

На правах рукописи

МОИСЕЕВА Екатерина Михайловна

**ПЕРСОНАЛИЗАЦИЯ АНТИАГРЕГАНТНОЙ ТЕРАПИИ МЕТОДАМИ
СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА И
ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА**

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки)

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Калининград - 2024 г.

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор

**Рафальский
Владимир
Витальевич**

Доктор медицинских наук, профессор,

**Ройтман
Александр
Польевич**

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры фармакологии лечебного факультета, ученый секретарь ученого совета ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России

**Кантемирова
Бэла
Исмаиловна**

Доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, руководитель отдела лабораторной диагностики ФГБНУ «Научный центр неврологии»

**Шабалина
Алла
Анатольевна**

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» ноября 2024 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета 21.3.054.05 на базе ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д.2/1, стр.1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России по адресу: 125445, г. Москва, ул. Беломорская, д. 19/38 и на сайте <https://www.rmapo.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор

Меньшикова Лариса Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Сохраняется проблема недостаточно высокого ответа пациентов на терапию антиагрегантными препаратами (М.Д. Гончаров и соавт., 2022, М.В. Журавлева и соавт., 2021). О данной особенности ответа на терапию антиагрегантами сообщалось у пациентов с сердечно-сосудистыми, цереброваскулярными и периферическими сосудистыми заболеваниями (В.А. Батурин и соавт., 2020, Б.И. Кантемирова и соавт., 2020).

На сегодняшний день не существует общепринятого определения резистентности к антиагрегантам, в первую очередь по причине отсутствия единого метода оценки действия (фармакодинамики) антиагрегантов и стандартизированных схем коррекции низкой чувствительности к ним (Б.И. Кантемирова и соавт., 2020, Ф.Т. Агеев и соавт., 2023).

Большая часть лабораторных методов исследования функции тромбоцитов измеряют сложные процессы, которые в конечном итоге приводят к агрегации или адгезии тромбоцитов (Т.А. Tyagi et al., 2022). Имеются данные, что уровень устойчивости к ацетилсалициловой кислоте сильно зависит от метода лабораторно диагностики (Р.А. Gurbel et al., 2007, И.В. Сидоренко, 2013), большинство тестов не могут быть использованы для оценки фармакологических эффектов антитромбоцитарных препаратов.

Наиболее часто используемыми методами для изучения антиагрегантных эффектов ацетилсалициловой кислоты являются методы оценки неспецифической функции тромбоцитов, такие как агрегометрия светопропускания (оптическая) или агрегометрия цельной крови (N.V. Russo, В. Росса, 2016, Ю.П. Ковальчук и соавт., 2021)

Оптическая агрегометрия широко используется для мониторинга эффективности антиагрегантной терапии, в том числе ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом. К недостаткам метода можно отнести большие объемы, длительную и сложную подготовку проб (G. Feher et al., 2009) Гемолиз, низкое количество тромбоцитов и гиперлипидемия могут влиять на результат теста (K. Koltai et al. 2017).

Анализатор функции тромбоцитов Innovance PFA-100 и PFA-200 (Siemens) измеряет *in vitro* прекращение потока крови (А.А. Шабалина и соавт., 2019). Это простой, быстрый метод с использованием цельной крови, требует небольших объемов проб. Однако полученный результат зависит от фактора Виллебранда, уровня гематокрита и требует пипетирования (K. Koltai et al., 2017), данные анализаторы совместимы в работе только с оригинальными картриджными системами Siemens.

Импедансная агрегометрия оценивает функцию тромбоцитов в более физиологических условиях, поскольку она выполняется в цельной крови, что позволяет другим элементам крови влиять на агрегацию тромбоцитов (М. Столяр, И.А. Ольховский, 2016). Данный метод требует меньшего времени, пробоподготовка образца не требуется (И.А. Базаев и соавт., 2015). Недостатками является контакт с цельной кровью, частичная автоматизация, высокая стоимость прибора (К.Б. Мирзаев и соавт., 2015)

В связи с вышеизложенным актуальным является разработка, валидация лабораторных методов и создание лабораторных приборов с использованием

предиктивных биомаркеров для повышения эффективности и безопасности терапии антиагрегантными препаратами.

Неразрушающие спектроскопические методы (спектроскопия комбинационного рассеяния и спектроскопия ядерного магнитного резонанса) исследования имеют значительный потенциал для использования в клинической практике для персонализации антиагрегантной терапии. Данные методы являются быстрыми и чувствительными, не требующими трудоемкой пробоподготовки, и могут быть использованы для определения тактики и оценки эффективности терапии антиагрегантами (А. Zyubin et al., 2020, А. Kapara et al., 2020).

Степень разработанности темы

Персонализация терапии антитромботическими препаратами и, как следствие, повышение ее эффективности и безопасности является актуальной задачей современной клинической практики. На сегодняшний день отсутствуют доказанные биомаркеры эффективности, позволяющие с высокой точностью предсказывать ответ на терапию антиагрегантами у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Основные инструменты персонализированной медицины представлены методами: фармакогеномика, эпигенетика, метаболомика, транскриптомика, протеомика, которые объединены термином «омиксные технологии». Наиболее развитым направлением с точки зрения персонализации терапии является фармакогеномика. Современное исследование персонализации фармакотерапии должно включать, помимо генетических, фенотипические биомаркеры (И.И. Мирошниченко, 2023). Исследование фенотипических биомаркеров является важной задачей, поскольку генотипирование не может с точностью определять эффективность фармакотерапии у конкретного пациента (Ф.М. Мухсинов, И.В. Ливерко, 2022)

Исследователи в своих работах сходятся во мнении, что персонализация терапии с использованием только одной "омиксной" технологии невозможна - требуется сочетание нескольких методов для получения наиболее полного профиля эффективности и безопасности (Ф.М. Мухсинов, И.В. Ливерко, 2022, В.И. Петров и соавт., 2023). При этом регулярно появляющимся и затрагивающим данную тему публикациям присущ ряд общих черт, а именно: значительная ограниченность методов исследования фармакокинетики и фармакодинамики, преимущественно обособленное рассмотрение методов оценки фармакодинамической активности антиагрегантов и различия в подходах к проведению исследований.

Организация и проведение комплексных исследований с использованием спектроскопических методов для оценки фармакокинетики и фармакодинамики антиагрегантных препаратов позволят разработать подход к прогнозированию ответа на терапию антиагрегантными препаратами.

Цель исследования

Изучение возможности персонализации терапии антиагрегантными препаратами с использованием методов, основанных на спектроскопии комбинационного рассеяния света, и спектроскопии ^1H -ядерного магнитного резонанса.

Задачи исследования

1. Выявить биомаркеры, связанные с фармакодинамическими эффектами ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела, методом спектроскопии

комбинационного рассеяния света богатой тромбоцитами плазмы с использованием оригинального биосенсора.

2. Установить биомаркеры, позволяющие определять низкую лабораторную эффективность ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, методом спектроскопии комбинационного рассеяния света богатой тромбоцитами плазмы с использованием оригинального биосенсора.

3. Рассчитать пограничные значения для установленных биомаркеров, позволяющие выявлять пациентов с высокими значениями остаточной реактивности тромбоцитов на фоне терапии ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом.

4. Сравнить частоту выявления высокой остаточной реактивности тромбоцитов методами спектроскопии комбинационного рассеяния света и агрегометрии у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, получающих ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел.

5. Применить метод спектроскопии ^1H ядерного магнитного резонанса для детектирования метаболитов ацетилсалициловой кислоты в моче для контроля комплаентности.

Научная новизна исследования

Впервые применен метод спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния с использованием оригинального биосенсора для изучения фармакодинамики ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Выявлены биомаркеры эффективности антиагрегантной терапии у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями методом спектроскопии, соответствующие интенсивностям на частотных сдвигах на 970 см^{-1} для ацетилсалициловой кислоты и 1590 см^{-1} для клопидогрела.

Получены новые данные о фармакодинамике антиагрегантных препаратов методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния с использованием оригинального биосенсора.

Выявлена возможность определения приверженности (комплаентности) пациентов к терапии ацетилсалициловой кислотой методом спектроскопии ^1H ядерного магнитного резонанса.

Расширены представления о возможности определения динамики выведения метаболитов ацетилсалициловой кислоты у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями методом спектроскопии ^1H ядерного магнитного резонанса.

Произведена комплексная оценка возможности применения неразрушающих спектроскопических методов исследования для персонализации антиагрегантной терапии у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования вносят важный вклад в развитие подходов к прогнозированию ответа на терапию антиагрегантными препаратами, а именно ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом.

Представлены объективные данные об информативности спектров гигантского комбинационного рассеяния богатой тромбоцитами плазмы у здоровых добровольцев, пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и под

действием антиагрегантных препаратов, представлены объективные данные о выведении метаболитов ацетилсалициловой кислоты с мочой в динамике.

Разработаны рекомендации по выбору наиболее информативных частотных сдвигов спектров гигантского комбинационного рассеяния для анализа фармакодинамических параметров ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела.

Построены модели машинного обучения и алгоритмы поиска корреляций между частотными сдвигами спектров гигантского комбинационного рассеяния и данными агрегометрии. Выявлены частотные сдвиги, изменение интенсивности сигнала на которых коррелирует с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов у пациентов, получающих антиагреганты.

Полученные в исследовании данные могут быть использованы для разработки комплексных алгоритмов персонализации антиагрегантной терапии пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, разработки прибора для оценки эффективности и безопасности лечения, а также позволят снизить возможные социально-экономические затраты, возникшие вследствие осложнений антиагрегантной терапии.

Методология и методы исследования

Для реализации поставленной цели и решения задач исследования были применены следующие методы: клинический, спектроскопический, статистический, информационный. В основу научно-исследовательской работы легли современные принципы проведения клинических исследований.

Клинический: проведено комплексное обследование здоровых добровольцев и пациентов. Выполнен сбор жалоб и анамнеза, основных показателей жизнедеятельности, физикальное обследование.

Спектроскопический: для получения спектров комбинационного рассеяния света использовался спектрометр Centaur U HR. Агрегационную активность тромбоцитов исследовали при помощи агрегометра Siemens PFA 200. В качестве индукторов агрегации были использованы: коллаген в сочетании с эпинефрином, коллаген в сочетании с аденозиндифосфатом, простагландином E1. Для изучения динамики метаболитов ацетилсалициловой кислоты в моче был использован спектрометр VARIAN 400MR.

Статистический: для статистической обработки, проведения линейного дискриминационного и корреляционного анализа были использованы редактор электронных таблиц MS Excel 7.0 и программный пакет Statistica 13.3. Для оценки гомогенности спектральных данных было применено два подхода: первый основан на снижении размерности спектральных данных и дальнейшей оценке дисперсии и расстояния между данными, второй включает оценку разброса значений парных корреляций, а также их средний момент.

Информационный: для обработки массива спектральных данных были применены алгоритмы машинного обучения с использованием библиотеки `rampru` (манипуляции со спектрами), `scikit-learn`, `XGBoost` (алгоритмы машинного обучения).

Этические аспекты – проведение исследования одобрено Независимым этическим комитетом Центра клинических исследований БФУ им. И.Канта (Выписка из протокола заседания №8 от 16.05.2019)

Основные положения, выносимые на защиту

1. Для оценки фармакодинамических эффектов ацетилсалициловой кислоты может быть применен метод спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния богатой тромбоцитами плазмы с использованием оригинального биосенсора.
2. Для оценки эффективности терапии антиагрегантными препаратами, а именно ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом, у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями может быть использован метод спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света богатой тромбоцитами плазмы.
3. Для контроля комплаентности пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями к терапии и детектирования метаболитов ацетилсалициловой кислоты в моче может быть использован метод спектроскопии ^1H ядерного магнитного резонанса.

Степень достоверности полученных результатов

Необходимая степень достоверности полученных автором результатов достигнута и обусловлена достаточным количеством здоровых добровольцев и пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, включенных в исследование (152 человека), полнотой современного клинического, лабораторного и инструментального исследования, дизайном исследования, соответствующим цели и задачам исследования.

Полученные данные обработаны с использованием современных методов статистического анализа. Обработка полученных данных проводилась с применением обоснованных и адекватных поставленным задачам статистических методов. Выводы и практические рекомендации вытекают из результатов и соответствуют цели и задачам исследования. Достоверность обоснована актом проверки полноты и достоверности первичной документации по кандидатской диссертации от 29 мая 2024 года. Тема диссертации утверждена решением Ученого совета Образовательно-научного кластера «Институт медицины и наук о жизни» (МЕДБИО) БФУ им. И. Канта (выписка из протокола №4 от 28 мая 2024 г.).

Апробация результатов исследования

Апробация работы состоялась на заседании экспертной комиссии для рассмотрения диссертации на соискание ученой степени кандидата наук федерального государственного автономного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени И. Канта» 04 июня 2024 года.

Результаты исследования были доложены и обсуждены на Международном молодежном научном форуме «Ломоносов» (Москва, 2019), 6th Annual European Congress on Clinical & Translational Sciences (EUSTM-2019) (Austria, 2019), XXII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2019), Российском Национальном конгрессе кардиологов 2020 (Казань, 2020), Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2021), XVII Международном научном конгрессе «Рациональная фармакотерапия «Золотая осень»» (Санкт-Петербург, 2022), Международной конференции «Sensing and quantum information in fluorescent nanomaterials» (Казань, 2022), 2nd International

Conference on Innovative Sciences and Technologies for Research and Education (InnoSTRE) 2022 (Borneo Convention Centre Kuching (BCCK), 2022), Международной научно-практической конференции «Дни науки - 2024» (Бишкек, 2024)

Получены патенты РФ на изобретение: № 2788479 «Планарный наноструктурированный сенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса для усиления комбинационного рассеяния света тромбоцитов человека и способ его получения», № 2023618212 «Программа классификации массивов спектров комбинационного рассеяния света тромбоцитов человека».

Исследование было выполнено при поддержке РФФИ (грант № 19-15-00132) и совместного проекта РФФИ и Правительства Калининградской области (грант № 415-390001).

Изобретение, патент РФ № 2788479 «Планарный наноструктурированный сенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса для усиления комбинационного рассеяния света тромбоцитов человека и способ его получения» внедрен в практику работы лаборатории ООО «МЦ Медэксперт Л.Д.» (акт внедрения №14-03/2023), в практику работы ГБУЗ КО «Центральная городская клиническая больница» (акт внедрения №24), а также в практику работы ООО «МЦ Медэксперт-4» (акт внедрения №24/2024).

Созданная в рамках диссертационного исследования комплексная система анализа фармакокинетики и фармакодинамики АП применяется в совместной работе НОЦ «Центр Клинических Исследований» и НОЦ «Фундаментальная и прикладная фотоника. Нанопотоника» БФУ им. И.Канта - Проект ПРОМЕТЕЙ-Ф 427-Л-23 в рамках программы «Приоритет-2030» (акт внедрения №5-07/2023). Результаты диссертационной работы внедрены в практику научных исследований, проводимых НИЛ-96 «Фотоника» федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва» (Самарский университет) (акт внедрения №14/ф-2024).

Основные положения работы включены в программу лекций и семинаров при проведении занятий со студентами по дисциплине «Клиническая фармакология» на кафедре терапии Медицинского института ФГАО ВО БФУ им. И. Канта (акт внедрения №3-07/2023).

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Научные положения диссертации соответствуют пунктам 6, 20 паспорта специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки) и пунктам 2, 3, 6 паспорта специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки).

Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовал в постановке цели и определении задач исследования, обследовании пациентов, получении биоматериала, самостоятельно провел анализ литературных источников и построение дизайна исследования, разработал базу данных добровольцев. Автор адаптировал метод пробоподготовки богатой тромбоцитами плазмы для исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния, метод пробоподготовки мочи для исследования методом спектроскопии ¹H ядерного магнитного резонанса, провел статистический

анализ данных и их интерпретацию, создал систему анализа и представления взаимосвязей фармакодинамических параметров.

Научные публикации по теме диссертации

По материалам исследования опубликовано 17 научных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень рекомендуемых Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, 12 - в изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus, получены два патента на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГАО ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» (регистрационный номер ЕГИСУ – 121112900178-7, 122041100258-6). Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, представления результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 179 источников, в том числе 113 отечественных и 66 зарубежных. Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 28 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования

Для выполнения поставленных задач на базе ФГАО ВО БФУ им. И. Канта было проведено проспективное исследование по оценке возможностей применения спектроскопических методов для персонализации терапии антиагрегантами.

В исследовании приняли участие здоровые добровольцы и пациенты с ССЗ.

Общее количество обследованных субъектов составило 152. Субъекты были разделены на 4 группы (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**): группа 1 - здоровые добровольцы без ССЗ (SCORE < 1%), без приема каких-либо АП и любых НПВС в течение предыдущих 7 дней; группа 2 – здоровые добровольцы без ССЗ (SCORE < 1%) , получавшие АСК в дозе 100 мг 1 раз в сутки в течение 1-3 дней; группа 3 - пациенты, страдающие ССЗ, риск смерти которых в ближайшие 10 лет по шкале SCORE от ССЗ высокий (5-10%) и очень высокий (более 10%), не получающие терапию какими-либо АП или НПВС в течение предыдущих 7 дней; группа 4 - пациенты, имеющие ССЗ, риск смерти которых в ближайшие 10 лет по шкале SCORE от ССЗ высокий (5-10%) и очень высокий (более 10%), получающие стабильную терапию антиагрегантами (АСК в дозе 75-100 мг 1 раз в сутки в течение 7 дней или более, клопидогрель 75 мг 1 раз в сутки в течение 7 дней или более).

Исследование фармакодинамики антиагрегантных препаратов

Для оценки спектральной гомогенности богатой тромбоцитами плазмы (БТП) у одного здорового добровольца было взято 15 образцов крови в 6 разных дней в течение двухнедельного периода.

Таблица 1

Клинико-анамнестические характеристики субъектов, включённых в исследование

Характеристика	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Количество субъектов, n	36	15	41	60
Возраст, лет, Me (Q25; Q75)	22,3 (20; 35)	28 (21; 45)	65 (56; 82)	67 (51; 81)
Пол, n (%)				
Женщины	21 (58%)	9 (60%)	31 (76%)	48 (80%)
Мужчины	15 (42%)	6 (40%)	10 (24%)	12 (20%)
Прием ЛС, n (%)				
АСК	0	100	0	100
Клопидогрел	0	0	0	25
SCORE, Me (Q25; Q75)	0,8 (0,6; 0,98)	0,8 (0,7; 0,9)	10,8 (5,2; 25,1)	9,7 (5,8; 17,2)

Me – медиана, Q25—25-й процентиль, Q75 — 75-й процентиль.

Образцы свежей венозной крови были взяты у здоровых добровольцев и пациентов с ССЗ в вакуумную пробирку, содержащую ЭДТА (Метод №1). Далее образцы подвергались двухэтапному центрифугированию при 60g в течение 15 мин, затем тромбоциты были осаждены путем центрифугирования супернатанта при 1500g в течение 15 мин. Метод №2. Венозная кровь была собрана в с цитратом натрия 3,8%. Далее образцы подвергались центрифугированию при режимах, описанных в методе №1.

Для получения спектров комбинационного рассеяния света (КРС) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКРС) использовался спектрометр Centaur U HR со спектральным разрешением $2,5 \text{ см}^{-1}$. Образцы БТП помещались на химически чистое кварцевое стекло или на модифицированные фемтосекундным лазером титановые поверхности для усиления КРС-сигнала и получения ГКРС-сигнала.

Для съемки был использован DPSS-лазер с длиной волны $\lambda=532 \text{ нм}$. Лазерный луч фокусировался на образце вручную с помощью USB-видеокамеры и механической системы позиционирования.

Агрегационную активность тромбоцитов исследовали при помощи агрегометра INNOVANCE Siemens PFA 200. Анализ был проведен с тремя видами картриджей: 1. Картридж, содержащий в качестве активатора коллаген в сочетании с эпинефрином (Collagen/EPI). 2. Картридж, содержащий коллаген с АДФ (Collagen/ADP). 3. Картридж, содержащий простагландин E1 (P2Y).

Исследование динамики выведения метаболитов ацетилсалициловой кислоты с мочой

В исследовании приняли участие здоровые добровольцы в возрасте 19-50 лет. Образцы мочи добровольцев были собраны до и после приема АСК, через несколько временных интервалов (в соответствии с физиологическими потребностями добровольцев) в течение 24 часов после введения препарата.

Образцы мочи были исследованы методом спектроскопии ^1H ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на спектрометре VARIAN 400MR в магнитном поле

9.4 Тесла и частотой резонанса протонов 400МГц. Количество накоплений (спектров) составило: от каждого образца, полученного от 4 здоровых добровольцев, принявших 3000 мг АСК 128 – всего 2560 спектров, от каждого образца, полученного от здоровых добровольцев, принявших 100 мг АСК 298 – всего 28 608 спектров. Все химические сдвиги определялись по сигналу остаточных протонов дейтерированной воды, сигнал при $\delta = 4.64$ м.д. ЯМР-спектры стандартов: салициловой, салицилуловой и гентизиновой кислот (salicylic, salicyluric and gentisic acids, Sigma-Aldrich) были зарегистрированы при тех же параметрах эксперимента, что и образцы мочи. Для подавления сигналов воды были опробованы различные импульсные последовательности (преднасыщение, WATERGATE, WET).

Статистический анализ полученных спектральных данных

Статистическая обработка 94 спектров БТП, полученной от одного здорового добровольца, была выполнена согласно двум подходам для оценки гомогенности (Рисунок 1). Первый подход основывался на снижении размерности спектральных данных и последующей оценке дисперсии и расстояния между спектрами. Расчеты проводились с помощью программы KnowItAll Vibrational Spectroscopy Edition.

При втором подходе в основе количественного определения «схожести» спектров была оценка разброса значений парных корреляций, а также их средний момент.



Рисунок 1. Схема статистического анализа гомогенности тромбоцитов

Для выявления частотных сдвигов (ЧС) ГКРС-спектров тромбоцитов периферической крови, имеющие наибольшую информативность были применены алгоритмы машинного обучения. Использовали язык python и библиотеки rampru (манипуляции со спектрами), scikit-learn, XGBoost (алгоритмы машинного

обучения). Предобработка данных состояла из операций ресэмплинга, обрезки спектра, коррекции базовой линии и нормировки интенсивности. Для ресэмплинга была использована линейная интерполяция на более грубую сетку частот с шагом 5 см^{-1} . Обрезка спектра происходила одновременно с ресэмплингом, в ходе чего отбрасывались все данные вне целевого интервала частот 400–1700 см^{-1} .

Статистическая обработка данных была выполнена с использованием редактора электронных таблиц MS Excel 7.0 и программного пакета Statistica 13.3. Каждая выборка перед проведением статистического анализа была проверена на нормальность тестом Шапиро-Уилка ($p < 0.05$). Принимая во внимание, что все выборки соответствовали условиям нормального распределения, в качестве метода сравнения средних значений выборок был использован t-критерий Стьюдента для независимых переменных.

Для проведения корреляционного анализа был использован метод Пирсона, для классификации интенсивностей, полученных на определенных ЧС при ГКС-спектроскопии, был проведен линейный дискриминантный анализ Фишера. В качестве группирующих переменных были использованы показатели потоковой агрегометрии, проведенной с использованием различных картриджей системы INNOVANCE PFA-200 («Siemens», Германия). В качестве категориальных переменных были исследованы значения интенсивностей ГКС-спектров, полученные на наиболее информативных частотных сдвигах.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Применение метода спектроскопии комбинационного рассеяния света для персонализации антиагрегантной терапии

При визуальном качественном изучении спектров выявлены отличия между спектрами, регистрируемыми от образцов, полученных с использованием метода №1 и метода №2 (Рисунок 2). Использование для пробоподготовки Метода №2 (цитрат натрия в качестве антикоагулянта) сопряжено с получением ГКС-спектров с большим количеством пиков – «шумов», заметных даже при простом визуальном сравнении.

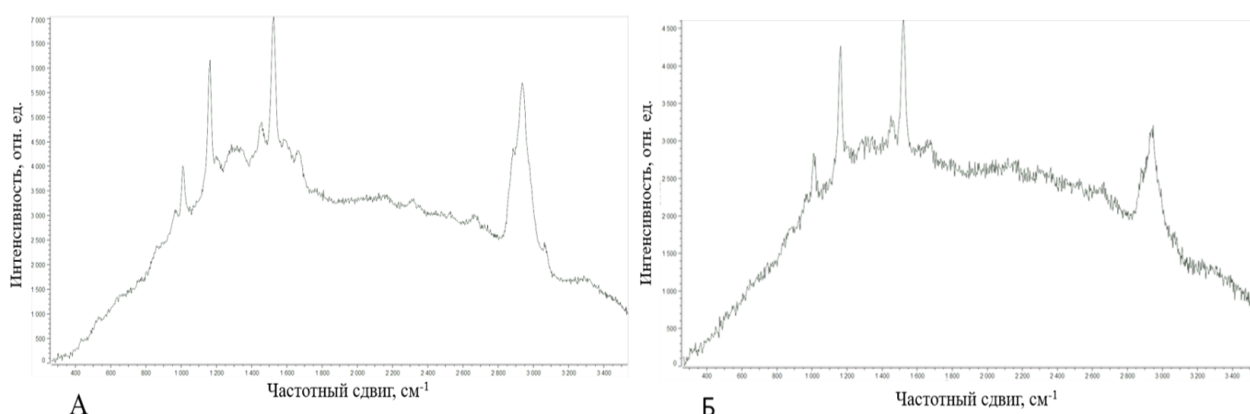


Рисунок 2. Сравнение ГКС-спектров богатой тромбоцитами плазмы здорового добровольца. А – типичный спектр тромбоцитов, полученных с использованием метода №1, Б – типичный спектр тромбоцитов, полученных с помощью метода №2

Далее в работе для выделения БТП с целью исследования методом КРС- и ГКРС-спектроскопии был использован только метод №1.

Было проведено качественное сравнение КРС- и ГКРС-спектров БТП. Как видно из Рисунок 3, для КРС-спектроскопии на кварце характерен «монотонный» спектр без выраженных характерных пиков. В то же время, спектры богатой тромбоцитами плазмы, полученные с помощью ГКРС-спектроскопии, характеризуются наличием выраженных пиков.

Таким образом, использование КРС-спектроскопии не позволяет собрать полную информации о физико-химических особенностях образца и их изменениях под действием антиагрегантных препаратов (АП), так как регистрируется сигнал низкой интенсивности, непригодный для дальнейшей расшифровки. Использование ГКРС-спектроскопии, основанной на применении оригинального оптического сенсора, позволяет получить сигнал достаточной интенсивности, необходимый для выявления потенциальных фармакодинамических маркеров.

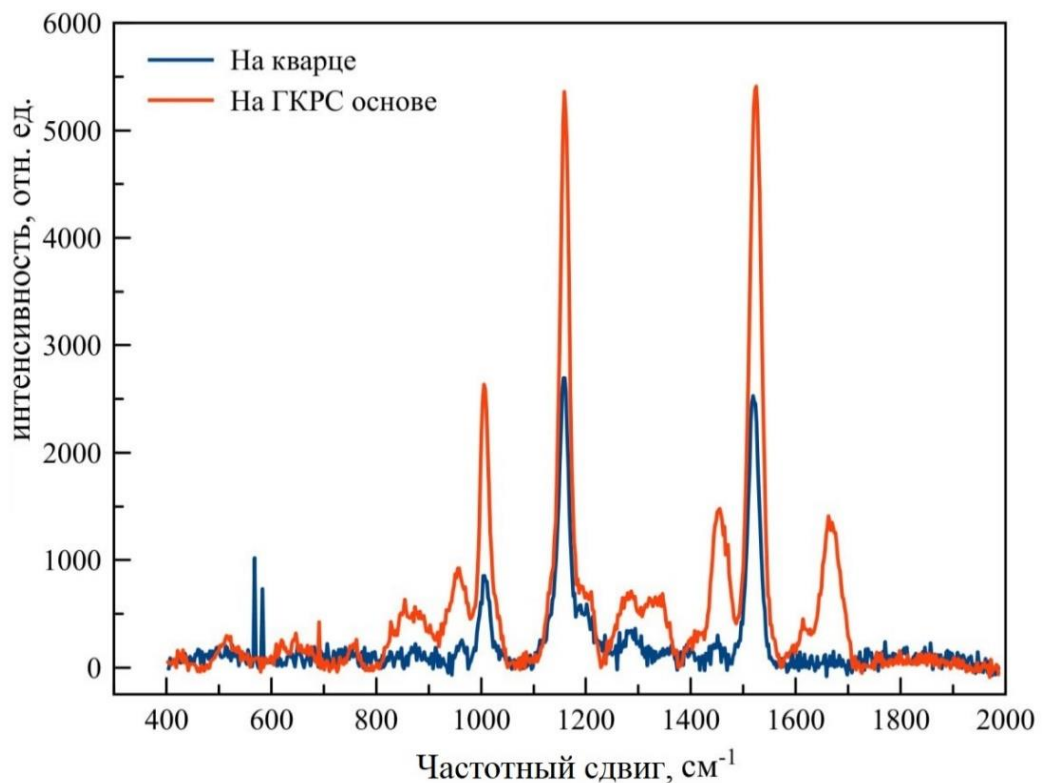
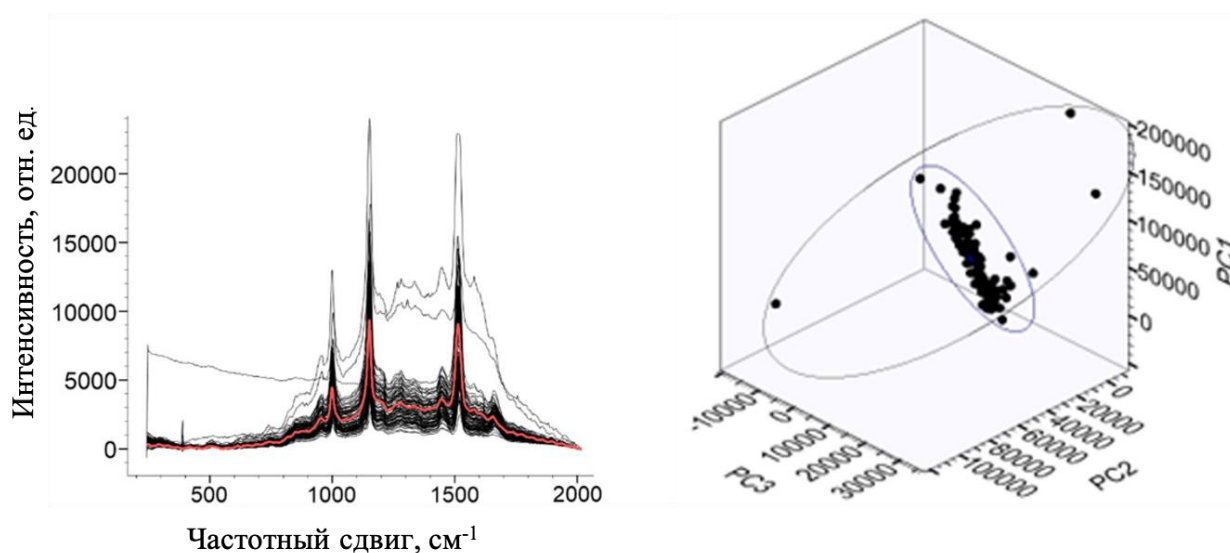


Рисунок 3. Спектры рассеяния тромбоцитов периферической крови.

С помощью предварительной обработки методом главных компонент (РСА-анализ) показана хорошая близость спектров, за исключением трех аномальных спектров, причиной отклонения которых стала неоднородность подложки для ГКРС-спектроскопии. Усредненные ГКРС-спектры отмечены красной линией (Рисунок 4А). Трехмерный график РСА, отражающий сгруппированные ГКРС-спектры БТП здорового добровольца без приема АП, показан на Рисунок 4Б.



А

Б

Рисунок 4. А. ГКРС – спектры богатой тромбоцитами плазмы, Б. Трехмерный график PCA-анализа ГКРС-спектров тромбоцитов

С использованием процедур машинного обучения были определены частотные сдвиги (ЧС) ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы, имеющие наибольшую информативность при выявлении различий в спектрах здоровых пациентов и пациентов с ССЗ, а также для оценки фармакодинамических эффектов антиагрегантных препаратов. В списке наиболее перспективных для последующего изучения ЧС, было выбрано 21 значение, а именно - 420 см^{-1} , 430 см^{-1} , 485 см^{-1} , 505 см^{-1} , 605 см^{-1} , 615 см^{-1} , 720 см^{-1} , 805 см^{-1} , 955 см^{-1} , 960 см^{-1} , 970 см^{-1} , 975 см^{-1} , 980 см^{-1} , 990 см^{-1} , 1040 см^{-1} , 1400 см^{-1} , 1410 см^{-1} , 1465 см^{-1} , 1535 см^{-1} , 1540 см^{-1} , 1590 см^{-1} .

Для использования ГКРС-спектроскопии при оценке эффективности антиагрегантной терапии была решена задача классификации (определения пограничных значений) интенсивностей ГКРС-спектров, для выявления пациентов с высокими значениями остаточной реактивности тромбоцитов (ОРТ) на фоне проводимой антиагрегантной терапии. Дискриминантный анализ выполнен в 3 этапа: первый этап – построение классификационной модели, второй этап – оценка точности модели, третий этап – использование разработанного классификатора для оценки выявления пациентов с высокой ОРТ.

На первом этапе проведено формирования обучающей информации, для этого были использованы данные агрегометрии и ГКРС-спектроскопии с использованием оригинального оптического сенсора здоровых добровольцев из групп 1 и 2. При этом в качестве дискриминантной переменной использовались значения времени закрытия, полученные при агрегометрии, которые принимали два возможных значения - «пациент с высокой ОРТ» в случае, если значением было выше верхней границы референтного диапазона и «пациент без высокой ОРТ» - значение ниже верхней границы референтного диапазона для различных картриджей системы PFA-200.

На втором этапе анализа были выработаны решающие правила в виде набора линейных классификационных функций, а также осуществлена оценка их информативности. Для этого были оценены в качестве категориальных

переменных значения интенсивностей ГКРС-спектров, полученные на наиболее информативных ЧС. На основании оценки отобранных ЧС, отобранные только те ЧС, для которых значение вероятности (p) для критерия Фишера (F) было < 0.05 . На третьем этапе осуществляется классификация интенсивностей спектров ГКРС для групп пациентов 3 и 4 на основе выработанных решающих правил.

При проведении дискриминантного анализа в качестве наиболее информативных маркеров оценки активности тромбоцитов были отобраны 2 частотных сдвига - 970 см^{-1} для оценки эффективности АСК и 1590 см^{-1} для оценки эффективности блокаторов P2Y₁₂ рецепторов (Таблица 2). Использование значений, полученных при ГКРС-спектроскопии на других ЧС, оказалось менее информативным, а значения p превышали 0.05. Проведение дискриминационного анализа позволило выделить константы дискриминации для интенсивностей ГКРС-спектров, которые составили 12254,35 и 12623,13 для частотных сдвигов 970 см^{-1} и 1590 см^{-1} , соответственно. Точность классификации с использованием установленных уравнений дискриминантных функций составила 84% для частотного сдвига 970 см^{-1} и 88% для частотного сдвига 1590 см^{-1} (Таблица 2).

Таблица 2

Данные для построения дискриминантных функций классификатора интенсивностей ГКРС-спектров

Исследуемая группа АТ препаратов	Ингибиторы ЦОГ1 (АСК)	Блокаторы P2Y ₁₂ рецепторов
Тип картриджа прибора PFA-200 для получения значений дискриминантной переменной	COL/ADP	P2Y
ЧС, ГКРС-спектров, для которых выполнялось условие $p < 0.05$ для критерия Фишера (F)	970 см^{-1}	1590 см^{-1}
Значение F	5,055	19,419
Вероятность P для значения F	0,03	0,00002
Константа дискриминационной функции	-1,99	-2,58
Множитель дискриминантной функции	0,00015	0,00017
Уравнение дискриминантной функции	$\Phi = -1,99 + 0,00015 * x$	$\Phi = -2,58 + 0,00017 * x$
Константа дискриминации	12254	10613
Точность классификации, %	84	88

Использование построенной дискриминационной модели, позволило провести классификацию значений, полученных при ГКРС-спектроскопии БТП и использовать этот подход для выделения популяции пациентов с высокой ОРТ из пациентов с ССЗ, получавших АТ. При этом были выделены частотные сдвиги в ГКРС-спектрах, специфичные для оценки функции разных групп АП - 970 см^{-1} для ингибиторов ЦОГ1 и 1590 см^{-1} для блокаторов P2Y₁₂ рецепторов. Таким образом, использование полученной константы дискриминации позволило классифицировать оценку интенсивностей, зарегистрированных при ГКРС-

спектроскопии у пациентов Группы 4, и оценить эффективность использования АП (Таблица 3).

Таблица 3

Оценка эффективности антитромбоцитарной терапии у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (группа 4) с помощью ГКРС-спектроскопии

Метод	Число пациентов с высокой ОРТ, %, $M \pm m$, (n/N)	X^2 , p
Изучаемый метод: ГКРС-спектроскопия		
Анализ ГКРС-спектра при ЧС - 970 см^{-1} (ингибиторы ЦОГ1)	$41,7 \pm 6,3$ (25/60)	$X^2 = 0.022$, $p = 0.882$
Изучаемый метод: ГКРС-спектроскопия		
Метод	Число пациентов с высокой ОРТ, %, $M \pm m$, (n/N)	X^2 , p
Анализ ГКРС-спектра при ЧС - 1590 см^{-1} (блокаторы P2Y ₁₂ рецепторов)	$36,7 \pm 6,2$ (22/60)	$X^2 = 0.018$, $p = 0.894$
Референтный метод: потоковая агрегометрия INNOVANCE PFA-200		
Тест COL/ADP	$43,5 \pm 10,3$ (10/23)	
Тест P2Y	$30,4 \pm 9,6$ (7/23)	

Примечание: n-число пациентов с выявленным в исследуемой группе признаком, N- общее число пациентов в исследуемой группе, M- среднее арифметическое, m – ошибка средней относительной величины. Критерий Хи-квадрат (X^2), уровень значимости (p), рассчитан при сравнении средних значений изучаемого и референтного методов, ОРТ – остаточная реактивность тромбоцитов

Как следует из таблицы 3, метод ГКРС-спектроскопии БТП с использованием оригинального оптического сенсора, позволяют выделять в популяции пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, получавших АП, популяцию пациентов с высокой ОРТ, т.е. пациентов с высоким риском неэффективности терапии АП.

Применение метода ^1H ядерного магнитного резонанса для определения комплаентности к терапии ацетилсалициловой кислотой

Наиболее значительные изменения в спектрах ^1H ЯМР наблюдались в образцах мочи добровольцев после введения 3000 мг АСК. Выявлены интенсивные перекрывающиеся сигналы в области между 6,7 и 6,8 ppm, а также четко различимые триплеты и перекрывающиеся сигналы в областях между 7,2 и 7,4 ppm и между 7,5 и 7,6 ppm. В качестве примера на Рисунке 5 показаны два фрагмента спектров ^1H ЯМР мочи, полученные до и через 2,5 часа после приема 3 г АСК.

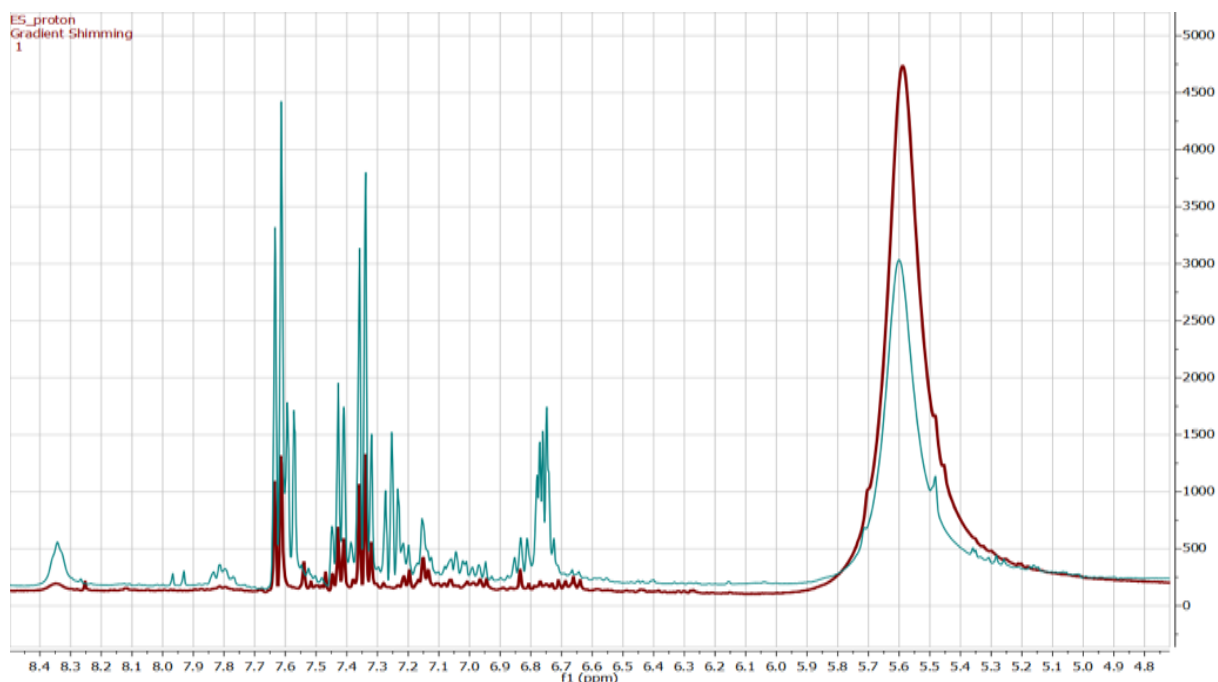


Рисунок 1. Фрагменты ^1H ЯМР спектра образца мочи добровольца, собранные до (красный) и через 2 часа после приема 3000 мг АСК (зеленый)

Аналогичные изменения в ^1H ЯМР спектрах наблюдались в образцах мочи добровольцев после приема 100 мг АСК. Интенсивность сигналов зависит от времени сбора мочи после приема препарата и величины дозы.

Фрагменты ^1H ЯМР спектров образцов мочи добровольцев, собранных после приема 100 мг и 300 мг препарата, показаны на Рисунке 6 и Рисунке 7.

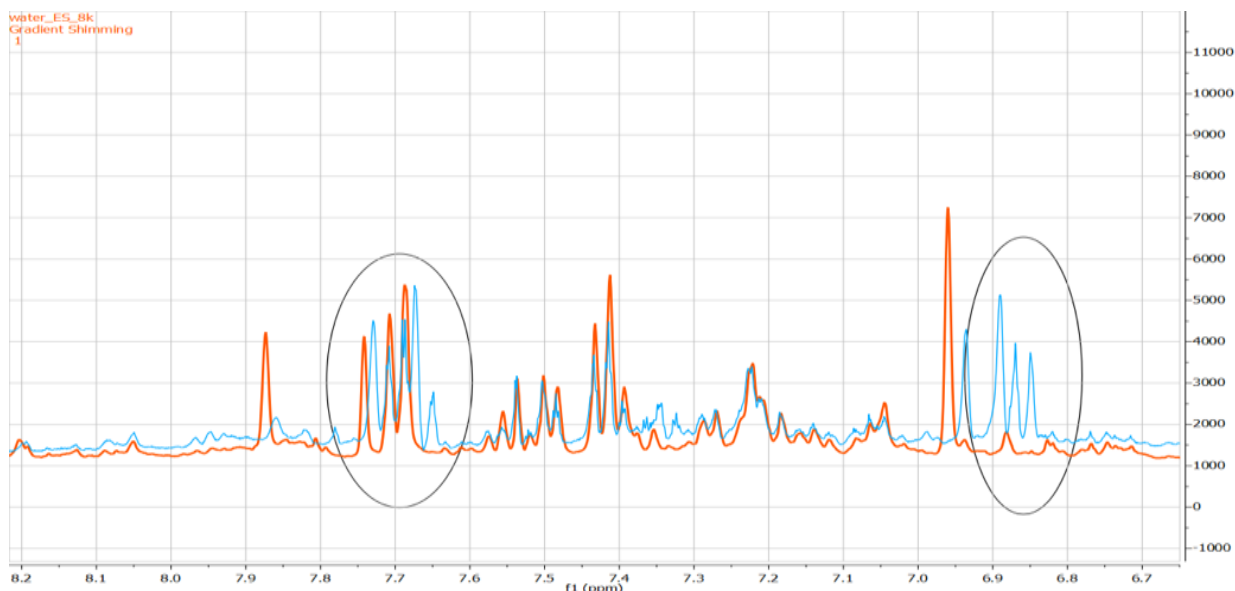


Рисунок 6. ^1H ЯМР образца мочи здорового добровольца, полученный до (оранжевый) и через 4 часа после приема 300 мг АСК (синий)

Спектр образцов мочи, собранных через 1,5 часа после приема препарата, не претерпел значительных изменений у 21 (88 %) здоровых добровольцев. Однако профиль ^1H ЯМР спектра мочи, собранной через 4 часа после приема 100 мг препарата, имеет значимые изменения у 22 (92 %) здоровых добровольцев. Более

выраженные изменения в одних и тех же областях ^1H ЯМР спектров можно наблюдать для образцов мочи, собранных через 4 часа и 6 часов у 24 (100 %) добровольцев, принявших однократную дозу 300 мг АСК. Обнаружено, что сигнал гиппурата уменьшился в 12,3 раза через 4 часа после введения 100 мг АСК для 16 (67 %) добровольцев и в 1,77 раза для 6 (25 %), тогда как он уменьшился в 2 раза для 2 (8 %) добровольцев через 3 часа после введения дозы (Рисунок 7).

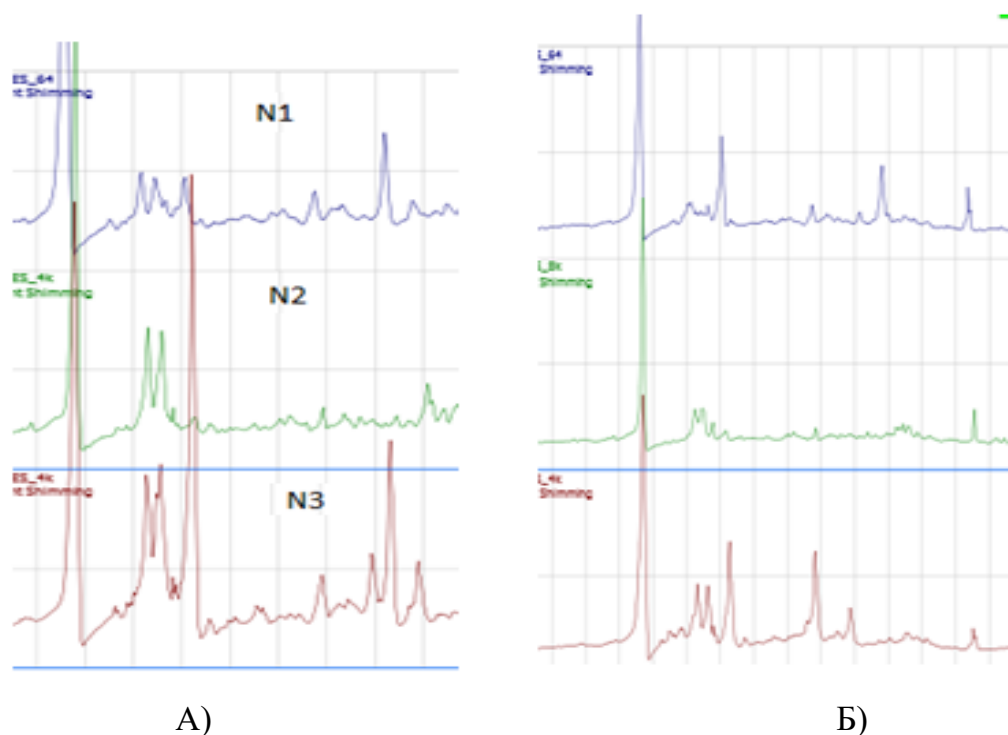


Рисунок 7. Фрагменты спектров ^1H ЯМР образцов мочи, собранных до (а) и после приема 100 мг АСК (б). Образец мочи собрали через 4 часа после приема для добровольцев №1 и №2 и через 3 часа для добровольца №2

Через 9 часов после приема 100 мг АСК сигнал гиппуровой кислоты восстановился у 22 (92%) добровольцев. Через 21-24 часа после приема 100 мг АСК сигнал салицилуровой и гиппуровой кислоты детектируется у 20 (83%) добровольцев в области 6,6 до 6,9 ppm. Однако по прошествии более 24 часов метаболиты АСК не детектировались у 16 (67%) добровольцев.

В заключении обобщены результаты проведенного исследования. Установлено, что КРС-спектроскопия не позволяет собрать полную информацию о физико-химических особенностях образца БТП. Для исследования фармакодинамики может быть использована только спектроскопия ГКРС. Образцы БТП обладают высокой спектральной однородностью. Нами выявлены наиболее информативные биомаркеры, связанные с фармакодинамическими эффектами антиагрегантных препаратов.

С использованием метода ГКРС-спектроскопии богатой тромбоцитами плазмы удалось выявить популяцию пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов, то есть с повышенным риском неэффективности терапии антиагрегантными препаратами.

Методом ЯМР спектроскопии удалось детектировать метаболиты ацетилсалициловой кислоты в моче при приеме низких доз. Данный метод может применяться для контроля комплаентности терапии ацетилсалициловой кислотой.

ВЫВОДЫ

1. Наиболее информативными биомаркерами, связанными с фармакодинамическими эффектами ацетилсалициловой кислоты в группе здоровых добровольцев, выявленными методом спектроскопии комбинационного рассеяния богатой тромбоцитами плазмы с использованием оригинального биосенсора, являются интенсивности спектров на частотных сдвигах 505 см^{-1} и 1465 см^{-1} ($p < 0,05$). У пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями наиболее информативные биомаркеры, связанные с приемом ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела, выявлены на частотных сдвигах 485 см^{-1} , 505 см^{-1} , 970 см^{-1} , 990 см^{-1} , 1465 см^{-1} , 1590 см^{-1} ($p < 0,05$).

2. У пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями биомаркерами, определяющими высокую остаточную реактивность тромбоцитов на фоне терапии ацетилсалициловой кислотой, являются изменения интенсивности спектров комбинационного рассеяния на частотном сдвиге 970 см^{-1} ($F=5,5$, $p=0,03$), на фоне терапии клопидогрелом на частотном сдвиге 1590 см^{-1} ($F=19,4$, $p=0.00002$).

3. Пограничные значения (константы дискриминации) для выявления пациентов с высокими значениями остаточной реактивности тромбоцитов методом спектроскопии комбинационного рассеяния света богатой тромбоцитами плазмы являются - 12254,35 для ацетилсалициловой кислоты на частотном сдвиге 970 см^{-1} и 12623,13 для клопидогрела на частотном сдвиге 1590 см^{-1} . Точность классификации с использованием установленных пограничных значений и полученного уравнения дискриминантной функций составила 84% для ацетилсалициловой кислоты и 88% для клопидогрела.

4. Частота выявления высокой остаточной реактивности тромбоцитов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, определенная методом спектроскопии комбинационного рассеяния света богатой тромбоцитами плазмы и референтным методом, статистически не различались ($p > 0,05$) и составила $41,7 \pm 6,3\%$ при терапии ацетилсалициловой кислотой и $36,7 \pm 6,2\%$ при терапии клопидогрелом, соответствующие значения при использовании метода потоковой динамической агрегометрии составили $43,5 \pm 10,3\%$ и $30,4 \pm 9,6\%$.

5. Наиболее интенсивные пики метаболитов ацетилсалициловой кислоты в спектрах ^1H ядерного магнитного резонанса мочи характерны для салицилуровой и гиппуровой кислот и позволяют верифицировать факт приема препарата в дозе 100 мг в интервале 0-24 часа, что позволяет использовать данный метод для объективного контроля комплаентности пациентов к терапии низкими дозами ацетилсалициловой кислоты.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Исследователям, занимающимся проблемой персонализации антиагрегантной терапии, рекомендуется использовать методы спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света и спектроскопии ядерного магнитного резонанса для изучения фармакокинетики и фармакодинамики антиагрегантных препаратов, так как они показали перспективность и высокую достоверность полученных результатов.

2. Исследователям, использующим спектроскопический метод для изучения фармакодинамики антиагрегантных препаратов, рекомендуется использовать пробоподготовку периферической венозной крови с использованием ЭДТА и трехэтапного центрифугирования, что позволяет получить богатую тромбоцитами плазму, пригодную для выделения информативных спектров. Наибольшую информативность для анализа фармакодинамических эффектов антиагрегантных препаратов несут значения спектров, полученных при использовании оригинального оптического сенсора на частотных сдвигах: 970 см^{-1} , 1590 см^{-1} , а также 485 см^{-1} , 505 см^{-1} , 990 см^{-1} , 1465 см^{-1} . Данные изменения спектров гигантского комбинационного рассеяния целесообразно использовать для дальнейшего изучения фармакодинамических эффектов антиагрегантных препаратов.

3. Исследователям при выборе метода спектроскопии комбинационного рассеяния света для изучения фармакодинамики антиагрегантных препаратов рекомендуется отдавать предпочтение использованию плазмон-усиленной спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света, при этом для усиления сигнала целесообразно использовать поверхности из наноструктурированного титана с нанесенным абляционным золотом наночастицами, при использовании их в качестве биосенсора удастся получить сигнал высокого разрешения.

4. Исследователям, занимающимся проблемой комплаентности терапии ацетилсалициловой кислотой, и врачам клинической лабораторной диагностики рекомендуется к использованию метод ^1H спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Особый интерес составляет область от 6,6 до 6,9 ppm, в которой детектируются сигналы салицилуровой и гиппуровой кислот.

5. Производителям медицинского оборудования предлагается рассмотреть возможность создания лабораторного прибора для оценки фармакодинамики антиагрегантных препаратов на основе метода спектроскопии комбинационного рассеяния света с использованием разработанного оригинального оптического сенсора. При этом нужно учитывать, что использование разных частотных сдвигов (970 см^{-1} или 1590 см^{-1}) позволяет селективно оценивать эффективность применения антиагрегантных препаратов разных групп – ингибиторов ЦОГ1 и блокаторов P2Y₁₂ рецепторов, соответственно. Выявленная закономерность может быть использована для создания портативных приборов для персонализации антиагрегантной терапии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Имеются перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования в виде возможности применения метода спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света с использованием оригинального биосенсора для оценки эффективности терапии ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом на базе клинических лабораторий многопрофильных медицинских организаций, оказывающих специализированную медицинскую помощь по профилю: кардиология, неврология, сердечно-сосудистая хирургия.

Имеются перспективы разработки портативного прибора, основанного на спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния света для оценки эффективности антиагрегантной терапии у постели больного. На основе полученных результатов могут быть созданы спектральные базы данных, а также

система поддержки принятия решений для использования при обучении врачей клинической лабораторной диагностики.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Моисеева, Е. М.** Использование спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния для поиска фармакодинамических предикторов ответа на антиагрегантную терапию / **Е. М. Моисеева**, В. В. Рафальский, А. Н. Соколов [и др.] // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2023. – Т. 38. – №. 3. – С. 185-193.

2. **Моисеева, Е. М.** Применение метода спектроскопии комбинационного рассеяния света с использованием оригинального оптического сенсора для оценки лабораторной эффективности антиагрегантных препаратов / **Е. М. Моисеева**, А. П. Ройтман, В. В. Рафальский [и др.] // Медицинский алфавит. – 2024. – №. 20. – С. 65-69.

Публикации в рецензируемых научных изданиях, включенных в международную базу SCOPUS

3. **Moiseeva, E. M.** Raman spectra simulation of antiplatelet drug-platelet interaction using DFT / A. Kundalevich, A. Kapitonova, K. Berezin [et al.] // Scientific Reports. – 2024. – Vol. 14, No. 1.

4. **Moiseeva, E. M.** Mathematical Analysis of Raman Spectra Data Arrays Using Machine Learning Algorithms / Y. A. Byuchkova, A. Y. Zyubin, V. V. Rafalskiy, **E. M. Moiseeva**, & Samusev, I. G. // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. – 2023. – Т. 9. – №. 2. – С. 020308.

5. **Moiseeva, E. M.** Single human platelet study using surface-enhanced Raman spectroscopy as a perspective tool for antiplatelet therapy effectiveness prediction / A. Y. Zyubin; V. V. Rafalskiy; A. V. Tcibulnikova, K. I. Matveeva, **E. M. Moiseeva** [et al.] // Optics in Health Care and Biomedical Optics IX. – SPIE, 2019. – Т. 11190. – С. 37-42.

6. **Moiseeva, E. M.** Surface-enhanced Raman spectroscopy for antiplatelet therapy effectiveness assessment / A. Y. Zyubin; V. V. Rafalskiy; A. V. Tcibulnikova, **E. M. Moiseeva** [et al.] // Laser Physics Letters. – 2020. – Т. 17. – №. 4. – С. 045601.

7. **Moiseeva, E. M.** Dataset of human platelets in healthy and individuals with cardiovascular pathology obtained by Surface-enhanced Raman spectroscopy / A. Y. Zyubin; V. V. Rafalskiy; A. V. Tcibulnikova, K. I. Matveeva, **E. M. Moiseeva** [et al.] // Data in brief. – 2020. – Т. 29. – С. 105145.

8. **Moiseeva, E. M.** NMR spectroscopy reveals acetylsalicylic acid metabolites in the human urine for drug compliance monitoring / G. S. Kupriyanova, V. V. Rafalskiy, I. G. Mershev, **E. M. Moiseeva** // Plos one. – 2021. – Т. 16. – №. 3. – С. e0247102.

9. **Moiseeva, E. M.** Spectral and time-resolved photoluminescence of human platelets doped with platinum nanoparticles / K. I. Matveeva, A. Y. Zyubin, E. Demishkevich, V. V. Rafalskiy, **E. M. Moiseeva** [et al.] // Plos one. – 2021. – Т. 16. – №. 9. – С. e0256621.

10. **Moiseeva, E. M.** Application of the spectrofluorimetric research method to study the complexes «Pt NPs-platelets» / K. I. Matveeva, A. Y. Zyubin, E. Demishkevich, V. V. Rafalskiy, **E. M. Moiseeva** [et al.] // Optics in Health Care and Biomedical Optics XI. – SPIE, 2021. – Т. 11900. – С. 476-482.

11. **Moiseeva, E. M** Application of vibrational spectroscopy and nuclear magnetic resonance methods for drugs pharmacokinetics research / V. V. Rafalskiy, A. Y. Zyubin, **E. M. Moiseeva** [et al.] //Drug Metabolism and Personalized Therapy. – 2022. – Т. 38. – №. 1. – С. 3-13.

12. **Moiseeva, E. M.** Raman spectroscopy and surface enhanced Raman spectroscopy as a promising approach for assessment of platelet function /V. V. Rafalsky, A. Y. Zubin, **E. M. Moiseeva** [et al.] //European Journal of Molecular and Clinical Medicine. – 2019. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-21.

Основные работы, опубликованные в других издания

13. **Моисеева, Е. М.** Перспективы применения метода спектроскопии комбинационного рассеяния света (рамановской спектроскопии) в кардиологии / В. В. Рафальский, А. Ю. Зюбин, **Е. М. Моисеева**, И. Г. Самусев //Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2020. – Т. 19. – №. 1. – С. 70-77.

14. **Моисеева, Е. М.** Разработка метода детекции метаболитов ацетилсалициловой кислоты с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния для контроля комплаентности антиагрегантной терапии / В. Рафальский, А. Ю. Зюбин, **Е. Моисеева** [и др.] // Российские дни сердца: материалы Восьмого Международного образовательного форума, Санкт-Петербург, 22–24 апреля 2021 года. – Санкт-Петербург: Без издательства, 2021. – С. 357.

15. **Моисеева, Е. М.** Детекция метаболитов ацетилсалициловой кислоты с помощью методов ядерно-магнитного резонанса для контроля комплаентности антиагрегантной терапии / В.В. Рафальский, Г.С. Куприянова, И.Г. Мершиев, А.Ю. Зюбин, **Е.М. Моисеева** [и др.] // Российские дни сердца: материалы Восьмого Международного образовательного форума, Санкт-Петербург, 22–24 апреля 2021 года. – Санкт-Петербург: Без издательства, 2021. – С. 148.

16. **Моисеева, Е.М.** Возможности применения спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния для оценки комплаентности терапии ацетилсалициловой кислотой/ Е.М. Моисеева, В.В. Рафальский, К.И. Матвеева, А.Ю. Зюбин // Рациональная фармакотерапия «Золотая осень»: сборник материалов XVII Международного научного конгресса «Рациональная фармакотерапия», Санкт-Петербург, 13-15 октября 2022 года. – Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского государственного экономического университета, 2022 – С. 75-76.

17. **Моисеева, Е.М.** Возможности применения ¹H ЯМР спектроскопии для определения комплаентности к терапии ацетилсалициловой кислотой у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями / Е.М. Моисеева, В.В. Рафальский, Г.С. Куприянова, И.Г. Мершиев, А.Ю. Зюбин // Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы: материалы Международной научно-практической конференции, Томск, 13-16 сентября 2021 года. – Томск: Без издательства, 2021. – С. 199.

Список патентов по теме диссертации

1. Патент на изобретение RU 2788479 C1 Российская Федерация, МПК G01N 21/41, B82B 1/00. Планарный наноструктурированный сенсор на основе поверхностного плазмонного резонанса для усиления комбинационного рассеяния

света тромбоцитов человека и способ его получения / А. Ю. Зюбин, В. В. Рафальский, **Е. М. Моисеева** [и др.]; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта». - 2022108969: заявл. 04.04.2022; опубл. 19.01.2023

2. Патент на изобретение RU 2023618212 Российская Федерация. Программа классификации массивов спектров комбинационного рассеяния света тромбоцитов человека / Я. А. Бычкова, А. Ю. Зюбин, **Е. М. Моисеева**, В. В. Рафальский; заявитель и патентообладатель ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта». - 2023617031: заявл. 10.04.2023; опубл. 20.04.2023

Список сокращений

1H ЯМР – спектроскопия - 1H спектроскопия ядерного магнитного резонанса
 Coll/ADP – коллаген/АДФ
 Coll/Epi – коллаген/ эпинефрином
 DPSS лазер - diode-pumped solid state (твердотельный с диодной накачкой лазер)
 MS Excel - Microsoft Excel
 PCA - principal component analysis (метод главных компонент)
 PFA - Platelet Function Analyzer
 ppm - parts per million (миллионная доля)
 SCORE - Systematic Coronary Risk Evaluation (Систематическая оценка коронарного риска)
 USB - Universal Serial Bus (универсальная последовательная шина)
 Varian 400 MR - Varian 400 Magnetic resonance spectrometer
 WATERGATE - WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation (подавление воды с помощью градиентного возбуждения)
 WET - water suppression Enhanced through T1 effects (подавление воды улучшено за счет эффектов T1)
 АДФ – аденозиндифосфат
 АП – антиагрегантные препараты
 АСК – ацетилсалициловая кислота
 БТП – богатая тромбоцитами плазма
 г – грамм
 ГКРС – гигантское комбинационное рассеяние
 ЕГИСУ НИОКТР - Единая государственная информационная система учета результатов научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ
 К2 ЭДТА - Дикал этилендиаминтетрауксусная кислоты
 КРС – комбинационное рассеяние света
 ЛС – лекарственное средство
 мг – миллиграмм
 Ме – медиана
 нм – нанометр
 НОЦ – научно-образовательный центр
 НПВС – нестероидные противовоспалительные средства
 РФФ - Российский научный фонд
 РФФИ - Российский фонд фундаментальных исследований

см⁻¹- обратный сантиметр

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат

ЧС – частотный сдвиг

ЯМР – ядерный магнитный резонанс