

На правах рукописи



Рожков Андрей Николаевич

Особенности профиля циркулирующих регуляторных РНК у пациентов с различными стадиями атеросклероза по данным МСКТ

3.1.20. Кардиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Копылов Филипп Юрьевич

Официальные оппоненты:

Мешков Алексей Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, институт персонализированной терапии и профилактики, руководитель института

Ежов Марат Владиславович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственные бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр Кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел проблем атеросклероза, главный научный сотрудник; лаборатория нарушений липидного обмена, руководитель лаборатории

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский Университет Медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «11» ноября 2025 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д.208.000.21 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, г Москва, ул. Трубецкая, дом 8, строение 2).

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1) и на сайте Первого МГМУ им. И.М. Сеченова www.sechenov.ru

Автореферат разослан « ___ » _____ 2025 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент



Брагина Анна Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Во многих развитых и развивающихся странах на первом месте в структуре смертности находятся заболевания сердечно-сосудистой системы. Так, в Российской Федерации по данным Росстата за 2019 год доля смертей от сердечно-сосудистых причин составила 46,8%, со снижением до 43,8% к 2022 году на фоне реализации Федеральных программ здравоохранения. Из них 54,4% приходилось на ишемическую болезнь сердца (ИБС) [Александрова Г.А. и соавт., 2023].

В целях снижения высокого бремени сердечно-сосудистой смертности у бессимптомных пациентов в качестве начальных этапов диагностики часто проводится оценка различных факторов риска, стресс-тесты и анализ ряда биологических маркеров [J. Knutti и соавт., 2020].

Поскольку патогенетическую основу атеросклероза и, соответственно, ИБС составляют процессы сосудистого воспаления, важным направлением совершенствования стратификации рисков развития сердечно-сосудистых осложнений (ССО) является выявление в плазме крови специфических маркеров и оценки их ассоциаций с расчетными значениями рисков ССО. Перспективным направлением в медицинской науке является изучение роли некодирующих регуляторных РНК в физиологических и патофизиологических процессах. Наиболее распространенным представителем этой группы являются микроРНК – небольшие одноцепочечные молекулы рибонуклеиновых кислот, регулирующих экспрессию генов и не несущих функцию синтеза белка. Участие микроРНК в развитии ССЗ отражается во многих исследованиях, описаны как их иницирующие и потенцирующие роли, так и защитные роли для различных молекул в рамках патофизиологии болезней сердечно-сосудистой системы [Zhang, X и соавт., 2015].

Вопросы оценки связи уровней циркулирующих микроРНК с клиническими и демографическими признаками пациентов, а также расчётными показателями риска ССО в отечественной и зарубежной медицинской практике исследованы недостаточно полно. Особый интерес представляет определение возможности оценки уязвимости атеросклеротической бляшки, поскольку это позволило бы более точно оценить риски сосудистых событий и оптимизировать

терапевтическую стратегию. В целях унификации с международными терминами в данной работе используется термин «уязвимая атеросклеротическая бляшка», аналогичный англоязычному термину «vulnerable atherosclerotic plaque».

Степень разработанности темы исследования

Современные исследования показали, что уровни экспрессии широкого спектра микроРНК ассоциированы с прогнозом сердечно-сосудистыми событиями у пациентов с ИБС [В. Siddeek и соавт., 2018]. Учитывая значимость микроРНК в патогенезе ССЗ, исследования их связи с уязвимостью атеросклеротических бляшек представляются актуальными. Большинство работ относятся к каротидным артериям и лишь несколько исследований проведены с целью оценки атеросклеротического процесса в коронарных артериях [Короллева И.А. и соавт., 2017]. Работы по изучению ассоциаций уровней микроРНК с наличием уязвимых коронарных атеросклеротических бляшек значительно отличаются по дизайну и, как правило, предполагают инвазивное исследование сосудов методами коронарной ангиографии [S. Li и соавт., 2017], внутрисосудистое УЗИ [J. Ren и соавт., 2013] или оптической когерентной томографии [D. M. Leistner и соавт., 2016]. При этом оценка уязвимости атеросклеротических бляшек более целесообразна на амбулаторном этапе, где основным методом визуализации является КТ [D. de Gonzalo-Calvo и соавт. 2019]. Однако, подобные исследования весьма ограничены и их результаты недостаточно репрезентативны. Анализ профилей циркулирующих микроРНК у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий остаётся актуальной и в значительной степени неисследованной задачей.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является выявление особенностей профиля циркулирующих регуляторных РНК у пациентов с различными стадиями коронарного атеросклероза по данным МСКТ.

Задачи исследования

1. Выявить циркулирующие микроРНК, ассоциированные со стадиями атеросклероза по данным КТ-ангиографии (исходя из объёма выборки в качестве стадий рассматривалось отсутствие атеросклероза, наличие уязвимых бляшек с невыраженной кальцификацией и наличие стабильных, кальцинированных бляшек).

2. Валидизировать результаты на более крупной выборке пациентов с атеросклерозом коронарных артерий без клиники типичной стенокардии.
3. Определить ассоциации уровней микроРНК со стабильными и уязвимыми атеросклеротическими бляшками по данным КТ-ангиографии.
4. Оценить ассоциации уровней микроРНК с риском сердечно-сосудистых катастроф и клинико-демографическими данными пациентов.

Научная новизна

Впервые получены данные сопоставления профилей циркулирующих микроРНК у пациентов с различными стадиями атеросклероза по данным КТА. Так, miR-143-3p и miR-181b-5p показали значимую связь с наличием уязвимых или стабильных атеросклеротических бляшек в венечных артериях. Оценка морфологии атеросклеротических бляшек проводилась при помощи 640-срезового компьютерного томографа. Уровни ряда других микроРНК ассоциировались с расчётными рисками сердечно-сосудистых осложнений, что позволяет рассматривать их в качестве дополнительных модификаторов при формировании прогноза ССО.

Впервые проведено широкое исследование ассоциаций уровней циркулирующих микроРНК с расчётными рисками сердечно-сосудистых осложнений, определёнными по шкалам SCORE2, Framingham, ACC/AHA и MESA в рамках одной работы.).

Теоретическая и практическая значимость работы

Определение профиля циркулирующих регуляторных РНК у пациентов с атеросклерозом позволяет расширить теоретическое представление об этом процессе, особенно в отношении вопроса уязвимости бляшек и процесса их кальцификации. Данное исследование демонстрирует новую, ранее не описанную роль miR-181b-5p в качестве одного из регуляторов процесса повышения плотности фиброатеромы. Результаты оценки ассоциаций уровней циркулирующих микроРНК с другими эпигенетическими факторами дополняют фундаментальную теоретическую платформу, необходимую для дальнейших исследовательских работ.

Выявленные особенности экспрессии циркулирующих микроРНК позволят использовать их в качестве маркеров коронарного атеросклероза различной

степени тяжести, а также для дифференцировки уязвимых и стабильных атеросклеротических бляшек. Оценка уровней циркулирующей miR-143-3p может служить биологическим маркером уязвимости бляшки. Такая диагностика способствует раннему выявлению уязвимых атеросклеротических поражений и проведению соответствующих лечебных и профилактических мероприятий.

Оценка уровней микроРНК как дополнительных компонентов к популяционным моделям расчёта риска ССО позволит персонализировать прогноз развития сосудистых событий.

Методология и методы исследования

Проведено исследование типа серии случаев, состоящее из этапов профилирования и валидации на выборке из 99 пациентов. В ходе исследовательской работы проведен анализ данных отечественных и зарубежных литературных источников, сформирован дизайн исследования, проведены сбор и систематизация данных анамнеза, лабораторных и инструментальных исследований, включая оценку уровня кальциноза коронарных артерий и визуализацию коронарного русла методом МСКТ с внутривенным контрастированием и оценкой коронарного кальциевого индекса. Отобраны образцы плазмы крови, в которых исследовались относительные уровни циркулирующих микроРНК методом микрочипов и полимеразной цепной реакцией реального времени с обратной транскрипцией. Выполнена обработка полученных данных при помощи современного программного обеспечения, полученные результаты сопоставлены с опубликованными исследованиями в рамках схожей проблематики.

Личный вклад автора

Научное исследование, проведенное и представленное в диссертационной работе Рожкова А.Н., выполнено автором самостоятельно на базах Клинического Центра (Университетская клиническая больница №1) и кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» МЗ РФ (Сеченовский Университет).

Автору принадлежит ведущая роль в планировании научной работы, включая определение целей и задач. Также автором самостоятельно проведен, анализ

имеющейся на момент начала исследования литературы, связанной с темой диссертации с последующей разработкой дизайна исследования, набора пациентов, сбора клинических данных, проведения забора крови и подготовки образцов плазмы для дальнейшего анализа, участие в проведении КТ и анализе данных КТ. Определяющим является вклад автора в подготовку базы полученных данных и анализ полученных результатов, формирование выводов и практических рекомендаций.

Положения, выносимые на защиту

1. Уровни miR-143-3p и miR-181b-5p имеют достоверную взаимосвязь с типом атеросклеротической бляшки, классифицированным согласно КТ-критериям уязвимости.

2. Имеется взаимосвязь уровней miR-126-3p и miR-181b-5p с коронарным кальцинозом.

3. Отмечаются положительные корреляции ряда исследуемых микроРНК с возрастом и полом, наличием артериальной гипертензии, значением индекса массы тела, а также уровнем ЛПВП > 1 ммоль/л и скоростью клубочковой фильтрации.

4. Ряд микроРНК (miR-195-5p, -16-5p, -211, -150-5p, -145-5p, -126-3p, -126-5p, -181b-5p), ассоциированных с воспалением, имеет значимые ассоциации рисками сердечно-сосудистых осложнений, определенными по шкалам SCORE2 (+OP), ACC/АНА, Framingham и шкале Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.20. Кардиология. Согласно формуле данной специальности, решается вопрос, связанный с патологией сердечно-сосудистой системы – ишемической болезнью сердца, а именно пунктами: 3 – заболевания коронарных артерий сердца, 6 – атеросклероз, 11 – генетика (генодиагностика и генотерапия) сердечно-сосудистых заболеваний, 13 – современные инвазивные и неинвазивные диагностические технологии у больных с сердечно-сосудистой патологией).

Степень достоверности и апробация результатов

Достаточный размер выборки пациентов, современные и репрезентативные методы исследования, которые позволяют достичь поставленных в работе целей и

задач, обеспечивают достоверность результатов настоящей диссертационной работы. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках. Сбор и систематизация данных, математический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием актуальных методов обработки информации и статистического анализа. Результаты доложены на отечественных и зарубежных конференциях. На заседании кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет) от 25.12.2024 (протокол 12) состоялась апробация диссертационного исследования.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 8 печатных работ, в том числе 5 оригинальных исследований, индексируемых в международных базах (Web of Science, Scopus, PubMed), из них 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России; 2 иные публикации по результатам исследования, 1 публикация в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех стандартных глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов), выводов, практических рекомендаций, а также списка литературы.

Диссертация написана на русском языке в объеме 147 страниц, иллюстрирована 14 таблицами и 15 рисунками. В списке литературы указано 16 отечественных и 263 иностранных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Данная работа по типу является одноцентровым исследованием серии случаев у пациентов с подозрением на коронарный атеросклероз, без клиники типичной стенокардии. Работа осуществлялась в два этапа: профилирование и валидизация результатов исследования циркулирующих микроРНК, в рамках которой проводилась оценка ассоциаций уровней микроРНК с расчётными рисками сердечно-сосудистых катастроф, клинико-демографическими показателями и данными МСКТ.

В исследование были включены пациенты Клинического центра Первого МГМУ имени И. М. Сеченова (Университетская клиническая больница №1). Каждый участник подписал информированное добровольное согласие.

На первом этапе проводился анализ уровней микроРНК в плазме крови малой выборки из 16 бессимптомных пациентов, участвовавших в клиническом исследовании Сеченовского университета. Этой группе исследование КТ-КА проводилось в качестве скринингового. Также использовались способы оценки риска ССО по шкалам SCORE 2, SCORE 2 OP ACC/АНА, Framingham и калькулятору MESA. В качестве независимых переменных рассматривались также курение, пол, возраст, артериальное давление, уровни холестерина. Кроме того, на первом этапе проводилась дифференцировка уязвимых или стабильных атеросклеротических бляшек. Компьютерная томография проводилась на базе отделения лучевой диагностики №2 Университетской клинической больницы №1 Сеченовского Университета.

Исследование микроРНК на первом этапе проводилось на базе лаборатории функциональной геномики сердечно-сосудистых заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный медицинский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова.

На втором этапе исследования условия набора пациентов и проведения КТ исследований были идентичными с первым этапом.

Для валидизации были отобраны микроРНК, показавшие значимые ассоциации с клинико-демографическими данными расчётных рисков ССО. Также, были отобраны микроРНК, значения экспрессии которых обладали широким

разбросом и в рамках выборки малого объема не могли быть включены в анализ на первом этапе. К ним относятся miR-21-5p, 145-5p, 29b-3p, 23a-3p, 181b-5p. Кроме того, было решено ввести еще 9 микроРНК, ассоциированных с коронарным атеросклерозом, отобранных на основании анализа данных научных публикаций.

Исследование микроРНК на втором этапе проводилось на базе лаборатории молекулярной генетики человека ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва.

Итоговый дизайн всего исследования представлен на Рисунке 1.

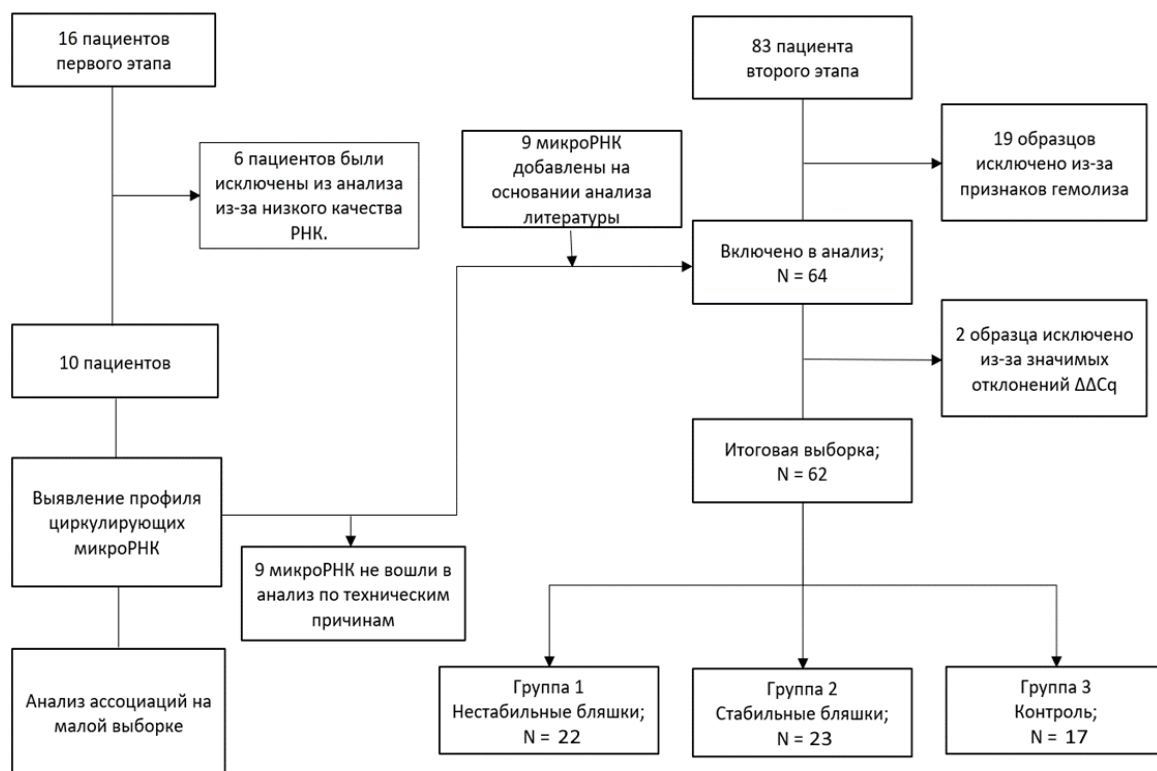


Рисунок 1 – Схематическое изображение дизайна исследования

Критерии соответствия на 1 и 2 этапах идентичны.

В исследование включались пациенты: в возрасте от 18 до 80 лет; имеющие показания к КТА (пациенты с атипичными болями за грудиной с низким или промежуточным риском ССО; бессимптомные пациенты с высоким риском ССО); отказавшиеся от проведения селективной коронарографии; подписавшие информированное добровольное согласие на участие в клиническом исследовании.

В исследование не включались пациенты: с известной на момент включения ИБС или клиникой типичной стенокардии; имевшие любые вмешательства на сердце и коронарных артериях в анамнезе; с известным атеросклерозом коронарных артерий, а также наличие атеросклероза других артериальных бассейнов; страдающие тяжелой сердечной недостаточностью (III–IV классы по

классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации NYHA); имеющие нарушения функции почек со снижением СКФ < 30 мл/мин/1,73м²; беременные и кормящие пациентки; страдающие сахарным диабетом, ожирением при массе тела >120 кг (ограничение обусловлено спецификой томографа); с тяжелыми соматическими заболеваниями, на момент исследования (в том числе онкологическими, системными и воспалительными); с психическими расстройствами, не позволяющими принимать участие в исследовании;

В настоящее исследование не включались пациенты с сахарным диабетом (как 1, так и 2 типов), поскольку указанное заболевание оказывает существенное влияние на работу сердечно-сосудистой системы и, как следствие, на уровни циркулирующих микроРНК. Кроме того, пациенты с сахарным диабетом исходно имеют очень высокий риск сердечно-сосудистых осложнений.

Критерии исключения пациентов из исследования: высокий уровень гемолиза в образцах плазмы крови пациентов; значительный разброс значений экспрессии микроРНК в исследуемых образцах плазмы; нежелание пациента участвовать в исследовании.

Описание медицинского вмешательства

На первом этапе исследование проводилось по уже имевшимся данным КТА. При контакте с пациентом проводился сбор *anamnesis vitae*, *anamnesis morbi*, осмотр пациента, включающий измерение артериального давления и пульса, изучение имеющейся медицинской документации пациента, включая данные лабораторных и инструментальных исследований.

Пациенты приглашались в клиническое исследование, после чего осуществлялся забор до 10 мл венозной крови с последующей подготовкой к исследованию микроРНК. Поскольку дизайн исследования не предполагал проспективного наблюдения, дальнейшее общение с пациентом по клиническим вопросам осуществлялось по телефону или в рамках регулярных визитов к лечащему врачу.

Риски сердечно-сосудистых осложнений по шкалам рассматривались стандартно в качестве низких, средних, высоких и очень высоких для шкал SCORE2, SCORE2 OP и Framingham согласно действующим европейским и

российским клиническим рекомендациям, риски по ACC/АНА и MESA распределялись на низкие, пограничные, умеренные и высокие.

В качестве независимых показателей в исследовании рассматривались: уровни в плазме крови общего холестерина, липопротеидов высокой, низкой и очень низкой плотности, триглицеридов, глюкозы натощак, креатинина, а также индекс массы тела (ИМТ), расчётная скорость клубочковой фильтрации (pСКФ), приём основных кардиотропных препаратов.

Проведение компьютерной томографии коронарной ангиографии осуществлялось на 640-срезовом компьютерном томографе Canon Aquilion ONE (Canon, Япония) с усилением рентгенконтрастным веществом йопромид-370 согласно клиническим протоколам Сеченовского университета на момент выполнения исследований, а также на основе руководства Общества Сердечно-сосудистой Компьютерной Томографии. Анализ рентгенологических изображений осуществлялся на первом этапе исследования.

После разморозки при комнатной температуре и дополнительного центрифугирования в течение 30 минут для каждого образца отбирались по две пробирки с супернатантом объёмом до 10 мкл. Затем производилась серия из трёх спектрофотометрических измерений (для каждой пробирки) на аппарате *Thermo Scientific NanoDrop™ 2000* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, США) с оценкой разницы поглощения излучений 414 нм и 385 нм согласно стандартной формуле $HS = \Delta(A_{414} - A_{385}) + 0,16 * A_{385}$. Длина волны 385 нм, относительно которой осуществляется нормирование значений разницы, является базовой линией сигнала, где не происходит пика гемолиза. При получении значений, превышающих порог $HS \geq 0,25$, образцы исключались из исследования.

Нормализацию данных qPCR для каждой исследуемой микроРНК проводили с использованием значения C_q hsa-miR-16-5p. Для каждой анализируемой микроРНК ее относительный уровень экспрессии в плазме был рассчитан как $\Delta\Delta C_q$ (исследуемая микроРНК - hsa-miR-16-5p). Влияние гемолиза эритроцитов на циркулирующие микроРНК оценивали по обнаруженному qPCR соотношению гемолиз-ассоциированной miR-451a, содержащейся в эритроцитах, и miR-23a-3p, которая не зависит от гемолиза. По техническим причинам лабораторные исследования miR-211-5p, 29a-3p, 30a-5p, 30e-5p, 410-3p, 449a, 656-3p, 9-5p и let-

7b-5p не проводились. Дополнительно было отобрано эквивалентное количество микроРНК на основании данных литературы. К ним относятся miR-143-3p, -223-3p, -146a-5p, 92a-3p и miR-126, представленная двумя разными молекулярными формами -3p и 5p, что не учитывалось многими исследователями, особенно на ранних этапах. Кроме этого, к анализу были добавлены miR-205-5p, которая практически не исследована в рамках ИБС и имеет лишь слабую потенциальную взаимосвязь с уровнем коронарного кальциноза, и miR-150-5p, которая тесно ассоциирована с воспалением, но отсутствовала в наборе первого этапа.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты первого этапа исследования

В исследование изначально вошло 16 пациентов с коронарным атеросклерозом. Из-за признаков гемолиза в образцах крови из исходного числа пришлось исключить шестерых пациентов. Итоговый объем выборки, таким образом, составил 10 пациентов. Характеристики выборки указаны в Таблице 1.

Пациенты распределялись на несколько групп сравнения в зависимости от наличия уязвимых атеросклеротических бляшек или по группам расчётного риска сердечно-сосудистых осложнений для каждой из использовавшихся шкал. Кроме того, оценивались ассоциации уровней исследуемых микроРНК с клинико-демографическими показателями.

Среди всех исследуемых микроРНК достаточной экспрессией для анализа обладали hsa-miR-16-5p, -195-5p, -211-5p, -29a-3p, -30a-5p, -30e-5p, -410-3p, -449a-5p, -656-3p, -9-5p. Также, при сравнительном анализе пациентов, была выявлена «уникальная» экспрессия hsa let-5b-5p в одной из групп, что было также включено в исследование.

Таблица 1 – Клинические характеристики пациентов, разделённых по наличию признаков уязвимости атеросклеротической бляшки по данным КТ

Параметры	Больные с нестабильными атеросклеротическими бляшками (N=5)	Больные со стабильными атеросклеротическими бляшками (N=5)	P-value
Возраст, годы	69,4 ± 10,5	63,4 ± 7,4	0,33
Женский пол, %	40	40	1,00
Курящие, %	40	40	1,00
ИМТ, кг/м ²	27,99 ± 2,45	26,73 ± 3,86	0,55
Креатинин, мкмоль/л	82,12 ± 5,45	95,70 ± 14,48	0,08

Продолжение таблицы 1

рСКФ по СКД-ЕРІ, мл/мин/1,73 м ³	71,74 ± 16,79	62,05 ± 7,09	0,27
Общий холестерин, ммоль/л	5,86 ± 1,06	5,29 ± 1,04	0,42
Триглицериды, ммоль/л	1,60 ± 0,93	1,20 ± 0,43	0,41
ЛПНП, ммоль/л	3,31 ± 1,29	3,25 ± 0,82	0,93
ЛПВП, ммоль/л	1,37 ± 0,18	1,62 ± 0,61	0,40
Кальциевый индекс, AU	35,6	196,6	0,08
Шкала CadRads, баллы	2,0	2,2	0,35
Шкала ACC/АНА, баллы	22,2	11,2	0,13
Шкала Framingham, баллы	15,3	7,6	0,12
Шкала SCORE, баллы	7,0	5,6	0,71
Шкала MESA, баллы	9,8	15,04	0,23

ИМТ – индекс массы тела; рСКФ – скорость клубочковой фильтрации; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛПВП – липопротеины высокой плотности.

Формирование групп пациентов проводилось как по наличию признаков уязвимости атеросклеротической бляшки, так и по группам исходного расчётного риска ССО.

Ассоциация уровней микроРНК с типом атеросклеротических бляшек

Клинические характеристики пациентов с уязвимыми и стабильными бляшками отражены выше в Таблице 5. Исследуемые группы не имели статистически значимых различий по всем клиническим и демографическим показателям. В то же время обращает на себя внимание наличие разницы уровней коронарного кальциноза, не достигшей статистической значимости. Дополнительно стоит отметить, что по шкалам SCORE2, Framingham и ACC/АНА риск сосудистых осложнений в группе уязвимых бляшек оценивался более значимым, чем по шкале MESA, что объясняется более низким уровнем кальциноза уязвимых бляшек. Тем не менее, между группами разницы в расчётных рисках ССО не отмечалось. При сравнении уровней циркулирующих микроРНК в исследуемых группах пациентов значимое ($p = 0,032$) различие отмечалось для let-7b-5p. Различие было вызвано тем, что данная микроРНК обнаруживалась только в плазме крови пациентов с уязвимыми бляшками и отсутствовала в группе стабильных. Другие уровни циркулирующих микроРНК в исследуемых группах значимо не отличались.

Ассоциация уровней микроРНК с показателями риска сердечно-сосудистых катастроф

Показатели риска ССО формируются исходя из возраста, пола, уровней артериального давления, холестерина и ряда других факторов. Согласно распределению пациентов на стандартные для каждой шкалы группы, а также на группы с расчётными показателями более или менее 10% была произведена соответствующая оценка уровней циркулирующих микроРНК, значимые отличия которых отражены на рисунке 2.

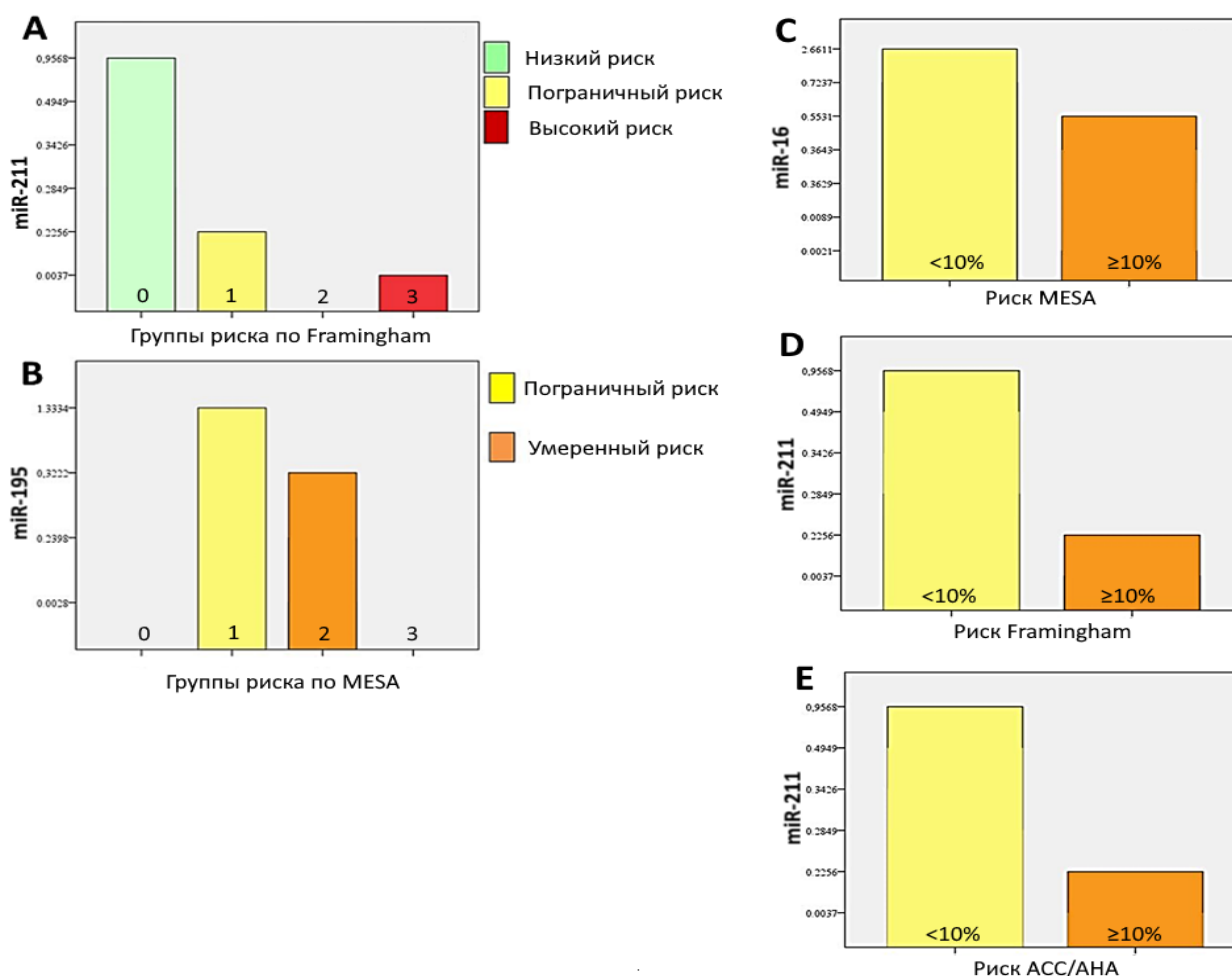


Рисунок 2 – ассоциации уровней микроРНК с показателями расчетного риска ССО по шкалам Framingham, MESA и ACC/АНА

Так, при использовании шкалы MESA и разделении по группам риска или по границе 10%, для пациентов с более низким риском отмечалось повышение относительных уровней miR-16-5p (Рис. 2С) и -195-5p (Рис. 2В). Для остальных шкал, в которых отсутствует в качестве модификатора значение КИ, разница ($p < 0,05$) отмечалась только для циркулирующей miR-211-5p (Рис. 2А, D, E). В подгруппах пациентов с более высоким риском ССО отмечалось снижение этой

микроРНК, причём для шкалы Framingham отмечалось проградIENTное снижение по мере роста риска.

Ассоциация уровней микроРНК с клинико-демографическими характеристиками пациентов

Анализ ассоциаций с клинико-демографическими показателями пациентов проводился без распределения по группам ввиду маленькой выборки. Тем не менее, ряд циркулирующих микроРНК продемонстрировал значимые взаимосвязи. Так, уровни циркулирующих miR-16-5p показали значимую корреляцию с индексом массы тела пациента ($p = 0,034$). С ИМТ также положительно коррелирует уровень miR-30a-5p ($p = 0,029$). Наибольшее количество положительных корреляций у исследуемых микроРНК было с уровнем липопротеидов низкой плотности, статистическую значимость показали уровни miR-29a-3p, -30a-5p, -30e-5p и let-7b-5p. Последняя микроРНК также имела положительную корреляцию с уровнем креатинина плазмы крови. Уровни циркулирующей в плазме miR-195-5p обладали значимой отрицательной корреляцией с индексом массы тела ($p = 0,003$) и положительной с уровнем ЛПВП ($p = 0,005$). Положительная корреляция с женским полом регистрировалась для miR-410-3p ($p = 0,046$), также эта микроРНК отрицательно коррелировала со статусом курения ($p = 0,046$). Интересно, что уровни miR-211-5p, сниженные в группах более высокого расчётного риска ССО, имели положительную корреляцию с возрастом пациентов ($p = 0,021$). Положительная корреляция с возрастом выявлена и для miR-9-5p, уровень которой также имел положительную корреляцию с уровнем общего холестерина.

Результаты второго этапа исследования

Исследование второго этапа предполагалось провести на 83 пациентах. Однако при анализе образцов плазмы 19 пациентов было исключено из-за признаков гемолиза. Ещё 2 пациента исключены из-за значительного разброса значений ΔCq . Итоговая выборка для анализа особенностей профиля циркулирующих микроРНК, таким образом, составила 62 пациента.

Анализ профиля циркулирующих микроРНК в итоговой выборке

Пациенты были распределены на три группы: с мягкими бляшками (группа 1), стабильными бляшками (группа 2) и без коронарного атеросклероза – контрольная (группа 3). Характеристики пациентов приведены в Таблице 4.

Таблица 4 – Характеристики пациентов итоговой выборки второго этапа

Параметр	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p-value
Возраст	62,18	67,09	65,94	0,217
ИМТ	30,04	27,69	28,36	0,152
SCORE2(+OP)	3,84	3,93	4,32	0,765
АТР III	9,77	10,16	8,14	0,622
АСС/АНА	12,02	17,04	17,38	0,333
MESA	9,26	14,52	3,62	<0,001
КИ (AU)	45,50	336,78	0,00	0,003
Глюкоза	5,81	5,16	5,18	0,007
Креатинин	88,42	87,73	86,46	0,925
СКФ (СКД-ЕРI)	69,43	64,90	67,14	0,609
Холестерин	5,94	5,34	5,73	0,287
Триглицериды	1,92	1,38	1,39	0,030
ЛПНП	3,78	3,33	3,61	0,424
ЛПВП	1,33	1,42	1,56	0,162
Параметр, %	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p-value
Женский пол	59,09	82,61	76,47	0,192
Атипичная стенокардия	45,45	34,78	0,00	0,006
Гипертензия	95,45	82,61	88,24	0,395
АГ 3 степени	50,00	43,48	41,18	0,842
ФВ> 50%	90,91	95,65	88,24	0,679
Парокс.я форма ФП	9,09	13,04	41,18	0,027
Курящие	18,18	13,04	5,88	0,524
Принимаемые группы препаратов				
Статины	36,36	73,91	41,18	0,025
иАПФ	31,82	34,78	23,53	0,739
БРА	36,36	52,17	29,41	0,312
Бета-блокаторы	72,73	52,17	47,06	0,211
БКК	36,36	39,13	11,76	0,137
НОАК	13,64	4,35	35,29	0,029
АСК	31,82	47,83	35,29	0,514

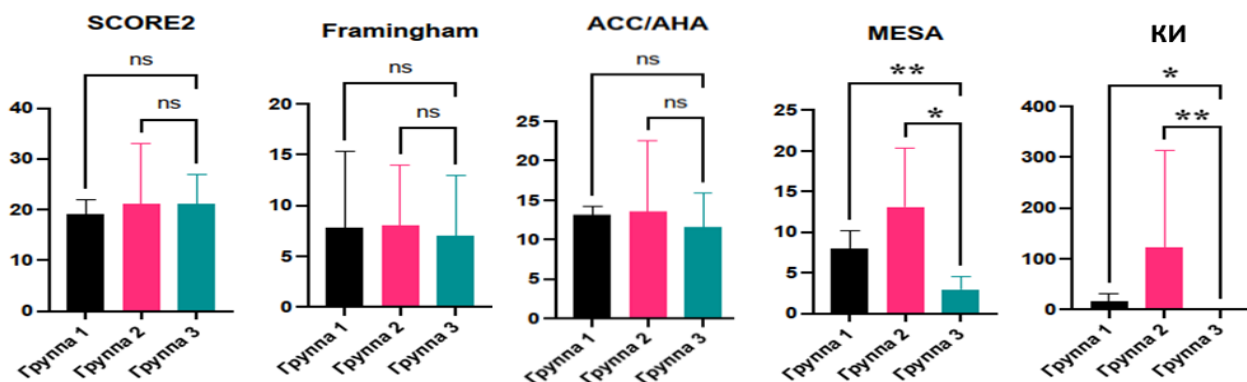
В рамках этой части исследования определялись уровни 15 циркулирующих микроРНК: miR-21-5p, -23a-3p, -29b-3p, -92a-3p, -126-3p, -126-5p, -143-3p, -145-5p, -146a-5p, -150-5p, -181b-5p, -195-5p, -205-5p и -451a.

В группах пациентов со стабильными и уязвимыми бляшками не регистрировалось значимых различий по полу и возрасту, значениям расчётных рисков сосудистых осложнений (SCORE2(+OP), Framingham (АТР III), АСС/АНА), индексу массы тела, уровням креатинина, холестерина, липопротеидов высокой, низкой и очень низкой плотности, а также СКФ.

В группе контроля отсутствовали пациенты с атипичной стенокардией, при этом в ней отмечалось значимое количество пациентов с пароксизмальной формой

фибрилляции предсердий. Между группами закономерно наблюдалась разница степени коронарного кальциноза (Рисунок 5).

В группе с уязвимыми бляшками преобладали пациенты с более высокими значениями глюкозы и триглицеридов в плазме крови, а в группе со стабильными бляшками большее количество пациентов получало статины.



Тест Крускалла-Уоллиса с поправкой Данна для попарного сравнения

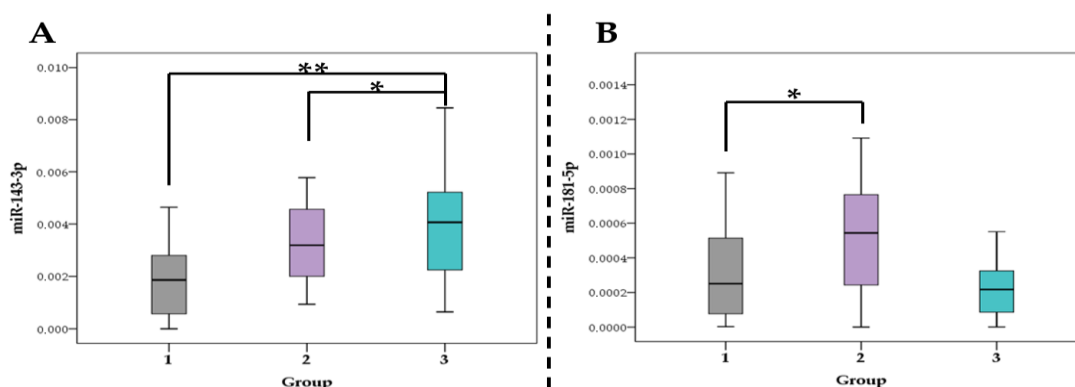
Рисунок 5 – Сравнение значений риска ССО, определённого согласно шкалам SCORE2(+OP), Framingham (АТРИИ), ACC/АНА, MESA, а также по значениям

КИ: Группа 1 – уязвимые бляшки, Группа 2 – стабильные бляшки,

Группа 3 – контроль; КИ – кальциевый индекс; * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$

Ассоциация уровней микроРНК с типом атеросклеротических бляшек

Проведенный сравнительный анализ относительных уровней циркулирующих микроРНК на втором этапе продемонстрировал значимые отличия экспрессии miR 143-3p (Рисунок 6А), и miR 181-5p (Рисунок 6В) в исследуемых группах пациентов.



1 – группа пациентов с уязвимыми бляшками; 2 – группа пациентов со стабильными бляшками; 3 – контрольная группа. Непараметрический тест сравнения множественных групп Крускалла-Уоллиса в связи с распределением данных, отличных от нормального. Парное сравнение выполнено с использованием теста Манна-Уитни. Данные экспрессии представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{стандартное отклонение}$. Уровень $p < 0,05$ считался статистически значимым. А * - $p\text{-value} = 0,0457$, ** - $p\text{-value} = 0,0046$. В * - $p\text{-value} = 0,0179$

Рисунок 6 – Результаты сравнения значений экспрессии микроРНК у пациентов с различными характеристиками атеросклеротических бляшек

Анализ ROC-кривых показал умеренную предикторную способность данных микроРНК (рисунок 7А и 7Б).

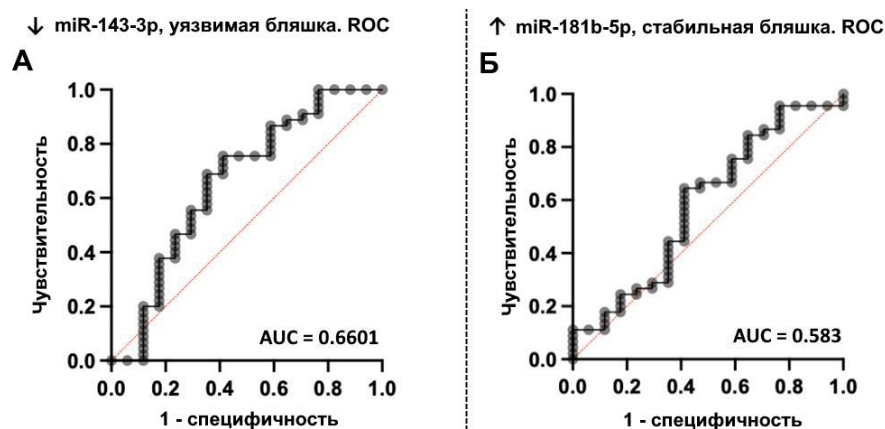


Рисунок 7 – Результаты анализа чувствительности и специфичности снижения относительных уровней циркулирующей miR-143-3p в плазме крови в качестве маркера уязвимости атеросклеротической бляшки и повышения miR-181b-5p в качестве маркера стабильности атеросклеротической бляшки

Для оценки возможной связи показателей экспрессии выбранных микроРНК с развитием атеросклеротического поражения и стабильность бляшки был использован метод простой логистической регрессии. Несмотря на отсутствие статистически значимых отличий, вызванным малым объемом выборки пациентов, обращает на себя внимание то, что более высокие значения циркулирующей miR 126-5p в полтора раза чаще выявлялись в кумулятивной группе пациентов с атеросклерозом, чем в контрольной, а также повышенные уровни в плазме крови miR 92a-3p в 2,5 раза чаще отмечались в группе пациентов с уязвимыми бляшками.

Ассоциация уровней микроРНК с расчётными значениями риска сердечно-сосудистых катастроф

При оценке различий уровней микроРНК у пациентов, имеющих разные риски по наиболее популярным популяционным системам оценки, для SCORE2 и Framingham не было получено достоверных отличий. При оценке по ACC/АНА получены значимые ($p < 0,05$) отличия уровней hsa-miR-21-5p, 92a-3p, 126-3p, 146a-5p, 150-5p, 181b-5p для пациентов с риском $>7,5\%$ и $> 10\%$.

Рассматривая ассоциации с методами оценки рисков, включающими уровень коронарного кальциноза, уровни hsa-miR-195-5p у пациентов значимо повышались при расчётном риске по MESA, превышающем порог в 7,5% ($p < 0,05$), соответствующий положению между пограничным и промежуточным риском.

Интересно, что в то же время у пациентов с нулевым значением коронарного кальция уровни данной микроРНК также были выше ($p = 0,039$). У пациентов с высоким ($100+$ AU) уровнем КИ отмечалось значимое ($p = 0,036$) повышение уровней циркулирующей miR-181b-5p.

Анализ линейных взаимоотношений показал значимую ($p = 0,0164$) связь уровней miR-145-5p с расчетным риском по АСС/АНА, а также связь ($p = 0,0484$) уровней miR-126-3p со значениями КИ.

Учитывая ассоциации с уровнем КИ, miR-126-3p продемонстрировала потенциальную способность ($p = 0,03$) выявления значимых ($>70\%$) стенозов, согласно данным КТ (Рисунок 10).

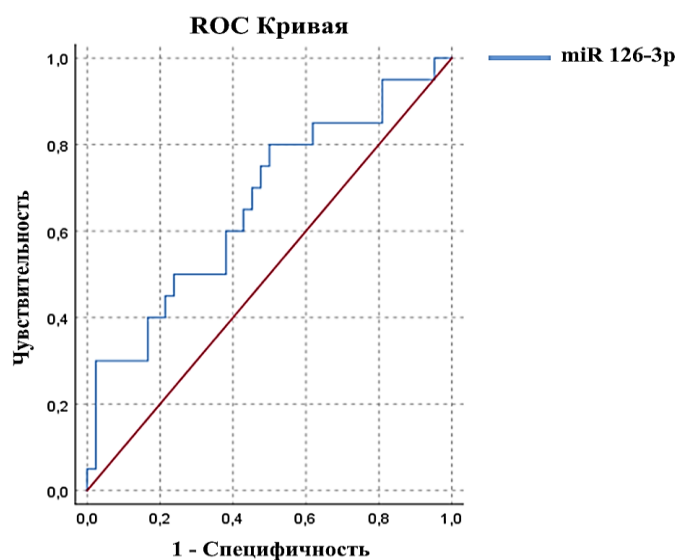


Рисунок 10 – Чувствительность и специфичность использования относительного уровня miR-126-3p в плазме крови в выявлении гемодинамически значимых стенозов по данным КТ

Ассоциация уровней микроРНК с различными клинико-демографическими характеристиками

Значимые ассоциации, наблюдаемые для анализируемых микроРНК представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Ассоциации уровней микроРНК с различными клинико-демографическими данными пациентов

	Атипичная стенокардия	СКФ>60 (мл/мин/1,73м ²)	ЛПВП>N* (ммоль/л)	ЛПВП>1,55 (ммоль/л)	Мужской пол	Возраст	ИМТ	АГ
miR-195-5p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,048	>0,05
miR-126-3p	>0,05	>0,05	>0,05	0,027	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
miR-126-5p	0,031	>0,05	>0,05	0,025	>0,05	0,018	>0,05	>0,05
miR-21-5p	>0,05	0,017	>0,05	>0,05	0,028	0,0001	>0,05	>0,05
miR-223-3p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,041
miR-145-5p	>0,05	>0,05	0,029	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
miR-146a-5p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,031	0,0001	>0,05	0,036
miR-150-5p	>0,05	0,041	>0,05	0,034	>0,05	0,001	>0,05	>0,05
miR-181b-5p	>0,05	0,037	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примечания:

СКФ – скорость клубочковой фильтрации (по формуле СКД-EPI);

ЛПВП – липопротеиды высокой плотности, N* - условные нормальные значения, составляющие 1,0 ммоль/л для мужчин и 1,2 ммоль/л для женщин;

ИМТ – индекс массы тела, АГ – артериальная гипертензия.

Салатовым цветом обозначены положительные корреляции, голубым - отрицательные.

ВЫВОДЫ

1. Были определены ассоциации miR-143-3p ($p = 0,0046$) и miR-181b-5p ($p = 0,0179$) с типом атеросклеротической бляшки, определяемом по КТ-ангиографии. Повышение уровней циркулирующей miR-143-3p может свидетельствовать о наличии уязвимых атеросклеротических бляшек, в то время как miR-181b-5p может служить маркером стабильности. Также, в качестве потенциального маркера уязвимости атеросклеротической бляшки можно считать let-7b-5p.

2. Отмечается линейная взаимосвязь уровней циркулирующих miR-126-3p с уровнем коронарного кальция ($p = 0,0484$), а ассоциация miR-181b-5p с коронарным кальцинозом выявлена впервые (КИ > 100 AU; $p = 0,036$).

3. Отмечаются положительные корреляции с возрастом уровней для miR-126-5p, -21-5p, -146a-5p, -150-5p; корреляции с уровнем ЛПВП для miR-126-3p, -126-5p, -145-5p, -150-5p; положительные корреляции со скоростью клубочковой фильтрации для miR-21-5p, -150-5p, -181b-5p; положительные корреляции с мужским полом для miR-21-5p; -146a-5p; положительные корреляции с наличием артериальной гипертензии для miR-223-3p, -146a-5p и отрицательная корреляция уровня miR-195-5p с индексом массы тела.

4. Профилирование провоспалительных микроРНК, проведенное методом чипов на малой выборке показало значимые ассоциации miR-16 ($p = 0,034$ при MESA > 10%), 211 ($p = 0,042$ при Framingham > 10%; $p = 0,042$ при ACC/ANA

> 10%) и 195-5p ($p = 0,027$ между группами риска MESA) с рисками сердечно-сосудистых осложнений. Результаты пилотного исследования частично были валидизированы на более крупной выборке: подтвердилась ассоциация miR-195-5p ($p < 0,05$) с риском сердечно-сосудистых осложнений по шкале MESA. При исследовании ассоциаций микроРНК с рисками ССО >10% по ACC/АНА значимые результаты отмечены для miR-126-5p ($p = 0,0412$), miR-150-5p ($p = 0,0149$) и miR-145-5p ($p = 0,0164$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Возможно использование циркулирующих miR-143-3p и 181b-5p в качестве маркеров стабильности атеросклеротического процесса.
2. Оценка уровней циркулирующих miR-195-5p, 126-5p, 150-5p, 145-5p может служить дополнительным модификатором риска сердечно-сосудистых осложнений.
3. Применение лучевых методов диагностики значительно точнее определяет расчётные риски сердечно-сосудистых катастроф, способствует уточнению рисков сердечно-сосудистых осложнений. Использование КТ-коронарографии и оценки коронарного кальциноза позволят определить необходимость начала терапии статинами, а также точнее определить целевые уровни ЛПНП.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ел Манаа, Х. Э. / Оценка динамики показателей нестабильности атеросклеротической бляшки по данным МСКТ коронарных артерий на фоне терапии аторвастатином // Российский электронный журнал лучевой диагностики // Х.Э. Ел Манаа, М.С. Шабанова, Д.Г. Гогниева, А.А. Ломоносова, Д.Ю. Щекочихин, **А.Н. Рожков**, М.А. Шария, С.К. Терновой, Ф.Ю. Копылов, А.Л. Сыркин // **Российский электронный журнал лучевой диагностики**. 2018. – Т. 8, № 3. – С. 164-173. URL: <https://doi.org/10.21569/2222-7415-2018-8-3-164-173>. [Scopus]
2. **Рожков, А.Н.** / Возможности использования МСКТ коронарных артерий для определения риска сердечно-сосудистых катастроф у бессимптомных пациентов // А.Н. Рожков, Д.Ю. Щекочихин, Е.С. Тебенькова // Профилактическая медицина. 2020. – Т. 23, № 4. – С. 108-114. URL: <https://doi.org/10.17116/profmed202023041108>.

3. **Рожков, А.Н.** / Анализ уровней, циркулирующих микро-РНК у пациентов с коронарной болезнью сердца при различной степени риска развития сердечно-сосудистых осложнений. Корреляция с данными МСКТ-КА // А.Н. Рожков, Д.Ю. Щекочихин, Н.М. Баулина // **Вестник Российской академии медицинских наук**. 2020. – Т. 75, № 4. – С. 283-291. URL: <https://doi.org/10.15690/vramn1325>. [**Scopus**]
4. **Rozhkov, A.N.** The International Conference on Nuclear Cardiology and Cardiac CT 2021. CT-based cardiovascular risk stratification benefits in asymptomatic patients / A.N. Rozhkov, D. Yu. Shchekochikhin, P. Yu. Kopylov // *EJ- Cardiovascular Imaging*. 2021, (3). URL: <https://doi.org/10.1093/ehjci/jeab111.021>.
5. Нго Билонг Э.А.В. / Апрегуляция микроРНК 23А-3Р, 146А-5Р И 150А-5Р как возможный диагностический маркер нестабильной стенокардии у пациентов с аневризмой грудной аорты // Э.А.В. Нго Билонг, **А.Н. Рожков**, Ю.О. Митина, С.В. Васильев, А.В. Желанкин, Э.В. Генерозов, Д.Ю. Щекочихин, С.К. Терновой, А.С. Аксельрод // **Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия**. 2022. – Т. 15, № 4. – С. 385-392. URL: <https://doi.org/10.17116/kardio202215041385>. [**Scopus**]
6. **Rozhkov, A.N.** The Profile of Circulating Blood microRNAs in Outpatients with Vulnerable and Stable Atherosclerotic Plaques: Associations with Cardiovascular Risks / A.N. Rozhkov, D.G. Gognieva, P. Yu. Kopylov // *Non-Coding RNA*. 2022, 8, 47. URL: <https://doi.org/10.3390/ncrna8040047>.
7. Ngo Bilong E.A.V. / Evaluation of microRNA Expression Features in Patients with Various Types of Arterial Damage: Thoracic Aortic Aneurysm and Coronary Atherosclerosis // E.A.V. Ngo Bilong, **A.N. Rozhkov**, D. Yu. Shchekochikhin, N.A. Novikova, P. Yu. Kopylov, A.A. Bestavashvili, T.V. Ivanova, A.V. Zhelankin, E.V. Generozov, D.N. Konanov, A.S. Akselrod // **Journal of Personalized Medicine**. 2023, 13(7), 1161. URL: <https://doi.org/10.3390/jpm13071161>. [**Scopus, Web of Science, PubMed**]
8. **Рожков, А.Н.** / Сопоставление лучевых и нелучевых методов стратификации риска сердечно-сосудистых катастроф у бессимптомных пациентов // А.Н. Рожков, Д.Ю. Щекочихин, Е.С. Тебенькова, // **Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия**. 2023;16(2):190–198. URL: <https://doi.org/10.17116/kardio202316021190>. [**Scopus**]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСС – Американский колледж кардиологии
АНА – Американская ассоциация сердца
АТР-III – Adult Treatment Panel III (Фрамингемская шкала риска)
AU – Agatson units (единицы Агатсона)
CAD-RADS
MESA – Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis
SCORE – The Systematic Coronary Risk Evaluation
АСК – ацетилсалициловая кислота
БКК – блокаторы кальциевых каналов
БРА – блокаторы рецепторов ангиотензина
ГМК – гладкомышечные клетки
иАПФ ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента
ИМТ – индекс массы тела,
КИ – кальциевый индекс
КТ-КА – компьютерная томография коронарная ангиография
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
ЛПОНП – липопротеины низкой плотности
НОАК – новые оральные антикоагулянты
ОКС – острый коронарный синдром
pСКФ – скорость клубочковой фильтрации
ССО – сердечно-сосудистые осложнения