

Рыткин Эрик Игоревич

**Плазменная микро-РНК как биомаркер прогнозирования фармакодинамических
эффектов антитромботических препаратов**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Сычев Дмитрий Алексеевич

Научный консультант:

кандидат медицинских наук

Мирзаев Карин Бадавиевич

Официальные оппоненты:

Прокофьев Алексей Борисович - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Центр клинической фармакологии, директор;

Решетько Ольга Вилоровна - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, заведующая кафедрой.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится "27" апреля 2021 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.11 ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая д.8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru.

Автореферат разослан "___" _____ 2021 года

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Дроздов Владимир Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

За последние несколько лет появились данные исследований, подтверждающих значимость некодирующих РНК. Из них наибольший интерес представляют микро-РНК. Микро-РНК - это короткие, сохранившиеся в ходе эволюции последовательности длиной 17-25 нуклеотидов. Данные последовательности принимают участие в регуляции экспрессии генов на этапе посттранскрипции. В ходе эволюции мРНК разных генов приобретали сайты для микро-РНК. Увеличение сайтов микро-РНК ведёт к уменьшению выхода белка. Микро-РНК связывается с мРНК полностью или частично, то есть на 8, 6, или 7 нуклеотидов. В случае неполного связывания мРНК с микро-РНК происходит снижение трансляции, а в случае полного связывания происходит разрушение мРНК. Неполное связывание мРНК с микро-РНК ведет к снижению трансляции, а полное связывание ведет к разрушению мРНК. Подобная дестабилизация целевой мРНК является причиной снижения продукции белка, по данным источников, до 85%. Таким образом, микро-РНК влияют на фенотип клетки, подстраивая трансляцию белка и, тем самым, регулируют экспрессию гена (Ambros, 2004; He and Hannon, 2004). Микро-РНК способны регулировать экспрессию многих ADME генов (Absorption, distribution, metabolism, excretion - абсорбции, распределения, метаболизма и выведения), которые могут быть ответственны за резистентность к препаратам (Haenisch et al., 2011; Yu and Pan, 2012; Yokoi and Nakajima 2013; Lamba et al., 2014). Такая способность регулировать экспрессию генов делает их потенциальным инструментом персонализации терапии антитромботическими препаратами при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Результаты исследований также показали, что уровень микро-РНК-142 способен оказывать влияние на метаболизм клопидогрела. Микро-РНК-142 регулирует экспрессию гена *CYP3A4*, что подтверждается достоверной корреляцией уровня микро-РНК-142 с активностью изофермента *CYP3A4* и плазменной концентрацией клопидогрела (Tang et al., 2016). Отмечается, что высокий уровень miR-142 в плазме связан с риском серьезных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий. Исходя из этого, микро-РНК-142 может рассматриваться как прогностический маркер при сердечно-сосудистых заболеваниях (Tang et al., 2018). Поскольку микро-РНК способны влиять на уровень экспрессии гена *CYP3A4*, эффективность терапии препаратом ривароксабан, следовательно, также зависит от уровня микро-РНК. (Sennesael et al., 2018). В ряде публикаций также продемонстрирована связь микро-РНК с остаточной реактивностью тромбоцитов, кроме ассоциации микро-РНК с активностью изоферментов и ADME генов. Остаточная реактивность тромбоцитов - это показатель того, какая часть тромбоцитов не подвержена действию P2Y₁₂-ингибиторов. Этим

значением остаточной реактивности тромбоцитов и определяется клиническая эффективность P2Y12-ингибиторов (Zhang et al., 2014, Shi et al., 2013).

Таким образом, **актуальность темы диссертации** заключается в том, что результаты исследования позволяют использовать микро-РНК в качестве биомаркеров эффективности лекарственных препаратов. Определение уровней экспрессии микро-РНК позволит прогнозировать индивидуальный ответ и снизить число жизнеугрожающих событий, что особенно важно в случае применения антитромботических препаратов.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на достигнутый в последние годы прогресс в изучении роли микро-РНК в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, многое по-прежнему остается неизученным и требует дальнейшего рассмотрения. В частности, необходимо установить связь уровня циркулирующих микро-РНК, как уже описанных, так и новых, с фенотипической активностью изоферментов системы цитохрома P450, и влиянием, которое микро-РНК способны оказывать на экспрессию ADME генов. Проведение таких исследований позволит разработать общий подход к персонализации антитромботической терапии на основе фармакогенетики и использовать микро-РНК в качестве биомаркеров ответа на лекарственные препараты

Цель исследования: разработать подход к прогнозированию антитромботического действия препаратов у пациентов с острым коронарным синдромом, подвергшихся чрескожному коронарному вмешательству, и у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий на основе результатов определения уровней экспрессии микро-РНК и фармакогенетических исследований.

Задачи исследования:

1. произвести оценку циркулирующих микро-РНК miR-34, miR-142, miR-29, miR-150, miR-223, miR-126 в качестве биомаркеров, прогнозирующих особенности фармакодинамических эффектов антиагрегантов;
2. оценить циркулирующие микро-РНК miR-142, miR-39 в качестве биомаркеров, прогнозирующих особенности фармакодинамических эффектов ривароксабана;
3. произвести оценку ассоциации между уровнем циркулирующих микро-РНК miR-142, miR-34, miR-29, miR-150, miR-223, miR-126 с носительством 17 значимых для клопидогрела и 6 для тикагрелора полиморфизмов генов системы ADME на фоне применения антиагрегантов у пациентов с острым коронарным синдромом, подвергшихся чрескожному коронарному вмешательству;

4. произвести оценку ассоциации между уровнем циркулирующих микро-РНК miR-142, miR-39 с носительством 4 значимых для ривароксабана полиморфизмов генов системы ADME на фоне применения ривароксабана у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий;
5. оценить ассоциацию между уровнем циркулирующих микро-РНК miR-142, miR-34, miR-29, miR-150, miR-223, miR-126 и активностью изофермента CYP3A4 (оцененную по отношению концентрации кортизола и 6-бета-гидрокортизола в моче) у пациентов с острым коронарным синдромом и перенесших чрескожное коронарное вмешательство;
6. произвести оценку ассоциации между уровнем циркулирующих микро-РНК miR-142, miR-39 и активностью изофермента CYP3A4 (оцененную по отношению концентрации кортизола и 6-бета-гидрокортизола в моче) у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий, принимающих ривароксабан;
7. представить универсальный алгоритм отбора релевантных микро-РНК для лекарственных средств с помощью существующих баз данных на примере клопидогрела и тикагрелора.

Научная новизна

В исследовании впервые оценена возможность использования плазменных микро-РНК в качестве биомаркеров фармакодинамических эффектов; выявлены и проанализированы значимые корреляции между уровнями экспрессии плазменных микро-РНК и показателями остаточной реактивности тромбоцитов у пациентов, принимающих ингибиторы P2Y₁₂ рецепторов; также обнаружены статистически значимые корреляции между уровнями экспрессии микро-РНК и показателями коагуляции у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий; проанализированы наиболее значимые полиморфизмы ADME генов как для клопидогрела и тикагрелора, так и для ривароксабана; оценена их связь с уровнями экспрессии плазменных микро-РНК.

В диссертационной работе также представлен универсальный алгоритм отбора релевантных микро-РНК для лекарственных средств на примере отбора значимых микро-РНК для клопидогрела и тикагрелора; представлены circos-плоты с наиболее значимыми микро-РНК для полиморфизмов генов, участвующих в метаболизме клопидогрела и тикагрелора. Данный универсальный алгоритм позволяет обозначить основные этапы процесса поиска релевантных микро-РНК для любых лекарственных средств.

Данное исследование, начиная с создания и применения алгоритма по поиску микро-РНК и заканчивая комплексной оценкой влияния уровней экспрессии плазменных микро-РНК на показатели коагуляции и уровней остаточной реактивности тромбоцитов, также

поддержанное фармакогенетическим анализом взаимосвязи уровней экспрессии микро-РНК и наличием значимых полиморфизмов генов, впервые предлагает потенциальные плазменные микро-РНК для оценки эффективности антитромботических препаратов.

Практическая значимость работы

В исследовании оценена возможность использования плазменных микро-РНК в качестве биомаркеров фармакодинамических эффектов антитромботических препаратов. Для поиска и подбора релевантных микро-РНК был создан и опробован на антитромботических препаратах универсальный алгоритм отбора микро-РНК для лекарственных препаратов. Данный алгоритм имеет практическую ценность: исследователи и создатели тест систем, так называемых, lab-on-a-chip, могут его использовать для подбора микро-РНК для включения в чип. Данный алгоритм позволит отобрать как самые релевантные микро-РНК, так и те, экспрессия которых соотносится с наибольшим числом регулируемых генов (так как микро-РНК могут регулировать множество генов). Отобранные микро-РНК на основе алгоритма и данных литературы были исследованы на предмет влияния на параметры коагуляции, остаточной реактивности тромбоцитов, то есть был оценен их потенциал стать биомаркерами; возможное влияние на коагуляцию и параметры гемостаза были дополнены данными по фармакогенетике. На основании данных результатов фармакогенетического тестирования, их корреляции с параметрами коагуляции и остаточной реактивности тромбоцитов был сделан вывод, что исследованные микро-РНК могут служить новыми фармакотранскриптомными маркерами эффективности антитромботических лекарственных средств.

Положения, выносимые на защиту

1. Доказана возможность использования плазменных микро-РНК miR-29, miR-34, miR-126, miR-142, miR-223 в качестве фармакотранскриптомных биомаркеров, прогнозирующих особенности фармакодинамических эффектов антиагрегантов ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов клопидогрела и тикагрелора у пациентов с острым коронарным синдромом, которые проявляются измененными уровнями остаточной реактивности тромбоцитов, измеренными при помощи АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.
2. Доказана возможность использования плазменных микро-РНК miR-142, miR-39 в качестве фармакотранскриптомных биомаркеров, прогнозирующих особенности фармакодинамических эффектов ривароксабана у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий, которые проявляются изменением коагулологических показателей крови: АЧТВ, протромбин по Квику, тромбиновое время. Между этими показателями и уровнями экспрессии исследованных микро-РНК существует тесная

корреляционная связь, что подтверждает возможность использования плазменных микро-РНК в качестве биомаркеров, прогнозирующих особенности фармакодинамических эффектов ривароксабана.

3. Предложен алгоритм подбора релевантных микро-РНК для включения в качестве потенциальных фармакотранскриптомных биомаркеров на примере антитромботических препаратов, позволяющий отобрать только значимые микро-РНК для лекарственных препаратов.

Внедрение в практику

Результаты диссертационного исследования, а именно, использование новых фармакотранскриптомных биомаркеров для прогнозирования особенностей фармакодинамических эффектов у пациентов, принимающих клопидогрел, тикагрелор, ривароксабан, алгоритм для поиска релевантных микро-РНК внедрены в НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Личный вклад соискателя

Автор непосредственно участвовал в выборе проблемы и темы научного исследования, постановке цели и определении задач исследования, сборе материала, проведении экспериментов по определению уровней экспрессии микро-РНК, уровней остаточной реактивности тромбоцитов, анализе, статистической обработке полученных данных. Автор на основе данных публикаций и имеющихся баз данных микро-РНК предложил универсальный алгоритм поиска и подбора релевантных лекарственному препарату микро-РНК и на примере антитромботических препаратов опробовал этот алгоритм в действии.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология» и пунктам 8 и 10 областей исследования данной специальности – «Изучение фармакокинетического и фармакодинамического взаимодействия лекарственных средств, разработка наиболее рациональных комбинаций при проведении современной фармакотерапии» и «Разработка методологии и проведение терапевтического лекарственного мониторинга препаратов с учетом клинической эффективности и возможности проявления нежелательного побочного действия лекарственных средств».

Апробация материалов диссертации

Работа обсуждена на заседании апробационной комиссии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России 13.11.2020, протокол № 11. Диссертация рекомендована к защите. Результаты работы внедрены в научную и практическую работу НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, а также в учебный процесс кафедры клинической фармакологии и терапии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Основные положения работы были представлены на IV-ом международном Форуме АнтиКоагулянтной и антиагрегантной Терапии (ФАКТplus2019) (21-23 марта 2019 года, Москва), XIV-ом международном научном конгрессе «Рациональная фармакотерапия» (17-19 октября 2019 года, Санкт-Петербург), 27 Российском Национальном Конгрессе "Человек и Лекарство" (6-9 апреля 2020 года, Москва), VI-ом Ежегодном Научном Конгрессе «Вотчаловские чтения» (28 мая 2020, Москва), V-ом международном Форуме АнтиКоагулянтной и антиагрегантной Терапии (ФАКТplus2020) (29-31 октября 2020 года, Москва).

Публикации автора

По теме диссертации имеется 10 публикаций: 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации (также входят в базу данных SCOPUS, Q4); в зарубежных рецензируемых научных изданиях - 5 статей, входящих в базы данных SCOPUS (из них Q1 - 2 статьи, Q2 - 2 статьи, Q4 - 1 статья). Также опубликованы тезисы в зарубежных рецензируемых научных изданиях, индексируемых в SCOPUS, Q1 - 2 тезиса; в российских научных изданиях, индексируемых в РИНЦ - 1 тезис.

Структура и объем диссертации

Объем диссертационной работы составляет 105 страниц машинописного текста, в том числе 11 таблиц и 11 рисунков. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов собственного исследования, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Список литературы включает 139 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 80 пациентов с острым коронарным синдромом, принимающих клопидогрел (n=35), тикагрелор (n=45), а также 57 пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий, принимающих ривароксабан. Критериями включения в группы пациентов с острым коронарным синдромом было наличие письменного информированного согласия пациента на участие в исследовании, установленный диагноз острого коронарного синдрома с проведением чрескожного коронарного вмешательства с установкой стента в сосуд, приём клопидогрела в дозе 75 мг один раз в сутки или тикагрелора в дозе 90 мг два раза в сутки в момент включения в исследование. В исследование включались пациенты с установленным диагнозом острого коронарного синдрома или неклапанной фибрилляции предсердий на основании клинической картины, результатов инструментальных методов исследования, либо больные, имевшие в анамнезе неклапанную фибрилляцию предсердий с документальным подтверждением в виде выписки из историй болезни при прошлых госпитализациях или амбулаторных карт.

Таблица 1. Клинико-демографические и лабораторные показатели пациентов с острым коронарным синдромом.

Параметр	Пациенты с острым коронарным синдромом (n=80)
Возраст, лет	64,4±12,3
ФВ, %	49,91±8,06
Лейкоциты, 10 ⁹ клеток/л	8,80±6,53
Тромбоциты, 10 ⁹ клеток/л	259.04±73,18
Гемоглобин, г/л	137.61±16,27
Холестерин, ммоль/л	5.35±1,22
ЛПНП, ммоль/л	3.53±0,93
ТГ, ммоль/л	1.88±0,69
Креатинин, мкмоль/л	104.14±37,26
Глюкоза, ммоль/л	5.88±1,42
Гематокрит, %	41.12±4,83
Курение	22 (27.5%)
Гиперлипидемия	59 (73.75%)
Диабет	11 (13.75%)
АГ	72 (90%)
Почечная недостаточность	4 (5%)
Аритмия	23 (28.75%)
Блокаторы кальциевых каналов	26 (32.5%)
Диуретики	36 (45%)

Ингибиторы протонной помпы	48 (60%)
Статины	78 (97.5%)
Бета-блокаторы	74 (92.5%)
иАПФ	53 (66.25%)
ПьШа	2 (2.5%)
Тикагрелор	45 (56.25%)
Клопидогрел	35 (43.75%)

У всех пациентов с острым коронарным синдромом, включенным в исследование, проводилось чрескожное коронарное вмешательство с установкой стента в сосуд. Группе пациентов с ОКС и имплантацией стента проводилось измерение остаточной реактивности тромбоцитов с помощью прибора VerifyNow. У всех пациентов проводилось определение активности изофермента CYP3A4 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Таблица 2. Сравнительная характеристика пациентов с острым коронарным синдромом, которые получали клопидогрел (n=35) или тикагрелор (n=45).

Параметр	Клопидогрел	Тикагрелор	p-значение
Возраст, лет	67.66±12.79	61.89±11.44	0.04
ФВ, %	48.80±8.18	50.78±7.94	0.28
Тромбоциты, 10 ⁹ клеток/л	256.31±72.89	261.16±74.16	0.77
Гемоглобин, г/л	133.34±16.43	140.93±15.51	0.04
Холестерин, ммоль/л	5.15±1.14	5.51±1.27	0.19
ЛПНП, ммоль/л	3.40±0.83	3.64±0.99	0.26
ТГ, ммоль/л	1.74±0.64	1.98±0.71	0.14
Креатинин, мкмоль/л	100.00±36.21	107.36±38.15	0.38
Глюкоза, ммоль/л	5.65±1.19	6.05±1.57	0.22
Гематокрит, %	41.15±4.81	41.08±4.98	0.96
Количество стентов	1.14±0.49	1.20±0.50	0.61
Диаметр стентов, мм	3.18±0.44	3.08±0.51	0.37
Суммарная длина стентов, мм	31.03±18.14	31.18±17.10	0.97

У всех пациентов проводилось исследование полиморфных вариантов генов, ответственных за метаболизм препарата. Для клопидогрела это следующие 17 полиморфизмов: *ABCB1* (C3435T, rs1045642), *CYP2C19**2 (681G>A, rs4244285), *CYP2C19**3 (636G>A, rs4986893), *CYP2C19**17 (C-806T, rs1224856), *CYP3A4**22 (C>T, rs35599367), *CYP3A4* (20239G>A, rs2242480), *CYP3A5**3 (A6986G, rs776746), *CYP4F2* (C>T, Val433Met, rs2108622), *CES1* (A-33C, rs2244613), *PON1* (Q192R, rs662), *IGTB3* (rs5918), *P2Y12* (rs2046934), *P2Y12R* (A>G, rs3732759), *PEAR1* (C>T, rs41273215), *PEAR1* (C>T, rs57731889), *B4GALT2* (C>T, rs1061781), *ABCG2* (G>T, rs2231142). Для тикагрелора это следующие 6 полиморфизмов: *ABCB1* (C3435T, rs1045642), *CYP3A5**3 (A6986G, rs776746), *CYP3A4**22 (C>T, rs35599367),

CYP3A4 (20239G>A, rs2242480), *P2Y12* (rs2046934), *SLCO1B1* (T521C, rs4149056). Для ривароксабана это следующие 4 полиморфизма: *CYP3A4*22* (C>T, rs35599367), *CYP3A5*3* (A6986G, rs776746), *ABCB1* (rs4148738), *ABCB1* (C3435T, rs1045642).

Всем пациентам проводилось измерение уровней экспрессии микро-РНК с помощью полимеразно-цепной реакции в реальном времени. Выделение тотальной РНК из плазмы крови проводилось с помощью реагента Qiazol и набора miRNeasy MiniKit (Qiagen, Хильден, Германия) в соответствии с протоколом производителей, с небольшими модификациями. Количественная оценка уровня экспрессии микро-РНК методом ПЦР в реальном времени производилась на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Геркулес, США) по рекомендованной производителем программе (15 минут при 95 °С для активации HotStar TaqDNA Polymerase и 40 трехступенчатых циклов (94 °С - 15 сек., 55 °С– 30 сек., 70 °С – 30 сек.)).

Таблица 3. Клинико-демографические и лабораторные показатели пациентов с фибрилляцией предсердий.

Параметр	Пациенты с фибрилляцией предсердий (n=57)
Возраст, лет	86,2±4,1
Количество мужчин	11 (19,3%)
Наличие ХСН	49 (85,9%)
Наличие АГ	49 (85,9%)
Наличие СД	17 (29,8%)
ОНМК	13 (16,25%)
Гемоглобин, г/л	121,0±15,7
Гематокрит, %	38,7±4,8
Лейкоциты, 10 ⁹ клеток/л	6,6±2,2
Тромбоциты, 10 ⁹ клеток/л	242,7±105,4
Креатинин, мкмоль/л	110,4±26,3
Глюкоза, ммоль/л	5,8±1,2

Статистическая обработка результатов проводилась в SPSS Statistics 20.0. Проверка нормальности распределения проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения для оценки достоверности различий количественных показателей был применен однофакторный дисперсионный анализ — ANOVA и коэффициент корреляции смешанных моментов Пирсона; для оценки достоверности различий категориальных показателей - t-критерий Стьюдента. В случае ненормального распределения -

критерий Манна-Уитни или Крускала-Уоллиса. Определение влияния количественных факторов на активность тромбоцитов проводилось при помощи линейного регрессионного анализа. Для установления различий категориальных показателей был применен критерий хи-квадрат Пирсона χ^2 . Для проверки соблюдения равновесия Харди-Вайнберга применялся точный критерий Фишера. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Оценка взаимосвязи между уровнем экспрессии микро-РНК и уровнем остаточной реактивности тромбоцитов

Для оценки взаимосвязи между уровнем экспрессии микро-РНК и уровнем остаточной реактивности тромбоцитов, измеренной с помощью прибора VerifyNow, проводился анализ линейной регрессии, со следующими переменными в качестве зависимых переменных: miR-142, miR-126, miR-223, miR-150, miR-29, miR-34. Из них следующие микро-РНК показали связь с уровнем остаточной реактивности тромбоцитов: miR-126 (β coefficient=-0.076, SE=0.032, $p=0.021$), miR-223 (β coefficient=-0.089, SE=0.041, $p=0.032$), miR-29 (β coefficient=-0.042, SE=0.018, $p=0.026$), miR-142 (β coefficient=-0.072, SE=0.026, $p=0.008$). Следующие два кандидата микро-РНК miR-150 (β coefficient=-0.006, SE=0.009, $p=0.518$) и miR-34 такой связи не показали (β coefficient=-0.020, SE=0.022, $p=0.372$).

Оценка взаимосвязи между уровнем экспрессии микро-РНК и наличием полиморфизмов генов

В ходе исследования в каждой группе пациентов проводилось определение полиморфизмов генов, участвующих в абсорбции, распределении, метаболизме и экскреции лекарственного препарата. Для 35 пациентов, принимающих клопидогрел, было проведено исследование 17 полиморфизмов. Наличие данных полиморфизмов способно влиять на то, как препарат метаболизируется на разных этапах биотрансформации. Данные полиморфизмы были получены в ходе анализа крупнейшей базы данных PharmGKB. Для клопидогрела были проанализированы следующие 17 полиморфизмов: *ABCB1* (C3435T, rs1045642), *CYP2C19*2* (681G>A, rs4244285), *CYP2C19*3* (636G>A, rs4986893), *CYP2C19*17* (C-806T, rs1224856), *CYP3A4*22* (C>T, rs35599367), *CYP3A4* (20239G>A, rs2242480), *CYP3A5*3* (A6986G, rs776746), *CYP4F2* (C>T, Val433Met, rs2108622), *CES1* (A-33C, rs2244613), *PON1* (Q192R, rs662), *IGTB3* (rs5918), *P2Y12* (rs2046934), *P2Y12R* (A>G, rs3732759), *PEAR1* (C>T, rs41273215), *PEAR1* (C>T, rs57731889), *B4GALT2* (C>T, rs1061781), *ABCG2* (G>T, rs2231142). Для 45 пациентов, принимающих тикагрелор, было проведено исследование 6 полиморфизмов, способных, по

данным базы данных PharmGKB, оказывать влияние на метаболизм тикагрелора на разных этапах. Это были следующие полиморфизмы: *ABCB1* (C3435T, rs1045642), *CYP3A5*3* (A6986G, rs776746), *CYP3A4*22* (C>T, rs35599367), *CYP3A4* (20239G>A, rs2242480), *P2Y12* (rs2046934), *SLCO1B1* (T521C, rs4149056). Меньшее число полиморфизмов в группе тикагрелора по сравнению с группой клопидогрела объясняется особенностями биотрансформации клопидогрела в печени. Для 57 пациентов, принимающих ривароксабан, было проведено исследование 4 полиморфизмов. Такими полиморфизмами стали *CYP3A4*22* (C>T, rs35599367), *CYP3A5*3* (A6986G, rs776746), *ABCB1* (rs4148738), *ABCB1* (C3435T, rs1045642). В ходе анализа на соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга было обнаружено, что частоты генотипов пациентов, принимающих участие в исследовании, соответствовали ожидаемым по уравнению Харди-Вайнберга. Так, для выборки пациентов с острым коронарным синдромом наблюдались следующие значения χ^2 для исследуемых полиморфизмов при $p=0.05$: *ABCB1* (C3435T, rs1045642) $\chi^2=1.4375$, *CYP2C19*2* (681G>A, rs4244285) $\chi^2=1.5887$, *CYP2C19*17* (C-806T, rs1224856) $\chi^2=2.1264$, *CYP3A4*22* (C>T, rs35599367) $\chi^2=0.0040$, *CYP3A4* (20239G>A, rs2242480) $\chi^2=0.0251$, *CYP3A5*3* (A6986G, rs776746) $\chi^2=0.8201$, *CYP4F2* (C>T, Val433Met, rs2108622) $\chi^2=0.6362$, *CES1* (A-33C, rs2244613) $\chi^2=0.8939$, *PON1* (Q192R, rs662) $\chi^2=2.6372$, *IGTB3* (rs5918) $\chi^2=0.7101$, *P2Y12* (rs2046934) $\chi^2=1.2237$, *P2Y12R* (A>G, rs3732759) $\chi^2=2.1264$, *PEAR1* (C>T, rs41273215) $\chi^2=2.1264$, *PEAR1* (C>T, rs57731889) $\chi^2=0.0344$, *B4GALT2* (C>T, rs1061781) $\chi^2=0.1474$, *ABCG2* (G>T, rs2231142) $\chi^2=0.2385$, *SLCO1B1* (T521C, rs4149056) $\chi^2=0.5436$. Для выборки пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий, принимающих ривароксабан, наблюдались следующие значения χ^2 для исследуемых полиморфизмов при $p=0.05$: *CYP3A4*22* (C>T intron 6, rs35599367) $\chi^2=0.0182$, *CYP3A5*3* (rs776746) $\chi^2=0.1759$, *ABCB1* (rs4148738) $\chi^2=1.3793$. Полученные значения χ^2 в выборках пациентов позволяют утверждать, что распределение частоты генотипов в исследовании соответствует их распределению в популяции в целом. А, значит, отсутствие статистически значимых различий между частотами аллелей и генотипов выборки и расчетных ожидаемых показателей свидетельствует о выполнении закона Харди-Вайнберга о поддержании постоянства генотипов из поколения в поколение. При помощи тестов на нормальность с помощью критериев Колмогорова-Смирнова с поправкой значимости Лилефорса и тестов Шапиро-Уилка было установлено, что распределение величин miR-29 ($p=0,000$), miR-126 ($p=0,001$), miR-142 ($p=0,049$), miR-150 ($p=0,001$) не соответствует нормальному распределению. При помощи этих же тестов установлено, что распределение величин miR-34 ($p=0,197$) и miR-223 ($p=0,537$) соответствует нормальному распределению. В связи с ненормальным распределением величин miR-29 ($p=0,000$), miR-126 ($p=0,001$), miR-142 ($p=0,049$), miR-150 ($p=0,001$) в выборке пациентов с острым коронарным синдромом, для

расчетов статистических параметров использовался критерий Манна-Уитни или Крускала-Уоллиса. Эти же критерии использовались для расчета статистики в выборке пациентов с фибрилляцией предсердий, так как распределение величин miR-142 ($p=0,004$) и miR-39 ($p=0,000$) не соответствует нормальному. Из полиморфизмов ADME генов ингибиторов P2Y12-рецепторов, продемонстрировавших статистически значимую связь с уровнями экспрессии микро-РНК, можно выделить следующие полиморфизмы: *P2Y12R* ($A>G$, *rs3732759*) и miR-29 ($p=0,017$), miR-34 ($p=0,003$); *CYP2C19*17* ($C-806T$, *rs1224856*) и miR-142 ($p=0,012$); *PON1* (*Q192R*, *rs662*) и miR-29 ($p=0,004$), *ABCG2* ($G>T$, *rs2231142*) и miR-34 ($p=0,007$). Поэтому в качестве биомаркеров полиморфизмов с измененными функциями можно использовать miR-29, miR-34, miR-142 (см. рис. 1).

Из полиморфизмов ADME генов ривароксабана, продемонстрировавших статистически значимую связь с уровнями экспрессии микро-РНК можно выделить полиморфизм *ABCB1* ($C3435T$, *rs1045642*) и miR-142 ($p=0,021$). Также отмечена взаимосвязь между *CYP3A4*22* ($C>T$, *rs35599367*) и показателями коагуляции, такими как протромбин по Квику, протромбиновое время и МНО ($p=0,05$).

Оценка взаимосвязи между уровнем экспрессии микро-РНК и коагулологическими параметрами

Подобно тому как проводились оценка эффективности терапии ингибиторами P2Y12-рецепторов и анализ остаточной реактивности тромбоцитов у пациентов с ОКС, производилось сравнение коагулологических показателей с уровнями экспрессии микро-РНК у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий, тех микро-РНК, которые являются кандидатами в биомаркеры эффективности терапии ривароксабаном.

Отмечена положительная корреляция между Ct miR-142 и АЧТВ ($p=0,019$), поэтому чем больше экспрессия miR-142 в выборке, тем меньше АЧТВ. Также отмечена тенденция miR-142 коррелировать с показателями протромбина по Квику ($p=0,095$). Это означает, что чем больше экспрессия miR-142, тем меньше протромбина по Квику. Примечательны также результаты miR-39: более высокая экспрессия miR-39 свидетельствует о более высоком тромбиновом времени (β коэффициент=-0.133, SE 0.061, $p=0,036$ в модели линейной регрессии).

Выбор микро-РНК для включения в наборы по персонализации антитромботических препаратов

База данных PharmGKB (www.pharmgkb.org) использовалась для отбора всех ADME генов, участвующих в метаболизме клопидогрела. Всего было отобрано 36 таких генов. Для

каждого гена были отобраны только те варианты, которые ассоциируются с устойчивостью к клопидогрелу со значением $p < 0,05$.

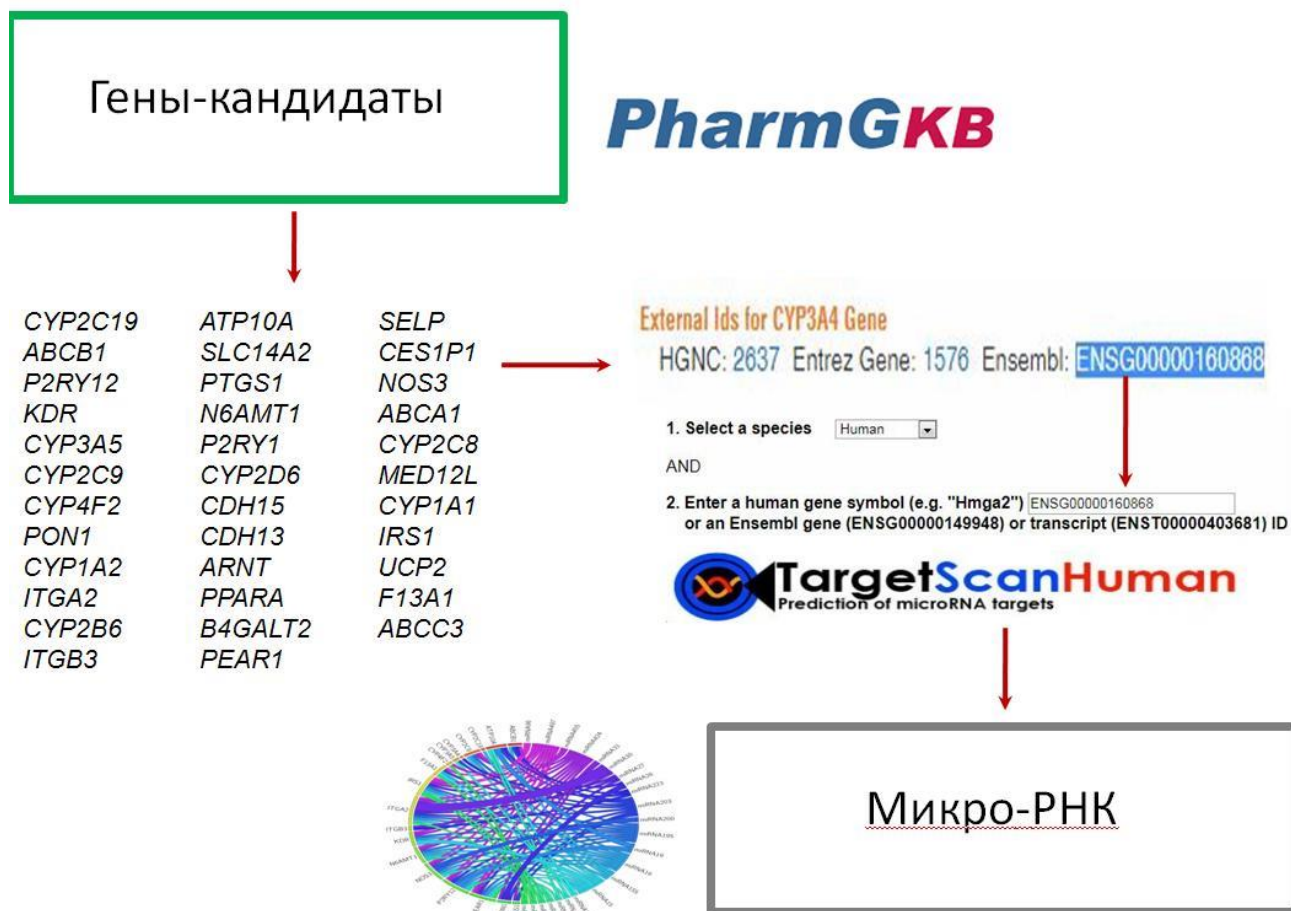


Рисунок 1. Алгоритм поиска релевантных микро-РНК, представленный на примере поиска релевантных микро-РНК в качестве биомаркеров эффективности клопидогрела.

Всего был выбран 51 вариант, ассоциированный с измененным ответом на терапию клопидогрелом, и получены названия Ensembl Общества вариаций генома человека (Human Genome Variation Society, HGVS). Эти Ensembl названия были использованы для отбора микро-РНК по сохраненным последовательностям нуклеотидов через TargetScanHuman 7.2 (www.targetscan.org/vert_72/). Были выбраны как консервативные участки, так и семейства miRNA с высокой совокупностью Pct (Probability of Conserved Targeting- вероятность таргетирования конкретной микро-РНК той последовательности, которая была сохранена на протяжении эволюции).

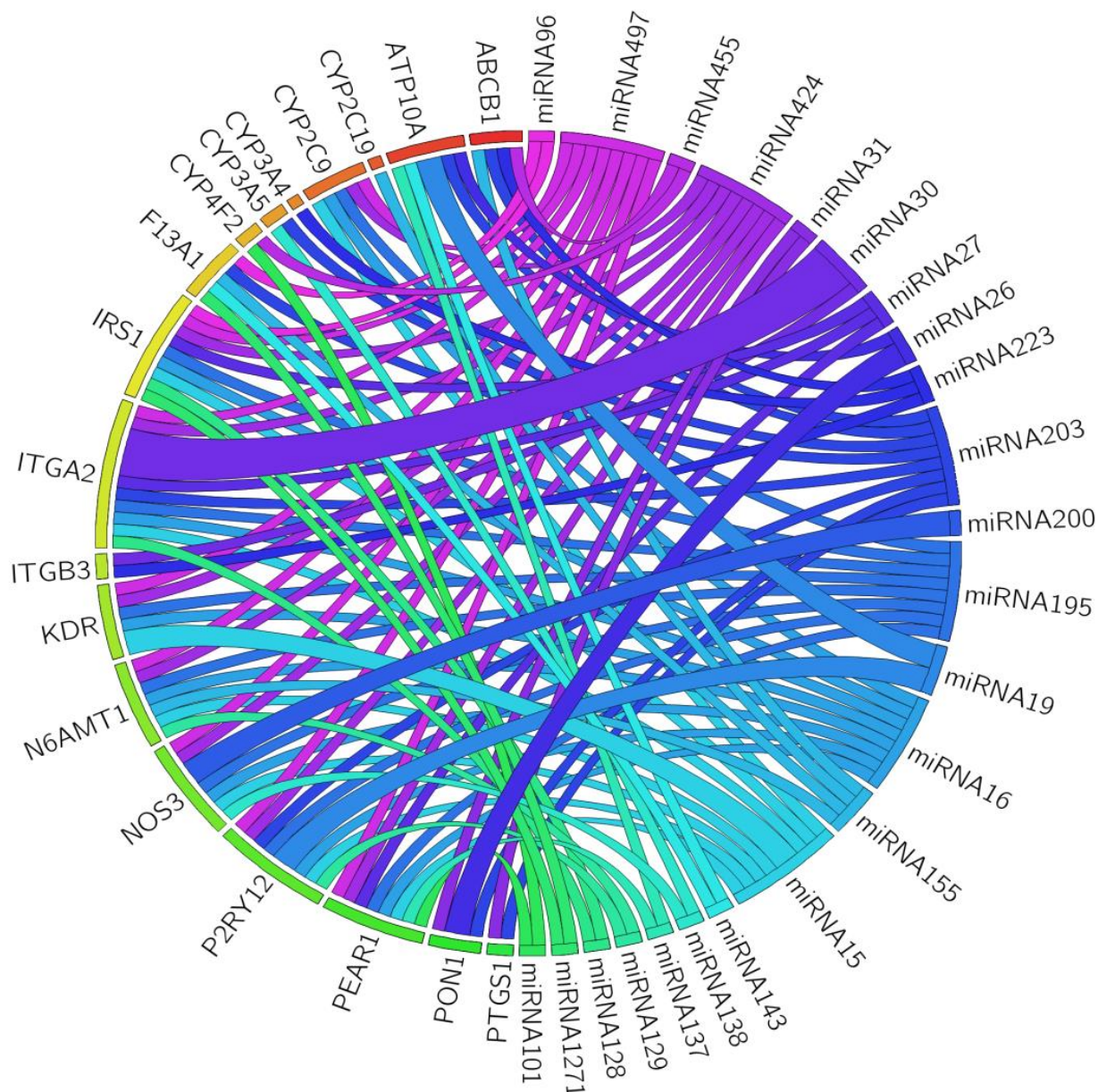


Рисунок 2. Микро-РНК, которые могут быть включены в интеллектуальную диагностическую систему для тестирования устойчивости к клопидогрелу и их связи с избранными генами ADME клопидогрела.

В диссертационной работе представлен первый в своем роде Circos Plot возможных микро-РНК, а также универсальный алгоритм поиска релевантных микро-РНК для прогнозирования возможности их использования в качестве биомаркера эффективности лекарственных средств. Circos Plot дает ответ на первый вопрос каждого ученого, который собирается разрабатывать интеллектуальную диагностическую систему для быстрого тестирования резистентности к клопидогрелу на основе микро-РНК: какие микро-РНК должны быть включены в систему? Предполагается, что микро-РНК, которые могут быть включены в интеллектуальную диагностическую систему тестирования устойчивости к клопидогрелу, должны быть нацелены на как можно большее количество генов, отвечающих за устойчивость к клопидогрелу.

ВЫВОДЫ

В данном диссертационном исследовании:

1. обоснована возможность использования циркулирующих микро-РНК miR-126, miR-223, miR-29, miR-142 в качестве биомаркеров, прогнозирующих особенности фармакодинамических эффектов антиагрегантов, поскольку выявлена корреляция с уровнем их экспрессии и остаточной реактивностью тромбоцитов, измеренной при помощи агрегометра VerifyNow: miR-126 (β coefficient=-0.076, SE=0.032, p=0.021), miR-223 (β coefficient=-0.089, SE=0.041, p=0.032), miR-29 (β coefficient=-0.042, SE=0.018, p=0.026), miR-142 (β coefficient=-0.072, SE=0.026, p=0.008);
2. обоснована возможность использования циркулирующих микро-РНК miR-142, miR-39 в качестве биомаркеров, прогнозирующих эффективность применения ривароксабана, так как выявлена корреляция данных микро-РНК с показателями коагуляции: miR-142 и АЧТВ (p=0.019), miR-142 и протромбин по Квику (p=0.095); miR-39 и тромбиновое время (β коэффициент=-0.133, SE 0.061, p=0.036 в модели линейной регрессии);
3. обоснована возможность использования циркулирующих микро-РНК miR-142, miR-34, miR-29 в качестве биомаркеров, прогнозирующих эффективность антиагрегантов, так как выявлена взаимосвязь экспрессии данных микро-РНК и наличием значимых полиморфизмов генов, участвующих в их метаболизме: *P2Y12R* (A>G, rs3732759) и miR-29 (p=0.017), miR-34 (p=0.003); *CYP2C19*17* (C-806T, rs1224856) и miR-142 (p=0.012); *PON1* (Q192R, rs662) и miR-29 (p=0.004), *ABCG2* (G>T, rs2231142) и miR-34 (p=0.007);
4. обоснована возможность использования циркулирующей микро-РНК miR-142 в качестве биомаркера, прогнозирующего эффективность применения ривароксабана у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий, так как выявлена корреляция микро-РНК miR-142 и *ABCB1* (C3435T, rs1045642) (p=0.021);
5. не выявлена корреляция между активностью изофермента CYP3A4 (оцененная по отношению концентрации кортизола и 6-бета-гидрокортизола в моче) и уровнем экспрессии ни одной микро-РНК ни у пациентов с ОКС, ни у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий;
6. представлен универсальный алгоритм отбора релевантных микро-РНК для лекарственных средств с помощью существующих баз данных. Применение алгоритма разобрано на примере поиска релевантных микро-РНК в качестве биомаркеров эффективности ингибиторов P2Y12-рецепторов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Применение циркулирующих микро-РНК в качестве биомаркеров целесообразно и обоснованно для персонализации применения антитромботических препаратов. Для ингибиторов P2Y12-рецепторов данными перспективными микро-РНК являются miR-142, miR-34, miR-29, miR-126, miR-223; для ривароксабана - miR-142, miR-39. Данные биомаркеры позволяют комплексно оценить эффективность проводимой терапии антитромботическими препаратами.
2. Применение циркулирующих микро-РНК позволит выделить пациентов, которым необходим контроль антиагрегантного эффекта или перевод на другой ингибитор P2Y12-рецепторов. В случае применения циркулирующих микро-РНК у пациентов, принимающих ривароксабан, это позволит выделить пациентов, которым требуется контроль концентрации лекарственного препарата.
3. Включение следующих микро-РНК: miR-142, miR-34, miR-39, miR-29, miR-126, miR-223 целесообразно для будущих умных систем терапевтического лекарственного мониторинга по типу lab-on-a-chip для оценки эффективности применения антитромботических лекарственных средств.
4. Применение универсального алгоритма по подбору релевантных микро-РНК позволит включить в системы терапевтического лекарственного мониторинга наиболее подходящие микро-РНК, то есть те, которые регулируют наибольшее число генов ADME и/или специфичны им.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Рыткин Э.И.**, Мирзаев К.Б., Смирнов В.В., Рыжикова К.А., Созаева Ж.А., Андреев Д.А., Сычёв Д.А. / Осложнения чрескожного коронарного вмешательства у пациентов с острым коронарным синдромом: связь с полиморфизмами генов CYP2C19, ABCB1, CYP3A5 и активностью изофермента CYP3A4. // Фармакогенетика и фармакогеномика -2017., №2; с. 26.
2. Karin Badavievich Mirzaev, **Eric Rytkin**, Elena Anatolyevna Grishina, Valery Valeryevich Smirnov, Kristina Anatolyevna Ryzhikova, Zhannet Alimovna Sozaeva, Denis Anatolyevich Andreev, Dmitriy Alekseevitch Sychev. / The Impact of CYP2C19, ABCB1 Genes Polymorphisms and CYP3A4 Isoenzyme Activity on the Incidence of Stent Implantation Complications for Patients With an Acute Coronary Syndrome // **JACC: Cardiovascular Interventions.** - 2017, №10, с. 6.
3. **Е. Rytkin**, К.В. Mirzaev, V.V. Smirnov, К.А. Ryzhikova, Zh.A. Sozaeva, D.A. Andreev, D.A. Sychev/ Assessment of CYP2C19, ABCB1, CYP3A5 Genes Polymorphisms' and CYP3A4 Isoenzyme Activity Influence on Major Adverse Cardiovascular Events Among Patients with an Acute Coronary

Syndrome Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. // **Clinical Therapeutics** -2017 г.; № 39, Issue 8; c. 67-68.

4. **Rytkin, E.**, Mirzaev, K.B., Grishina, E.A., Smirnov, V.V., Ryzhikova, K.A., Sozaeva, Z.A., Giliarov, M.I., Andreev, D.A. & Sychev, D.A / Do CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms and low CYP3A4 isoenzyme activity have an impact on stent implantation complications in acute coronary syndrome patients? // **Pharmacogenomics and Personalized Medicine** -2017 г.; № 10; c. 243-245.

5. Mirzaev, K.B., **Rytkin, E.**, Ryzhikova, K.A., Grishina, E.A., Sozaeva, Z.A., Fedorinov, D.S., Konova, O.D., Giliarov, M.I., Belyakova, G.A., Andreev, D.A. & Sychev, D.A.. / The ABCB1, CYP2C19, CYP3A5 and CYP4F2 genetic polymorphisms and platelet reactivity in the early phases of acute coronary syndromes. // **Drug Metabolism and Personalized Therapy** -2018 ; № 33, no. 3; c. 109-118.

6. **Rytkin, E.I.**, Mirzaev, K.B., Bure, I.V. & Sychev, D.A. / Micro-RNA as a new biomarker of activity of the cytochrome system P-450: Significance for predicting the antiplatelet action of P2Y12 receptor inhibitors // **Terapevticheskii Arkhiv** -2019.; № 91, no. 8; c 115-117.

7. Sychev, D.A., Sychev, I.N., Mirzaev, K.B., **Rytkin, E.I.**, Ivashchenko, D.V., Bure, I.V. & Otdelenov, V.A. / Clinical pharmacology technologies for personalization of cardiovascular diseases drug treatment: Focus on direct oral anticoagulants. // **Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk**; -2019. № 74, No 5; c. 299-306.

8. Sychev, D.A., Baturina, O.A., Mirzaev, K.B., **Rytkin, E.**, Ivashchenko, D.V., Andreev, D.A., Ryzhikova, K.A., Grishina, E.A., Bochkov, P.O. & Shevchenko, R.V / *CYP2C19*17* may increase the risk of death among patients with an acute coronary syndrome and non-valvular atrial fibrillation who receive clopidogrel and rivaroxaban. // **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**; -2020. № 13; c. 29-37.

9. **E. Rytkin**, K.B. Mirzaev, I.V. Bure, D.A. Sychev. Selection of miRNAs for clopidogrel resistance prediction /// **Meta Gene** -2020 г.

10. Sychev, D., Mirzaev, K., Cherniaeva, M., Kulikova, M., Bochkov, P., Shevchenko, R., Gorbatenkova, S., Golovina, O., Ostroumova, O., Bahteeva, D., **Rytkin, E** / Drug–drug interaction of rivaroxaban and calcium channel blockers in patients aged 80 years and older with nonvalvular atrial fibrillation. // **Drug Metabolism and Personalized Therapy** (published online ahead of print 2020), - 2020.