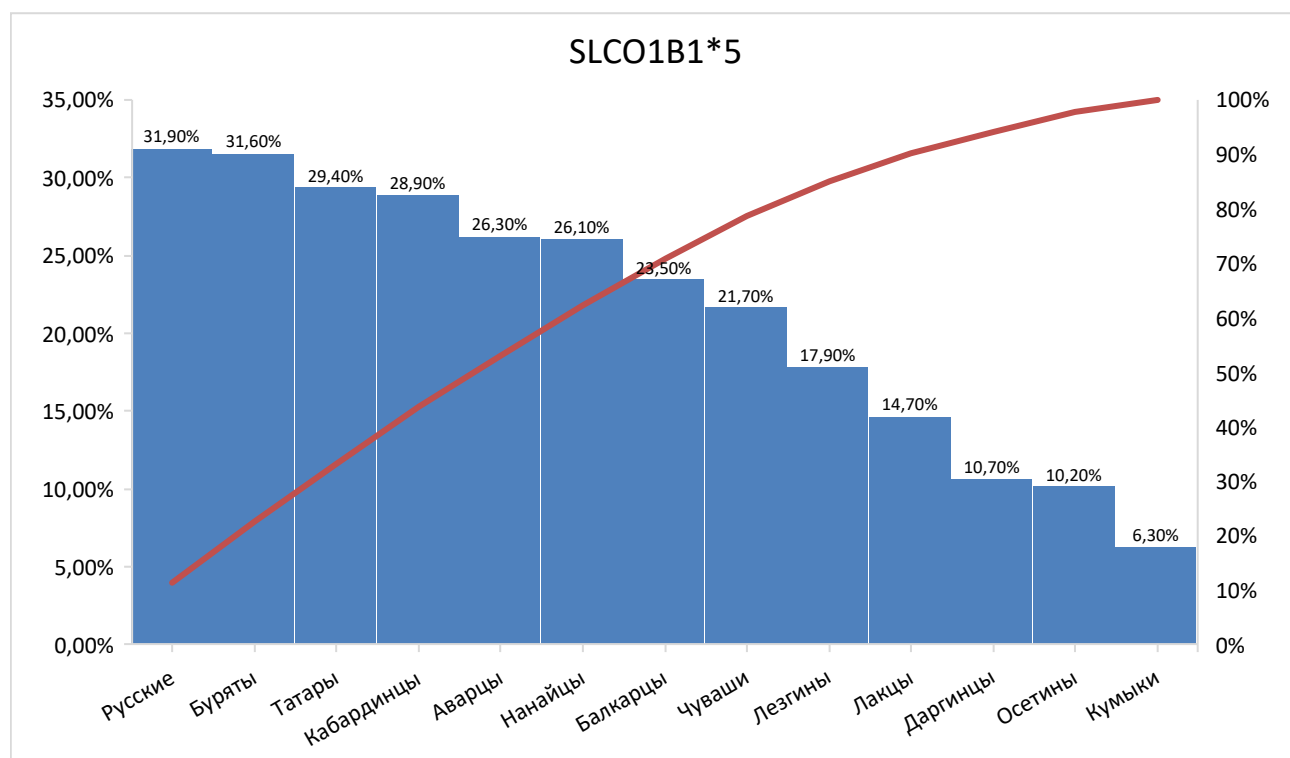


Рисунок 33 – Носительство проблемных генотипов по SLCO1B1*5 (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

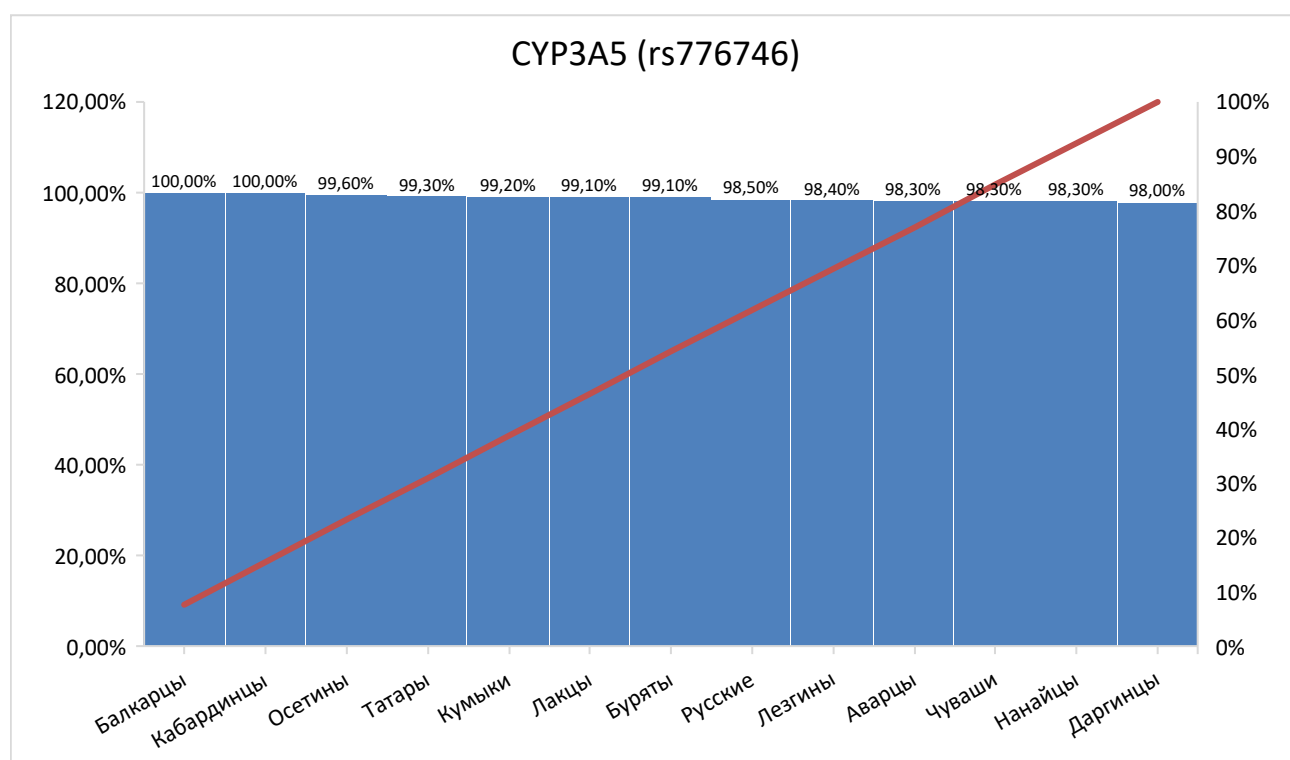


Рисунок 34 – Носительство проблемных генотипов по CYP3A5 (rs776746) (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

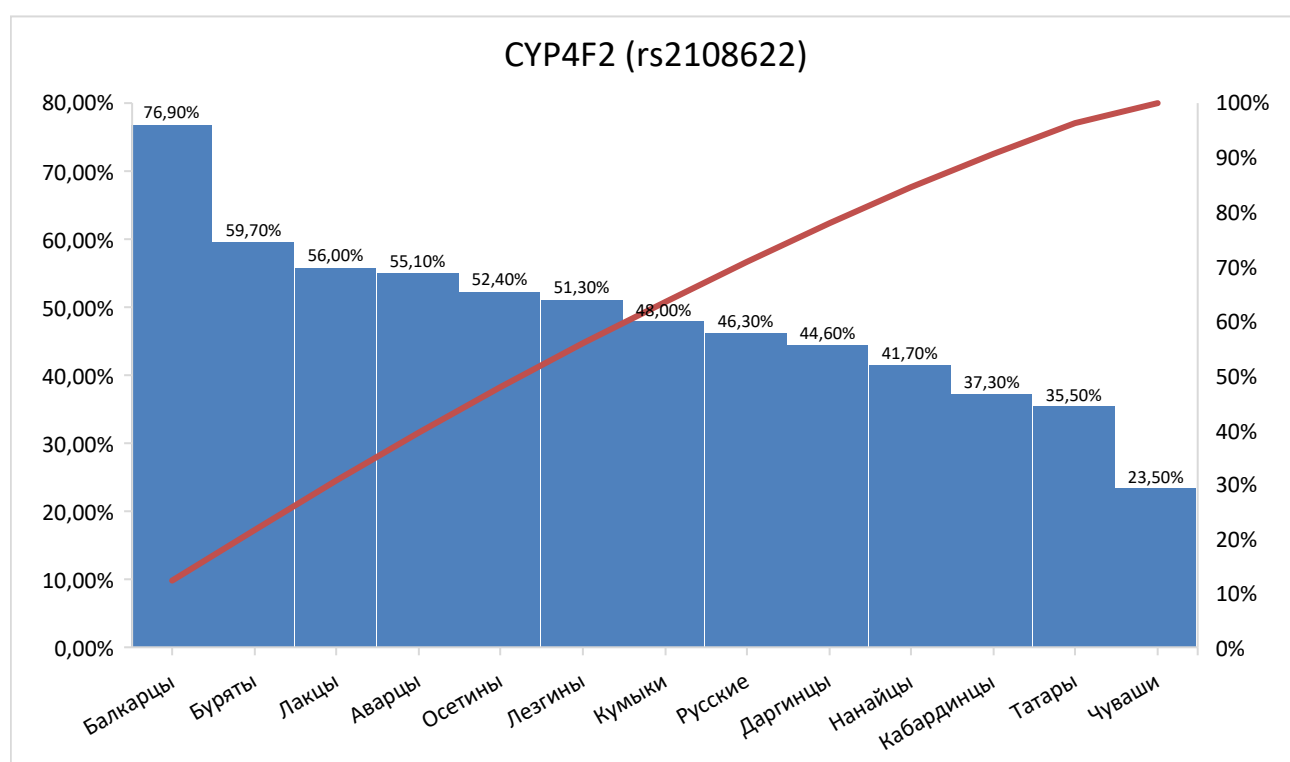


Рисунок 35 – Носительство проблемных генотипов по CYP4F2 (rs2108622) (гетерозигота + гомозигота по минорной аллели) среди этнических групп Российской Федерации

Анализ диаграмм распределения частот клинически значимых аллелей ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP2C19 (rs4244285, rs4986893, rs12248560), CES1 (rs2244613), CYP4F2 (rs2108622), демонстрирует, что носительство маркеров, ассоциированных с резистентностью к клопидогрелу и тикагрелору – неоднородно, а поправка на множественные сравнения стирает большинство значимых различий частоты аллелей. В тоже время частота аллельных вариантов ассоциированных с резистентностью к клопидогрелу CYP2C19 (rs4244285, rs4986893), CES1 (rs2244613), CYP4F2 (rs2108622) демонстрирует тренд к большей распространенности среди представителей монголоидной расы нанайцы, буряты. А частота аллельных вариантов, ассоциированных с чрезмерным ответом на клопидогрел CYP2C19 (rs12248560), наоборот демонстрирует тренд к большей распространенности среди представителей европеоидной расы - русские, народы Северного Кавказа. Для выявления основного паттерна распространенности конкретных аллелей в дальнейших исследованиях требуется построение геногеографических карт, что позволит выявить популяционно-этнические особенности чувствительности к ингибиторам P2Y₁₂ рецепторов в различных этнических группах Российской Федерации.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ПЕРСОНАЛИЗАЦИИ ОТВЕТА НА ИНГИБИТОРЫ P2Y₁₂-РЕЦЕПТОРОВ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

6.1. Результаты регрессионного анализа по выявлению значимых факторов прогнозирования ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов

В результате проведенного логистического регрессионного анализа были установлены значимые факторы прогнозирования реактивности тромбоцитов для: группы ОКС клопидогрел – не выявлено; ОКС тикагрелор – прием БКК (ОШ=0,184 (95%ДИ 0,044-0,779) $p=0,021$), уровень гемоглобина (ОШ=0,930 (95%ДИ 0,883-0,980) $p=0,06$); группы ОКС + ФП - нет; группы ишемического инсульта – СКФ (ОШ=1,56 (95%ДИ 1,03-2,3) $p=0,035$) на 7 день, возраст (ОШ=0,929 (95%ДИ 0,879-0,982) $p=0,009$), СКФ (ОШ=6,6 (95% ДИ 1,06-41,2) $p=0,042$) и прием БАБ (ОШ=0,384 (95%ДИ 0,160-0,924) $p=0,035$) на 13 день.

В результате проведенного линейного регрессионного анализа были установлены значимые факторы прогнозирования реактивности тромбоцитов для: группа ОКС клопидогрел - PEAR1 (rs41273215) (Бета = -0,417, $p=0,034$); группа ОКС тикагрелор – уровень гемоглобина (Бета = - 0,358, $p=0,0001$), прием БКК (Бета = 0.284, $p=0,003$) носительство CYP3A4 (rs2242480) (Бета = 0,193, $p=0,034$); группа ОКС + ФП – нет, группа ишемического инсульта – носительство P2Y₁₂ (rs2046934) (Бета = 0,242, $p=0,008$) на 7 и 13 день, возраст (Бета = 0,197, $p=0,031$) на 13 день. Для группы ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий регрессионный анализ не показал значимых предикторов.

6.2. Результаты биоинформатического анализа по выявлению значимых факторов прогнозирования ответа на ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов

По результатам биоинформатического анализа в группе ОКС в сочетании с ФП с элементами машинного обучения с высокой достоверностью удалось предсказать лишь общую смертность, а так же попадание в определенный диапазон уровня агрегации тромбоцитов (Рисунок 36, 37). Другие исходы не удалось

достоверно предсказать в связи с малым числом исходов по каждому событию. Наиболее значимыми факторами для предикции общей смертности оказались: СКФ, возраст, гемоглобин, процент ингибирования тромбоцитов и балы по шкалам SYNTAX и CRUSADE.

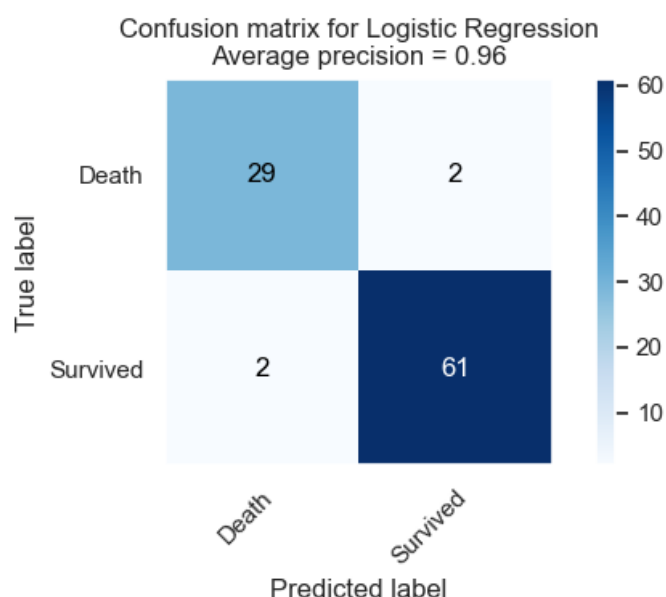


Рисунок 36 – Результаты прогнозирования смертности от всех причин в группе ОКС с ФП

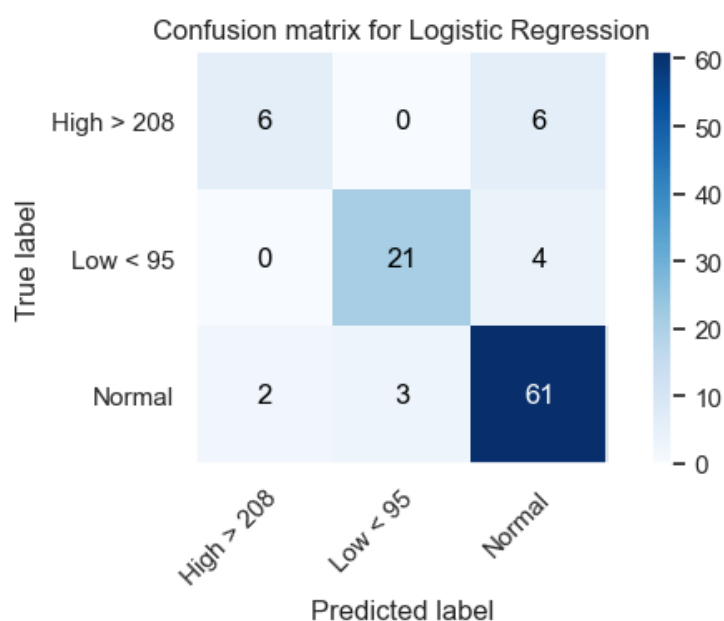


Рисунок 37 – Результаты прогнозирования смертности в группе ОКС с ФП

В подгруппе пациентов ОКС, получающих тикагрелор, с помощью Пуассоновской регрессии с корректировками, была выведена итоговая модель уравнения, для предикции уровня активности тромбоцитов:

$$\begin{aligned} \ln \mu_i = & -1.22X_1 - 0.82X_2 - 1.32X_3 - 1.53X_4 + 9.95X_5 - 1.8X_6 + 3.09X_7 \\ & - 17.22X_8 - 21.45X_9 - 0.85X_{10} + 0.3X_{11} - 0.59X_{12} - 0.84X_{13} \\ & + 0.46X_{14} + 5.78X_{15} - 3.9X_{16} + 1.88X_{17} - 1.2X_{18} + 0.88X_{19} + 1.43X_{20} \\ & - 1.6X_{21} - 27.17X_{22} + 3.26X_{23} - 5.24X_{24} + 7.39X_{25} - 26.22X_{26} \\ & - 1.88X_{27} + 2.22X_{28} + 3.15X_{29} + 0.41X_{30} - 2.74X_{31} - 1.46X_{32} \\ & - 1.29X_{33} + 1.22X_{34} + \varepsilon_i \end{aligned}$$

Точечная диаграмма для Пуассоновской регрессии представлена на рисунке 38.

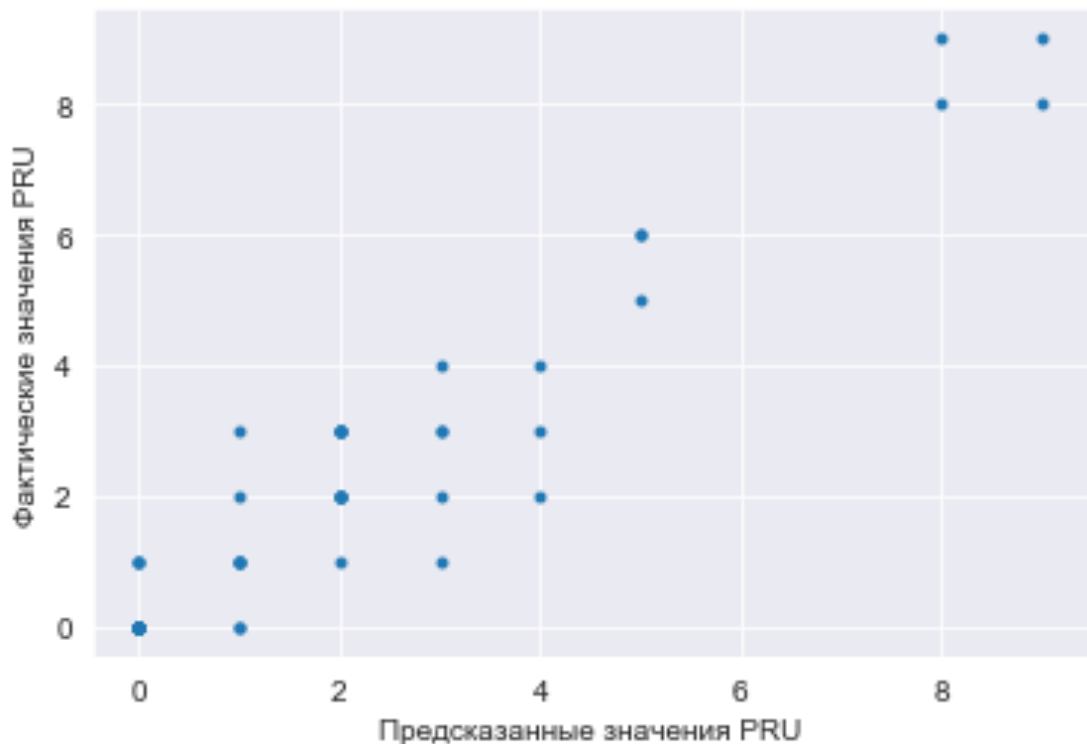


Рисунок 38 - Точечная диаграмма для Пуассоновской регрессии

Повышение PRU на фоне тикагрелора связано по результатам Пуассоновской регрессии с такими факторами, как: почечная недостаточность, общий уровень холестерина, количество тромбоцитов, количество повреждённых сосудов, статины, ингибиторы АПФ, полиморфизм гена CYP2C19*2, полиморфизм гена ABCB1*3435, полиморфизм гена PON1, полиморфизм CYP3A4*22,

полиморфизм гена IGTV3, полиморфизм гена P2Y12, концентрация тикагрелора и нестабильная стенокардия.

Снижением PRU на фоне тикагрелора связано по результатам Пуассоновской регрессии с такими факторами, как: принадлежность к возрасту, мужскому полу, курение, гиперлипидемия, уровень гемоглобина, поражение периферических артерий, гематокрит, уровень глюкозы в крови, принимает ли пациент бета-адреноблокаторы, принимает ли пациент ингибиторы рецепторов ангиотензина, полиморфизм гена SLCO1B1, полиморфизм гена CYP3A5, полиморфизм гена UGT2B7, полиморфизм гена PEAR1, концентрация тикагрелора относительно порогового значения, концентрация метаболита AR-C133913XX, был ли ранее у пациента инфаркт без NSTEMI.

6.3. Схема персонализации применения ингибиторов P2Y12-рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

По результатам проведенных исследований по оценке роли фармакогенетических, фармакоэпигенетических, фармакометаболических биомаркеров выявлены важные данные по дополнительным факторам риска резистентности к клопидогрелу и тикагрелору. В персонализации терапии на основе биомаркеров важную роль играет выделение показаний к тому или иному тесту с учетом экономических затрат. Соответственно при разработке схемы персонализации применения ингибитора P2Y12 - рецепторов выделяются показания к фармакогенетическому тестированию при наличии факторов риска вариабельности ответа на терапию клопидогрелом или тикагрелором.

Возможность адаптированного выбора ингибитора P2Y12 – рецепторов важна не только на начальном этапе, но так же важную роль может играть на этапе, когда нужна деэскалация терапии с тикагрелора или прасугрела на клопидогрел.

На Рисунке 39 изображена предлагаемая схема персонализации применения ингибиторов P2Y12 - рецепторов.

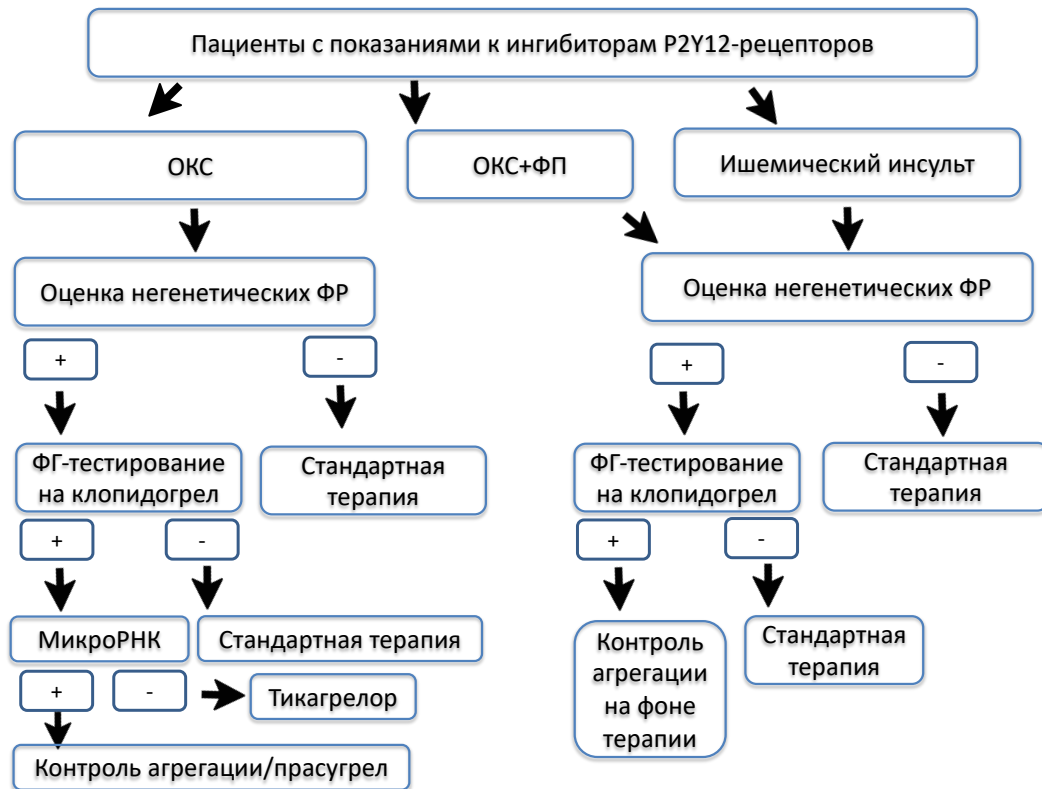


Рисунок 39 - Схема персонализации применения ингибиторов P2Y12-рецепторов при остром коронарном синдроме, сочетании острого коронарного синдрома с фибрилляцией предсердий, ишемическом инсульте

При наличии показаний к ингибиторам P2Y12 - рецепторов схема предполагает первым этапом оценку негенетических факторов риска резистентности к клопидогрелу как из текущего исследования, так и доказанные в предыдущих исследованиях: возраст, пол, наличие ХОБЛ, ХСН, СД, прием БКК, ИПП, диуретиков и др. При отсутствии факторов риска допускается назначение клопидогрела или тикагрелора в стандартной дозе. В случае наличия 2 и более факторов риска необходимо рассмотреть проведение фармакогенетического тестирования прежде всего по CYP2C19 (*2 (rs4244285), *17 (rs12248560)), P2Y12 (rs2046934). Если у пациента обнаружен 1 или более генетических факторов риска вариабельности антиагрегантного ответа на клопидогрел целесообразно выбрать другой ингибитор P2Y12 – рецепторов в стандартной дозе. В случае пациента с риском недостаточного или чрезмерного ответа на тикагрелор – рассмотреть возможность оценки уровня циркулирующих

микроРНК-126, 223, 150. При наличии фармакоэпигенетических факторов риска – мониторинг функции тромбоцитов может быть рассмотрен.

Приведенная схема персонализации имеет ограничения, например, отсутствие конкретной схемы персонализации в зависимости от уровня микроРНК, и требует усовершенствования и валидации в крупных проспективных исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование посвящено усовершенствованию лечения и разработке персонализированного подхода к выбору антиагрегантной терапии, обеспечивающего повышение эффективности и безопасности лечения у пациентов с острым коронарным синдромом, острым коронарным синдромом в сочетании с фибрилляцией предсердий и ишемическим инсультом. С учетом выраженной вариабельности ответа к ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов исследование вносит важный вклад в разработку подходов по прогнозированию эффективности и безопасности антиагрегантной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Клинико-лабораторная часть работы посвящена изучению вариабельности ответа и влияния фармакогенетических, фармакоэпигенетических, фармакометаболических биомаркеров на эффективность и безопасность терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов, с определением наиболее перспективных молекулярных биомаркеров для использования в схемах персонализированного подхода и прогнозирования эффективности антиагрегантной терапии острого коронарного синдрома, острого коронарного синдрома в сочетании с фибрилляцией предсердий, ишемического инсульта. Показатели вариабельности АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у пациентов ОКС и ОКС + ФП, как показано в исследовании, могут существенно различаться из-за дополнительного влияния антикоагулянтной терапии. В случае ОКС с ФП доля пациентов резистентных к клопидогрелу оказалась 2-3 раза ниже средних значений по данным литературы – 11,7%, что может стать одним из перспективных направлений для изучения способов преодоления резистентности к клопидогрелу у больных с ОКС. Показано так же, что в случае ОКС и ФП на первый план выходит высокая доля пациентов чрезмерным подавлением активности тромбоцитов – 24,3%. Доля пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов среди пациентов с ишемическим инсультом на фоне терапии клопидогрелом составила на 7 день - 30,3 % и на 13 день - 28,6%, что соответствует данным литературы составила почти около 1/3 пациентов. В текущем исследовании среди пациентов ОКС, получающих тикагрелор не выявлено пациентов с высокой остаточной

реактивностью тромбоцитов ($PRU > 208$), а число пациентов с низкой остаточной реактивностью тромбоцитов ($PRU < 95$) составило подавляющее большинство – 103 (97,1%) со средним значением $PRU - 19,7$. С учетом некорректности границ отсечения для тромботических и геморрагических осложнений предложены возможные границы «терапевтического окна» для тикагрелора - $PRU 5-47$, что коррелирует данными пилотных исследований других авторов [70].

При изучении влияния фармакогенетических особенностей выявлена важная роль полиморфизма генов *CYP2C19*, *PEAR1*, *PON1*, *CYP4F2*, *B4GALT2*, *P2Y12*. В группе ОКС-клопидогрел среди носителей аллели *CYP2C19*2*, отмечалась более высокая доля пациентов с недостаточным подавлением активности тромбоцитов (PRU более 208), по сравнению с носителями генотипа *CC* (40,0% vs 14,9%, ($p=0,011$)) и более низкий уровень процента адекватно ингибированных тромбоцитов (в %): $33,7 \pm 22$ vs $23,4 \pm 19,9$, $p = 0,037$. Среди носителей аллели *CYP2C19*17* отмечалась более высокая доля пациентов с чрезмерным подавлением активности тромбоцитов (PRU менее 95), по сравнению с носителями генотипа *CC*: 9,7% vs 31,4%, $p=0,005$. Среди носителей аллели *T* (генотипы *CT+TT*) по *PEAR1* (*rs41273215*) – выше доля пациентов с чрезмерным подавлением активности тромбоцитов (PRU менее 95), по сравнению с носителями генотипа *CC* (34,8% vs 100%, ($p=0,032$)). В группе ОКС с ФП у носителей *CYP2C19*17*, отмечались более высокие показатели ингибирования тромбоцитов ($37,8\% \pm 28,9$ по сравнению с $25,0\% \pm 25,9$; $p = 0,013$) и более низкие значения PRU ($121,4 \pm 63,5$ против $147,1 \pm 59,0$; $p = 0,044$). *CYP2C19*17* статистически значимо ассоциирован так же с риском общегоспитальной смертности (0% в среди *CC* против 6,7 % среди *CT+TT*; $p = 0,046$) и сердечно-сосудистой смертью (0% против 8,9%; $p = 0,021$). Пациенты с генотипами *CT+TT* по полиморфному маркеру *CYP4F2* (*rs2108622*) в данной группе, были статистически значимо ассоциированы с большей частотой значимых кровотечений: 3,5 % против 20,9 % ($p=0,006$). У пациентов с генотипами *CT+TT* по *PEAR1* (*rs41273215*) была в 3 раза выше частота значимых кровотечений: 23,8% против 7,6% ($p=0,035$). Среди пациентов с ишемическим инсультом - носителей генотипа *GA+AA* по *P2Y12* (*rs2046934*) значимо чаще на 13

день терапии резистентность к клопидогрелу (снижение максимальной агрегации после начала лечения менее 10%), по сравнению с носителями генотипов GG: 45,8 % vs 23,7 %, $p=0,031$.

Впервые на основе методов секвенирования нового поколения выделены генетические биомаркеры, оценка которых на практике позволит не только спрогнозировать риск кровотечений и в соответствии с этим индивидуально подойти к выбору ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов, но также способствовать улучшению клинических исходов лечения и качества жизни пациентов. Среди найденных значимых замен на экзонную область приходится: 3 несинонимичные (rs3826193, rs3826192, rs62028647) и 3 синонимичные (rs3826191, rs74019278, rs76828834) по гену CES1 и 1 синонимичная rs6785930 по гену P2Y₁₂. В ранее проведенных исследованиях взаимосвязь с риском кровотечений у пациентов с ОКС и фибрилляцией предсердий данных замен не описана.

Популяционно-этническая часть работы посвящена оценке распространенности клинически значимых фармакогенетических биомаркеров среди этнических групп Российской Федерации, для определения приоритетности внедрения фармакогенетического тестирования, обеспечивающего повышение эффективности и безопасности терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с острым коронарным синдромом, острым коронарным синдромом в сочетании с фибрилляцией предсердий и ишемическим инсультом. В данной части исследований были определены частоты распределения 10 клинически значимых маркеров по 7 генам-кандидатам среди 14 этнических групп Российской Федерации (Северный Кавказ, Поволжье, Дальний Восток, Прибайкалье). Анализ диаграмм распределения частот клинически значимых аллелей генов ABCB1, CES1, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A5, SLCO1B1 демонстрирует, что носительство маркеров, ассоциированных с резистентностью к клопидогрелу и тикагрелору – неоднородно, а поправка на множественные сравнения стирает большинство значимых различий частоты аллелей. Для выявления основного паттерна распространенности конкретных аллелей в дальнейших исследованиях требуется построение геногеографических карт.

При изучении влияния фармакоэпигенетических особенностей выявлена прямая корреляция средней силы микроРНК-126 ($r=0,541$, $p<0,001$) и микроРНК - 223 ($r=0,543$, $p<0,001$) с активностью тромбоцитов у больных с ОКС на фоне приема тикагрелора. Обратную корреляцию средней и слабой силы с концентрацией тикагрелора и его метаболита у больных с ОКС продемонстрировали микроРНК-29а ($r = - 0,520$) и микроРНК-150 ($r = -0,432$). По результатам регрессионного анализа микроРНК-150 и микроРНК-142 оказались независимыми предикторами в группе ОКС ($n=34$), что подтверждает перспективность дальнейшего изучения микроРНК-150 и микроРНК-142 в качестве перспективных для внедрения в клиническую практику биомаркеров,

При изучении влияния фармакоэпигенетических особенностей выявлена фармакометаболических биомаркеров (минимальной равновесной концентрации тикагрелора и клопидогрела, уровня активности CYP3A4/5 по метаболическому отношению 6-бета-гидроксикортизол/кортизол) с уровнем активности тромбоцитов - значимой взаимосвязи не обнаружено. Значимые корреляции были продемонстрированы только в дополнительном анализе для уровней микроРНК-29а и микроРНК-150 с показателями агрегации тромбоцитов, а так же концентрации клопидогрела с фармакогенетическими маркерами: у пациентов с концентрацией клопидогрела ниже порога определения 0,05 нг/мл гораздо реже встречались генотипы GA+AA P2Y12 (rs2046934), по сравнению с нормальным генотипом (29,3% vs 4%, $p=0,009$). В исследовании активности системы изоферментов CYP3A4/3A5 у больных с ОКС на клопидогреле была установлена значимая слабая обратная корреляция с уровнем микроРНК-142 ($r = - 0,361$, $p=0,04$), что соответствует данными литературы.

В результате проведенного логистического регрессионного анализа были установлены значимые факторы прогнозирования повышенной реактивности тромбоцитов для группы ОКС тикагрелор – прием БКК (ОШ=0,184 (95%ДИ 0,044-0,779) $p=0,021$), уровень гемоглобина (ОШ=0,930 (95%ДИ 0,883-0,980) $p=0,06$); группы ишемического инсульта – СКФ (ОШ=1,56 (95%ДИ 1,03-2,3) $p=0,035$) на 7 день, возраст (ОШ=0,929 (95%ДИ 0,879-0,982) $p=0,009$), СКФ (ОШ=6,6 (95% ДИ

1,06-41,2) $p=0,042$) и прием БАБ (ОШ=0,384 (95%ДИ 0,160-0,924) $p=0,035$) на 13 день. В результате проведенного линейного регрессионного анализа были установлены значимые факторы прогнозирования повышенной реактивности тромбоцитов для: группа ОКС клопидогрел - PEAR1 (rs41273215) (Бета = -0,417, $p=0,034$); группа ОКС тикагрелор – уровень гемоглобина (Бета = - 0,358, $p=0,0001$), прием БКК (Бета = 0.284, $p=0,003$) носительство CYP3A4 (rs2242480) (Бета = 0,193, $p=0,034$); группа ОКС + ФП – нет, группа ишемического инсульта – носительство P2Y12 (rs2046934) (Бета = 0,242, $p=0,008$) на 7 и 13 день, возраст (Бета = 0,197, $p=0,031$) на 13 день. Для группы ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий регрессионный анализ не показал значимых предикторов.

Биоинформатическая часть работы посвящена прогнозированию фармакологического ответа на ингибиторы P2Y12-рецепторов методами машинного обучения и разработке схем персонализации, обеспечивающих повышение эффективности и безопасности антиагрегантной терапии у пациентов с острым коронарным синдромом, острым коронарным синдромом в сочетании с фибрилляцией предсердий и ишемическим инсультом. По результатам биоинформатического анализа в группе ОКС в сочетании с ФП с элементами машинного обучения с высокой достоверностью удалось предсказать общую смертность, а также попадание в определенный диапазон уровня агрегации тромбоцитов. Наиболее значимыми факторами для предикции общей смертности оказались: СКФ, возраст, гемоглобин, процент ингибирования тромбоцитов и балы по шкалам SYNTAX и CRUSADE. В подгруппе пациентов ОКС, получающих тикагрелор, с помощью Пуассоновской регрессии с корректировками, была выведена итоговая модель уравнения, для предикции уровня активности тромбоцитов:

$$\begin{aligned} \ln \mu_i = & -1.22X_1 - 0.82X_2 - 1.32X_3 - 1.53X_4 + 9.95X_5 - 1.8X_6 + 3.09X_7 \\ & - 17.22X_8 - 21.45X_9 - 0.85X_{10} + 0.3X_{11} - 0.59X_{12} - 0.84X_{13} \\ & + 0.46X_{14} + 5.78X_{15} - 3.9X_{16} + 1.88X_{17} - 1.2X_{18} + 0.88X_{19} + 1.43X_{20} \\ & - 1.6X_{21} - 27.17X_{22} + 3.26X_{23} - 5.24X_{24} + 7.39X_{25} - 26.22X_{26} \\ & - 1.88X_{27} + 2.22X_{28} + 3.15X_{29} + 0.41X_{30} - 2.74X_{31} - 1.46X_{32} \\ & - 1.29X_{33} + 1.22X_{34} + \varepsilon_i \end{aligned}$$

По результатам проведенных исследований по оценке роли фармакогенетических, фармакоэпигенетических, фармакометаболических биомаркеров предложена следующая схема персонализации применения ингибиторов P2Y₁₂ - рецепторов. Схема предполагает оценку негенетических факторов риска резистентности к клопидогрелу с выявлением показаний к фармакогенетическому тестированию и оценке уровня микроРНК, выбором ингибитора P2Y₁₂ - рецепторов с учетом фармакогенетических особенностей, а так же условиями требующими контроль функциональной активности тромбоцитов.

Таким образом, в исследовании сформулирована концепция персонализированного подхода к проведению антиагрегантной терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с сердечно-сосудистой патологией и предложена персонализированная схема выбора ингибитора P2Y₁₂-рецепторов, в основе которой лежит использование оптимального комплекса молекулярных (фармакогенетических, фармакоэпигенетических, фармакометаболических) биомаркеров). В данной работе впервые проведен комплексный анализ влияния фармакогенетических, фармакоэпигенетических, фармакометаболических биомаркеров на эффективность и безопасность терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов. На основе статистического анализа полученных данных выделены наиболее перспективные молекулярные биомаркеры для использования в схемах персонализированного подхода к антиагрегантной терапии и предложены схемы персонализации терапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов, что может повысить эффективность антиагрегантной терапии и улучшить клинические исходы лечения. На основе биоинформатического анализа влияния исследуемых молекулярных биомаркеров на антиагрегантную терапию ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов, выведено уравнение прогнозирования ответа на тикагрелор у пациентов с острым коронарным синдромом, что позволяет предсказывать возможную неэффективность терапии или геморрагические осложнения. Требуется проведение дальнейших исследований на большей выборке пациентов для

уточнения прогностической роли выявленных биомаркеров [280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300].

ВЫВОДЫ

1. Резистентность к клопидогрелу встречается среди 23,6%, 11,7% и 30,3% пациентов с ОКС, ОКС в сочетании с ФП и ишемическим инсультом, соответственно. Резистентность к тикагрелору по предложенным границам встречается среди 7,8% пациентов с ОКС.
2. Фармакогенетическое тестирование по маркеру rs4244285 гена CYP2C19 прогнозирует резистентность к клопидогрелу у пациентов с ОКС (ОШ=3,795 ДИ 1,3-11,078; p=0,024).
3. Фармакогенетическое тестирование по маркеру rs2108622 гена CYP4F2 и rs41273215 гена PEAR1 прогнозирует геморрагические осложнения на фоне клопидогрела у пациентов с ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий (ОШ=7,279 ДИ:1,483-35,722; p=0,008). (ОШ=3,802 ДИ 1,032-14,722; p=0,0035).
4. Фармакогенетическое тестирование по маркеру rs2046934 гена P2Y12 прогнозирует резистентность к клопидогрелу на 13 день у пациентов с ишемическим инсультом (ОШ=0,367 ДИ: 0,145-0,930; p=0,0042).
5. Фармакогенетическое тестирование по ABCB1 (rs1045642), SLCO1B1 (rs4149056), CYP3A5 (*3 (rs776746)), CYP3A4 (*22 (rs35599367), rs2242480), CYP2C19 (*2 (rs4244285), *3 (rs4986893), *17 (rs12248560)), CES1 (rs2244613), UGT2B7 (rs61361928), PON1 (rs662), PEAR1 (rs822442, rs41273215), IGTB3 (rs5918T), P2Y12 (rs2046934), CYP4F2 (rs2108622) не позволяет достоверно прогнозировать резистентность к тикагрелору у пациентов с ОКС.
6. Методом секвенирования нового поколения выявлены однонуклеотидные замены в генах: CES1 (rs3826193 – частота 91,6%, rs3826192 - частота 83,3%, rs62028647 - частота 91,6%, rs3826191 - частота 91,67%, rs74019278 - частота 91,6%, rs76828834 - частота 91,6%), P2Y12 (rs6785930 - 66,6%) и ABCG2 (rs2231148 - частота 75,0), которые были ассоциированы с развитием геморрагических осложнений на фоне комбинированной

антитромботической терапии (клопидогрел+ривароксабан) у пациентов с ОКС в сочетании с фибрилляцией предсердий.

7. Полученные частоты распространенности клинических значимых аллелей по маркерам ABCB1 (rs1045642), CYP3A5 (rs776746), CYP2C19 (rs4244285, rs4986893, rs12248560), CYP2C9 (rs1799853, rs1057910), CES1 (rs2244613), CYP4F2 (rs2108622), SLCO1B1 (rs4149056) позволят спрогнозировать большую подверженность к риску резистентности к ингибиторам P2Y12-рецепторов (клопидогрелу и тикагрелору) и нежелательным лекарственным реакциям в определенных популяциях, а так же определить приоритетность внедрения персонализированных алгоритмов антиагрегантной терапии сердечно-сосудистыми заболеваниями с учетом популяционно-этнических особенностей.
8. Оценка плазменного уровня микроРНК-126, микроРНК-150, микроРНК-223, микроРНК-142, микроРНК-34а, микроРНК-29а-3р, регулирующих экспрессию фармакокинетических и фармакодинамических генов-кандидатов ингибиторам P2Y12-рецепторов не позволяет достоверно прогнозировать фармакологический ответ на клопидогрел у пациентов с ОКС.
9. Оценка плазменного уровня микроРНК-223 ($r^2=0,292$, $p=0,001$), микроРНК-126 ($r^2=0,292$, $p=0,001$) и микроРНК-150 ($r^2=0,121$, $p=0,038$) прогнозирует остаточную реактивность тромбоцитов на фоне тикагрелора у пациентов с ОКС.
10. Минимальная равновесная концентрация тикагрелора, метаболита тикагрелора, клопидогрела, метаболическое отношение 6-бета-гидрокортизол/кортизол при приеме тикагрелора достоверно не предсказывают уровень остаточной реактивности тромбоцитов на фоне терапии и не позволяет прогнозировать развитие резистентности к терапии тикагрелором и клопидогрелом.
11. Алгоритмы биоинформатического анализа позволяют предсказать смертность от всех причин и уровень остаточной реактивности тромбоцитов

у пациентов острым коронарным синдромом в сочетании с фибрилляцией предсердий, получающих клопидогрел, а также уровень остаточной реактивности тромбоцитов, получающих тикагрелор. Предложенная схема терапии позволяет выявлять пациентов-кандидатов на фармакогенетическое тестирование и персонализированный выбор ингибитора P2Y₁₂-рецепторов, в основе которого лежит использование оптимального комплекса клинико-демографических и молекулярных (фармакогенетических и фармакоэпигенетических) маркеров.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для определения целесообразности проведения фармакогенетического тестирования рекомендуется оценка факторов риска, ассоциированных с резистентностью к клопидогрелу у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.
2. Для персонализации применения ингибиторов P2Y12-рецепторов у пациентов с ОКС, ОКС и фибрилляцией предсердий, ишемическим инсультом рекомендуется фармакогенетическое тестирование по: CYP2C19 (rs4244285), PEAR1 (rs822442, rs41273215), CYP4F2 (rs2108622), P2Y12 (rs2046934).
3. Для прогнозирования антиагрегантного действия тикагрелора у пациентов с ОКС не рекомендуется фармакогенетическое тестирование и рекомендуется оценка уровней циркулирующих в плазме микроРНК-126, микроРНК-150, микроРНК-223.
4. Для прогнозирования антиагрегантного действия ингибиторов P2Y12-рецепторов рекомендуется уравнение, выведенное на основе биоинформатического анализа влияния исследуемых молекулярных биомаркеров прогнозирования ответа на тикагрелор у пациентов с ОКС, что позволит предсказывать возможную неэффективность терапии или геморрагические осложнения.
5. С учетом неоднородности распределения частоты клинически значимых фармакогенетических маркеров прогнозирования ответа на ингибиторы P2Y12-рецепторов, рекомендуется разработка индивидуализированных алгоритмов антиагрегантной терапии в различных регионах компактного проживания этнических групп Российской Федерации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ - Аденозиндифосфат
 АСК – Ацетилсалициловая кислота
 АТК - артерия тупого края
 ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
 ВТК – ветвь тупого края
 ДАД – диастолическое артериальное давление
 ДВ – диагональная ветвь
 ДИ - Доверительный интервал
 ГХ-ХМС - Газовая хроматография с масс-спектрометрией
 ЖХ-ХМС - Жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
 ИБС – Ишемическая болезнь сердца
 ИПП - Ингибиторы протонной помпы
 ЛКА – левая коронарная артерия
 ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
 ЛС – лекарственное средство
 МИС - медицинские информационные системы
 ОА – огибающая артерия
 ОКС - Острый коронарный синдром
 ОТП – Обедненная тромбоцитами плазма
 ОШ - Отношение шансов
 ПКА - правая коронарная артерия
 ПНА/ПМЖВ – передняя нисходящая артерия/передняя межжелудочковая ветвь
 иАПФ- ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента
 САД – систолическое артериальное давление
 СКФ - скорость клубочковой фильтрации
 ССЗ - Сердечно-сосудистые заболевания
 ТИА - Транзиторная ишемическая атака
 ФДЭ – Фосфодиэстераза
 ФП – Фибрилляция предсердий
 цАМФ - Циклический аденозинмонофосфат
 ЦОГ-1 - Циклооксигеназа 1-типа
 ЧКВ – Чрескожное коронарное вмешательство
 ЧСС – частота сердечных сокращений
 ADME - Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion
 ANN - Artificial Neural Networks
 BARC - Bleeding Academic Research Consortium

CRUSADE - Can Rapid risk stratification of Unstable angina patients Suppress ADverse outcomes with Early implementation of the ACC/AHA guidelines
 EGAPP - Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention
 EMA - European Medicines Agency
 ESC - European Society of Cardiology
 ESRS - The Essen Stroke Risk Score
 FDA - Food and Drug Administration
 GIANT - Genotyping to Adjust Thienopyridine Treatment After Primary PCI for STEMI
 HCSC - Health Canada Santé Canada
 IGV - Integrative Genomic Viewer
 LTA - light transmission aggregometry
 MLS - Machine Learning Systems
 NIHSS - National Institutes of Health Stroke Scale
 PFA - Platelet Function Assay
 PLATO - PLATelet inhibition and patients Outcome
 PMDA - Pharmaceuticals and Medical Devices Agency Japan
 RISC - RNA Induced Silencing Complex
 ROTEM - Rotation Thromboelastometry
 SD - standard deviation
 SYNTAX - Synergy between Percutaneous Coronary Intervention with TAXUS
 TEG - Thrombelastography
 VASP-P Vasodilator-stimulated Phosphoprotein-phosphorylation

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO report about Cardiovascular diseases (CVDs). URL: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (Просмотрено: 22 июня 2021 г.)
2. Vos T. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 / T. Vos, S. S. Lim, C. Abbafati [et al.] // Lancet. – 2020. - V. 396. – №10258. – P. 1204-1222
3. Piepoli M. F. Update on cardiovascular prevention in clinical practice: A position paper of the European Association of Preventive Cardiology of the European Society of Cardiology / M. F. Piepoli, A. Abreu, C. Albus [et al.] // European Journal of Preventive Cardiology. – 2020. - V. 27. - №2. – P. 181-205.
4. Timmis A., Townsend N., Gale C. P. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019 / A. Timmis, N. Townsend, C. P. Gale // European Heart Journal. – 2020. – V. 41 - № 1. – P. 12-85.
5. Virani S. S., Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association / S. S. Virani, A. Alonso, H. J. Aparicio [et al.] // Circulation. – 2021. – V. 143. - № 8. – P. e254-e743.
6. Шаповал Н. И. Здоровоохранение в России. 2019: Статистический сборник / Под редакцией Н. И. Шаповал, Никитина С. Ю. // Москва. - 2019. – 170 с.
7. OECD report “Expenditure by disease, age & gender”. URL: <https://www.oecd.org/els/health-systems/Expenditure-by-disease-age-and-gender-FOCUS-April2016.pdf> (Просмотрено 22 июня 2021 г.)
8. Концевая А. В. Экономический ущерб сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации в 2016 году / А. В. Концевая, О. М. Драпкина, Ю. А. Баланова // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2018. – Т. 14. - № 2. – С. 156-166.
9. Приказ Минздрава России от 15.01.2020 N 8 "Об утверждении Стратегии формирования здорового образа жизни населения, профилактики и контроля

неинфекционных заболеваний на период до 2025 года" (Просмотрено: 22 июня 2021 г.)

10. Layne K. The role of platelets in the pathophysiology of atherosclerosis and its complications / K. Layne, G. Passacuale, A. Ferro // Cardiovascular Thrombus: From Pathology and Clinical Presentations to Imaging, Pharmacotherapy and Interventions. – Elsevier. - 2018. – P. 51-65.
11. Prabhu S. Platelets in the Pathogenesis of Vascular Disease and their Role as a Therapeutic Target / S. Prabhu, R. Sharma, K. Peter // Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists [Internet]. – 2011. - URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534273/> (Просмотрено 22 июня 2021г.)
12. Freedman J. E. The role of platelets in coronary heart disease / Freedman J. // Uptodate. – 2019. - URL: <https://www.uptodate.com/contents/the-role-of-platelets-in-coronary-heart-disease#subscribeMessage> (Просмотрено: 22 июня 2021 г.)
13. Coller B. S. The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend / B. S. Coller, S. J. Shattil // Blood. – 2008. – V. 112 - № 8. P. 3011-25.
14. Freedman J. E., Loscalzo J, Barnard MR. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment / J. E. Freedman, J. Loscalzo, M. R. Barnard [et al.] The Journal of clinical investigation. – 1997. – V. 100. - № 2. P. 350-6.
15. Bhatt D. L. Opie's Cardiovascular Drugs: A Companion to Braunwald's Heart Disease E-Book / D. L. Bhatt (ed.) // Elsevier Health Sciences. - 2021. – 720 pp.
16. Falk E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion / E. Falk // Circulation. – 1985. – V. 71. - № 4. – P. 699-708
17. Добровольский А. Б. Образование тромбина и его функции в системе гемостаза / А. Б. Добровольский, Е. В. Титаева // Атеротромбоз. – 2013. – №. 1. – С. 66-72
18. Merten M. A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation / M. Merten, T. Chow, J. D. Hellums [et al.]. Circulation. – 2000. – V. 102. - № 17. -P. 2045-5

19. Endler G. Mean platelet volume is an independent risk factor for myocardial infarction but not for coronary artery disease / G. Endler, A. Klimesch, Sunder-H. Plassmann [et al.] // *British journal of haematology*. – 2002. – V. 117. – № 2. – P. 399-404.
20. Mathur A. Platelet reactivity in acute coronary syndromes: evidence for differences in platelet behaviour between unstable angina and myocardial infarction / A. Mathur, M. S. Robinson, J. Cotton [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. - 2001. – V. 85. - № 6. – P. 989-94
21. Cattaneo M. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH / M. Cattaneo, C. P. Hayward, K. A. Moffat // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – V. 7. - № 6. – P. 1029.
22. Michelson A. D., Frelinger AL, Furman MI. Current options in platelet function testing / A. D. Michelson, A.L. Frelinger, M. I. Furman // *The American journal of cardiology*. – 2006. – V. 98. – P. S4 – S10
23. Quiroga T. Diagnosis of mild platelet function disorders. Reliability and usefulness of light transmission platelet aggregation and serotonin secretion assays / T. Quiroga, M. Goycoolea, V. Matus // *British journal of haematology*. – 2009. – V. 147. – № 5. – P. 729-736.
24. Favaloro E. J. Clinical utility of closure times using the platelet function analyzer-100/200 / E. J. Favaloro // *American journal of hematology*. – 2017. – V. 92. – № 4. – P. 398-404
25. Harrison P. Platelet function testing / P. Harrison // *Uptodate*. – 2021. – URL: https://www.uptodate.com/contents/platelet-function-testing?topicRef=6683&source=see_link#H8 (Просмотрено 22 июня 2021 г.)
26. Afshari A. Thrombelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemotherapy versus usual care in patients with massive transfusion / A. Afshari, A. Wikkelsø, A. M. Møller [et al.] // *Cochrane database of systematic reviews*. – 2011. – V. 3 – P. 1-90

27. Choi J. L., Li S, Han JY. Platelet function tests: a review of progresses in clinical application / J. L. Choi, S. Li, J. Y. Han // BioMed research international. – 2014.- V. 2014. – P. 456569.
28. Mansouritorghabeh H. Current methods of measuring platelet activity: pros and cons / H. Mansouritorghabeh, B. de Laat, M. Roest // Blood Coagulation & Fibrinolysis. – 2020. – V. 31. – № 7. – P. 426-433
29. Stone G. W. Platelet reactivity and clinical outcomes after coronary artery implantation of drug-eluting stents (ADAPT-DES): a prospective multicentre registry study / G. W. Stone, B. Witzenbichler, G. Weisz // Lancet. – 2013. – V. 382. – P. 614–623.
30. Sofi F. Clopidogrel non-responsiveness and risk of cardiovascular morbidity / F. Sofi, R. Marcucci, A. M. Gori [et al.] // Thrombosis and haemostasis. - 2010. – V. 103. – P. 841-848
31. Aradi D. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis / D. Aradi, A. Komocsi, A. Vorobcsuk [et al.] // American heart journal. – 2010. – V. 160. – № 3. – P. 543-551
32. Gurbel P. A. Platelet reactivity in patients and recurrent events post-stenting: results of the PREPARE POST-STENTING Study / P. A. Gurbel, K. P. Bliden, K. Guyer [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2005. – V. 46. – № 10. – P. 1820-1826.
33. Aradi D. Efficacy and safety of intensified antiplatelet therapy on the basis of platelet reactivity testing in patients after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis / D. Aradi, A. Komócsi, M. J. Price [et al.] //International journal of cardiology. – 2013. – V. 167. – № 5. – P. 2140-2148.
34. Yamaguchi Y. Effects of VerifyNow P2Y12 test and CYP2C19* 2 testing on clinical outcomes of patients with cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis / Y. Yamaguchi, T. Abe, Y. Sato [et al.] // Platelets. – 2013. – V. 24. – № 5. – P. 352-361.

35. Reny J. L. Vascular risk levels affect the predictive value of platelet reactivity for the occurrence of MACE in patients on clopidogrel / J. L. Reny, P. Fontana, W. Hochholzer [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 2016. – V. 115. – № 4. – P. 823-825.
36. Cannon C. P. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study / C. P. Cannon, R. A. Harrington, S. James [et al.] // *Lancet*. – 2010. - V. 375. – P. 283–293
37. Wiviott S. D. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes / S. D. Wiviott, E. Braunwald, C. H. McCabe [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – V. 357. – № 20. – P. 2001-2015.
38. Collet J. P. Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting / J. P. Collet, T. Cuisset, G. Range [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2012. – V. 367. – № 22. – P. 2100-2109.
39. Aradi D. Platelet reactivity and clinical outcomes in acute coronary syndrome patients treated with prasugrel and clopidogrel: a pre-specified exploratory analysis from the TROPICAL-ACS trial / D. Aradi, L. Gross, D. Trenk [et al.] // *European heart journal*. – 2019. – V. 40. – № 24. – P. 1942-1951.
40. You J. Platelet function testing guided antiplatelet therapy reduces cardiovascular events in Chinese patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention: The PATROL study / J. You, H. Li, W. Guo [et al.] // *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. – 2020. – V. 95. – P. 598-605.
41. Sibbing D. Updated expert consensus statement on platelet function and genetic testing for guiding P2Y₁₂ receptor inhibitor treatment in percutaneous coronary intervention / D. Sibbing, D. Aradi, D. Alexopoulos [et al.] // *JACC: Cardiovascular Interventions*. – 2019. – V. 12. – № 16. – P. 1521-1537.
42. Collet J. P. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: the Task Force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent

- ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC) / J. P. Collet, H. Thiele, E. Barbato [et al.] // *European heart journal*. – 2021. – V. 42. – № 14. – P. 1289-1367.
43. Fu H. Association of clopidogrel high on-treatment reactivity with clinical outcomes and gene polymorphism in acute ischemic stroke patients: An observational study / H. Fu, P. Hu, C. Ma [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. - 2020 – V. 99. - № 15. – P. e19472.
 44. Cha J. K. High residual platelet reactivity (HRPR) for adenosine diphosphate (ADP) stimuli is a determinant factor for long-term outcomes in acute ischemic stroke with anti-platelet agents: The meaning of HRPR after ADP might be more prominent in large atherosclerotic infarction than other subtypes of AIS / J. K. Cha, H. S. Park, H. W. Nah [et al.] // *Journal of thrombosis and thrombolysis*. – 2016. – V. 42. – № 1. – P. 107-117.
 45. Depta J. P. Clinical outcomes using a platelet function-guided approach for secondary prevention in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack / J. P. Depta, J. Fowler, E. Novak [et al.] // *Stroke*. - 2012 – V. 43. - № 9. – P. 2376-81.
 46. Yi X. Platelet function-guided modification in antiplatelet therapy after acute ischemic stroke is associated with clinical outcomes in patients with aspirin nonresponse / X. Yi, J. Lin, C. Wang [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. V. 63. - № 8. - - P. 106258-106269.
 47. Fiolaki A. High on treatment platelet reactivity to aspirin and clopidogrel in ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis / A. Fiolaki, A. H. Katsanos, A. P. Kyritsis [et al.] // *Journal of the neurological sciences*. – 2017. – V. 376. – P. 112-116.
 48. Lim S. T. Platelet function/reactivity testing and prediction of risk of recurrent vascular events and outcomes after TIA or ischaemic stroke: systematic review and meta-analysis / S. T. Lim, V. Thijs, S. J. X. Murphy [et al.] // *Journal of neurology*. – 2020. – V. 267. - № 10. – P. 3021-3037.
 49. Yan A. R. Effectiveness of platelet function analysis-guided aspirin and/or clopidogrel therapy in preventing secondary stroke: a systematic review and meta-analysis / A. R. Yan, M. Naunton, G. M. Peterson [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – V. 9. – № 12. – P. 3907.

50. Hu C. Vasodilator-stimulated phosphoprotein-guided Clopidogrel maintenance therapy reduces cardiovascular events in atrial fibrillation patients requiring anticoagulation therapy and scheduled for percutaneous coronary intervention: a prospective cohort study / C. Hu, X. Zhang, Y. Liu [et al.] // BMC cardiovascular disorders. – 2018. – V. 18. – №. 1. – P. 1-11.
51. Blinc A. Aspirin resistance—clinically meaningful or a laboratory artefact?. – 2006. URL: <https://www.escardio.org/Journals/E-Journal-of-Cardiology-Practice/Volume-3/Vol3n25-Title-Aspirin-Resistance-Clinically-Meaningful-or-A-Laboratory-Art>. (Просмотрено 22 июня 2021 г.)
52. Patrono C. Drug insight: aspirin resistance—fact or fashion? / C. Patrono, B. Rocca // Nature clinical practice Cardiovascular medicine. – 2007. – V. 4. – № 1. – P. 42-50.
53. Collet J.P. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation / J. P. Collet, H. Thiele, E. Barbato [et al.] // European Heart Journal. 2021. Apr 7;42(14):1289-1367. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa575. Erratum in: Eur Heart J. – 2021. – V. 42 - №. 19. – P. 1908
54. Kleindorfer D.O. 2021 Guideline for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association / D. O. Kleindorfer, A. Towfighi, S. Chaturvedi [et al.] // Stroke. – 2021. – V. 52. - №. 7. – P. e364-e467.
55. Berge E. European Stroke Organisation (ESO) guidelines on intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke / E. Berge, W. Whiteley, H. Audebert [et al.] // European Stroke Journal. – 2021. - V. 6. - №. 1. – P. I-LXII.
56. Ibanez B. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC) / B. Ibanez, S. James, S. Agewall [et al.] // European Heart Journal. – 2018. – V. 39. - №. 2. – P. 119-177.
57. Tantry U. S. Clopidogrel resistance and clopidogrel treatment failure / U. S. Tantry, C. H. Hennekens, J. L. Zehnder [et al.] // Uptodate. – 2021. URL:

https://www.uptodate.com/contents/clopidogrel-resistance-and-clopidogrel-treatment-failure?topicRef=4433&source=see_link [Просмотрено 22 июня 2021 г.]

58. Bonello L. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate / L. Bonello, U. S. Tantry, R. Marcucci [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2010. – V. 56. – № 12. P. 919-933.
59. Fiolaki A. High on treatment platelet reactivity to aspirin and clopidogrel in ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis / A. Fiolaki, A. H. Katsanos, A. P. Kyritsis [et al.] // Journal of the neurological sciences. – 2017. – V. 376. – P. 112-116.
60. Меситская Д. Ф. Клиническая фармакогенетика клопидогреля у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями: / Д. Ф. Меситская // дис. канд. мед. наук: 14.01.05 Москва. - 2016. –128 с.
61. Сулимов В. А. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам (аспирину, клопидогрелу) у пациентов, подвергающихся elective стентированию коронарных артерий / В. А. Сулимов, Е. В. Мороз // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2012. – № 8. – С. 23-30.
62. Стойко О. А. Клинико-прогностическое значение резидуальной активности тромбоцитов у больных острым коронарным синдромом без подъемов сегмента ST: / О. А. Стойко // дис. канд. мед. наук: 14.01.05 Москва. - 2017. –139 с.
63. Warlo E. M. K. A brief review on resistance to P2Y₁₂ receptor antagonism in coronary artery disease / E. M. K. Warlo, H. Arnesen, I. Seljeflot //Thrombosis journal. – 2019. – V. 17. – № 1. – P. 1-9.
64. Lemesle G. High on-treatment platelet reactivity with ticagrelor versus prasugrel: a systematic review and meta-analysis / G. Lemesle, G. Schurtz, C. Bauters // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2015. – V. 13. – № 6. – P. 931-942.
65. Thomas M. R. Clinical significance of residual platelet reactivity in patients treated with platelet P2Y₁₂ inhibitors / M. R. Thomas, R. F. Storey // Vascular pharmacology. – 2016. – V. 84. – P. 25-27.
66. Navarese E. P. Comparative Efficacy and Safety of Oral P2Y₁₂Inhibitors in Acute Coronary Syndrome: Network Meta-Analysis of 52 816 Patients From 12 Randomized

- Trials / E. P. Navarese, S. U. Khan, M. Kołodziejczak [et al.] // *Circulation*. 2020. – V. 142. – № 2. – P. 150-160
67. Turgeon R. D. Association of ticagrelor vs clopidogrel with major adverse coronary events in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention / R. D. Turgeon, S. L. Koshman, E. Youngson [et al.] // *JAMA internal medicine*. – 2020. – V. 180. – № 3. – P. 420-428.
 68. Lee Y. Real-World Bleeding and Ischemic Events in Asian Patients on P2Y12-Inhibitors After Percutaneous Coronary Intervention: A National Claims Data Analysis / Y. Lee, Y. H. Lim, Y. Park [et al.] // *Advances in therapy*. – 2021. – V. 38. – № 1. – P. 562-578.
 69. Lhermusier T. Meta-analysis of direct and indirect comparison of ticagrelor and prasugrel effects on platelet reactivity / T. Lhermusier, M. J. Lipinski, U. S. Tantry [et al.] // *The American journal of cardiology*. – 2015. – V. 115. – № 6. – P. 716-723.
 70. Angiolillo D. J. Use of the VerifyNow point of care assay to assess the pharmacodynamic effects of loading and maintenance dose regimens of prasugrel and ticagrelor / D. J. Angiolillo, L. Been, M. Rubinstein [et al.] // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2021. – V. 51. – № 3. – P. 741-747.
 71. Tersalvi G. Acute coronary syndrome, antiplatelet therapy, and bleeding: A clinical perspective / G. Tersalvi, L. Biasco, G. M. Cioffi [et al.] // *Journal of clinical medicine*. – 2020. – V. 9. – № 7. – P. 2064.
 72. Becker R. C. Bleeding complications with the P2Y12 receptor antagonists clopidogrel and ticagrelor in the PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial / R. C. Becker, J. P. Bassand, A. Budaj [et al.] // *European heart journal*. – 2011. – V. 32. – № 23. – P. 2933-2944.
 73. Gao F. Comparison of different antithrombotic regimens for patients with atrial fibrillation undergoing drug-eluting stent implantation / F. Gao, Y. J. Zhou, Z. J. Wang [et al.] // *Circulation Journal*. – 2010. – V. 74. – № 4. – P. 701-708.
 74. Lv M. A New Score for Predicting Acute Gastrointestinal Bleeding in Patients Administered Oral Antiplatelet Drugs / M. Lv, X. Zheng, T. Wu [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2021. – V. 11. – P. 2245.

75. Zanchin T. Frequency, reasons, and impact of premature ticagrelor discontinuation in patients undergoing coronary revascularization in routine clinical practice: results from the Bern Percutaneous Coronary Intervention Registry / T. Zanchin, F. Temperli, A. Karagiannis [et al.] // *Circulation: Cardiovascular Interventions*. – 2018. – V. 11. – № 5. – P. e006132.
76. O'Donoghue M. Clopidogrel response variability and future therapies: clopidogrel: does one size fit all? / M. O'Donoghue, S. D. Wiviott // *Circulation*. – 2006. – V. 114. – №. 22. – P. e600-e606.
77. Collins F. S. Varmus H. A new initiative on precision medicine / F. S. Collins, H. Varmus // *New England journal of medicine*. – 2015. – V. 372. – № 9. – P. 793-795.
78. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP). Working Group: Methods|EGAPP|CDC. URL: www.cdc.gov/egappreviews/methods.html (Просмотрено 22 июня 2021 г.)
79. Hengstenberg C. Genetic testing to guide therapy? Not for ticagrelor! / C. Hengstenberg, A. Kastrati // *European heart journal*. – 2019. – V. 40. – № 24. – P. e1-e3.
80. Pharmacogenomics Knowledge Base. URL: <https://www.pharmgkb.org/>. (Просмотрено 22 июня 2021 г.)
81. Su J. ABCB1 C3435T polymorphism and response to clopidogrel treatment in coronary artery disease (CAD) patients: a meta-analysis / J. Su, J. Xu, X. Li [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – V. 10. - №7. – P. e46366
82. Zhang Y. J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel: evidences and perspectives / Y. J. Zhang, M. P. Li, J. Tang [et al.] // *International journal of environmental research and public health*. – 2017. – V. 14. – № 3. – P. 301.
83. Kazui M. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite / M. Kazui, Y. Nishiya, T. Ishizuka [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2010. – V. 38. – № 1. – P. 92-99.

84. Bouman H. J. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy / H. J. Bouman, E. Schömig, J. W. van Werkum [et al.] // *Nature medicine*. – 2011. – V. 17. – № 1. – P. 110-116.
85. Wallentin L. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial / L. Wallentin, S. James, R. F. Storey [et al.] // *Lancet*. – 2010. – V. 376. - №9749. – P. 1320-28
86. Xiao F. Y. Effect of carboxylesterase 1 S75N on clopidogrel therapy among acute coronary syndrome patients / F. Y. Xiao, J. Q. Luo, M. Liu [et al.] // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 1-6.
87. Pereira N. L. Effect of CYP2C19 genotype on ischemic outcomes during oral P2Y12 inhibitor therapy: a meta-analysis / N. L. Pereira, C. Rihal, R. Lennon [et al.] // *Cardiovascular Interventions*. – 2021. – V. 14. – № 7. – P. 739-750.
88. Li Y. The gain-of-function variant allele CYP2C19*17: a double-edged sword between thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients / Y. Li, H. L. Tang, Y. Hu [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2012. – V. 10. – № 2. – P. 199-206.
89. Singh M. CYP2C19* 2/ABCB1-C3435T polymorphism and risk of cardiovascular events in coronary artery disease patients on clopidogrel: Is clinical testing helpful? / M. Singh, T. Shah, S. Adigopula [et al.] // *Indian heart journal*. – 2012. – V. 64. – № 4. – P. 341-352.
90. Yi X. Association of cytochrome P450 genetic variants with clopidogrel resistance and outcomes in acute ischemic stroke / X. Yi, J. Lin, Y. Wang [et al.] // *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. – 2016. – V. 23. – № 10. – P. 1188-1200.
91. Angiolillo D. J. Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel / D. J. Angiolillo, A. Fernandez-Ortiz, E. Bernardo [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2006. – V. 26. – № 8. – P. 1895-1900.
92. Cresci S. Cytochrome p450 gene variants, race, and mortality among clopidogrel-treated patients after acute myocardial infarction / S. Cresci, J. P. Depta, P. A. Lenzini [et al.] // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. – 2014. – V. 7. – № 3. – P. 277-286.

93. Park K. W. Enhanced clopidogrel responsiveness in smokers: smokers' paradox is dependent on cytochrome P450 CYP1A2 status / K. W. Park, J. J. Park, K. H. Jeon [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2011. – V. 31. – № 3. – P. 665-671.
94. Kassimis G. CYP2C19* 2 and other genetic variants affecting platelet response to clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention / G. Kassimis, P. Davlouros, I. Xanthopoulou [et al.] // *Thrombosis research*. – 2012. – V. 129. – № 4. – P. 441-446.
95. Wu H. Besides CYP2C19, PON1 genetic variant influences post-clopidogrel platelet reactivity in Chinese patients / H. Wu, J. Qian, J. Xu [et al.] // *International journal of cardiology*. – 2013. – V. 165. – № 1. – P. 204-206.
96. Li X. Q. Association of PON1, P2Y12 and COX1 with recurrent ischemic events in patients with extracranial or intracranial stenting / X. Q. Li, N. Ma, X. G. Li [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – V. 11. – № 2. – P. e0148891.
97. Zoheir N. P2Y12 receptor gene polymorphism and antiplatelet effect of clopidogrel in patients with coronary artery disease after coronary stenting / N. Zoheir N, S. Abd Elhamid S, N. Abulata [et al.] // *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. – 2013. – V. 24. – № 5. – P. 525-531.
98. Cha J. J. Impact of genetic variants on major bleeding after percutaneous coronary intervention based on a prospective multicenter registry / J. J. Cha, H. J. Joo, J. H. Park [et al.] // *Scientific reports*. – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 1-8.
99. Xiang Q. Genetic variants of PEAR1 are associated with platelet function and antiplatelet drug efficacy: a systematic review and meta-analysis / Q. Xiang, S. Zhou, J. P. Lewis [et al.] // *Current pharmaceutical design*. – 2017. – V. 23. – № 44. – P. 6815-6827.
100. Yao Y. Association of PEAR1 genetic variants with platelet reactivity in response to dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel in the Chinese patient population after percutaneous coronary intervention / Y. Yao, X. F. Tang, J. H. Zhang [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2016. – V. 141. – P. 28-34

101. Lewis J. P. Genetic variation in PEAR1 is associated with platelet aggregation and cardiovascular outcomes / J. P. Lewis, K. Ryan, J. R. O'Connell [et al.] // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. – 2013. – V. 6. – № 2. – P. 184-192.
102. Cayla G. Clinical, angiographic, and genetic factors associated with early coronary stent thrombosis / G. Cayla G, J. S. Hulot JS, S. A. O'Connor [et al.] // *JAMA*. – 2011. – V. 306. – № 16. – P. 1765-1774.
103. Giusti B. Role of glycoprotein Ia gene polymorphisms in determining platelet function in myocardial infarction patients undergoing percutaneous coronary intervention on dual antiplatelet treatment / B. Giusti, A. M. Gori, R. Marcucci [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2008. – V. 196. – № 1. – P. 341-348.
104. Scott S. A. Exome sequencing of extreme clopidogrel response phenotypes identifies B4GALT2 as a determinant of on-treatment platelet reactivity / S. A. Scott, J. P. Collet, U. Baber [et al.] // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2016. – V. 100. – № 3. – P. 287-294.
105. Kupstyte N. Effect of clinical factors and gene polymorphism of CYP2C19*2, *17 and CYP4F2*3 on early stent thrombosis / N. Kupstyte, R. Zaliunas, V. Tatarunas [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2015. – V. 16. – № 3. – P. 181-9
106. Danielak D. Ticagrelor in modern cardiology-an up-to-date review of most important aspects of ticagrelor pharmacotherapy / D. Danielak, M. Karaźniewicz-Łada, F. Głowska // *Expert opinion on pharmacotherapy*. – 2018. – V. 19. – № 2. – P. 103-112.
107. Zhou D. In vitro evaluation of potential drug-drug interactions with ticagrelor: cytochrome P450 reaction phenotyping, inhibition, induction, and differential kinetics / D. Zhou, T. B. Andersson, S. W. Grimm // *Drug metabolism and disposition*. – 2011. – V. 39. – № 4. – P. 703-710.
108. Varenhorst C. Effect of genetic variations on ticagrelor plasma levels and clinical outcomes / C. Varenhorst, N. Eriksson, A. Johansson [et al.] // *European heart journal*. – 2015. – V. 36. – № 29. – P. 1901-1912.
109. Williams E. T. The biotransformation of prasugrel, a new thienopyridine prodrug, by the human carboxylesterases 1 and 2 / E. T. Williams, K. O. Jones, G. D. Ponsler [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2008. – V. 36. – № 7. – P. 1227-1232.

110. Rehmel J. L. Interactions of two major metabolites of prasugrel, a thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450 / J. L. Rehmel, J. A. Eckstein, N. A. Farid [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2006. – V. 34. – № 4. – P. 600-607.
111. Dobesh P. P. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel, a thienopyridine P2Y₁₂ inhibitor/ P. P. Dobesh // *Pharmacotherapy*. – 2009. – V. 29. - № 9. – P. 1089-102
112. Holmberg M. T. CYP3A4* 22 impairs the elimination of ticagrelor, but has no significant effect on the bioactivation of clopidogrel or prasugrel / M. T. Holmberg, A. Tornio, M. Paile-Hyvärinen [et al.] // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2019. – V. 105. – № 2. – P. 448-457.
113. Li M. P. Influence of P2Y₁₂ polymorphisms on platelet activity but not ex-vivo antiplatelet effect of ticagrelor in healthy Chinese male subjects / M. P. Li, J. Tang, Z. P. Wen [et al.] // *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. – 2015. – V. 26. – № 8. – P. 874-881.
114. Li M. Association of PEAR1 rs12041331 polymorphism and pharmacodynamics of ticagrelor in healthy Chinese volunteers / M. Li, Y. Hu, Z. Wen [et al.] // *Xenobiotica*. 2017. – V. 47. - № 12. – P. 1130-1138.
115. Tatarunas V. The impact of *CYP2C19* and *CYP4F2* variants and clinical factors on treatment outcomes during antiplatelet therapy / V. Tatarunas, N. Kupstyte-Kristapone, R. Norvilaite // *Pharmacogenomics*. - 2019. – V. 20. - № 7. P. 483-492
116. Cavallari L. H. Multisite investigation of outcomes with implementation of *CYP2C19* genotype-guided antiplatelet therapy after percutaneous coronary intervention / L. H. Cavallari, C. R. Lee, A. L. Beitelshees [et al.] // *JACC: Cardiovascular Interventions*. – 2018. – V. 11. – № 2. – P. 181-191.
117. Williams A. K. *CYP2C19* genotype-guided antiplatelet therapy and 30-day outcomes after percutaneous coronary intervention / A. K. Williams, M. D. Klein, J. Martin [et al.] // *Circulation: Genomic and Precision Medicine*. – 2019. – V. 12. – № 2. – P. e002441.

118. Hulot J. S. Routine CYP2C19 genotyping to adjust thienopyridine treatment after primary PCI for STEMI: results of the GIANT study / J. S. Hulot, B. Chevalier, L. Belle [et al.] // Cardiovascular Interventions. – 2020. – V. 13. – № 5. – P. 621-630.
119. Notarangelo F. M. Pharmacogenomic approach to selecting antiplatelet therapy in patients with acute coronary syndromes: the PHARMCLO trial / F. M. Notarangelo, G. Maglietta, P. Bevilacqua [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2018. – V. 71. – № 17. – P. 1869-1877.
120. Claassens D. M. F. A genotype-guided strategy for oral P2Y12 inhibitors in primary PCI / D. M. F. Claassens, G. J. A. Vos, T. O. Bergmeijer [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2019. – V. 381. – № 17. – P. 1621-1631.
121. Pereira N. L. Clopidogrel pharmacogenetics: state-of-the-art review and the TAILOR-PCI Study / N. L. Pereira, C. S. Rihal, D. Y. F. So [et al.] // Circulation: Cardiovascular Interventions. – 2019. – V. 12. – № 4. – P. e007811.
122. Kheiri B. CYP2C19 pharmacogenetics versus standard of care dosing for selecting antiplatelet therapy in patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized clinical trials / B. Kheiri, M. Osman, A. Abdalla [et al.] // Catheterization and Cardiovascular Interventions. – 2019. – V. 93. – № 7. – P. 1246-1252.
123. Wang X. Genotype-guided antiplatelet therapy compared with standard therapy for patients with acute coronary syndromes or undergoing percutaneous coronary intervention: A systematic review and meta-analysis / X. Wang, S. Wang, J. Yang [et al.] // Thrombosis research. – 2020. – V. 193. – P. 130-138.
124. Galli M. Guided versus standard antiplatelet therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis / M. Galli, S. Benenati, D. Capodanno [et al.] // The Lancet. – 2021. – V. 397. – № 10283. – P. 1470-1483.
125. Gower M. N. Clinical utility of cyp2c19 genotype-guided antiplatelet therapy in patients at risk of adverse cardiovascular and cerebrovascular events: A review of emerging evidence / M. N. Gower, L. R. Ratner, A. K. Williams [et al.] // Pharmacogenomics and Personalized Medicine. – 2020. – V. 13. – P. 239-252.

126. Wang Y. Association between CYP2C19 loss-of-function allele status and efficacy of clopidogrel for risk reduction among patients with minor stroke or transient ischemic attack / Y. Wang, X. Zhao, J. Lin [et al.] // JAMA. – 2016. – V. 316. – № 1. – P. 70-78.
127. Wu Y. Impact of CYP2C19 polymorphism in prognosis of minor stroke or TIA patients with declined eGFR on dual antiplatelet therapy: CHANCE substudy / Y. Wu, Y. Zhou, Y. Pan [et al.] // The pharmacogenomics journal. – 2018. – V. 18. – №. 6. – P. 713-720.
128. Jia D. CYP2C19 polymorphisms and antiplatelet effects of clopidogrel in acute ischemic stroke in China / D. M. Jia, Z. B. Chen, M. J. Zhang [et al.] // Stroke. – 2013. – V. 44. – № 6. – P. 1717-1719.
129. Patel P. D. CYP2C19 Loss-of-Function is Associated with Increased Risk of Ischemic Stroke after Transient Ischemic Attack in Intracranial Atherosclerotic Disease / P. D. Patel, P. Vimalathas, X. Niu [et al.] // Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. – 2021. – V. 30. – № 2. – P. 105464.
130. Patel P. D. CYP2C19 Loss-of-Function Associated with First-Time Ischemic Stroke in Non-surgical Asymptomatic Carotid Artery Stenosis During Clopidogrel Therapy / P. D. Patel, X. Niu, C. N. Shannon [et al.] // Translational Stroke Research. – 2021. – P. 1-10.
131. Zhang X. G. Personalised antiplatelet therapy based on pharmacogenomics in acute ischaemic minor stroke and transient ischaemic attack: study protocol for a randomised controlled trial / X. G. Zhang, X. Q. Zhu, J. Xue [et al.] // BMJ open. – 2019. – V. 9. – № 5. – P. e028595.
132. Российский Государственный реестр лекарственных средств. URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=%u043a%u043b%u043e%u043f%u0438%u0434%u043e%u0433%u0440%u0435%u043b&lf=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&isfs=0&isND=-1®type=1%2c6&pageSize=10&order=RegDate&orderType=desc&pageNum=1>
(Просмотрено 22 июня 2021 г.)

133. Pharmacogenomics Knowledge base. Drug Label Annotations. URL: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA449053/labelAnnotation> (Просмотрено 22 июня 2021 г.)
134. Pharmacogenomics Knowledge base. Clinical Guideline Annotations. URL: <https://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotations> (Просмотрено 22 июня 2021 г.)
135. Fragoulakis V. Cost-effectiveness analysis of pharmacogenomics-guided clopidogrel treatment in Spanish patients undergoing percutaneous coronary intervention / V. Fragoulakis, M. Bartsakoulia, X. Díaz-Villamarín [et al.] // The pharmacogenomics journal. – 2019. – V. 19. – № 5. – P. 438-445.
136. Kazi D. S. Cost-effectiveness of genotype-guided and dual antiplatelet therapies in acute coronary syndrome / D. S. Kazi, A. M. Garbe, R. U. Shah [et al.] // Annals of internal medicine. – 2014. – V. 160. – №4. – P. 221-232.
137. Plumpton C. O. A Systematic Review of Economic Evaluations of Pharmacogenetic Testing for Prevention of Adverse Drug Reactions / C. O. Plumpton, D. Roberts, M. Pirmohamed // Pharmacoeconomics. - 2016. – V. 34. - № 8. – P. 771-93
138. Narasimhalu K. Cost effectiveness of genotype-guided antiplatelet therapy in Asian ischemic stroke patients: ticagrelor as an alternative to clopidogrel in patients with CYP2C19 loss of function mutations / K. Narasimhalu, Y. K. Ang, D. S. Y. Tan [et al.] // Clinical Drug Investigation. – 2020. – V. 40. – № 11. – P. 1063-1070.
139. Bartel D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function / D. P. Bartel // Cell. – 2004. – V. 116. – № 2. – P. 281-297.
140. Huang X. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing / X. Huang, T. Yuan, M. Tschannen [et al.] // BMC genomics. – 2013. – V. 14. – № 1. – P. 1-14.
141. Zhang J. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function / J. Zhang, S. Li, L. Li [et al.] // Genomics, proteomics & bioinformatics. – 2015. – V. 13. – № 1. – P. 17-24.

142. Edelstein L. C. MicroRNAs in platelet production and activation / L. C. Edelstein, P. F. Bray // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2011. – V. 117. – №. 20. – P. 5289-5296.
143. McRedmond J. P. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes / J. P. McRedmond, S. D. Park, D. F. Reilly [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2004. – V. 3. – № 2. – P. 133-144.
144. Willeit P. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation / P. Willeit P, A. Zampetaki A, K. Dudek [et al.] // *Circulation research*. – 2013. – V. 112. – №. 4. – P. 595-600.
145. Jäger B. Course of platelet miRNAs after cessation of P2Y₁₂ antagonists / B. Jäger, S. Stojkovic, P. M. Haller [et al.] // *European journal of clinical investigation*. – 2019. – V. 49. – № 8. – P. e13149.
146. Carino A. Modulation of circulating microRNAs levels during the switch from clopidogrel to ticagrelor / A. Carino, S. De Rosa, S. Sorrentino [et al.] // *BioMed research international*. – 2016. – V. 2016. – P. 3968206
147. Chen S. Expression of miRNA-26a in platelets is associated with clopidogrel resistance following coronary stenting / S. Chen, X. Qi, H. Chen [et al.] // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2016. – V. 12. – № 1. – P. 518-524.
148. Liu J. Platelet-derived miRNAs as determinants of the antiplatelet response in clopidogrel-treated patients with ACS / J. Liu, L. Qin, Z. Wang [et al.] // *Thrombosis research*. – 2020. – V. 186. – P. 71-74.
149. Czajka P. MicroRNA as Potential Biomarkers of Platelet Function on Antiplatelet Therapy: A Review / P. Czajka, A. Fitas, D. Jakubik [et al.] // *Frontiers in physiology*. – 2021. – V. 12. – P. 498.
150. Tang Q. Plasma miR-142 predicts major adverse cardiovascular events as an intermediate biomarker of dual antiplatelet therapy / Q. J. Tang, H. P. Lei, H. Wu // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2019. – V. 40. – № 2. – P. 208-215.
151. Zhang Y. Y. Decreased circulating microRNA-223 level predicts high on-treatment platelet reactivity in patients with troponin-negative non-ST elevation acute coronary

- syndrome / Y. Y. Zhang, X. Zhou, W. J. Ji [et al.] // Journal of thrombosis and thrombolysis. – 2014. – V. 38. – № 1. – P. 65-72.
152. Chyrchel B. Association of plasma miR-223 and platelet reactivity in patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy: A preliminary report / B. Chyrchel, J. Totoń-Żurańska, O. Kruszelnicka [et al.] // Platelets. – 2015. – V. 26. – № 6. – P. 593-597.
 153. Shi R. Decreased platelet miR-223 expression is associated with high on-clopidogrel platelet reactivity / R. Shi, L. Ge, X. Zhou [et al.] // Thrombosis research. – 2013. – V. 131. – № 6. – P. 508-513.
 154. Peng L. Interaction between platelet-derived microRNAs and CYP2C19* 2 genotype on clopidogrel antiplatelet responsiveness in patients with ACS / L. Peng, J. Liu, L. Qin [et al.] // Thrombosis research. – 2017. – V. 157. – P. 97-102.
 155. He Y. The effects of micro RNA on the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs / Y. He, J. R. Chevillet, G. Liu [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2015. – V. 172. – № 11. – P. 2733-2747.
 156. Yu A. M. MicroRNA pharmacoepigenetics: posttranscriptional regulation mechanisms behind variable drug disposition and strategy to develop more effective therapy / A. M. Yu, Y. Tian, M. J. Tu [et al.] // Drug Metabolism and Disposition. – 2016. – V. 44. – № 3. – P. 308-319.
 157. Rieger J. K. Expression variability of absorption, distribution, metabolism, excretion-related MicroRNAs in human liver: Influence of nongenetic factors and association with gene expression / J. K. Riege, K. Klein, S. Winter [et al.] // Drug Metabolism and Disposition. – 2013. – V. 41. – № 10. – P. 1752-1762.
 158. Nakano M. Current knowledge of microRNA-mediated regulation of drug metabolism in humans / M. Nakano, M. Nakajima // Expert opinion on drug metabolism & toxicology. – 2018. – V. 14. – № 5. – P. 493-504.
 159. Tang Q. J. Plasma miR-142 accounting for the missing heritability of CYP3A4/5 functionality is associated with pharmacokinetics of clopidogrel / Q. J. Tang, H. M. Lin, G. D. He // Pharmacogenomics. – 2016. – V. 17. – № 14. – P. 1503-1517.

160. Zhou W. L. microRNA-605 rs2043556 polymorphisms affect clopidogrel therapy through modulation of CYP2B6 and P2RY12 in acute coronary syndrome patients / W. L. Zhou, Z. Z. Mo, F. Y. Xiao [et al.] // *Platelets*. – 2020. – V. 31. – №. 7. – P. 897-905.
161. Sharma A. R. Coding SNPs in hsa-miR-1343-3p and hsa-miR-6783-3p target sites of CYP2C19 modulates clopidogrel response in individuals with cardiovascular diseases / A. R. Sharma, M. Vohra, V. Shukla [et al.] // *Life sciences*. – 2020. – V. 245. – P. 117364.
162. Yu D. MicroRNA hsa-miR-29a-3p modulates CYP2C19 in human liver cells / D. Yu, B. Green, W. H. Tolleson [et al.] // *Biochemical pharmacology*. – 2015. – V. 98. – №. 1. – P. 215-223.
163. Beger R. D. Current concepts in pharmacometabolomics, biomarker discovery, and precision medicine / R. D. Beger, M. A. Schmidt, R. Kaddurah-Daouk // *Metabolites*. – 2020. – V. 10. – №. 4. – P. 129.
164. Neavin D. Pharmacometabolomics informs pharmacogenomics / D. Neavin, R. Kaddurah-Daouk, R. Weinshilboum // *Metabolomics*. – 2016. – V. 12. – №. 7. – P. 1-6.
165. Kantae V. Integration of pharmacometabolomics with pharmacokinetics and pharmacodynamics: towards personalized drug therapy / V. Kantae, E. H. J. Krekels, M. J. V. Esdonk // *Metabolomics*. – 2017. – V. 13. – №. 1. – P. 1-11.
166. Dona A. C. Precision high-throughput proton NMR spectroscopy of human urine, serum, and plasma for large-scale metabolic phenotyping / A. C. Dona, B. Jiménez, H. Schäfer [et al.] // *Analytical chemistry*. – 2014. – V. 86. – №. 19. – P. 9887-9894.
167. Sillén H., Cook M., Davis P. Determination of ticagrelor and two metabolites in plasma samples by liquid chromatography and mass spectrometry / H. Sillén, M. Cook, P. Davis // *Journal of Chromatography B*. – 2010. – V. 878. – №. 25. – P. 2299-2306.
168. Amin A. M. Pharmacometabolomics analysis of plasma to phenotype clopidogrel high on treatment platelets reactivity in coronary artery disease patients / A. M. Amin, L. Sheau Chin, C. H. Teh [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2018. – V. 117. – P. 351-361.

169. Amin A. M. et al. ¹H NMR based pharmacometabolomics analysis of urine identifies metabolic phenotype of clopidogrel high on treatment platelets reactivity in coronary artery disease patients / A. M. Amin, L. S. Chin, C. H. The [et al.] // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2017. – V. 146. – P. 135-146.
170. Galteau M. M. Urinary 6 β -hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals / M. M. Galteau, F. Shamsa // European journal of clinical pharmacology. – 2003. – V. 59. – №. 10. – P. 713-733.
171. Diczfalussy U. 4 β -Hydroxycholesterol as an endogenous marker for CYP3A4/5 activity. Stability and half-life of elimination after induction with rifampicin / U. Diczfalussy, K. P. Kanebratt, E. Bredberg [et al.] // British journal of clinical pharmacology. – 2009. – V. 67. – №. 1. – P. 38-43.
172. Rivory L. P. The erythromycin breath test for the prediction of drug clearance / L. P. Rivory, K. A. Slaviero, J. M. Hoskins [et al.] // Clinical pharmacokinetics. – 2001. – V. 40. – №. 3. – P. 151-158.
173. Streetman D. S. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes / D. S. Streetman, Jr J. S. Bertino, A. N. Nafziger // Pharmacogenetics and Genomics. – 2000. – V. 10. – №. 3. – P. 187-216.
174. Mirghani R. A. Quinine 3-hydroxylation as a biomarker reaction for the activity of CYP3A4 in man / R. A. Mirghani, O. Ericsson, G. Tybring [et al.] // European journal of clinical pharmacology. – 2003. – V. 59. – №. 1. – P. 23-28.
175. Anderson G. D. Sex and racial differences in pharmacological response: where is the evidence? Pharmacogenetics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics / Anderson G. D. // Journal of women's health. – 2005. – V. 14. – №. 1. – P. 19-29.
176. Eichelbaum M. CYP3A genetics in drug metabolism / M. Eichelbaum, O. Burk // Nature medicine. – 2001. – V. 7. – №. 3. – P. 285-287.
177. Luo X. Evaluation of CYP3A activity in humans using three different parameters based on endogenous cortisol metabolism / X. Luo, X. M. Li, Z. Y. Hu [et al.] // Acta Pharmacologica Sinica. – 2009. – V. 30. – №. 9. – P. 1323-1329.

178. Özdemir V. et al. Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method / V. Ozdemir, W. Kalow, B. K. Tang [et al.] // *Pharmacogenetics and Genomics*. – 2000. – V. 10. – №. 5. – P. 373-388.
179. Lau W. C. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance / W. C. Lau, P. A. Gurbel, P. B. Watkins [et al.] // *Circulation*. – 2004. – V. 109. – №. 2. – P. 166-171.
180. Nylen H. Studies on 4 β -hydroxycholesterol, a marker of CYP3A activity, and its association with 25-hydroxyvitamin D: thesis for a doctoral degree (Ph. D.). – Stockholm, 2015. – 51 pp.
181. Peng C. C. Evaluation of 6 β -hydroxycortisol, 6 β -hydroxycortisone, and a combination of the two as endogenous probes for inhibition of CYP3A4 in vivo / C. C. Peng, I. Templeton, K. E. Thummel [et al.] // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2011. – V. 89. – №. 6. – P. 888-895.
182. Lee S. The utility of CYP3A activity endogenous markers for evaluating drug-drug interaction between sildenafil and CYP3A inhibitors in healthy subjects / S. Lee, A. H. Kim, S. Yoon [et al.] // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 2021. – V. 36. – P. 100368.
183. Taubert D. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose / D. Taubert, A. Kastrati, S. Harlfinger [et al.] // *Thrombosis and haemostasis*. – 2004. – V. 92. – №. 8. – P. 311-316.
184. Amin A. M. et al. The personalization of clopidogrel antiplatelet therapy: the role of integrative pharmacogenetics and pharmacometabolomics / A. M. Amin, L. Sheau Chin, D. Azri Mohamed Noor [et al.] // *Cardiology research and practice*. – 2017. – V. 2017. – P. 8062796.
185. Peer C. J. A sensitive and rapid ultra HPLC–MS/MS method for the simultaneous detection of clopidogrel and its derivatized active thiol metabolite in human plasma / C. J. Peer, S. D. Spencer, D. A. VanDenBerg [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2012. – V. 880. – P. 132-139.

186. Karaźniewicz-Łada M. Clinical pharmacokinetics of clopidogrel and its metabolites in patients with cardiovascular diseases / M. Karaźniewicz-Łada, D. Danielak, P. Burchardt [et al.] // *Clinical pharmacokinetics*. – 2014. – V. 53. – №. 2. – P. 155-164.
187. Frelinger A. L. Clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics vary widely despite exclusion or control of polymorphisms (CYP2C19, ABCB1, PON1), noncompliance, diet, smoking, co-medications (including proton pump inhibitors), and pre-existent variability in platelet function / A. L. Frelinger, D. L. Bhatt, R. D. Lee [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2013. – V. 61. – №. 8. – P. 872-879.
188. Brandt J. T. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel / J. T. Brandt, S. L. Close, S. J. Iturria [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – V. 5. – №. 12. – P. 2429-2436.
189. Kim H. S. The pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction of clopidogrel and cilostazol in relation to CYP2C19 and CYP3A5 genotypes / H. S. Kim, Y. Lim, M. Oh [et al.] // *British journal of clinical pharmacology*. – 2016. – V. 81. – №. 2. – P. 301-312.
190. Taubert D. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption / D. Taubert D, N. von Beckerath, G. Grimberg [et al.] // *Clinical pharmacology & therapeutics*. – 2006. – V. 80. – №. 5. – P. 486-501.
191. Zhong W. P. Genomewide association study identifies novel genetic loci that modify antiplatelet effects and pharmacokinetics of clopidogrel / W. P. Zhong, H. Wu, J. Y. Chen [et al.] // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2017. – V. 101. – №. 6. – P. 791-802.
192. Chen Y. Influences of an NR1I2 polymorphism on heterogeneous antiplatelet reactivity responses to clopidogrel and clinical outcomes in acute ischemic stroke patients / Y. B. Chen, Z. Y. Zhou, G. M. Li [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2019. – V. 40. – №. 6. – P. 762-768.
193. Brandt J. T. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation / J.

- T. Brandt, C. D. Payne, S. D. Wiviott [et al.] // *American heart journal*. – 2007. – V. 153. – №. 1. – P. 66.e9-66.e16.
194. Patel N. K. Rapid LC—ESI-MS—MS method for the simultaneous determination of Clopidogrel and its carboxylic acid metabolite in human plasma / N. K. Patel, G. Subbaiah, H. Shah [et al.] // *Journal of chromatographic science*. – 2008. – V. 46. – №. 10. – P. 867-875.
 195. Mani H. Determination of clopidogrel main metabolite in plasma: a useful tool for monitoring therapy? / H. Mani, S. W. Toennes, B. Linnemann [et al.] // *Therapeutic drug monitoring*. – 2008. – V. 30. – №. 1. – P. 84-89.
 196. Alvitigala B. Y. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacogenetic assays to monitor clopidogrel therapy / B. Y. Alvitigala, L. V. Gooneratne, G. R. Constantine [et al.] // *Pharmacology Research & Perspectives*. – 2020. – V. 8. – №. 6. – P. e00686.
 197. Adamski P. Comparison of bioavailability and antiplatelet action of ticagrelor in patients with ST-elevation myocardial infarction and non-ST-elevation myocardial infarction: A prospective, observational, single-centre study / P. Adamski, J. Sikora, E. Laskowska [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – V. 12. – №. 10. – P. e0186013.
 198. Adamski P. Metabolism of ticagrelor in patients with acute coronary syndromes / P. Adamski, K. Buszko, J. Sikora [et al.] // *Scientific reports*. – 2018. – V. 8. – №. 1. – P. 1-8.
 199. Kubica J. Impact of morphine on antiplatelet effects of oral P2Y₁₂ receptor inhibitors / J. Kubica, A. Kubica, B. Jilma [et al.] // *International journal of cardiology*. – 2016. – V. 215. – P. 201-208.
 200. Liu S. Effect of CYP3A4* 1G and CYP3A5* 3 polymorphisms on pharmacokinetics and pharmacodynamics of ticagrelor in healthy chinese subjects / S. Liu, X. Shi, X. Tian [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2017. – V. 8. – P. 176.
 201. Zhu Q. et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic factors contributing to platelet function recovery after single dose of Ticagrelor in healthy subjects / Q. Zhu, W. Zhong, X. Wang [et al.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2019. – V. 10. – P. 209.

202. Brockmüller J. Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment / J. Brockmüller, M. V. Tzvetkov // *European journal of clinical pharmacology*. – 2008. – V. 64. – №. 2. – P. 133-157.
203. Bermisheva M. A. Diversity of mitochondrial DNA haplogroups in ethnic populations of the Volga–Ural region / M. A. Bermisheva, K. Tambets, R. Villems [et al.] // *Molecular biology*. – 2002. – V. 36. – №. 6. – P. 802-812.
204. Malyarchuk B. Mitogenomic diversity in Tatars from the Volga-Ural region of Russia / B. Malyarchuk, M. Derenko, G. Denisova [et al.] // *Molecular biology and evolution*. – 2010. – V. 27. – №. 10. – P. 2220-2226.
205. Limborska S. A., Khusnutdinova E. K. Ethnogenomics of the peoples of the Volga-Ural's region / S. A. Limborska, E. K. Khusnutdinova // Nauka Publishing. – 2002. – 250 pp.
206. Халикова А. Р. Изучение полиморфизма гена цитохрома Р-450 CYP2C19 в популяции татар, проживающих на территории Республики Татарстан / А. Р. Халикова, А. А. Архипова, И. И. Ахметов [и др.] // *Практическая медицина*. – 2012. – Т. 58. - №. 3 – С. 53-55.
207. Korytina G. Polymorphisms of cytochrome p450 genes in three ethnic groups from Russia / G. Korytina, O. Kochetova, L. Akhmadishina [et al.] // *Balkan medical journal*. – 2012. – V. 29. – №. 3. – P. 252.
208. Sychev D. A. 1846G> A polymorphism of CYP2D6 gene and extrapyramidal side effects during antipsychotic therapy among Russians and Tatars: a pilot study / D. A. Sychev, I. S. Burashnikova, R. E. Kazakov // *Drug metabolism and personalized therapy*. – 2016. – V. 31. – №. 4. – P. 205-212.
209. Gareeva A. E. Polymorphism of brain neurotransmitter system genes: Search for pharmacogenetic markers of haloperidol efficiency in Russians and Tatars / A. E. Gareeva, K. O. Kinyasheva, D. Y. Galaktionova [et al.] // *Molecular Biology*. – 2015. – V. 49. – №. 6. – P. 858-866.
210. Gareeva A. E. Polymorphism of the glutamate receptor genes and risk of paranoid schizophrenia in Russians and Tatars from the Republic of Bashkortostan / A. E.

- Gareeva, E. K. Khusnutdinova // *Molecular Biology*. – 2014. – V. 48. – №. 5. – P. 671-680.
211. Ромодановский Д. Частоты «медленных» аллельных вариантов генов, кодирующих изоферменты цитохрома P450, CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 у карачаевцев и черкесов / Д. Ромодановский, Б. Хапаев, И. Игнатьев [и др.] // *Биомедицина*. – 2010. – №2. – С. 33-37
 212. Mirzaev K. B. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes and transport proteins in a Russian population and three ethnic groups of Dagestan / K. B. Mirzaev, D. A. Sychev, K. A. Ryzhikova [et al.] // *Genetic testing and molecular biomarkers*. – 2017. – V. 21. – №. 12. – P. 747-753.
 213. Baturin V. Study of CYP2C9 gene polymorphism in ethnic groups of the population of stavropol region / V. Baturin, A. Tsarukyan, E. Kolodijchuk // *Med. News North Caucasus*. – 2014. – V. 9. – №. 1. – P. 51-58.
 214. CYP2C19. Pharmacogene Variation Consortium. URL: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C19> [Просмотрено 22 июня 2021 г.]
 215. Sim S. C. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants / S. C. Sim, C. Risinger, M.-L. Dahl [et al.] // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2006. – V. 79. – №. 1. – P. 103-113.
 216. CYP2C19 frequency table. URL: https://api.pharmgkb.org/v1/download/file/attachment/CYP2C19_frequency_table.xlsx. [Просмотрено 22 июня 2021 г.]
 217. Yasumori T. Cytochrome P450 mediated metabolism of diazepam in human and rat: involvement of human CYP2C in N-demethylation in the substrate concentration-dependent manner / T. Yasumori, K. Nagata, S. K. Yang [et al.] // *Pharmacogenetics*. – 1993. – V. 3. – №. 6. – P. 291-301.
 218. Brøsen K. Some aspects of genetic polymorphism in the biotransformation of antidepressants / Brøsen K. // *Therapies*. – 2004. – V. 59. – №. 1. – P. 5-12.
 219. Li X. Q. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human

- cytochrome P450 activities / X. Q. Li, T. B. Andersson, M. Ahlström [et al.] // Drug metabolism and disposition. – 2004. – V. 32. – №. 8. – P. 821-827.
220. Hulot J. S. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects / J. S. Hulot, A. Bura, E. Villard [et al.] // Blood. – 2006. – V. 108. – №. 7. – P. 2244-2247.
221. Bockeria O. L. The possibility of selecting optimal antiplatelet therapy in patients with coronary heart disease in terms of CYP2C19 polymorphism / O. L. Bockeria, Z. F. Kudzoeva, V. A. Shvarts [et al.] // Terapevticheskii arkhiv. – 2016. – V. 88. – №. 5. – P. 47-54.
222. Golukhova E. Z. Clopidogrel response variability: impact of genetic polymorphism and platelet biomarkers for predicting adverse outcomes poststenting / E. Z. Golukhova, M. N. Ryabinina, N. I. Bulaeva [et al.] // American journal of therapeutics. – 2015. – V. 22. – №. 3. – P. 222-230.
223. Golukhova E. Z. Body mass index and plasma P-selectin before coronary stenting predict high residual platelet reactivity at 6 months on dual antiplatelet therapy / E. Z. Golukhova, M. V. Grigoryan, M. N. Ryabinina [et al.] // Cardiology. – 2018. – V. 139. – №. 2. – P. 132-136.
224. Muslimova E. F. Association of ITGB3, P2RY12, and CYP2C19 gene polymorphisms with platelet functional activity in patients with coronary heart disease during dual antiplatelet therapy / E. F. Muslimova, S. A. Afanasiev, T. Y. Rebrova [et al.] // Terapevticheskii arkhiv. – 2017. – V. 89. – №. 5. – P. 74-78.
225. Fedorinov D. S. Pharmacogenetic testing by polymorphic markers 681G> A and 636G> A CYP2C19 gene in patients with acute coronary syndrome and gastric ulcer in the Republic of Sakha (Yakutia) / D. S. Fedorinov, K. B. Mirzaev, D. V. Ivashchenko [et al.] // Drug metabolism and personalized therapy. – 2018. – V. 33. – №. 2. – P. 91-98.
226. Mirzaev K. B. CYP2C19 polymorphism frequency in Russian patients in Central Russia and Siberia with acute coronary syndrome / K. B. Mirzaev, E. Zelenskaya, O. Barbarash // Pharmacogenomics and personalized medicine. – 2017. – V. 10. – P. 107-114.

227. CYP2C9. Pharmacogene Variation Consortium. URL:
<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C9> [Просмотрено 22 июня 2021 г.]
228. CYP2C9 frequency table. URL:
https://api.pharmgkb.org/v1/download/file/attachment/CYP2C9_frequency_table.xls
x. [Просмотрено 22 июня 2021 г.]
229. Kirchheiner J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms / J. Kirchheiner, J. Brockmöller // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2005. – V. 77. – №. 1. – P. 1-16.
230. Барышева В. О., Кетова Г. Г. Анализ распространенности генотипов по данным фармакогенетического тестирования / В. О. Барышева, Г. Г. Кетова // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – №. 4. – С. 58-58.
231. Ivashchenko D. The frequency of CYP2C9, VKORC1, and CYP4F2 polymorphisms in Russian patients with high thrombotic risk / D. Ivashchenko, I. Rusin, D. Sychev [et al.] // *Medicina*. – 2013. – V. 49. – №. 12. – P. 517-521.
232. Pchelina S. N. The frequency of cytochrome P450 2C9 genetic variants in the Russian population and their associations with individual sensitivity to warfarin therapy / S. N. Pchelina, O. V. Sirotkina, A. E. Taraskina [et al.] // *Thrombosis research*. – 2005. – V. 115. – №. 3. – P. 199-203.
233. Батурин В. А. Исследование полиморфизма гена сур2с9в этнических группах населения Ставропольского края / В. А. Батурин, А. А. Царукян, Е. В. Колодийчук // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2014. – Т. 9. – №. 1 - С. 33.
234. Makeeva O. Global pharmacogenetics: genetic substructure of Eurasian populations and its effect on variants of drug-metabolizing enzymes / O. Makeeva, V. Stepanov, V. Puzyrev [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2008. – V. 9 - №. 7. – P. 847-868
235. Gra O. Microarray-Based Detection of CYP1A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, GSTT1, GSTM1, MTHFR, MTRR, NQO1, NAT2, HLA-DQA1, and AB0 Allele Frequencies in Native Russians / O. Gra, O. Mityaeva, I. Berdichevets [et al.] // *Genetic testing and molecular biomarkers*. – 2010. – V. 14. – №. 3. – P. 329-342.

236. Gaikovitch E. A. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population / E. A. Gaikovitch, I. Cascorbi, P. M. Mrozikiewicz [et al.] // *European journal of clinical pharmacology*. – 2003. – V. 59. – №. 4. – P. 303-312.
237. Gra O. A. Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing genes and the risk of chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adult Russian patients / O. A. Gra, A. S. Glotov, E. A. Nikitin [et al.] // *American journal of hematology*. – 2008. – V. 83. – №. 4. – P. 279-287.
238. Vasilyev F. F. Frequency distribution of polymorphisms of CYP2C19, CYP2C9, VKORC1 and SLCO1B1 genes in the Yakut population / F. F. Vasilyev, D. A. Danilova, V. S. Kaimonov [et al.] // *Research in pharmaceutical sciences*. – 2016. – V. 11. – №. 3. – P. 259.
239. Sychev D. A. Comparison of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, ABCB1, and SLCO1B1 gene-polymorphism frequency in Russian and Nanai populations / D. Sychev, G. Shuev, S. Suleymanov [et al.] // *Pharmacogenomics and personalized medicine*. – 2017. – V. 10. – C. 93-99.
240. Takeuchi F. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose / F. Takeuchi, R. McGinnis, S. Bourgeois [et al.] // *PLoS genetics*. – 2009. – V. 5. – №. 3. – P. e1000433.
241. Ross K. A. Worldwide allele frequency distribution of four polymorphisms associated with warfarin dose requirements / K. A. Ross, A. W. Bigham, M. Edwards [et al.] // *Journal of human genetics*. – 2010. – V. 55. – №. 9. – P. 582-589.
242. Borgiani P. CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population / P. Borgiani, C. Ciccacci, V. Forte [et al.] // – 2009. – V. 10. - №. 2. – P. 261-266.
243. Sakiene R. CYP4F2 (rs2108622) gene polymorphism association with age-related macular degeneration / R. Sakiene, A. Vilkeviciute, L. Kriauciuniene [et al.] // *Advances in medicine*. – 2016. – V. 2016. – P. 3917916.

244. Scott S. A. Combined CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 frequencies among racial and ethnic groups / S. A. Scott, R. Khasawneh, I. Peter [et al.] // Pharmacogenomics. – 2010. – V. 11. – №. 6. – P. 781-791.
245. Li S. Warfarin dosage response related pharmacogenetics in Chinese population / S. Li, Y. Zou, X. Wang [et al.] // PloS one. – 2015. – V. 10. – №. 1. – P. e0116463.
246. Fu Z. Haplotype-based case-control study of the human CYP4F2 gene and essential hypertension in Japanese subjects / Z. Fu, T. Nakayama, N. Sato [et al.] // Hypertension Research. – 2008. – V. 31. – №. 9. – P. 1719-1726.
247. Kim K. A. Multiplex pyrosequencing method to determine CYP2C9* 3, VKORC1* 2, and CYP4F2* 3 polymorphisms simultaneously: its application to a Korean population and comparisons with other ethnic groups / K. A. Kim, W. G. Song, H. M. Lee [et al.] // Molecular biology reports. – 2014. – V. 41. – №. 11. – P. 7305-7312.
248. Very Important Pharmacogene: MT-RNR1. Pharmacogenomics Knowledge Base. URL: <https://www.pharmgkb.org/vip/PA166170041>. [Просмотрено 22 июня 2021 г.]
249. rs776746 Reference SNP (rs) Report. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs776746#frequency_tab. [Просмотрено 22 июня 2021 г.]
250. Грабуздов А.М. Сравнение частоты встречаемости однонуклеотидного варианта CYP3A5*3 в этнических группах русских и нанайцев / А. М. Грабуздов, Г. Н. Шуев, С. Ш. Сулейманов [и др.] // Фармакогенетика и Фармакогеномика. – 2017. – №. 2. – С. 48-49.
251. Kazakov R. E. Prospects of using C3435T polymorphism in the ABCB1 gene encoding P-glycoprotein in personalised medicine / R. E. Kazakov, V. A. Evteev, O. V. Muslimova [et al.] // The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. – 2017. – V. 7. – №. 4. – P. 212-220.
252. Aszalos A. Drug–drug interactions affected by the transporter protein, P-glycoprotein (ABCB1, MDR1): II. Clinical aspects / A. Aszalos // Drug discovery today. – 2007. – V. 12. – №. 19-20. – P. 838-843.

253. Fung K. L. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function / K. L. Fung, M. M. Gottesman // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. – 2009. – V. 1794. – №. 5. – P. 860-871.
254. Sychev D. Effects of ABCB1 rs1045642 polymorphisms on the efficacy and safety of amlodipine therapy in Caucasian patients with stage I–II hypertension / D. Sychev, N. Shikh, T. Morozova [et al.] // *Pharmacogenomics and personalized medicine*. – 2018. – V. 11. – P. 157-165.
255. Rozhkov A. ABCB1 polymorphism and acenocoumarol safety in patients with valvular atrial fibrillation / A. Rozhkov, D. A. Sychev, R. E. Kazakov // *International Journal of Risk & Safety in Medicine*. – 2015. – V. 27. – №. s1. – P. S15-S16.
256. Salnikova L. E. Functional polymorphisms in the CYP1A1, ACE, and IL-6 genes contribute to susceptibility to community-acquired and nosocomial pneumonia / L. E. Salnikova, T. V. Smelaya, V. V. Moroz [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2013. – V. 17. – №. 6. – P. e433-e442.
257. Kryukov A. V. Influence of ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms on pharmacokinetics of apixaban in patients with atrial fibrillation and acute stroke / A. V. Kryukov, D. A. Sychev, D. A. Andreev [et al.] // *Pharmacogenomics and personalized medicine*. – 2018. – V. 11. – P. 43-49.
258. Sychev D. A. The impact of CYP4F2, ABCB1, and GGCX polymorphisms on bleeding episodes associated with acenocoumarol in Russian patients with atrial fibrillation / D. A. Sychev, A. V. Rozhkov, R. E. Kazakov [et al.] // *Drug metabolism and personalized therapy*. – 2016. – V. 31. – №. 3. – P. 173-178.
259. SEARCH Collaborative Group. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy—a genomewide study / SEARCH Collaborative Group // *New England Journal of Medicine*. – 2008. – V. 359. – №. 8. – P. 789-799.
260. Sychev D. A. The frequency of SLCO1B1*5 polymorphism genotypes among Russian and Sakha (Yakutia) patients with hypercholesterolemia / G. Shuev, D. Sychev, J. Chertovskih [et al.] // *Pharmacogenomics and personalized medicine*. – 2016. – V. 9. – P. 59-63.

261. Vasilyev F. F. Frequency distribution of polymorphisms of CYP2C19, CYP2C9, VKORC1 and SLCO1B1 genes in the Yakut population / F. F. Vasilyev, D. A. Danilova, V. S. Kaimonov [et al.] // Research in pharmaceutical sciences. – 2016. – V. 11. – №. 3. – P. 259-64.
262. Хохлов А. А. Аспекты безопасного применения статинов: межлекарственное взаимодействие, фармакогенетические вопросы / А. А. Хохлов, Д. А. Сычев, А. М. Сироткина // Universum: медицина и фармакология. – 2016. – №. 1-2 (24).
263. Солодун М. В. Особенности гиполипидемической терапии аторвастатином при инфаркте миокарда с позиций персонализированной медицины / М. В. Солодун, С. С. Якушин // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2015. – Т. 11. – №. 1. – С. 31-35
264. Wang D. Human carboxylesterases: a comprehensive review / D. Wang, L. Zou, Q. Jin [et al.] // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2018. – V. 8. – №. 5. – P. 699-712.
265. Shi J. Dabigatran etexilate activation is affected by the CES1 genetic polymorphism G143E (rs71647871) and gender / J. Shi, X. Wang, J. H. Nguyen [et al.] // Biochemical pharmacology. – 2016. – V. 119. – P. 76-84.
266. Сычев Д. А. Генетические детерминанты безопасности применения прямого ингибитора тромбина среди этнических групп Российской Федерации / Д. А. Сычев, Ш. П. Абдуллаев, К. Б. Мирзаев [и др.] // Биомедицина. – 2019. – Т. 15. – №. 1. – С. 78-94
267. Абдуллаев Ш. П. Распространенность полиморфного маркера rs2244613 гена карбоксилэстеразы 1 типа (CES1), ассоциированного с низким риском кровотечений при применении дабигатрана, у русских и в трех этнических группах Республики Дагестан / Ш. П. Абдуллаев, К. Б. Мирзаев, С. Н. Маммаев [и др.] // Клиническая Фармакология и Терапия. – 2018. – Т. 27. – №. 4. – С. 87-90
268. Мирзаев К. Б. Влияния полиморфизма гена CES1 на антиагрегантный эффект блокатора P2Y₁₂ рецепторов клопидогрела / К. Б. Мирзаев, Д. В. Осипова, Е. Ю. Китаева [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. – 2018. – Т. 27. – №. 5. – С. 96-100.

269. Балановская Е. В. Картографический атлас распространения 45 фармакогенетических маркеров в народонаселении России и сопредельных стран / Е. В. Балановская, В. С. Петрушенко, С. М. Кошель [и др.] // Вестник РГМУ. - 2020. - №. 6. – С. 39-51.
270. Podda G. M. Prediction of high on-treatment platelet reactivity in clopidogrel-treated patients with acute coronary syndromes / G. M. Podda, E. Grossi, T. Palmerini [et al.] // International journal of cardiology. – 2017. – V. 240. – P. 60-65.
271. Grossi E. Artificial Adaptive Systems and predictive medicine: a revolutionary paradigm shift / E. Grossi // Immunity & Ageing. – BioMed Central, 2010. – V. 7. – №. 1. – P. 1-5.
272. Miura G. Genetic and non-genetic factors responsible for antiplatelet effects of clopidogrel in Japanese patients undergoing coronary stent implantation: an algorithm to predict on-clopidogrel platelet reactivity / G. Miura, N. Ariyoshi, Y. Sato [et al.] // Thrombosis research. – 2014. – V. 134. – №. 4. – P. 877-883.
273. Hernandez-Suarez D. F. et al. Pharmacogenetic association study on clopidogrel response in Puerto Rican Hispanics with cardiovascular disease: a novel characterization of a Caribbean population / D. F. Hernandez-Suarez, M. R. Botton, S. A. Scott [et al.] // Pharmacogenomics and personalized medicine. – 2018. – V. 11. – P. 95-106.
274. Курчева Н. П. Многофакторный алгоритм прогнозирования антиагрегантного действия клопидогрела, как потенциальный способ повышения эффективности и безопасности антиагрегантной терапии / Н. П. Курчева, К. Б. Мирзаев, Д. А. Сычёв // Фармакогенетика и Фармакогеномика. - 2015. - №. 2. – С. 29-32.
275. VerifyNow P2Y12 Platelet Reactivity Test instructions for use – English. URL: <https://www.instrumentationlaboratory.com/en/verifynow-system>. [Просмотрено 22 июня 2021 г.]
276. Müller I. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement / I. Müller, F. Besta, C. Schulz [et al.] // Thrombosis and haemostasis. – 2003. – V. 89. – №. 5. – P. 783-787.

277. Genome Aggregation Database. URL: <https://gnomad.broadinstitute.org>.
[Просмотрено 22 июня 2021 г.]
278. Смирнов В.В. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6- β -гидрокортизола в моче с целью определения активности изофермента CYP 3A4 / В. В. Смирнов, А. Ю. Савченко, Г. В. Раменская // Биомедицина. - 2010. – Т. 1. - №. 4. – С. 56-60.
279. Сычев Д. А. Рекомендации для фармацевтических компаний по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных и внесение информации в инструкции по применению / науч. ред. В. Г. Кукес // Москва. – 2009.
280. Abdullaev S. P. Clinically relevant pharmacogenetic markers in Tatars and Balkars / S. P. Abdullaev, K. B. Mirzaev, I. S. Burashnikova [et al.] // Molecular biology reports. – 2020. – V. 47. – №. 5. – P. 3377-3387.
281. Fedorinov D. S. Pharmacogenetic testing by polymorphic markers 681G>A and 636G>A CYP2C19 gene in patients with acute coronary syndrome and gastric ulcer in the Republic of Sakha (Yakutia) / D. S. Fedorinov, K. B. Mirzaev, D. V. Ivashchenko [et al.] // Drug metabolism and personalized therapy. – 2018. – V. 33. – №. 2. – P. 91-98.
282. Fedorinov D. S. Pharmacogenetic testing by polymorphic markers G1846A (CYP2D6*4) and C100T (CYP2D6*10) of the CYP2D6 gene in coronary heart disease patients taking $\beta\beta$ -blockers in the Republic of Sakha (YAKUTIA) / D. S. Fedorinov, K. B. Mirzaev, V. R. Mustafina [et al.] // Drug metabolism and personalized therapy. – 2018. – V. 33. – №. 4. – P. 195-200.
283. Mirzaev K. B. Interethnic differences in the prevalence of main cardiovascular pharmacogenetic biomarkers / K. B. Mirzaev, S. P. Abdullaev, K. A. Akmalova [et al.] // Pharmacogenomics. – 2020. – V. 21. – №. 10. – P. 677-694.
284. Mirzaev K. B. ADME pharmacogenetics: future outlook for Russia / K. B. Mirzaev, D. S. Fedorinov, D. V. Ivashchenko [et al.] // Pharmacogenomics. – 2019. – V. 20. – №. 11. – P. 847-865.

285. Mirzaev K. B. Effects of the rs2244613 polymorphism of the CES1 gene on the antiplatelet effect of the receptor P2Y12 blocker clopidogrel / K. B. Mirzaev, D. V. Osipova, E. J. Kitaeva [et al.] // Drug metabolism and personalized therapy. – 2019. – V. 34. – №. 3. – P. 20180039.
286. Mirzaev K. B. The ABCB1, CYP2C19, CYP3A5 and CYP4F2 genetic polymorphisms and platelet reactivity in the early phases of acute coronary syndromes / K. B. Mirzaev, E. Rytkin, K. A. Ryzhikova [et al.] // Drug metabolism and personalized therapy. – 2018. – V. 33. – №. 3. – P. 109-118.
287. Mirzaev K. B. Genotyping and phenotyping CYP3A4\CYP3A5: no association with antiplatelet effect of clopidogrel / K. B. Mirzaev, K. I. Samsonova, P. P. Potapov [et al.] // Molecular biology reports. – 2019. – V. 46. – №. 4. – P. 4195-4199.
288. Rytkin E. Do CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms and low CYP3A4 isoenzyme activity have an impact on stent implantation complications in acute coronary syndrome patients? / E. Rytkin, K. B. Mirzaev, E. A. Grishina [et al.] // Pharmacogenomics and personalized medicine. – 2017. – V. 10. – P. 243.
289. Rytkin E. Selection of miRNAs for clopidogrel resistance prediction / E. Rytkin, K. B. Mirzaev, I. V. Bure [et al.] // Meta Gene. – 2020. – V. 25. – P. 100745.
290. Sychev D. A. Genetic determinants of dabigatran safety (CES1 gene rs2244613 polymorphism) in the Russian population: multi-ethnic analysis / D. A. Sychev, S. P. Abdullaev, K. B. Mirzaev [et al.] // Molecular biology reports. – 2019. – V. 46. – №. 3. – P. 2761-2769.
291. Sychev D. A. CYP2C19*17 May Increase the Risk of Death Among Patients with an Acute Coronary Syndrome and Non-Valvular Atrial Fibrillation Who Receive Clopidogrel and Rivaroxaban / D. A. Sychev, O. A. Baturina, K. B. Mirzaev [et al.] // Pharmacogenomics and personalized medicine. – 2020. – V. 13. – P. 29.
292. Sychev D. A. Comparison of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, ABCB1, and SLCO1B1 gene-polymorphism frequency in Russian and Nanai populations / D. A. Sychev, G. N. Shuev, S. S. Suleymanov [et al.] // Pharmacogenomics and personalized medicine. – 2017. – V. 10. – P. 93.

293. Абдуллаев Ш. П. Распространенность полиморфного маркера rs2244613 гена карбоксилэстеразы 1 типа (CES1), ассоциированного с низким риском кровотечений при применении дабигатрана, у русских и в трех этнических группах республики Дагестан / Ш. П. Абдуллаев, К. Б. Мирзаев, С. Н. Маммаев [и др.] // Клиническая Фармакология и Терапия. – 2018. – Т. 27. – №. 4. – С. 87-90.
294. Андреенова М. А. Фармакогенетические и клинические предикторы низкой эффективности клопидогрела у пациента с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей: описание клинического случая / М. А. Андреенова, К. Б. Мирзаев, Д. А. Сычев [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2018. – Т. 14. – №. 5. – С. 699-702.
295. Китаева Е. Ю. Частота полиморфизмов генов CYP2C19 и ABCB1, ассоциированных с изменением антиагрегантного действия клопидогрела, у русских и бурят / Е. Ю. Китаева, В. В. Шпрах, К. Б. Мирзаев [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2018. – №. 3. – С. 43-50.
296. Мирзаев К. Б. Влияние аллельного варианта CYP4F2*3 на антиагрегантное действие клопидогрела у пациентов с острым коронарным синдромом / К. Б. Мирзаев, О. Д. Конова, Е. А. Гришина [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2018. – Т. 14. – №. 1. – С. 47-52.
297. Мирзаев К. Б. Новые фармакогенетические маркеры риска кровотечений на фоне применения прямых оральных антикоагулянтов / К. Б. Мирзаев, Д. В. Иващенко, И. В. Володин // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2020. – Т. 16. – №. 5. – С. 670-677.
298. Мирзаев К. Б. Мультиэтнический анализ кардиологических фармакогенетических маркеров генов цитохрома Р-450 и мембранных транспортеров в российской популяции / К. Б. Мирзаев, Д. С. Федоринов, Д. В. Иващенко [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2019. – Т. 15. – №. 3. – С. 393-406.
299. Рыткин Э. И. Микро-РНК, как новый биомаркер активности системы цитохрома Р-450: значение для прогнозирования антиагрегантного действия ингибиторов

P2Y₁₂-рецепторов. / Э. И. Рыткин, К. Б. Мирзаев, И. В. Буре [и др.] // Терапевтический архив. – 2019. – Т. 91. – №. 8. - С. 115-117.

300. Сычев Д. А. Полиморфизм генов CYP2C19 и ABCB1, ассоциированный с изменением активности клопидогрела, у больных ишемическим инсультом: клинические и этнические аспекты / Д. А. Сычев, В.В. Шпрах, Е. Ю. Китаева [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. – 2019. – Т. 28. – №. 3. – С. 79-84.