

Новые фармакогенетические маркеры риска кровотечений на фоне применения прямых оральных антикоагулянтов

Карин Бадавиевич Мирзаев^{1*}, Дмитрий Владимирович Иващенко¹, Илья Владимирович Володин^{1,2}, Елена Анатольевна Гришина¹, Кристина Анатольевна Акмалова¹, Анастасия Алексеевна Качанова¹, Алена Игоревна Скрипка³, Радик Мисхатович Миннигулов³, Татьяна Евгеньевна Морозова³, Ольга Александровна Батурина³, Александр Николаевич Леванов⁴, Татьяна Владимировна Шелехова⁴, Алексей Игоревич Калинин², Дмитрий Александрович Напалков³, Анастасия Андреевна Соколова³, Денис Анатольевич Андреев³, Игорь Николаевич Сычев¹, Павел Олегович Бочков¹, Дмитрий Алексеевич Сычев¹

¹ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Россия, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1 стр. 1

² Медико-Генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова Россия, 115522, Москва, ул. Москворечье, 1

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет). Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8 стр. 2

⁴ Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Россия, 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112

Цель. Проведение поиска новых фармакогенетических биомаркеров риска кровотечений на фоне применения ривароксабана и дабигатрана у пациентов различных нозологических групп: фибрилляция предсердий, эндопротезирование крупных суставов нижних конечностей.

Материал и методы. В исследование было включено 29 пациентов (17 пациентов получали дабигатран и 12 – ривароксабан) из реальной клинической практики, имеющих геморрагические осложнения на фоне применения различных прямых оральных антикоагулянтов. С целью поиска новых фармакогенетических биомаркеров риска кровотечений были использованы методы секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) по отобранным генам-кандидатам.

Результаты. В группе пациентов с кровотечениями, получавших дабигатран, статистически значимое отклонение от популяционных значений показали 13 вариантов нуклеотидной последовательности: 11 по гену *CES1*, и 2 по гену *ABCB1*. В группе ривароксабана, значимые отклонения показали 7 вариантов нуклеотидной последовательности: 4 в гене *ABCG2*, 2 в гене *CYP3A4* и 1 в гене *ABCB1*.

Заключение. Выявленные в настоящем исследовании полиморфные варианты генов-кандидатов *ABCB1*, *ABCG2*, *CES1*, *CYP3A4*, ассоциированные с риском кровотечений на фоне приема ривароксабана и дабигатрана, вносят важный вклад в изучение фармакогенетики прямых оральных антикоагулянтов и требуют дополнительной оценки клинической значимости в более крупных исследованиях.

Ключевые слова: дабигатран, ривароксабан, фармакогенетика, прямые оральные антикоагулянты, секвенирование, персонализированная медицина.

Для цитирования: Мирзаев К.Б., Иващенко Д.В., Володин И.В., Гришина Е.А., Акмалова К.А., Качанова А.А., Скрипка А.И., Миннигулов Р.М., Морозова Т.Е., Батурина О.А., Леванов А.Н., Шелехова Т.В., Калинин А.И., Напалков Д.А., Соколова А.А., Андреев Д.А., Сычев И.Н., Бочков П.О., Сычев Д.А. Новые фармакогенетические маркеры риска кровотечений на фоне применения прямых оральных антикоагулянтов. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии* 2020;16(5):670-677. DOI:10.20996/1819-6446-2020-10-05

New Pharmacogenetic Markers to Predict the Risk of Bleeding During Taking of Direct Oral Anticoagulants

Karin B. Mirzaev^{1*}, Dmitriy V. Ivashchenko¹, Ilya V. Volodin^{1,2}, Elena A. Grishina¹, Kristina A. Akmalova¹, Anastasia A. Kachanova¹, Alena I. Skripka³, Radik M. Minnigulov³, Tatiana E. Morozova³, Olga A. Baturina³, Alexander N. Levanov⁴, Tatiana V. Shelekhova⁴, Alexey I. Kalinkin², Dmitriy A. Napalkov³, Anastasia A. Sokolova³, Denis A. Andreev³, Igor N. Sychev¹, Pavel O. Bochkov¹, Dmitriy A. Sychev¹

¹ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. Barrikadnaya ul. 2/1-1, Moscow, 125993 Russia

² Research Centre for Medical Genetics. Moskvorechiye ul. 1, Moscow, 115522 Russia

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). Trubezkaya ul. 8-2, Moscow, 119991 Russia

⁴ Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky. Bolshaya Kazachya ul. 112, Saratov, 410012 Russia

Aim. To search for new pharmacogenetic biomarkers of bleeding risk in patients taking rivaroxaban and dabigatran for different indications: atrial fibrillation, endoprosthesis of large joints of lower limbs.

Material and methods. The study enrolled 29 patients (17 patients received dabigatran and 12 – rivaroxaban), who had hemorrhagic complications during taking direct oral anticoagulants. To find new pharmacogenetic biomarkers of bleeding risk, a next generation sequencing (NGS) was performed for selected candidate genes.

Results. Among the patients with bleeding who received dabigatran, 13 variants of the nucleotide sequence showed statistically significant deviation from the population values: 11 in the *CES1* gene and 2 in the *ABCB1* gene. Among the patients with bleeding who received rivaroxaban, 7 variants

of nucleotide sequence showed significant deviation: 4 in the *ABCG2* gene, 2 in the *CYP3A4* gene, and 1 in the *ABCB1* gene.

Conclusion. The identified in this study polymorphisms of candidate genes *ABCB1*, *ABCG2*, *CES1*, *CYP3A4* were associated with the risk of bleeding in patients taking rivaroxaban and dabigatran. It makes an important contribution to the pharmacogenetics of direct oral anticoagulants and require additional assessment of clinical significance in further studies.

Keywords: dabigatran, rivaroxaban, pharmacogenetics, direct oral anticoagulants, sequencing, personalized medicine.

The full English version of the article is available on the journal website: www.rpcardio.com

For citation: Mirzaev K.B., Ivashchenko D.V., Volodin I.V., Grishina E.A., Akmalova K.A., Kachanova A.A., Skripka A.I., Minnigulov R.M., Morozova T.E., Baturina O.A., Levanov A.N., Shelekhova T.V., Kalinkin A.I., Napalkov D.A., Sokolova A.A., Andreev D.A., Sychev I.N., Bochkov P.O., Sychev D.A. New Pharmacogenetic Markers to Predict the Risk of Bleeding During Taking of Direct Oral Anticoagulants. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2020;16(5):670-677. DOI:10.20996/1819-6446-2020-10-05

*Corresponding Author (Автор, ответственный за переписку): karin05doc@yandex.ru

Received/Поступила: 31.07.2020

Accepted/Принята в печать: 12.08.2020

Прямые оральные антикоагулянты (ПОАК: дабигатран, ривароксабан, аписабан, эдоксабан) в настоящее время широко применяются для профилактики системных тромбоэмболических осложнений у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий (ФП), для профилактики тромбоэмболических осложнений после эндопротезирования коленного и тазобедренного сустава, а также лечения тромбоза глубоких вен нижних конечностей (ТГВ) и тромбоза легочной артерии (ТЭЛА). Так, в США с 2011 по 2014 гг. назначение ривароксабана выросло с 0,13% до 13,87%, а дабигатрана – с 1,3% до 7,6% [1]. Доля ПОАК среди пероральных антикоагулянтов в 2017-2018 гг. составила 56,5% в Великобритании и 31% – в США [2,3]. В том же 2018 г. ривароксабан и аписабан вошли в топ-10 самых продаваемых лекарственных средств в США: 10 и 2 место, соответственно [4].

Рост потребления ПОАК, имеющих ряд преимуществ по сравнению с варфарином (более быстрое начало действия, отсутствие необходимости рутинного контроля фармакодинамического ответа, предсказуемая фармакокинетика, фиксированные дозы и др.), ассоциирован с неизбежным ростом наиболее частого неблагоприятного побочного эффекта при применении данных препаратов – кровотечений, в том числе, требующих неотложной медицинской помощи [5]. Например, в Великобритании на каждые 10% роста назначения ПОАК врачами общей практики относительно остальных антикоагулянтов наблюдалось увеличение числа геморрагических осложнений на 0,9% [5]. При этом с началом применения ПОАК в этой стране с 2011 по 2016 гг. наблюдалось 4929 дополнительных случаев экстренной госпитализации по поводу геморрагических осложнений при антикоагулянтной терапии [5].

В вариабельность фармакологического ответа на ПОАК вносят вклад различные клиническо-демографические (возраст, нарушение функции почек, расо-

вая и этническая принадлежность, пол, курение, межлекарственные взаимодействия, диета и др.) и генетические факторы (полиморфизм генов, кодирующих изоферменты цитохрома P-450 и транспортеры лекарственных средств и др.). При этом, несмотря на стремительный рост назначения ПОАК и увеличение геморрагических осложнений на фоне терапии, особенности фармакогенетики ПОАК остаются недостаточно изученными [6]. На сегодняшний день имеется ограниченное количество фармакогенетических исследований связи полиморфизма генов системы транспорта и метаболизма лекарственных средств (ADME) с ответом на ПОАК: выявлены единичные одонуклеотидные полиморфизмы генов *CES1* и *ABCB1*, влияющие на фармакокинетические параметры и клинические исходы на фоне дабигатрана, и одонуклеотидные полиморфизмы гена *ABCB1*, влияющие на фармакокинетические параметры ривароксабана и аписабана [7]. В то же время отмечается существенная нехватка исследований по поиску новых генетических биомаркеров путем секвенирования генома (экзомное, полногеномное) или отдельных генов-кандидатов у пациентов с неудовлетворительным ответом и геморрагическими осложнениями на фоне ПОАК.

Целью настоящего исследования являлось проведение поиска новых фармакогенетических биомаркеров риска кровотечений на фоне применения ривароксабана и дабигатрана у пациентов различных нозологических групп: ФП, эндопротезирование крупных суставов нижних конечностей.

Материал и методы

От всех участников исследования получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования.

Пациенты

В исследование было включено 29 пациентов (17 пациентов получали дабигатран и 12 – ривароксабан) из реальной клинической практики с геморрагическими осложнениями, относящимися к 2-3 типу кровотечений по шкале BARC (Bleeding Academic Research Consortium). Набор участников исследования осуществлялся на клинических базах двух учреждений: Сеченовский Университет и Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского. Количество пациентов мужского пола составило 35,2% в группе дабигатрана и 75% – в группе ривароксабана. Медиана возраста составила 72,5 [45;86] 71 [40;87] лет в исследуемых группах дабигатрана и ривароксабана, соответственно. Характеристика особенностей демографических, клинических и лабораторных признаков представлена в табл. 1.

Table 1. Characteristics of the study participants

Таблица 1. Характеристика исследуемой популяции

Признак	Дабигатран (n=17)	Ривароксабан (n=12)
Мужчины, n (%)	6 (35,2)	9 (75)
Возраст, лет	72,5 [45;86]	71 [40;87]
Концентрация ПОАК, нг/мл	144,25 [36;800]	60,1 [24;243]
CHA ₂ DS ₂ -VASc, баллы	4 [3;7]	4,5 [3;8]
HAS-BLED, баллы	1 [0;2]	3 [1;6]
Гемоглобин, г/л	137 [99;167]	125,5 [73;161]
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	184 [116;246]	Нет данных
Тромбоцитопения, n (%)	2 (11,7)	0 (0,0)
СКФ, мл/мин/1,73 м ²	53,5 [31;101]	50,5 [16;90]
Доза ПОАК, мг/сут	110 [110;220]	15 [10;15]
Фибрилляция предсердий, n (%)	12 (70,6)	10 (83,3)
Эндопротезирование суставов нижних конечностей (гонартроз, коксартроз), n (%)	5 (29,4)	2 (16,7)
Данные указаны в виде Ме [25%;75%], если не указано иное		
ПОАК – прямые оральные антикоагулянты, СКФ – скорость клубочковой фильтрации		

Обоснование выбора генов-кандидатов для секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS)

Исходная выборка пациентов была подразделена на две группы: а) пациенты, получавшие дабигатран (n=17); б) пациенты, получавшие ривароксабан (n=12). В каждой группе был проведен поиск потенциально значимых вариантов в таргетных для препаратов генах. По данным проведенного поиска литературы на специализированном ресурсе PharmGKB [8] и известным фармакокинетическим особенностям из-

учаемых ПОАК из официальной инструкции [9] для поиска новых фармакогенетических маркеров были отобраны: гены *ABCB1* и *CES1* для дабигатрана, *ABCB1*, *ABCG2* и *CYP3A4* – для ривароксабана. Ген *ABCB1* кодирует Р-гликопротеин или белок множественной лекарственной устойчивости, субстратом которого является как ривароксабан, так и дабигатран [10]. На фармакокинетику ривароксабана также может оказывать влияние другой транспортер – *ABCG2*, который кодирует белок резистентности к терапии рака молочной железы (BCRP) [10]. Ген *CES1* кодирует карбоксилэстеразу-1, участвующую в метаболизме дабигатрана с образованием дабигатрана этаксилата. И, наконец, ген *CYP3A4* кодирует изофермент системы цитохрома Р-450 – *CYP3A4*, субстратом которого является ривароксабан [10].

Выделение ДНК. ДНК выделяли из образцов цельной периферической венозной крови пациентов методом селективной преципитации с использованием высоких концентраций солей («высаливание»).

Секвенирование. Скрининг мутаций у пациентов проводился методом высокопроизводительного полупроводникового параллельного секвенирования ДНК с использованием прибора Ion S5 (Thermo Fisher). В процессе пробоподготовки использовали стандартный протокол приготовления библиотек AmpliSeq (ThermoFisher) с помощью набора реагентов Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 и пользовательской панели праймеров, включающей в себя экзоны и прилегающие к ним интронные участки генов *ABCB1*, *ABCG2*, *CES1*, *CYP3A4*, а также их 5'- и 3'-некодирующие участки.

Анализ результатов секвенирования был проведен с использованием следующего программного обеспечения:

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

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

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

Для определения потенциально значимых вариантов для каждого найденного варианта встречаемость в исследуемой группе сравнивалась со встречаемостью в выборке 15708 полных геномов здоровых людей,

отсеквенированных методом NGS, из базы данных GnomAD [11]. Значение *p-value* было рассчитано с использованием χ^2 -квadrat с поправкой на непрерывность (программа Statistica), в качестве поправки на множественность тестирования использовалась поправка FDR.

Измерение концентраций ривароксабана и дабигатрана в плазме

Определение концентрации ривароксабана и дабигатрана в крови проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием. Пробы анализировали на жидкостном хроматографе Agilent 1200 (в составе четырехканальный насос, дегазатор подвижной фазы, термостат хроматографических колонок). В работе использовалась колонка Agilent Extend-C18 (длина – 100 мм; внутренний диаметр – 2,1 мм; зернение – 3,5 мкм). Разделение проводили при температуре колонки 40°C. Подвижная фаза: раствор «А» (50 мл 0,1 М раствора ацетата аммония и 5 мл муравьиной кислоты разбавляли деионизованной водой до общего объема 1 л) и раствор «Б» (50 мл 0,1 М раствора ацетата аммония и 5 мл муравьиной кислоты разбавляли ацетонитрилом до общего объема 1 л). Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме элюирования при соотношении компонентов «А»:«Б» 70:30. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,3 мл/мин. Объ-

ем вводимой пробы – 10 мкл. Анализ проводили в течение 7 мин.

В работе использовали масс-спектрометр (тип тройной квадруполь) Agilent Triple Quad LC/MS 6410 с ионизацией электроспреем в режиме положительной ионизации. Регистрацию спектров ривароксабана проводили в режиме множественных молекулярных реакций. Давление газа распылителя – 35 psi. Объемная скорость осушающего газа – 11 л/мин, температура 350°C. Значение напряжения фрагментации составляло 135 В, напряжения на ячейке соударений – 25 В. Пробоподготовку проводили осаждением белков плазмы крови. Образцы плазмы размораживали при комнатной температуре. Далее 100 мкл плазмы переносили в пробирки типа Eppendorf, добавляли 250 мкл смеси метанола с 0,1 % соляной кислотой HCl в соотношении компонентов 9:1, перемешивали на встряхивателе Vortex, оставляли на 10 мин, и перемешивали повторно. Затем полученные образцы центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин. Надосадочный слой переносили в хроматографические виалы и помещали на автосемплер хроматографа.

Результаты Дабигатран

В группе пациентов с кровотечениями, получавших дабигатран, статистически значимое отклонение от популяционных значений показали 13 вариантов нук-

Table 2. Variants, the frequency of which differs significantly among patients with bleeding events during dabigatran therapy and in the general population

Таблица 2. Варианты, частота которых значительно различается среди пациентов с геморрагическими осложнениями на фоне приема дабигатрана и в общей популяции

Ген	Референсный вариант	Альтернативный вариант	Тип замены, расположение	Rs	Частота в настоящей выборке	Частота в GnomAD
ABCB1	A	G	Низлежащая цис-регуляторная область	rs41297348	0,0555	0,0001
ABCB1	T	C	Экзонная, несинонимичная	rs9282564	0,3888	0,0903
CES1	T	C	Экзонная, несинонимичная	rs3826193	0,7222	0,2468
CES1	T	-	В 5'-нетранспируемой области	rs761128900	0,1111	0,0016
CES1	T	C	Интронная	rs375970897	0,0555	0,0
CES1	C	T	Экзонная, несинонимичная	rs3826192	0,7777	0,3202
CES1	G	A	Экзонная, синонимичная	rs3826191	0,7777	0,3298
CES1	C	G	Экзонная, синонимичная	rs3826194	0,7777	0,3548
CES1	C	T	Экзонная, несинонимичная	rs2307240	0,2222	0,0434
CES1	A	G	Интронная	rs62028646	0,7777	0,4055
CES1	G	A	Экзонная, несинонимичная	rs62028647	0,7777	0,4134
CES1	T	C	Экзонная, синонимичная	rs74019278	0,7777	0,4178
CES1	T	C	Экзонная, синонимичная	rs76828834	0,7777	0,4183

Table 3. Parameters of longitudinal left ventricular deformation before and after CABG, depending on the preoperative approach

Таблица 3. Параметры деформации левого желудочка в продольном направлении до и после КШ в зависимости от подхода к предоперационной подготовке

Ген	Референсный вариант	Альтернативный вариант	Тип замены, расположение	Rs	Частота в настоящей выборке	Частота в GnomAD
ABCB1	A	-	Интронная	rs531438597	0,0833	0,0005
ABCG2	A	G	В 3'-нетранслируемой области	rs546230660	0,0833	0,0003
ABCG2	C	T	Экзонная, несинонимичная	rs34783571	0,0833	0,0019
ABCG2	A	G	Интронная	rs2231157	0,7500	0,335
ABCG2	G	C	В 5'-нетранслируемой области	rs55927234	0,0833	0,0026
CYP3A4	C	T	Интронная	Нет данных	0,0833	Нет данных
CYP3A4	C	T	Интронная	rs55808838	0,0833	0,0015

леотидной последовательности (табл. 2). Среди 11 найденных значимых замен по гену *CE1*, 8 (*rs3826193*, *rs761128900*, *rs3826192*, *rs3826191*, *rs3826194*, *rs2307240*, *rs62028647*, *rs74019278*, *rs76828834*) приходятся на экзонную область. При этом 4 из них (*rs3826193*, *rs3826192*, *rs2307240*, *rs62028647*) лежат в функционально значимой области и являются несинонимичными (т.е. приводят к изменению аминокислотной последовательности), и 4 (*rs3826191*, *rs3826194*, *rs74019278*, *rs76828834*) – синонимичными (т.е. не приводят к изменению аминокислотной последовательности). Из оставшихся вариантов нуклеотидной последовательности, найденных в гене *CE1*, 2 (*rs375970897*, *rs62028646*) приходятся на интронную область и 1 находится в 5'-нетранслируемой области (*rs761128900*). Среди найденных значимых замен по гену *ABCB1* 1 (*rs9282564*) находится в экзонной области и является несинонимичной, еще 1 (*rs41297348*) замена находится в низлежащей цис-регуляторной области.

Ривароксабан

В группе пациентов с кровотечениями, получавшей ривароксабан, значимые отклонения показали 7 вариантов нуклеотидной последовательности: 4 в гене *ABCG2*, 2 в гене *CYP3A4* и 1 в гене *ABCB1* (табл. 3).

Среди 4 найденных значимых замен по гену *ABCG2* одна (*rs34783571*) приходится на экзонную область и является несинонимичной. Из оставшихся замен по гену *ABCG2* 1 (*rs2231157*) приходится на интронную область и по 1 находятся в 5'-нетранслируемой области (*rs55927234*) и 3'-нетранслируемой области (*rs546230660*). Варианты, показавшие значимое отклонение от популяционных частот в генах *ABCB1* (*rs531438597*) и *CYP3A4* (*rs55808838*), находятся в интронной области.

В табл. 2 и 3 также представлены частоты носительства найденных вариантов в настоящей выборке пациентов с кровотечениями на фоне приема дабигатрана или ривароксабана и в общей популяции. Прогностическая значимость (повышение риска кровотечений или протективная роль) найденных вариантов будет уточнена в будущих исследованиях на большей выборке пациентов со сравнением полученных данных с пациентами аналогичных клинических групп без кровотечений.

Обсуждение

В текущее исследование были включены пациенты с геморрагическими осложнениями на фоне приема прямых оральных антикоагулянтов: дабигатрана и ривароксабана. Из пациентов, принимающих дабигатран в дозе 110-220 мг 2 р/д только 4 (23,5%) пациента из 17 имели минимальные равновесные концентрации препарата в плазме, превышающие ранее описанные терапевтические границы [12]. Среди пациентов, принимающих ривароксабан в дозе 10-20 мг/сут, выявлено двое (16,6%) с уровнем минимальной равновесной концентрации препарата в плазме выше ранее описанных терапевтические границы. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что «золотой стандарт» – оценка концентрации ПОАК – не является идеальным маркером прогнозирования риска геморрагических осложнений на фоне приема данной группы препаратов, что требует изучения дополнительных маркеров персонализации терапии дабигатраном и ривароксабаном.

Как указывалось выше, дабигатран является субстратом Р-гликопротеина, кодируемого геном *ABCB1*. Кроме того, в фармакокинетике дабигатрана важную роль играет печеночная карбоксилэстераза-1 (*CE1*), кодируемая геном *CE1*, под влиянием которой мета-

болит дабигатрана М2 превращается в активную форму препарата – дабигатранаэтаксилат [13]. В ранее проведенных исследованиях, в том числе, полногеномных ассоциативных исследованиях было выявлено несколько полиморфных вариантов гена *CES1*, ассоциированных с более низкой концентрацией дабигатрана в плазме и снижением риска геморрагических осложнений [14]. Так, носительство минорных аллелей по полиморфному маркеру *rs2244613* гена *CES1* может быть связано со снижением концентрации дабигатрана в плазме и меньшим риском геморрагических осложнений на фоне терапии дабигатраном [14]. Другой однонуклеотидный полиморфизм того же гена *rs8192935* продемонстрировал ассоциацию с минимальной и максимальной концентрацией дабигатрана, но не влиял на риск геморрагических осложнений [14,15]. Ассоциация со снижением скорости активации дабигатрана показана также по полиморфному маркеру *rs71647871* гена *CES1* [13]. Из однонуклеотидных полиморфизмов гена *ABCB1*, которые были ассоциированы с плазменной концентрацией дабигатрана и риском кровотечений на фоне терапии данным препаратом, необходимо выделить *rs4148738*, *rs1045642* и *rs2032582* [14,16,17]. В то же время выявленные в данном исследовании варианты ранее не были описаны как ассоциированные с риском кровотечений на фоне терапии дабигатраном, что требует исследования клинической значимости выявленных вариантов в более крупных исследованиях. При этом полиморфный вариант *rs62028647* показал [18] сильное неравновесное сцепление с ранее хорошо описанным вариантом *rs2244613*, и данные варианты могут быть выделены, как гаплотип.

Полиморфизм генов *ABCB1*, *ABCG2*, кодирующих эффлюксные транспортеры, и полиморфизм гена *CYP3A4*, кодирующего одноименный изофермент системы цитохрома Р-450, могут оказывать существенное влияние на фармакокинетику ривароксабана и риск кровотечений на фоне приема данного препарата. В ранее опубликованных исследованиях было описано 4 однонуклеотидных полиморфизма гена *ABCB1* (*rs2032582*, *rs1045642*, *rs4148738*, *rs1128503*), которые могут быть ассоциированы (преимущественно, в составе гаплотипа) с более высокими плазменными концентрациями ривароксабана и, соответственно, с более высоким риском геморрагических осложнений [17,19,20]. Отдельные аллельные однонуклеотидные полиморфизмы генов *ABCG2* и *CYP3A4*, которые значимо влияют на фармакокине-

тические показатели ривароксабана и риск кровотечений на фоне его приема, не описаны. Выявленные в данном исследовании полиморфные маркеры по генам *ABCB1*, *ABCG2* и *CYP3A4* ранее не были описаны как ассоциированные с риском кровотечений на фоне терапии ривароксабаном, что также требует исследования их клинической значимости в более масштабных исследованиях.

Ограничения исследования

Использованный подход NGS имеет технологические особенности; отобранные по результатам NGS варианты в последующих исследованиях будут подтверждены классическим секвенированием методом Сэнгера после наработки данных на более объемных размерах выборки. Также необходимо отметить, что сильно отличающийся размер сравниваемых выборок вносит дополнительные статистические погрешности и ошибки. Так, варианты, лежащие на краях распределения меньшей из сравниваемых выборок, имеют большую представленность для своей группы, и, соответственно, могут показывать ложную значимость. Это указывает на необходимость подтверждения значимости выявленных замен путем сравнения с сопоставимой по размерам контрольной выборкой.

Заключение

Выявленные в настоящем исследовании полиморфные варианты генов-кандидатов *ABCB1*, *ABCG2*, *CES1*, *CYP3A4*, ассоциированные с риском кровотечений на фоне приема ривароксабана и дабигатрана, вносят важный вклад в изучение фармакогенетики прямых оральных антикоагулянтов и требуют дополнительной оценки клинической значимости в более крупных исследованиях.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Disclosures. All authors have not disclosed potential conflicts of interest regarding the content of this paper.

Financial support: The study was funded by Russian Science Foundation, project №16-15-00227

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, номер проекта 16-15-00227 «Профилактика ятрогенных лекарственных поражений внутренних органов: фармакокинетические и фармакогенетические подходы».

References / Литература

1. Alalwan A.A., Voils S.A., Hartzema A.G. Trends in utilization of warfarin and direct oral anticoagulants in older adult patients with atrial fibrillation. *Am J Health Syst Pharm.* 2017;74(16):1237-44. DOI:10.2146/ajhp160756.
2. Loo S.Y., Dell'Aniello S., Huiart L., et al. Trends in the prescription of novel oral anticoagulants in UK primary care. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;83(9):2096-106. DOI:10.1111/bcp.13299.
3. Ziakas P.D., Kourbeti I.S., Poulou L.S., et al. Medicare part D prescribing for direct oral anticoagulants in the United States: Cost, use and the "rubber effect". *PLoS One.* 2018;13(6):e0198674. DOI:10.1371/journal.pone.0198674.
4. Philippidis A. Top 15 Best-Selling Drugs of 2018: Sales for most treatments grow year-over-year despite concerns over rising prices. *Genetic Engineering & Biotechnology News.* 2019 39(4):16-7.
5. Alfirevic A., Downing J., Daras K., et al. Has the introduction of direct oral anticoagulants (DOACs) in England increased emergency admissions for bleeding conditions? A longitudinal ecological study. *BMJ Open.* 2020;10(5):e033357. DOI:10.1136/bmjopen-2019-033357.
6. Ragia G., Manolopoulos V.G. Pharmacogenomics of anticoagulation therapy: the last 10 years. *Pharmacogenomics.* 2019;20(16):1113-7. DOI:10.2217/pgs-2019-0149.
7. Kanuri S.H., Kreutz R.P. Pharmacogenomics of Novel Direct Oral Anticoagulants: Newly Identified Genes and Genetic Variants. *J Pers Med.* 2019;9(1):7. DOI:10.3390/jpm9010007.
8. Whirl-Carrillo M., McDonagh E.M., Hebert J.M., et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(4):414-7. DOI:10.1038/clpt.2012.96.
9. Russian State Registry of Drugs. [cited by Jul 20, 2020]. Available from: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx> (In Russ.) [Государственный реестр лекарственных средств [цитировано 20.07.2020]. Доступно на: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>.
10. Gong I.Y., Kim R.B. Importance of pharmacokinetic profile and variability as determinants of dose and response to dabigatran, rivaroxaban, and apixaban. *Can J Cardiol.* 2013;29(7 Suppl):S24-S33. DOI:10.1016/j.cjca.2013.04.002.
11. Genome Aggregation Database [cited by Jul 20, 2020]. Available from: <https://gnomad.broadinstitute.org>.
12. Moner-Banet T., Alberio L., Bart P.A. Does One Dose Really Fit All? On the Monitoring of Direct Oral Anticoagulants: A Review of the Literature. *Hamostaseologie.* 2020;40(2):184-200. DOI:10.1055/a-1113-0655.
13. Shi J., Wang X., Nguyen J.H., et al. Dabigatran etexilate activation is affected by the *CE51* genetic polymorphism *G143E (rs71647871)* and gender. *Biochem Pharmacol.* 2016;119:76-84. DOI:10.1016/j.bcp.2016.09.003.
14. Paré G., Eriksson N., Lehr T., et al. Genetic determinants of dabigatran plasma levels and their relation to bleeding. *Circulation.* 2013;127(13):1404-12. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001233.
15. Dimatteo C., D'Andrea G., Vecchione G., et al. Pharmacogenetics of dabigatran etexilate interindividual variability. *Thromb Res.* 2016;144:1-5. DOI:10.1016/j.thromres.2016.05.025.
16. Sychev D.A., Levanov A.N., Shelekhova T.V., et al. The impact of *ABCB1 (rs1045642 and rs4148738)* and *CE51 (rs2244613)* gene polymorphisms on dabigatran equilibrium peak concentration in patients after total knee arthroplasty [published correction appears in *Pharmacogenomics Pers Med.* 2018 Sep 26;11:167]. *Pharmacogenomics Pers Med.* 2018;11:127-37. DOI:10.2147/PGPM.S169277.
17. Gouin-Thibault I., Delavenne X., Blanchard A., et al. Interindividual variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of *ABCB1* genetic polymorphisms and interaction with clarithromycin. *J Thromb Haemost.* 2017;15(2):273-83. DOI:10.1111/jth.13577.
18. Sánchez Pascua T. Carboxylesterase 1 genetic variability, expression and potential for drug-drug interactions. Diss. University of Liverpool, 2014 [cited by Jul 20, 2020]. Available from: https://liverpool.ac.uk/2006752/1/SanchezTer_Sep2014_2006752.pdf.
19. Lorenzini K.I., Daali Y., Fontana P., et al. Rivaroxaban-Induced Hemorrhage Associated with *ABCB1* Genetic Defect. *Front Pharmacol.* 2016;7:494. DOI:10.3389/fphar.2016.00494.
20. Sennesael A.L., Larock A.S., Douxfils J., et al. Rivaroxaban plasma levels in patients admitted for bleeding events: insights from a prospective study. *Thromb J.* 2018;16:28. DOI:10.1186/s12959-018-0183-3.

About the Authors:

Karin B. Mirzaev – MD, PhD, Senior Researcher, Head of Department of Personalized Medicine, Research Institute of Molecular and Personalized Medicine; Associate Professor, Chair of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Dmitriy V. Ivashchenko – MD, PhD, Senior Researcher, Department of Personalized Medicine, Research Institute of Molecular and Personalized Medicine; Associate Professor, Chair of Child Psychiatry and Psychotherapy, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Ilya V. Volodin – Junior Researcher, Department of Molecular Medicine, Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education; Researcher, Laboratory of Epigenetics, Research Centre for Medical Genetics

Elena A. Grishina – PhD (Biology), Associate Professor, Head of Department of Molecular Medicine, Director of Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Kristina A. Akmalova – Researcher, Department of Molecular Medicine, Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Anastasia A. Kachanova – Junior Researcher, Department of Molecular Medicine, Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Alena A. Skripka – MD, Post-Graduate Student, Chair of Faculty Therapy №1, Sechenov University

Radik M. Minnigulov – MD, Post-Graduate Student, Chair of Clinical Pharmacology and Internal Diseases, Sechenov University

Tatiana E. Morozova – MD, PhD, Professor, Head of Chair of General Medical Practice, Sechenov University

Olga A. Baturina – MD, Post-Graduate Student, Chair of Cardiology, Functional and Sonographic Diagnostics, Sechenov University

Alexander N. Levanov – MD, Assistant, Chair of Occupational Diseases, Hematology and Clinical Pharmacology, Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky

Tatiana V. Shelekhova – MD, PhD, Professor, Head of Chair of Occupational Diseases, Hematology and Clinical Pharmacology, Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky

Alexey I. Kalinkin – Researcher, Laboratory of Epigenetics, Research Centre for Medical Genetics

Dmitriy A. Napalkov – MD, PhD, Professor, Chair of Faculty Therapy №1, Sechenov University

Anastasia A. Sokolova – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Faculty Therapy №1, Sechenov University

Denis A. Andreev – MD, PhD, Professor, Head of Chair of Cardiology, Functional and Sonographic Diagnostics, Sechenov University

Igor N. Sychev – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Pavel O. Bochkov – PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Personalized Medicine, Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Dmitriy A. Sychev – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of Chair of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Rector, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education

Сведения об авторах:

Ми́рзаев Ка́рин Бада́виевич – к.м.н., с.н.с., зав. отделом персонализированной медицины, НИИ молекулярной и персонализированной медицины; доцент, кафедра клинической фармакологии и терапии, РМАНПО

Иващенко Дмитрий Владимирович – к.м.н., с.н.с., отдел персонализированной медицины, НИИ молекулярной и персонализированной медицины; доцент, кафедра детской психиатрии и психотерапии, РМАНПО

Володин Илья Владимирович – м.н.с., отдел молекулярной медицины, НИИ молекулярной и персонализированной медицины, РМАНПО; н.с., лаборатория эпигенетики, Медико-Генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова

Гришина Елена Анатольевна – д.б.н., доцент, зав. отделом молекулярной медицины, директор НИИ молекулярной и персонализированной медицины, РМАНПО

Акмалова Кристина Анатольевна – н.с., отдел молекулярной медицины, НИИ молекулярной и персонализированной медицины, РМАНПО

Качанова Анастасия Алексеевна – м.н.с., отдел молекулярной медицины, НИИ молекулярной и персонализированной медицины, РМАНПО

Скрипка Алена Игоревна – аспирант, кафедра факультетской терапии №1, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, Сеченовский Университет

Миннигулов Радик Мисхатович – аспирант, кафедра клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, Сеченовский Университет

Морозова Татьяна Евгеньевна – д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей врачебной практики, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, Сеченовский Университет

Батурина Ольга Александровна – аспирант, кафедра кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, Сеченовский Университет

Леванов Александр Николаевич – ассистент, кафедра профпатологии, гематологии и клинической фармакологии, Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского

Шелехова Татьяна Владимировна – д.м.н., профессор, зав. кафедрой профпатологии, гематологии и клинической фармакологии, Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского

Калинкин Алексей Игоревич – н.с., лаборатория эпигенетики, Медико-Генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова

Напалков Дмитрий Александрович – д.м.н., профессор, кафедра факультетской терапии №1, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, Сеченовский Университет

Соколова Анастасия Андреевна – к.м.н., доцент, кафедра факультетской терапии №1, Сеченовский Университет

Андреев Денис Анатольевич – д.м.н., профессор, кафедра кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики, Сеченовский Университет

Сычев Игорь Николаевич – к.м.н., доцент, кафедра клинической фармакологии и терапии, РМАНПО

Бочков Павел Олегович – к.б.н., с.н.с., отдел персонализированной медицины, НИИ молекулярной и персонализированной медицины, РМАНПО

Сычев Дмитрий Алексеевич – д.м.н., профессор, чл.корр. РАН, зав. кафедрой клинической фармакологии и терапии, ректор, РМАНПО