

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАЛТИЙСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ИММАНУИЛА КАНТА»

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)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор,
Рафальский Владимир Витальевич
доктор медицинских наук, профессор,
Ройтман Александр Польевич

Калининград – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Значение антиагрегантной терапии и контроля за ее эффективностью и безопасностью для первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний	15
1.2. Клиническое значение и методы определения комплаентности к длительному приему антиагрегантных препаратов.....	29
1.3. Перспективы использования новых методов, основанных на спектроскопии комбинационного рассеяния света и спектроскопии ^1H ядерного магнитного резонанса.....	30
1.4. Преимущества и недостатки спектроскопических методов исследования фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных средств.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1. Характеристика участников исследования	42
2.2. Материалы и методы исследования фармакодинамики антиагрегантных препаратов	48
2.3. Материалы и методы исследования динамики выведения метаболитов ацетилсалициловой кислоты с мочой.....	51
2.4. Статистический анализ полученных спектральных данных.....	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	58
3.1. Применение спектроскопии комбинационного рассеяния света для персонализации антиагрегантной терапии.....	58
3.2. Применение метода ^1H ядерного магнитного резонанса для определения метаболитов ацетилсалициловой кислоты в моче	84
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
ВЫВОДЫ.....	98

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	100
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	128
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Суммарный риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний в ближайшие 10 лет (Шкала SCORE).....	131
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Рабочая таблица. Сравнение интенсивностей ГКР-спектров богатой тромбоцитами плазмы периферической крови, полученных на разных значениях частотных сдвигов в разных группах.....	132
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Рабочая таблица. Коэффициенты корреляции между интенсивностями ГКР-спектров богатой тромбоцитами плазмы периферической крови и параметрами агрегации тромбоцитов, полученных с использованием разных картриджей системы PFA-200.....	133
ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Опросник Мориски-Грина.....	134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сохраняется проблема недостаточно высокого ответа пациентов на терапию антиагрегантными препаратами [1, 2]. О данной особенности ответа на терапию антиагрегантами сообщалось у пациентов с сердечно-сосудистыми, цереброваскулярными и периферическими сосудистыми заболеваниями [3, 4].

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 [4, 5].

Большая часть лабораторных методов исследования функции тромбоцитов измеряют сложные процессы, которые в конечном итоге приводят к агрегации или адгезии тромбоцитов [6]. Имеются данные, что уровень устойчивости к ацетилсалициловой кислоте сильно зависит от метода лабораторно диагностики [7, 8], 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 [9, 10].

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 [11, 12]. Гемолиз, низкое количество тромбоцитов и гиперлипидемия могут влиять на результат теста [12].

Анализатор функции тромбоцитов Innovance PFA-100 и PFA-200 (Siemens) измеряет *in vitro* прекращение потока крови [13]. Это простой, быстрый метод с использованием цельной крови, требует небольших объемов проб. Однако

полученный результат зависит от фактора Виллебранда, уровня гематокрита и требует пипетирования [12], 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 [14]. Данный метод требует меньшего времени, пробоподготовка образца не требуется [15]. Недостатками является контакт с цельной кровью, частичная автоматизация, высокая стоимость прибора [16].

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 [17, 18].

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 [19]. Исследование фенотипических биомаркеров является важной задачей, поскольку генотипирование не может с точностью определять эффективность фармакотерапии у конкретного пациента [20].

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 [20, 21]. 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 *rampy* (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

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 РФФ (грант № 19-15-00132) и совместного проекта РФФИ и Правительства Калининградской области (грант № 415-390001).

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.

Внедрение полученных результатов

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).

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 отечественный и 66 зарубежных. Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 28 рисунков.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Научные положения диссертации соответствуют формулам специальностей:

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки): п. 6. Изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека; п. 20. Разработка и оптимизация методов фармакотерапии и профилактики заболеваний у различных групп пациентов с учетом индивидуальных особенностей, включая исследование приверженности фармакотерапии (комплаентности).

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки): п. 2. Оптимизация и разработка новых методов исследования химического и клеточного состава биоматериалов, определение требований и показаний к условиям их применения; установление референтных величин, предела колебаний каждого параметра биологических жидкостей и нормальных колебаний для отдельных контингентов (по возрасту, полу, роду занятий, среде обитания); определение диагностической информативности лабораторных тестов и их колебаний; п. 3. Клинико-лабораторные методы исследования для определения тяжести, периода и срока болезни, прогноза, контроля за лечением и его результатами; п. 6. Разработка методов химических исследований биологических жидкостей на предмет определения эндогенных и экзогенных вещества и их производные в организме: токсические вещества, лекарственные соединения.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Значение антиагрегантной терапии и контроля за ее эффективностью и безопасностью для первичной и вторичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются наиболее распространенной причиной смерти в мире несмотря на значительные достижения в профилактике и лечении атеротромбоза [22-24]. В Европе ССЗ являются причиной 44% всех смертей, при этом ишемическая болезнь сердца (ИБС) является причиной 44% летальных исходов от сердечно-сосудистых заболеваний, а инсульт — 25%. [22-24]. По данным федеральной службы государственной статистики в Российской Федерации с 2008 г. по 2021 г. смертность от ССЗ снизилась с 57% до 38%, в то же время в 2021 темпы снижения существенно уменьшились [25]. Смертность от ССЗ все еще превалирует над другими причинами смертности, 14,5% людей, погибших от ССЗ относятся к группе трудоспособного возраста [25]. Несмотря на положительную динамику, необходимо продолжать активную работу по снижению показателя смертности от ССЗ [26].

Исследователи отмечают, что возможности дополнительного снижения смертности за счет улучшения прогноза при острых состояниях практически исчерпаны [27]. Помимо использования эндоваскулярного лечения ключевую роль в лечении и профилактике повторного ОКС играет двойная антиагрегантная терапия, представляющая собой комбинацию ацетилсалициловой кислоты (АСК) и ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов тромбоцитов.

Антиагрегантная терапия (АТ) представляет собой один из основных методов медикаментозного вмешательства для предотвращения агрегации тромбоцитов, тем самым снижая риск образования тромбов, которые могут привести к инфаркту миокарда, инсульту и другим жизнеугрожающим

состояниям [28]. Актуальной и необходимой задачей на сегодняшний день является поиск новых подходов персонализации антитромбоцитарной терапии для снижения риска повторных атеротромботических событий [29].

Первичная профилактика ССЗ с использованием антиагрегантных препаратов (АП) представляет собой стратегию для уменьшения риска развития первичных сердечно-сосудистых событий у лиц, не имеющих клинически выраженных проявлений этих заболеваний, но обладающих факторами риска их развития [30].

АП, в частности АСК, давно используются в качестве базовой терапии в стратегиях первичной и вторичной профилактики ССЗ [30]. Использование АСК в первичной профилактике ССЗ поддерживается рядом крупных исследований, показавших, что ее применение у лиц с высоким сердечно-сосудистым риском, но без установленного заболевания, может снижать частоту сердечно-сосудистых событий [30, 31]. Однако такая терапия ассоциируется с увеличением риска кровотечений, что требует тщательной оценки баланса потенциальной пользы и риска перед началом лечения [30, 32].

В последние годы в рекомендациях международных медицинских организаций акцент смещается в сторону более осторожного подхода к назначению АСК в первичной профилактике, особенно у лиц с низким или умеренным риском ССЗ [31, 32]. Это обусловлено результатами недавних крупных исследований, таких как ASPREE, ARRIVE и ASCEND, которые продемонстрировали ограниченную пользу от применения АСК в популяциях с повышенным риском сердечно-сосудистых осложнений, при этом подтвердив связь с повышенным риском кровотечений [33].

На сегодняшний день подходы к первичной профилактике ССЗ антиагрегантами требуют индивидуализации, с учетом как общего сердечно-сосудистого риска, так и специфических факторов риска кровотечения у каждого конкретного пациента [32]. Важно учитывать возраст, наличие сахарного диабета, высокого артериального давления и других состояний, которые могут влиять на решение о начале терапии. Таким образом, первичная профилактика ССЗ с

использованием антиагрегантных препаратов остается важным, но сложным аспектом медицинской практики [32]. При принятии решения о назначении такой терапии необходимо внимательно взвешивать потенциальные преимущества и риски, опираясь на последние доказательства и рекомендации [30-32].

Вторичная профилактика ССЗ антиагрегантами играет критическую роль в уменьшении риска повторных сердечно-сосудистых событий у пациентов, перенесших инфаркт миокарда или инсульт [34]. Эта стратегия ориентирована на предотвращение агрегации тромбоцитов, что снижает вероятность образования тромбов и последующего развития острого коронарного синдрома, инсульта и других осложнений, связанных с ССЗ [34].

Крупные исследования показали, что АТ значительно снижает риск повторных сердечно-сосудистых событий у пациентов с ИБС. Например, метаанализ, проведенный совместно с Antithrombotic Trials (АТТ), показал, что долгосрочное использование АСК снижает риск серьезных сердечно-сосудистых событий примерно на 20% у пациентов с ИБС. [35]. Современные клинические руководства, например, от Американской кардиологической ассоциации (АНА) и Европейского общества кардиологов (ESC), рекомендуют применение ДАТ у пациентов после ОКС и ЧКВ для минимизации риска повторных сердечно-сосудистых событий [36]. Однако длительность ДАТ должна быть индивидуализирована на основе оценки риска исходов и потенциальных осложнений, включая риск кровотечений [37, 38].

Вторичная профилактика ССЗ с помощью АП является фундаментальной стратегией уменьшения риска повторных сердечно-сосудистых событий [34]. Выбор конкретного АП и схемы лечения должен основываться на клинических рекомендациях, актуальных исследованиях и индивидуальных характеристиках пациента.

Наиболее часто используемым АП в клинической практике является ацетилсалициловая кислота (АСК) [39]. Фармакодинамика АСК связана с необратимым ингибированием циклооксигеназы (ЦОГ-1), это приводит к снижению синтеза тромбоксана А₂ в тромбоцитах [40]. Тромбоксан А₂ является

мощным стимулятором агрегации тромбоцитов и сужения кровеносных сосудов. Понижение уровня тромбксана A2 уменьшает агрегацию тромбоцитов, тем самым предотвращая формирование тромбов, которые могут привести к развитию сердечно-сосудистых событий [40].

АСК применяется как для первичной, так и для вторичной профилактики ССЗ [32]. В контексте первичной профилактики АСК может назначаться определенным группам пациентов с высоким риском развития ССЗ для снижения риска инфаркта миокарда, инсульта и других тромботических событий [30-32]. Для вторичной профилактики АСК является стандартом терапии для пациентов после инфаркта миокарда, инсульта, а также для тех, кто подвергся коронарной ангиопластике или другим вмешательствам на сосудах, для предотвращения повторных сердечно-сосудистых событий [34].

К преимуществам АСК можно отнести доказанный эффект, в исследования подтверждают эффективность АСК в снижении риска сердечно-сосудистых событий. АСК применяется в медицинской практике десятки лет, что дает обширные данные о ее безопасности и эффективности.

Исследование Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration, этот мета-анализ объединил данные из более чем 100 000 участников и показал, что АТ с использованием АСК приводит к значительному снижению риска серьезных сосудистых событий на 25% у пациентов с атеротромботическими заболеваниями, включая пациентов, перенесших инфаркт миокарда, инсульт, или тех, кто имеет ИБС [41]. Исследование CURE показало, что комбинация клопидогрела и АСК по сравнению с применением только АСК у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) без подъема сегмента ST повышает риск сердечно-сосудистой смерти, инфаркта миокарда или инсульта. [42]. В исследовании CHARISMA изучалась эффективность комбинированной терапии клопидогрелом и АСК по сравнению с АСК в монотерапии у пациентов с повышенным риском атеротромботических событий [43]. Результаты показали небольшое, но статистически не значимое улучшение исходов в группе комбинированной терапии, подчеркивая необходимость индивидуального подхода к выбору терапии.

Также стоит отметить, что АСК является одним из самых доступных антиагрегантных препаратов на рынке [44].

К недостаткам стоит отнести повышение риска кровотечений. Длительное использование АСК может увеличить риск желудочно-кишечных кровотечений и кровотечений в других органах [32].

Клопидогрел — антиагрегантное средство, которое ингибирует связывание аденозиндифосфата (АДФ) с его рецепторами на поверхности тромбоцитов. Данный механизм делает клопидогрел эффективным препаратом для уменьшения риска тромбоэмболических событий [46].

Клопидогрел — производное тиенилпиридина, представляющее собой пролекарство, активируемое в печени цитохромом P450. [47]. Активный метаболит клопидогрела необратимо связывается с рецепторами P2Y₁₂ на мембране тромбоцитов, блокируя агрегацию тромбоцитов на весь оставшийся срок их жизни (7–10 дней). [47].

Клопидогрел используется в качестве стандартного средства в лечении пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС), в том числе у пациентов, подвергшихся ЧКВ [46]. Также препарат применяется для профилактики ишемических событий у пациентов с фибрилляцией предсердий, которым противопоказаны оральные антикоагулянты [48]. Ключевые исследования, подтверждающие эффективность клопидогрела, включают исследование CURE, которое показало преимущества добавления клопидогрела к стандартной терапии АСК у пациентов с ОКС без подъема сегмента ST [42], и исследование CAPRIE, демонстрирующее небольшое, но статистически значимое преимущество клопидогрела по сравнению с АСК в снижении риска ишемических событий у пациентов с атеротромботическими заболеваниями [49].

К достоинствам клопидогрела стоит отнести снижение риска сердечно-сосудистых событий у широкого круга пациентов и хорошую переносимость большинством пациентов [50]. Недостатками являются: необходимость метаболической активации, что может привести к вариабельности ответа у разных пациентов [7], риск кровотечений, особенно при комбинации с другими

антиагрегантами или антикоагулянтами [6, 42, 50], взаимодействия с другими лекарствами, метаболизируемыми с помощью цитохрома P450 [47].

Прасугрел — антиагрегантный препарат, антагонист класса рецепторов P2Y₁₂ к АДФ, который ингибирует активацию и агрегацию тромбоцитов. [51]. Прасугрел является одним из основных препаратов, применяемых для предотвращения повторного тромбообразования у пациентов с ОКС после проведения ЧКВ [52]. Прасугрел эффективно блокирует активацию тромбоцитов, вызванную АДФ, путем необратимого связывания с рецепторами P2Y₁₂ на их поверхности [53, 54]. Это приводит к значительному снижению риска тромбообразования.

Прасугрел рекомендуется для применения у пациентов с ОКС, включая тех, кто подвергается ЧКВ, поскольку исследования показали высокую эффективность у данной группы пациентов [55]. Препарат показан пациентам, которым требуется агрессивная антиагрегантная терапия для предотвращения тромбоза стента [56]. Эффективность и безопасность прасугрела были подтверждены в ряде крупных клинических исследований, включая исследование TRITON-TIMI 38, которое сравнивало прасугрел с клопидогрелом у пациентов с ОКС, подвергшихся ЧКВ [55]. По результатам проведенного исследования выявлено, что прасугрел эффективно снижает риск повторных сердечно-сосудистых событий, но при этом ассоциируется с повышением риска кровотечений [55].

К достоинствам прасугрела стоит отнести высокую эффективность в предотвращении сердечно-сосудистых событий у пациентов с ОКС и быстрое начало действия, что важно для пациентов, нуждающихся в немедленном эффекте [55, 56]. Однако повышенный риск кровотечений, необходимость в коррекции дозы у пожилых пациентов и пациентов с кровотечением в анамнезе, требуют тщательного отбора пациентов для терапии прасугрелом по сравнению с некоторыми другими антиагрегантами [56].

Тикагрелор — антиагрегант, который является селективным, но обратимым антагонистом рецептора P2Y₁₂ к АДФ, используемый для предотвращения агрегации тромбоцитов [57]. Тикагрелор применяется для снижения риска

сердечно-сосудистых событий у пациентов с ОКС, включая тех, кто подвергается ЧКВ [58].

В отличие от клопидогрела, тикагрелор не требует метаболической активации в печени для выражения своего антиагрегантного эффекта, что обеспечивает более быстрое и предсказуемое действие [57]. Эффективность тикагрелора в сравнении с клопидогрелом была продемонстрирована в исследовании PLATO, результаты которого показали значительное снижение риска смерти от инфаркта миокарда и инсульта у пациентов, получавших тикагрелор, по сравнению с теми, кто получал клопидогрел [58, 59].

К достоинствам тикагрелора стоит отнести быстрое начало действия: тикагрелор быстро абсорбируется и достигает максимальной концентрации в плазме крови в течение короткого времени, что обеспечивает быстрое начало антиагрегантного эффекта [57]. В отличие от клопидогрела и прасугрела, которые образуют необратимые связи с рецепторами P2Y₁₂ тромбоцитов, тикагрелор обладает обратимым механизмом действия [59]. Недостатком препарата является повышенный риск кровотечений, включая серьезные, что требует тщательного мониторинга [59]. Некоторые пациенты, принимающие тикагрелор, могут испытывать диспноэ (одышку), что может потребовать отмены препарата [60]. Стоимость тикагрелора может быть выше по сравнению с другими антиагрегантами, что делает его менее доступным [61]. Стоит также отметить, что тикагрелор принимается два раза в день, что может повлиять на соблюдение режима лечения пациентами [62].

Эффективность АСК и клопидогрела являлась предметом изучения во многих клинических исследованиях, которые подтвердили их эффективность в снижении риска сердечно-сосудистых событий у различных групп пациентов, включая тех, кто перенес инфаркт миокарда, инсульт или подвергся ЧКВ [42]. АСК и клопидогрел обладают широким спектром действия и хорошо переносятся большинством пациентов. Оба препарата доступны во многих странах и относительно недороги, особенно в сравнении с более новыми антиагрегантами, такими как тикагрелор и прасугрел [63].

АСК и клопидогрел включены во многие национальные и международные клинические рекомендации как стандартные средства для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний [64]. Их применение поддерживается ведущими кардиологическими организациями, такими как Американская кардиологическая ассоциация (АНА) и Европейское общество кардиологов (ESC) [65]. АСК и клопидогрел могут быть легко интегрированы в существующие схемы лечения, не требуя сложного мониторинга или коррекции дозы в большинстве случаев, что упрощает их применение в клинической практике [66].

В совокупности эти факторы делают АСК и клопидогрел предпочтительными вариантами для многих клинических случаев, в которых требуется АТ для профилактики повторных сердечно-сосудистых событий.

Фармакологический и лабораторный контроль за концентрациями ЛС в организме пациента играет ключевую роль в обеспечении эффективности и безопасности фармакотерапии [67]. Этот контроль позволяет оптимизировать дозировку, минимизировать риск побочных эффектов и взаимодействия между препаратами, а также обеспечить достижение терапевтических концентраций активных веществ для наилучшего клинического эффекта [67].

Понимание фармакокинетических процессов критически важно для корректировки дозировок, особенно у пациентов с сопутствующими заболеваниями, такими как почечная или печеночная недостаточность, которые могут влиять на метаболизм и выведение лекарственных средств [1, 67].

Лабораторный контроль включает в себя не только мониторинг концентраций лекарственных средств, но и оценку фармакодинамических эффектов препаратов, таких как изменения лабораторных показателей пациента, указывающих на эффективность или развитие побочных эффектов [32]. Это позволяет своевременно корректировать терапию и предотвращать нежелательные исходы лечения.

Персонализированная терапия, основанная на фармакокинетических и фармакодинамических данных, является фундаментальным принципом современной фармакотерапии [68]. Это подразумевает адаптацию дозировки

лекарственных средств с учетом индивидуальных особенностей пациента, таких как возраст, вес, пол, функциональное состояние органов метаболизма и выведения лекарств, а также наличие сопутствующих заболеваний [69].

Таким образом, фармакологический и лабораторный контроль за концентрациями лекарственных средств является неотъемлемой частью эффективной и безопасной фармакотерапии [7, 68].

В настоящее время для проведения терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) наиболее часто используют различные варианты иммунологических анализов с использованием моноклональных антител (иммуноферментный, радиоиммунный, иммунохроматографический анализы), а также высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) / масс-спектрометрию (МС) [70]. Иммунологические методы являются наиболее распространенными в силу своей относительной простоты в использовании и высокой скорости получения результата. В то же время иммунологические методы разработаны для ограниченного списка ЛС, требующих ТЛМ. В ряде случаев использование иммунологических методов не позволяет достичь нужной специфичности в силу возникновения перекрестных реакций с метаболитами ЛС, структурно-схожими компонентами и эндогенными соединениями [70]. ВЭЖХ/МС является золотым стандартом для ТЛМ в клинической практике, так как они признаны более надежными и являются достаточно точными. Однако проведение анализа занимает длительное время, является трудозатратным, дорогостоящим и требует высокой квалификации персонала [71]. Кроме того, пробоподготовка зависит от ожидаемой концентрации метаболита в биологическом образце, в некоторых случаях требуется разведение или концентрация биологического образца [72].

В связи с этим, разработка методов определения концентраций ЛС, которые основаны на иных принципах и лишены недостатков описанных выше подходов, является актуальной научной задачей.

В современной клинической практике агрегометрия служит основным методом лабораторного контроля за эффективностью АТ, позволяет оценить

функциональную активность тромбоцитов [73]. Различные виды агрегометрии, включая световую (оптическую), импедансную, многоплоскостную (МПА) и другие, имеют свои достоинства и ограничения [63].

Оптическая агрегометрия является "золотым стандартом" для измерения агрегации тромбоцитов [74]. Этот метод высоко чувствителен к изменениям в агрегации тромбоцитов, что обеспечивает точность в оценке эффективности терапии [74, 75]. Однако метод не лишен недостатков. Для анализа необходим свежий образец цельной крови, что может ограничивать применение метода [74, 76].

Импедансная агрегометрия позволяет проводить анализ прямо в цельной крови без необходимости предварительной подготовки образца [74]. Данный метод может быть использован для рутинного мониторинга. Благодаря оперативности и простоте исполнения, импедансная агрегометрия подходит для регулярного мониторинга пациентов [77]. Однако по сравнению с оптической агрегометрией, импедансная агрегометрия может быть менее чувствительной к некоторым изменениям в агрегационной активности тромбоцитов [74]. Метод менее информативен при необходимости детального изучения механизмов агрегации тромбоцитов, может не полностью отражать размер и структуру тромбоцитарных агрегатов [74, 77].

Многоканальная (многоплоскостная) агрегометрия (МПА) позволяет одновременно оценить влияние различных агонистов на тромбоцитарную функцию, обеспечивая комплексную картину агрегационной активности [74]. Метод дает возможность оценить различные аспекты тромбоцитарной функции, что может быть использовано для персонализации лечения [78].

Высокая информативность метода обусловлена сложностью его реализации и интерпретации результатов, что также сказывается на стоимости исследования [74, 78]. Для проведения МПА требуется специализированное оборудование и высокая квалификация персонала [78].

Экспресс-диагностика. P.O.C.T. – аналитическая система VerifyNow — это система для быстрого лабораторного тестирования, предназначенная для оценки

функциональной активности тромбоцитов и мониторинга антиагрегантной терапии АСК, клопидогрелом и тикагрелором [79]. Этот метод позволяет в режиме реального времени оценить эффективность антиагрегантной терапии, обеспечивая важную информацию для корректировки лечения и предотвращения как тромботических, так и геморрагических осложнений [79, 80]. Для работы прибор использует одноразовые тест-картриджи, содержащие реагенты для инициирования агрегации тромбоцитов в присутствии лекарственного средства [79]. Измерение агрегации тромбоцитов производится методом оптической агрегометрии на основе турбидиметрии (светопропускание) образца крови [79, 80].

VerifyNow обеспечивает получение результатов в течение нескольких минут [79]. Также система не требует специализированного лабораторного оборудования или высокой квалификации персонала для выполнения тестов [56]. VerifyNow предлагает стандартизированный метод оценки антиагрегантной терапии, что снижает риск вариабельности результатов [56]. Ограничением широкого использования метода в некоторых медицинских учреждениях может быть высокая стоимость тест-картриджей и самой системы [79]. Также стоит отметить, VerifyNow специфично оценивает эффект конкретных АП и может не отражать общую функциональную активность тромбоцитов при комплексном подходе к терапии [56].

Анализатор функции тромбоцитов Siemens PFA-200 представляет прибор, принцип работы которого основан на имитации условий агрегации тромбоцитов в кровеносных сосудах [81].

PFA-200 обладает высокой чувствительностью к функциональным дефектам тромбоцитов, в том числе к наследственным, приобретенным или индуцированным ЛС [82]. Анализатор позволяет получать результаты в течение нескольких минут [83]. Также анализатор отличается простотой в эксплуатации, что снижает вероятность ошибок при проведении анализа [82].

К недостаткам стоит отнести высокую стоимость прибора и расходных материалов [83]. Несмотря на широкий спектр возможностей, PFA-200 может

быть менее чувствителен к определенным типам нарушений, например, нарушению секреции гранул тромбоцитов, низкому уровню факторов свертывания, что требует дополнительного подтверждения другими методами [82]. Качество образца крови влияет на результаты анализа, что требует строгого соблюдения условий получения и хранения образцов [82].

Исследование особенностей фармакодинамики АП может являться ключевым фактором повышения эффективности данной группы ЛС, что в свою очередь имеет большую клинико-социальную значимость [39, 84].

Одной из причин возникновения тромботических событий несмотря на терапию АП является резистентность [4, 85]. Существует большое количество публикаций, в которых была выявлена корреляционная зависимость между резистентностью к АП и клиническими исходами [4, 46, 53, 66, 86].

Общепринятого определения резистентности к АП не существует, в первую очередь по причине отсутствия единого метода оценки действия (фармакодинамики) антиагрегантов и стандартизированных схем коррекции низкой чувствительности к ним [4, 5]. Рабочая группа по тромбозу Европейского кардиологического общества предложила следующие определения резистентности к АП: «клиническая резистентность» к пероральным АП определяется как наличие сердечно-сосудистого события у пациента во время приема АП, «лабораторная резистентность» к пероральным АП имеет место, когда реактивность тромбоцитов *in vitro* не блокируется должным образом, несмотря на использование пероральных АП [87].

АСК и клопидогрел в отличие от антагонистов GP IIb / IIIa, не полностью ингибируют агрегацию тромбоцитов [88] и не могут считаться мощными ингибиторами агрегации тромбоцитов. Данное заключение имеет два важных последствия:

1. Образование тромба, богатого тромбоцитами, может произойти, даже если один из механизмов усиления активации полностью заблокирован. Например, при ингибировании синтеза ТХА₂ АСК, отсутствует воздействие на опосредованную АДФ активацию тромбоцитов или активацию тромбином.

2. Большая часть лабораторных методов исследования функции тромбоцитов измеряют сложные процессы, которые в конечном итоге приводят к агрегации или адгезии тромбоцитов. Таким образом большинство данных тестов не подходят для оценки фармакологических эффектов АП, следует использовать методы, которые определяют наиболее прямое фармакодинамическое действие антиагреганта.

АСК необратимо подавляет активность ЦОГ-1, что в дальнейшем приводит к ингибированию образования ТХА₂. Таким образом, для обнаружения эффектов АСК предпочтительно использовать методики, которые измеряют образование ТХА₂ или функции тромбоцитов, которые «абсолютно» зависят от образования ТХА₂ [89]. В лабораторных методах, измеряющих сложные функции тромбоцитов, данный путь часто может быть «обойден» другими механизмами активации тромбоцитов. Таким образом, имеются данные, что уровень устойчивости к АСК сильно зависит от метода лабораторного анализа [14, 15]. Активный метаболит клопидогрела в свою очередь необратимо ингибирует Gi-связанный рецептор АДФ (P2Y₁₂) на поверхности тромбоцитов, таким образом для оценки эффективности препарата следует использовать метод, который измеряет опосредованное действие АДФ на рецептор АДФ/ систему Gi (например, ингибирование простаглицлина или простаглицлина Е1 стимулированное образование цАМФ).

Оценить эффективность АСК возможно, определив стабильный продукт разложения ТХА₂ - ТХВ₂ с помощью специфических иммунологических методов [40].

Наиболее часто используемыми методами для изучения антитромбоцитарных эффектов АСК являются методы оценки неспецифической функции тромбоцитов, такие как агрегометрия светопропускания или агрегометрия цельной крови. Используя тщательно подобранные активаторы тромбоцитов, можно достичь высокой степени специфичности исследования. Широко используется АДФ-индуцированная агрегация, но она не подходит для измерения эффектов АСК, потому что даже при искусственно низких

концентрациях Ca^{2+} (например, в цитратной крови или PRP) АДФ не стимулирует заметное образование тромбоксана и, что более важно, АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов не зависит от ингибирования тромбоксана. Соответственно, на агрегацию тромбоцитов, стимулированных АДФ, АСК не влияет. Напротив, агрегация тромбоцитов, вызванная низкими концентрациями коллагена (<1 мкг / мл), обычно зависит от образования эндогенного тромбоксана. Однако у некоторых людей даже низкие концентрации коллагена заметно стимулируют агрегацию тромбоцитов, несмотря на полное ингибирование образования тромбоксана АСК («псевдорезистентность») [63]. Таким образом, измерение индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов не является оптимальным методом оценки эффективности АСК. Напротив, индуцированная арахидоновой кислотой агрегация тромбоцитов зависит от образования эндогенного тромбоксана [73]. Однако следует отметить, что из-за высокой степени связывания белков цельной крови или PRP для индукции воспроизводимых процессов агрегации тромбоцитов требуются высокие уровни арахидоновой кислоты (до 1 мМ). Таким образом, агрегация тромбоцитов, вызванная арахидоновой кислотой, является наиболее надежным методом оценки антиагрегантного эффекта АСК.

Наиболее точные методы изучения фармакодинамики клопидогрела основаны на эффектах P2Y_{12} -опосредованной активации ингибирующих G-белков. [91]. Однако активация P2Y_{12} не приводит к выраженному снижению концентрации цАМФ в тромбоцитах и данные изменения достаточно трудно зафиксировать, метод выбора в данном случае – радиоиммуноанализ. Однако полученные результаты могут сильно различаться. Также концентрацию цАМФ возможно оценить путем измерения фосфорилирования VASP, опосредованного цАМФ/протеинкиназой A с помощью биохимических методов, таких как вестерн-блоттинг. Несмотря на то, что данный метод исследования достаточно специфичен для выявления эффектов клопидогрела, применение его достаточно ограничено по причине высокой трудоемкости (требуется выделение тромбоцитов, удаление белков плазмы, длительность постановки). Таким

образом, вестерн-блоттинг, хотя и является достаточно надежным методом, не подходит для рутинной оценки эффективности клопидогрела. Подобные соображения также применимы к иммуноферментным анализам [87].

Считается, что агрегометрия светопропускания и анализ фосфорилирования VASP сопоставимы для определения фармакологического ингибирования тромбоцитарного рецептора P2Y₁₂ АДФ [68]. Следует отметить, что АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов не может быть полностью подавлена клопидогрелом. В настоящее время активно используются методы, основанные на оптической трансмиссионной агрегометрии для определения эффективности терапии клопидогрелом [68]. Индуктором активации в данном случае является АДФ/пептид, активирующий тромбиновый рецептор.

На основании вышеизложенного, можно сделать вывод, что наиболее применимыми методами для изучения фармакодинамических показателей АСК являются агрегометрия светопропускания или агрегометрия цельной крови, индуцированная арахидоновой кислотой. Для изучения фармакодинамики клопидогрела предпочтительным методом является АДФ-индуцированная агрегометрия светопропускания или агрегометрия цельной крови. Однако данные методы не лишены недостатков и существует потребность разработки прибора для оценки эффективности АТ, основанного на иных принципах.

1.2. Клиническое значение и методы определения комплаентности к длительному приему антиагрегантных препаратов.

Наиболее распространенным способом определения степени соблюдения пациентами режима приема антиагрегантных препаратов является проведение интервью между пациентом и врачом или сбор данных с использованием различных типов анкет [92, 93]. С развитием компьютерной техники и мобильных технологий появилась возможность оценки приверженности с использованием электронных ресурсов [94]. Преимуществом использования мобильных устройств для оценки комплаентности является то, что их можно

использовать как инструменты для улучшения приверженности терапии (push-уведомления, смс, электронные письма о необходимости принять препарат) [94].

Многоцентровое проспективное наблюдательное фармакоэпидемиологическое исследование FORPOST выявило низкую приверженность к длительному приему АСК у пациентов, перенесших ОКС - 74,9% пациентов сообщили, что остановили или полностью прекратили прием препарата. Полностью комплаентными к длительному приему АСК оказалось 16,2% пациентов в исследовании. [95]. Авторы отмечают, что важной причиной снижения комплаентности к АСК является забывчивость пациентов, которая в 25,4% случаев становилась причиной прекращения приема препарата. Особое внимание стоит уделить преимуществам использования календарной блистерной упаковки, которая способствует обеспечению простоты и удобства применения препарата, а также в целом повышению комплаентности пациентов к длительному приему антиагрегантных препаратов.

Таким образом, современное представление о возможностях повышения комплаентности основывается на повышении информированности пациентов относительно их заболевания, адекватной оценки тяжести заболевания пациентом, понимания пользы от получаемой терапии. Повышение мотивации и дополнительное информирование пациентов с помощью мобильных устройств приводит в конечном счете к повышению комплаентности к терапии антиагрегантами.

1.3. Перспективы использования новых методов, основанных на спектроскопии комбинационного рассеяния света и спектроскопии ^1H -ядерного магнитного резонанса

Спектроскопические методы исследования ядер, атомов, ионов и молекул принадлежат сегодня к группе важнейших и наиболее распространенных методов инструментальной аналитики [96]. Высокотехнологические эмиссионные, абсорбционные и флуоресцентные спектрометры обеспечивают

точное определение качественного, а иногда и количественного состава газообразных, жидких и твердых веществ в биомедицинских исследованиях. Наиболее используемыми спектроскопическими методами в медицине являются: инфракрасная спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния, масс-спектроскопия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса. В данной работе мы рассматриваем возможности применения неразрушающих спектроскопических методов для персонализации антиагрегантной терапии. К неразрушающим методам относятся: спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС-спектроскопия), гигантского комбинационного рассеяния света (ГКРС-спектроскопия) и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия).

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) и гигантского комбинационного рассеяния света (ГКРС) представляют собой методы колебательной спектроскопии, используемые для детектирования сигнала (уникального спектрального отпечатка) молекулы [97].

Спектроскопия КРС – это метод колебательной спектроскопии, используемый для получения уникального спектрального отпечатка химического состава органических и неорганических соединений [97]. Излучение, рассеиваемое молекулами, содержит фотоны той же частоты, что и падающее излучение, а также некоторое количество фотонов с измененной (смещенной) частотой. Обычно КРС-спектры представляют как частоты (график соответствия зависимости интенсивности каждой индивидуальной частоты). Индивидуальные частоты декодируются из интерферограммы с использованием хорошо известного математического алгоритма Фурье преобразования.

Не существует двух разных молекул, которые имеют одинаковые КРС-спектры, в то же время интенсивность рассеянного света, как правило, связана с концентрационной зависимостью исследуемого вещества. Данный факт позволяет получать как качественную, так и количественную информацию об образце. Положение, интенсивность и ширина пиков в спектрах могут быть использованы для идентификации молекул или функциональных групп

(Рисунок 1) [99].

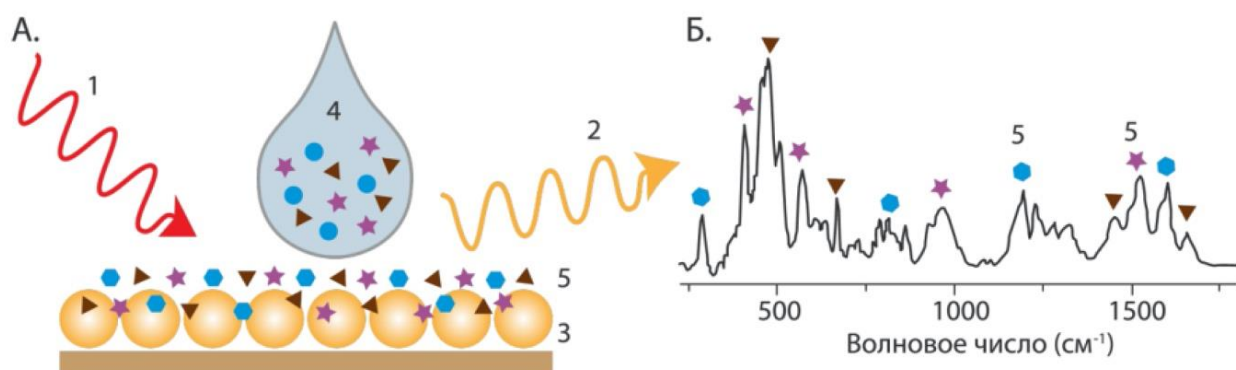


Рисунок 1. Выявление различных веществ по ключевым пикам на КРС-спектре сложной смеси. А. Комбинационное рассеяние (2) после облучения лазером (1) сложной смеси (4) биологических молекул (5) на подложке (3). Б. Спектр КР, отдельные пики позволяют идентифицировать наличие в сложной смеси определенные молекулы (5) (98)

ГКРС представляет собой явление, возникающее вследствие усиления сигнала на поверхности подложки за счет возбуждения плазмонных резонансов. Данный эффект позволяет на порядки увеличить интенсивность регистрируемого сигнала и, как следствие, повысить чувствительность обнаружения химических соединений и биологических молекул [100], что приводит к усилению КРС-сигнала от биологического объекта и позволяет определять анализируемые вещества в диапазоне очень низких концентраций [101].

Для реализации ГКРС-эффекта используют частицы и структуры металлов (чаще всего золота, серебра, меди), обладающих способностью генерировать колебания свободных электронов, усиливающих многократно (до 10^{10} раз) КРС-сигнал [102]. Подобные частицы называют ГКРС-зондами или ГКРС-наносенсорами. Нередко ГКРС-зонды имеют сложное строение и могут

включать, кроме наночастиц (НЧ), антитела, лекарственные вещества, магнитные частицы, ферменты. При прикреплении зонда к молекуле возможно осуществлять детектирование сигнала зонда и молекулы, а также получать спектральную информацию (Рисунок 2) [103].

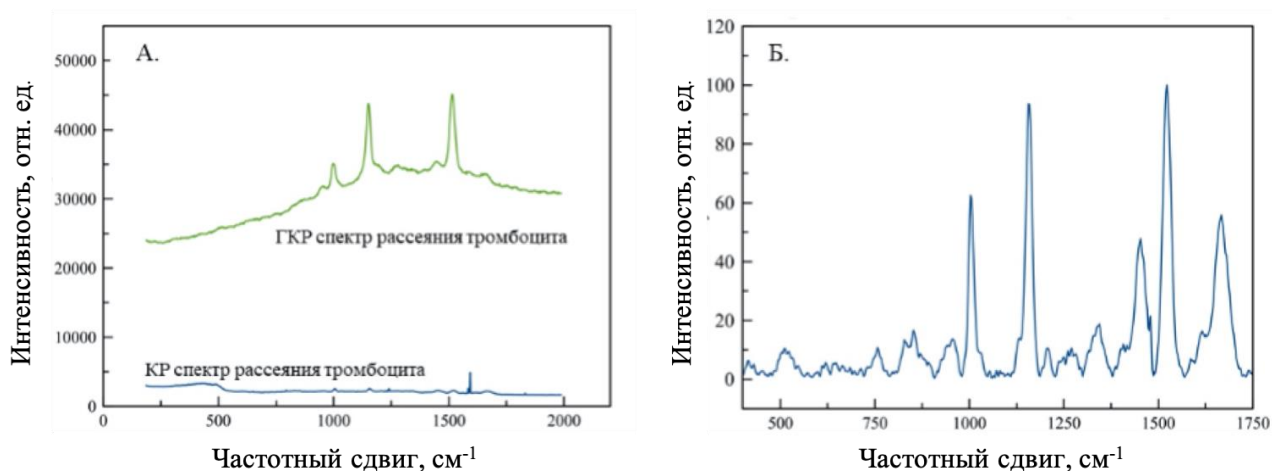


Рисунок 2. Спектры рассеяния тромбоцитов периферической крови. А. Сравнение КРС и ГКРС спектров рассеяния тромбоцитов человека. Б. ГКРС спектр рассеяния тромбоцита здорового добровольца (99)

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – метод, основанный на анализе спектра поглощения электромагнитного излучения ядрами атомов с ненулевым магнитным моментом, помещенных в постоянное магнитное поле [104].

Наибольший интерес для использования в медицине представляет изучение с помощью ЯМР ядер водорода (¹H), углерода (¹³C), натрия (²³Na) и фосфора (³¹P), так как атомы, содержащие данные ядра, максимально представлены в органах и тканях организма человека, а также входят в состав большинства ЛС [105]. При отсутствии внешнего поля магнитные моменты протонов разупорядочены (Рисунок 3А). Локальные поля вызывают частотные сдвиги (химические сдвиги) протонов, имеющих различное электронное окружение, а взаимодействия с ближайшими ядрами приводят к возникновению мультиплетной картины (Рисунок 3Б).

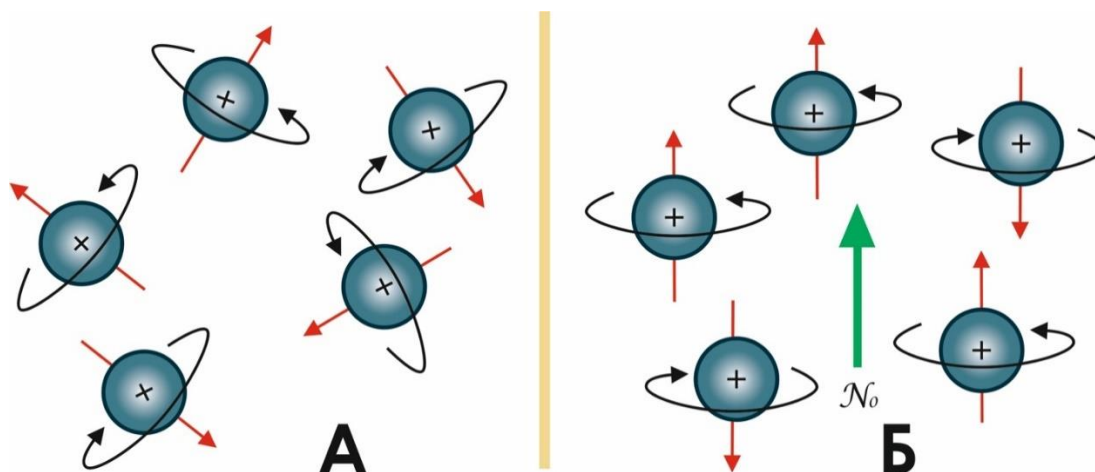


Рисунок 3. Воздействие внешнего магнитного поля на протоны. А. Протоны при отсутствии внешнего поля, Б. Протоны во внешнем магнитном поле

Данные, извлекаемые из ^1H ЯМР спектра, такие как химические сдвиги различных протонов, мультиплетность сигналов, ширина линий, содержат всю информацию о структуре исследуемого соединения, его концентрации, что позволяет осуществить его идентификацию без привлечения других методов и использовать ЯМР при поиске неизвестных продуктов метаболизма (Рисунок 4).

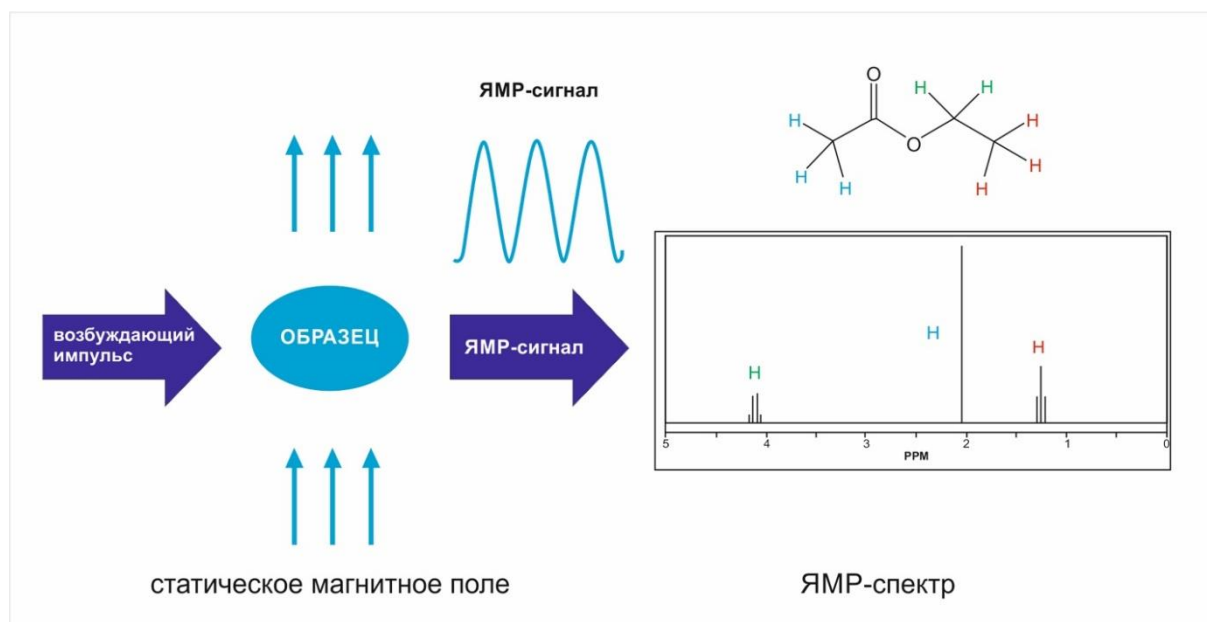


Рисунок 4. Схема получения ^1H ЯМР-спектра. ^1H ЯМР-спектр этилацетата, полученный с помощью спектрометра Varian 400-MR

^1H ЯМР-спектроскопия успешно используется для анализа биологических образцов с 1980-х годов и зарекомендовала себя как эффективный метод для идентификации и, преимущественно, качественной оценки как известных, так и неизвестных ЛС и их метаболитов в различных биологических жидкостях и тканях. В настоящее время ^1H ЯМР-спектроскопия бесспорно является одним из наиболее широко используемых спектроскопических методов в метаболомике и фармакометаболомике [45, 106]. А. Emwas и соавт. в своем обзоре отмечают, что за последние 15 лет существенно возросло количество научных работ, посвященных данной методике [105]. Востребованность метода резко возросла после появления руководства FDA о необходимости определения безопасности метаболитов ЛС, соответственно, появилась потребность поиска оптимальных средств их идентификации и количественного определения [107].

1.4. Преимущества и недостатки спектроскопических методов исследования фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных средств

Преимуществами метода ГКРС-спектроскопии являются: высокая чувствительность, минимальная инвазивность, низкий риск деструкции образца, минимальная необходимость в пробоподготовке, что открывает широкий спектр возможностей применения в биомедицинских исследованиях [71, 108, 109]. Для применения в рамках ТЛМ важным является то, что качественный и количественный анализ метаболитов ЛС в биологических жидкостях организма может быть проведен в течение нескольких минут. Точность метода в свою очередь сравнима с обычными методами ТЛМ [108, 109]. Предполагается, что ГКРС-спектроскопия может обеспечить возможность количественной оценки метаболита ЛС, в сложных биологических жидкостях [110]. Неоспоримым преимуществом ГКРС-спектроскопии является возможность определения нескольких молекул в одном образце одновременно [111].

К недостаткам метода ГКРС стоит отнести вероятность перекрытия

сигналов при анализе сложных биологических объектов. Кроме этого, сигнал очень чувствителен к собственной флуоресценции образца, например, при анализе сыворотки крови возможно перекрытие сигнала от отдельных молекул сигналом от макропротеинов [112]. Присутствие сложных биологических молекул может оказывать влияние на регистрируемые ГКРС-спектры, что делает количественную оценку концентрации ЛС в реальных образцах сложной задачей. Поэтому исследователи сосредоточились на задаче получения ГКРС-спектров от биологических образцов в контролируемых условиях. Способами реализации данной задачи являются: упрощение химической сложности самого образца в объеме или на поверхности металла [113].

Метод ^1H ЯМР спектроскопии получил широкое распространение благодаря своей воспроизводимости и скорости выполнения. Существенными преимуществами метода являются отсутствие сложной пробоподготовки, возможность одновременной работы с большим количеством образцов [114]. Ограничениями применения метода являются относительно невысокая чувствительность и сильная перегруженность получаемых спектральных изображений, которые в дальнейшем могут требовать дополнительной обработки [115]. Несмотря на наличие некоторых ограничений, ^1H ЯМР спектроскопия может быть использована в качестве метода выбора для определения метаболитов ЛС, поскольку позволяет определять структуру, проверять чистоту и количественно измерять выделенный метаболит ЛС [107].

На сегодняшний день идут активные разработки новых оригинальных сенсоров (зондов) для получения ГКРС-спектров лекарственных препаратов, многие подобные зонды уже являются коммерческими продуктами [116, 117]. Например, поверхность Klarite ТМ, предложенная Renishaw Diagnostics, используются для нанесения растворов сунитиниба, паклитаксела, иринотекана, активного метаболита иринотекана и доксорубина. [116]. Использование данных поверхностей позволяет количественно определять содержание ЛС и их метаболитов в терапевтических концентрациях.

S. Fornasaro и соавт. удалось количественно определить содержание

метотрексата в диапазоне концентраций от $1,0 \times 10^{-7}$ М до $3,0 \times 10^{-4}$ М в образцах сыворотки у онкологических пациентов методом ГКРС-спектроскопии с использованием сенсора из наночастиц, осажденных на фильтровальной бумаге [117].

Обнаружение метаболитов ЛС методом КРС в биологических жидкостях (сыворотка, кровь, моча) является важной задачей [118-120]. В работе М. El-Zahry и соавт. ГКРС-спектроскопия использовалась для одновременного определения АСК и витамина С как в образцах мочи [121]. Пределы обнаружения составили 32 и 3 нг/мл для АСК и витамина С соответственно. Результаты работы указывают на высокую точность и чувствительность метода.

N. Markina и соавт. разработали протокол для обнаружения антибиотиков в моче с использованием метода ГКРС-спектроскопии [122]. Протокол был апробирован для определения антибиотиков цефалоспоринового ряда (цефазолин, цефоперазон, цефотаксим, цефтриаксон и цефуроксим) в образцах мочи. Результаты исследования показали, что ГКРС-спектроскопия может быть использована для качественного и количественного определения вышеуказанных антибактериальных препаратов, за исключением цефуроксима.

В современной клинической фармакологии хорошо известна проблема оптимального дозирования аминогликозидов [67, 123]. В исследовании К. Mc Keating и соавт. впервые метод ГКРС был использован для обнаружения различных аминогликозидов, благодаря способности данной группы антибиотиков агрегировать наночастицы золота [124]. В результате работы выявлено, что метод способен детектировать концентрацию на три порядка ниже, чем требуется в клинической практике.

G. Nan и соавт. представили результат разработки протокола ГКРС-спектроскопии для изучения метаболизма противоопухолевого препарата 6-меркаптопурина (6-МП) в живых клетках [125]. Учеными установлено, что после попадания в клетки наночастицы золота, конъюгированные с 6-МП, метаболизируются до 6-МП-рибозы за 4 часа, а сигнал от этой молекулы резко снижается через 16 часов. Похожая работа была выполнена J. Yang и соавт. для

количественного определения 6-меркаптопурина и метимазола [126]. Таким образом, с помощью ГКРС-спектроскопии возможно визуализировать распределение противоопухолевого препарата опухолевых клетках.

Особый интерес представляет возможность использования ГКРС для детектирования концентрации ЛС *in vivo*, в частности J. Dong с соавт. сообщили об успешном обнаружении 6-МП с помощью устройства, объединяющего в себе иглу и ГКРС-датчик для внутрисосудистого и внутритканевого определения концентрации ЛС. Датчик был введен в вену уха кролика и латеральную широкую мышцу бедра на 10 минут для определения концентрации препарата в крови и мышцах соответственно [127].

Известно, что исследование фармакокинетики топических форм ЛС, используемых в офтальмологии, представляет большую сложность, прежде всего в связи с необходимостью использования инвазивных процедур [128]. В то же время, существуют клинические ситуации, когда подобный мониторинг ЛС крайне важен [129]. КРС-спектроскопия обладает бесспорными преимуществами: бесконтактность, возможность анализа в реальном времени, возможность качественной и количественной оценки ЛС, высокая специфичность определения ЛС [129]. М. Elshout и соавт. использовали относительно безопасный лазер, с помощью которого удалось идентифицировать и количественно оценить 29 ЛС, применяемых в офтальмологии [130].

КРС-спектроскопия позволяет проводить качественную и количественную оценку элюируемого вещества в стенке препарат-элюирующих стентов *in vivo* [131, 132]. Впервые метод КРС-спектроскопии был применен для исследования сосудистых стентов, покрытых полимерами и серолимуcom [132]. В процессе исследования были определены уникальные спектральные сигнатуры для каждой составляющей стента [132].

ЯМР-спектроскопия признана одним из самых эффективных методов одновременного получения качественной и количественной информации о химическом составе сложных веществ [133].

В литературе представлены данные о практичности применения ^1H ЯМР

спектроскопии при изучении строения и разработке дизайна ЛС [134, 135]. Благодаря своим преимуществам, данный метод широко востребован при разработке ЛС [136, 137]. ^1H ЯМР спектроскопия может быть использована для одновременной идентификации нескольких молекул (138-140), а также для определения структуры веществ [141-143]. Метод нашел применение в стереохимии [144, 145] и изучении изомеров [145, 146], имеет большой потенциал в исследованиях взаимодействия ЛС с белками [147, 148] и оценке токсичности ЛС [149-154]. Поскольку ЯМР является неразрушающим по своей природе, один и тот же образец можно анализировать повторно. Сначала можно провести ЯМР, а затем провести масс-спектрометрию (МС) биологического образца. Комбинация данных методов активно применяется для исследования биоэквивалентности оригинальных ЛС и дженериков [153, 155].

Благодаря усилиям ряда крупных лабораторий по изучению метаболомики со всего мира, в настоящее время существует несколько высококачественных ^1H ЯМР - спектральных баз данных эталонных спектров [105].

Количественный ЯМР анализ (кЯМР) возможен, поскольку интенсивность сигнала прямо пропорциональна количеству каждого отдельного ядра (например, ^1H , ^{13}C , ^{15}N и т.д.), присутствующего в образце [156], в том числе в биологических жидкостях, сложных лекарственных формах, растительных экстрактах и т.д. [157, 158]. Подавляющая часть применения кЯМР относится к ядрам ^1H , поскольку это наиболее чувствительный и простой метод [159].

В работе Gregory S Walker и соавт. подробно описаны возможности применения кЯМР для количественной оценки метаболитов атазанавира [160]. Метаболиты известной структуры некоторых ЛС, в том числе и атазанавира были синтезированы и точно количественно измерены с использованием кЯМР.

Фармакокинетика сопряженных с ПЭГ ЛС существенно зависит от фармакокинетики самого полимера. В связи с этим, некоторые исследовательские группы активно изучают возможности количественного определения ПЭГ в биологических средах методом кЯМР [161, 162]. Purnima Khandelwal и соавт. разработали метод, основанный на ЯМР для прямого

количественного определения ПЭГ (40 кДа) в образцах сыворотки [162]. Исследователи отмечают, что представленный метод является быстрым, надежным, точным, дает возможность количественной оценки и перспективен для применения в исследованиях фармакокинетики и безопасности ЛС. ЯМР идеально подходит для измерения таких полимеров, как ПЭГ, так как его молекула содержит большое количество спектроскопически эквивалентных протонов [162].

Большой интерес представляет собой обнаружение метаболитов лекарственных препаратов и других веществ в моче, поскольку моча является идеальным кандидатом для ЯМР анализа. Образец мочи не требует сложной пробоподготовки для последующего анализа методом ^1H ЯМР. Однако необходимым этапом подготовки образца биожидкости является добавление оксида дейтерия (D_2O) (дейтрированный растворитель) [163]. С использованием метода ^1H ЯМР возможно обнаружить вещества в низких концентрациях в моче, например, метаболит никетамида (аналептик, используемый как допинговый препарат) и γ -гидроксимасляной кислоты (ГНВ) (психоактивное вещество) [133]. Также с помощью ^1H ЯМР удалось выявить в моче биомаркеры применения таких ЛС, как парацетамол, АСК, симвастатин [160].

ГКРС может служить универсальным методом для быстрой и количественной оценки антимикробных эффектов на основе общей метаболической активности патогенных бактерий. Метод ГКРС подходит для быстрого обнаружения устойчивых и чувствительных штаммов *E. Coli* к карбапенемам [165] и тигециклину [166], обладает 100% чувствительностью, 98,7% специфичностью, имеет потенциал для прогнозирования эффективности терапии бактериальных инфекций [165, 166]. Активно разрабатываются новые поверхности для обнаружения и фототермического уничтожения микроорганизмов методом ГКРС в образцах цельной крови [167, 168]. Любопытные данные были получены Yifan Тао и соавт., команда исследовала антимикробный эффект фторида натрия, хлоргексидина и ампициллина с помощью ГКРС микроскопии [169]. Выявлено, что *Streptococcus mutans* при

воздействии данными веществами прекращал свое размножение, но оставался метаболически высокоактивным.

Также метод ГКРС имеет потенциал для использования в терапии онкологических заболеваний. Ряд исследований направлен на изучение экспрессии различных рецепторов раковых клеток, что позволяет персонализировать и повысить эффективность противоопухолевой терапии. В исследованиях Анастасии Капара и соавторов с помощью ГКРС-спектроскопии измерялся уровень экспрессии рецепторов ER α — одного из основных биомаркеров рака молочной железы, что имеет решающее значение для клинической диагностики и лечения. [25]. ГКРС - спектроскопия использовалась для исследования активности фулвестранта, первого в своем классе одобренного селективного деградатора рецепторов эстрогена (SERD). Картирование подтвердило, что дегградация ER α происходит после обработки фулвестрантом. Эффективность данного метода для определения послеоперационной чувствительности к химиопрепаратам при раке яичников была изучена Kazufumi Honda и соавт. [170]. Выявлено, что с помощью ГКРС-спектроскопии можно выявить сульфидные остатки, которые являются предикторами резистентности к цисплатину. Кроме того, ученые установили, что комбинация цисплатина с амброксолом (муколитический препарат, разрушающий сульфидные связи) увеличивает процент эффективности терапии в эксперименте у мышей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выполнения поставленных задач на базе ФГАО ВО БФУ им. И. Канта было проведено проспективное контролируемое исследование по оценке возможностей применения спектроскопических методов исследования для изучения фармакокинетики и фармакодинамики антиагрегантных лекарственных препаратов.

Для обеспечения объективности и надежности получаемых результатов исследование проводилось в соответствии с международными стандартами Good Clinical Practice (GCP), этическими стандартами Комитета по экспериментам на человеке; требованиями Хельсинской декларации 1964 года и ее пересмотренного варианта 2013 года; требованиями Постановления Межпарламентской Ассамблеи государств — участников Содружества Независимых Государств от 18 ноября 2005 г. № 26–10 «О модельном законе «О защите прав и достоинства человека в биомедицинских исследованиях в государствах — участниках СНГ». Все участники исследования дали письменное согласие на участие в исследовании и обнародование результатов.

2.1. Характеристика участников исследования

Выборка участников исследования формировалась на основе четко определенных критериев включения и исключения, что позволило сформировать гомогенную группу пациентов с сопоставимым риском развития ССЗ. В ходе исследования применялись стандартизированные методы сбора и анализа данных, что обеспечивало высокую степень воспроизводимости результатов.

Критерии включения в исследование:

1. Группа 1 (Здоровые добровольцы без ССЗ):
 - Добровольцы обоего пола, возраст 18 лет и старше.
 - Отсутствие ССЗ и других хронических заболеваний.
 - Отсутствие приема АП и НПВС в течение 7 дней до начала исследования.

2. Группа 2 (Здоровые добровольцы, получавшие АСК):

- Добровольцы обоего пола, возраст 18 лет и старше.
- Отсутствие ССЗ и других хронических заболеваний.
- Отсутствие приема АП и НПВС в течение 7 дней до начала исследования.

- Прием АСК в дозе 100 мг ежедневно в течение 1-3 дней перед процедурами исследования.

3. Группа 3 (Пациенты с ССЗ, без антиагрегантной терапии):

- Пациенты с ССЗ обоего пола, возраст 18 лет и старше.
- Диагностированные ССЗ с риском смерти от ССЗ в ближайшие 10 лет по шкале SCORE от 5 до 10% и выше.

- Отсутствие приема АП и НПВС в течение 7 дней до начала исследования.

4. Группа 4 (Пациенты с ССЗ, получавшие антиагрегантную терапию):

- Пациенты с ССЗ обоего пола, возраст 18 лет и старше.
- Диагностированные ССЗ с риском смерти от ССЗ в ближайшие 10 лет по шкале SCORE от 5 до 10% и выше.

- Получение стабильной антиагрегантной терапии (АСК в дозе 75-100 мг ежедневно или клопидогрел 75 мг ежедневно) в течение 7 дней или более перед началом исследования.

Пациент должен набрать 4 балла по опроснику MMAS-4 (Morisky Medication Adherence Scale) для определения комплаентности к лечению АП как «хорошая».

Критерии исключения из исследования (общие для всех групп):

- Применение других антиагрегантов (тикагрелор, прасугрел) и антикоагулянтов.

- Наличие острых инфекционных или воспалительных заболеваний на момент исследования.

- Беременность или лактация у женщин.

- История геморрагических расстройств или склонность к

кровотечениям.

- Психические расстройства или недостаточность, не позволяющие осознанно дать информированное согласие.
- Любые медицинские или этические причины, по мнению исследователей, делающие участие неподходящим или небезопасным для участника исследования.
- Отказ от подписания формы Информированного согласия.

Исследование проведено на базе Клинико-диагностического центра БФУ им. И.Канта. В исследовании приняли участие здоровые добровольцы и пациенты с ССЗ. Протокол проведения исследования был одобрен Независимым этическим комитетом Центра клинических исследований БФУ им. И.Канта (Выписка из протокола заседания № 8 от 16.05.2019 г.). Все участники исследования исследования подписали 2 экземпляра Информированного согласия до проведения всех процедур, предусмотренных данным исследованием. У участников исследования было достаточно времени, чтобы посоветоваться с родственниками и/или врачами. Участникам были разъяснены основные цели и задачи исследования, права и обязанности, перечень проводимых процедур. Все участники проинформированы об ожидаемой пользе и степени риска. Один экземпляр Информированного согласия был передан участникам на руки, второй экземпляр вложен в документацию по исследованию.

Общее количество обследованных участников исследования составило 152, возраст ≥ 18 лет. Исследуемая популяция была разделена на 4 группы. Это позволило более точно стратифицировать обследованных и использовать клинические данные.

У всех участников исследования была проведена оценка факторов сердечно-сосудистого риска. К факторам сердечно-сосудистого риска отнесены: мужской пол, возраст старше 55 лет у мужчин и старше 65 лет у женщин, менопауза, наследственная отягощенность по ССЗ, сахарный диабет, курение, дислипидемия, артериальная гипертензия, избыточная масса тела и ожирение,

употребление алкоголя.

Все обследуемые были разделены на 4 группы (Таблица 1).

Таблица 1

Клинико-анамнестические характеристики участников исследования,
включённых в исследование

Характеристика	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
Количество участников, 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)

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

Группа 1 - здоровые добровольцы без ССЗ (SCORE < 1%) SCORE, 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, клопидогрел 75 мг 1 раз в сутки в течение 7 дней или более). Группы здоровых добровольцев и пациентов с ССЗ не сравнивались между собой.

Оценку риска, согласно шкале SCORE, проводили в зависимости от пола, возраста, статуса курения, систолического артериального давления и концентрации общего холестерина (171). Риск смерти от ССЗ за 10 лет считали низким, если при проекции данных пациента на шкалу SCORE он составлял меньше 1%; умеренным — больше или равен 1% и меньше 5%; высоким — больше или равен 5% и меньше 10%; очень высоким — больше или равен 10%.

В 3 группу был включен 41 пациент обоего пола с артериальной гипертензией (систолическое давление 148 ± 15 (min=110; max=171) мм.рт.ст), из них 28 (68%) с документально подтвержденным наличием атеросклеротических бляшек в сонных артериях по данным ультразвукового исследования сосудов головы и шеи. Средний возраст 65 ± 7 лет (min=56; max=82), масса тела $68 \pm 15,1$ (min=59; max=102) кг, ИМТ = $28,2 \pm 4,8$ (min=59; max=102); 31 (76%) женщин и 10 (24%) мужчин. Все женщины находились в постменопаузе. Имели наследственную отягощенность по ССЗ 16 (39%), сахарный диабет 2 типа - 2 (5%) пациентов. Поведенческие привычки пациентов: курение - 7 (17%), курили ранее, но бросили - 4 (10%), наличие избыточной массы тела - 10 (24%), употребление алкоголя - 25 (60%). Все пациенты, включенные в данную группу, не получали терапию АП и НПВС не менее 7 дней до получения биологических образцов. Также пациентам были проведены следующие лабораторные исследования: общий холестерин, ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП, триглицериды, С-реактивный белок, глюкоза, креатинин, СОЭ, клинический анализ крови. Средний уровень общего холестерина составил $6,4 \pm 1,3$ ммоль/л, средний индекс коэффициента атерогенности $3,6 \pm 1,45$.

В 4 группу было включено 60 пациентов обоего пола с ИБС в анамнезе, артериальное давление (систолическое давление 137 ± 17 (min=100; max=160) мм.рт.ст), из них 35 (58%) с документально подтвержденным наличием

атеросклеротических бляшек в сонных артериях. Средний возраст $67 \pm 8,7$ лет ($\min = 51$; $\max=81$), масса тела $84 \pm 15,6$ кг ($\min = 52$; $\max=123$), ИМТ = $30,1 \pm 4,6$; 48 (80%) женщин и 12 (20%) мужчин. Все женщины находились в постменопаузе. Имели наследственную отягощенность по ССЗ 28 (47%), сахарный диабет 2 типа - 4 (7%) пациентов. Поведенческие привычки пациентов: курение - 12 (20%), курили ранее, но бросили - 1 (2%), наличие избыточной массы тела - 28 (46%), употребление алкоголя - 24 (40%) Пациенты, включенные в данную группу, получали постоянную терапию АСК – 60 (100%), клопидогрел – 12 (25%). Также пациентам были проведены следующие лабораторные исследования: Общий холестерин, ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП, Триглицериды, С-реактивный белок, Глюкоза, Креатинин, СОЭ, Клинический анализ крови. Средний уровень общего холестерина составил $6,6 \pm 1,3$ ммоль/л, средний индекс коэффициента атерогенности $3,6 \pm 1,5$.

Для определения комплаентности к терапии АП у всех пациентов из группы 4 был проведен опрос с использованием опросника MMAS-4 (Morisky Medication Adherence Scale). Опросник MMAS-4 (Morisky Medication Adherence Scale) включает четыре вопроса, направленных на оценку приверженности пациента лекарственной терапии. Эти вопросы касаются забывчивости пациента относительно приема лекарств, пропуска доз, прекращения приема лекарств при самочувствии и изменения дозировки без консультации с врачом. Ответы на вопросы позволяют оценить, насколько тщательно пациент следует предписаниям врача относительно лекарственного лечения. Все пациенты, включенные в данную группу, набрали 4 балла по MMAS-4. Таким образом, комплаентность к лечению АП определялась как «хорошая».

При сравнении клинических характеристик, выявлено, что группа 3 и группы 4 по возрастному ($t = 0,8$, $p>0.05$) и половому ($\chi^2 = 0.276$, $p>0.05$) составу достоверных различий не имеет (Таблица1).

Для оценки спектральной гомогенности богатой тромбоцитами плазмы у одного здорового добровольца мужского пола 33 лет (Группа 1) было взято 15 образцов крови в 6 разных дней в течение двухнедельного периода.

В исследовании фармакокинетики антиагрегантных препаратов методом ^1H – ядерного магнитного резонанса приняли участие 24 здоровых добровольца (14 женщин и 10 мужчин) в возрасте 19-50 лет. Здоровые добровольцы, принявшие участие в исследовании, исключили прием любых лекарственных препаратов и биологически активных веществ в течение как минимум семи дней до приема ацетилсалициловой кислоты и получения образцов мочи. Кроме того, добровольцы придерживались диеты, из которой были исключены продукты, богатые АСК (некоторые овощи: огурцы, кабачки, брокколи, шпинат, перец; свежие ягоды; фрукты; варенье). Возраст участников исследования был от 19 до 50 лет, вес от 55 до 85 кг. Все участники исследования не имели в анамнезе хронических заболеваний. Все процедуры исследования проведены после подписания информированного согласия.

2.2. Материалы и методы исследования фармакодинамики антиагрегантных препаратов

Агрегационную активность тромбоцитов исследовали при помощи агрегометра INNOVANCE Siemens PFA 200 (PFA-200, Siemens Healthineer, Мюнхен, Германия).

Анализ был поведен с тремя видами картриджей: 1. Картридж, содержащий в качестве активатора коллаген в сочетании с эпинефрином (Collagen/EPI). Картридж применяется для оценки риска кровотечения перед операцией, выявления тромбоцитарных дефектов, в том числе болезнь Виллебранда, а также выявления резистентности к терапии АСК и десмопрессином [83]. 2. Картридж, содержащий коллаген с АДФ (Collagen/ADP). Используется для дифференциации действия АСК от других дисфункций тромбоцитов [83]. 3. Картридж, содержащий простагландин E1 (P2Y). Основное применение — выявление резистентности к блокаторам рецептора P2Y₁₂. При этом прием АСК не влияет на результат исследования с этим картриджем [83].

Одноразовые картриджи состоят из нескольких частей: отсек для образца, капилляр, мембрана с индукторами и центральной апертурой. Анализируемый образец крови (800 мкл) аккуратно с помощью дозатора помещают в резервуар для образца, затем картриджи помещают в карусель анализатора, на дисплее указывают все необходимые параметры пациента и запускают прибор.

Образцы свежей венозной крови для проведения агрегометрии были взяты у здоровых добровольцев и пациентов с ССЗ в вакуумную пробирку, содержащую цитрат натрия (Vacutainer 4,5 мл с цитратом натрия 3,2% ®). Далее пробирки с полученным материалом экспонировались при комнатной температуре в течение 1,5 – 3 ч. Затем 800 мкл крови загружались в картридж анализатора.

Для исследования фармакодинамики АП с помощью КРС- и ГКРС-спектроскопии образцы свежей венозной крови были взяты у здоровых добровольцев и пациентов с ССЗ в вакуумную пробирку.

Метод №1. Венозная кровь была собрана в пробирку, содержащую ЭДТА (K2EDTA с напылением BD Vacutainer®).

Метод №2. Венозная кровь была собрана в пробирку, содержащую цитрат натрия 3,8% (BD Vacutainer® 4,5 мл с цитратом натрия 3,8%)

Далее образцы подвергались центрифугированию при 60g в течение 15 мин для отделения богатой тромбоцитами плазмы, затем ее второй раз центрифугировали при 60g в течение 15 мин для осаждения лейкоцитов и эритроцитов. На последнем этапе тромбоциты были осажены путем центрифугирования супернатанта при 1500g в течение 15 мин. Все этапы центрифугирования были проведены при 4°C с использованием центрифуги Eppendorf 5702 R. Далее богатая тромбоцитами плазма была нанесена на кварцевое стекло для исследования методом КРС и ГКРС-спектроскопии.

Данный этап работ был проведен на базе НОЦ «Фундаментальная и прикладная фотоника. Нанопотоника» БФУ им. И. Канта, руководитель лаборатории к. ф.-м. н. Илья Геннадьевич Самусев.

Для получения спектров КРС и ГКРС использовался спектрометр Centaur U HR со спектральным разрешением 2,5 см⁻¹. В процессе реализации выработанной

методики съемки образцы богатой тромбоцитами плазмы помещались на химически чистое кварцевое стекло или на модифицированные фемтосекундным лазером титановые поверхности [24]. Такие поверхности обеспечивали эффект плазмонного усиления и состояли из наноструктурированного титана с нанесенным абляционным золотом (Рисунок 5).

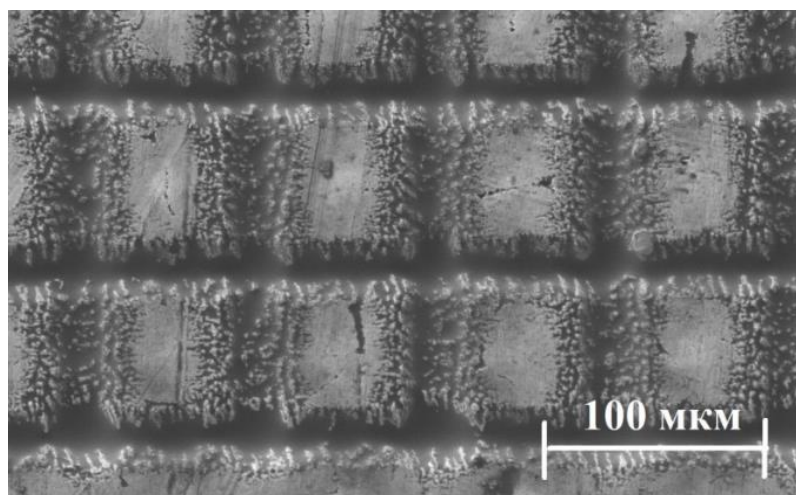


Рисунок 5. Используемые для получения ГКРС-спектров тромбоцитов наноструктурированные золотыми частицами титановые поверхности. Изображение получено методом сканирующей электронной микроскопии

На титановые поверхности наносилась капля образца объемом 5 мкл, производилось ее высушивание в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего образец помещался на держатель микроскопа. Оптическое изображение тромбоцитов на титановой поверхности изображено на Рисунке 6А. Для съемки был использован DPSS-лазер с длиной волны $\lambda=532$ нм. Лазерный луч фокусировался на образце вручную с помощью USB-видеокамеры и механической системы позиционирования. Размер лазерного пятна варьировался от 1×10 мкм до 1×25 мкм в зависимости от используемой мощности лазера. Для предотвращения разрушения образца и достижения наилучшего отношения сигнал / шум мощность лазера на образце варьировалась от 10 до 45 мВт. Время экспозиции регистрации сигнала составляло 30-80 секунд. Для каждого образца измерялось три повтора, после чего спектр арифметически усреднялся. Спектры комбинационного

рассеяния регистрировали в диапазоне волновых чисел «отпечатка пальца» от 400 см⁻¹ до 1800 см⁻¹. Прибор калибровался перед оценкой каждой серии образцов с кремниевым стандартом. Пример спектра изображен на Рисунке 6Б.

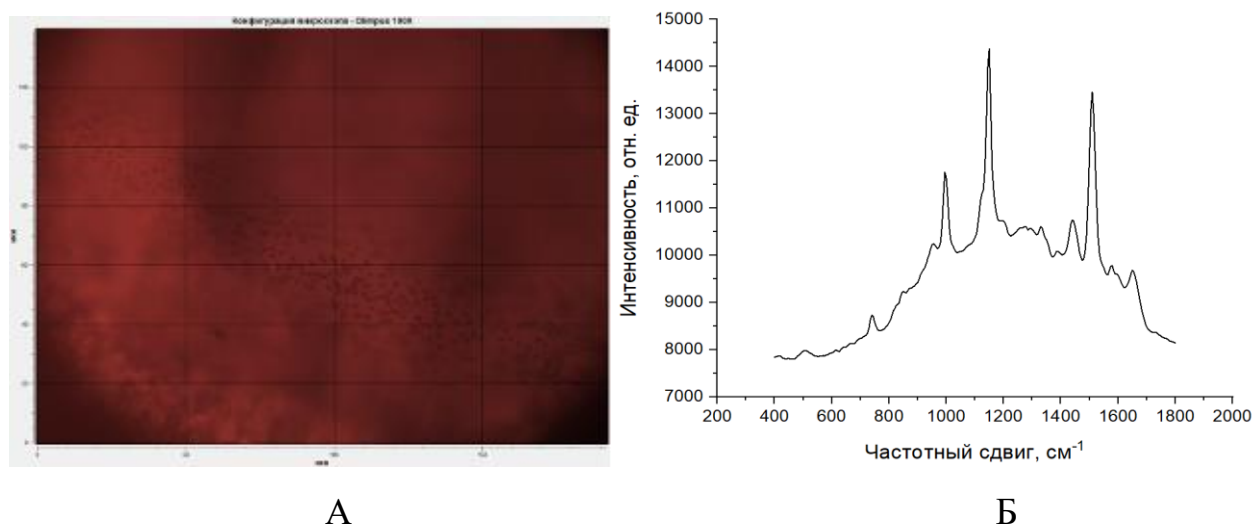


Рисунок 6. Оптическое изображение тромбоцитов на титановой поверхности (а) и (б) характерный ГКРС-спектр тромбоцита периферической крови пациента из группы 4

2.3. Материалы и методы исследования динамики выделения метаболитов ацетилсалициловой кислоты с мочой

Образцы мочи добровольцев были собраны до и после приема АСК. Моча была собрана через несколько временных интервалов (в соответствии с физиологическими потребностями добровольцев) в течение 24 часов после введения препарата. Для поиска оптимальной методики пробоподготовки образцов мочи для дальнейшего исследования ¹H ЯМР-спектроскопией было изучено несколько методов:

Метод 1. Свежесобранную мочу центрифугировали в течение 10 минут при 2000 g для удаления любых твердых частиц.

Метод 2. После проведения центрифугирования, описанного в методе 1, супернатант собирали и пропускали через стерильный шприцевой фильтр со средним диаметром пор 0,2 мкм и диаметром мембраны 28 мм (ацетат целлюлозы, стекловолокно (Merck, Millipore)).

Метод 3. После проведения процедур, описанных в методе 1 и 2, к образцу мочи добавляли 100–200 мМ забуференный фосфором раствор (K_2HPO_4), далее рН мочи был доведен до 7,2–7,4.

Затем образцы направлялись для исследования 1H -ЯМР.

Данный этап работ был проведен на базе Лаборатории магнитно-резонансных методов исследования БФУ им. И. Канта, руководитель лаборатории д.ф.-м.н. Галина Сергеевна Куприянова.

Во все подготовленные образцы перед исследованием методом 1H ЯМР для стабилизации условий резонанса добавляли 0.1% раствора DSS (4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфоновая кислота) в D_2O (дейтерированная вода). Общий объём образца составлял 600 мкл. Дейтерированная вода в методах ЯМР высокого разрешения необходима для точной стабилизации частоты эксперимента. DSS – один из калибровочных стандартов ЯМР, применяемый как для количественных измерений, так и для нахождения референтного сигнала химического сдвига. Данный стандарт часто применяется в метаболическом анализе методами ЯМР за счёт хорошей растворимости в воде и низкой чувствительности к колебаниям рН образца.

Образцы мочи были исследованы методом 1H ЯМР на спектрометре VARIAN 400MR в магнитном поле 9.4 Тесла и частотой резонанса протонов 400МГц. Основные параметры одномерного эксперимента, следующие: длительность 90 импульса была 2,5 мкс. Число накоплений (спектров) составило: от каждого образца, полученного от 4 здоровых добровольцев, принявших 3000 мг АСК 128 – всего 2560 спектров, от каждого образца, полученного от 24 здоровых добровольцев, принявших 100 мг АСК 298 - всего 28 608 спектров. Спектры регистрировались при температуре $T=25^\circ C$. Все химические сдвиги определялись по сигналу остаточных протонов дейтерированной воды, сигнал при $\delta = 4.64$ м.д. Спектральное отнесение сигналов эндогенных соединений в образцах мочи было сделано с учетом литературных данных химических сдвигов в биологических жидкостях, констант спин-спинового взаимодействия и значений, полученные для стандартных растворителей (105, 179). ЯМР-спектры стандартов: салициловой,

салициловой и гентизиновой кислот (salicylic, salicyluric and gentisic acids, Sigma-Aldrich) были зарегистрированы при тех же параметрах эксперимента, что и образцы мочи. Двумерные спектры COSY были получены со следующей импульсной последовательностью: $(90^\circ x - t_1 - 90^\circ x - t_1)$. Для подавления сигналов воды были опробованы различные импульсные последовательности (преднасыщение, WATERGATE, WET). Наиболее эффективной для исследованных образцов оказалась методика WATERGATE. Метод WATERGATE (WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation) основан на явлении градиентного спинового эха и позволяет подавлять сигнал воды с минимальными артефактами в получаемых спектрах, что позволяет также наблюдать сигналы, близкие к сигналу воды или перекрывающиеся с ним.

Предварительно, с целью различения сигналов метаболитов АСК на фоне метаболитов здорового человека, таких как гиппуровая кислота, были зарегистрированы спектры гентизиновой, салициловой и салицилуровой кислот с добавлением дейтерированной воды, и определены химические сдвиги относительно сигнала тетраметилсилоксана (ТМС).

После преобразования сигналов в частотное представление с помощью преобразования Фурье, на предмет наличия продуктов метаболизма АСК исследовались участки спектра в области химических сдвигов 4 ppm и 7-8ppm.

2.4. Статистический анализ полученных спектральных данных

Статистическая обработка 94 спектров богатой тромбоцитами плазмы, полученной от одного здорового добровольца, была выполнена согласно двум подходам для оценки гомогенности.

Первый подход основывался на снижении размерности спектральных данных и оценке дисперсии и расстояния между спектрами. Предварительная обработка данных включала коррекцию базовой линии и сглаживание с помощью фильтра Савицкого-Голея. Для снижения размерности применялся метод главных компонент (РСА), а в качестве меры удаленности спектров друг от друга

использовалось расстояние Махаланобиса. Расчеты проводились с помощью программы KnowItAll Vibrational Spectroscopy Edition (лицензия № 112029), также был использован ее статистический модуль (MVP).

При втором подходе в основе количественного определения «схожести» спектров была оценка разброса значений парных корреляций, а также их средний момент. Процедуры обработки, использованные во втором подходе, включали четыре основных этапа. Сначала выполнялось устранение грубого шума путем поиска одиночных «выбитых» точек (одиночных выбросов) и замена их средним значением шести соседних точек. В качестве второго шага применялось подавление «нормальных» статистических флуктуаций с помощью фильтра Савицкого-Голея. На заключительном этапе предварительной обработки выполнялось шкалирование путем стандартизации, а затем минимакс (MinMax) нормализации в группе спектров, полученных от одного человека. Для сопоставления спектров от разных образцов также использовалась интерполяция на одну сетку узлов. Сперва между собой сравнивались спектры, полученные с одной пробы, затем для каждой пробы выбирался наиболее типичный (коррелирующий с другими) спектр и уже они сравнивались между собой (Рисунок 7).



Рисунок 7. Схема статистического анализа гомогенности тромбоцитов

Для выявления ЧС ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы периферической крови, имеющих наибольшую информативность были применены алгоритмы машинного обучения. Использовали язык python и библиотеки `numpy` (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 $400\text{--}1700\text{ см}^{-1}$. Для коррекции базовой линии был использован алгоритм дважды взвешенных наименьших квадратов со штрафной функцией [173]. Нормализация интенсивности проводилась в два этапа: сначала путём линейного преобразования максимальное значение интенсивности приравнивалось единице, а минимальное — нулю, затем интегральная интенсивность в рассматриваемой области частот нормировалась на единицу.

Полученные в результате предобработки значения интенсивности использовались напрямую в качестве векторов признаков для тренировки алгоритмов машинного обучения. Задачи бинарной классификации решались с использованием методов случайного леса и градиентного бустинга [174]. Оптимальные гиперпараметры для классификаторов определялись с использованием Байесовского поиска и 4-кратной кросс-валидации со стратификацией. Разделение на выборки проводилось таким образом, чтобы данные от одного участника эксперимента не попадали одновременно в тестовую и обучающие выборки. В качестве критерия отбора гиперпараметров использовалась f-мера, поиск был ограничен до 100 шагов.

Для определения значимости признаков все данные разбивались на обучающую и тестовую выборку в соотношении 9:1. Значимость признаков определялась как полный прирост информации, обусловленный использованием признака при построении деревьев.

Результаты проведения численных экспериментов показали, что использование градиентного бустинга позволяет получить лучшие результаты по сравнению с обычным случайным лесом (результаты приводятся только для бустинга). Дополнительно, для отсеивания признаков использовался алгоритм Борута [175-177] с ограничением в 100 эпох.

Статистическая обработка данных была выполнена с использованием редактора электронных таблиц MS Excel 7.0 и программного пакета Statistica 13.3. В качестве основного объекта для поиска потенциальных предиктивных биомаркеров являлись совокупности значений максимумов ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы периферической крови, соответствующих определенным частотным сдвигам (ЧС). Эти данные были получены отдельно для всех групп пациентов и здоровых добровольцев. 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, реализованный в функции «прямоугольная матрица корреляции» программного пакета Statistica 13.3.

Для классификации интенсивностей, полученных на определенных частотных сдвигах при ГКРС спектроскопии, был проведен линейный дискриминантный анализ Фишера с использованием соответствующих функций пакета Statistica 13.0. 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 ГКРС-спектров, полученные на наиболее информативных частотных сдвигах.

Для преобразования количественных значений времени закрытия (СТ), определенных при проведении агрегометрии, к неколичественным (номинативным) значениям, использовали следующие критерии. Для теста COL/ADP референтный диапазон СТ составил – 96,2-114,5 сек. как для мужчин, так и женщин. Для теста COL/EPI общий референтный диапазон СТ составил для мужчин – 161,3-199,6 сек., для женщин – 131,2-193,4 сек. Для теста P2Y референтные значения СТ - 73,2-88,0 сек., независимо от гендерной принадлежности [178].

Учитывая, что основной целью исследования явилось оценка основного фармакодинамического действия АТ препаратов - антитромботического эффекта, количественные значения СТ, преобразовывали в два качественных значения – «высокая остаточная реактивности тромбоцитов (ОРТ)» и «отсутствие высокой ОРТ». Данное разделение использовалось прежде всего для выявления тромбоцитарной гиперфункции – фактора риска развития тромботических и тромбоэмболических осложнений у пациентов, получающих АТ препараты. При превышении верхних значений, указанных референтных диапазонов пациенты классифицировались как пациенты с высокой ОРТ.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Применение метода спектроскопии комбинационного рассеяния света для персонализации антиагрегантной терапии

Нами были изучены две методики пробоподготовки образцов периферической крови для получения богатой тромбоцитами плазмы с целью дальнейшего исследования методами КРС- и ГКРС-спектроскопии (Рисунок 8).

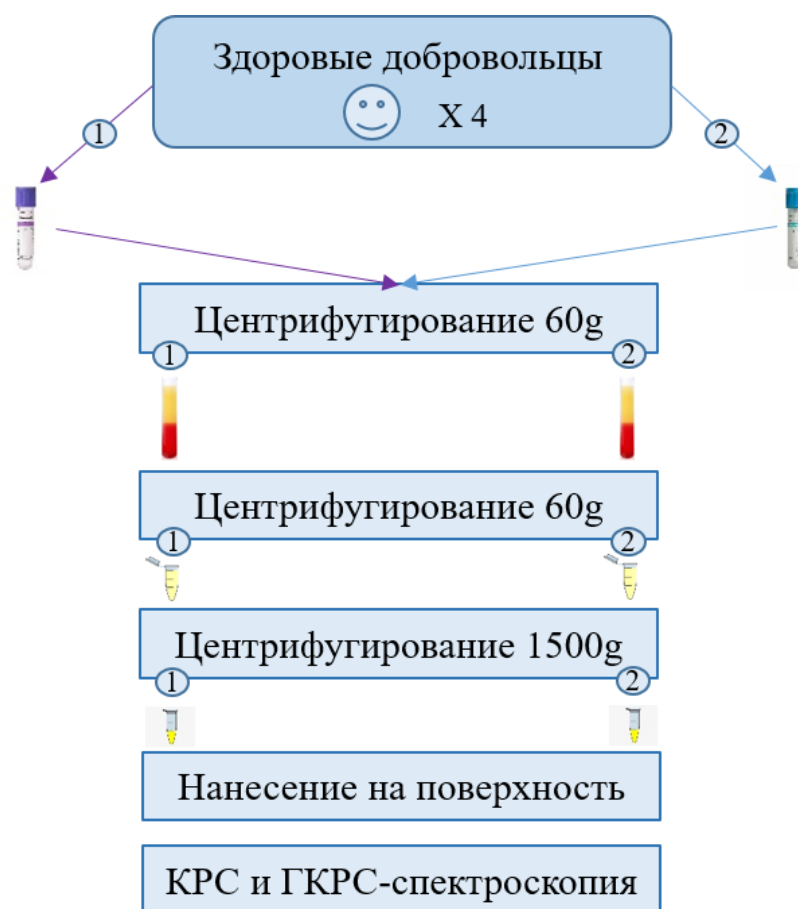


Рисунок 8. Схема пробоподготовки образцов венозной крови для получения богатой тромбоцитами плазмы и дальнейшего исследования методом КРС и ГКРС-спектроскопии. 1- метод № 1, 2 – метод № 2.

Особенностью метода № 1 является использование для забора крови вакуумных пробирок с напылением K2EDTA, метода № 2 – вакуумных пробирок, содержащих цитрат натрия 3,8%. Различий в режимах центрифугирования

образцов при использовании метода № 1 и метода № 2 не было.

Для выбора оптимальной методики пробоподготовки, были собраны образцы крови у 4 здоровых добровольцев, не принимающих АП. Все образцы были собраны в один день, пробоподготовка была произведена в день сбора биоматериала. У каждого добровольца было получено 2 образца венозной крови (1 образец в пробирку с K2EDTA, 1 образец в пробирку с цитратом натрия 3,8%). Образцы, полученные от каждого добровольца, были обработаны с использованием метода № 1 и метода № 2.

Далее каплю образца богатой тромбоцитами плазмы объемом 5 мкл помещали на модифицированные фемтосекундным лазером титановые поверхности. Оптическое изображение тромбоцитов, полученное с помощью объектива Olympus 100X представлены на Рисунке 9.

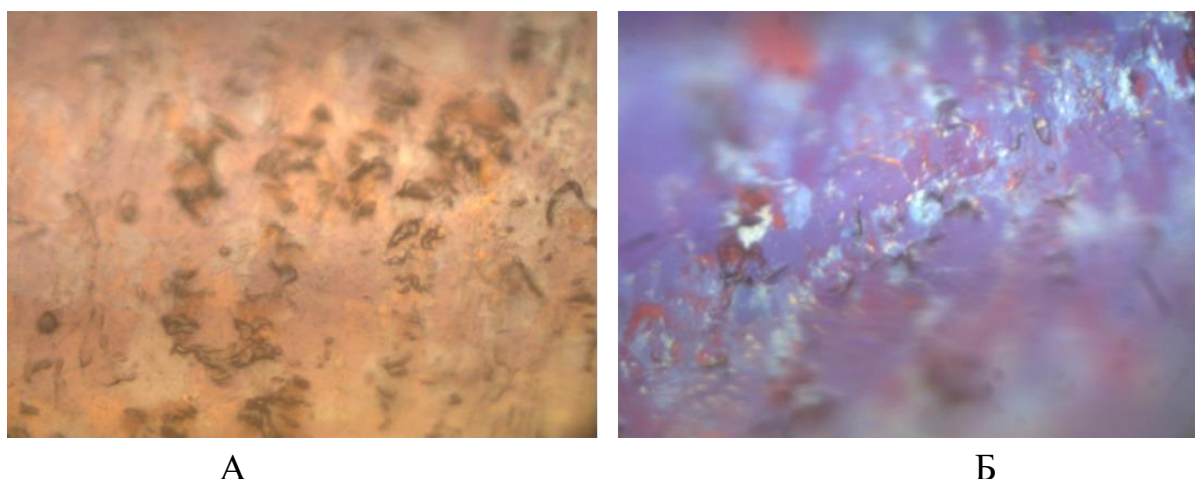


Рисунок 9. Фотографии тромбоцитов, полученные с помощью оптического микроскопа Vx 47 Olympus с использованием объектива Olympus 100X.

А – тромбоциты, полученные с использованием метода №1,

Б – тромбоциты, полученные с помощью метода №2.

При визуальном качественном изучении спектров выявлены отличия между спектрами, регистрируемыми от образцов, полученных с использованием метода № 1 и метода № 2 (Рисунок 10). Использование для пробоподготовки Метода № 2 (цитрат натрия в качестве антикоагулянта) сопряжено с получением ГКРС-

спектров с большим количеством пиков – «шумов», заметных даже при простом визуальном сравнении.

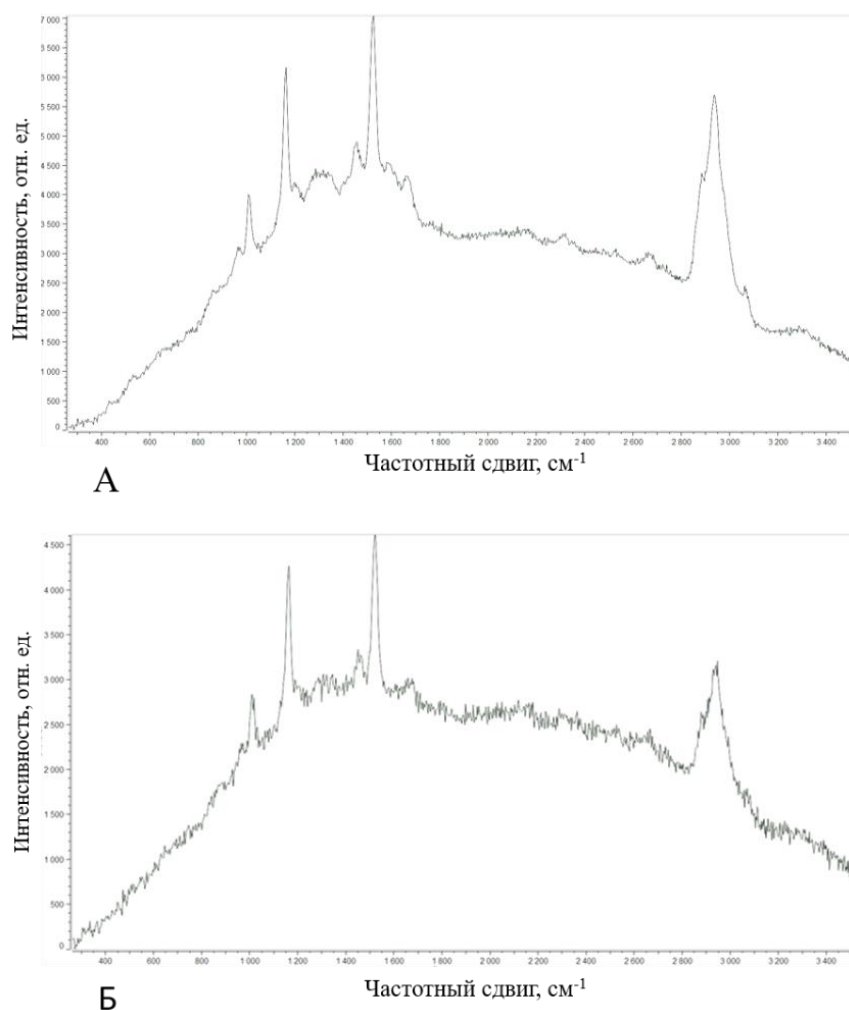


Рисунок 10. Сравнение ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы здорового добровольца.

А – типичный спектр, полученных с использованием метода №1;

Б – типичный спектр, полученных с помощью метода №2

Далее в работе для выделения получения богатой тромбоцитами плазмы периферической крови с целью дальнейшего исследования методом КРС- и ГКРС-спектроскопии был использован только метод № 1.

Для сравнения подходов, основанных на КРС- и ГКРС-спектроскопии, образец богатой тромбоцитами плазмы здорового добровольца был изучен как методом КРС-, так и методом ГКРС- спектроскопии (Рисунок 11).

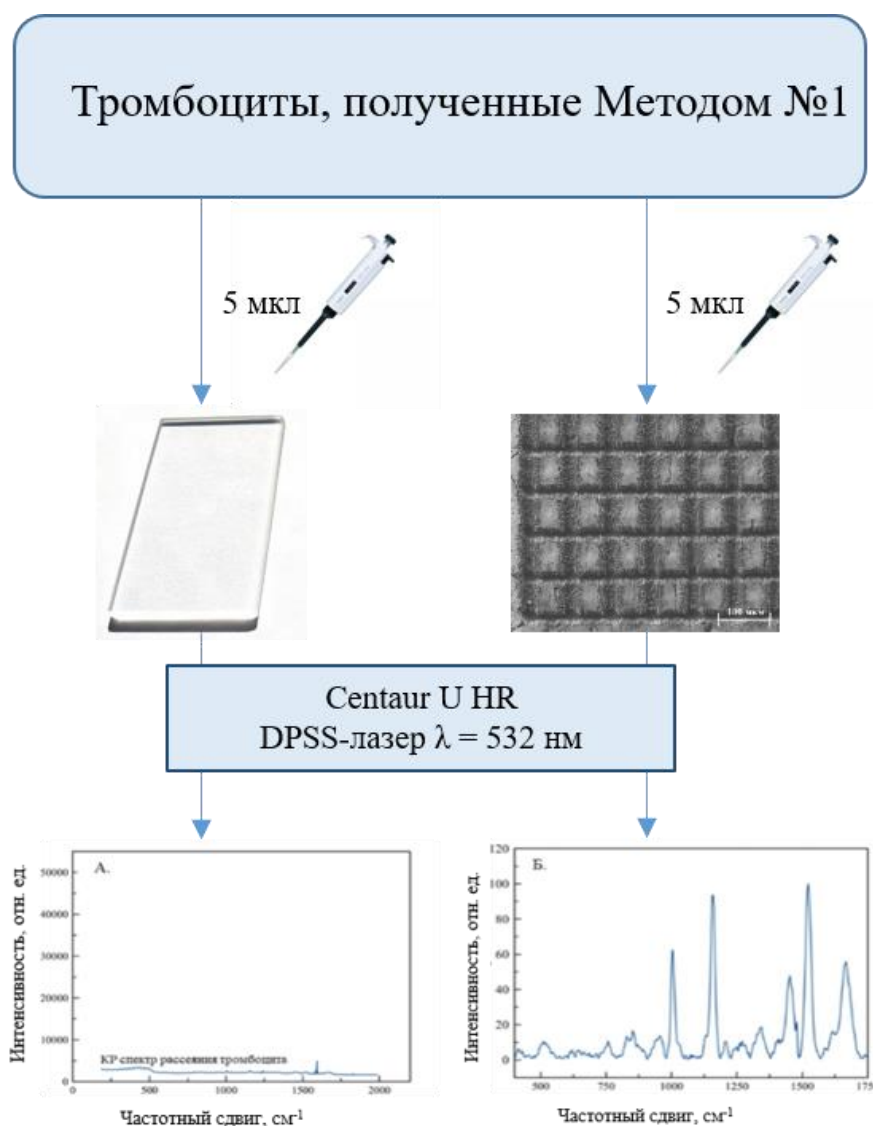


Рисунок 11. Получение КРС и ГКРС спектров рассеяния богатой тромбоцитами плазмы периферической крови А. КРС-спектр рассеяния богатой тромбоцитами плазмы здорового добровольца, Б. ГКРС-спектр рассеяния богатой тромбоцитами плазмы здорового добровольца

Каплю образца объемом 5 мкл помещали на химически чистое кварцевое стекло для дальнейшего исследования с помощью метода КРС-спектроскопии. Также каплю образца богатой тромбоцитами плазмы объемом 5 мкл помещали на модифицированные фемтосекундным лазером титановые поверхности, для формирования эффекта ГКРС и для получения ГКРС-спектров. Для получения КРС- и ГКРС- спектров использовались идентичные условия съемки, описанные ранее в разделе «Материалы методы». В частности, использовались одинаковые

характеристики лазерного луча (DPSS-лазер $\lambda = 532$ нм). Спектры КРС и ГКРС регистрировали в диапазоне волновых чисел «отпечатка пальца» от 400 см⁻¹ до 1800 см⁻¹. Для обработки полученных спектров использовалась информационная система BioRad-Know It All (Willey, UK).

Было проведено качественное сравнение КРС- и ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы. Как видно из Рисунка 12, для КРС-спектроскопии богатой тромбоцитами плазмы на кварцевом стекле характерен «монотонный» спектр без выраженных характерных пиков. В то же время, спектры, полученные с помощью ГКРС-спектроскопии, характеризуются наличием выраженных пиков, которые позволяют анализировать информацию о физико-химическом состоянии образца.

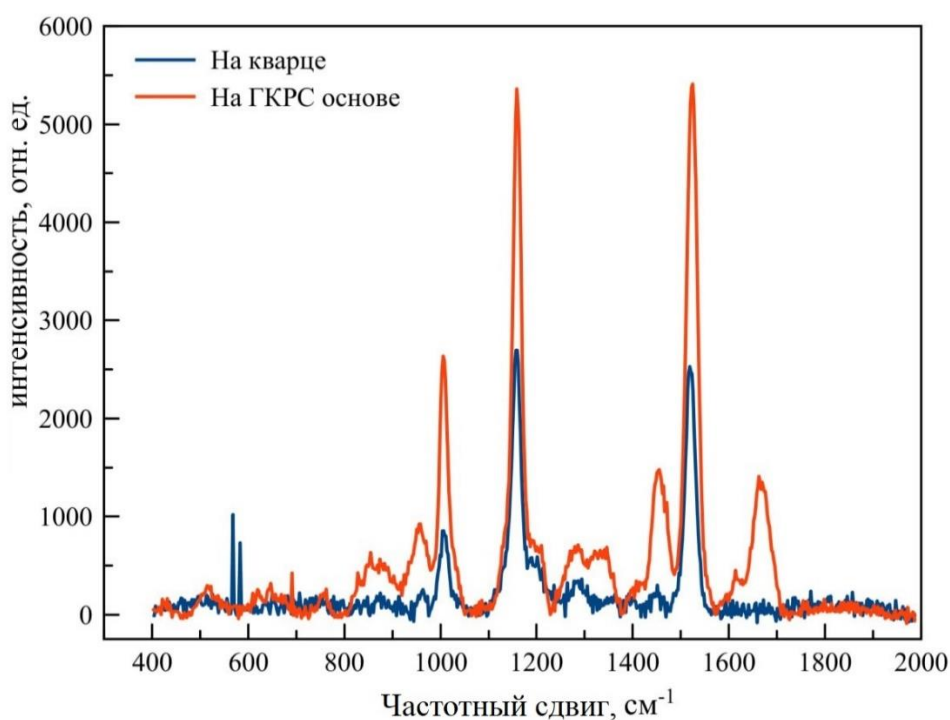
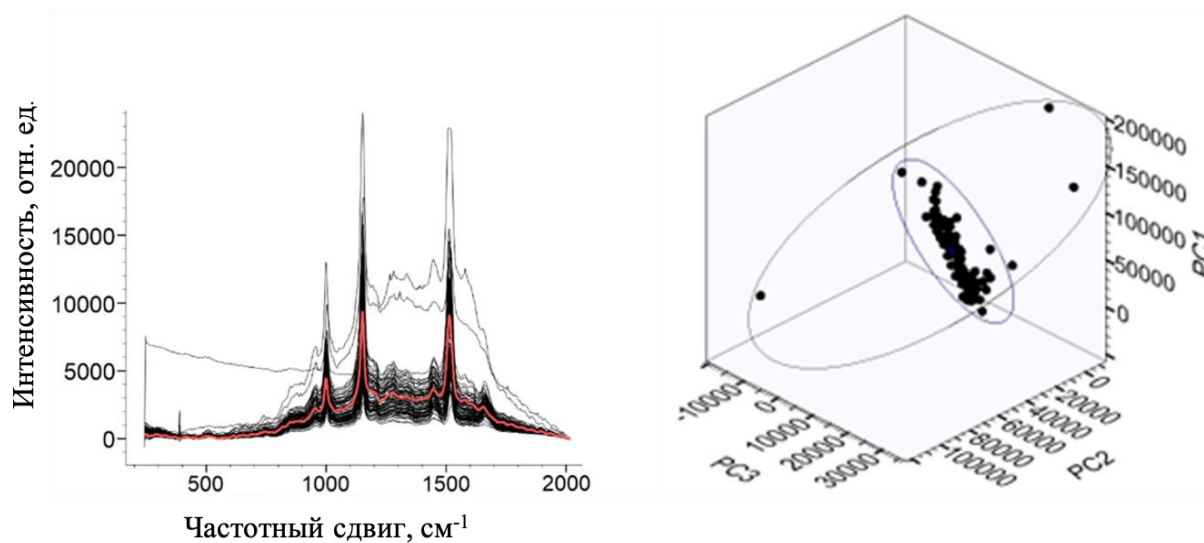


Рисунок 12. Спектры рассеяния богатой тромбоцитами плазмы периферической крови.

В связи с очевидными преимуществами метода ГКРС-спектроскопии, связанным, прежде всего, с его более высокой чувствительностью, далее в работе для выявления фармакодинамических биомаркеров использовался данный метод.

С помощью предварительной обработки методом главных компонент (РСА-

анализ) показана высокая однородность спектров, за исключением трех аномальных спектров, причиной отклонения которых стала неоднородность подложки для ГКРС-спектроскопии. Усредненные ГКРС-спектры отмечены красной линией (Рисунок 13А). Трехмерный график РСА показан на Рисунке 13Б. На трехмерном графике представлены сгруппированные ГКРС-спектры богатой тромбоцитами плазмы здорового добровольца.



А

Б

Рисунок 13. А. ГКРС – спектры богатой тромбоцитами плазмы, Б. Трехмерный график РСА-анализа ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы

На Рисунке 14 показана совокупная дисперсия набора данных ГКРС-спектров и значение процентной дисперсии. Первые три компонента представлены осями графика и охватывают наибольшую дисперсию данных. Совокупная дисперсия набора спектральных данных показала, что главные компоненты от PC1 до PC3 ответственны за 97% всех спектральных вариаций: PC1 = 81,8%; PC 2 = 93,4%; PC 3 = 97,2%. С другой стороны, значение процентной дисперсии для спектральных вариаций составило 3,5%: PC1 = 81,27%; PC 2 = 12,09% PC 3 = 3,29%.

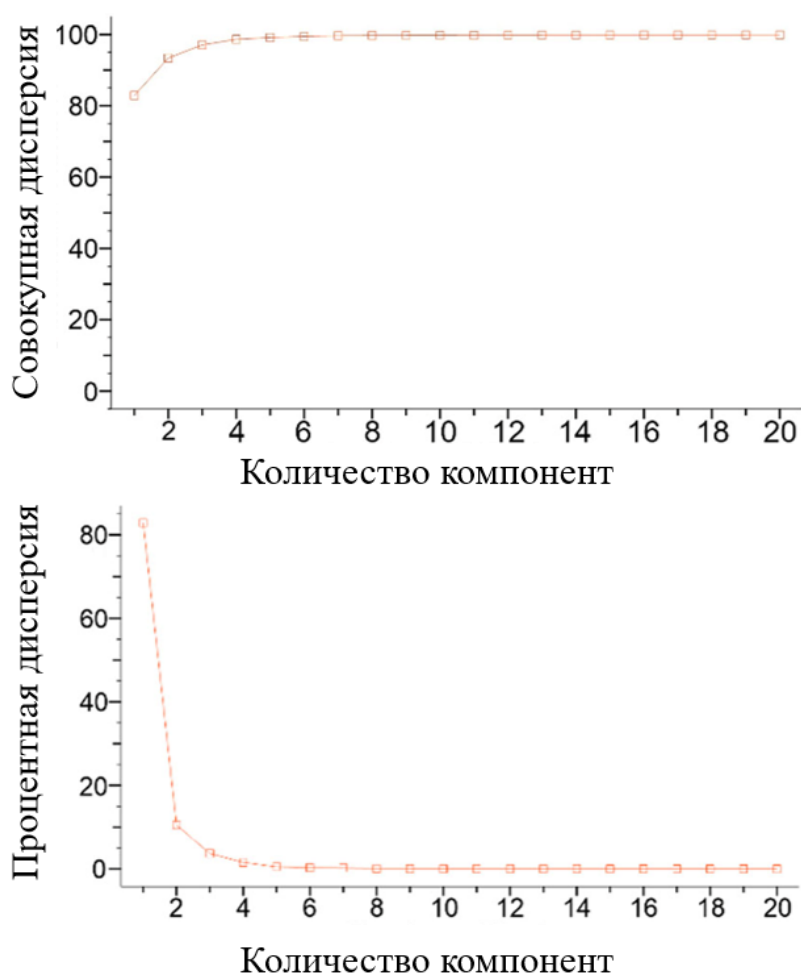


Рисунок 14. Совокупная дисперсия набора данных ГКРС-спектров (А) и значение процентной дисперсии (Б)

Для определения сходства ГКРС-спектров было использовано расстояние Махаланобиса (Рисунок 15). Расстояние Махаланобиса учитывает ковариацию данных и измеряется как стандартное евклидово расстояние между двумя точками, одна из которых является точкой выборки, а другая - центром выборки, взвешенным по ковариационной матрице данных.

В нашем случае получаемые значения дают статистическую меру того, насколько хорошо спектр неизвестного образца совпадает с инвариантом всех спектров. Рассчитанное расстояние Махаланобиса для 91 спектра не превышало 5, а для трех спектров – 14, 32 и 91. Оно показало минимальное отклонение для 97% спектрального набора. В результате мы можем сделать вывод, что спектры богатой тромбоцитами плазмы достаточно однородны.

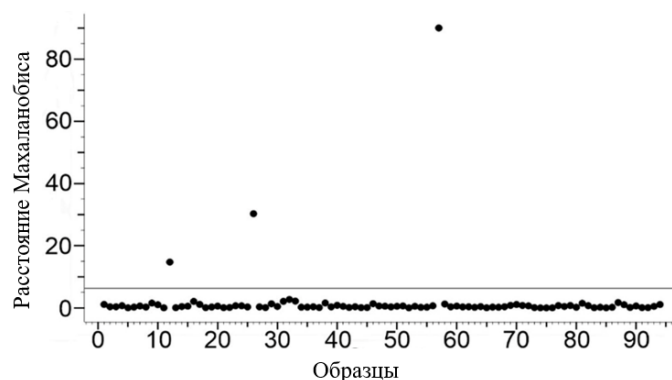


Рисунок 15. Распределение расстояний Махаланобиса для ГКРС-спектров здорового добровольца

Для более глубокого изучения и подтверждения предположения о спектральной однородности мы провели еще одну статистическое исследование. Для него были поставлены 2 задачи: 1) сравнить спектры, снятые с разных точек одной пробы (снятые в том числе после перезагрузки спектрометра), 2) сравнить спектры разных проб, взятых у одного добровольца в разные дни. На Рисунке 16 показан пример набора спектров для одного образца до предварительной обработки и после нее.

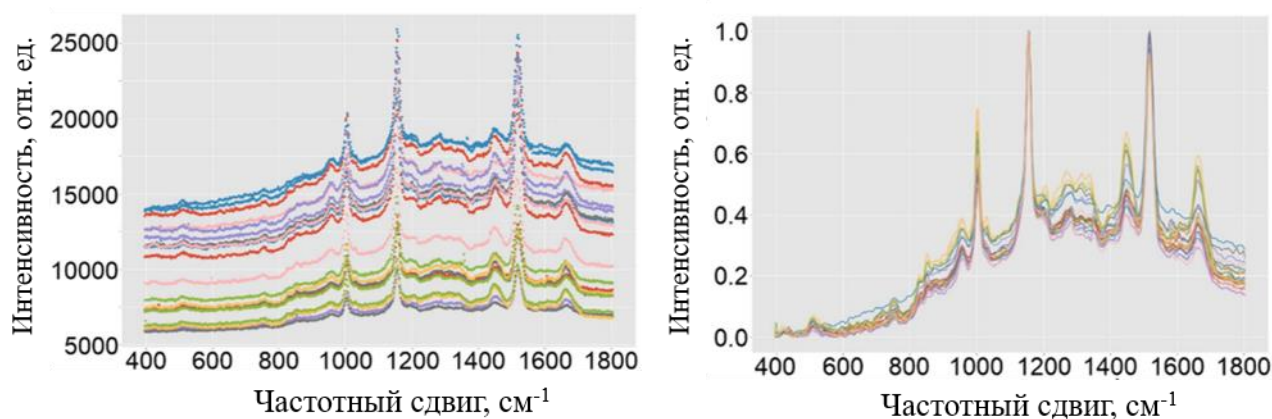


Рисунок 16. Предварительная обработка набора данных ГКРС-спектров. Набор ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы здорового добровольца до предварительной обработки (А) и после нее (Б)

Гипотеза о спектральной однородности БТП, полученной в разные дни от одного здорового человека, проверялась в три этапа. Сначала среди ряда спектров одного образца выявлялся наиболее типичный, который наиболее коррелировал с другими, т.е. сумма его коэффициентов корреляции с ними превышала аналогичные с другими спектрами. Это означает, что в корреляционной матрице определялась строка с большей суммой значений. Найденные таким образом спектры от каждого изученного образца интерполировались на одну сетку узлов, после чего их сравнивали так же, как и спектры, взятые от одного образца.

Для каждого образца БТП рассматривались корреляции всех пар, полученных ГКР-спектров. На рисунке 17 представлена корреляционная матрица, составленная для 20 спектров, снятых в разных точках одного образца здорового добровольца, половина из которых была детектирована после перезапуска оборудования.

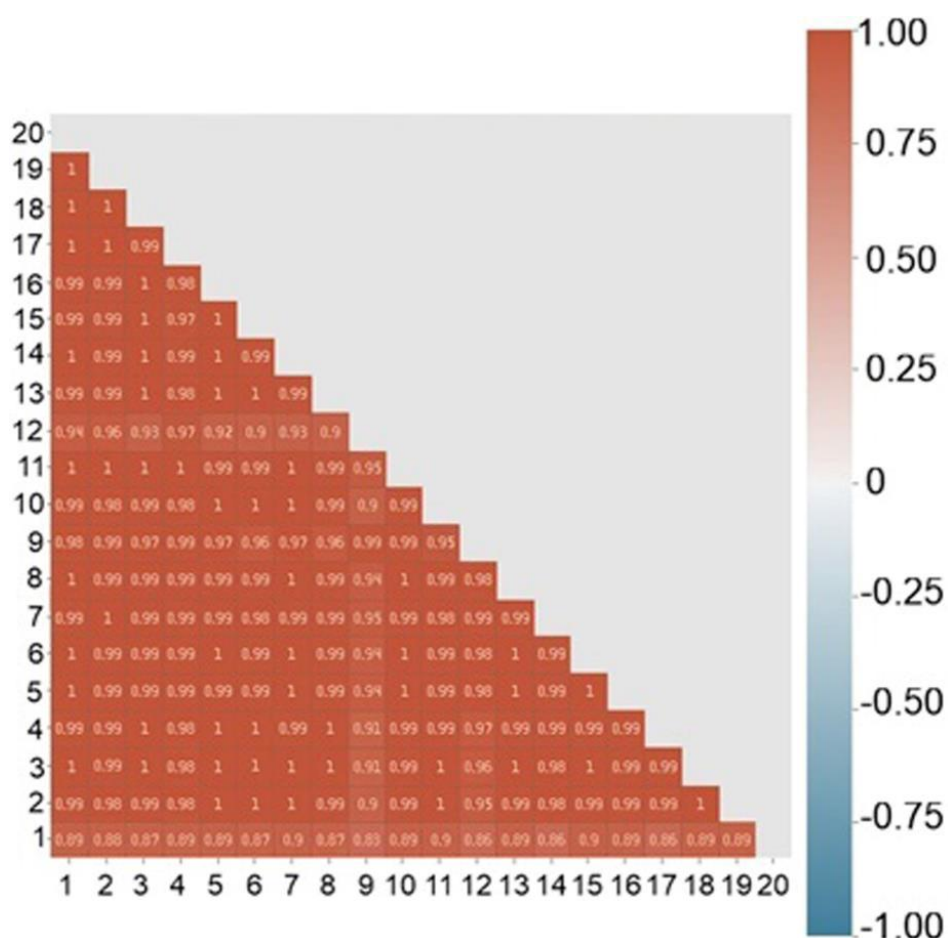


Рисунок 17. Парная линейная корреляция ГКРС-спектров в пределах одного образца

На рисунке 18 показаны распределения результатов этой матрицы в виде гистограммы (рисунок 18А) и прямоугольной диаграммы (рисунок 18Б).

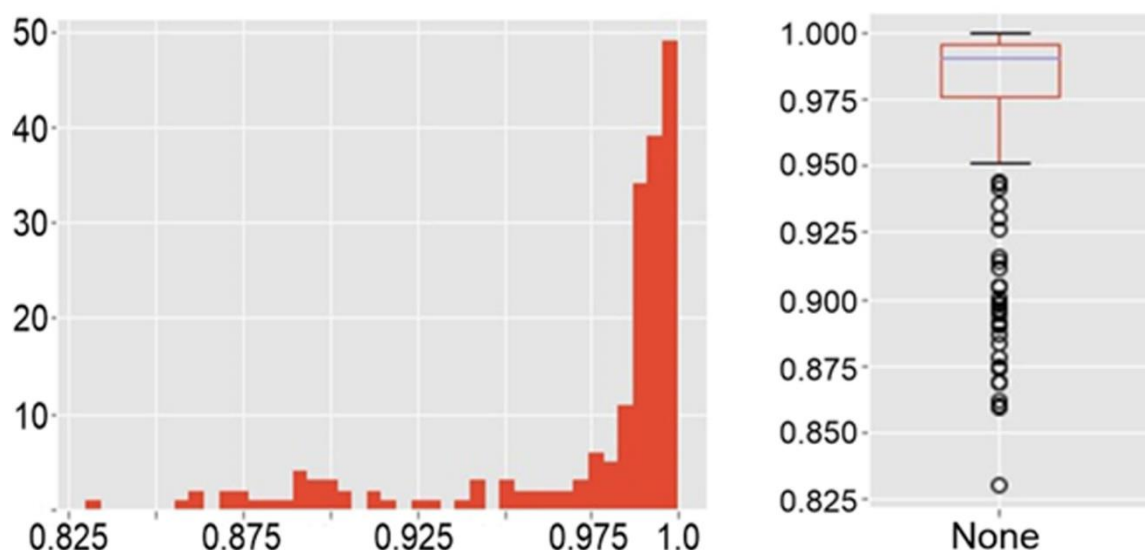


Рисунок 18. Распределение значений матрицы корреляций ГКРС-спектров внутри одной пробы. Гистограмма (А) и диаграмма (Б)

Для анализа корреляций между образцами были рассмотрены парные зависимости между наиболее типичными спектрами этих образцов. На рисунке 19 показана корреляционная матрица, составленная для 7 образцов.

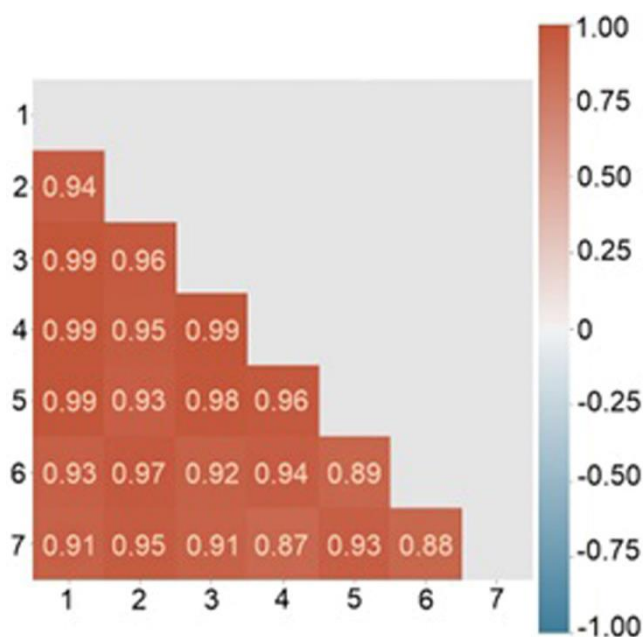


Рисунок 19. ГКРС-спектры БТП с парной линейной спектральной корреляцией между образцами

Распределение значений показано в виде матрицы, гистограммы (Рисунок 20А) и диаграммы (Рисунок 20Б).

Среднее арифметическое коэффициентов корреляции для каждой спектральной выборки составило более 0,92, средний коэффициент детерминации — более 0,86. Средние показатели имеют высокие значения для образца БТП, ГУРС-спектры которого сняты до и после перезагрузки оборудования. При этом несмотря на то, что минимальное значение корреляции между двумя спектрами (0,60122) имеет именно эта выборка, уже 15-й перцентиль для нее, как и для всех других выборок, имеет значение более 0,9.

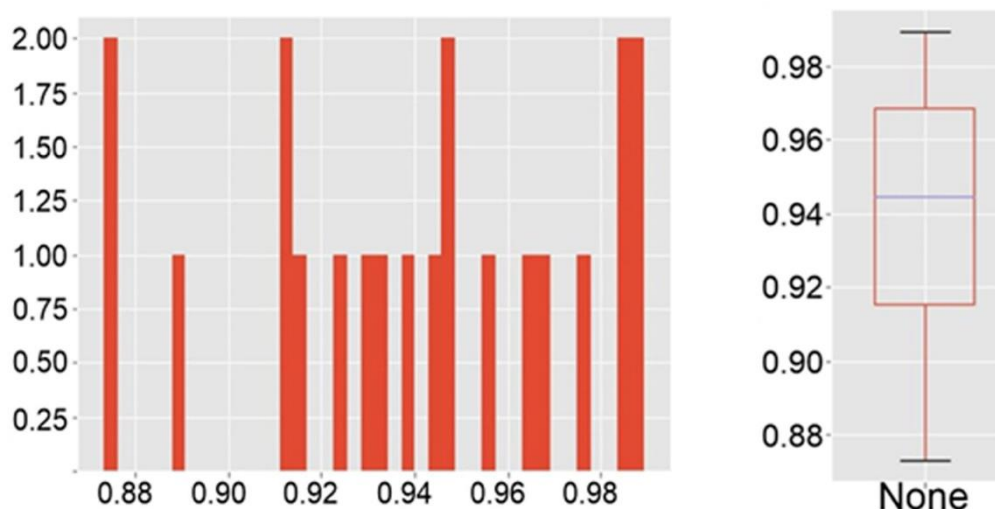


Рисунок 20. Распределение значений парной линейной спектральной корреляции.

Гистограмма (А) и диаграмма (Б)

Для выявления наиболее значимых ЧС ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы, отличающих ГКРС-спектры здоровых добровольцев (группа 1+ группа 2) от ГКРС-спектров пациентов с ССЗ (группа 3 + группа 4) были использованы алгоритмы машинного обучения. На данном этапе были использованы спектральные данные богатой тромбоцитами плазмы 51 здорового добровольца (244 спектра) и 101 пациента с ССЗ (308 спектров). Далее был сформирован массив данных, к которому был применен байесовский поиск с

усредненной по макросу f-метрикой в качестве оценки и 4-кратной перекрестной проверкой, как это реализовано в библиотеке `scikit-learn`. В результате байесовского поиска были определены следующие оптимальные гиперпараметры: 45 деревьев, скорость обучения — 0.35, размер подвыборки — 0.95. Средняя f-мера при подборе гиперпараметров составила 0.75, после обучения на тестовых — 0.73. Матрица несоответствий для тестовых данных представлена на Рисунке 21.

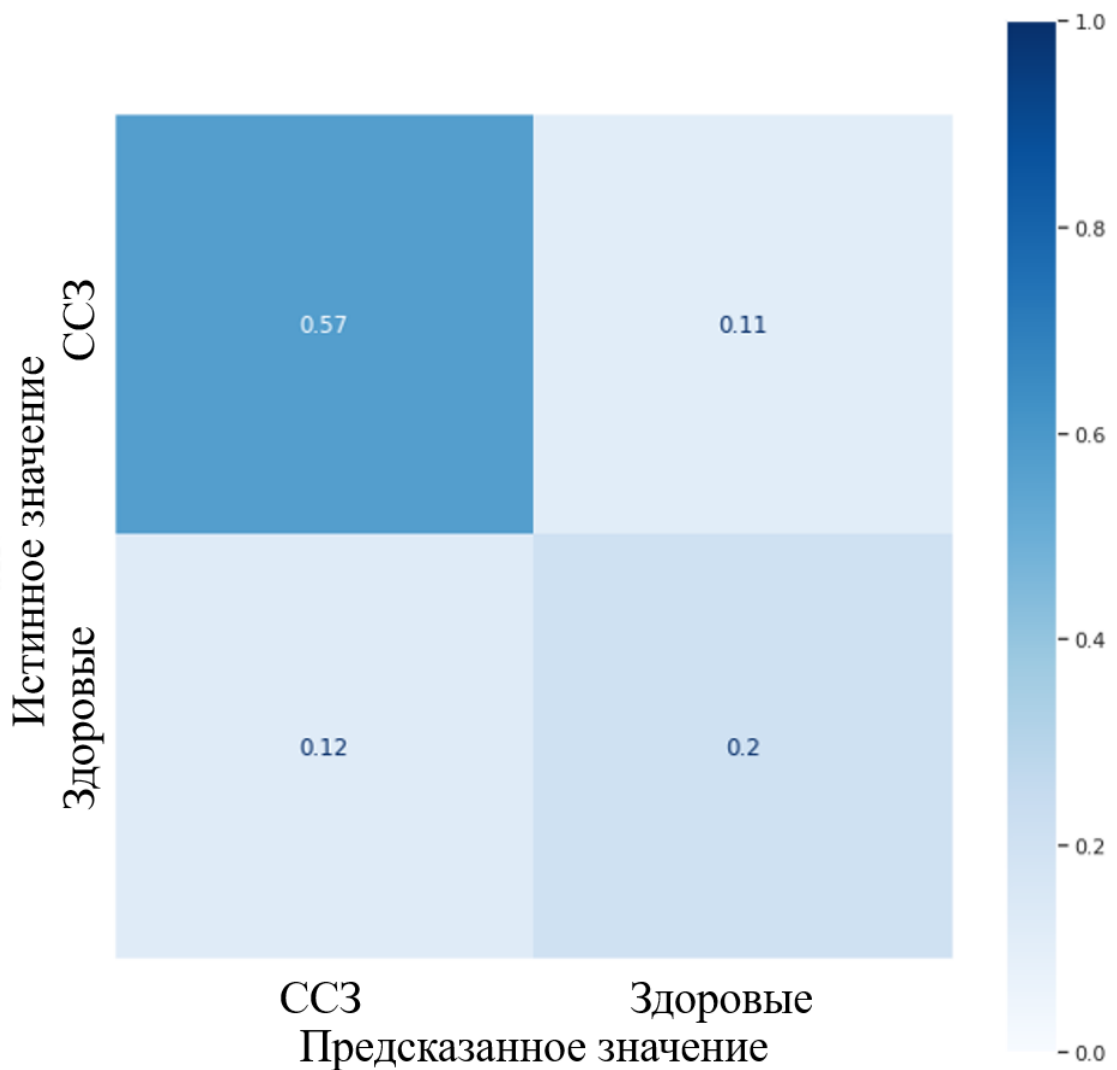


Рисунок 21. Матрица несоответствий для тестовых данных спектров богатой тромбоцитами плазмы здоровых добровольцев и пациентов с ССЗ

Наиболее значимыми признаками, выявленными при анализе массива спектральных данных, являются интенсивности на следующих частотных сдвигах, представленных в Таблице 2.

Таблица 2.

Наиболее значимые признаки, выявленные с использованием алгоритма Борута

Частотный сдвиг, см ⁻¹	Значимость	Значимость по Борута
1535	0.161	да
1465	0.115	да
990	0.096	да
1040	0.030	да
1410	0.021	да
960	0.018	да
970	0.017	не определяемая
955	0.016	да
1400	0.015	нет
805	0.014	нет

Полный список значимых частот согласно алгоритму Борута: 640 см⁻¹, 670 см⁻¹, 705 см⁻¹, 805 см⁻¹, 955 см⁻¹, 960 см⁻¹, 970 см⁻¹, 990 см⁻¹, 1035 см⁻¹, 1040 см⁻¹, 1050 см⁻¹, 1400 см⁻¹, 1410 см⁻¹, 1465 см⁻¹, 1530 см⁻¹, 1535 см⁻¹, 1540 см⁻¹.

Для выявления наиболее значимых ЧС ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы, отличающих ГКРС-спектры участников исследования, принимающих АП (группа 2 + группа 4) от ГКРС-спектров участников, не принимающих АП (группа 1 + группа 3) вне зависимости от наличия ССЗ, были использованы спектральные данные богатой тромбоцитами плазмы 75 участников исследования, принимающих АП (285 спектров) и 77 участников, не получающих терапию АП (308 спектров). Далее был сформирован массив данных, к которому

был применен байесовский поиск с усредненной по макросу f -метрикой в качестве оценки и 4-кратной перекрестной проверкой, как это реализовано в библиотеке `scikit-learn`.

Средняя f -мера при подборе гиперпараметров составила 0.55, после обучения на тестовых — 0.16. Полученные метрики не позволяют говорить о решённой задаче классификации, и как следствие интерпретация значимостей признаков в данном случае смысла не имеет.

Для выявления наиболее значимых ЧС ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы, отличающих ГКРС-спектры здоровых добровольцев, не принимающих АП (группа 1) от ГКРС-спектров здоровых добровольцев, принимающих АП (группа 2), были использованы спектральные данные богатой тромбоцитами плазмы 36 добровольцев, принимающих АП (144 спектра) и 15 добровольцев, не получающих терапию АП (100 спектров). Далее был сформирован массив данных, к которому был применен байесовский поиск с усредненной по макросу f -метрикой в качестве оценки и 4-кратной перекрестной проверкой, как это реализовано в библиотеке `scikit-learn`.

Средняя f -мера при подборе гиперпараметров составила 0.63, после обучения на тестовых — 0.00. Полученные метрики не позволяют говорить о решённой задаче классификации, и как следствие интерпретация значимостей признаков в данном случае смысла не имеет.

Для определения наиболее значимых ЧС спектров ГКРС БТП, отличающих ГКРС-спектры, полученные от здоровых добровольцев, не принимающих АП (группа 1), от ГКРС-спектров пациентов с ССЗ, не принимающих АП (группа 3), были использованы спектральные данные богатой тромбоцитами плазмы 36 добровольцев без ССЗ, не принимающих АП (144 спектра) и 41 пациента с ССЗ, не получающих АП (123 спектра). Далее был сформирован массив данных, к которому был применен байесовский поиск с усредненной по макросу f -метрикой в качестве оценки и 4-кратной перекрестной проверкой, как это реализовано в библиотеке `scikit-learn`.

В результате Байесовского поиска были определены следующие оптимальные гиперпараметры: 177 деревьев, скорость обучения — 0.35, размер подвыборки — 0.55. Средняя f-мера при подборе гиперпараметров составила 0.76, после обучения на тестовых — 0.53. Матрица несоответствий для тестовых данных представлена на Рисунке 22.

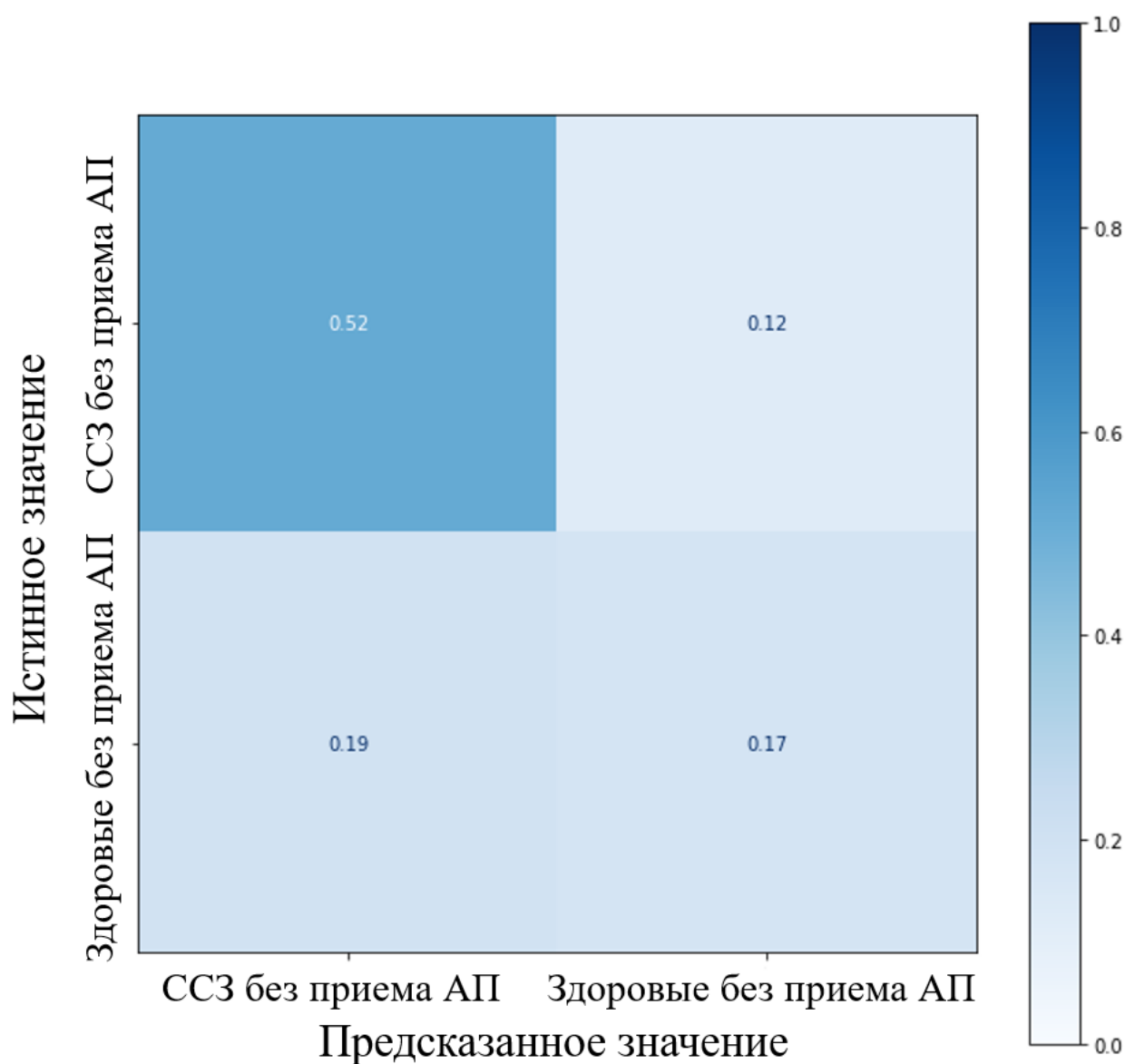


Рисунок 22. Матрица несоответствий для тестовых данных спектров богатой тромбоцитами плазмы здоровых добровольцев, не получающих АП и пациентов с ССЗ, не получающих АП

Наиболее значимыми признаками являются интенсивности на частотных сдвигах представленные в Таблице 3 (указаны 10 наиболее значимых).

Таблица 3.

Наиболее значимые признаки, выявленные с использованием алгоритма Борута

Частотный сдвиг, см^{-1}	Значимость	Значимость по Борута
1540	0.154	да
990	0.059	да
1395	0.048	да
970	0.043	да
1475	0.034	не определяемая
1410	0.030	да
1160	0.023	нет
1030	0.022	нет
1360	0.020	нет
770	0.019	нет

Полный список значимых частот согласно алгоритму Борута: 420 см^{-1} , 935 см^{-1} , 960 см^{-1} , 970 см^{-1} , 990 см^{-1} , 1000 см^{-1} , 1055 см^{-1} , 1255 см^{-1} , 1390 см^{-1} , 1395 см^{-1} , 1410 см^{-1} , 1415 см^{-1} , 1470 см^{-1} , 1535 см^{-1} , 1540 см^{-1} .

Для определения наиболее значимых ЧС спектров ГКРС богатой тромбоцитами плазмы, отличающих ГКРС-спектры здоровых добровольцев, получающих АП (группа 2) от ГКРС-спектров пациентов с ССЗ, получающих АП (группа 4), были использованы спектральные данные богатой тромбоцитами плазмы 36 добровольцев, не принимающих АП (144 спектра) и 41 пациента с ССЗ, не получающих терапию АП (123 спектра). Далее был сформирован массив данных, к которому был применен байесовский поиск с усредненной по макросу f-

метрикой в качестве оценки и 4-кратной перекрестной проверкой, как это реализовано в библиотеке `scikit-learn`.

В результате Байесовского поиска были определены следующие оптимальные гиперпараметры: 177 деревьев, скорость обучения — 0.2, размер подвыборки — 0.675. Средняя *f*-мера при подборе гиперпараметров составила 0.85, после обучения на тестовых — 0.68. Матрица несоответствий для тестовых данных представлена на Рисунке 23.

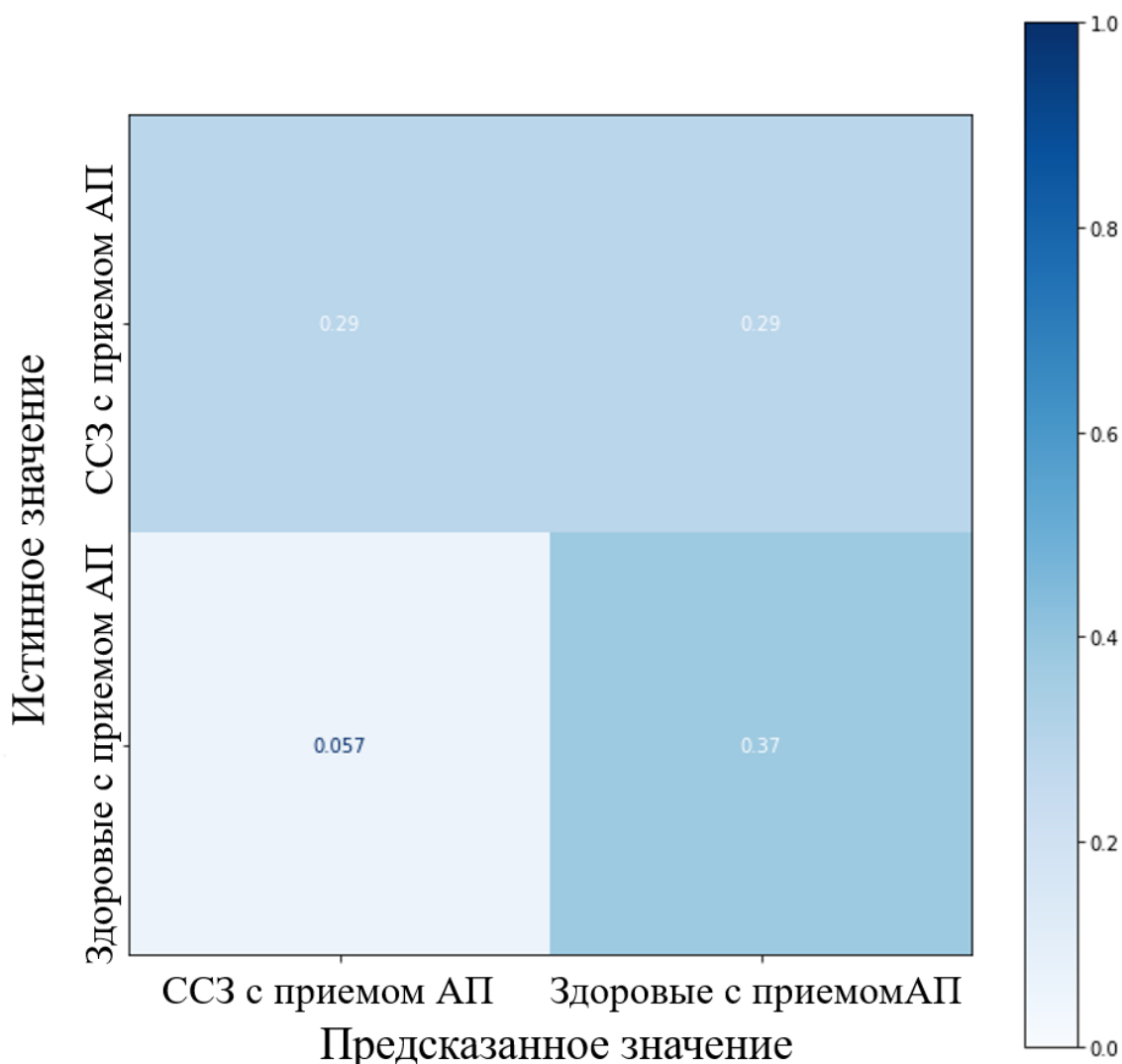


Рисунок 23. Матрица несоответствий для тестовых данных спектров богатой тромбоцитами плазмы здоровых добровольцев, получающих АП и пациентов с ССЗ, получающих АП

Наиболее значимыми признаками являются интенсивности на частотных сдвигах представленные в Таблице 4 (указаны 10 наиболее значимых).

Таблица 4.

Наиболее значимые признаки, выявленные с использованием алгоритма Борута.

Частотный сдвиг, см ⁻¹	Значимость	Значимость по Борута
1005	0.150	да
1000	0.133	да
1470	0.103	да
1210	0.064	да
980	0.052	да
1155	0.037	да
1050	0.034	нет
1600	0.032	да
1520	0.029	нет
985	0.028	да

Полный список значимых частот согласно алгоритму Борута: 610 см⁻¹, 980 см⁻¹, 985 см⁻¹, 990 см⁻¹, 1000 см⁻¹, 1005 см⁻¹, 1155 см⁻¹, 1210 см⁻¹, 1430 см⁻¹, 1470 см⁻¹, 1500 см⁻¹, 1530 см⁻¹, 1600 см⁻¹.

Для выявления наиболее значимых ЧС ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы, отличающих ГКРС-спектры пациентов с ССЗ, не принимающих АП (группа 3) от ГКРС-спектров пациентов с ССЗ, принимающих АП (группа 4), были использованы спектральные данные богатой тромбоцитами плазмы 41 пациента с ССЗ, не принимающих АП (123 спектра) и 60 пациентов с ССЗ, получающих терапию АП (185 спектров). Далее был сформирован массив данных, к которому был применен байесовский поиск с усредненной по макросу f-

метрикой в качестве оценки и 4-кратной перекрестной проверкой, как это реализовано в библиотеке `scikit-learn`.

Средняя *f*-мера при подборе гиперпараметров составила 0.55, после обучения на тестовых — 0.10. Полученные метрики не позволяют говорить о решённой задаче классификации, и как следствие интерпретация значимостей признаков в данном случае смысла не имеет.

С использованием процедур машинного обучения, описанных в предыдущем разделе, были определены частотные сдвиги (ЧС) ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы периферической крови, имеющие наибольшую информативность при выявлении различий в спектрах здоровых пациентов и пациентов с ССЗ, а также для оценки фармакодинамических эффектов антитромбоцитарных 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. В настоящем разделе будут представлены результаты более детального анализа интенсивностей ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы периферической крови получены для перечисленных выше значений ЧС. Такой анализ важен для выбора конкретных значений ЧС, которые можно использовать в качестве фармакодинамических биомаркеров для контроля за эффективностью антитромбоцитарной терапии и разработки медицинских диагностических приборов.

При сравнении средних значений интенсивностей ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы, полученных для разных групп участников исследования, были выявлены значимые различия. Между спектрами тромбоцитов здоровых добровольцев и пациентов, страдающих ССЗ (группа 1 и группа 3) значимые различия были выявлены для всех значений ЧС: 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 (Таблица 5).

Абсолютные разницы средних значений интенсивностей ГКРС-спектров колебалась от 2890 до 9521, при этом максимальные различия были получены для ЧС 505 и 990 см^{-1} .

Сопоставление средних значений интенсивностей ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы здоровых добровольцев, получавших (группа 2) и не получавших АСК (группа 1) выявлены статистически значимые отличия для следующих трех ЧС: 505 см^{-1} , 990 см^{-1} , 1465 см^{-1} . При этом для ЧС 505 см^{-1} , 1465 см^{-1} отмечались максимальные различия средних значений интенсивностей ГКРС-спектров – 2142 и 2054 (Таблица 5).

Таблица 5.

Сравнение интенсивностей ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы периферической крови, полученных на разных значениях частотных сдвигов в разных группах

Частотный сдвиг, см^{-1}	Группа 1. М (S), n=385	Группа 2. М (S), n=126	Группа 3. М (S), n=407	Группа 4. М (S), n=348
420	10173 (408)	8911 (416)	14986 (582) [#]	14958 (664)
430	10160 (409)	8895 (419)	14963 (582) [#]	14940 (665)
485	10255 (415)	8954 (423)	13499 (587) [#]	15403 (674) [⊗]
505	10427 (419)	8285 (426) [*]	17553 (591) [#]	15358 (678) [⊗]
605	10508 (430)	9138 (440)	15386 (599) [#]	15539 (689)
615	10573 (432)	9175 (440)	15454 (601) [#]	15622 (691)
720	10970 (442)	9486 (452)	15844 (610) [#]	16155 (703)
805	11220 (457)	9670 (471)	16255 (626) [#]	16588 (722)
955	12973 (498)	11328 (526)	18344 (682) [#]	18783 (775)
960	12941 (499)	11307 (528)	18309 (682) [#]	18759 (776)
970	12820 (497)	11174 (528)	18196 (681) [#]	18671 (777)

Продолжение таблицы 5.

Частотный сдвиг, см ⁻¹	Группа 1. М (S), n=385	Группа 2. М (S), n=126	Группа 3. М (S), n=407	Группа 4. М (S), n=348
975	12818 (497)	11152 (527)	18226 (681) #	18713 (778)
980	12907 (498)	11198 (528)	18379 (685) #	18871 (782)
990	13660 (509)	11891 (548) *	23181 (705) #	19853 (798) ⊗
1040	12962 (500)	11248 (532)	18191 (682) #	18710 (777)
1400	13460 (549)	11653 (583)	18924 (721) #	19561 (815)
1410	13479 (548)	11664 (589)	18940 (720) #	19564 (814)
1465	14261 (555)	12207 (590) *	17151 (727) #	19841 (815) ⊗
1535	14229 (586)	12650 (686)	19376 (743) #	19880 (831)
1540	13837 (572)	12054 (648)	19012 (735) #	19598 (828)
1590	13205 (562)	11341 (594)	18592 (724) #	19299 (822)

Примечания: n – количество спектров, М – среднее арифметическое, S – стандартная ошибка среднего арифметического. Значение вероятности нулевой гипотезы равенства средних арифметических с использованием непарного t критерия Стьюдента $p < 0.05$ при сравнении: * - группы 1 и группы 2, ⊗ - группы 3 и группы 4, # - группы 1 и группы 3.

Для целей выявления и дальнейшего изучения фармакодинамических биомаркеров наибольший интерес представляло сравнение средних значений интенсивностей ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы пациентов с ССЗ получающих и не получающих антитромботики – группа 3 и группа 4. Установлено, что существуют статистически значимые различия средних значений интенсивностей ГКРС-спектров для четырех ЧС 485 см⁻¹, 505 см⁻¹, 990 см⁻¹, 1465 см⁻¹. Для перечисленных ЧС также выявлены наибольшие различия в средних по абсолютным значениям – 1904 см⁻¹, 2195 см⁻¹, 3328 см⁻¹, 2690 см⁻¹. Интересно что разницы средних значений интенсивностей ГКРС-спектров богатой тромбоцитами

плазмы для групп 3 и 4 варьировала для разных ЧС не только по абсолютным значениям, но и по знаку. Так, для ЧС 505 см^{-1} и 990 см^{-1} , разница средних составила -2195 и -3328 , а для ЧС 485 см^{-1} и 1465 см^{-1} – 1904 и 2690 , соответственно.

Для использования ГКРС-спектроскопии при оценке эффективности терапии антитромботиками была решена задача классификации (определения пограничных значений) интенсивностей ГКРС-спектров, для определения пациентов с высокими значениями остаточной реактивности тромбоцитов (ОРТ) на фоне проводимой терапии антитромбоцитарными препаратами. 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 формирование информации для обучения, для этого были использованы результаты агрегометрии и ГКРС-спектроскопии с использованием оригинального оптического биосенсора здоровых добровольцев из групп 1 и 2. В качестве дискриминантной переменной использовались значения времени закрытия капилляра, 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 отобраны ЧС, отобраны 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.

Таблица 6.

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 Р 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

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 6). 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 6).

Использование построенной дискриминационной модели, позволило провести классификацию значений, полученных при ГКРС-спектроскопии тромбоцитов с использованием оригинального оптического сенсора и использовать этот подход для выделения популяции пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов (ОРТ) у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, получавших АТ. При этом были выделены частотные сдвиги в ГКРС-спектрах, специфичные для оценки функции разных групп АТ препаратов - 970 см⁻¹ для ингибиторов ЦОГ1 и 1590 см⁻¹ для блокаторов P2Y₁₂ рецепторов (таблица 7). Таким образом, использование полученной константы дискриминации позволило классифицировать оценку интенсивностей, зарегистрированных при ГКРС-спектроскопии у пациентов Группы 4, и оценить эффективность использования АТ препаратов (Таблица 7).

Таблица 7.

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)	χ^2 , p
Изучаемый метод: ГКРС-спектроскопия		
Анализ ГКРС-спектра при ЧС - 970 см ⁻¹ (ингибиторы ЦОГ1)	$41,7 \pm 6,3$ (25/60)	$\chi^2 = 0.022$, $p = 0.882$

Продолжение Таблицы 7.

Метод	Число пациентов с высокой ОРТ, %, $M \pm m$, (n/N)	χ^2 , p
Изучаемый метод: ГКРС-спектроскопия		
Анализ ГКРС-спектра при ЧС - 1590 см^{-1} (блокаторы P2Y12 рецепторов)	$36,7 \pm 6,2$ (22/60)	$\chi^2 = 0.018$, $p = 0.894$
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 (χ^2), уровень значимости (p), рассчитан при сравнении средних значений изучаемого и референтного методов, ОРТ – остаточная реактивность тромбоцитов

Как видно из Таблицы 7, метод ГКРС-спектроскопии с использованием оригинального оптического сенсора, позволят выделять в популяции пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, получавших АТ препараты, популяцию пациентов с высокой ОРТ, т.е. пациентов с высоким риском неэффективности АТ-терапии. При этом, анализ ГКРС-спектров с использованием разных значений частотных сдвигов (970 см^{-1} или 1590 см^{-1}), позволяет оценивать данный показатель отдельно для ингибиторов ЦОГ1 и блокаторов P2Y12 рецепторов. Так, количество пациентов в группе 4 с высокой ОРТ при использовании АСК составило $41,7\% \pm 6,3\%$, а при терапии клопидогрелом - $36,7\% \pm 6,2\%$, аналогичные значение при использовании референтного метода, составили $43,5\% \pm 10,3\%$ и $30,4\% \pm 9,6\%$. При

этом статистически значимы различий между показателями, определенными изучаемым и референтным методом, выявлено не было – χ^2 критерий 0.022 и 0.018, при уровнях значимости $p=0.882$ и $p=0.894$ для оценки пациентов, получавших АСК и клопидогрел, соответственно.

Для выявления потенциальных биологических механизмов, лежащих в основе выявленных спектральных различий, был выполнен корреляционный анализ между интенсивностями ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы и параметрами активности тромбоцитов, полученных с помощью разных вариантов агрегометрии. Корреляционный анализ выполнили для всех значений интенсивностей ГКРС-спектров, зарегистрированных для всех групп пациентов и показателей агрегометрии, полученных при анализе тех же образцов тромбоцитов с использованием различных картриджей системы PFA-200 («Siemens», Германия). При этом количество полученных значений коэффициентов корреляции составило более 10000, поэтому для упрощения анализа в данной работе мы приводим только диапазоны коэффициентов корреляций, сгруппированных для разных категорий пациентов и разных методов изучения агрегации тромбоцитов (Таблица 8).

Таблица 8.

Диапазоны коэффициентов корреляции между интенсивностями
ГКР-спектров богатой тромбоцитами плазмы и параметрами агрегации
тромбоцитов, полученных с использованием картриджей системы PFA-200

Группы пациентов	Диапазон коэффициентов корреляции, min-max (Me)		
	Coll/ADP	Coll/Epi	P2Y
Все группы	0,05 - 0,07 (0,06)	0,07 - 0,1 (0,09)	0,31 - 0,33 (0,32)*
Группа 1	-0,3 - -0,16 (-0,23)	-0,32 - -0,17 (-0,24)	-0,12 - -0,06 (-0,09)
Группа 2	-0,93 - -0,75 (-0,84)*	-0,51 - -0,18 (-0,34)	-0,51 - -0,18 (-0,34)
Группа 3	-0,13 - -0,06 (-0,09)	-0,16 - -0,09 (-0,12)	0,16 - 0,19 (0,18)
Группа 4	-0,06 - 0,09 (0,02)	0,13 - 0,15 (0,140)	0,47 - 0,81 (0,7)*

Примечания: Coll/ADP - картридж, содержащий в качестве активатора коллаген с АДФ, Coll/Epi - картридж, содержащий в качестве активатора коллаген

с эпинефрином, P2Y - картридж, содержащий простагландин E1, Min – минимальное значение коэффициента корреляции, Max – максимальное значение коэффициента корреляции, Me – медиана, * - наличие достоверных значений коэффициентов корреляции, $p < 0,05$.

При проведении корреляционного анализа ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы разных групп с результатами агрегометрии для некоторых групп были выявлены статистически значимые корреляции (Таблица 8). При рассмотрении данных корреляционного анализа (Таблица 8) видно, что ГКРС-спектры богатой тромбоцитами плазмы здоровых добровольцев, получающих АСК (Группа 2) имеют статистически значимую высокую отрицательную корреляцию ($r = -0,93 - 0,75$; $p < 0,05$) с результатами агрегометрии при воздействии активатора Coll/ADP представленными в секундах. В свою очередь суммарно ГКРС-спектры всех участников (Группа 1, 2, 3, 4) исследования имеют слабую положительную связь ($r = 0,305-0,328$) с результатами агрегометрии в секундах с использованием картриджа с активатором P2Y. ГКРС-спектры богатой тромбоцитами плазмы пациентов с ССЗ, получающих терапию АСК также коррелируют с результатами агрегометрии в секундах с использованием картриджа с активатором P2Y и показывают среднюю положительную связь ($r = 0,472 - 0,521$).

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

Нами были изучены три методики пробоподготовки образцов мочи с целью дальнейшего исследования методом ^1H ЯМР-спектроскопии. Подробно методики описаны в разделе «Материалы и методы».

Для выбора оптимальной методики пробоподготовки, были собраны образцы мочи у одного добровольца до и после приема 100 мг АСК. Все образцы были собраны в один день, пробоподготовка была произведена в день сбора биоматериала. Образцы были обработаны с использованием метода № 1, метода № 2 и метода №3 (Рисунок 24). Далее образец был изучен методом ^1H ЯМР-

спектроскопии.

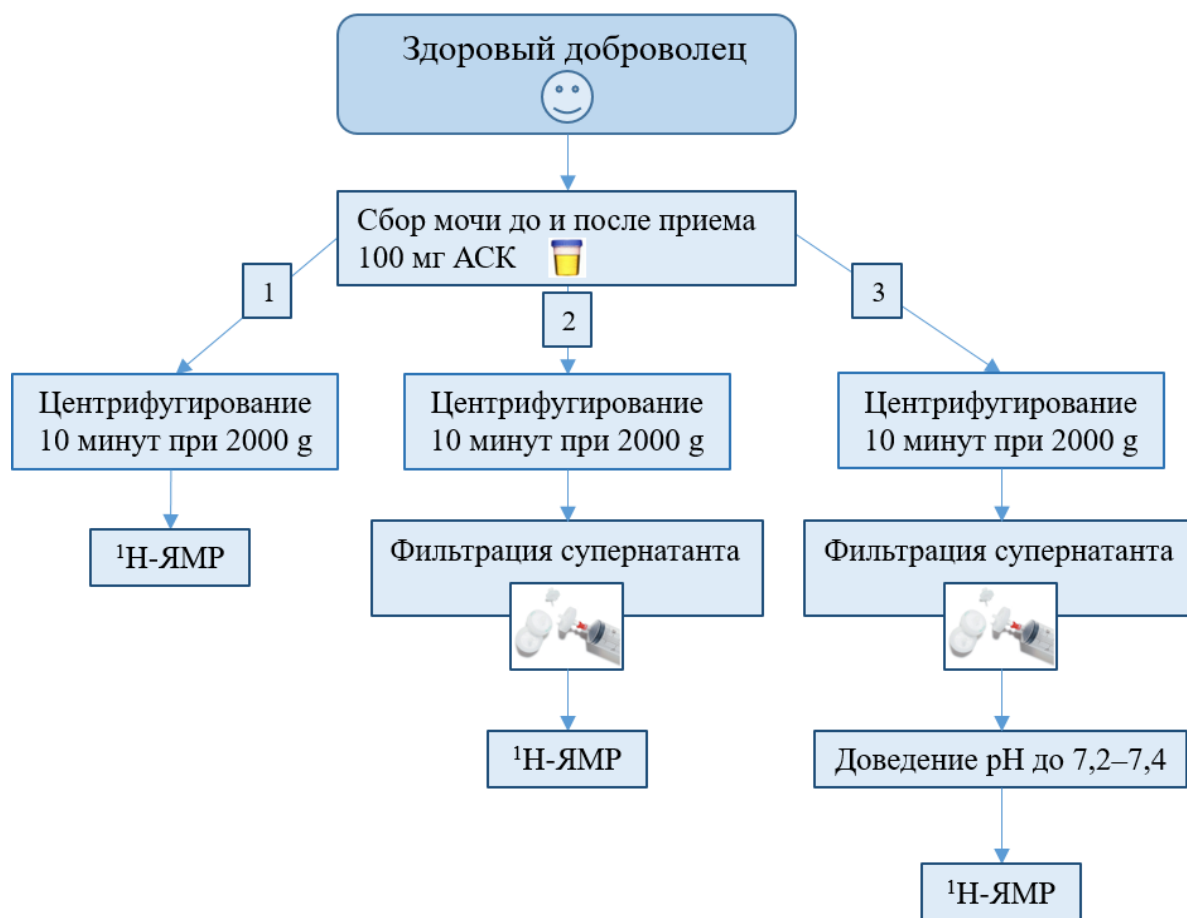


Рисунок 24. Схема пробоподготовки образцов мочи для дальнейшего исследования методом ^1H ЯМР-спектроскопии.

1- метод №1, 2 – метод №2, 3 – метод №3

Изучение методик пробоподготовки мочи позволило выявить, что наиболее оптимальной методикой является метод №3, включающий фильтрацию образца с последующим доведением pH образца до 7,2–7,4 (Рисунок 25). Данный этап пробоподготовки необходим для избегания вариаций химических сдвигов и стабилизации полученного раствора в течение нескольких часов. Использование метода №3, включающего фильтрацию и последующее доведение pH образца позволило получить спектры, сходные с ^1H -ЯМР-спектрами мочи ранее описанными в литературе.

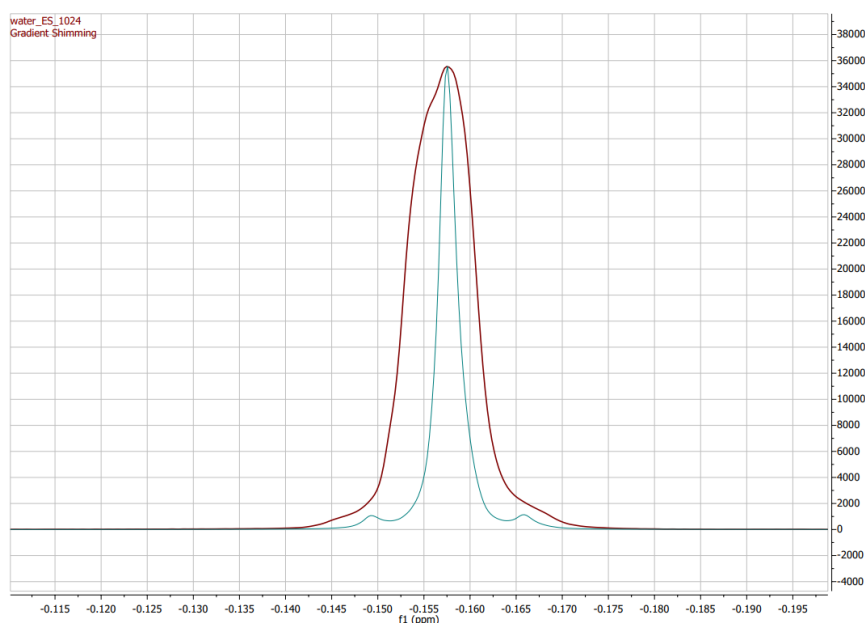


Рисунок 25. Сравнение участка ^1H -ЯМР-спектра образцов мочи с доведением рН до 7,2–7,4, полученных методикой без фильтрации образца (выделено красным) и методикой с фильтрацией образца (выделено голубым)

Для определения метаболитов АСК и дальнейшего сравнения с ЯМР-спектрами стандартов: салициловой, салицилуловой и гентиизиновой кислот (salicylic, salicyluric and gentisic acids, Sigma-Aldrich), были проанализированы ^1H ЯМР-спектры мочи 4 здоровых добровольцев после приема АСК в дозе 3000 мг анализировали. В течение 3-4 часов после приема АСК выявлены изменения на 7,6 ppm (двойной дублет), 7,25 ppm (двойной триплет) и 6,7 ppm (перекрывающиеся сигналы), соответствующие метаболитам АСК: салициловой, салицилуровой и гиппуровой кислоте.

Спектры ^1H ЯМР мочи 24 здоровых добровольцев, собранной в декабре, ноябре, марте и июле и прошедшей пробоподготовку с использованием метода №3, анализировали для определения сезонных метаболических изменений. Наиболее интенсивные сигналы ^1H ЯМР, связанные с известными основными эндогенными соединениями: креатинином, мочевиной, ТМАО (триметиламиноксидом), глицином (G1), лактатом, цитратом, ацетатом, гиппуратом и др., наблюдались у 24 (100 %) здоровых добровольцев в спектрах ^1H ЯМР. Анализ показал, что профили отдельных спектров практически не изменились в зимние, осенние и весенние

месяцы. Однако в образцах мочи, собранных в июле, наблюдались некоторые изменения в ароматической области спектра 7,0–7,4 ppm.

Выявлено, что салициловая кислота является основным продуктом метаболизма АСК и характеризуется двойным спектральным пиком (дублет) метильной группы в районе 4 ppm у 24 (100 %) здоровых добровольцев, который парциально перекрывается со спектральным сигналом от гиппуровой кислоты. Сигналы от ароматической группы протонов салициловой кислоты детектируются в районе 7.0, 7.5-7.6 ppm у 23 (96 %) здоровых добровольцев.

Образцы мочи здоровых добровольцев до и после приема АСК в дозах 100 мг, 300 мг и 3000 мг после пробоподготовки с методом №3, как описано выше, были исследованы с помощью ^1H ЯМР-спектрометра с использованием метода подавления воды. Наиболее характерные изменения в ^1H ЯМР спектрах образцов мочи наблюдались у добровольцев после приема 3000 мг АСК. Отчетливо детектировано появление интенсивных наслаивающихся сигналов в районе между 6,7 и 6,8 ppm, а также различных триплетных и наслаивающихся сигналов в районе между 7,2 и 7,4 ppm и между 7,5 и 7,6 ppm. На рисунке 26 изображены два фрагмента ^1H ЯМР-спектров мочи, полученной до и через 2,5 часа после приема 3 г АСК.

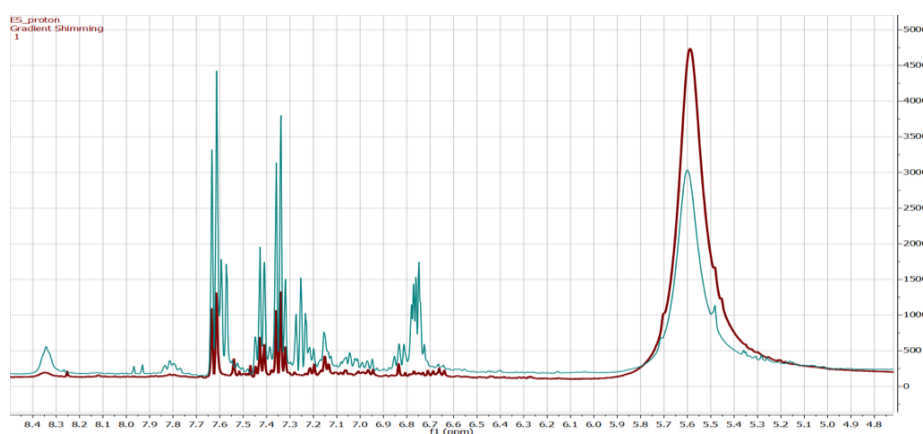


Рисунок 26. ^1H ЯМР-спектры мочи здорового добровольца, собранные до (красный) и через 2 часа после приема 3000 мг АСК (зеленый)

Типичные изменения интенсивностей в ^1H ЯМР-спектрах были выявлены в образцах, полученных от добровольцев после приема 100 мг и 300 мг у 23 (96%)

здоровых добровольцев. Установлено, что возникновение сигналов и их интенсивность зависели от времени сбора образца мочи после приема АСК и дозы.

Спектры ^1H ЯМР, полученные от образцов мочи здоровых добровольцев после приема АСК в дозе 100 мг и 300 мг, изображены на Рисунке 27 и Рисунке 28.

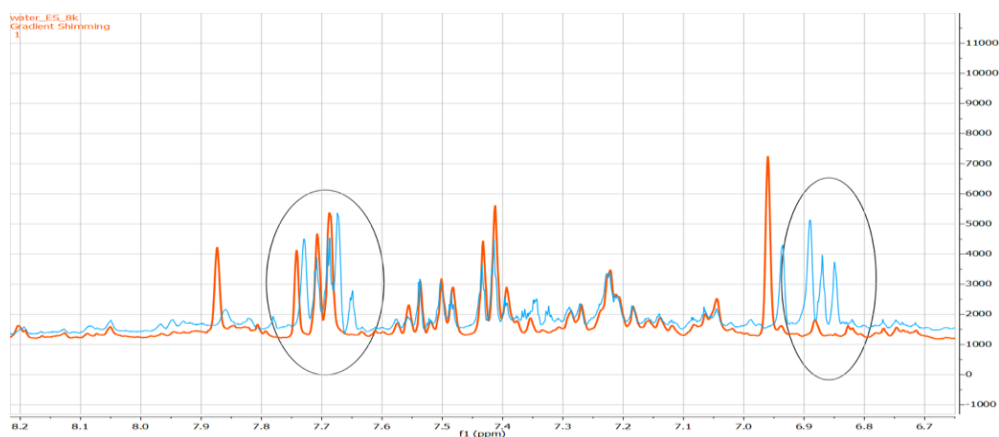


Рисунок 27. Спектр ^1H ЯМР образца мочи здорового добровольца, полученные до (оранжевый) и через 4 часа после приема 300 мг АСК (синий)

В ходе проведения анализа спектров ^1H ЯМР образцов мочи здоровых добровольцев до и после приема АСК выявлены различия в динамике метаболизма, зависящие от времени сбора мочи. ^1H ЯМР-спектры, полученные от образцов мочи, которые были собраны через 1,5 часа после приема АСК, не имели значительных изменений у 21 (88 %) здоровых добровольцев по сравнению со спектром, полученным до приема препарата. Однако в ^1H ЯМР-спектрах образцов, собранных через 4 часа после приема 100 мг АСК, выявлены значимые изменения интенсивностей у 22 (92 %) здоровых добровольцев. У 24 (100 %) здоровых добровольцев, получивших препарат в однократной дозе 300 мг АСК были выявлены более выраженные изменения интенсивностей в тех же областях ^1H ЯМР спектров образцов мочи, собранных через 4 часа и 6 часов.

Динамику сигнала гиппуровой и салицилуровой кислот в районе от 3 ppm до 4 ppm заслуживает отдельного внимания. Изменения интенсивностей зависит как от персональных особенностей метаболизма у добровольцев, так и от интервала после приема дозы АСК. Таким образом выявлено, что интенсивность ^1H ЯМР-

сигнала гиппурата уменьшается в 12,3 раза через 4 часа после приема 100 мг АСК для 16 (67 %) здоровых добровольцев и в 1,77 раза для 6 (25 %), тогда как он уменьшился в 2 раза для 2 (8 %) добровольцев через 3 часа после приема АСК (Рисунок 28). Интенсивность сигнала гиппуровой кислоты восстановилась у 22 (92%) добровольцев через 9 часов после приема 100 мг АСК. Сигнал от салицилуровой и гиппуровой кислоты был детектирован у 20 (83%) добровольцев в районе 6,6 до 6,9 ppm через 21-24 часа после приема 100 мг препарата. Однако через 24 часа и более метаболиты АСК не были детектированы у 16 (67%) добровольцев.

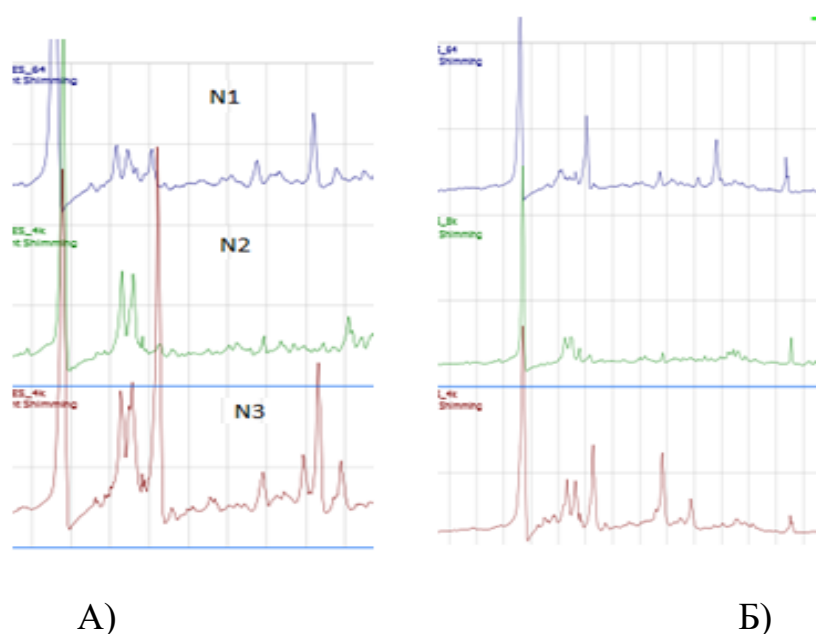


Рисунок 28. ^1H ЯМР-спектры мочи добровольцев, собранные до (а) и после приема АСК в дозе 100 мг (б). Образец мочи был собран через 4 часа после приема АСК для добровольцев №1 и №2 и через 3 часа для добровольца №2

Определены значительные изменения как в одномерном, так и двумерном ^1H ЯМР спектрах образцов мочи, полученных от здоровых добровольцев до и после приема АСК в разных дозах: 100 мг, 300 мг и 3000 мг. Детектированные изменения связаны с появлением дополнительных сигналов, характеризующих метаболиты АСК. Наиболее интенсивный ^1H ЯМР сигнал представлен салицилуровой кислоты и был детектирован у 24 (100 %) добровольцев.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование КРС-спектроскопии не позволяет собрать полную информации о физико-химических особенностях образца богатой тромбоцитами плазмы и его изменениях под действием антиагрегантных препаратов, так как регистрируется сигнал низкой интенсивности, непригодный для дальнейшей расшифровки. Для получения сигнала достаточной интенсивности и регистрации спектров, пригодных для дальнейшей работы, необходимо усилить КРС сигнал.

С помощью метода ГКРС-спектроскопии с использованием оригинального оптического биосенсора (титановые поверхности с нанесенным абляционным золотом, модифицированные фемтосекундным лазером) возможно получить сигнал достаточной интенсивности, необходимый для выявления фармакодинамических эффектов антиагрегантной терапии. ГКРС-спектры богатой тромбоцитами плазмы здорового добровольца, полученные с помощью данного биосенсора характеризуются наличием выраженных пиков, пригодных для дальнейшего анализа, имеют высокую спектральную однородность (среднее арифметическое коэффициентов корреляции более 0,92, средний коэффициент детерминации - 0,86.)

С помощью метода ГКРС-спектроскопии выявлены наиболее информативные биомаркерами, связанные с фармакодинамическими эффектами антиагрегантных препаратов. В группе здоровых добровольцев биомаркеры выявлены на частотных сдвигах 505 см^{-1} и 1465 см^{-1} ($p < 0,05$) и связаны с приемом ацетилсалициловой кислоты в низких дозах. В группе пациентов, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями наиболее информативные биомаркеры, связанные с приемом клопидогрела и ацетилсалициловой кислоты детектированы на частотных сдвигах 485 см^{-1} , 505 см^{-1} , 970 см^{-1} , 990 см^{-1} , 1465 см^{-1} , 1590 см^{-1} ($p < 0,05$).

Метод ГКРС-спектроскопии богатой тромбоцитами плазмы может быть использован для оценки эффективности антиагрегантной терапии у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. У данной группы пациентов, получавших антиагрегантную терапию, выявлены достоверные изменения интенсивностей

ГКРС-спектров тромбоцитов богатой тромбоцитами плазмы, полученных с использованием оригинального оптического сенсора на частотах 485 см^{-1} , 505 см^{-1} , 990 см^{-1} , 1465 см^{-1} по сравнению с пациентами, не получавшими антиагрегантную терапию. Эти изменения интенсивностей в спектрах ГКРС являются перспективными для дальнейшего изучения фармакодинамики 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. При использовании ацетилсалициловой кислоты высокая остаточная реактивность тромбоцитов определялась у $41,7\% \pm 6,3\%$ пациентов, при терапии клопидогрелом - $36,7\% \pm 6,2\%$. Данные изменения детектируются в области 970 см^{-1} при приеме ацетилсалициловой кислоты и в области 1590 см^{-1} при приеме клопидогрела. Установлены пограничные значения на выделенных частотных сдвигах для идентификации пациентов с высокими значениями остаточной реактивности тромбоцитов - 12254,35 при терапии ацетилсалициловой кислотой на частотном сдвиге 970 см^{-1} и 12623,13 при терапии клопидогрелом на частотном сдвиге 1590 см^{-1} .

В качестве референтного метода активность тромбоцитов исследовали при помощи агрегометра INNOVANCE Siemens PFA 200 с тремя видами картриджей: коллаген в сочетании с эпинефрином (Collagen/EPI), коллаген с АДФ (Collagen/ADP), простагландин E1 (P2Y). Высокая остаточная реактивность тромбоцитов методом агрегометрии выявлена у $43,5\% \pm 10,3\%$ пациентов, получающих ацетилсалициловую кислоту и у $30,4\% \pm 9,6\%$ пациентов, получающих клопидогрел. Статистически значимых различий между показателями, определенными изучаемым и референтным методом, выявлено не было.

Метод ^1H ЯМР – спектроскопии мочи может быть использован для качественного и количественного определения метаболитов ацетилсалициловой кислоты в моче с целью оценки приверженности пациентов терапии. Наиболее

интенсивные пики в ^1H ЯМР -спектрах характеризуют салициловую и гиппуровую кислоты. ^1H ЯМР-сигнал, характеризующий основные метаболиты ацетилсалициловой кислоты (салицилутовую и гиппуровую кислоты) детектируется у 20 (83%) здоровых добровольцев в диапазоне от 6,6 до 6,9 ppm в одномерном и двумерном ^1H ЯМР спектрах после приема 100 мг препарата. Через 24 часа после приема ацетилсалициловой кислоты пики, характеризующие метаболиты (салициловая, салицилутовая и гиппуровая кислоты) не определялись у 16 (67%) здоровых добровольцев.

Исследование ^1H ЯМР -спектров, полученных от образцов мочи здоровых добровольцев до и после приема ацетилсалициловой кислоты в дозах: 100 мг, 300 мг и 3000 мг показало, что изменения в одномерном и двумерном ^1H ЯМР -спектрах связаны с наличием сигналов, характерных для метаболитов ацетилсалициловой кислоты. Наиболее интенсивный сигнал получен от салицилутовой кислоты и был детектирован у 24 (100 %) здоровых добровольцев после приема ацетилсалициловой кислоты в дозе 100 мг. Динамика деления метаболитов ацетилсалициловой кислоты меняется в зависимости от принятой дозы и индивидуальных метаболических особенностей пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биохимические механизмы различных фаз активации тромбоцитов: адгезии, изменения формы, реакции высвобождения и агрегации - хорошо описаны, однако полное отражение этих сложных процессов в лабораторные методы не выполнено. На сегодняшний день разработаны десятки молекулярных и функциональных методов исследования тромбоцитов. Лабораторные методы исследования функции тромбоцитов, такие как агрегометрия светопропускания, агрегометрия цельной крови и активация тромбоцитов, исследуемая с помощью проточной цитометрии, используются для диагностики нарушений гемостаза и оценки фармакодинамики антиагрегантов, но их применение все еще ограничено недостаточным доступом к специализированным лабораториям. В связи с большой распространенностью применения антиагрегантной терапии в клинической практике, существует потребность оценки эффективности терапии этим классом препаратов у значительной когорты пациентов.

В качестве лабораторных методов оценки эффективности терапии антиагрегантными препаратами используют оптическую, импедансную агрегометрию, PFA-100 или PFA-200 анализ, VerifyNow, VASP (определение вазодилататор-стимулированного фосфопротеина для оценки действия клопидогрела).

Наиболее применимыми методами исследования фармакодинамики и оценки эффективности АСК являются агрегометрия светопропускания или агрегометрия цельной крови, индуцированная арахидоновой кислотой. АДФ-индуцированная агрегация не в полной мере подходит для исследования эффективности АСК, поскольку АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов не зависит от ингибирования тромбоксана. Агрегация тромбоцитов, вызванная коллагеном, в свою очередь, зависит от образования эндогенного тромбоксана, однако у некоторых групп пациентов даже низкие концентрации коллагена могут вызвать агрегацию даже при полном ингибировании тромбоксана АСК. Таким образом методы оценки эффективности АСК с использованием агрегации, стимулированной АДФ или коллагеном, не являются оптимальными. Метод

оценки агрегационной способности тромбоцитов с использованием арахидоновой кислоты в качестве активатора признан более надежным для оценки эффективности АСК, поскольку агрегация тромбоцитов под действием арахидоновой кислоты зависит от образования эндогенного тромбоксана.

Для изучения антиагрегантного действия клопидогреля чаще всего используют метод светопропускающей агрегометрии с использованием АДФ в качестве индуктора агрегации. Считается, что агрегометрия светопропускания и VASP сопоставимы для определения фармакологического ингибирования тромбоцитарного рецептора P2Y₁₂ АДФ, однако следует отметить, что не во всех случаях АДФ-индуцированная агрегация может быть полностью подавлена клопидогрелом.

Таким образом, анализ современного состояния исследований показывает необходимость поиска нового метода оценки эффективности терапии АП.

Метод ГКРС-спектроскопии обладает преимуществами, делающими его перспективным диагностическим подходом для использования в клинической практике. В ходе исследовательской работы, мы выявили, что КРС - спектроскопия не дает четкого и разрешенного спектрального отпечатка слаборассеивающих объектов, в том числе и богатой тромбоцитами плазмы человека. Поэтому для изучения фармакодинамики АП нами была использована спектроскопия ГКРС с применением структурированных титановых металлических поверхностей, что позволило получить качественные спектральные данные, отражающие изменения тромбоцитарной клетки под влиянием терапии.

При изучении спектральных данных, полученных методом ГКРС-спектроскопией с использованием оригинального наноструктурированного сенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса для усиления КРС-сигнала удастся дифференцировать пики.

ГКРС-спектроскопия позволяет быстро и точно получать информацию о биологической структуре объекта в режиме реального времени с использованием минимальной пробоподготовки. Нами определено, что оптимальным методом пробоподготовки богатой тромбоцитами плазмы для изучения фармакодинамики

АП является метод №1, в котором для забора крови используются пробирки с ЭДТА. При использовании пробирок с цитратом натрия в ГКРС-спектре присутствует посторонний «шум». Мы предполагаем, что изменение обусловлено наличием кристаллов цитрата натрия при высыхании образца на поверхности.

Одними из основных преимуществ ГКРС являются высокая специфичность и возможность относительно простого масштабирования данного метода с лабораторного прототипа в портативные устройства для диагностики на месте оказания медицинской помощи - Point-of-care testing (ПОСТ). Потенциально использование ГКРС - спектроскопии в корпусе устройства ПОСТ даст возможность расширить доступ к эффективной мультиплексной методике оценки агрегационной способности тромбоцитов. Решение данной задачи возможно только в процессе совместной работы исследователей с клиницистами, биостатистиками, производителями лабораторного оборудования. Результат работы должен быть представлен недорогой, быстрой, чувствительной платформой для диагностики in-vitro, которая представляет портативный, автономный прибор доступный для использования в клинике.

На сегодняшний день количество работ, описывающих использование ГКРС- спектроскопии для изучения форменных элементов крови ограничено и единые подходы к применению данного метода пока не разработаны. В наших исследованиях впервые показана возможность применения ГКРС-спектроскопии для изучения функционального состояния тромбоцитов в диагностических целях. В ходе исследований мы выявили, что спектры одного образца однородны, в том числе воспроизводятся даже после перезагрузки оборудования, лишь небольшое количество (до 15%) имеют значительные отклонения — возможно, из-за того, что в точке съемки могли появиться остаточные эритроциты, поврежденные/деградирующие тромбоциты или другие причины.

При использовании комбинированного подхода, базирующегося на многомерных методах, в числе которых анализ главных компонент и алгоритмы парных корреляций, нами определено, что образцы богатой тромбоцитами плазмы, полученные от одного здорового добровольца, являются спектрально

однородными. Определена высокая спектральная однородность богатой тромбоцитами плазмы внутри одного образца и между разными образцами от одного добровольца.

Исходя из вышесказанного, нами выдвинута гипотеза о возможности успешного использования ГКРС-спектроскопии для выделения функциональных кластеров тромбоцитов, а также использование данного метода для оценки фармакодинамики антиагрегантных препаратов.

Обнаруженные спектральные различия богатой тромбоцитами плазмы здоровых добровольцев и пациентов с ССЗ ожидаемы, поскольку ранее исследователи уже сообщали о структурных и функциональных изменениях тромбоцитов, обнаруженных у пациентов с ССЗ. В ходе исследовательской работы мы выявили, что метод ГКРС-спектроскопии может быть успешно применен для дифференцировки тромбоцитов здоровых добровольцев и пациентов с ССЗ.

Одним из самых сложных аспектов использования ГКРС-спектроскопии для является выделения наиболее информативных участков среди большого количества данных, получаемых при снятии ГКРС-спектров. С использованием процедур машинного обучения нами были определены ЧС ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы периферической крови, имеющие наибольшую информативность при выявлении различий в спектрах здоровых добровольцев и пациентов с ССЗ, а также для оценки фармакодинамических эффектов антитромбоцитарных препаратов. В списке наиболее перспективных для последующего изучения ЧС, было выбрано 21 значение, а именно - 420, 430, 485, 505, 605, 615, 720, 805, 955, 960, 970, 975, 980, 990, 1040, 1400, 1410, 1465, 1535, 1540, 1590 см^{-1} . Результаты, представленные в настоящей статье, показывают, что анализ интенсивностей ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы на всех перечисленных выше ЧС достоверно отличается в группах здоровых лиц и пациентов с ССЗ. Таким образом, все перечисленные ЧС являются потенциальными кандидатами для использования в методиках диагностики ССЗ и для создания соответствующих диагностических приборов.

Для метода ГКРС-спектроскопии характерным является получение информации о химической и физической природе исследуемого образца в пределах нескольких микрон, поэтому полученные в наших исследованиях ГКРС-спектры, вероятно, отражают прежде всего особенности химического состава именно мембраны тромбоцитов. Поэтому, наиболее вероятным объяснением найденных различий, на наш взгляд, является отличие химического состава мембран тромбоцитов у здоровых лиц и пациентов с ССЗ, которые определяют наличие структурных и функциональных изменений тромбоцитов, имеющих место у пациентов с ССЗ. Это подтверждается проведенным нами ранее сопоставлением ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы здоровых лиц и пациентов с ССЗ по наличию четких отличий в содержании амидных групп, триптофана, серина, изменениях в структуре белков для групп Амид I, S-S связей низкочастотной области.

В то же время, основной задачей нашего исследования было обнаружить с помощью ГКРС-спектроскопии богатой тромбоцитами плазмы потенциальные биомаркеры у пациентов, получающих терапию антиагрегантами, которые бы позволили изучать фармакодинамические эффекты этих препаратов. В этой связи наибольший интерес представляли различия ГКРС-спектров между здоровыми лицами, получавшими и не получавшими АСК (группа 1 и группа 2), а также пациентами с ССЗ, получавшими и не получавшими терапию антиагрегантами (группа 3 и группа 4). Нами были выявлены статистически значимые различия по некоторым интенсивностям ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы у добровольцев и пациентов с ССЗ, получающих терапию АСК и без терапии АСК только для четырех ЧС, а именно - 485, 505, 990, 1465 см^{-1} . Полученный результат, свидетельствует о том, что изменения интенсивностей ГКРС-спектров на данных ЧС могут быть маркерами прямых фармакодинамических эффектов антиагрегантов и метод ГКРС-спектроскопии богатой тромбоцитами плазмы потенциально может быть использован для оценки фармакодинамических эффектов антиагрегантов.

Для того чтобы определить с каким классом антиагрегантов в большей степени коррелируют выявленные нами спектральные различия богатой тромбоцитами плазмы, был проведен корреляционный анализ между интенсивностями ГКРС-спектров богатой тромбоцитами плазмы периферической крови и параметрами агрегации тромбоцитов, полученных с использованием разных картриджей системы PFA-200. Для целей предварительной оценки и формулирования рабочей гипотезы такого подхода оказалось достаточно, были выявлены достоверные корреляции: между ГКРС-спектрами здоровых добровольцев, получающих АСК (Группа 2) и результатами агрегометрии при воздействии активатора Coll/ADP; между ГКРС-спектрами всех участников (Группа 1, 2, 3, 4) и результатами агрегометрии при воздействии активатора P2Y; между ГКРС-спектрами богатой тромбоцитами плазмы пациентов с ССЗ, получающих терапию АСК и результатами агрегометрии при воздействии активатора P2Y. Наличие данных корреляций свидетельствует о связи изменения структуры мембраны с функциональной активностью тромбоцита.

Методом ^1H ЯМР спектроскопии определено, что у здоровых добровольцев после приема АСК в дозах 100, 300 и 3000 мг наиболее интенсивные пики метаболитов в ^1H ЯМР-спектрах связаны с салицилуровой кислотой. Повышенная интенсивность сигнала детектирована в районе от 6,6 до 6,9 ppm. Данная группа ^1H ЯМР-сигналов не перекрывается сигналами от естественных метаболитов и сигналами гиппуровой и салициловой кислот. Таким образом, метод ^1H ЯМР может быть применен для контроля приема АСК в дозах, используемых для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

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 гипсуровой 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 удается 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ^1H ЯМР – спектроскопия - ^1H спектроскопия ядерного магнитного резонанса
- 6-МП - 6-меркаптопурин
- Coll/ADP – коллаген/АДФ
- Coll/Epi – коллаген/ эпинефрином
- D₂O – оксид дейтерия
- DPSS лазер - diode-pumped solid state (твердотельный с диодной накачкой лазер)
- ER α - receptor - estrogen receptor alpha (рецептор эстрогена альфа)
- FDA - Food and Drug Administration (Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств)
- GHB - gamma hydroxybutyric acid (гамма-гидроксимасляная кислота)
- Gl –глицин
- GP IIb/IIIa - glycoprotein IIb/IIIa (гликопротеин IIb/IIIa)
- K₂HPO₄ - Гидроортофосфат калия
- MACE - major adverse cardiovascular events (основные неблагоприятные сердечно-сосудистые события)
- Max – максимальное значение
- Me (Q₂₅; Q₇₅) - Me – медиана, Q₇₅—25-й процентиль, Q₇₅ — 75-й процентиль
- Min – минимальное значение
- MS Excel - Microsoft Excel
- PCA - principal component analysis (метод главных компонент)
- PFA - Platelet Function Analyzer
- PLS – Projection on Latent Structures (метод проекций на латентные структуры, модель регрессионной калибровки)
- POCT – point of care testing (тестирование в месте оказания медицинской помощи)
- ppm - parts per million (миллионная доля)

PRP - platelet-rich plasma (обогащённая тромбоцитами плазма)

SCORE - Systematic Coronary Risk Evaluation (Систематическая оценка коронарного риска)

SERD - selective estrogen receptor degrader (селективный деструктор рецепторов эстрогена)

TXA2 - thromboxane A2 (тромбоксан A2)

TXB2 - thromboxane B2 (тромбоксан B2)

USB - Universal Serial Bus (универсальная последовательная шина)

Varian 400 MR - Varian 400 Magnetic resonance spectrometer

VASP - vasodilator-stimulated phosphoprotein (сосудорасширяющий фосфопротеин)

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

ВЭЖХ - Высокоэффективная жидкостная хроматография

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

кДа – килодальтон

КО – Калининградская область

КРС – комбинационное рассеяние света

кЯМР-спектроскопия – количественная спектроскопия ядерного магнитного резонанса

ЛППР – локализованный поверхностный плазмонный резонанс

ЛС – лекарственное средство

МВт – Мегаватт

мг – миллиграмм

МГц – мегагерц

Me – медиана

мкл – микролитр

мкм – микрометр

мкМ – микромоль

мкс- микросекунда

мл- миллилитр

МС - Масс-спектрометрия

нм – нанометр

НОЦ – научно-образовательный центр

НПВС – нестероидные противовоспалительные средства

НЧ – наночастица

ПЭГ – Полиэтиленгликоль

РНФ - Российский научный фонд

РФФИ - Российский фонд фундаментальных исследований

см⁻¹- обратный сантиметр

СНГ - Содружество Независимых Государств

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТЛМ – терапевтический лекарственный мониторинг

ТМАО – триметиламиноксид

ТМС – триметиламиноксид

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат

ЦОГ-1 - циклооксигеназа-1

ЧС – частотный сдвиг

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончаров, М. Д. Особенности продукции активных форм кислорода тромбоцитами и нейтрофилами в формировании недостаточного ответа на ацетилсалициловую кислоту у пациентов с ишемической болезнью сердца после операции коронарного шунтирования / М. Д. Гончаров, Ю. И. Гринштейн, А. А. Савченко // Трансляционная медицина. – 2022. – Т. 9. – №. 1. – С. 12-28.
2. Журавлева, М. В. Оценка влияния применения лекарственного препарата тикагрелор у пациентов с острым коронарным синдромом на выполнение целевого показателя “снижение смертности населения от болезней системы кровообращения” в периоде 2022-2024гг / М. В. Журавлева, С. К. Зырянов, Ф.Н. Палеев [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2021. – №. 12. – С. 131-140.
3. Батурин, В. А. Этнические особенности антиагрегантного действия ацетилсалициловой кислоты у жителей Ставропольского края / В. А. Батурин, А. В. Иванова, К. А. Муравьев [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 15. – №. 1. – С. 68-71.
4. Кантемирова, Б. И. Фармакогенетические основы индивидуальной чувствительности и персонализированного назначения антиагрегантной терапии в различных этнических группах / Б. И. Кантемирова, Е. А. Орлова, О. С. Полунина [и др.] // Фармация и фармакология. – 2020. – Т. 8. – №. 6. – С. 392-404.
5. Агеев, Ф. Т. Низкая приверженность терапии и пути ее преодоления на примере антиагрегантной терапии / Ф. Т. Агеев, М. Д. Смирнова, Т. В. Феофанова [и др.] // РМЖ. Медицинское обозрение. – 2023. – Т. 7. – №. 1. – С. 56-61.
6. Tyagi, T. A guide to molecular and functional investigations of platelets to bridge basic and clinical sciences / T. Tyagi, K. Jain, S. X. Gu et al. // Nature Cardiovascular Research. – 2022. – Т. 1. – №. 3. – С. 223-237.
7. Gurbel, P. A. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study / P. A. Gurbel, K. P. Bliden, J. DiChiara et al. // Circulation. – 2007. – Т. 115. – №. 25. – С. 3156-3164.

8. Сидоренко, И. В. Резистентность к ацетилсалициловой кислоте: современное состояние проблемы / И. В. Сидоренко // Медицинские новости. – 2013. – №. 9 (228). – С. 12-14.
9. Russo, N. W. Aspirin, stroke and drug-drug interactions / G. Petrucci, B. Rocca // Vascular pharmacology. – 2016. – Т. 87. – С. 14-22.
10. Ковальчук, Ю. П. Определение референсных значений для анализа агрегации тромбоцитов в автоматическом режиме на анализаторе Sysmex CS-5100 / Ю. П. Ковальчук, М. И. Кадинская, М. С. Пименов, И. Ю. Ефимова // Медицинский алфавит. – 2021. – №. 13. – С. 42-46.
11. Feher, G. The genetics of antiplatelet drug resistance / G. Feher, A. Feher, G. Pusch et al. // Clinical genetics. – 2009. – Т. 75. – №. 1. – С. 1-18.
12. Koltai, K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications / K. Koltai, G. Kesmarky, G. Feher et al. // International journal of molecular sciences. – 2017. – Т. 18. – №. 8. – С. 1803.
13. Шабалина, А. А. Сравнение двух методов лабораторной оценки агрегации тромбоцитов и резистентности к антиагрегантной терапии / А. А. Шабалина, Е. В. Ройтман, М. М. Танащян // Тромбоз, гемостаз и реология научно-практический журнал ISSN 2078–1008 (Print); ISSN 2687-1483 (online). – 2019. – С. 64-71.
14. Столяр, М. К вопросу определения границ нормальной реакции тромбоцитов в тесте импедансной агрегометрии / М. Столяр, И. А. Ольховский // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61. – №. 6. – С. 359-363.
15. Базаев, И. А. Современные методы измерения параметров свертываемости крови / И. А. Базаев, А. В. Пржиялговская, П. А. Руденко, [и др.] // Медицинская техника. – 2015. – Т. 3. – С. 9-13.
16. Мирзаев, К. Б. Оценка агрегации тромбоцитов в клинической практике / К. Б. Мирзаев, Д. А. Андреев, Д. А. Сычев // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2015. – Т. 11. – №. 1. – С. 85-91.

17. Zyubin, A. Surface-enhanced Raman spectroscopy for antiplatelet therapy effectiveness assessment / A. Zyubin, V. Rafalskiy, A. Tcibulnikova et al. // *Laser Physics Letters*. – 2020. – Т. 17. – №. 4. – С. 045601.
18. Kapara, A. Characterisation of estrogen receptor alpha (ERalpha) expression in breast cancer cells and effect of drug treatment using targeted nanoparticles and SERS / A. Kapara, V. G. Brunton, D. Graham, K. Faulds // *Analyst*. – 2020. – Т. 145. – №. 22. – С. 7225-7233.
19. Мирошниченко, И. И. Мониторинг эффективности антипсихотической терапии / И. И. Мирошниченко // *Психиатрия*. – 2023. – Т. 20. – №. 4. – С. 128-138.
20. Мухсинов, Ф. М. Фенотипические предикторы и биомаркеры прогноза эффективности антимикробной терапии / Ф. М. Мухсинов, И. В. Ливерко // *Journal of cardiorespiratory research*. – 2022. – Т. 1. – №. 3. – С. 54-58.
21. Петров, В. И. Клиническая значимость фармакогенетического тестирования полиморфизмов гена цитохрома P450 (CYP2C19) с целью персонализации выбора ингибиторов протонной помпы / В. И. Петров, А. В. Пономарева, А. М. Доценко [и др.] // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2023. – Т. 18. – №. 3. – С. 283-286.
22. Танащян, М. М. Ожирение и протромбогенное состояние крови у пациентов с цереброваскулярными заболеваниями / М.М. Танащян, К.В. Антонова, О.В. Лагода, А.А. Шабалина [и др.] // *Тромбоз, гемостаз и реология научно-практический журнал* ISSN 2078–1008 (Print); ISSN 2687-1483 (online). – 2023. – С. 53-62.
23. Ates, H. C. On-site therapeutic drug monitoring / H. C. Ates, J. A. Roberts, J. Lipman et al. // *Trends in biotechnology*. – 2020. – Т. 38. – №. 11. – С. 1262-1277.
24. Timmis, A. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021 / A. Timmis, P. Vardas, A. Townsend et al. // *European Heart Journal*. – 2022. – Т. 43. – №. 8. – С. 716-799.
25. Естественное движение населения Российской Федерации. [Электронный ресурс]. 2023. Дата обновления: 23.06.2023. URL: <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13269> (дата обращения 23.06.2023)

26. Журавлёва, М. В. Анализ влияния применения комбинированной терапии ривароксабаном в сочетании с ацетилсалициловой кислотой у пациентов с ишемической болезнью сердца на достижение целевого показателя по снижению смертности от болезней системы кровообращения федерального проекта «Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями» / М. В. Журавлёва, А. В. Панов, А. Р. Куксенюк // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2022. – Т. 18. – №. 1. – С. 56-66.
27. Шляхто, Е. В. Система управления сердечно-сосудистыми рисками: предпосылки к созданию, принципы организации, таргетные группы / Е. В. Шляхто, Н. Э. Звартау, С. В. Виллевалде [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2019. – №. 11. – С. 69-82.
28. Ostergaard, L. The Role of Antiplatelet Therapy in Primary Prevention. A Review / L. Ostergaard, E. L. Fosbol, M. T. Roe // Current pharmaceutical design. – 2017. – Т. 23. – №. 9. – С. 1294-1306.
29. Мирзаев, К. Б. Значение фармакогенетического тестирования по CYP2C19 для персонализации применения антиагрегантов в кардиологической практике / К. Б. Мирзаев, Д. А. Сычев, Д. А. Андреев, А. Б. Прокофьев // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2013. – Т. 9. – №. 4. – С. 404-408.
30. Чулков, В. С. Актуальный взгляд на первичную профилактику сердечно-сосудистых заболеваний (обзор современных рекомендаций) / В. С. Чулков, А. В. Синеглазова, В. А. Конашов [и др.] // Вестник современной клинической медицины. – 2021. – Т. 14. – №. 6. – С. 113-123.
31. Новиков, В. Первичная профилактика кардиоваскулярных заболеваний при сахарном диабете: стратегия-2020 / В. Новиков, К. Новиков // Медицинский совет. – 2020. – №. 4. – С. 40-47.
32. Драпкина, О. Актуальные вопросы применения ацетилсалициловой кислоты с целью первичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в свете новых научных данных и обновленных клинических рекомендаций. Резолюция совета экспертов / О. Драпкина, Т. Вавилова, Ю. Карпов [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21. – №. 12. – С. 97-109.

33. Ricciotti, Aspirin in the prevention of cardiovascular disease and cancer / E. Ricciotti, G. A. FitzGerald // *Annual review of medicine*. – 2021. – Т. 72. – С. 473-495.
34. Журавков, Ю. Антитромботическая терапия сегодня / Ю. Журавков, А. Королева, А. Журавкова // *Белорусский государственный медицинский университет - Сообщение 2*. – 2023.
35. Chiarito, M. Antiplatelet therapy for secondary prevention of cardiovascular disease: challenging the certainties / M. Chiarito, G. G. Stefanini // *The Lancet*. – 2021. – Т. 397. – №. 10293. – С. 2443-2444.
36. Боцкорт, В. Ключевые данные и определения для сердечной недостаточности Американского колледжа кардиологии (асс) и Американской ассоциации кардиологов (АНА) 2021 (обновление с 2005 г.) / В. Боцкорт, Р. Хершбергер Б. Дж // *Кардиология: Новости. Мнения. Обучение*. – 2022. – Т. 10. – №. 2 (29). – С. 15-17.
37. Эрлих, А. Некоторые практические вопросы о разной длительности двойной антитромбоцитарной терапии / А. Эрлих, М. Давиденко // *Лечебное дело*. – 2023. – №. 2. – С. 57-66.
38. Мамедов, М. Н. О. Обновленные европейские рекомендации по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Аналитический обзор / М. Н. О. Мамедов, Е. Ю. Митченко, Ш. Пранас // *Международный журнал сердца и сосудистых заболеваний*. – 2022. – Т. 10. – №. 33. – С. 4-11.
39. Russo, N. W. Aspirin, stroke and drug-drug interactions / N. W. Russo, G. Petrucci, B. Rocca // *Vascular pharmacology*. – 2016. – Т. 87. – С. 14-22.
40. Зырянов, С. К. Клинико-фармакологическое обоснование вариабельности антиагрегантного ответа при использовании разных лекарственных форм ацетилсалициловой кислоты / С. К. Зырянов, О. И. Бутранова // *Consilium Medicum*. – 2017. – Т. 19. – №. 10. – С. 105-112.
41. Baigent, C. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials / C. Baigent, L. Blackwell R. Collins et al. // *Lancet*. – 2009. – Т. 373. – №. 9678. – С. 1849-1860.

42. Фролов, Д. В. Первичная профилактика венозных тромбозов и тромбоэмболических осложнений: современное состояние проблемы / Д. В. Фролов, В. И. Петров, Г. А. Суханова // ФЛЕБОЛОГИЯ Учредители: ООО "Издательство" Медиа Сфера", Межрегиональная общественная организация "Ассоциация флебологов России". – 2022. – Т. 16. – №. 2. – С. 164-174.

43. Erdmann, E. Prevention of atherothrombotic incidents. CHARISMA Study (The Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance / E. Erdmann // Der Internist. – 2006. – Т. 47. – С. 1295-1297.

44. Бекетова, Т. Обзор рекомендаций American College of Rheumatology/Vasculitis Foundation по лечению системных васкулитов крупных сосудов (гигантоклеточного артериита и артериита Такаясу) / Т. Бекетова, И. Попов, В. Зеленев // Научно-практическая ревматология. 2022;60(2):165-73.

45. Amin, A. M. 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. Teh et al. // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2017. – Т. 146. – С. 135-146.

46. Якуббеков, Н. Т. Дезагрегантная эффективность клопидогреля и прасугреля у больных ИБС с многососудистым стентированием на фоне сахарного диабета с учетом G681A полиморфизма и C-806T полиморфизма гена CYP2C19 / Н. Т. Якуббеков, Г. У. Муллабаева, А. Г. Никишин, С. Я. Абдуллаева // В номере. – 2022. – С. 34.

47. Сычев, Д. А. Генетические и негенетические факторы лабораторной резистентности к клопидогрелу у больных с ишемическим инсультом / Д. А. Сычев, В. В. Шпрах, Е. Ю. Китаева [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. – 2019. – Т. 119. – №. 3-2. – С. 45-52.

48. Кропачева, Е. Аспекты антикоагулянтной терапии у больных фибрилляцией предсердий в свете обновленных рекомендаций Европейского общества кардиологов 2020 года: место дабигатрана / Е. Кропачева, Е. Панченко // Атеротромбоз. – 2020. – №. 2. – С. 17-26.

49. Clement, D. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee // *Lancet*. 1996;348(9038):1329-39.
50. Мороз, Е. Низкие дозы аспирина и желудочно-кишечные осложнения (обзор литературы). / Е. Мороз, В. Чернецов, Е. Крюков // *Военно-медицинский журнал*. – 2019. – Т. 340. – №. 2. – С. 51-57.
51. Guirgis, M. Review of aspirin and clopidogrel resistance in peripheral arterial disease / M. Guirgis, P. Thompson, S. Jansen // *Journal of vascular surgery*. – 2017. – Т. 66. – №. 5. – С. 1576-1586.
52. Батурин, В. А. Изучение функциональной активности тромбоцитов на фоне антиагрегантной терапии у больных кардиологического стационара / В. А. Батурин, А. В. Иванова, К. А. Муравьев, А. А. Царукян // *Вестник Биомедицина и социология*. – 2021. – Т. 6, № 4. – С. 20-29.
53. Эверстова, Т. Е. Проблемы резистентности к ацетилсалициловой кислоте в профилактике ишемического инсульта (обзор литературы) / Т. Е. Эверстова, Т. Я. Николаева // *Сибирское медицинское обозрение*. – 2020. – №. 3 (123). – С. 47-53.
54. Braun, O. Ö. Greater reduction of platelet activation markers and platelet-monocyte aggregates by prasugrel compared to clopidogrel in stable coronary artery disease / O. Ö. Braun, M. Johnell, S. James et al. // *Thrombosis and haemostasis*. – 2008. – Т. 100. – №. 10. – С. 626-633.
55. Mariani, M. Efficacy and safety of prasugrel compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: results of TRITON-TIMI 38 trials / M. Mariani, G. Mariani, S. De Servi // *Expert review of cardiovascular therapy*. – 2009. – Т. 7. – №. 1. – С. 17-23.
56. Пучиньян, Н. Ф. Проблема контроля эффективности антитромбоцитарной терапии в кардиологической практике / Н. Ф. Пучиньян, Н. В. Фурман, Л. И. Малинова, П. В. Долотовская // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. – 2017. – Т. 13. – №. 1. – С. 107-115.

57. Салухов, В. Профилактика осложнений ИБС при вариабельном тромбоцитарном ответе / В. Салухов, Н. Гуляев, А. Чепель [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. НИ Пирогова. – 2020. – Т. 15. – №. 4. – С. 82-90.

58. Драпкина, О. Острый коронарный синдром в период пандемии новой коронавирусной инфекции / О. Драпкина, А. Кравченко, А. Будневский // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2023. – Т. 19. – №. 1. – С. 65-70.

59. James, S. Comparison of ticagrelor, the first reversible oral P2Y(12) receptor antagonist, with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: Rationale, design, and baseline characteristics of the PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial / S. James, A. Akerblom, C. P. Cannon et al. // American heart journal. – 2009. – Т. 157. – №. 4. – С. 599-605.

60. Зайнобидинов, Ш. Современные аспекты диагностики и лечения пациентов со спонтанной диссекцией коронарных артерий / Ш. Зайнобидинов, Д. Хелимский, А. Баранов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21. – №. 8. – С. 106-118.

61. Лебедева, Д. Роль неустойчивого гемостаза в развитии специфических послеоперационных осложнений (обзор литературы). / Д. Лебедева, Е. Ильичева // Acta Biomedica Scientifica. – 2020. – Т. 5. – №. 4. – С. 98-102.

62. Козиолова, Н. Сахарный диабет 2 типа и микрососудистые осложнения у больных стабильной ишемической болезнью сердца: распространенность, прогноз и выбор антитромботической терапии / Н. Козиолова, Е. Полянская, С. Миронова // Южно-Российский журнал терапевтической практики. – 2022. – Т. 3. – №. 4. – С. 7-24.

63. Салухов, В. В. Профилактика осложнений ибс при вариабельном тромбоцитарном ответе / В. В. Салухов, Н. И. Гуляев, А. И. Чепель [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. НИ Пирогова. – 2020. – Т. 15. – №. 4. – С. 82-90.

64. Заболотских, И. Б. Периоперационное ведение пациентов, получающих длительную антитромботическую терапию. Методические рекомендации

Общероссийской общественной организации" Федерация анестезиологов и реаниматологов" / И. Б. Заболотских, М. Киров, В. Афончиков // Вестник интенсивной терапии имени АИ Салтанова. – 2019. – №. 1. – С. 7-19.

65. Timmis, A. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021: Executive Summary / A. Timmis, P. Vardas, N. Townsend et al. // European heart journal. – 2022. – Т. 43. – №. 8. – С. 716-799.

66. 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. – Т. 8. – №. 1. – С. 23-30.

67. Соколов, А. В. Терапевтический лекарственный мониторинг / А. В. Соколов // Качественная клиническая практика. – 2008. – №. 1. – С. 78-88.

68. Гительзон, Д. Г. Персонализированная антитромботическая терапия при стентировании коронарных артерий у больных нестабильной стенокардией / Д. Г. Гительзон, А. Г. Файбушевич, Д. А. Максимкин // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2020. – №. 10. – С. 144-150

69. Корнилова, А. А. Генетические аспекты аспиринорезистентности у пациентов с цереброваскулярной патологией / А. А. Корнилова, М. М. Танащян, А. А. Раскуражев, А. А. Шабалина // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2021. – №. 3. – С. 23-29.

70. Мищенко, Е. С. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе новой субстанции VMA-10-18 / Е. С. Мищенко, Д. С. Лазарян, А.Д. Лазарян // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10. – №. 3. – С. 76-81.

71. Петров, В. И. Разработка и валидация количественного ВЭЖХ-МС/МС метода определения ванкомицина в плазме крови / В. И. Петров, И. С. Аникеев, Т. Е. Заячникова [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2022. – Т. 19. – №. 4. – С. 128-134.

72. Лохов, П. Г. Десять лет российской метаболомике: история развития и основные результаты / П. Г. Лохов, Е. Е. Балашова, О. П. Трифонова [и др.] // Биомедицинская химия. – 2020. – Т. 66. – №. 4. – С. 279-293.
73. Hochholzer, W. Whole blood aggregometry for evaluation of the antiplatelet effects of clopidogrel / W. Hochholzer, D. Trenk, D. Frundi et al. // Thrombosis research. – 2007. – Т. 119. – №. 3. – С. 285-291.
74. Лукьянец, К. Резистентность к терапии препаратами ацетилсалициловой кислоты: факторы риска, механизмы, методы диагностики / К. Лукьянец, И. Пчелин // Juvenis scientia. – 2020. – Т. 6. – №. 2. – С. 16-34.
75. Zhangelova, S. B. Nurmukhammad F. N., Nurdinov N. High residual reactivity of platelets as a predictor of atherothrombosis in patients with coronary heart disease. 2023.
76. Кубова, М. Ч. Факторы риска развития тромбоза шунтов у больных ишемической болезнью сердца в отдаленные сроки после операции коронарного шунтирования / М. Ч. Кубова, Н. И. Булаева, Е. В. Рузина, Е. З. Голухова // Креативная кардиология. – 2021. – Т. 15. – №. 2. – С. 180.
77. Стрыканова, В. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОРОВОЙ КОАГУЛЯЦИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СВЁРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ / В. Стрыканова, В. Виноградов // Химия, физика, биология: пути интеграции. – 2022. – С. 163-163.
78. Пономаренко, Е. А. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики / Е. А. Пономаренко, А. А. Игнатова, Д. В. Федорова // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2019. – Т. 18. – №. 3. – С. 112-119.
79. Mitchell, D. L. Assessing the efficacy of VerifyNow platelet-function testing in predicting postoperative thromboembolic complications of neuroendovascular surgery: A systematic review and meta-analysis (part 1) / D. L. Mitchell, L. S. McGuire, S. I. Khalid, A. Alaraj // Interventional Neuroradiology. – 2024. – С. 15910199231224008.
80. Максимова, М. Ю. Влияют ли малые стоматологические вмешательства на гемостаз и безопасность использования ацетилсалициловой

кислоты у пациентов с гипертоническими малыми глубинными инфарктами головного мозга? / М. Ю. Максимова, М. М. Танащян, Н. А. Рязанцев, Е. Н. Анисимова, А. А. Шабалина // Тромбоз, гемостаз и реология научно-практический журнал ISSN 2078–1008 (Print); ISSN 2687-1483 (online). – 2023. – С. 75-82.

81. Колесникова, И. Ройтман Е, editors. Установление границ нормальных значений для метода потоковой агрегатометрии тромбоцитов / И. Колесникова, Е. Ройтман // молекулярная диагностика 2017. – 2017. – С. 264-264.

82. Мошкин, А. Оценка чувствительности пациентов к антиагрегантной терапии при эндоваскулярном лечении интракраниальных аневризм с применением стент-ассистенции / Мошкин, А., Микеладзе К, Виноградов Е [и др.] Лабораторная служба. – 2017. – Т. 6. – №. 4. – С. 63-66.

83. Piao, J. Performance comparison of the PFA-200 and Anysis-200: Assessment of bleeding risk screening in cardiology patients / J. Piao, C. Yoo, S. Kim et al. // Clinical Hemorheology and Microcirculation. – 2021. – Т. 79. – №. 3. – С. 445-454.

84. Трушникова, Е. Проблема двойной антиагрегантной терапии. Обзор клинических исследований / Е.К. Трушникова, А. М. Намитоков, В. И. Фетисова [и др.] // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2019. – №. 4. – С. 73-80.

85. Явелов, И. С. Сохраняющийся риск сосудистых осложнений и эффективность длительной двойной антитромбоцитарной терапии после инфаркта миокард / И. С. Явелов // Атеротромбоз. – 2021. – №. 2. – С. 18-28.

86. Ажигова, А. М. Фармакогеномика ламотриджина (обзор литературы) / А. М. Ажигова, А. Г. Брутян, П. Н. Власов // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2021. – Т. 15. – №. 2. – С. 59-72.

87. Kulickowski, W. Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology // W. Kulickowski, A. Witkowski, L. Polonski et al. // European heart journal. – 2009. – Т. 30. – №. 4. – С. 426-435.

88. Никонов, В. В. Тромбоцитарный гемостаз и антитромбоцитарная терапия при остром коронарном синдроме / В. В. Никонов, Е. И. Киношенко // *Новости медицины и фармации*. – 2011. – №. 3. – С. 5-12.
89. Карева, Е. Н. Побочные эффекты нестероидных противовоспалительных средств и пути их профилактики / Е. Н. Карева, О. М. Олейникова // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2022. – Т. 85. – №. 3. – С. 33-44.
90. Schror, K. Aspirin "resistance" / K. Schrör, A. A. Weber, T. Hohlfield et al. // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2006. – Т. 36. – №. 2. – С. 171-176.
91. Баринов, Э. Ф. Молекулярные механизмы регуляции функциональной активности клеток крови: совершенствование таргетной противовоспалительной терапии / Э. Ф. Баринов, Х. В. Григорян, Т. И. Фабер [и др.] // *Врач*. – 2019. – Т. 30. – №. 11. – С. 15-22.
92. Зырянов, С. К. Приверженность к фармакотерапии у пожилых пациентов с ишемической болезнью сердца в условиях первичного амбулаторного звена / С. К. Зырянов, С. Б. Фитилев, А. В. Возжаев [и др.] // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. – 2021. – Т. 17. – №. 2. – С. 178-185.
93. Ханина, Е. А. Анализ эффективности генерических препаратов в сравнении с оригинальными у пациентов при сердечно-сосудистой патологии / Е. А. Ханина, Ю. О. Мишакина, И.С. Добрынина // *Актуальные проблемы медицинской науки и образования (АПМНО-2019)*. – 2019. – С. 157-159.
94. Васенина, Е. Е. Приверженность к терапии у больных деменцией / Е. Е. Васенина, О. С. Левин // *Современная терапия в психиатрии и неврологии*. – 2016. – №. 4. – С. 4-8.
95. Багликов, А. Н. Значение приверженности пациентов к лечению при длительном приеме ацетилсалициловой кислоты у пациентов, перенесших острый коронарный синдром: результаты исследования / А. Н. Багликов, В. В. Рафальский // *Кардиология*. – 2012. – Т. 52. – №. 9. – С. 22-28.
96. Бёккер, Ю. Спектроскопия. – Litres, 2022.

97. Садагов, А. Ю. Меры на основе стекол, активированных ионами редкоземельных элементов, для калибровки флуоресцентных и рамановских спектрометров / А. Ю. Садагов, Т. А. Гойдина, В. А. Асеев [и др.] // Оптика и спектроскопия. – 2020. – Т. 128. – №. 10. – С. 1535-1543.
98. Рафальский, В.В. 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.
99. Brozek-Pluska, B. Raman microspectroscopy of noncancerous and cancerous human breast tissues. Identification and phase transitions of linoleic and oleic acids by Raman low-temperature studies / B. Brozek-Pluska, M. Kopec, J. Surmacki, H. Abramczyk // Analyst. – 2015. – Т. 140. – №. 7. – С. 2134-2143.
100. Магсумова, О. А. Рамановская спектроскопия и ее применение в стоматологии / О. А. Магсумова, В. А. Полканова, В. Е. Тимченко, Л. Т. Волкова // Стоматология. – 2021. – Т. 100. – №. 4. – С. 137-142.
101. Moore, T. J. In vitro and in vivo SERS biosensing for disease diagnosis / T. J. Moore, A. S. Moody, T. D. Payne et al. // Biosensors. – 2018. – Т. 8. – №. 2. – С. 46
102. Jia, M. Analysis of biomolecules based on the surface enhanced Raman spectroscopy / M. Jia, S. Li, L. Zang et al. // Nanomaterials. – 2018. – Т. 8. – №. 9. – С. 730.
103. Писарев, Э. К. Безамплификационные методы идентификации и определения нуклеиновых кислот методами поверхностного плазмонного резонанса и гигантского комбинационного рассеяния / Э. К. Писарев, О. О. Капитанова, И. А. Веселова, М. Э. Зверева // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2021. – Т. 62. – №. 6. – С. 459-469.
104. Прокопов, А. А. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса как способ характеристики растительного сырья / А. А. Прокопов, О. В. Нестерова // Прикаспийский вестник медицины и фармации. – 2022. – Т. 3. – №. 4. – С. 38-48.
105. Emwas, A. H. NMR spectroscopy for metabolomics research / A. H. Emwas, R. Roy, R. T. McKay et al. // Metabolites. – 2019. – Т. 9. – №. 7. – С. 123.

106. Гончаров, Н. В. Методы метаболомики в решении проблем токсикологии / Н. В. Гончаров, Е. И. Савельева, В. Е. Соболев [и др.] // Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии. – 2019. – С. 23-23.

107. Espina, R. Nuclear magnetic resonance spectroscopy as a quantitative tool to determine the concentrations of biologically produced metabolites: implications in metabolites in safety testing / R. Espina, L. Yu, J. Wang et al. // Chemical research in toxicology. – 2009. – Т. 22. – №. 2. – С. 299-310.

108. Матвеева, К. И. Спектроскопия комбинационного рассеяния света в исследованиях процессов инактивации бактериальных микроорганизмов / К. И. Матвеева, А. А. Кундалевич, А. И. Капитунова [и др.] // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2023. – Т. 23. – №. 4. – С. 676-684.

109. Schlucker, S. Surface-Enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications / S. Schlucker // Angewandte Chemie International Edition. – 2014. – Т. 53. – №. 19. – С. 4756-4795.

110. Ma, Y. Surface-enhanced Raman spectroscopy on liquid interfacial nanoparticle arrays for multiplex detecting drugs in urine / Y. Ma, H. Liu, M. Mao et al. // Analytical chemistry. – 2016. – Т. 88. – №. 16. – С. 8145-8151.

111. Голубева, Е. Н. Количественная оценка локальной концентрации коротких одностенных углеродных нанотрубок в живых клетках методом спектроскопии комбинационного рассеяния / Е. Н. Голубева, М. В. Шуба, Т. А. Кулагова // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. – 2018. – С. 72-72.

112. Александров, М. Т. Применение раман-флюоресцентной технологии для оценки эффективности реминерализации твёрдых тканей зуба / М.Т. Александров, М. А. Полякова, В. И. Кукушкин [и др.] // Российский стоматологический журнал. – 2018. – Т. 22. – №. 5. – С. 220-223.

113. Александров, М. Т. Экспериментально-теоретическое обоснование применения раман-люминесцентных технологий в репродуктивной медицине / М.

Т. Александров, В. М. Зуев, В. И. Кукушкин [и др.] // Репродуктивная медицина. – 2014. – №. 3-4. – С. 66-72.

114. Кузиков, А. В. Методы определения функциональной активности изоферментов цитохрома P450 / А. В. Кузиков, Р. А. Масамрех, А. И. Арчаков [и др.] // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64. – №. 2. – С. 149-168.

115. Ельцова, Н. О. Аналитические методы исследования стабильности фармацевтических композиций и совместимости их компонентов / Н. О. Ельцова, Г. Б. Голубицкий, Е. В. Будко // Журнал аналитической химии. – 2014. – Т. 69. – №. 10. – С. 1011-1011.

116. Chen, C. Novel Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Techniques for DNA, Protein and Drug Detection / C. Chen, W. Liu, S. Tian, T. Hong // Sensors. – 2019. – Т. 19. – №. 7. – С. 1712.

117. Fornasaro, S. Toward SERS-based point-of-care approaches for therapeutic drug monitoring: the case of methotrexate / S. Fornasaro, S. Dalla Marta, M. Rabusin // Faraday Discussions. – 2016. – Т. 187. – С. 485-499.

118. Roberts, J. A. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials / J. A. Roberts, R. Norris, D. L. Paterson, J. H. Martin // British journal of clinical pharmacology. – 2012. – Т. 73. – №. 1. – С. 27-36.

119. Маслов, Д. Л. Фармакометабономика—новый подход к персонализации лекарственной терапии / Д. Л. Маслов, Е. Е. Балашова, П. Г. Лохов, А. И. Арчаков // Биомедицинская химия. – 2017. – Т. 63. – №. 2. – С. 115-123.

120. Стрижевская, А. М. Терапевтический лекарственный мониторинг метотрексата при применении его в высоких дозах для лечения остеосаркомы у детей / А. М. Стрижевская, Е. Г. Головня, И. С. Кулешова [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2016. – №. 1. – С. 48-53.

121. El-Zahry, M. R. Sequential SERS determination of aspirin and vitamin C using in situ laser-induced photochemical silver substrate synthesis in a moving flow cell / M. R. El-Zahry, I. H. Refaat, H. A. Mohamed, B. Lendl // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2016. – Т. 408. – С. 4733-4741.

122. Markina, N.E. Application of Aluminum Hydroxide for Improvement of Label-Free SERS Detection of Some Cephalosporin Antibiotics in Urine / N. E. Markina, A. V. Markin // *Biosensors*. – 2019. – Т. 9. – №. 3. – С. 91.

123. Николетт, А. И. М. Фармакоэкономическое обоснование преимуществ индивидуального дозирования аминогликозидов: анализ затрат и эффективности / А. И. М Николетт, Р. А. А. Матъет, В. П. Гюс // *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. – 2020. – №. 1. – С. 58-68.

124. McKeating, K.S. High throughput LSPR and SERS analysis of aminoglycoside antibiotics / K. S. McKeating, M. Couture, M. P. Dinel et al. // *Analyst*. – 2016. – Т. 141. – №. 17. – С. 5120-5126.

125. Han, G. Label-free surface-enhanced Raman scattering imaging to monitor the metabolism of antitumor drug 6-mercaptopurine in living cells / G. Han, R. Liu, M. Y. Han et al. // *Analytical chemistry*. – 2014. – Т. 86. – №. 23. – С. 11503-11507.

126. Yang, J. A sandwich substrate for ultrasensitive and label-free SERS spectroscopic detection of folic acid / methotrexate / J. Yang, X. Tan, W. C. Shih, M. C. Cheng // *Biomedical microdevices*. – 2014. – Т. 16. – С. 673-679.

127. Dong, J. Minimally invasive surface-enhanced Raman scattering detection with depth profiles based on a surface-enhanced Raman scattering-active acupuncture needle / J. Dong, Q. Chen, C. Rong, D. Li et al. // *Analytical chemistry*. – 2011. – Т. 83. – №. 16. – С. 6191-6195.

128. Yu, Y.P. Bioequivalence Assessment of Topical Ophthalmic Drugs Using Sparse Sampling Pharmacokinetics Data / Y. Pei, Y. Yan, Y. Chen, X. Lai // *Biomedical and Environmental Sciences*. – 2019. – Т. 32. – №. 10. – С. 788-792.

129. Савельева, М. И. Возможности трансдермальных систем доставки лекарственных средств, применяемых при хронических заболеваниях вен / М. И. Савельева, Д. А. Сычев // *Flebologia*. – 2018. – Т. 12. – №. 1.

130. Бойко Э. В. Сравнительное исследование фармакокинетики рекомбинантной проурокиназы при субконъюнктивальном и инстилляционном методах введения / Э. В. Бойко, Т. Г. Сажин, А. С. Суворов [и др.] // *Российский офтальмологический журнал*. – 2017. – Т. 10. – №. 2. – С. 18-22.

131. Бабунашвили А. М. Эффективность применения стентов, покрытых сиролимусом, при лечении диффузных (длинных и очень длинных) атеросклеротических поражений коронарных артерий / А. М. Бабунашвили, Д. С. Карташов, В.Е. Бабокин // Российский кардиологический журнал. – 2017. – №. 8 (148). – С. 42-50.

132. Balss, K. M. Multivariate Analysis Applied to the Study of Spatial Distributions Found in Drug-Eluting Stent Coatings by Confocal Raman Microscopy / K. M. Balss, F. H. Long, V. Veselov et al. // Analytical chemistry. – 2008. – Т. 80. – №. 13. – С. 4853-4859.

133. Моисеев, С. В. Метод ЯМР в отечественной и зарубежных фармакопиях для оценки качества лекарственных средств / С. В. Моисеев, Н. Е. Кузьмина, А.И. Лутцева // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2022. – Т. 12. – №. 1. – С. 8-23.

134. Чепило, Д. А. Комплексный подход к определению подлинности при разработке стандартных образцов лекарственных препаратов ингибиторов АПФ / Д. А. Чепило, В. И. Гегечкори, О. Ю. Щепочкина [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2022. – Т. 56. – №. 4. – С. 41-47.

135. Ивлев, В. А. Количественная спектроскопия ЯМР в идентификации и контроле качества лекарственных препаратов и растительных биологически активных композиций / В. А. Ивлев, А. С. Прокопьев, Г. А. Калабин // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2015. – №. 1. – С. 5-14.

136. Гегечкори, В. И. Применение спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C в анализе стандартных образцов для лекарственных средств пептидной структуры дилепт и ГБ-115 / В. И. Гегечкори, В.А. Кокорекин, О. Ю. Щепочкина [и др.] // Биофармацевтический журнал. – 2016. – Т. 8. – №. 3. – С. 37-43.

137. Моисеев, С. В. Разработка методики определения трифторацетатов в фармацевтической субстанции "глатирамера ацетат" методом ^{19}F ЯМР-спектроскопии / С. В. Моисеев, В. И. Крылов, Н. Е. Кузьмина [и др.] // Ведомости

Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2017. – Т. 7. – №. 4. – С. 256-260.

138. Manzoor, S. Identification and characterization of SSE15206, a microtubule depolymerizing agent that overcomes multidrug resistance / S. Manzoor, A. Bilal, S. Khan et al. // Scientific reports. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 3305.

139. Dias, D.A. Current and Future Perspectives on the Structural Identification of Small Molecules in Biological Systems / D. A. Dias, O. H. Jones, D. J. Beale // Metabolites. – 2016. – Т. 6. – №. 4. – С. 46.

140. Веремейчик, Я. В. Структурная идентификация сульфонамидов методами ИК и ЯМР спектроскопии / Я. В. Веремейчик, Д. Н. Шурпик, В. В. Племенков, Г. С. Куприянова // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Серия: Физико-математические и технические науки. – 2013. – №. 4. – С. 52-57.

141. Колоколова, Т. Н. Метаболический анализ биологических жидкостей человека с помощью спектроскопии ЯМР / Т. Н. Колоколова, О. Ю. Савельев, Н. М. Сергеев // Журнал аналитической химии. – 2008. – Т. 63. – №. 2. – С. 118-136.

142. Колотова, Н. В Синтез и биологическая активность монозамещенных гидразидов итаконовой и диметилмалеиновой кислот / Н. В. Колотова, А. В. Старкова, С. В. Чащина // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2016. – №. 3. – С. 15-23.

143. Дубровин, А. Н. Поиск биологически активных веществ среди 2-замещенных хинолин-4-карбоновых кислот / А. Н. Дубровин, А. И. Михалёв, Ю. Л. Данилов // Теоретические и прикладные аспекты современной науки. – 2014. – №. 5-2. – С. 37-39.

144. Fordwour, O.B. Wolthers, Active site arginine controls the stereochemistry of hydride transfer in cyclohexanone monooxygenase / O. B. Fordwour, K. R. Wolthers // Archives of biochemistry and biophysics. – 2018. – Т. 659. – С. 47-56.

145. Jeziorowski, S. Poly-gamma-p-Biphenylmethyl-Glutamate as Enantiodifferentiating Alignment Medium for NMR Spectroscopy with Temperature-

Tunable Properties / S. Jeziorowski, C. M. Thiele // Chemistry–A European Journal. – 2018. – Т. 24. – №. 58. – С. 15631-15637.

146. Li, P. Identification of polyunsaturated triacylglycerols and CC location isomers in sachal oil by photochemical reaction mass spectrometry combined with nuclear magnetic resonance spectroscopy / P. Li, J. Deng, N. Xiao // Food chemistry. – 2020. – Т. 307. – С. 125568.

147. Курковская, Л. Н. Взаимодействие фенолов с овальбумином по данным метода ЯМР / Л. Н. Курковская, И. И. Левина // Журнал структурной химии. – 2009. – Т. 50. – №. 6. – С. 1238-1239.

148. Мамаева, А. А. Разработка алгоритмов для упорядочивания структур белков / А. А. Мамаева, П. О. Тюрина, Л. С. Марченко // Актуальные научные исследования. – 2017. – С. 88-89.

149. Трифонова, О. П. Метаболомное профилирование крови / О. П. Трифонова, П. Г. Лохов, А. И. Арчаков // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60. – №. 3. – С. 281-294.

150. Верная, О. И. Криохимическая модификация диоксида, его активность и токсичность / О. И. Верная, В. П. Шабатин, Т. И. Шабатина [и др.] // Журнал физической химии. – 2017. – Т. 91. – №. 2. – С. 230-233.

151. Dallons, M. New insights about doxorubicin-induced toxicity to cardiomyoblast-derived H9C2 cells and dexrazoxane cytoprotective effect: Contribution of in vitro ¹H-NMR metabolomics / M. Dallons, C. Schepkens, A. Dupuis et al. // Frontiers in pharmacology. – 2020. – Т. 11. – С. 79.

152. Розвидовский А. О. Взаимодействие ароматических антибиотиков и витаминов: ¹H-ЯМР-анализ гетероассоциации никотинамида с антрациклиновыми антиопухолевыми антибиотиками / А. О. Розвидовский, В. П. Евстигнеев, Д. Б. Дэвис // Биофизика. – 2006. – Т. 51. – №. 2. – С. 214-224.

153. Al-Talla, Z. A. Bioequivalence assessment of two formulations of ibuprofen / Z. A. Al-Talla, S. H. Akrawi, L. T. Tolley et al. // Drug Design, Development and Therapy. – 2011. – С. 427-433.

154. Portilla, D. Metabolomic study of cisplatin-induced nephrotoxicity / D. Portilla, S. Li, K. K. Nagothu et al. // *Kidney international*. – 2006. – Т. 69. – №. 12. – С. 2194-2204.
155. Полунина, Т. А. Масс-спектрометрия в медицине и биотехнологии / Т. А. Полунина, М. Н. Киреев, М. Н. Храмченкова [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2013. – №. 5. – С. 112-119.
156. Монахова, Ю. Б. Хемометрические методы в ЯМР-спектроскопическом анализе пищевых продуктов / Ю. Б. Монахова, Т. Кубалла, Д. В. Лакенмаейер // *Журнал аналитической химии*. – 2013. – Т. 68. – №. 9. – С. 837-837.
157. Лебедева, Р. А. Идентификация и количественное определение диацетата бетулина как потенциальной фармацевтической субстанции / Р. А. Лебедева, Д. С. Малыгина // *Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты*. – 2016. – №. 24. – С. 155-160.
158. Singh, S. The application of absolute quantitative ^1H NMR spectroscopy in drug discovery and development / S. Singh, R. Roy // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2016. – Т. 11. – №. 7. – С. 695-706.
159. Абрамович, Р. А. Экспресс-анализ суппозиторий методом количественной спектроскопии ЯМР ^1H / Р. А. Абрамович, С. А. Ковалева С. А. Горяинов [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2012. – Т. 57. – №. 5-6. – С. 3-6.
160. Walker, G.S. Biosynthesis of drug metabolites and quantitation using NMR spectroscopy for use in pharmacologic and drug metabolism studies / G. S. Walker, J. N. Bauman, T. F. Ryder et al. // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2014. – Т. 42. – №. 10. – С. 1627-1639.
161. Тринеева, О. В. Методы контроля качества аминокислот в фармацевтическом анализе / О. В. Тринеева // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2015. – №. 2. – С. 120-140.
162. Khandelwal, P. Pharmacokinetics of 40 kDa PEG in rodents using high-field NMR spectroscopy / P. Khandelwal, L. Zhang, A. Chimalakonda et al. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2019. – Т. 171. – С. 30-34.

163. Золотарев, Ю. А. Количественный анализ пептида hldf-6-амида и его метаболитов в тканях лабораторных животных с использованием их меченных тритием и дейтерием производных / Ю. А. Золотарев, А. К. Дадаян, Н. В. Кост [и др.] // Биоорганическая химия. – 2015. – Т. 41. – №. 6. – С. 644-644.

164. Sachse, D. Urine NMR metabolomics analysis of breastfeeding biomarkers during and after pregnancy in a large prospective cohort study / D. Sachse, A. Bærug, L. Sletner et al. // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. – 2014. – Т. 74. – №. 3. – С. 264-272.

165. Bashir, S. Rapid and sensitive discrimination among carbapenem resistant and susceptible E. coli strains using Surface Enhanced Raman Spectroscopy combined with chemometric tools / S. Bashir, H. Nawaz, M. I. Majeed // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2021. – Т. 34. – С. 102280.

166. Bashir, S. Surface-enhanced Raman spectroscopy for the identification of tigecycline-resistant E. coli strains / S. Bashir, H. Nawaz, M. I. Majeed et al. // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2021. – Т. 258. – С. 119831.

167. Криставчук, О. В. Иммобилизация наночастиц серебра, полученных электроискровым методом, на поверхности трековых мембран / О. В. Криставчук, И. В. Никифоров, В. И. Кукушкин [и др.]// Коллоидный журнал. – 2017. – Т. 79. – №. 5. – С. 596-605.

168. Хлебцов, Н. Г. Синтез, оптические свойства и биомедицинские применения металлических и композитных многофункциональных наночастиц с контролируемыми параметрами плазмонного резонанса и поверхностной функционализации молекулами-зондами / Н. Г. Хлебцов, Л. А. Дыкман, Б. Н. Хлебцов [и др.]// Вестник Российского фонда фундаментальных исследований. – 2014. – №. 4. – С. 18-33.

169. Tao, Y. Metabolic-activity-based assessment of antimicrobial effects by D2O-labeled single-cell Raman microspectroscopy / Y. Tao, Y. Wang, S. Huang et al. // Analytical Chemistry. – 2017. – Т. 89. – №. 7. – С. 4108-4115.

170. Honda, K. On-tissue polysulfide visualization by surface-enhanced Raman spectroscopy benefits patients with ovarian cancer to predict post-operative chemosensitivity / K. Honda, T. Hishiki, S. Yamamoto et al. // *Redox Biology*. – 2021. – Т. 41. – С. 101926.

171. Pocock, S. J. A score for predicting risk of death from cardiovascular disease in adults with raised blood pressure, based on individual patient data from randomised controlled trials / S. J. Pocock, V. McCormack, F. Gueyffier et al. // *Bmj*. – 2001. – Т. 323. – №. 7304. – С. 75-81.

172. Zyubin, A. Spectral homogeneity of human platelets investigated by SERS / A. Zyubin, V. Rafalskiy, M. Lopatin et al. // *Plos one*. – 2022. – Т. 17. – №. 5. – С. e0265247.

173. Лабунец, Л. В. Рекуррентные статистики нестационарных временных рядов / Л. В. Лабунец, Н. Л. Лабунец, М. Ю. Чижов // *Радиотехника и электроника*. – 2011. – Т. 56. – №. 12. – С. 1468-1489.

174. Xu, D. Baseline correction method based on doubly reweighted penalized least squares / D. Xu, S. Liu, Y. Cai, C. Yang // *Applied optics*. – 2019. – Т. 58. – №. 14. – С. 3913-3920.

175. Rozov, S. Machine Learning and Deep Learning methods for predictive modelling from Raman spectra in bioprocessing / S. Rozov // *arXiv preprint arXiv:2005.02935*. – 2020.

176. Kursa, M.B. Feature selection with the Boruta package / M. B. Kursa, W. R. Rudnicki // *Journal of statistical software*. – 2010. – Т. 36. – С. 1-13.

177. Курочкин, И. Н. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния в развитии биоаналитических методов / И. Н. Курочкин, А. В. Еременко, А. Д. Васильева [и др.] // *Фотон-экспресс*. – 2023. – №. 6 (190). – С. 113-114.

178. Колесникова, И. М. Установление границ нормальных значений для метода потоковой агрегатометрии тромбоцитов / И. М. Колесникова, Е. В. Ройтман // *Молекулярная диагностика 2017 : сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва, 18–20 апреля 2017 года. Том 2*. – Москва: ООО фирма «Юлис», 2017. – С. 264. Колоколова, Т. Н.

Количественное определение концентраций метаболитов в моче человека методом спектроскопии ЯМР ^1H / Т. Н. Колоколова, Н. М. Сергеев, А. Ю. Корольков // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54. – №. 2. – С. 223-235.

179. Пантелеев, М. А Свертывание крови: биохимические основы / М. А. Пантелеев, Ф. И. Атауллаханов // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2008. – Т. 1. – №. 1. – С. 50-62.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1. Выявление различных веществ по ключевым пикам на КРС-спектре сложной смеси. А. Комбинационное рассеяние (2) после облучения лазером (1) сложной смеси (4) биологических молекул (5) на подложке (3). Б. Спектр КР, отдельные пики позволяют идентифицировать наличие в сложной смеси определенные молекулы (5) [24].....	32
Рисунок 2. Спектры рассеяния тромбоцитов периферической крови. А. Сравнение КРС и ГКРС спектров рассеяния тромбоцитов человека. Б. ГКРС спектр рассеяния тромбоцита здорового добровольца [24].....	33
Рисунок 3. Воздействие внешнего магнитного поля на протоны. А. Протоны при отсутствии внешнего поля, Б. Протоны во внешнем магнитном поле.....	34
Рисунок 4. Схема получения ¹ H ЯМР-спектра. ¹ H ЯМР-спектр этилацетата, полученный с помощью спектрометра Varian 400-MR.....	34
Рисунок 5. Используемые для получения ГКРС-спектров тромбоцитов наноструктурированные золотыми частицами титановые поверхности. Изображение получено методом сканирующей электронной микроскопии.....	50
Рисунок 6. Оптическое изображение тромбоцитов на титановой поверхности (а) и (б) характерный ГКРС-спектр тромбоцита периферической крови пациента.....	51
Рисунок 7. Схема статистического анализа гомогенности тромбоцитов.....	55
Рисунок 8. Схема пробоподготовки образцов венозной крови для выделения тромбоцитов и дальнейшего исследования методом КРС и ГКРС-спектроскопии. 1- метод № 1, 2 – метод № 2.....	58
Рисунок 9. Фотографии тромбоцитов, полученные с помощью оптического микроскопа Vx 47 Olympus с использованием объектива Olympus 100X.....	59
Рисунок 10. Сравнение ГКРС-спектров тромбоцитов здорового добровольца.....	60
Рисунок 11. Получение КРС и ГКРС спектров рассеяния тромбоцитов периферической крови А. КРС-спектр рассеяния тромбоцита здорового	

добровольца, Б. ГКРС спектр рассеяния тромбоцита здорового добровольца.....	61
Рисунок 12. Спектры рассеяния тромбоцитов периферической крови.....	62
Рисунок 13. А. ГКРС – спектры тромбоцитов, Б. Трехмерный график РСА-анализа ГКРС-спектров тромбоцитов.....	63
Рисунок 14. Совокупная дисперсия набора данных ГКРС-спектров (А) и значение процентной дисперсии (Б).....	64
Рисунок 15. Распределение расстояний Махаланобиса для ГКРС-спектров здорового добровольца.....	65
Рисунок 16. Предварительная обработка набора данных ГКРС-спектров.....	65
Рисунок 17. Парная линейная корреляция ГКРС-спектров в пределах одного образца	66
Рисунок 18. Распределение значений матрицы корреляций ГКРС-спектров внутри одной пробы. Гистограмма (А) и диаграмма (Б).....	67
Рисунок 19. ГКРС-спектры БТП с парной линейной спектральной корреляцией между образцами	67
Рисунок 20. Распределение значений парной линейной спектральной корреляции. Гистограмма (А) и диаграмма (Б).....	68
Рисунок 21. Матрица несоответствий для тестовых данных спектров тромбоцитов здоровых добровольцев и пациентов с ССЗ.....	69
Рисунок 22. Матрица несоответствий для тестовых данных спектров тромбоцитов здоровых добровольцев, не получающих АП и пациентов с ССЗ.....	72
Рисунок 23. Матрица несоответствий для тестовых данных спектров тромбоцитов здоровых добровольцев, получающих АП и пациентов с ССЗ, получающих АП	74
Рисунок 24. Схема пробоподготовки образцов мочи для дальнейшего исследования методом ^1H ЯМР-спектроскопии.....	85
Рисунок 25. Сравнение участка ^1H -ЯМР-спектра образцов мочи с	

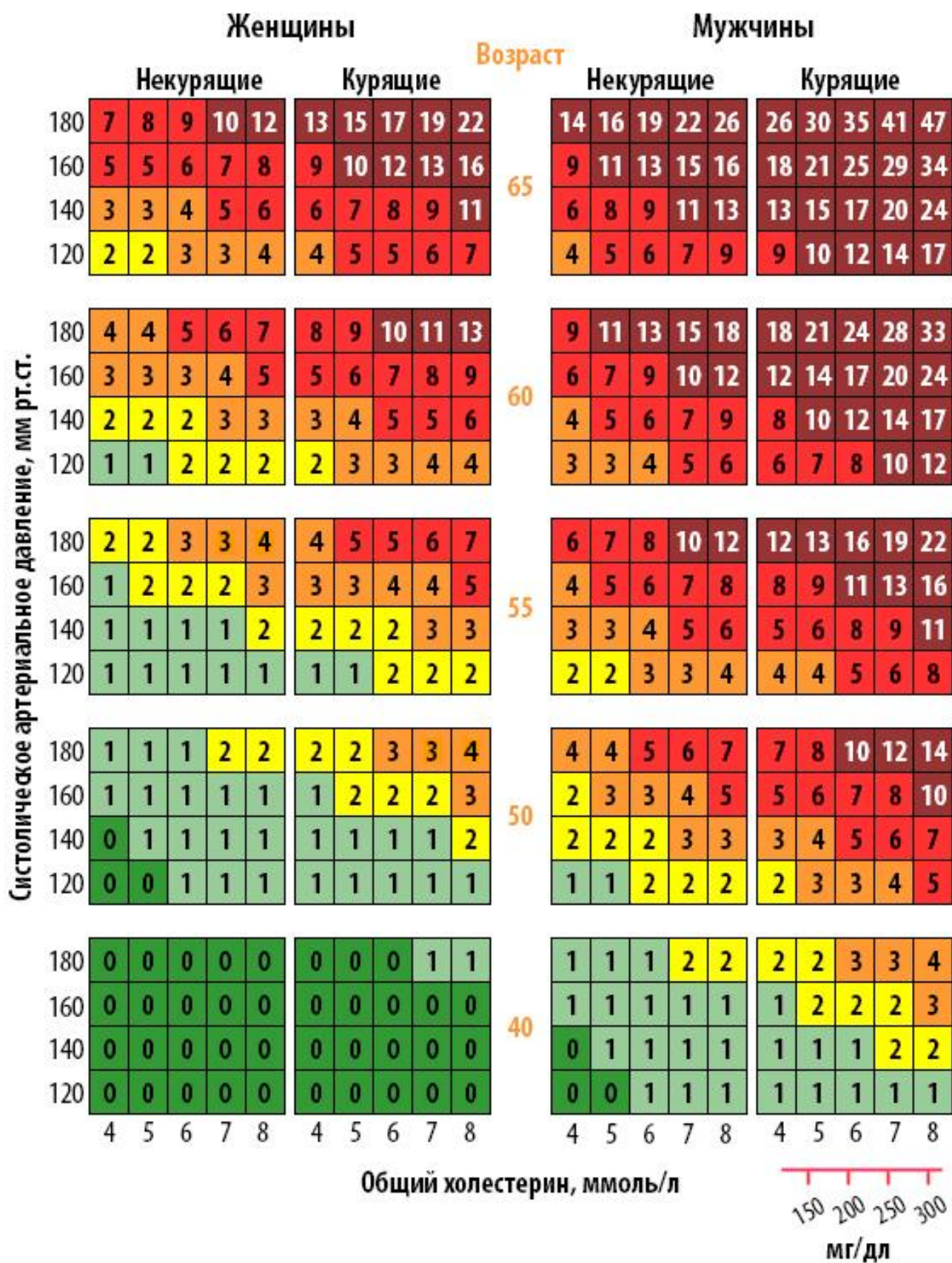
доведением pH до 7,2–7,4, полученных методикой без фильтрации образца (выделено красным) и методикой с фильтрацией образца (выделено голубым).....86

Рисунок 26. ^1H ЯМР-спектры мочи здорового добровольца, собранные до (красный) и через 2 часа после приема 3000 мг АСК (зеленый).....87

Рисунок 27. Спектр ^1H ЯМР образца мочи здорового добровольца, полученные до (оранжевый) и через 4 часа после приема 300 мг АСК (синий).....88

Рисунок 28. ^1H ЯМР-спектры мочи добровольцев, собранные до (а) и после приема АСК в дозе 100 мг (б). Образец мочи был собран через 4 часа после приема АСК для добровольцев №1 и №2 и через 3 часа для добровольца №2.....89

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Суммарный риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний в ближайшие 10 лет (Шкала SCORE)



ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Рабочая таблица. Сравнение интенсивностей ГКР-спектров тромбоцитов периферической крови, полученных на разных значениях частотных сдвигов в разных группах

	Группа 1 (n=385)		Группа 2 (n=126)		Группа 3 (n=407)		Группа 4 (n=348)		1 vs 2		3 vs 4		1 vs 3	
	CP	CTOШCP	10511	CTOШCP	CP	CTOШCP	CP	CTOШCP	t, p<0.05	t, p<0.05	t, p<0.05	t, p<0.05		
4C														
420	10173	408	8911	416	14986	582	14958	664	0,09418673	0,974778092	3,88E-11			
430	10160	409	8895	419	14963	582	14940	665	0,09420093	0,97907697	4,53E-11			
485	10255	415	8954	423	13499	587	15403	674	0,08958611	0,03365817	8,60984E-06			
505	10427	419	8285	426	17553	591	15358	678	0,00511436	0,01634413	0			
605	10508	430	9138	440	15386	599	15539	689	0,08442186	0,86663766	9,93E-11			
615	10573	432	9175	440	15454	601	15622	691	0,08001573	0,82700662	1,16E-10			
720	10970	442	9486	452	15844	610	16155	703	0,06958374	0,77006237	2,52E-10			
805	11220	457	9670	471	16255	626	16588	722	0,06642775	0,72596142	2,09E-10			
955	12973	498	11328	526	18344	682	18783	775	0,07483153	0,67000885	4,87E-10			
960	12941	499	11307	528	18309	682	18759	776	0,07742994	0,66245758	5,21E-10			
970	12820	497	11174	528	18196	681	18671	777	0,07436666	0,64448623	4,44E-10			
975	12818	497	11152	527	18226	681	18713	778	0,0707551	0,63610275	3,58E-10			
980	12907	498	11198	528	18379	685	18871	782	0,06442063	0,78654336	6,29E-11			
990	13660	509	11891	548	23181	705	19853	798	0,00080702	0,00437526	0			
1040	12962	500	11248	532	18191	682	18710	777	0,06461913	0,61408564	1,39E-09			
1400	13460	549	11653	583	18924	721	19561	815	0,07576097	0,5576601	3,35E-09			
1410	13479	548	11664	589	18940	720	19564	814	0,07418492	0,56445661	3,28E-09			
1465	14261	555	12207	590	17151	727	19841	815	0,04538113	0,01065724	0,001682436			
1535	14229	586	12650	686	19376	743	19880	831	0,15060514	0,51145859	4,15E-11			
1540	13837	572	12054	648	19012	735	19598	828	0,09544747	0,59554177	7,59E-10			
1590	13205	562	11341	594	18592	724	19299	822	0,07348959	0,51730059	7,90E-09			

**ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Рабочая таблица. Коэффициенты корреляции между
интенсивностями ГКР-спектров тромбоцитов периферической крови и
параметрами агрегации тромбоцитов, полученных с использованием разных
картриджей системы PFA-200**

	Все группы (1,2,3,4)			1 группа N=13			2 группа N=7			3 группа N=40			4 группа N=40		
ЧС	Coll/ADP сек	Coll/Epi сек	P2Y сек	Coll/ADP сек	Coll/Epi сек	P2Y сек	Coll/ADP сек	Coll/Epi сек	P2Y сек	Coll/ADP сек	Coll/Epi сек	P2Y сек	Coll/ADP сек	Coll/Epi сек	P2Y сек
420	0.048032	0.013416	0.310134	-0.306372	-0.344848	-0.055752	-0.851069	-0.504808	-0.768871	-0.111456	-0.132883	0.310587	0.142236	0.105160	0.381818
430	0.047704	0.012992	0.309878	-0.305946	-0.344889	-0.056606	-0.852558	-0.502646	-0.765756	-0.112178	-0.132943	0.310140	0.142703	0.104735	0.382268
485	0.048681	0.013467	0.312257	-0.310376	-0.343604	-0.059331	-0.848163	-0.499139	-0.766783	-0.114785	-0.135837	0.310048	0.147388	0.108751	0.387259
505	0.048682	0.014064	0.312937	-0.312735	-0.343629	-0.059927	-0.848985	-0.497243	-0.770592	-0.115477	-0.135079	0.309146	0.148220	0.109489	0.389023
605	0.049082	0.014239	0.314785	-0.313506	-0.338090	-0.067154	-0.860458	-0.487291	-0.765111	-0.119900	-0.138676	0.309617	0.154061	0.114689	0.393504
615	0.049225	0.014491	0.314995	-0.315169	-0.338163	-0.067047	-0.858328	-0.484591	-0.766467	-0.120358	-0.138797	0.308739	0.154672	0.114905	0.394306
720	0.048653	0.016638	0.318294	-0.315210	-0.333665	-0.064898	-0.878544	-0.436187	-0.796154	-0.125873	-0.142107	0.308843	0.157264	0.120312	0.399170
805	0.052257	0.020117	0.321403	-0.312579	-0.330902	-0.068672	-0.869827	-0.395630	-0.806293	-0.123738	-0.141918	0.309154	0.158719	0.122252	0.403720
955	0.053559	0.028217	0.324561	-0.306057	-0.322895	-0.059761	-0.884297	-0.293461	-0.867700	-0.121902	-0.136593	0.304508	0.148820	0.117703	0.404438
960	0.053460	0.028894	0.324808	-0.303248	-0.320746	-0.059864	-0.890237	-0.285855	-0.866061	-0.123191	-0.136614	0.305604	0.149633	0.119092	0.404217
970	0.053923	0.029046	0.324683	-0.301844	-0.319547	-0.060996	-0.889941	-0.279214	-0.862878	-0.122907	-0.137391	0.306429	0.150260	0.120346	0.403418
975	0.055187	0.029173	0.324363	-0.303271	-0.320488	-0.061957	-0.882576	-0.273729	-0.862716	-0.120481	-0.137147	0.305201	0.150192	0.119484	0.403644
980	0.055971	0.028305	0.323754	-0.304592	-0.321914	-0.062348	-0.876135	-0.266536	-0.864571	-0.117635	-0.138589	0.303685	0.148150	0.117531	0.402948
990	0.060746	0.030599	0.323193	-0.312779	-0.331545	-0.060380	-0.826942	-0.263530	-0.877065	-0.104935	-0.135777	0.294151	0.140091	0.111141	0.404448
1040	0.054367	0.028248	0.324257	-0.307071	-0.320495	-0.067998	-0.889596	-0.278468	-0.857088	-0.122024	-0.138328	0.305295	0.151998	0.121229	0.404115
1400	0.059492	0.021467	0.315219	-0.307731	-0.313288	-0.086197	-0.857280	-0.354437	-0.793764	-0.102308	-0.132353	0.294743	0.146808	0.104708	0.399002
1410	0.059791	0.020449	0.314651	-0.308828	-0.313697	-0.088423	-0.861505	-0.365616	-0.791815	-0.101649	-0.133408	0.292949	0.148288	0.105685	0.400324
1465	0.055538	0.018451	0.311040	-0.302901	-0.308658	-0.084330	-0.903743	-0.376792	-0.802153	-0.103453	-0.131575	0.290563	0.143149	0.104089	0.394998
1535	0.054443	0.017188	0.310178	-0.274492	-0.296998	-0.093608	-0.862738	-0.378767	-0.772342	-0.102542	-0.129755	0.295876	0.133345	0.093466	0.390777
1540	0.057764	0.018988	0.312351	-0.287834	-0.302571	-0.094474	-0.848982	-0.371624	-0.765617	-0.100486	-0.131119	0.296815	0.140187	0.100240	0.394726
1590	0.061233	0.021042	0.312334	-0.302257	-0.306067	-0.092801	-0.832557	-0.341870	-0.756548	-0.096757	-0.129145	0.295436	0.148463	0.106576	0.398007

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Опросник Мориски-Грина.

Уважаемый пациент!

Внимательно прочитайте предложенные вопросы и выберите один вариант ответа, поставив галочку в соответствующем окне. Старайтесь отвечать честно.

№	Вопрос	Да (0)	Нет (1)
1	Забывали ли Вы когда-либо принять препараты?		
2	Относитесь ли Вы иногда невнимательно к часам приема лекарств?		
3	Не пропускаете ли Вы прием препаратов, если чувствуете себя хорошо?		
4	Если Вы чувствуете себя плохо после приема лекарств, не пропускаете ли Вы следующий прием?		

Итоговый балл: _____