

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
НЕПРЕРЫВНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Рыткин Эрик Игоревич

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

14.03.06 - Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Сычев Дмитрий Алексеевич

Научный консультант:
кандидат медицинских наук
Мирзаев Карин Бадавиевич

Москва - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Микро-РНК и ингибиторы P2Y ₁₂ рецепторов	20
1.2. Микро-РНК и ривароксабан	30
1.3. Микро-РНК: какое семейство выбрать?	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	36
2.1. Характеристика пациентов, участвующих в исследовании	37
2.2. Определение уровней экспрессии микро-РНК	42
2.3. Определение полиморфизмов генов, ответственных за метаболизм препаратов	44
2.4. Измерение остаточной реактивности тромбоцитов с помощью прибора VerifyNow.....	51
2.5. Определение активности изофермента CYP3A4 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	53
2.6. Статистическая обработка результатов	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
3.1. Оценка взаимосвязи между уровнем экспрессии микро-РНК и уровнем остаточной реактивности тромбоцитов	56
3.2. Оценка взаимосвязи между уровнем экспрессии микро-РНК и наличием полиморфизмов генов	64
3.3. Оценка взаимосвязи между уровнем экспрессии микро-РНК и коагулологическими параметрами	70
3.4. Выбор микро-РНК для включения в наборы по персонализации антитромботических препаратов	73

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	81
ВЫВОДЫ	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	93

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации

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. Подобная дестабилизация целевой мРНК является во многом причиной снижения продукции белка. Как сообщают источники, такое снижение доходит до 85%. Таким образом, микро-РНК влияют на фенотип клетки, подстраивая трансляцию белка и, тем самым, регулируют экспрессию гена [5, 47, 94]. Многочисленные семейства микро-РНК экспрессируются во всех органах, тканях, на всех стадиях развития [48]. Они также способны воздействовать на РНК сотен других генов-мишеней [40]. Данная особенность делает их значимым регулятором генома. Микро-РНК влияют в значительной степени на регуляцию индивидуального развития, апоптоза, пролиферации, клеточной дифференциации и организации структуры хромосом. Всякое нарушение экспрессии микро-РНК может привести к диабету, аутоиммунным, сердечно-сосудистым и онкологическим заболеваниям [39, 94].

Микро-РНК также регулируют экспрессию многих ADME генов (Absorption, distribution, metabolism, excretion - абсорбции, распределения, метаболизма и выведения). Данные гены могут определять резистентность

организма к лекарственным средствам [45, 54, 131, 132]. Таким образом, они способны регулировать экспрессию генов. Данная особенность делает их потенциальным инструментом персонализации терапии антитромботическими препаратами при различных сердечно-сосудистых патологиях.

В ряде работ уже имеются описания генов-мишеней системы ADME для ряда семейств микро-РНК: *ABCB1* [107], *CYP2C19*, *CYP3A4* и *CYP2C9* [88]. Данные исследования убедительно доказали, что miR-27 регулирует *CYP1B1* и *CYP3A4* [120], а miR-378, в свою очередь, воздействует на экспрессию *CYP2E1* [76]. В исследованиях было продемонстрировано, что некоторые микро-РНК обладают способностью регулировать экспрессию нескольких ферментов. Подобная ситуация отмечается у miR-130 с генами-мишенями *CYP2C9*, *CYP2A6* и *CYP2C19* [88]. Опосредованная регуляция экспрессии ферментов также отмечена для микро-РНК miR-148, miR-24, miR-34a. В результате подавления miR-148 гена *PXR* уменьшается экспрессия *CYP3A4* [115]. MiR-24 и miR-34a способны понижать уровень ядерного фактора гепатоцитов 4-альфа, опосредованно влияя на *CYP7A1* [85, 115].

Высокий уровень циркулирующих miR-27, miR-106, miR-133, miR-145, miR-181, miR-218 и miR-326 приводит к повышению эффективности терапии паклитакселом и цисплатином у пациентов с раком яичников за счет подавления активности гена *ABCB1*, кодирующего эффлюксный транспортер Р-гликопротеин [107]. Примечательны результаты исследований по подавлению экспрессии гена *CYP2C19* при помощи miR-29a-3p [132] и miR-34 [54]. В клинической практике это означает, что подобного рода подавление экспрессии гена ключевого фермента биотрансформации антиагрегантного препарата клопидогрела приводит к нарушению фармакологического ответа. И в такой ситуации применение данного антиагреганта увеличивает частоту тромботических событий у пациентов, применяющих данный антиагрегант [94].

Результаты исследований также показали, что уровень микро-РНК-142 способен оказывать влияние на метаболизм клопидогрела. Микро-РНК-142 регулирует экспрессию гена *CYP3A4*. Это подтверждается достоверной корреляцией уровня микро-РНК-142 с активностью изофермента *CYP3A4* и концентрацией клопидогрела в плазме пациентов. Имеются также данные о том, что высокий уровень плазменной miR-142 связан с большим риском серьезных сердечно-сосудистых осложнений. Исходя из этого, микро-РНК-142 может рассматриваться как прогностический маркер при сердечно-сосудистых заболеваниях [94, 130].

Поскольку микро-РНК способны влиять на уровень экспрессии гена *CYP3A4*, эффективность терапии препаратом ривароксабан, следовательно, также зависит от уровня микро-РНК.

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 [101, 137]. MiR-26a, как отмечается в исследованиях, достоверно коррелирует с резистентностью к клопидогрелу у больных с острым коронарным синдромом в случаях чрескожного коронарного вмешательства [101]. Небезынтересным является наблюдение, что при переводе пациента с терапии клопидогрелом на терапию тикагрелором, у больных с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов отмечалось значимое снижение уровней miR-150, miR-223 и miR-126[19].

Таким образом, **актуальность темы** диссертации заключается в том, что микро-РНК могут быть биомаркерами недостаточной эффективности лекарственных препаратов; определение уровней их экспрессии позволит прогнозировать индивидуальный ответ и снизить число жизнеугрожающих

событий, что особенно важно в случае применения антитромботических препаратов.

Степень разработанности проблемы

Несмотря на сделанный 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 генов системы ADME. Данный анализ представляется важным для использования микро-РНК в персонализированном подходе к терапии сердечно-сосудистых патологий.

Проведение этих 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 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, подвергшихся чрескожному коронарному вмешательству.

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

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 найдены статистически значимые корреляции между уровнями экспрессии микро-РНК и показателями коагуляции у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий. Проанализированы наиболее значимые полиморфизмы генов системы ADME как для клопидогрела и тикагрелора, так и для ривароксабана; оценена их связь с уровнями экспрессии плазменных микро-РНК.

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.

Теоретическая и 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.

Соответствие паспорту специальности

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

Методология и методы исследования

Теоретической базой настоящего исследования являются имеющиеся результаты ранее проведенных исследований, установивших наличие ассоциаций между фармакодинамическими, фармакогенетическими маркерами и клинической эффективностью, безопасностью лекарственной терапии препаратами из группы ингибиторов P2Y₁₂- рецепторов, применяемыми для антиагрегантной терапии пациентов, подвергшихся чрескожному коронарному вмешательству [65–67, 70–72, 91, 112, 138]. Данной проблеме посвящены отечественные и зарубежные публикации по фармакогенетике антиагреганта из группы ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов клопидогрела. Данные исследования явились базой для разработки и валидации персонализированных алгоритмов применения клопидогрела для антиагрегантной терапии пациентов, подвергшихся эндоваскулярным вмешательствам по поводу острого коронарного синдрома [73, 91, 92, 110, 114]. В основе теоретической части данного исследования лежат также работы отечественных и зарубежных ученых, установивших ассоциации между фармакодинамическими, фармакогенетическими маркерами и клинической эффективностью, безопасностью лекарственной терапии из препаратов группы прямых оральных антикоагулянтов, применявшихся у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий. Данные исследования посвящены фармакогенетике ривароксабана [23, 50, 65, 75, 81, 109, 112].

Методологическая база исследования представляет собой комплексное использование фармакодинамических (оценка остаточной реактивности тромбоцитов) и фармакогенетических методов (выявление полиморфизмов генов-кандидатов, определение экспрессии циркулирующей микро-РНК в плазме) для разработки персонализированного подхода к антиагрегантной терапии у пациентов с острым коронарным синдромом, подвергшихся чрескожному коронарному вмешательству и персонализированному подходу

к назначению ривароксабана у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий.

Методы, использованные в работе:

-метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (определение 17 полиморфизмов для клопидогрела, 6 полиморфизмов для тикагрелора и 4 полиморфизмов для ривароксабана);

-определение экспрессии микро-РНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени ;

-высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС) для определения концентраций кортизола и 6-бета-гидрокортизола в моче (фенотипирование CYP3A4 по метаболическому отношению 6-бета-гидрокортизол/кортизол) [122];

-определение остаточной реактивности тромбоцитов с помощью определения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов [138];

-клинические, лабораторные методы оценки коагулологического состояния пациентов.

Предметом исследования является поиск новых биомаркеров для прогнозирования фармакодинамических эффектов антитромботических препаратов.

Объектом исследования являются пациенты с острым коронарным синдромом, проходящие лечение на базе кардиологических отделений ГКБ имени С.П. Боткина, а также пациенты с неклапанной фибрилляцией предсердий, проходящие лечение на базе ГБУЗ Госпиталь для ветеранов войн №2.

Внедрение результатов работы

Результаты диссертационного исследования, а именно: использование новых фармакотранскриптомных биомаркеров для прогнозирования особенностей фармакодинамических эффектов у пациентов, принимающих

клопидогрел, тикагрелор, ривароксабан, а также алгоритм для поиска релевантных микро-РНК внедрены в НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Основные положения, выносимые на защиту по результатам исследования

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.
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.

Личный вклад автора

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

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты диссертационного исследования прошли апробацию с применением сертифицированного оборудования, предназначенного для проведения фармакогенетического исследования, определения уровней экспрессии микро-РНК, уровней остаточной реактивности тромбоцитов, а также адекватных методов статистической обработки данных. Выборка исследования включает достаточное число случаев для значимых результатов. Поставленные цели и задачи определили выбор соответствующих методов и методик исследования. Положения, выносимые на защиту, полученные выводы и практические рекомендации по результатам исследования, подтверждаются актом проверки первичного материала (от 09.11.2020).

Основные положения работы были апробированы на IV Международном Форуме Антикоагулянтной и Антиагрегантной Терапии (ФАКТplus2019), 21-23 марта, 2019 года в Москве, XIV Международном научном конгрессе «Рациональная фармакотерапия», 17-19 октября, 2019 года в Санкт-Петербурге, XXVII Российском Национальном Конгрессе "Человек и Лекарство", 6-9 апреля, 2020 года в Москве, VI Ежегодном научном конгрессе «Вотчаловские чтения», 28 мая, 2020 года в Москве, V

Международном Форуме Антикоагулянтной и Антиагрегантной Терапии (ФАКТplus2020), 29-31 октября, 2020 года в Москве.

Результаты работы были обсуждены на заседании кафедры клинической фармакологии и терапии имени академика Б.Е. Вотчала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России и НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (протокол № от 09.11.2020).

Публикации автора

Автором данного диссертационного исследования опубликованы по теме диссертации:

- 2 статьи в рецензируемых научных изданиях из списка рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации (также входят в базу данных SCOPUS, Q4);

- 5 статей в зарубежных рецензируемых научных изданиях, входящих в базу данных SCOPUS (из них Q1 - 2 статьи, Q2 - 2 статьи, Q4 - 1 статья).

- опубликованы тезисы в зарубежных рецензируемых научных изданиях, индексируемые в SCOPUS, Q1 - 2 тезиса; в российских научных изданиях, индексируемые в РИНЦ - 1 тезис.

Объем и структура диссертации

Объем диссертационного исследования составляет 105 страниц машинописного текста, в том числе 11 таблиц и 11 рисунков. Диссертационная работа состоит из Введения, трех глав (Глава 1 даёт литературный обзор; Глава 2 посвящена анализу материалов и методов исследования, Глава 3 описывает результаты собственного исследования); выводов по главам, Заключение, Выводов, Практических рекомендаций и Списка литературы. Список литературы включает 139 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данной главе описываются результаты исследований отечественных и зарубежных авторов, посвященных рассматриваемой проблеме. Исследователи определяют микро-РНК как короткие некодирующие цепочки РНК, состоящие из последовательности 21 нуклеотидов [58, 93, 94, 105]. Предшественники микро-РНК образуются в ядре клетки и имеют двухцепочечную структуру, в виде «шпильки». В ходе сборки цепочки микро-РНК из ядра пре-микро-РНК транспортируются в цитоплазму. Под влиянием ферментов в цитоплазме из одного плеча «шпильки» формируется молекула микро-РНК. Предшественник микро-РНК образуется из геномной ДНК, в результате чего появляется промежуточная форма – пре-микро-РНК. В пре-микро-РНК образуется петля, которая подвергается двухстадийной обработке. Вначале эндонуклеаза Droscha отрезает шпильку пре-микро-РНК. Шпилька пре-микро-РНК переносится в цитоплазму, где распознается ферментом Dicer, который отрезает петлю от пре-микро-РНК. В результате этого образуется структура зрелой микро-РНК, которая является составной частью комплекса RISC (РНК-индуцируемого комплекса выключения гена). Микро-РНК может связаться с мРНК или полностью или частично, то есть на 8, 6, или 7 нуклеотидов [93]. При полной комплементарности микро-РНК происходит деградация мРНК, а при неполной – ингибирование трансляции и снижение продукции белка.

Микро-РНК регулируют эффекторные молекулы, включая деацетилазы гистонов, чьи модификации, в свою очередь, при воздействии реакций ацетилирования, метилирования и фосфорилирования остатков лизина, играют ключевую роль в регуляции генной экспрессии. На основе распознавания нуклеотидной последовательности информационной РНК происходит регуляция экспрессии генов при участии микро-РНК. Изменения экспрессии генов осуществляются через модуляцию процесса трансляции

(ингибирование или стимуляция) с помощью микро-РНК, что приводит на последнем этапе к снижению выхода белкового продукта гена [10].

В ходе эволюционного развития мРНК разных генов приобрели сайты для микро-РНК [10]. Увеличение сайтов микро-РНК приводит к уменьшению выхода белка. Связывание микро-РНК с мРНК может пройти или полностью, или частично, то есть на 8, 6, или 7 нуклеотидов [108].

Неполное связывание мРНК с микро-РНК ведет к снижению трансляции, а полное связывание ведет к разрушению мРНК. И такая дестабилизация целевой мРНК может являться причиной снижения продукции белка до 85% [10].

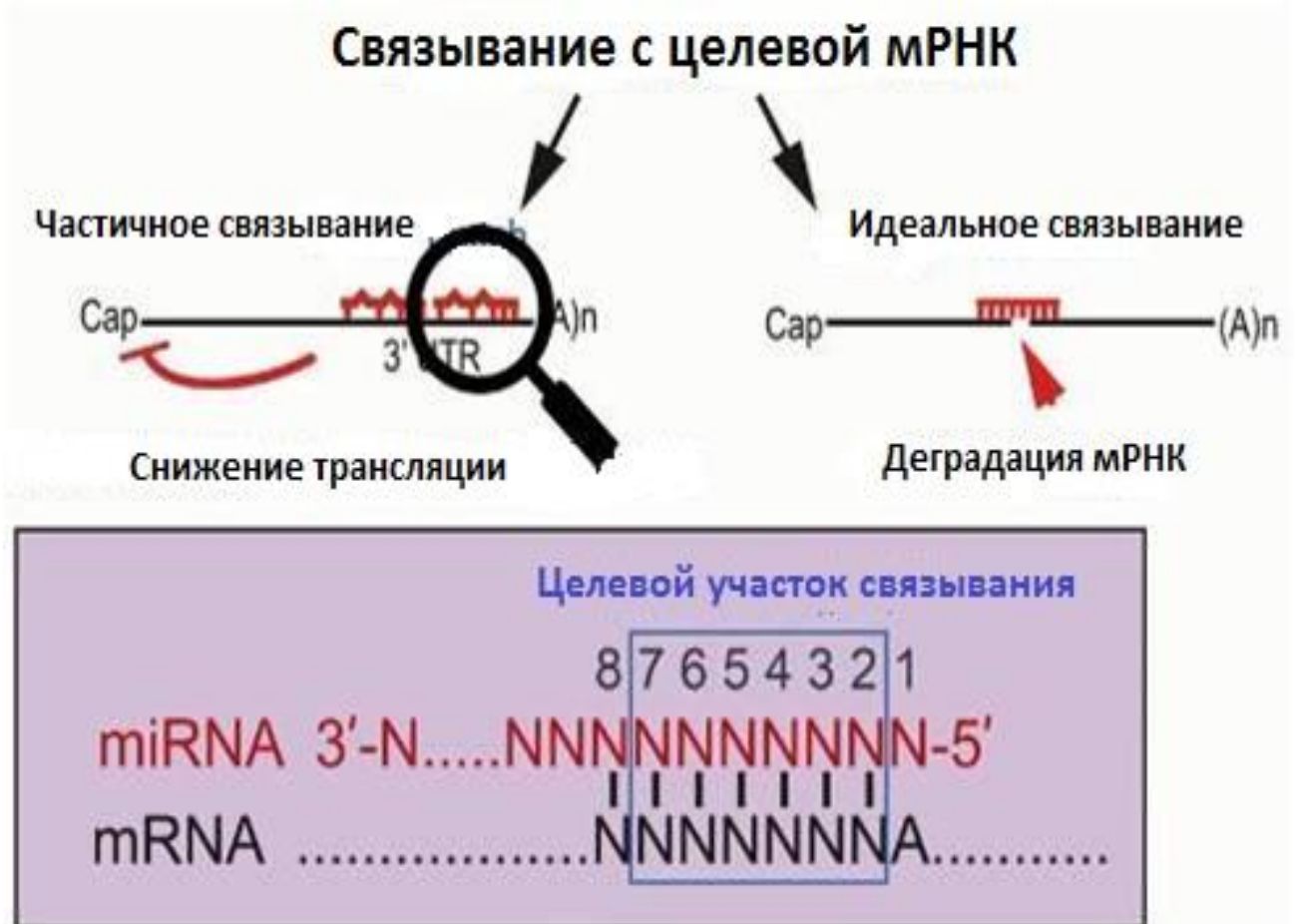


Рисунок 1.1- Механизм связывания микро-РНК с целевой мРНК и исходы взаимодействия микро-РНК и мРНК в зависимости от количества связавшихся нуклеотидов (адаптировано из Bartel и др., 2009)

Как видно из рисунка 1.1, экспрессия белка осуществляется на минимальных уровнях при неполном связывании мРНК с микро-РНК. Регулируя трансляцию белка, микро-РНК влияют на фенотип клетки, и, таким образом, регулируют экспрессию гена.

Практически все ткани организма, на всех стадиях развития содержат микро-РНК [10]. Микро-РНК свободно циркулирует в плазме крови и содержится в тромбоцитах. При этом, в тромбоциты переходит не только микро-РНК из мегакариоцитов, но и вся своеобразная «фабрика» по сборке микро-РНК. Поскольку микро-РНК содержится в тромбоците, то, очевидно, что микро-РНК может участвовать в регуляции экспрессии рецепторов тромбоцитов, например P2Y₁₂ рецепторов.

Принято подразделять микро-РНК, содержащиеся преимущественно в тромбоцитах, так называемые тромбоцитарные микро-РНК, и содержащиеся в плазме, так называемые плазменные или циркулирующие. В связи с тем, что микро-РНК присутствуют во всех тканях организма требуется своеобразное разделение терминологии [128].

Исследования Wang и др. по исследованию уровней микро-РНК конкретных семейств показали, что разница в конкретных семействах микро-РНК значительна в зависимости от того, какой материал для исследования забирался. Если определялись семейства микро-РНК в образцах плазмы, то они показывали высокую концентрацию одних семейств микро-РНК, которые впоследствии стали называть плазменные или циркулирующие. Если же в том же исследовании концентрация семейств микро-РНК определялась в образцах цельной крови, то уровни концентраций микро-РНК показывали преобладание отличных семейств микро-РНК от тех, которые наблюдались в исследовании образцов плазмы. В связи с этим Wang и др. сделали вывод, что семейства микро-РНК, которые преобладают в тромбоцитах отличаются от тех, которые циркулируют в плазме [126].

На данный момент имеются накопленные данные, касающиеся использования микро-РНК в качестве биомаркера, согласно которым микро-

РНК играют важную роль в регуляции ADME генов (absorbtion, distribution, metabolism, excretion) и в качестве «медиаторов токсичности» [132]. Согласно данным исследований отечественных и зарубежных авторов, каждому полиморфизму изоферментов цитохрома Р-450, принимающих участие в метаболизме препаратов- ингибиторов P2Y12 рецепторов, соответствует микро-РНК, которая принимает участие в регуляции экспрессии гена, который ответственен за данный изофермент. Важной особенностью микро-РНК является то, что одна и та же микро-РНК может принимать участие в регуляции экспрессии нескольких изоферментов. Таким образом, микро-РНК это высокочувствительный биомаркер, обладающий ограниченной специфичностью [79, 88].

До настоящего времени влияние генетических факторов на экспрессию цитохрома CYP3A4/5 изучено недостаточно. Уровень экспрессии гена, кодирующего цитохром CYP3A4/5, различен, в результате чего различается и клиническая картина пациентов. Такую особенность возможно объяснить генетическими и эпигенетическими механизмами, регулируемыми гены ферментов, которые принимают участие в биотрансформации антиагрегантных препаратов. Различия в экспрессии микро-РНК могут быть тем определяющим фактором, от которого зависит вариабельность функционирования ферментов [116].

Определенная специфичность микро-РНК для ферментов биотрансформации лекарственных средств открывает широкие возможности для прогнозирования индивидуальных показателей фармакокинетики антитромботических препаратов. МикроРНК обеспечивают эпигенетический механизм регуляции экспрессии ферментов, участвующих в метаболизме лекарств, включая такие важные ферменты биотрансформации как CYP3A4, CYP2E1, CYP1B1, и SULT1A1. Изменение уровней микро-РНК в человеческом организме может влиять на индивидуальную вариабельность экспрессии CYP2C19. Экзогенные и эндогенные уровни CYP2C19 в клетках печени и почек, как было обнаружено, демонстрировали негативную

корреляцию с уровнем микроРНК miR-29. Данная микро-РНК функционирует как негативный регулятор CYP2C19 через целевую последовательность нуклеотидов в кодирующем участке *CYP2C19*.

Проведенные ранее исследования показали, что высокий уровень экспрессии микро-РНК-142 связан с низкой экспрессией генов *CYP3A5* и *CYP3A4*. Высокий уровень микро-РНК-142 может напрямую ингибировать трансляцию мРНК *CYP3A4/5*, помимо этого не напрямую ингибировать активность *CYP3A*. Таким образом, происходит замедление процессов образования активного метаболита многих лекарственных средств, и ингибиторы P2Y₁₂-рецепторов являются одними из них.

1.1. Микро-РНК и ингибиторы P2Y₁₂ рецепторов

Наиболее часто применяемыми ингибиторами P2Y₁₂ рецепторов являются препараты клопидогрел и тикагрелор [35, 41, 121]. Оба препарата входят в рекомендации по лечению ишемической болезни сердца, рекомендованы в составе схем двойной антиагрегантной терапии у пациентов, перенёсших острый коронарный синдром, проведенным чрескожным коронарным вмешательством и имплантированным стентом в коронарную артерию [96, 106, 133]. Применение ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов в составе двойной антиагрегантной терапии показало достоверное снижение вероятности тромбоза имплантированного стента и наступления больших сердечно-сосудистых катастроф по сравнению с приемом аспирина в качестве единственного антиагреганта [13, 139]. Клопидогрел необратимо связывается с рецептором P2Y₁₂ АДФ тромбоцитов, и этим объясняется его фармакологическое действие [123]. Таким образом, клопидогрел является пролекарством, и ему требуется биотрансформация ферментами цитохромов системы P450, в первую очередь CYP2C19, для превращения из пролекарства в активный метаболит [68, 70, 91, 92, 114]. Полиморфизмы одноименного гена, кодирующего изофермент CYP2C19, вызывающие потерю функции этого гена, являются весьма

распространенными в популяции [29, 91, 92, 113]. По данным некоторых источников, до 40% популяции могут быть носителями таких значимых полиморфизмов [92]. И, конечно, неоднородность носительства данных полиморфизмов в разных этнических группах является предметом пристального изучения объединенных усилий популяционных генетиков и клинических фармакологов во всем мире [2]. Особенно востребованными являются подобные исследования на территории Российской Федерации вследствие этнического разнообразия народов, проживающих на ее территории [2, 34, 65, 67, 69, 73, 74, 110, 113].

Пациенты с наличием значимых полиморфизмов генов обладают измененной способностью к превращению пролекарства в активный метаболит, а значит и прогнозирование фармакодинамических эффектов у таких пациентов является затруднительным [97, 134, 135]. Не только вышеупомянутые полиморфизмы гена *CYP2C19* могут оказывать влияние на фармакодинамические эффекты клопидогрела [17]. По данным базы данных PharmGKB, таких значимых полиморфизмов генов, участвующих в метаболизме клопидогрела на разных этапах, насчитывается тридцать шесть. Такое большое количество генов, участвующих на разных этапах в метаболизме клопидогрела и способных приводить к измененным фармакодинамическим эффектам, осложняет не только прогнозирование его эффектов, но и возможность проведения фармакогенетического исследования [20–22]. Действительно, широко известно фармакогенетическое тестирование на наличие полиморфизмов гена *CYP2C19*. Это обусловлено тем, что накопилась "критическая масса" исследований, проведенных на многих тысячах пациентов разных этнических групп, подтверждающих прогностическую значимость результатов фармакогенетического тестирования конкретных полиморфизмов данного гена [31, 98, 103, 104, 125]. Но для остальных 36 полиморфизмов генов, участвующих в метаболизме клопидогрела, такая "критическая масса" исследований пока не накопилась, однако есть

исследования, подтверждающие их высокую прогностическую значимость [18, 20, 53, 62, 73, 104].

Для носителей полиморфизмов гена *CYP2C19* тактика для прогнозирования эффектов клопидогрела весьма очевидна, благодаря недавно полученным результатам двух исследований POPular Genetics и TAILOR-PCI [26, 84]. В многочисленных ретроспективных анализах было показано, что пациенты получающие клопидогрел и имеющие одну (промежуточный метаболитатор) или две (плохой метаболитатор) аллели *CYP2C19*, вызывающие потерю функции фермента, показали значительно более высокий риск возникновения основных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий после чрескожного коронарного вмешательства [68, 70, 91, 92, 114].

В исследование POPular Genetics Berg и др. включили 2488 пациентов с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, проходящих первичное чрескожное коронарное вмешательство с мая 2012 по апрель 2018. Пациенты были распределены на две группы по итогам рандомизации: первая часть получала стандартную двойную антиагрегантную терапию тикагрелор или прасугрел с аспирином в течение 12 месяцев; второй части пациентов проводилось фармакогенетическое исследование с определением значимых полиморфизмов гена *CYP2C19*, и в зависимости от результатов фармакогенетического исследования пациенты получали или клопидогрел в составе двойной антиагрегантной терапии, или альтернативный P2Y12 ингибитор, такой как тикагрелор или прасугрел [26].

Результаты этого исследования POPular Genetics показывают, что генетическое тестирование не уступает стандартному подходу в отношении назначения ингибиторов P2Y12 рецепторов по первичной комбинированной конечной точке: смерти от всех причин, инфаркту миокарда, тромбозу стента, инсульту или кровотечению по критериям исследования PLATO (5,1% против 5,9%; P для не меньшей эффективности < 0.001). Кроме того,

подход на основе результатов генетического тестирования превосходил стандартный подход в отношении назначения ингибиторов P2Y12 рецепторов по конечной точке больших и малых кровотечений по критериям исследования PLATO (9,8% против 12,5%; $P = 0.04$) (Рисунок 1.1). Причем, различия между когортами в отношении других вторичных конечных точек отсутствовали.

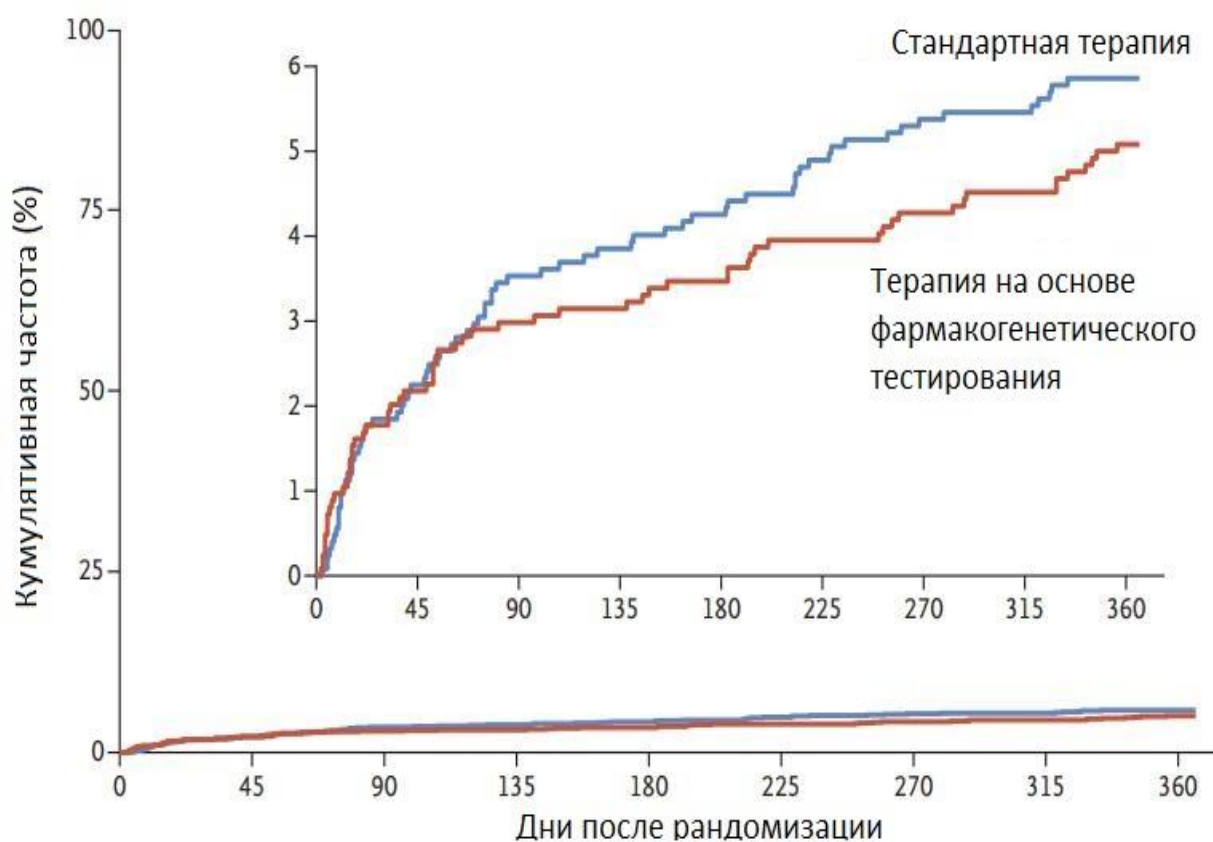


Рисунок 1.2 - Кривые Каплана-Мейера, демонстрирующие разницу в конечных точках между группами пациентов исследования POPular Genetics в зависимости от выбора стратегии назначения двойной антиагрегантной терапии (адаптировано из Claassens и др., 2019)

Также опубликованы результаты другого исследования TAILOR-PCI по назначению ингибиторов P2Y12-рецепторов в зависимости от результатов определения полиморфизмов генов у пациентов, перенесших чрескожное коронарное вмешательство. В исследовании приняли участие 5302 пациента,

распределенных на две группы после рандомизации. Пациенты первой группы получали терапию на основе фармакогенетического тестирования: 85% носителей полиморфизмов гена *CYP2C19* получали тикагрелор и 15% получали клопидогрел. Пациенты второй группы получали стандартную двойную антиагрегантную терапию с клопидогрелом [84]. Разница в первичной конечной точке между двумя группами не достигла определенной значимости (ОР, 0.66 [95% ДИ, 0.43-1.02]; $P = .06$), тем не менее, она составила 1.8 % (5.85% стандартной терапии против 4.03% в группе терапии на основе фармакогенетического тестирования) (Рисунок 1.2).

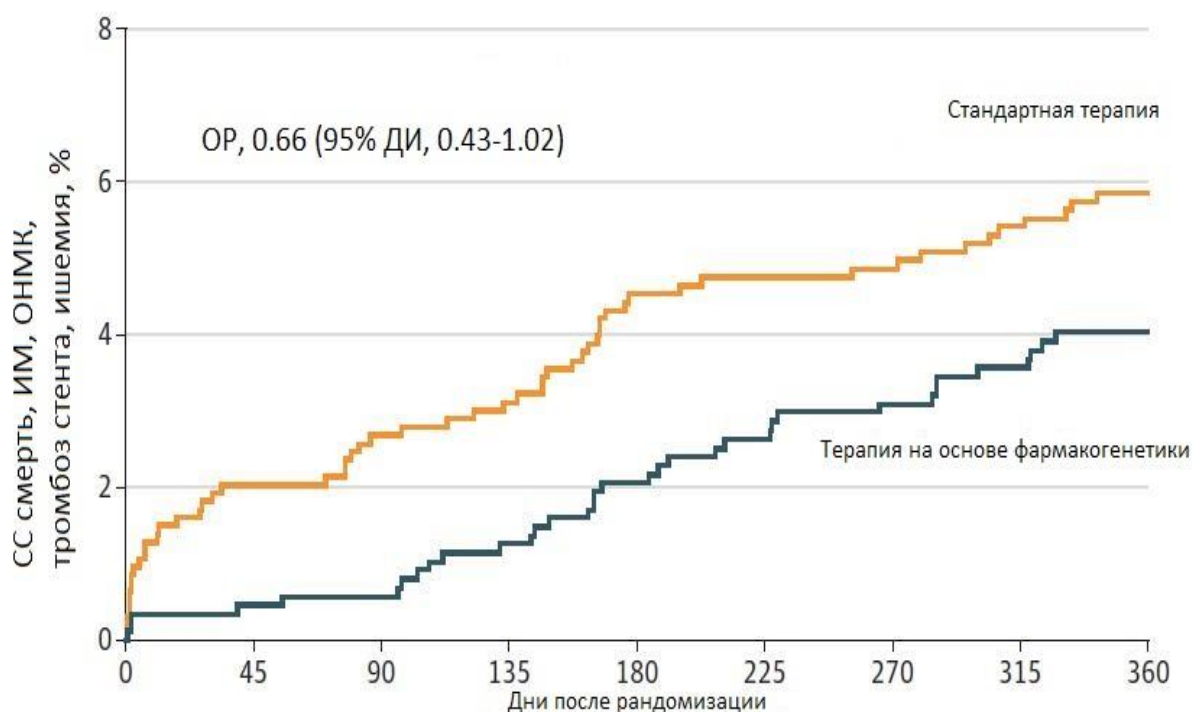


Рисунок 1.3 - Кривые Каплана-Мейера, демонстрирующие разницу в конечных точках между группами пациентов исследования TAILOR-PCI в зависимости от выбора стратегии назначения двойной антиагрегантной терапии (адаптировано из Pereira и др., 2020)

Данные два исследования POPular Genetics и TAILOR-PCI демонстрируют преимущества назначения ингибиторов P2Y12 рецепторов на основе результатов фармакогенетического тестирования. Но они оба оценивали генетику пациентов и наличие значимых полиморфизмов,

оказывающих влияние на метаболизм P2Y₁₂-ингибиторов только по гену CYP2C19, для которого есть убедительная доказательная база, и они не включали более 30 других значимых полиморфизмов.

В отличие от клопидогрела, у ингибитора P2Y₁₂ рецепторов тикагрелора есть особенности биотрансформации. Несмотря на то, что сам тикагрелор является активным веществом, часть его метаболизируется с превращением в эквипотентный метаболит тикагрелора. В данном превращении принимают участие на разных уровнях следующие изоферменты: SLCO1B1, UGT2B7, CYP3A4/CYP3A5 [94, 127].

И значимые полиморфизмы в генах, кодирующих эти изоферменты, также могут оказывать влияние на эффективность тикагрелора. Пусть это влияние и не настолько ярко проявляется, как в случае с клопидогрелом, поскольку тикагрелор не является пролекарством и сам активен в отношении ингибирования P2Y₁₂ рецепторов [123, 124].

Еще одним способом прогнозировать фармакодинамические эффекты ингибиторов P2Y₁₂ рецепторов является измерение остаточной реактивности тромбоцитов [108]. На данный момент, одним из самых востребованных и распространенных способов измерения антиагрегантного эффекта при приеме ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов является измерение АДФ-индуцированной агрегации с помощью агрегометра “VerifyNow” (“Accumetrics”, California, USA). [6, 16, 18, 37, 51, 55, 61, 83, 94]. Каждый тест-картридж системы “VerifyNow” предназначен для отдельного пациента и содержит лиофилизат, состоящий из микросфер, покрытых человеческим фибриногеном, а также агонист тромбоцитов – аденозиндифосфат (АДФ). Способность GP IIb/IIIa рецепторов на активированных тромбоцитах связываться с микросферами, покрытыми фибриногеном человека, лежит в основе данного способа тестирования агрегации. При этом активированные тромбоциты подвергаются воздействию микросферами, покрытыми фибриногеном, и агглютинация происходит пропорционально числу имеющихся тромбоцитарных рецепторов. Прибор агрегометр “VerifyNow”

предназначен для измерения развивающейся агглютинации по пропорциональному увеличению прохождения света. На основе измерения остаточной реактивности тромбоцитов при помощи измерения АДФ-индуцированной агрегации был построен дизайн большого исследования TROPICAL-ACS [7]. В этом исследовании приняли участие 2610 пациентов, которые были рандомизированы на две группы [7]. Первая группа пациентов получала прасугрел, а другой группе пациентов проводилась деэскалация терапии с прасугрела на клопидогрел на основе измерения остаточной реактивности тромбоцитов. Результаты исследования продемонстрировали значимое увеличение тромботических событий у пациентов с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов, как, впрочем, и увеличение числа кровотечений у пациентов с очень низкой остаточной реактивностью тромбоцитов (Рисунок 1.3).

Рисунок 1.4



Рисунок 1.4 - Разница в относительных рисках между пациентами с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов и пациентами с низкой остаточной реактивностью тромбоцитов в исследовании TROPICAL-ACS (адаптировано из Aradi и др., 2019)

Таким образом, измерение остаточной реактивности тромбоцитов с помощью проведения анализа измерения АДФ-индуцированной агрегации для выбора подходящего ингибитора P2Y₁₂-рецепторов оправдано и позволяет снизить наступление нежелательных сердечно-сосудистых событий у пациентов с острым коронарным синдромом, перенесших чрескожное коронарное вмешательство без проведения фармакогенетического тестирования.

Однако, у измерения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов как метода измерения остаточной реактивности тромбоцитов есть свои недостатки [63, 64]. Высокая стоимость картриджей для тест-системы является самым главным недостатком. Также существует вероятность недостоверности измерений у пациентов с высоким гематокритом. Метод требователен ко времени. Он должен быть выполнен в промежуток времени от 20 минут до 4 часов после взятия образца крови; вне данного временного промежутка достоверность анализа следует подвергать сомнению. К недостаткам тест-систем по измерению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов можно отнести также высокую частоту аппаратных ошибок, что делает картридж с образцом крови неподлежащим дальнейшему повторному анализу. Это может потребовать перезабора крови средним медицинским персоналом с использованием новой вакуумной пробирки, нового картриджа. Данные аппаратные ошибки означают удорожание анализа в два раза, доставляют неудобство как среднему медицинскому персоналу, так и пациентам.

Таким образом, у врачей кардиологов существует неудовлетворенная потребность в новом биомаркере, который будет отражать весь комплекс разнообразных генетических вариантов, которые могут присутствовать у пациента, принимающего определенный препарат, и которые могут оказывать влияние на фармакодинамические эффекты приема данного препарата. В случае с антиагрегантами данный биомаркер также должен прогнозировать уровень остаточной реактивности тромбоцитов, заменив

метод измерения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Применение данного биомаркера также должно быть быстрым, простым, без использования специфической редкой аппаратуры, давать надежный воспроизводимый результат измерения. Таким биомаркером могут служить определенные семейства микро-РНК, как было показано в исследованиях, которые были проведены совсем недавно [14, 24, 36, 93, 117].

Помимо рассмотренной в начале главы связи микро-РНК с активностью изоферментов и транспортеров лекарственных средств, в исследованиях обнаружена их ассоциация с реактивностью тромбоцитов и эффективностью таких антиагрегантов, как клопидогрел и тикагрелор [9, 11, 15, 25, 30].

Работа Chen et al. фокусирует внимание на специфических маркерах микро-РНК тромбоцитов, ассоциированных с возникновением и развитием резистентности к клопидогрелу [24]. Как подчеркивают авторы, микро-РНК тромбоцитов обладают способностью участвовать в регуляции транскрипции тромбоцитарного везикулярно-ассоциированного мембранного белка. Последовательный количественный ПЦР-анализ выявил значительное повышение экспрессии miR-26 в тромбоцитах у пациентов со слабым ответом на терапию клопидогрелом. Исходя из этого, можно предположить, что экспрессия miR-26 в тромбоцитах связана с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов. Закономерен вывод, что miR-26 может принимать участие в регуляции активности тромбоцитов на фоне применения клопидогрела [24].

Ряд исследований был также посвящен измерению изменения уровней микро-РНК у пациентов, получающих терапию прасугрелом и аспирином [128]. Данные исследования выявили те семейства микро-РНК, уровни экспрессии которых подвержены изменению при применении антиагрегантов.

Исследователи Carino et al. изучили влияние смены ингибитора рецептора-P2Y₁₂ с клопидогрела на тикагрелор на уровни экспрессии микро-

РНК у пациентов, перенесших острый коронарный синдром. [19]. Исследование выявило, что со сменой антиагреганта, уровни микро-РНК у пациентов изменялись как в сторону повышения, так и понижения, в зависимости от семейства микро-РНК. Таким образом, среди авторов работ по исследованию микро-РНК существует консенсус о необходимости, прежде всего, отдавать предпочтение изучению панели из семейств микро-РНК и изменению их уровней относительно друг друга, нежели изучению индивидуальных изменений уровня каждой микро-РНК [19, 91].

Авторы исследования Kondkar et al. пришли к выводу, что гетерогенность ответа на клопидогрел коррелирует с экспрессией микро-РНК тромбоцитов у пациентов с ИБС [52]. MiR-223 может регулировать экспрессию рецептора P2Y₁₂. Снижение уровня miR-223 ассоциируется с изменённым ответом на клопидогрел. Это позволяет прогнозировать, что miR-223 может служить новым маркером при оценке уровня ингибирования рецептора P2Y₁₂. Экспрессия miR-223 и miR-96 может влиять на эффективность терапии клопидогрелом у пациентов с ишемической болезнью сердца [102].

В качестве вывода к данной главе по анализу литературы о перспективах применения микро-РНК в качестве нового биомаркера прогнозирования фармакодинамических эффектов антиагрегантов можно отметить, что с микро-РНК как новым биомаркером связаны большие надежды среди исследовательского сообщества, так как обнаруживается взаимосвязь уровней экспрессии некоторых семейств микро-РНК с уровнями остаточной реактивности тромбоцитов, а также имеется корреляция между уровнем экспрессии семейств микро-РНК и наличием значимых полиморфизмов генов, участвующих на разных этапах метаболизма антиагрегантов. Поэтому в данной диссертационной работе приводятся результаты как взаимосвязи уровней экспрессии избранных семейств микро-РНК с восемнадцатью (из 36 известных) значимыми полиморфизмами генов, участвующими в метаболизме клопидогрела и тикагрелора, так и результаты

исследования остаточной реактивности тромбоцитов, измеренной при помощи прибора VerifyNow. Результаты, представленные в данной диссертационной работе, призваны дополнить результаты имеющихся исследований и помочь определить перспективные семейства микро-РНК, которые могли бы использоваться в качестве биомаркеров антиагрегантного эффекта ингибиторов P2Y₁₂ рецепторов.

1.2. Микро-РНК и ривароксабан

За последние 10 лет возможности для применения коагулянтов были значительно расширены благодаря введению антикоагулянтов прямого действия. Таким ингибитором фактора Ха является ривароксабан [42, 89]. Одним из преимуществ, которым обладает ривароксабан по заявлению производителя, является то, что при назначении ривароксабана в фиксированных дозах не требуется рутинный мониторинг ни фармакокинетики, ни фармакодинамики [27, 42, 89, 109].

Существует доказанная корреляция между высокой плазменной концентрацией прямых оральных антикоагулянтов и частотой кровотечений, а также корреляция между низкими плазменными концентрациями прямых оральных антикоагулянтов, измеренными в первый месяц терапии, и тромбоэмболическими событиями [87, 119]. Поскольку терапевтический лекарственный мониторинг не является рутинной процедурой и не требуется, согласно заверениям производителя, существуют только предполагаемые терапевтические окна для различных прямых оральных антикоагулянтов, которые были определены клиническими исследованиями. В частности, для ривароксабана C_{\min} варьирует в диапазоне 6-87 нг/мл. Данные исследований показали 15-кратное изменение концентрации ривароксабана в плазме крови при среднем уровне 40 нг/мл, причем почти у 40% пациентов оно выходит за пределы терапевтического диапазона [99, 113]. Исследования также показали, что концентрация препарата, а следовательно, и эффект, зависят от многих параметров, начиная от межлекарственных взаимодействий с

другими лекарственными веществами, состояния функции почек, до индивидуальных генетических особенностей организма [86, 90].

Ривароксабан метаболизируется с помощью изоферментов цитохрома P450: CYP3A4, CYP2C8 и CYP2J2. Также в его метаболизме принимают участие BCRP и р-гликопротеин, кодируемый *ABCB1*. Сычев и др. говорят о значимой корреляции между активностью CYP3A и концентрацией ривароксабана в крови у пациентов с тромбозом глубоких вен [111].

Полиморфизмы гена *ABCB1*, кодирующие р-гликопротеин, были изучены в нескольких клинических исследованиях. Имеется более 100 полиморфизмов гена *ABCB1*, среди которых *rs2032582 (C.2677G>T)* и *rs1045642 (C.3435C>T)*, влияние которых является значимым [8, 43]. Такие полиморфизмы как *C.2677G>T* и *C.3435C>T* часто документируются как гаплотипы. Частота гаплотипов TT у европеоидной популяции составляет около 25-40% [59]. Согласно недавно опубликованному сообщению, у пациентов, гомозиготных по гаплотипу (*C.2677G>T; TT* и *C.3435C>T; TT*), отмечается более высокая концентрация препарата в плазме, выше период полураспада, а значит, и повышенный риск кровотечений [59]. Фармакогенетическое исследование пациентов, принимающих ривароксабан, может быть оправдано, особенно у пациентов с такими факторами риска, как почечная недостаточность и пациентов, одновременно принимающими ингибиторы CYP3A5 [23, 28, 50, 59, 81, 82, 129].

Таким образом, для мониторинга эффективности применения ривароксабана существует всего несколько опций: изменение концентрации препарата в крови, измерение АЧТВ и протромбинового времени, фармакогенетическое тестирование.

Измерение концентрации препарата в крови не доступно большинству медицинских центров, и доступно лишь немногим лабораториям [8, 33, 44, 46, 59, 77, 78, 95]. Измерение АЧТВ и протромбинового времени не является специфичным для измерения эффективности препарата, и, скорее, характеризует общее состояние каскада свёртывающей системы крови.

Фармакогенетическое тестирование также необходимо проводить по множеству генов, чтобы выделить тех пациентов, кому необходим терапевтический лекарственный мониторинг [1, 8, 28, 43, 82, 111].

Итак, в случае с ривароксабаном, так же как и с выше рассмотренными ингибиторами P2Y₁₂ рецепторов, у кардиологов существует неудовлетворённая потребность в универсальном биомаркере, который бы позволил прогнозировать фармакодинамические эффекты ривароксабана, а также выделить тех пациентов, кому требуется терапевтический лекарственный мониторинг. И таким универсальным биомаркером могут стать определенные семейства микро-РНК.

Литературный поиск при помощи MeSH терминов "miRNA", "microRNA", "DOAC", "rivaroxaban" в различных комбинациях таких международных баз медицинских статей как PubMed и ClinicalKey не дал ни одного релевантного результата. Это, очевидно, свидетельствует о том, что до данного исследования никто не пытался оценить роль микро-РНК не только среди пациентов, принимающих ривароксабан, но и в принципе среди пациентов на прямых оральных антикоагулянтах.

Тем не менее, исследовались корреляции уровней экспрессии микро-РНК у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий. Несмотря на отсутствие упоминаний о том, какой антикоагулянт получали пациенты, были выделены следующие микро-РНК: miR-150, miR-146, miR-375 [12, 58, 80, 100]. В исследовании пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий после процедуры абляции устьев легочных вен проводилось сравнение уровней следующих микро-РНК: miR-22, miR-126 и miR-142 [80].

Таким образом, очевидно, что микро-РНК представляют интерес в качестве биомаркеров у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий, и были предприняты попытки исследовать уровень экспрессии определенных семейств микро-РНК; однако, никто пока не исследовал роль микро-РНК как биомаркеров, прогнозирующих эффект прямых оральных антикоагулянтов.

Ввиду отсутствия упоминания в литературе возможных кандидатов на роль фармакотранскриптомных биомаркеров, было решено для подбора кандидатов микро-РНК воспользоваться универсальным алгоритмом подбора микро-РНК, описанным в данной диссертационной работе. Такими кандидатами оказались miR-142 и miR-39. Их ассоциация с коагулологическими параметрами, а также с наличием значимых полиморфизмов и исследовалась в данной диссертационной работе.

1.3. Микро-РНК: какое семейство выбрать?

В начале работы необходимо было решить проблему выбора подходящих семейств микро-РНК. Различные микро-РНК демонстрируют особенность, при которой одни семейства микро-РНК могут использоваться в качестве фармакодинамических маркеров, другие семейства микро-РНК – в качестве фармакокинетических маркеров. В литературе описано более 3000 семейств микро-РНК [108]. Поэтому возникает вопрос, какую микро-РНК выбрать для анализа каждого конкретного гена? Для решения этой проблемы можно обратиться к литературе и выяснить, для каких микро-РНК существуют данные по влиянию на гены. Можно также применить методы NGS (“nextgenerationsequencing”) для поиска определенных микро-РНК. Полезным будет обратиться к методам биоинформатики и использовать программный продукт «TargetScan» для того, чтобы определиться с семействами микро-РНК для исследований [3].

Но по каким критериям следует исследователю подбирать микро-РНК семейства? Ранее было уже отмечено, что микро-РНК могут связываться с целевой мРНК полностью или неполностью, на 8, 6 или 7 нуклеотидов. [3, 4, 10, 32, 38, 49, 56, 57]. Интересным также представляется тот факт, что в ходе эволюции микро-РНК сохранили свои целевые локусы связывания с последовательностями нуклеотидов мРНК в генах [10]. И чтобы отразить эту связь ввели такую функцию, как P_{ct} (probability of conserved targeting - вероятность сохранения таргетирования). Её значение примерно равно

значению отношения $(S/B - 1)/(S/B)$ (или стремится к нулю, где $S/B < 1$), в котором S/B - вычисленное отношение сигнал/фон (signal-to-background) для каждого сайта, введенное для разделения одинаковых последовательностей нуклеотидов в плохо сохранных сайтах от хорошо сохранных сайтов прикрепления микро-РНК к мРНК. Это значение P_{ct} выражает байесову оценку вероятности того, что сайт микро-РНК к мРНК сохранен на протяжении эволюции при помощи естественного отбора, направленного на поддержание селективности микро-РНК к мРНК. А следовательно, не является совпадением вследствие причин, отличных от действия естественного отбора [38].

Функция P_{ct} служит критерием для определения биологической значимости взаимодействий микро-РНК - целевая мРНК. У сохранных участков на протяжении эволюции выше вероятность того, что у них есть значимая биологическая функция, а значит, что это не просто последовательность из 8 нуклеотидов, не выполняющая биологической функции, а целевая зона прикрепления микро-РНК для последующей регуляции экспрессии гена и регуляции синтеза белка [3, 10, 56].

На основе вычисленных значений P_{ct} был организован упомянутый выше ресурс «TargetScan». В нём аннотированы гены млекопитающих, в том числе человека, и подобраны вероятные семейства микро-РНК к последовательностям в аннотированных генах, которые ранжированы в зависимости от значения P_{ct} . [38, 60, 93]. Любопытно, что при оценке количества сайтов к микро-РНК в генах только в случае идеального совпадения 6-8 нуклеотидов число сайтов к микро-РНК составило $46,441 \pm 2175$, что означает $57.8\% \pm 3.0\%$ всех генов человека являются сохранными сайтами для микро-РНК. Если учесть еще не идеальные совпадения с меньшим числом нуклеотидов, то окажется, что около 60% всех генов человека являются сохранными сайтами для микро-РНК.

Для отбора релевантных микро-РНК для определенного гена следует воспользоваться значениями P_{ct} , которые выдает ресурс «TargetScan». На основе использования данных нескольких ресурсов, таких как PharmGKB, Targetscan, ENSEMBL был разработан универсальный алгоритм поиска релевантных микро-РНК для лекарственных средств, представленный в данной диссертационной работе, и разобран на примере подбора микро-РНК для ингибиторов P2Y₁₂ рецепторов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование предусматривало поиск кандидатов микро-РНК и сбор биоматериалов пациентов, лабораторную часть и клиническую часть. Клиническая часть проводилась на базе кардиологических отделений ГКБ имени С.П. Боткина г. Москвы, ГБУЗ Госпиталь для ветеранов войн №2. Поиск кандидатов микро-РНК для включения в исследование проводился в базах данных.

Лабораторная работа по генотипированию пациентов, измерению уровней экспрессии микро-РНК, определению уровней остаточной реактивности тромбоцитов проводилась на базе Научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России (директор НИИ молекулярной и персонализированной медицины д.б.н. Гришина Е.А., исполнители: Рыжикова К.А., Созаева Ж.А., Качанова А.А., Буре И.В., Абдуллаев Ш.П.). Фенотипирование пациентов по СУРЗА4 проводилось путём определения концентраций кортизола и 6-бетагидрокортизола в моче на базе лаборатории клинической фармакологии ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА (руководитель: заведующий лабораторией клинической фармакологии к.фарм.н. Смирнов В.В.).

Исследование получило одобрение этического комитета ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России (протокол от 11.12.2018). Исследование проводилось в соответствии с международными нормативно-правовыми документами (Международные гармонизированные трехсторонние правила Надлежащей клинической практики, 1996 год, Хельсинкская Декларация Всемирной Медицинской Ассоциации, 2013 год), а также в соответствии с законодательством РФ (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 41 «Надлежащая клиническая практика», 2005 год).

2.1. Характеристика пациентов, участвующих в исследовании

Исследование включает 80 пациентов с острым коронарным синдромом, принимающих клопидогрел (n=35), тикагрелор (n=45), а также 57 пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий, принимающих ривароксабан.

Все пациенты с острым коронарным синдромом дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями включения пациентов в группы были: 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.

Все пациенты с неклапанной фибрилляцией предсердий также дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Критериями включения пациентов в группы были: установленный диагноз неклапанной фибрилляции предсердий; приём ривароксабана в дозе 15 мг или 20 мг один раз в сутки.

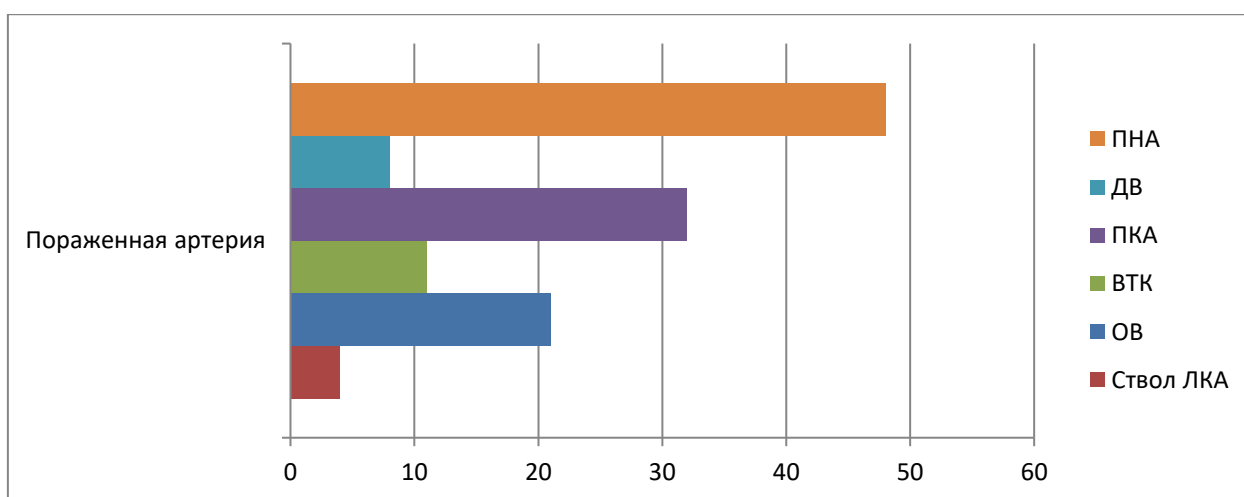


Рисунок 2.1 - Локализация поражения по данным ангиографии

Из исследования исключались пациенты с повышенной чувствительностью к клопидогрелу/ тикагрелору или ривароксабану или вспомогательным компонентам препарата, не соблюдающие протокол

исследования, не включались пациенты с беременностью и в период лактации, детского возраста до 18 лет.

В исследование вошли пациенты с установленным диагнозом острого коронарного синдрома или неклапанной фибрилляции предсердий на основании клинической картины, результатов инструментальных методов исследования, пациенты, имевшие в анамнезе неклапанную фибрилляцию предсердий с документальным подтверждением из историй болезни или амбулаторной карты.

Таблица 2.1

Распределение пациентов с острым коронарным синдромом по типу

Распределение пациентов с острым коронарным синдромом	Количество пациентов	Процент
STEMI	53	66,25
NSTEMI	18	22,5
Нестабильная стенокардия	9	11,25

Таблица 2.2

Клинические и лабораторные показатели пациентов с острым коронарным синдромом

Возраст, лет	64,4±12,3
ФВ, %	49,91±8,06
ДАД, мм.рт.ст.	80,21±11,68
САД, мм.рт.ст.	136,74±21,28
ЧСС, уд/мин	73,46±11,91
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
Глюкоза, ммоль/л	5.88±1,42
Креатинин, мкмоль/л	104.14±37,26
Гематокрит, %	41.12±4,83
Курение	22 (27.5%)
Гиперлипидемия	59 (73.75%)
Диабет	11 (13.75%)
АГ	72 (90%)
Почечная недостаточность	4 (5%)
Тромбоз стента	2 (2.5%)
Атеросклероз периферических артерий	5 (6.25%)
Аритмия	23 (28.75%)
ХСН	66 (82.5%)
Рестеноз	4 (5%)
Аневризма ЛЖ	4 (5%)
Количество пораженных артерий	Одна - 38
	Две - 22
	Три - 19
Количество стентов	1.18±0,50
Диаметр стентов, мм	3.12±0,48
Суммарная длина стентов, мм	31.11±17,46
Ствол ЛКА	4 (5%)

ОВ	21 (26.25%)
ВТК	11 (13.75%)
ПКА	32 (40%)
ДВ	8 (10%)
ПНА	48 (60%)
Стенты	Калипсо - 66
	Хience - 2
	Resolute Onyx - 5
	Biomatrix -7
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%)

Всем пациентам с острым коронарным синдромом, включенным в исследование, проводилось чрескожное коронарное вмешательство с установкой стента в сосуд. У 53 (66,25%) пациентов наблюдался острый коронарный синдром с подъемом сегмента ST, у 18 (22,5%) пациентов без подъема сегмента ST, у 9 (11,25%) пациентов была диагностирована нестабильная стенокардия.

Группе пациентов с ОКС и имплантацией стента проводилось измерение остаточной реактивности тромбоцитов с помощью прибора VerifyNow.

Всем пациентам проводилось определение активности изофермента СУР3А4 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Таблица 2.3

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

	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
ДАД, мм.рт.ст.	77.94±10.50	81.98±12.34	0.13
САД, мм.рт.ст.	135.66±19.55	137.58±22.71	0.69
ЧСС, уд/мин	73.43±9.32	73.49±13.69	0.98
Тромбоциты, 10 ⁹ клеток/л	256.31±72.89	261.16±74.16	0.77
Лейкоциты, 10 ⁹ клеток/л	9.52±9.67	8.25±1.85	0.39
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
Гемоглобин, г/л	133.34±16.43	140.93±15.51	0.04
Креатинин, мкмоль/л	100.00±36.21	107.36±38.15	0.38
Гематокрит, %	41.15±4.81	41.08±4.98	0.96
Глюкоза, ммоль/л	5.65±1.19	6.05±1.57	0.22
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

Таблица 2.4

Клинические 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%)
ДАД, мм.рт.ст.	82,13±4,91
САД, мм.рт.ст.	140,83±13,41
ЧСС, уд/мин	70,28±12,23
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

2.2. Определение уровней экспрессии микро-РНК.

Методика определения уровней экспрессии микро-РНК отработана и стандартизована в НИИ персонализированной и молекулярной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО и применяется в неизменном виде для всех исследований подобного рода.

Для проведения исследования кровь отбиралась в стерильные пробирки с содержанием ЭДТА. Для перемешивания с антикоагулянтом закрытую пробирку с кровью переворачивали несколько раз. Получение плазмы производилось центрифугированием в течение 10 мин при 2000g. На следующем этапе супернатант перемещали в стерильные пробирки объемом 1,5 мл и 2 мл, которые хранили до использования при температуре -80°C.

В соответствии с протоколом производителей, с небольшими модификациями, производилось выделение суммарной РНК с помощью реагента Qiazol и набора miRNeasy MiniKit (Qiagen, Хильден, Германия). К 500 мкл плазмы в объемном соотношении 2:1 добавляли реагент Qiazol. Далее в пробирку вносили хлороформ с последующим центрифугированием с целью разделения фаз. Полученную водную фазу переносили в новую пробирку и добавляли к ней полтора объема этанола 100%. После этого раствор, содержащий РНК, помещали в колонку miRNeasy и подвергали дальнейшей отмывке по инструкциям производителя. Окончательный объем элюции составил 15 мкл. С помощью спектрофотометра для микрообъемов NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Нью-Йорк, США) проводилась оценка концентрации и чистоты полученной РНК. Для каждого образца процесс выделения повторялся до получения достаточного количества РНК для следующих этапов.

Далее проводилась количественная оценка уровня экспрессии микро-РНК методом ПЦР в реальном времени.

В соответствии с рекомендованным протоколом, обратная транскрипция проводилась набором MiScript II RT Kit (Qiagen). Выделенные из каждого образца 300 ng суммарной РНК использовались для получения кДНК. Следующие компоненты вносились в реакционную смесь: 2 мкл 10X miScript Nucleic Mix, 3,8 мкл 5x miScript HiFlex Buffer, 1 мкл miScript Reverse Transcriptase Mix, 2,2 мкл экзогенного контроля (до 20 мкл свободной от РНКаз воды). Смесь инкубировалась 60 минут при 37 °С, после чего

температуру повышали до до 95°C на 5 минут с целью инактивации транскриптазы.

Полимеразно-цепная реакция выполнялась в режиме реального времени в трех повторениях для каждой микроРНК, а также экзогенного контроля. Применялись наборы коммерчески доступных праймеров miScript Primer Assay (Qiagen) в объеме реакционной смеси 12 мкл (2 мкл полученной кДНК, 5 мкл 2x Quanti Tect SYBR Green PCR Master Mix, 1 мкл 10x miScript Primer Assay, 1 мкл 10X miScript Universal Primer, к исследуемым микро-РНК и 12мкл воды, свободной от РНКаз) и MiScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Полимеразно-цепная реакция в реальном времени проводилась на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Геркулес, США) в соответствии с рекомендациями производителя (15 минут, 95 °C с целью активации Hot Star TaqDNA Polymerase, проводилось 40 трехступенчатых циклов (94 °C - 15 сек., 55 °C – 30 сек., 70 °C – 30 сек.). Экспрессия микроРНК была нормализована относительно экзогенного контроля и рассчитывалась с использованием метода 2-ΔΔCt.

2.3. Определение полиморфизмов генов, ответственных за метаболизм препаратов

Всем пациентам проводилось исследование полиморфных вариантов генов, ответственных за метаболизм препарата.

Для клопидогрела это следующие 17 полиморфизмов: *ABCB1* (C3435T, rs1045642), *CYP2C19*3* (636G > A, rs4986893), *CYP2C19*17* (C-806T, rs1224856), *CYP3A4*22* (C>T, rs35599367), *CYP2C19*2* (681G > A, rs4244285), *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), *ABCB1* (rs4148738), *ABCB1* (C3435T, rs1045642), *CYP3A5**3 (A6986G, rs776746).

Генотипирование проводилось с использованием венозной крови, собранной на 3-5 сутки после имплантации стента, в вакуумные пробирки с этилендиаминтетраацетатом VACUETTE® (Greiner Bio-One, Австрия) (ЭДТА). Носительство полиморфных маркеров генов *ABCB1* (C3435T, rs1045642), *ABCB1* (rs4148738), , *CYP2C19**2 (681G > A, rs4244285), *CYP2C19**17 (C-806T, rs1224856), *CYP2C19**3 (636G > A, rs4986893), , *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), *SLCO1B1* (T521C, rs4149056) выявлялось на приборах CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) и Applied Biosystems StepOne™ (Life Technologies, USA) при помощи метода ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR). До проведения анализа пробирки с кровью содержались при температуре -70° С.

Методика фармакогенетического тестирования отработана и стандартизована в НИИ персонализированной и молекулярной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО и применяется в неизменном виде для всех исследований подобного рода.

Из образцов цельной крови, собранных в пробирки, содержащие ЭДТА, были выделены ДНК с применением набора реагентов для выделения ДНК на сорбенте (ООО «Синтол», Россия). Набор состоял из элюирующего

раствора (раствор для растворения ДНК), отмывочных растворов 1 и 2 (реагенты для отмывки сорбента), лизирующего раствора (реагент для лизиса клеток), сорбента (реагент для сорбции ДНК).

Выделение ДНК проводилось в четыре этапа в боксах микробиологической безопасности «Ламинар-С» (ЗАО «Ламинарные системы», Россия):

- I. внесение образца;
- II. лизис материала и сорбция ДНК;
- III. отмывка сорбента от ингибиторов;
- IV. элюция ДНК.

В пробирку вносилось 100 мкл образца и 300 мкл лизирующего раствора. Пробирку помещали на встряхиватель для микропробирок, и в течение 5 минут подогревали в термостате при 65° С. Для сбрасывания капель с крышки пробирки их снова краткосрочно центрифугировали. Затем в пробирку помещали 30 мкл сорбента.

Содержимое перемешивалось на встряхивателе для микропробирок, отстаивалось 2 минуты в штативе, после чего снова подвергалось перемешиванию на встряхивателе и помещалось в штатив на 2 минуты.

Далее пробирка центрифугировалась на скорости 5000 оборотов в минуту в течение 30 секунд. Вакуумный отсасыватель применялся для удаления надосадочной жидкости.

Отмывочный раствор 1 в объеме 300 мкл добавлялся к осадку и подвергался обработке на встряхивателе для микропробирок. Центрифугирование пробирки проводили при скорости 5000 об/мин, 30 секунд, надосадочную жидкость удалили вакуумным отсасывателем. Затем к полученному осадку добавили 500 мкл второго отмывочного раствора, и его тоже перемешали на встряхивателе для пробирок. Центрифугирование пробирки проводилось при скорости 5000 об/мин, 30 секунд, надосадочную жидкость удалили вакуумным отсасывателем. К осадку повторно добавили

500 мкл отмывочного раствора 2 и перемешали встряхивателем для микропробирок. Снова провели центрифугирование пробирки при скорости 5000 об/мин, 30 секунд, надосадочную жидкость удалили вакуумным отсасывателем.

Сорбент подсушивали в термостате при температуре 65° С 15 минут. К осадку добавили 100 мкл элюирующего раствора, снова содержимое пробирки перемешали встряхивателем для микропробирок и подогрели в термостате при 65° С 5 минут. Следующим этапом смесь центрифугировали при 13000 об/мин, 2 минуты. Получившуюся надосадочную жидкость, содержащую ДНК, перенесли в чистую пробирку.

Данный набор рассчитан на одновременную детекцию, поэтому в одной пробирке определяются по два аллельных варианта генетического полиморфизма. Соответственно, для определения четырех генетических полиморфизмов у одного пациента требуется подготовить четыре пробирки для амплификации, содержащие смесь компонентов амплифицирующего раствора и образцов выделенной исследуемой ДНК.

Пробирки с ПЦР-буфером, смесью для амплификации, Таq-АТ полимеразой перемешивались встряхивателем для микропробирок 5 секунд, потом центрифугировались 3 секунды центрифугой для микропробирок. Смесь для амплификации в объеме 20 мкл вносилась в промаркированные пробирки отдельным наконечником пипетки для каждого полиморфизма.

Отдельно готовилась смесь 0,5 мкл Таq-АТ полимеразы и 10 мкл ПЦР-буфера с учетом количества анализируемых образцов, затем полученную смесь перемешивали встряхивателем для микропробирок 5 секунд, центрифугировали 3 секунды центрифугой для микропробирок. Производили добавление 10 мкл смеси из ПЦР-буфера и Таq-АТ полимеразы в каждую пробирку со смесью для амплификации. Далее добавляли по 20 мкл минерального масла в каждую пробирку с последующим закрытием крышки пробирки для предотвращения контаминации посторонними веществами.

На заключительном этапе вносили в пробирки по 5 мкл ДНК-содержащей жидкости, центрифугировали смесь 3 секунды на центрифуге для микропробирок. В отдельно выделенную пробирку отрицательного контроля вносилось 5 мкл отрицательного контрольного образца, после этапа выделения ДНК смесь центрифугировалась 3 секунды центрифугой для микропробирок.

Ряд пробирок устанавливался в блок детектирующего амплификатора, производился пуск программного обеспечения, указывали количество и идентификаторы образцов, отрицательных контролей, проводилось фиксирование расположения пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой. Проведение полимеразно-цепной реакции осуществлялось аппаратом в автоматическом режиме. В программу амплификации для всех полиморфизмов включалась: начальная фаза денатурации 3 минуты, 95° по Цельсию, последующая пятнадцатисекундная денатурация при температуре 95° С, 40 повторяющихся циклов, 40-секундный отжиг при температуре 63° С, регистрация и учет результатов.

Два флуоресцентных зонда, меченых флуоресцентными красителями FAM и HEX соответственно, позволяют исследователю определить соотношение экспрессии полиморфизма гена к «дикому» гену в одной реакционной смеси для одной и той же пробы.

Таблица 2.5

Тест на соответствие выборки пациентов с ОКС равновесию Харди-Вайнберга

Генетический полиморфизм	Генотип	n	Chi-square
<i>ABCB1 (C3435T, rs1045642)</i>	CC	21	1.4375
	CT	29	
	TT	18	

<i>CYP2C19*17 (C-806T, rs1224856)</i>	CC	16	2.1264
	CT	10	
	TT	5	
<i>CYP3A4*22 (C>T, rs35599367)</i>	CC	62	0.0040
	CT	1	
<i>CYP2C19*2 (681G > A, rs4244285)</i>	GG	22	1.5887
	GA	7	
	AA	2	
<i>CYP4F2 (C > T, Val433Met, rs2108622)</i>	CC	17	0.6362
	CT	13	
	TT	1	
<i>CYP3A4 (20239G>A, rs2242480)</i>	GG	47	0.0251
	GA	15	
	AA	1	
<i>CYP3A5*3 (A6986G, rs776746)</i>	GG	58	0.8201
	AG	9	
	AA	1	
<i>CES1 (A-33C, rs2244613)</i>	AA	22	0.8939
	AC	9	
<i>PON1 (Q192R, rs662)</i>	TT	17	2.6372
	CT	14	
<i>IGTB3 (rs5918)</i>	TT	22	0.7101

	TC	8	
<i>P2Y12 (rs2046934)</i>	GG	39	1.2237
	GA	14	
	AA	3	
<i>P2Y12R (A>G, rs3732759)</i>	GG	5	2.1264
	AG	10	
	AA	16	
<i>PEAR1 (C>T, rs41273215)</i>	CC	26	2.1264
	CT	4	
	TT	1	
<i>PEAR1 (C>T, rs57731889)</i>	CT	29	0.0344
	TT	2	
<i>B4GALT2 (C>T, rs1061781)</i>	CC	27	0.1474
	CT	4	
<i>ABCG2 (G>T, rs2231142)</i>	CC	26	0.2385
	CA	5	
<i>SLCO1B1 (T521C, rs4149056)</i>	TT	29	0.5436
	TC	8	

Таблица 2.6

**Тест на соответствие выборки пациентов с фибрилляцией
предсердий равновесию Харди-Вайнберга**

Генотип	Генотип	n	%	Chi-square
<i>CYP3A4*22 C>T intron 6</i> <i>rs35599367</i>	CC	55	96.5	0.0182
	CT	2	3.5	
<i>CYP3A5*3 rs776746</i>	GG	51	89.47	0.1759
	AG	6	10.53	
<i>ABCB1 rs1045642</i>	CC	3	5.26	9.4185
	CT	38	66.67	
	TT	16	28.07	
<i>ABCB1 rs4148738</i>	CC	18	31.58	1.3793
	CT	24	42.11	
	TT	15	26.31	

2.4 Измерение остаточной реактивности тромбоцитов с помощью прибора VerifyNow

Цельная кровь пациентов для измерения агрегации тромбоцитов забиралась из локтевой вены на 3-5 сутки после ОКС и ЧКВ. Кровь забиралась в 2 мл вакуумные пробирки с 3,2% цитратом натрия Greiner Bio-One Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия). Измерение остаточной реактивности тромбоцитов проводилось в течение 1-4 часов после взятия образца цельной венозной крови. У пациентов, которым во время вмешательства чрескожного коронарного вмешательства проводилось введение ингибиторов гликопротеина IIb-IIIa, измерение агрегации оценивалось не ранее чем через 5–6 дней после окончания внутривенного введения препарата, как рекомендовано в инструкции по измерению остаточной реактивности тромбоцитов прибором VerifyNow P2Y12 («Accumetrics», США). Измерение остаточной реактивности тромбоцитов осуществлялось на тест-системе для прикроватной оценки активности тромбоцитов —VerifyNow P2Y12 («Accumetrics», США).

Далее в тексте приводится стандартная методика измерения остаточной реактивности тромбоцитов, которая описана в инструкции по эксплуатации прибора (www.accumetrics.com), и рекомендована к применению производителем.

В тест-системе используются индивидуальные картриджи для каждого отдельного пациента. Один картридж-один пациент. Каждый тест-картридж, предназначенный для отдельного пациента, содержит лиофилизат, состоящий из микросфер с покрытием человеческим фибриногеном, а также агонист тромбоцитов -аденозиндифосфат (АДФ). Данная методика тестирования агрегации основана на способности GP IIb/IIIa рецепторов на активированных тромбоцитах связываться с микросферами с покрытием фибриногеном человека [64, 83]. При этом активированные тромбоциты подвергаются воздействию микросферами с покрытием фибриногеном, их агглютинация происходит пропорционально числу имеющихся рецепторов на тромбоцитах [63].

Прибор предназначен для измерения развивающейся при этом агглютинации по пропорциональному увеличению прохождения света. При этом компактные размеры прибора позволяют использовать прибор как в лаборатории, так и у постели больного.

Результат тестирования печатается встроенным принтером и включает в себя следующие показатели: абсолютная степень агрегации тромбоцитов в единицах реакции (PRU- platelet reactivity units) и процентах ингибирования (IP - inhibition percentage). PRU рассчитывается по скорости и степени АДФ-стимулированной агрегации тромбоцитов. Процент ингибирования (PI) показывает изменение от начальной агрегации и рассчитывается как отношение результата PRU и базового результата. Базовый результат является независимым измерением, основанным на параллельном пути измерения агрегации с помощью скорости и степени агрегации тромбоцитов при стимуляции рецепторов тромбина (PAR-1 и PAR-4) [51, 55, 61].

Консенсус, основанный на результатах предыдущих исследований принял оптимальные границы «терапевтического окна» [118]. Согласно его положениям, оптимальным диапазоном остаточной активности тромбоцитов для прибора VerifyNow является не более 208, и не менее 95 PRU [6, 18]. Таким образом, если остаточная реактивность является высокой, при PRU больше 208, значит существенно возрастает риск тромботических осложнений [6], а при PRU меньше 95 наблюдается очень низкая остаточная реактивность тромбоцитов, а значит возрастает риск кровотечений [18].

2.5. Определение активности изофермента CYP3A4 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методика проведения измерения активности изофермента CYP3A4 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии стандартизована на базе лаборатории клинической фармакологии ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА. Создателем методики является заведующий лабораторией клинической фармакологии к.фарм.н. Смирнов В.В. Ниже приведено описание стандартной методики фенотипирования по CYP3A4.

Для такого исследования у пациентов берется материал для исследования в объеме 5 мл утренней мочи, собранные на 3-5 день в пробирки без консерванта. Далее пробирки замораживаются при температуре минус 20 градусов по Цельсию и хранятся до проведения измерений. Содержание субстрата и метаболита 6-бета-гидрокортизола (6-ОНС) и кортизола (FC) определяется методом хромато-масс-спектрометрического анализа на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent G1978B Multimode Source for 6410 TripleQuade LC/MS (Agilent Technologies, Inc., США). Оценка метаболической активности CYP3A4 проводится по отношению 6-бета-гидрокортизол/кортизол в утренней моче. Данное исследование рекомендовано и используется фармацевтическими компаниями для оценки роли изоферментов цитохрома P-450 в

биотрансформации лекарственных средств [66]. В основе метода лежит образование метаболита эндогенного кортизола под влиянием изофермента СУР3А4. Получение более высоких значений 6-бета-гидрокортизол/кортизол свидетельствуют о высокой активности изофермента СУР3А4, а меньших - о низкой [136]. Метод жидко-жидкостной экстракции с использованием смеси этилацетат/изопропанол (85/15) в качестве экстрагента рутинно применяется для экстракции вышеупомянутых стероидов из мочи.

Ниже приведена подробная техника проведения исследования. Экстракцию проводят дважды из 2 мл мочи четырьмя миллилитрами экстрагента. Далее центрифугируют 5 минут образец в центрифуге на скорости 3000 оборотов в минуту, что позволяет отделить и объединить органические слои. Авторская методика предполагает добавление 2 мл 1N раствора NaOH для улучшения экстракции к объединенному органическому слою; затем помещение пробы на шейкер и центрифугирование в течение 5 минут на скорости 3000 оборотов в минуту. Упаривание объединенного органического слоя производили на вакуумно-выпарительном аппарате. Для аппаратного этапа исследования определение кортизола и 6-бета-гидрокортизола в моче проводили на приборе Agilent G1978B Multimode Source for 6410 TripleQuad LC/MS (Agilent Technologies, Inc., США) [122]. Объем добавления был выбран 10 мкл. Использовался следующий состав подвижной фазы: 55% воды, подкисленной 1 мл муравьиной кислотой на 1 литр воды, а также был добавлен 45%-ный ацетонитрил. Скорость потока подвижной фазы была выбрана 0,5 мл/минуту. В исследовании использовалась колонка обращеннофазная Waters (5мкм; 4,6×150мм), при температуре 350⁰ С [122]. Длина волны ультрафиолетового детектора была выбрана в 246 нм. Для работы масс-детектора был выбран режим сканирования в позитивной полярности; тип ионизации: MM-ES + APCI [122, 136].

2.6. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проводилась в SPSS Statistics 20.0. Для проверки нормальности распределения использовался критерий Колмогорова-Смирнова.

Если наблюдалось нормальное распределение данных, тогда для оценки статистической значимости различий количественных показателей применялся однофакторный дисперсионный анализ — ANOVA, а также коэффициент корреляции смешанных моментов Пирсона. При нормальном распределении данных использовался t-критерий Стьюдента для оценки статистической значимости различий в двух группах.

Если наблюдалось ненормальное распределение данных, то использовался критерий Манна-Уитни или Крускала-Уоллиса.

Линейный регрессионный анализ применялся для определения влияния количественных факторов на активность тромбоцитов.

Критерий хи- квадрат Пирсона χ^2 применялся для установления различий категориальных показателей.

Точный критерий Фишера применялся для проверки соблюдения равновесия Харди–Вайнберга. В исследовании различия считались значимыми при $p < 0,05$.

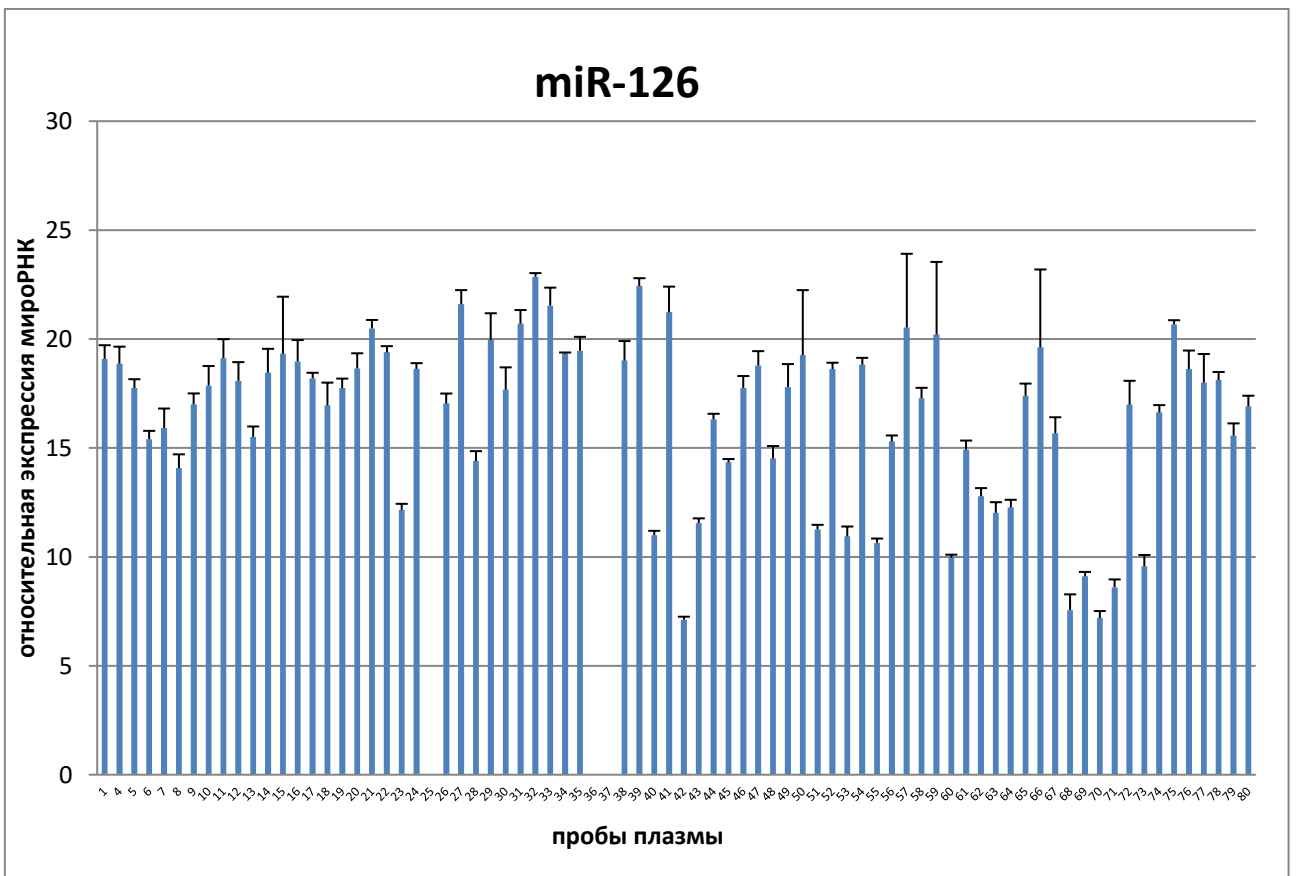
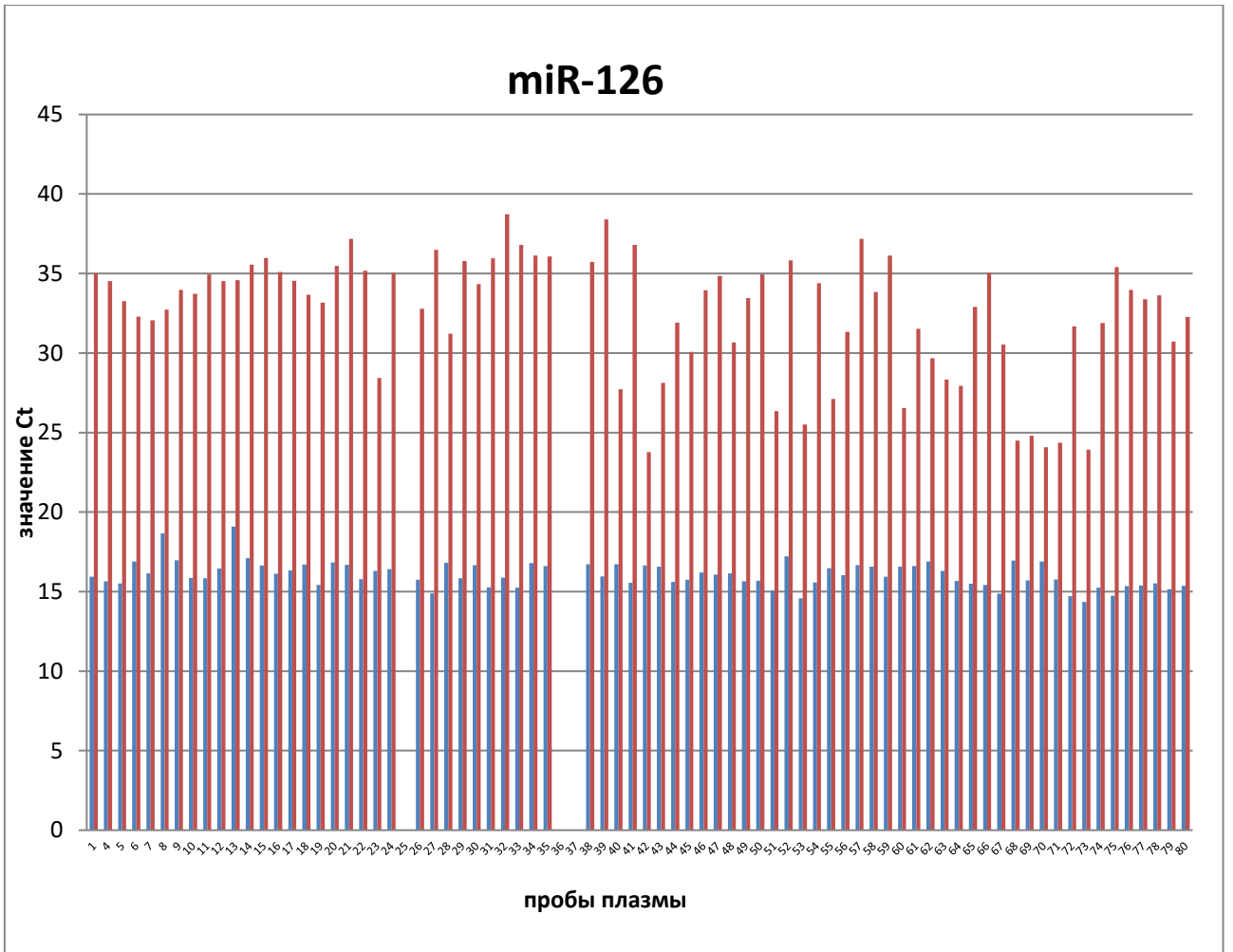
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

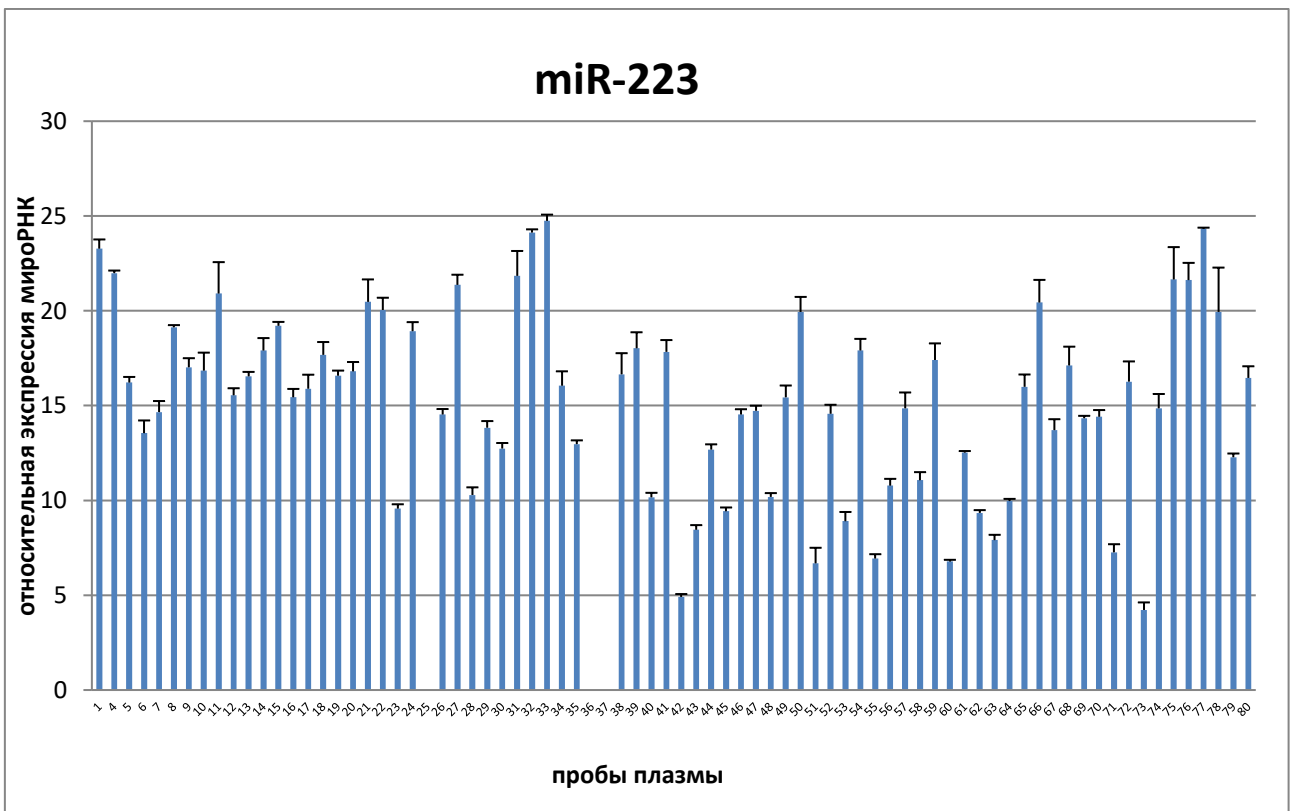
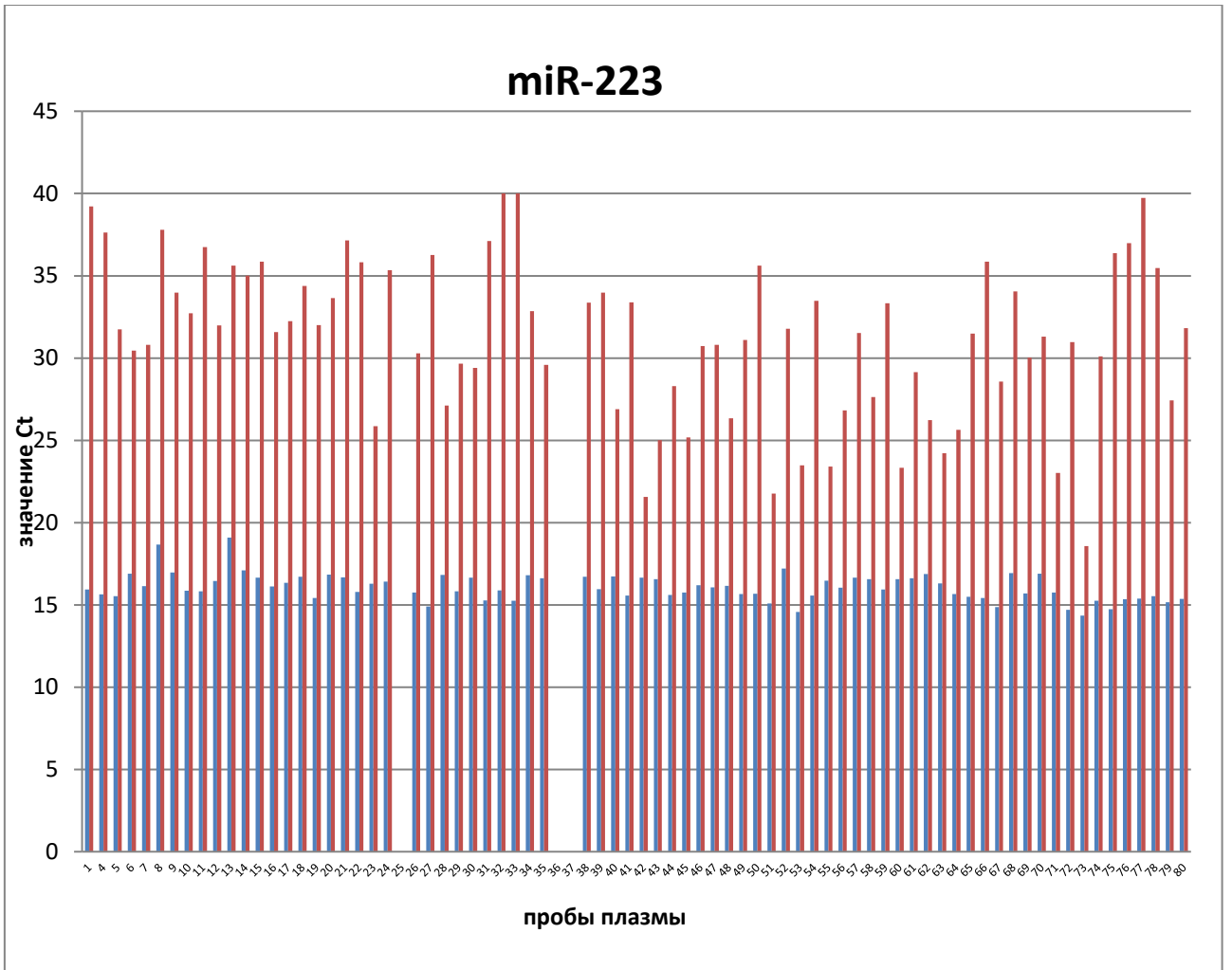
3.1. Оценка взаимосвязи между уровнем экспрессии микро-РНК и уровнем остаточной реактивности тромбоцитов

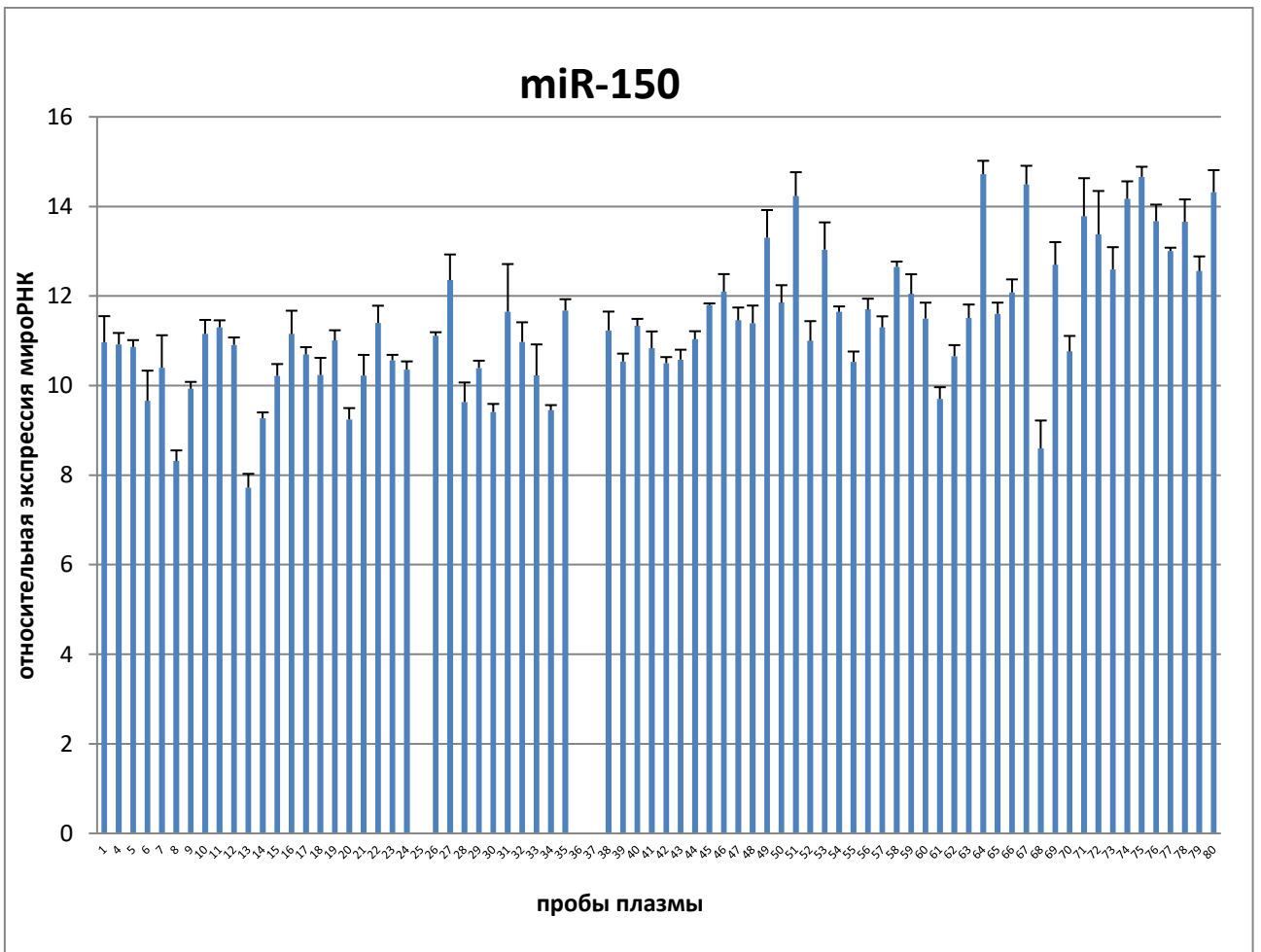
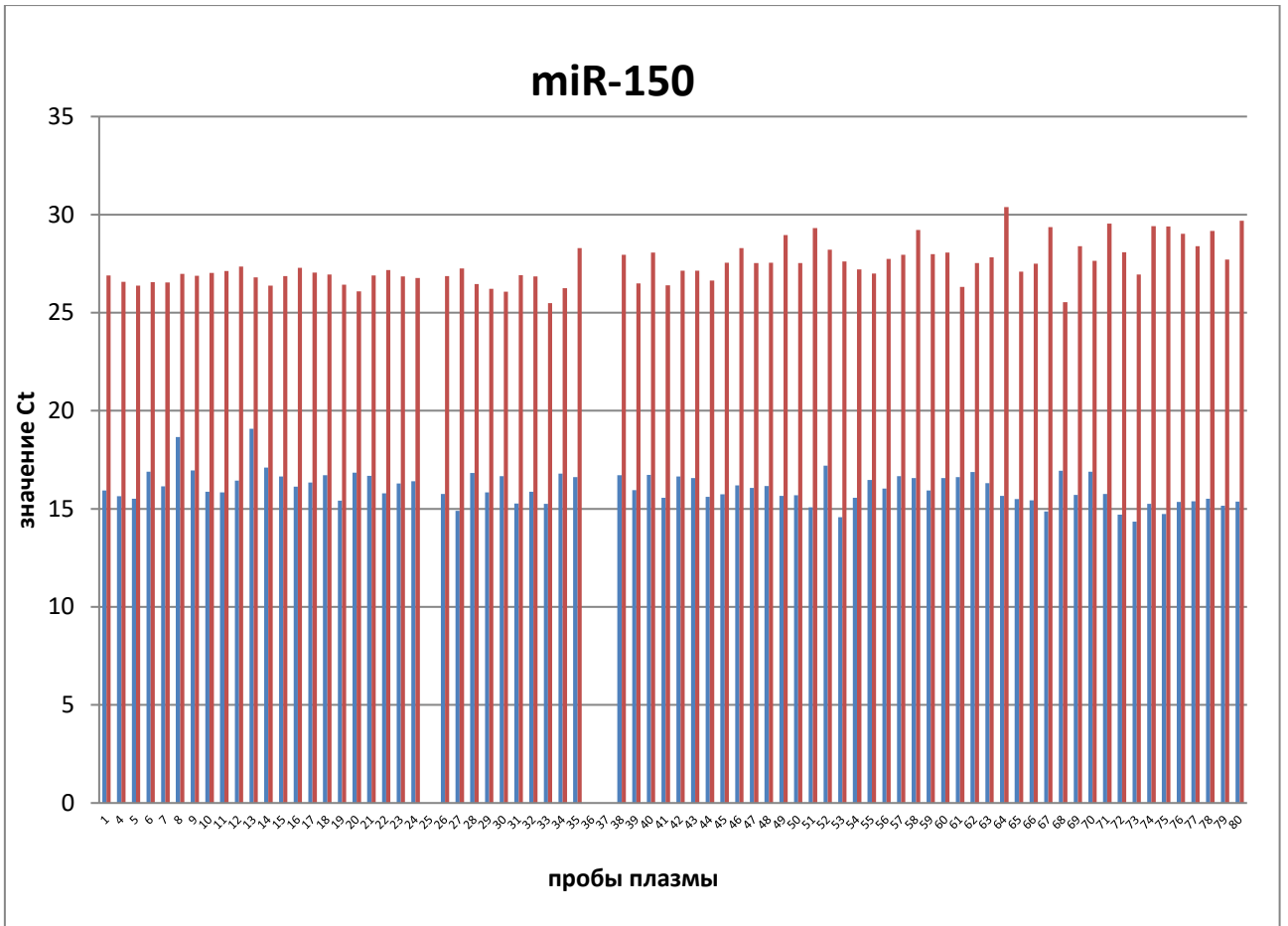
Для оценки взаимосвязи между уровнем экспрессии микро-РНК и уровнем остаточной реактивности тромбоцитов, которая была измерена на приборе VerifyNow, проводился анализ линейной регрессии, со следующими переменными в качестве зависимых переменных: miR-126, miR-142, miR-150, miR-223, miR-29, miR-34. Из них следующие микро-РНК показали связь с уровнем остаточной реактивности тромбоцитов:

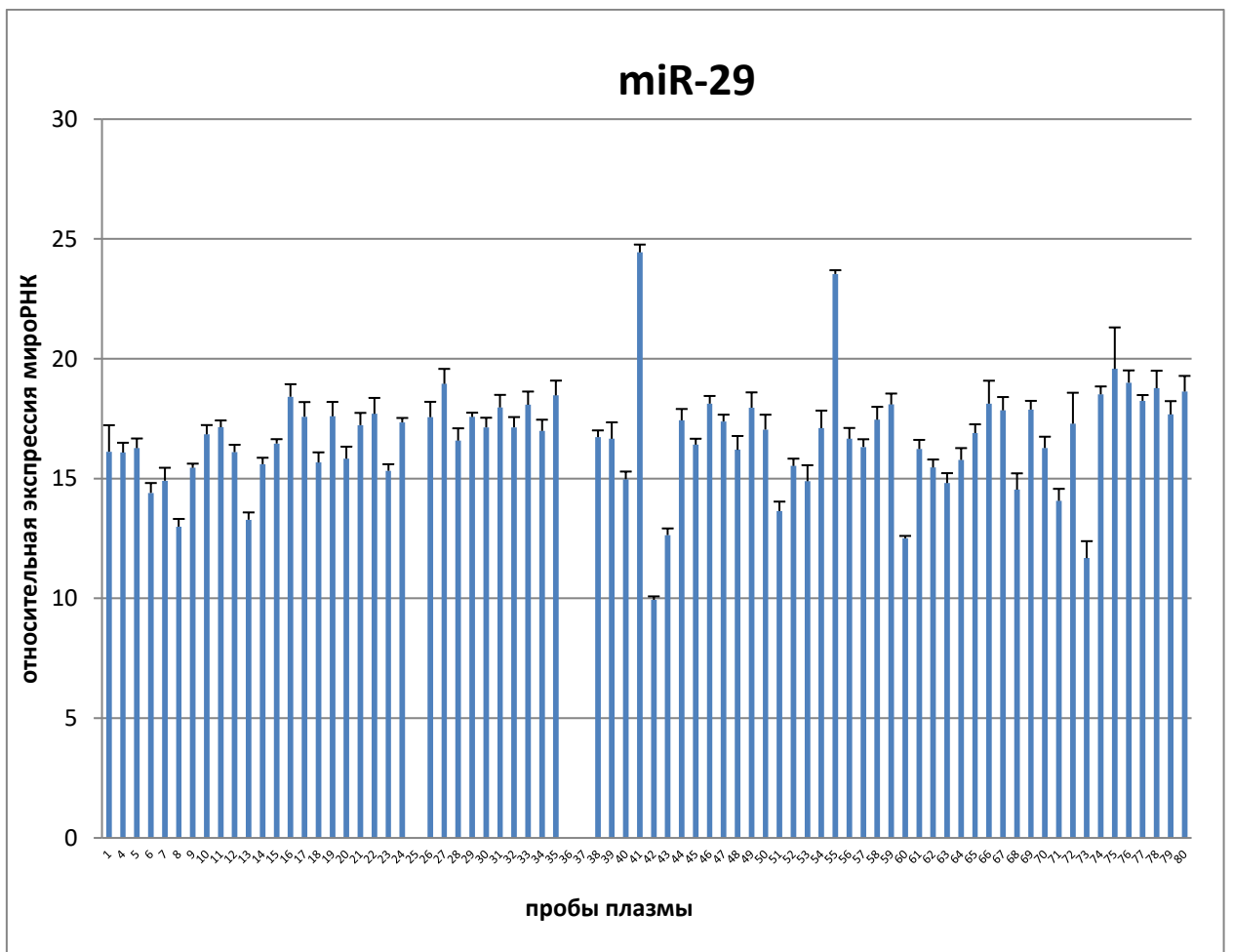
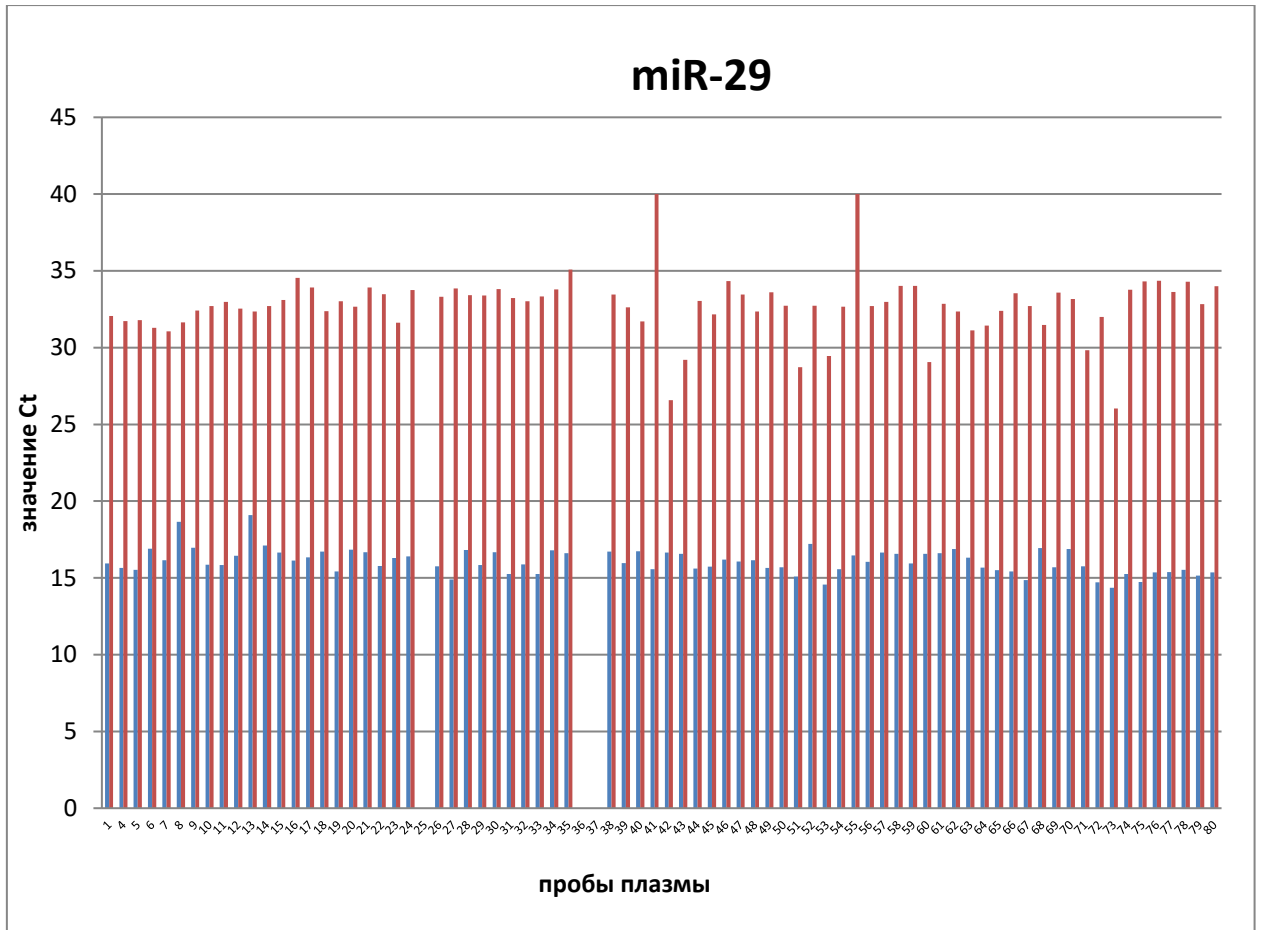
miR-126 (β coefficient=-0.076, SE=0.032, p=0.021), miR-223 (β coefficient=-0.089, SE=0.041, p=0.032), miR-29 (β coefficient=-0.042, SE=0.018, p=0.026), miR-142 (β coefficient=-0.072, SE=0.026, p=0.008).

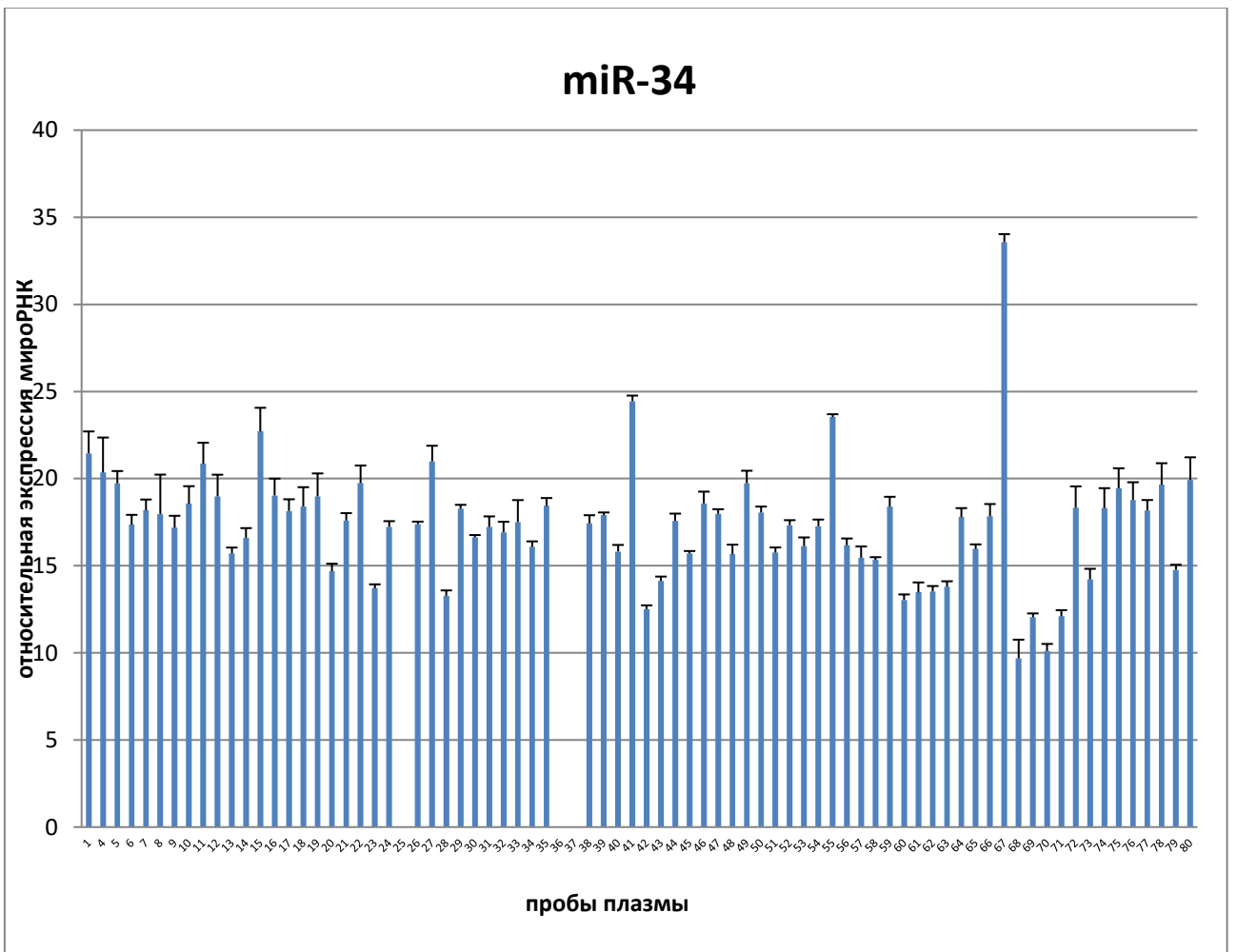
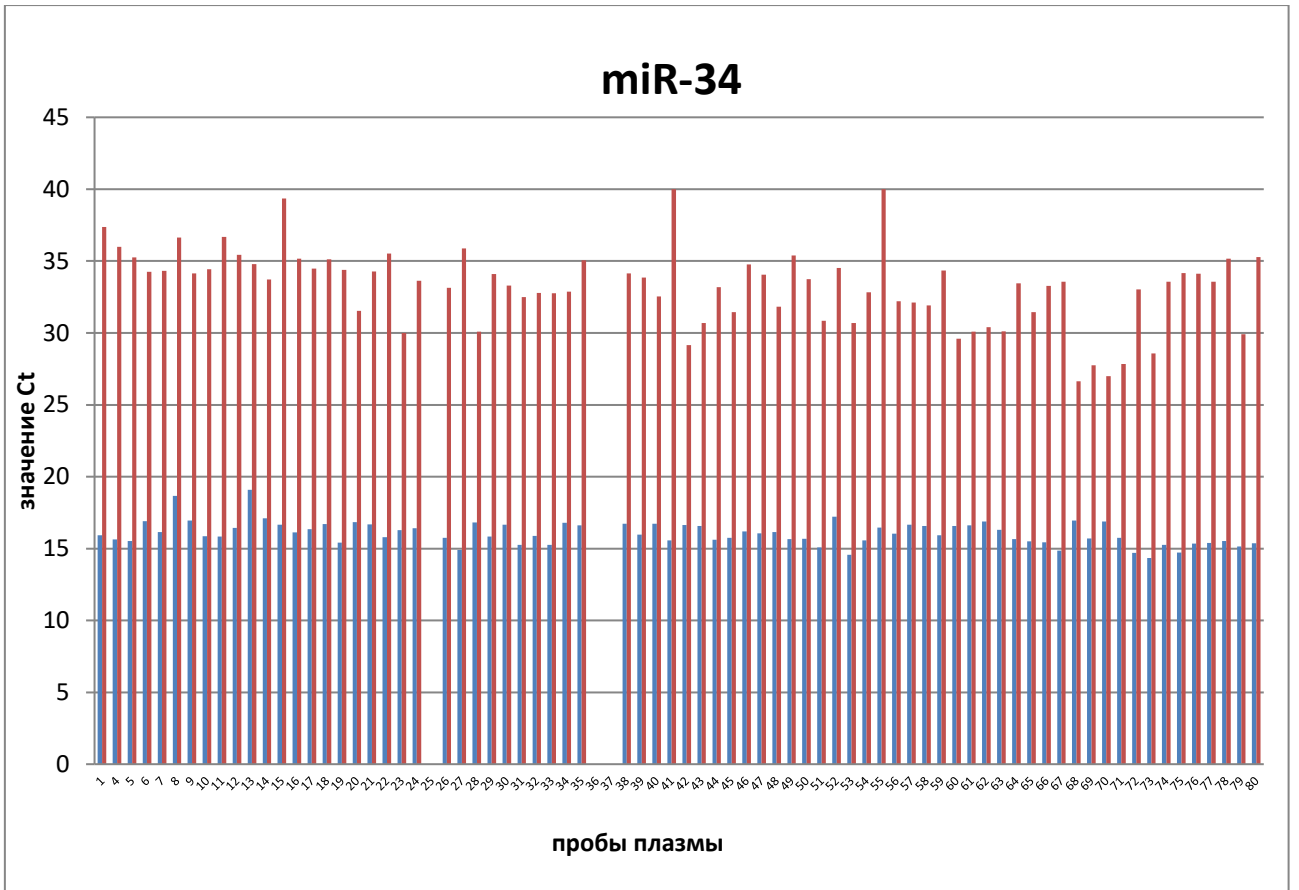
Следующие два кандидата микро-РНК miR-150 (β coefficient=-0.006, SE=0.009, p=0.518) и miR-34 такой связи не показали (β coefficient=-0.020, SE=0.022, p=0.372).

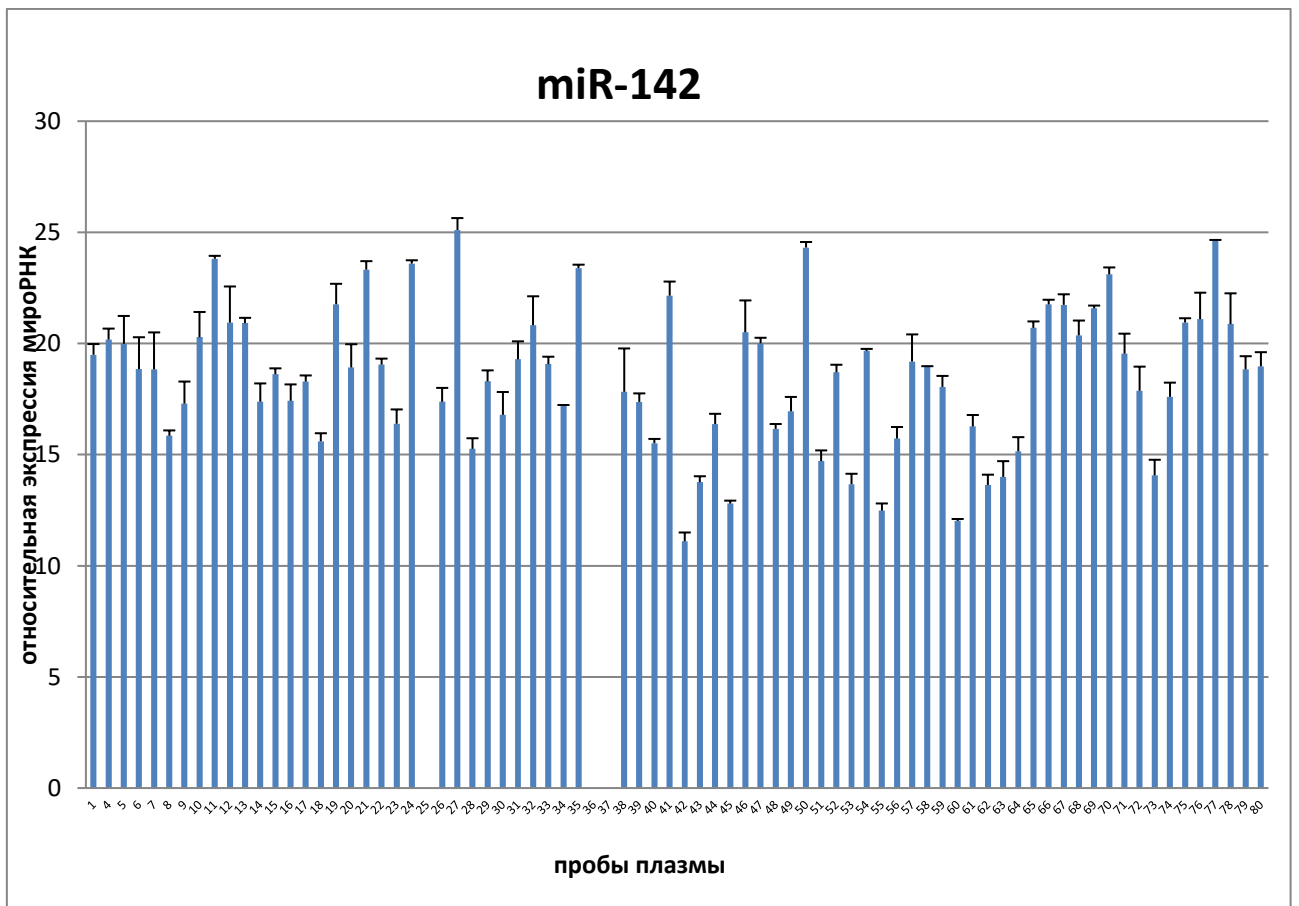
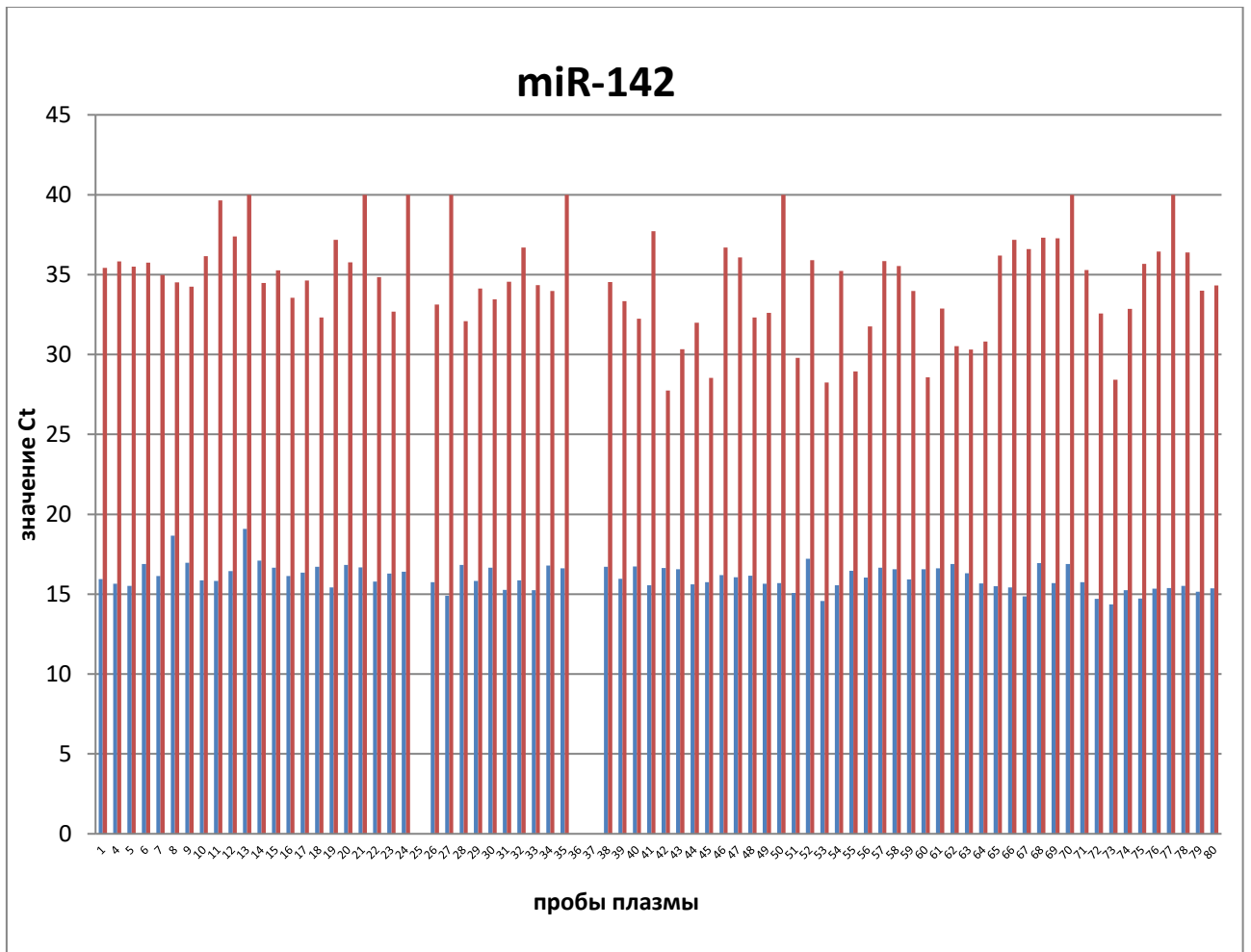












**Рисунок 3.1 - графики относительной экспрессии микро-РНК у
пациентов с острым коронарным синдромом**

Примечание: на данных графиках продемонстрированы уровни экспрессии исследованных у 80 пациентов с острым коронарным синдромом микро-РНК. Чем выше значение C_t , тем меньше экспрессия данной микро-РНК в образце. Значения ΔC_t вычисляются путем вычитания значения C_t эндогенного контроля (или среднего значения C_t эндогенного контроля, если таких контролей несколько) из значения C_t гена для данной выборки. При расчете значения ΔC_t мы ссылаемся на число, вычитаемое из исходных значений C_t каждого гена, как на C_{t0} . Вычисление $\Delta\Delta C_t$ производится путем вычитания ΔC_t экспериментальной пробы из контрольной пробы.

Таблица 3.1

**P-значения, полученные в результате анализа линейной регрессии
между уровнями экспрессии miRNA и результатами измерения
остаточной реактивности тромбоцитов**

	PRU	% ингибирования	Базовое значение
miR-126	0.021	0.009	0.011
miR-223	0.032	0.005	0.098
miR-29	0.026	0.026	0.002
miR-142	0.008	0.003	0.001

3.2. 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.

У 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*).

У 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.

У 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*).

Таким образом, в ходе исследования суммарно были проанализированы результаты 1093 генетического исследования, полученного в ходе анализа образцов цельной крови 137 пациентов, получающих 3 разных антитромботических лекарственных средства.

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: *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: *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 в выборках пациентов позволяют утверждать, что соблюдается закон Харди-Вайнберга, так как распределение частоты генотипов в исследовании соответствует их распределению в популяции. Это подкрепляется отсутствием статистически значимых различий между частотами аллелей и генотипов выборки и расчетных ожидаемых показателей.

При помощи тестов на нормальность с помощью критериев Колмогорова-Смирнова с поправкой значимости Лильефорса 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 соответствуют 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 использовались 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)

Таблица 3.2

Результаты тестов на нормальность распределения уровней экспрессии микро-РНК пациентов с ОКС с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка

Микро-РНК	Колмогоров-Смирнов ^a		Шапиро-Уилк	
	Статистика	Значимость	Статистика	Значимость
miR-126	0.121	0.019	0.930	0.001

miR -223	0.057	0.200*	0.983	0.537
miR -150	0.146	0.001	0.929	0.001
miR -29	0.186	0.000	0.845	0.000
miR -34	0.091	0.200*	0.974	0.197
miR -142	0.077	0.200*	0.963	0.049

Таблица 3.3

Результаты тестов на нормальность распределения уровней экспрессии микро-РНК пациентов с фибрилляцией предсердий с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка

Микро-РНК	Колмогоров-Смирнов ^a		Шапиро-Уилк	
	Статистика	Значимость	Статистика	Значимость
miR -142	0.135	0.012	0.934	0.004
miR -39	0.168	0.000	0.687	0.000

Таблица 3.4

Данные генотипирования пациентов с ОКС и связь полиморфизмов с уровнями экспрессии микро-РНК

<i>P2Y12</i> (<i>rs2046934</i>)	GG			GA			AA			р-значение
	N	M	SD	N	M	SD	N	M	SD	
miR-34 экспрессия	33	33.49	2.95	14	33.45	1.86	3	33.60	.77	0.063
miR-126 экспрессия	33	32.60	4.00	14	34.96	2.62	3	33.51	1.59	0.082
<i>P2Y12R</i> (<i>A>G</i> .)										

<i>rs3732759</i>										
miR-29 экспрессия	3	38.10	3.27	9	33.35	.64	15	32.89	1.26	0.017
miR-34 экспрессия	3	38.25	3.01	9	32.72	2.11	15	32.95	2.23	0.003
<i>CYP2C19*2</i> (681G > A. <i>rs4244285</i>)										
miR-126 экспрессия	20	32.48	4.08	6	36.16	1.89	1	34.94	1.79	0.066
<i>CYP2C19*17</i> (C-806T. <i>rs1224856</i>)	CC			CT			TT			
	N	M	SD	N	M	SD	N	M	SD	
miR-142 экспрессия	14	35.96	2.66	9	33.13	2.64	4	37.66	1.57	0.012
<i>ABCB1</i> (C3435T. <i>rs1045642</i>)										
miR-223 экспрессия	17	31.20	4.85	28	31.70	4.12	17	30.54	5.13	0.080
<i>PON1</i> (Q192R. <i>rs662</i>)	CT			TT						
	N	M	SD	N	M	SD				
miR-29 экспрессия	13	32.68	1.29	14	34.49	2.38				
<i>PEAR1</i> (C>T. <i>rs57731889</i>)	CC			CT						
	N	M	SD	N	M	SD				

miR-34 экспрессия	25	33.21	2.56	2	36.63	4.76	0.078
miR-223 экспрессия	25	32.23	4.60	2	34.62	1.74	0.094
<i>B4GALT2</i> (C>T. <i>rs1061781</i>)							
miR-34 экспрессия	24	33.54	2.27	3	32.86	6.37	0.096
<i>ABCG2</i> (G>T. <i>rs2231142</i>)	СС			СА			
	N	M	SD	N	M	SD	
miR-34 экспрессия	22	33.42	3.08	5	33.68	0.60	0.007

Таблица 3.5.

**Данные генотипирования пациентов с фибрилляцией предсердий и
связь полиморфизмов с уровнями экспрессии микро-РНК и
показателями коагуляции**

<i>ABCB1</i> 3435 C>T	СС			СТ			ТТ			р-значение критерий Крускала- Уоллиса
	N	M	SD	N	M	SD	N	M	SD	
miR-142 экспрес сия	3	31.69	1.60	38	34.06	1.66	16	33.16	1.77	0.021

CYP3A4 *22	CC			CT			p-value критерий Манна-Уитни
	N	M	SD	N	M	SD	
Протромбин по Квику	52	74.52	16.84	2	97.55	10.54	0.059
Протромбиновое время	52	14.10	2.17	2	11.87	0.60	0.059
МНО	52	1.31	0.20	2	1.1	0.06	0.059

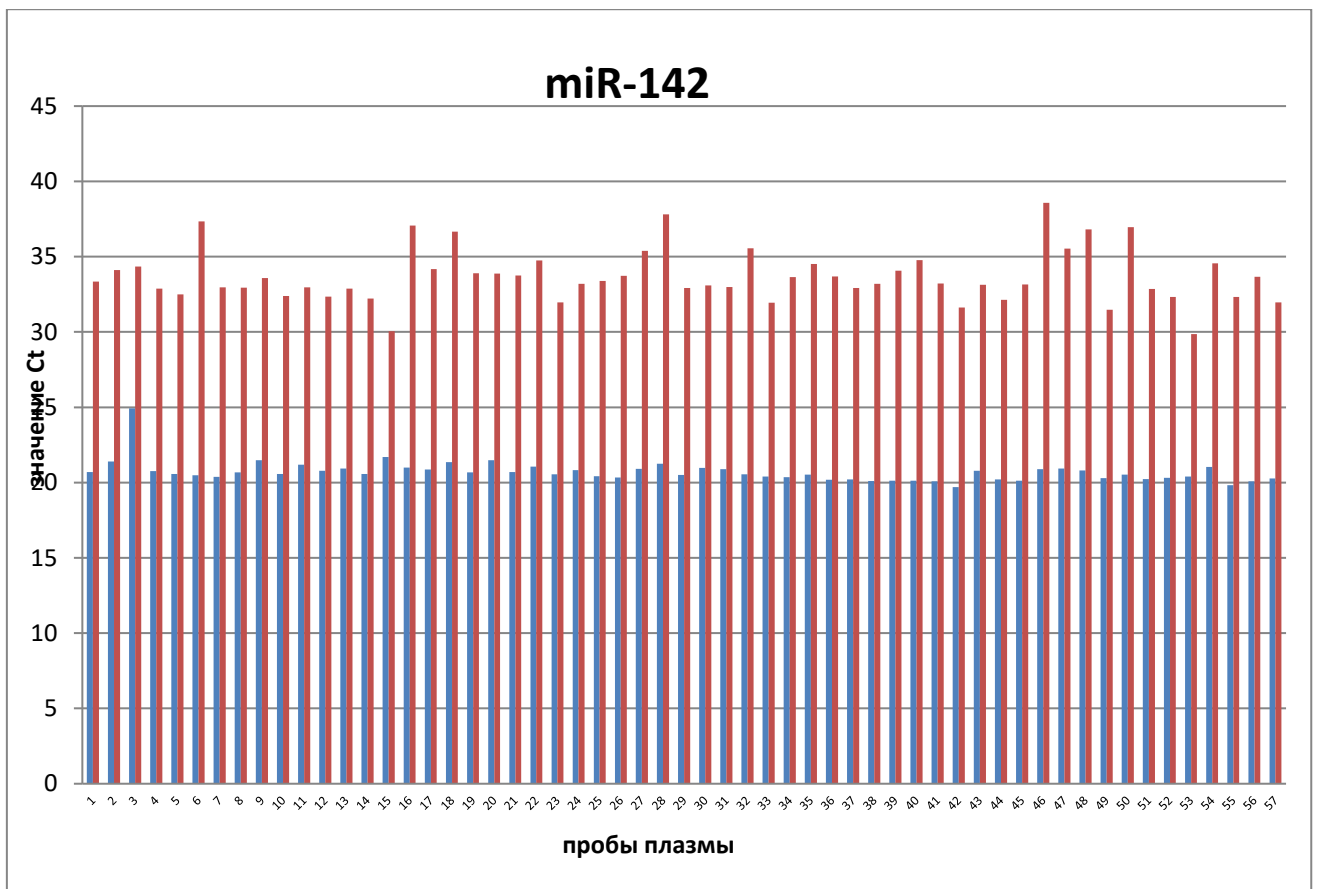
Из полиморфизмов ADME генов ривароксабана, продемонстрировавших статистически значимую связь с уровнями экспрессии микро-РНК, можно выделить полиморфизм *ABCB1* (*C3435T*, *rs1045642*) и *miR-142* ($p=0.021$). Также отмечена взаимосвязь между *CYP3A4*22* ($C>T$, *rs35599367*) и показателями коагуляции, такими как протромбин по Квику, протромбиновое время и МНО ($p=0.05$).

3.3. Оценка взаимосвязи между уровнем экспрессии микро-РНК и коагулологическими параметрами

Как и для оценки эффективности терапии ингибиторами P2Y12-рецепторов у пациентов с ОКС проводился анализ остаточной реактивности тромбоцитов, и показатели остаточной реактивности тромбоцитов сравнивались с экспрессией микро-РНК, так и в случае с пациентами с неклапанной фибрилляцией предсердий сравнивались коагулологические показатели пациентов с уровнями экспрессии тех микро-РНК, которые являются кандидатами в биомаркеры по эффективности терапии ривароксабаном.

Анализ проводился между уровнями экспрессии микро-РНК miR-142 и miR-39 и показателями коагуляции у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий. 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). Имеется также тенденция к уменьшению экспрессии miR-39 с возрастом (β коэффициент=-0.052, SE 0.030, $p=0.090$ в модели линейной регрессии)



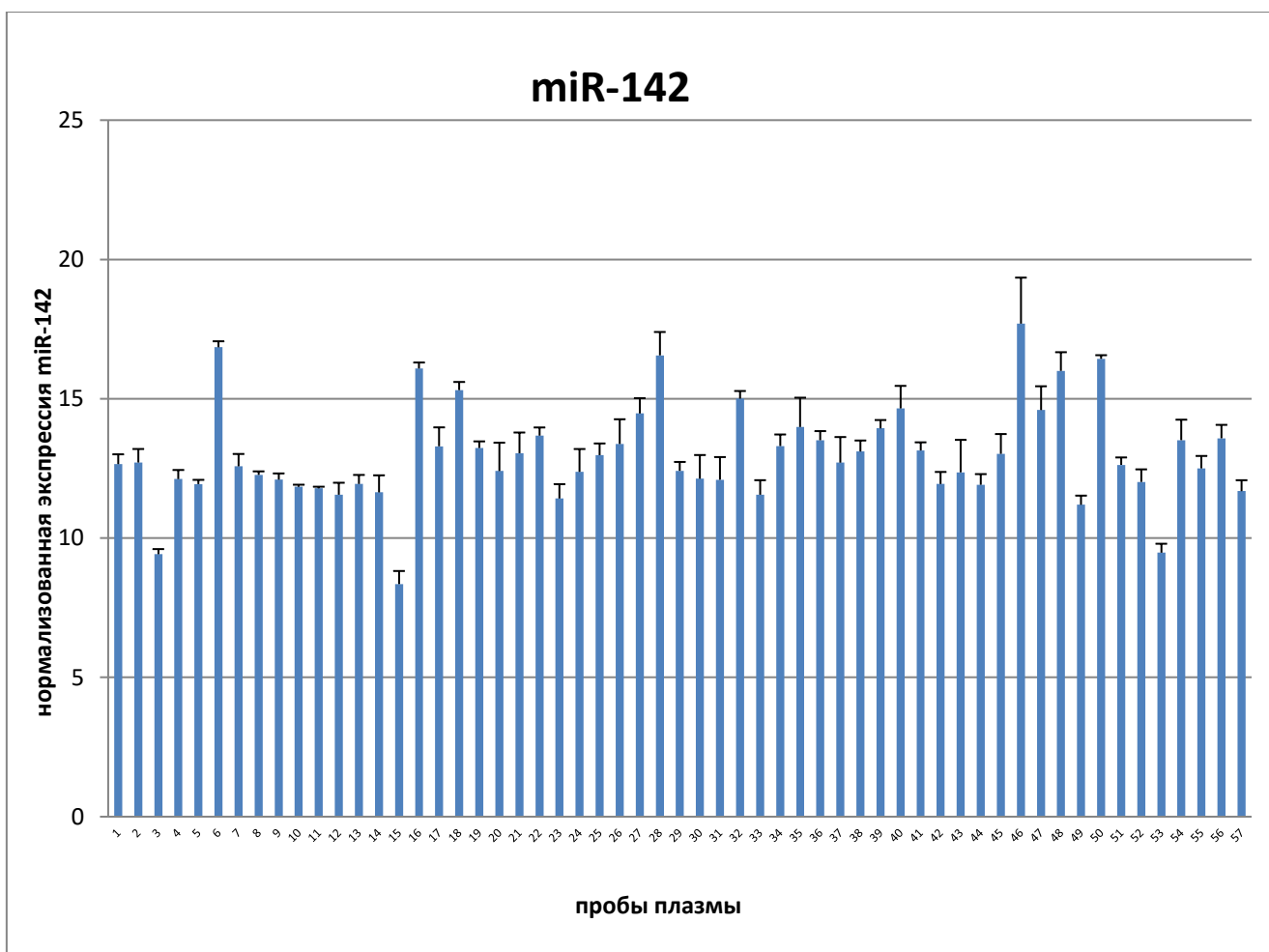


Рисунок 3.2 - Графики относительной экспрессии микро-РНК у пациентов с неклапанной фибрилляцией предсердий

Примечание: на данных графиках продемонстрированы уровни экспрессии исследованных у 57 пациентов с фибрилляцией предсердий микро-РНК. Чем выше значение C_t , тем меньше экспрессия данной микро-РНК в образце. Значения ΔC_T вычисляются путем вычитания значения C_t эндогенного контроля (или среднего значения C_t эндогенного контроля, если таких контролей несколько) из значения C_t гена для данной выборки. При расчете значения ΔC_T мы ссылаемся на число, вычитаемое из исходных значений C_t каждого гена, как на C_{t0} . Вычисление $\Delta\Delta C_T$ производится путем вычитания ΔC_T экспериментальной пробы из контрольной пробы.

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

В данном отрывке диссертационной работы представлен универсальный алгоритм поиска релевантных микро-РНК для лекарственного средства. Он основан на использовании данных трех баз данных: PharmGKB, Ensembl, TargetScan, и ему может следовать каждый исследователь, который ищет релевантные микро-РНК для лекарственных средств, так как все эти базы находятся в открытом доступе, а алгоритм прост и включает в себя лишь три шага.

Рассмотрим процесс поиска релевантных микро-РНК на примере ингибиторов P2Y₁₂ рецепторов.

Первым делом из базы данных PharmGKB извлечем данные о том, какие полиморфизмы генов, участвующие в метаболизме клопидогрела, имеют статистическую значимость по данным исследований. База данных PharmGKB (www.pharmgkb.org) использовалась для отбора всех генов системы ADME, участвующих в метаболизме клопидогрела. Всего было отобрано 36 таких генов, участвующих в метаболизме клопидогрела. Для каждого гена были отобраны только те варианты, которые ассоциируются с измененным ответом к клопидогрелу со значением $p < 0.05$.

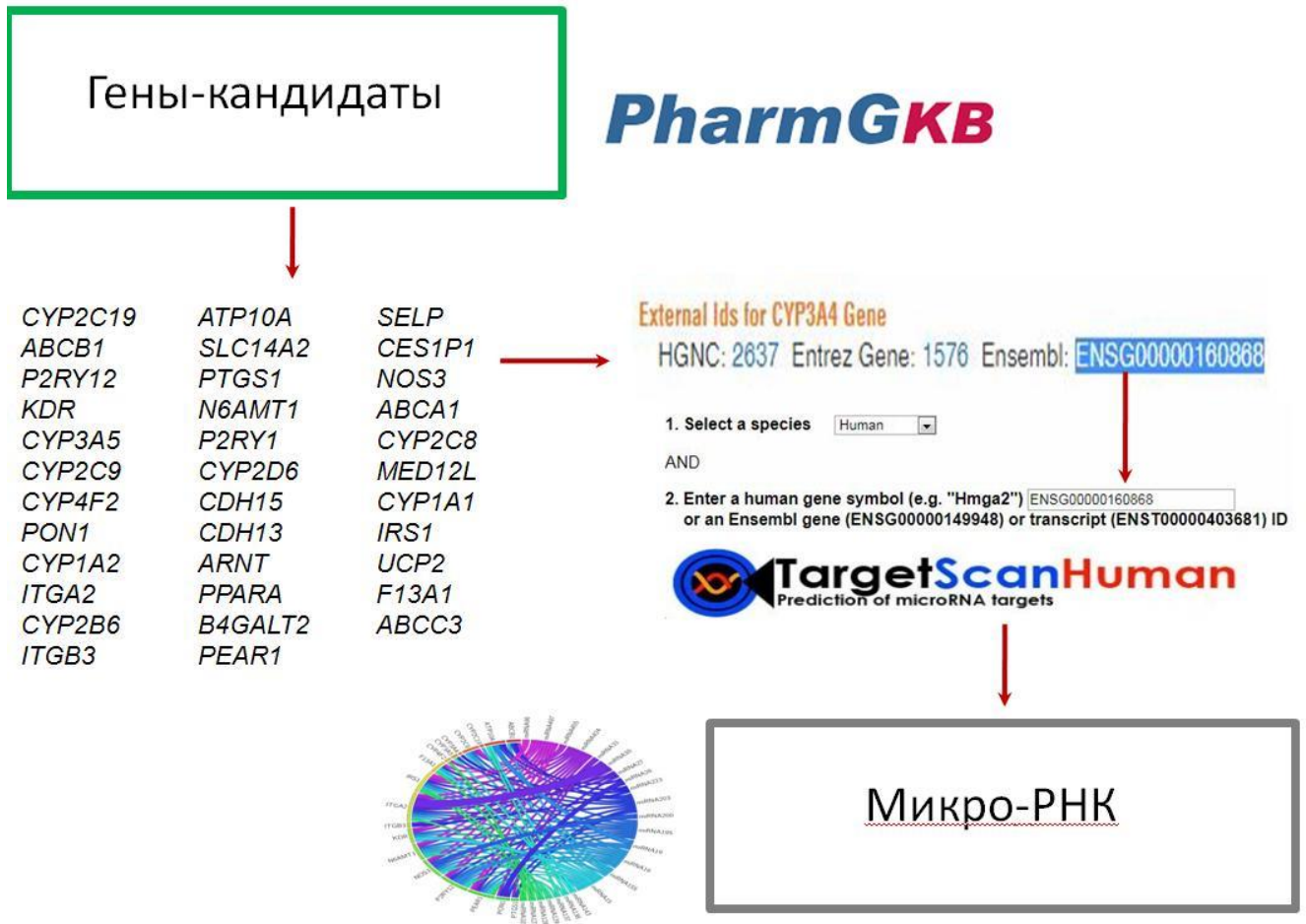


Рисунок 3.3 - Алгоритм поиска релевантных микро-РНК, представленный на примере поиска релевантных микро-РНК в качестве биомаркеров эффективности клопидогрела

Примечание: алгоритм включает информацию из трех баз данных - PharmGKB, TargetScanHuman, Ensembl.

Всего был выбран 51 вариант, ассоциированный с измененным ответом на терапию клопидогрелом.

Следующим шагом было получение Ensembl (Human Genome Variation Society, HGVS, Общество вариаций генома человека) названий данных полиморфизмов. Эти Ensembl названия нужны исследователю для отбора микро-РНК по сохраненным последовательностям нуклеотидов через TargetScanHuman 7.2 (www.targetscan.org/vert_72/), так как только Ensembl названия полиморфизмов могут быть приняты базой данных "TargetScan".

На заключительном этапе из списка микро-РНК, представленного базой данных "TargetScan", были выбраны семейства miRNA с высокой совокупностью P_{ct} (Probability of Conserved Targeting- вероятность таргетирования конкретной микро-РНК той последовательности, которая была сохранена на протяжении эволюции). Особенностью семейств микро-РНК является тот факт, что одна и та же микро-РНК способна принимать участие в регуляции экспрессии многих генов. Поэтому некоторые микро-РНК могут регулировать работу большего числа генов. Использование тех микро-РНК, которые регулируют работу большего числа генов, позволит сэкономить место в будущих тест-системах lab-on-a-chip, использующих набор микро-РНК в качестве биомаркеров для прогнозирования фармакодинамических эффектов препаратов. На рисунке 3.4 представлена гистограмма из микро-РНК, отобранных с использованием алгоритма.

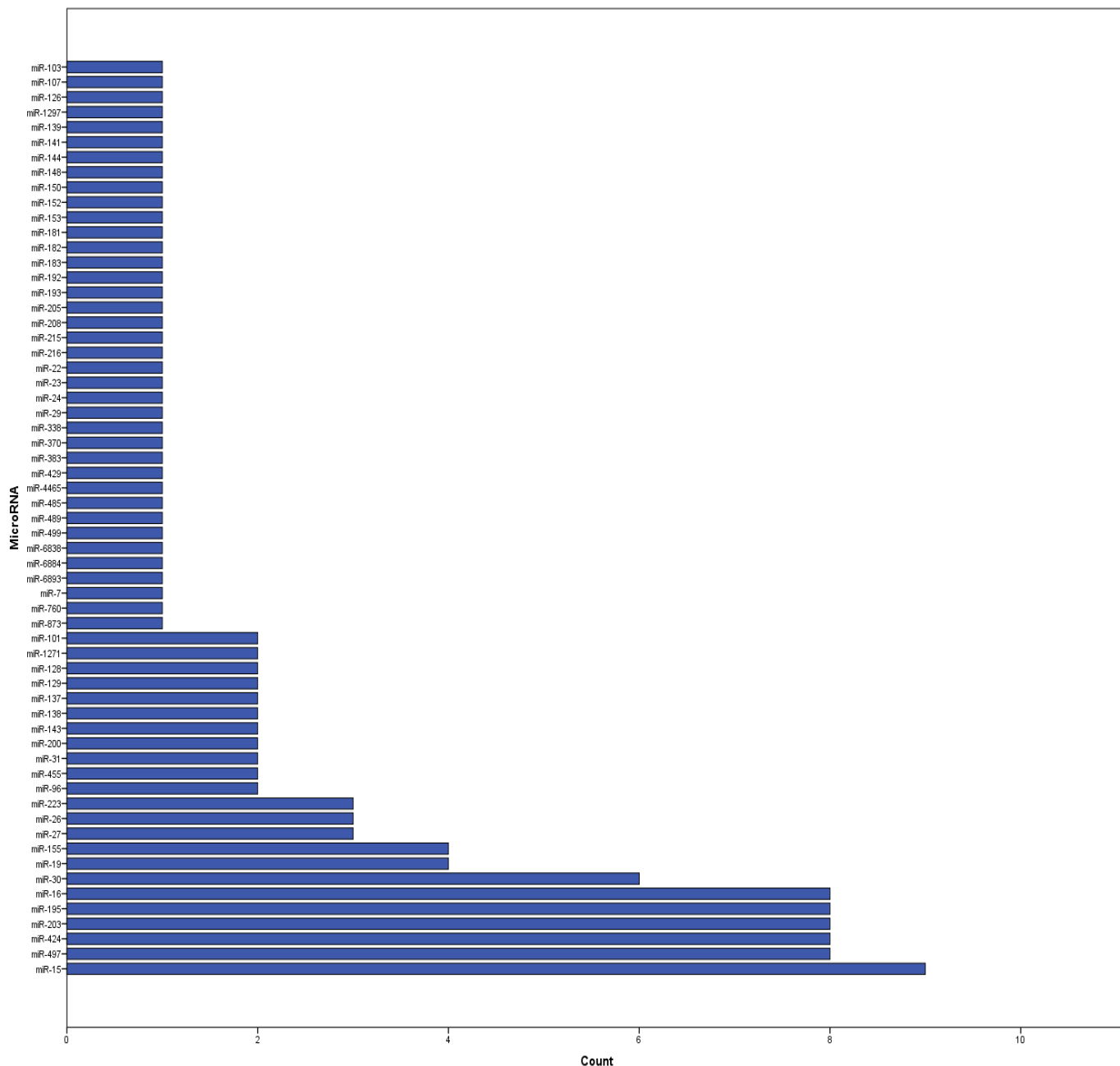


Рисунок 3.4 - список микро-РНК, которые могут быть ответственны за резистентность к клопидогрелу и их распространенность среди всех генов, участвующих в метаболизме клопидогрела

Примечание: так как некоторые избранные микро-РНК способны оказывать влияние на экспрессию нескольких генов; закономерно, что некоторые микро-РНК встречаются чаще остальных. Данное свойство может быть использовано исследователями для отбора тех микро-РНК, которые регулируют экспрессию большего числа генов для экономии места на чипах диагностических систем.

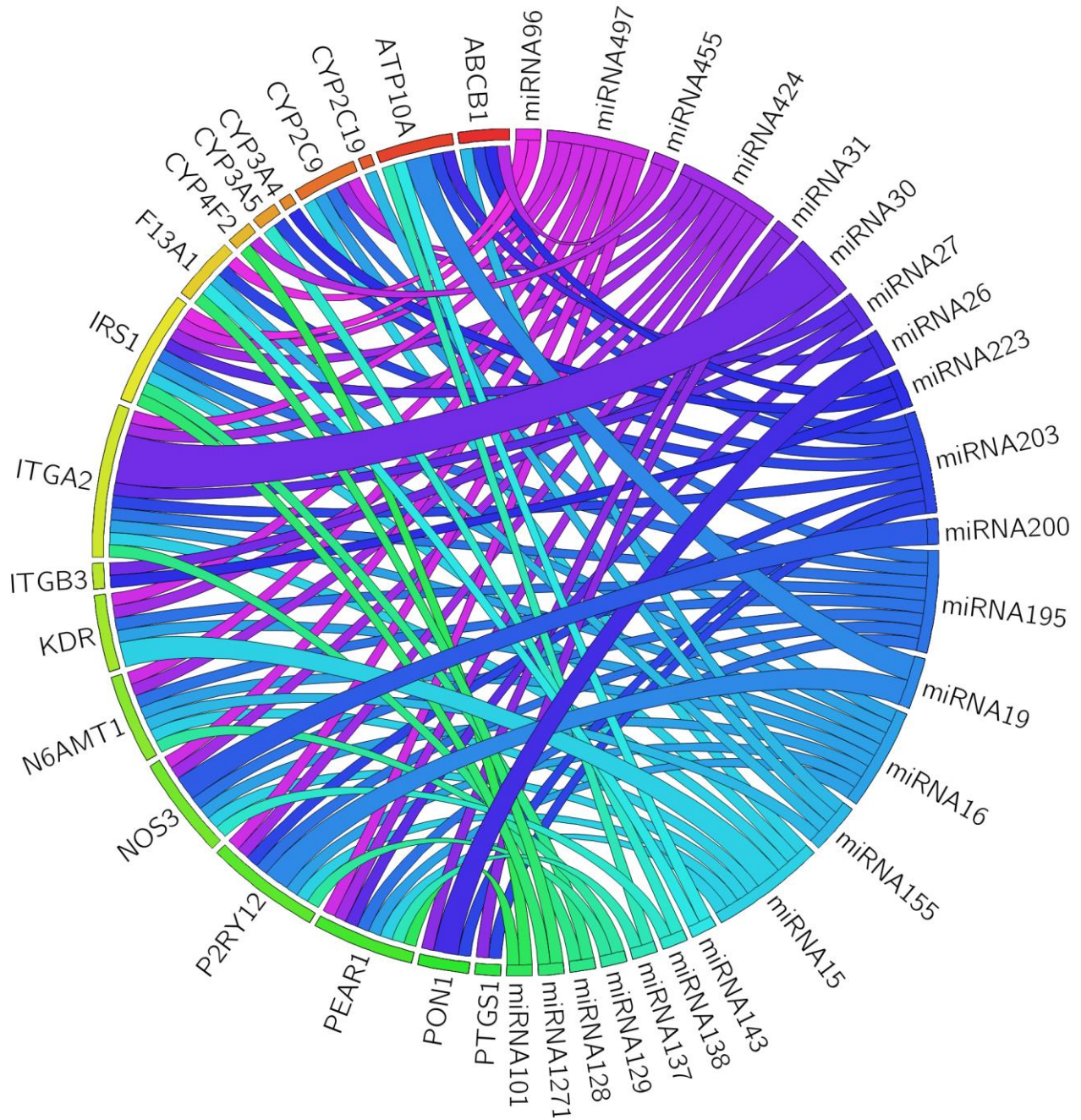


Рисунок 3.5 - микро-РНК, которые могут быть включены в интеллектуальную диагностическую систему для тестирования устойчивости к клопидогрелу и их связи с избранными генами ADME клопидогрела

Примечание: для чтения circos plot следует совместить гены (преимущественно левое полушарие) с соответствующими им микро-РНК (преимущественно правое полушарие).

На основе гистограммы релевантных микро-РНК, для включения в тест-систему, был построен Circos Plot для наглядной демонстрации взаимосвязей между самыми важными микро-РНК и генами, в регуляции которых те принимают участие. (Рисунок 3.5) Аналогичная работа была проделана для микро-РНК и генов, которые исследовали в данном диссертационном исследовании. (Рисунок 3.6)

В качестве обобщения к данной главе можно отметить, что в 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. В диссертационной работе представлен пример использования данного алгоритма на примере подбора микро-РНК для ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов. Circos Plot микро-РНК основан на надежных базах данных: PharmGKB и TargetscanHuman 7.2. 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?

Рецензенты диссертационной статьи, опубликованной в журнале *Meta Gene* отметили, почему из множества баз данных микро-РНК была выбрана именно TargetScan 7.2 [93]. Да, несмотря на то, что существует множество других баз данных микро-РНК: miRanda, PITA, miRTarBase и Pharmaco-miR, база TargetScan 7.2 была использована как надежная, самая современная и обширная.

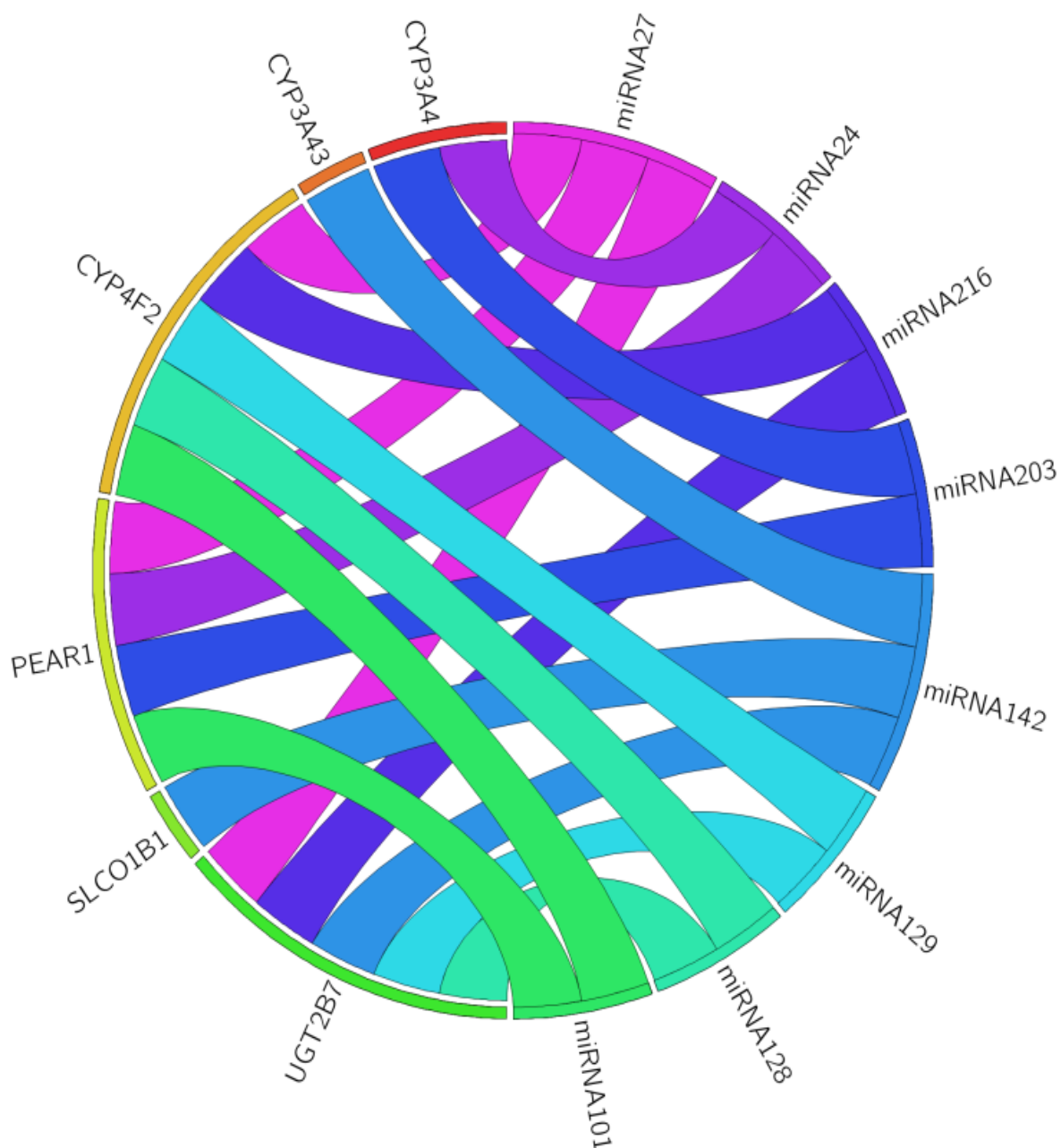


Рисунок 3.6 - микро-РНК, которые релевантны для генов, участвующих в метаболизме тикагрелора

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.

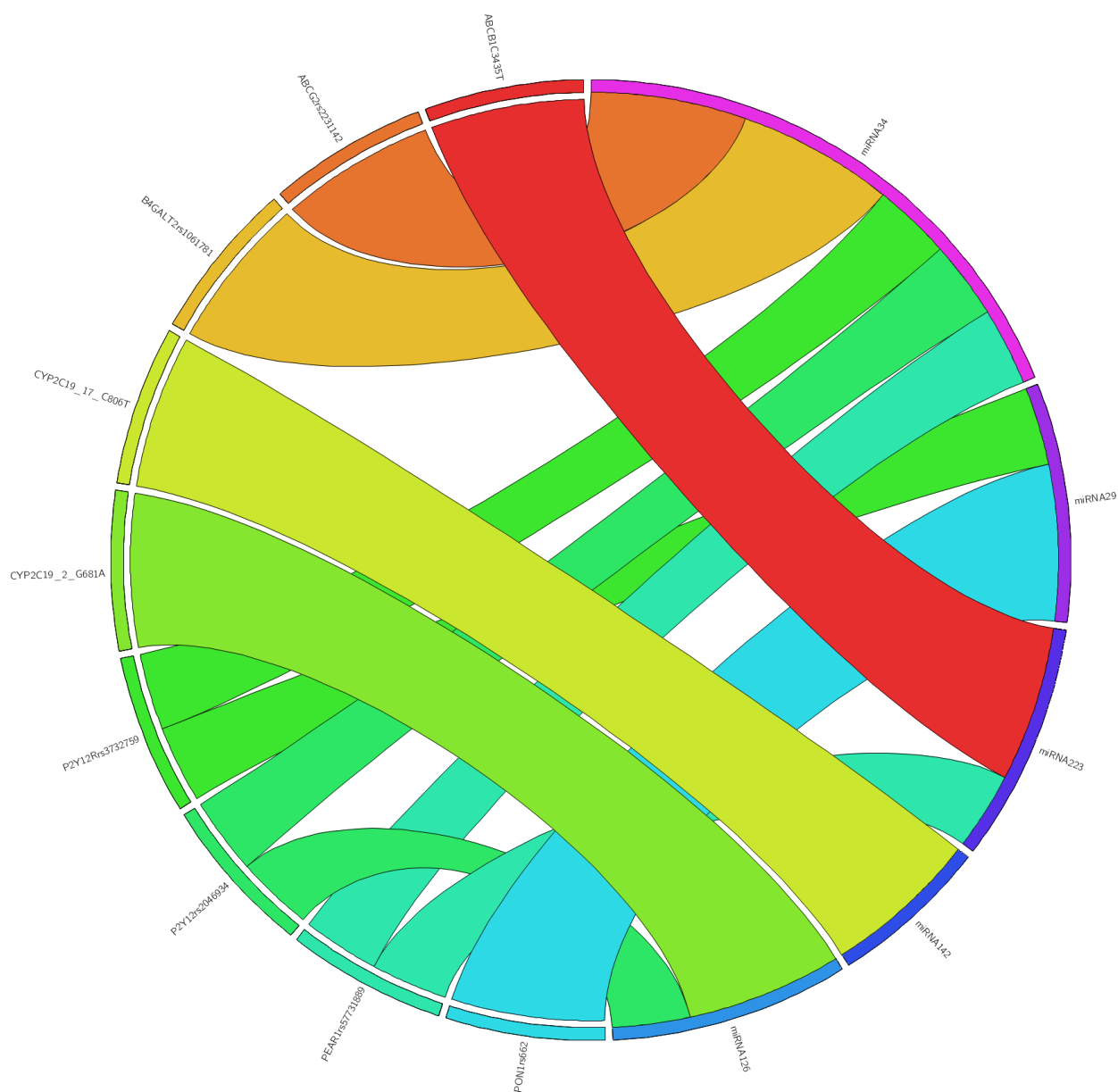


Рисунок 3.7 - связи между микро-РНК и полиморфизмами генов ADME для P2Y12-ингибиторов, проверенные экспериментально в диссертационном исследовании

Примечание: для чтения circos plot следует совместить гены (преимущественно левое полушарие) с соответствующими им микро-РНК (преимущественно правое полушарие).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микро-РНК играет одну из важных ролей в регуляции экспрессии белков. В ходе эволюции мРНК разных генов приобрели сайты для микро-РНК. Однако, тот факт, что микро-РНК не являются кодирующими последовательностями нуклеотидов, не умаляет их роли. Ведь чем больше сайтов для микро-РНК имеются на мРНК, тем меньше выход белка вследствие снижения трансляции. Отмечаются два варианта связывания микро-РНК с мРНК: или полностью - на 8 нуклеотидов целевого сайта, или частично - на 7 и 6 нуклеотидов целевого сайта. Связывание мРНК с микро-РНК на 7 или 6 нуклеотидов ведет к снижению трансляции, а полное связывание на 8 нуклеотидов ведет к разрушению целевой мРНК. В некоторых случаях наблюдаемая учеными дестабилизация целевой мРНК может явиться причиной снижения продукции белка по данным источников на 85%. В то же время, при неполном связывании экспрессия белка продолжает осуществляться на минимальных уровнях. Таким образом, микро-РНК оказывают прямое влияние на фенотип клетки, подстраивая трансляцию белка и, таким образом, регулируя экспрессию гена.

Микро-РНК оказывают свое действие на регуляцию экспрессии генов, в том числе экспрессию многих ADME генов (Absorption, distribution, metabolism, excretion - абсорбции, распределения, метаболизма и выведения), которые могут быть ответственны за резистентность к препаратам. Такая способность регулировать экспрессию открывает новые возможности в применении микро-РНК в качестве инструмента персонализированной медицины в терапии антитромботическими препаратами сердечно-сосудистых заболеваний. Существует проблема отсутствия биомаркеров, прогнозирующих ответ на антитромботические лекарственные средства. Так, измерение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов для терапевтического лекарственного мониторинга эффективности приема пациентами ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов чрезвычайно затратно, позволяет оценить остаточную агрегацию тромбоцитов лишь в один

конкретный момент времени, измерение подвержено влиянию сторонних факторов, таких как уровень гематокрита в крови, аккуратность забора крови средним медицинским персоналом (так как возможен гемолиз), внезапные ошибки аппаратуры, вследствие чего и проба крови в вакуумной пробирке, и картридж с уже заполненными кровью емкостями, становятся непригодными. Это приводит не только к потере времени (при измерении агрегации тромбоцитов в лаборатории катетеризации), необходимости повторного забора крови средним медицинским персоналом, но и в два раза повышает цену одного измерения. Все это вызывает необходимость в биомаркере, измерение которого легко прогнозировать, легко осуществить, не является затратным. Также для пациентов, получающих прямые оральные антикоагулянты необходим биомаркер, который позволит оценить эффективность применения лекарственного средства. Показатели коагулологического состояния крови, такие как МНО, АЧТВ здесь не подходят. А измерение концентрации лекарственного средства в крови чрезвычайно затратно и доступно только большим специализированным лабораториям. В этом случае микро-РНК, как новые фармакотранскриптомные биомаркеры окажутся особенно перспективны.

Для трансляции опыта использования микро-РНК в целях персонализации терапии при сердечно-сосудистых заболеваниях в ежедневную клиническую работу кардиологических и терапевтических отделений необходимо более чёткое понимание ассоциаций уровней циркулирующих плазменных микро-РНК – как уже описанных, так и новых, - с фенотипической вариантностью изоферментов системы цитохрома P450, и влиянием, которое микро-РНК способны оказывать на экспрессию генов системы ADME. Проведение этих исследований позволит разработать общий подход к персонализации антитромботической терапии на основе фармакогенетики и использовать микро-РНК в качестве биомаркеров ответа на лекарственные препараты

В данной диссертационной работе впервые оценена возможность использования плазменных микро-РНК в качестве биомаркеров фармакодинамических эффектов у пациентов, принимающих антитромботические препараты. Выявлены и проанализированы значимые корреляции между уровнями экспрессии плазменных микро-РНК и показателями остаточной реактивности тромбоцитов у пациентов, принимающих ингибиторы P2Y₁₂ рецепторов. Также найдены 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.

Немаловажным с практической точки зрения достоинством этой диссертационной работы является представленный универсальный алгоритм подбора релевантных микро-РНК для лекарственных средств на примере значимых микро-РНК для клопидогрела и тикагрелора. Представленный универсальный алгоритм позволяет обозначить основные этапы процесса поиска релевантных микро-РНК для любых лекарственных средств. Он имеет практическую ценность: исследователи и создатели тест систем, так называемых, lab-on-a-chip систем, 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). Ввиду ограниченности количества возможных ячеек для размещения чувствительных к микро-РНК зон на чипе, применение данного алгоритма позволит создателям тест-систем существенно удешевить производство чипов, что, в свою очередь, повысит распространенность методики применения микро-РНК в качестве биомаркеров для прогнозирования эффективности лечения антитромботическими средствами. В данном диссертационном исследовании

представлены наглядные Circos Plots с наиболее значимыми микро-РНК для полиморфизмов генов, участвующих в метаболизме клопидогрела и тикагрелора.

Данное диссертационное 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.

Данное исследование является не только новаторским благодаря предложенным новым биомаркерам, оно также является самым большим из опубликованных, так как оно включает 137 пациентов, которым суммарно было проведено 1093 фармакогенетических исследования, рассматривает 7 микро-РНК, 18 значимых полиморфизмов и три наиболее востребованные в клинической практике препарата по лечению пациентов с такими важными заболеваниями, как острый коронарный синдром и неклапанная фибрилляция предсердий.

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.

Современные исследования, которые изучали подход к назначению антиагрегантов на основе результатов фармакогенетического тестирования продемонстрировали интересные результаты. Так, исследование TAILOR-PCI показало снижение первичной конечной точки - смерти вследствие инфаркта миокарда, инсульта, определенного или вероятного стент-тромбоза и тяжелой рецидивирующей ишемии до 34%. В ходе последующего анализа результатов установлено, что при использовании стратегии назначения антиагрегантов на основе результатов фармакогенетического тестирования, абсолютная польза от использования данной стратегии составила 2,1%. Таким образом, назначение антиагрегантов не только на основе измерения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, но также на основе результатов фармакогенетического тестирования является оправданным и валидизированным, что позволяет снизить количество осложнений у пациентов с острым коронарным синдромом.

Однако микро-РНК могут предложить лучшее из двух методик - комплексную оценку эффективности применения антиагрегантов. И в этом диссертационном исследовании было показано, что в случае применения следующих микро-РНК: miR-29, miR-126, miR-142, miR-223 - есть достоверная корреляция с уровнем остаточной реактивности тромбоцитов, а в случае с miR-29, miR-142, miR-34 - и с наличием полиморфизмов генов, которые могут влиять на метаболизм лекарственного средства. Таким образом, miR-29, miR-142 являются наиболее перспективными биомаркерами для прогнозирования антиагрегантного эффекта ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с острым коронарным синдромом. В их случае отмечена корреляция между уровнями их экспрессии и остаточной реактивностью тромбоцитов, измеренной на приборе VerifyNow, а также наличием значимых полиморфизмов.

Для ривароксабана перспективными являются микро-РНК: miR-142 и miR-39. Но особенно значимым является miR-142, так как отмечена корреляция между уровнем его экспрессии и такими коагулологическими

показателями, как АЧТВ ($p=0.019$) и протромбин по Квику ($p=0.095$). Отмечена корреляция между miR-142 и *ABCB1* (*C3435T*, *rs1045642*) ($p=0.021$). Таким образом, miR-142 является наиболее перспективным биомаркером прогнозирования фармакодинамических эффектов прямого орального антикоагулянта ривароксабана.

Большое количество пациентов в данном диссертационном исследовании, количество исследованных полиморфизмов и отработанный метод оценки эффективности как P2Y₁₂-ингибиторов, так и прямых оральных антикоагулянтов, позволяют валидизировать использование miR-29, miR-34, miR-39, miR-126, miR-142, miR-223 в качестве биомаркеров прогнозирования фармакодинамических эффектов антитромботических лекарственных средств.

ВЫВОДЫ

1. Обоснована возможность использования циркулирующих микро-РНК miR-223, miR-126, miR-29, miR-142 в качестве биомаркеров, прогнозирующих особенности фармакодинамических эффектов антиагрегантов, так как 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, которая оценивалась 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ADME	Абсорбция, распределение, метаболизм и выведение
CYP3A4	Изофермент системы цитохрома P-450
DOACs	Прямые оральные антикоагулянты
GP IIb/IIIa	Гликопротеин IIb/IIIa
NGS	Секвенирование следующего поколения
NSTEMI	Инфаркт миокарда без подъема сегмента ST
P_{ct}	Probability of conserved targeting - вероятность сохранения таргетирования
PRU	Platelet reactivity units -остаточная реактивность тромбоцитов
PXR	Прегнан X рецептор
RISC	РНК-индуцируемый комплекс выключения гена
SE	Standard error - стандартная погрешность
STEMI	Инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST
АГ	Артериальная гипертензия
АДФ	Аденозиндифосфат
АЛТ	Аланинаминотрансфераза
АСК	Ацетилсалициловая кислота
АСТ	Аспартатаминотрансфераза
АЧТВ	Активированное частичное тромбопластиновое время
ВТК	Ветвь тупого края
ВЭЖХ-МС	Высокоэффективная жидкостная хроматография – тандемная масс-спектрометрия
ДАД	Диастолическое артериальное давление
ДВ	Диагональная ветвь левой коронарной артерии

ДИ	Доверительный интервал
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
иАПФ	Ингибиторы ангиотензин превращающего фермента
ИБС	Ишемическая болезнь сердца
ЛКА	Левая коронарная артерия
ЛПНП	Липиды низкой плотности
МНО	Международное нормализованное отношение
мРНК	Матричная цепочка рибонуклеиновой кислоты
НМГ	Низкомолекулярные гепарины
НПКО	Нижний предел количественного определения
ОАК	Оральные антикоагулянты
ОВ	Огибающая ветвь левой коронарной артерии
ОКС	Острый коронарный синдром
ОР	Отношение рисков
ПВ	Протромбиновое время
ПКА	Правая коронарная артерия
ПНА	Передняя нисходящая артерия
ПОАК	Прямые оральные антикоагулянты
ПЦР	Полимеразно-цепная реакция
РНК	Рибонуклеиновая кислота
C_{\min}	Минимальная концентрация препарата в крови
САД	Систолическое артериальное давление
СД	Сахарный диабет
ТВ	Тромбиновое время
ТГ	Триглицериды
ФВ	Фракция выброса
ФП	Фибрилляция предсердий
ХБП	Хроническая болезнь почек
ХСН	Хроническая сердечная недостаточность

ЧКВ	Чрескожное коронарное вмешательство
ЧСС	Частота сердечных сокращений
ЭДТА	Этилендиаминтетраацетат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. T. Fundamentals of coagulation and new insights into the pharmacology and pharmacogenetics of anticoagulant therapy // *Clinical Toxicology*. 2013.
2. Abdullaev S. P. [и др.]. Clinically relevant pharmacogenetic markers in Tatars and Balkars // *Molecular Biology Reports*. 2020.
3. Agarwal V. [и др.]. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs // *eLife*. 2015.
4. Ambros V. [и др.]. A uniform system for microRNA annotation // *RNA*. 2003.
5. Ambros V. The functions of animal microRNAs // *Nature*. 2004.
6. Aradi D. [и др.]. Efficacy and safety of intensified antiplatelet therapy on the basis of platelet reactivity testing in patients after percutaneous coronary intervention: Systematic review and meta-analysis // *International Journal of Cardiology*. 2013.
7. Aradi D. [и др.]. Platelet reactivity and clinical outcomes in acute coronary syndrome patients treated with prasugrel and clopidogrel: A pre-specified exploratory analysis from the TROPICAL-ACS trial // *European Heart Journal*. 2019.
8. Ašić A. [и др.]. Pharmacogenetics of novel oral anticoagulants: A review of identified gene variants & future perspectives // *Personalized Medicine*. 2018.
9. B. J. [и др.]. Levels of platelet micro-RNA-223, microRNA-150 and microRNA-21 in patients with coronary artery disease during dual anti platelet therapy and after cessation of P2Y12-inhibitor therapy // *European Heart Journal*. 2017.
10. Bartel D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions // *Cell*. 2009.
11. Becker K. C. [и др.]. Regulation of platelet reactivity identified through microRNA profiling in acute coronary syndrome // *Circulation*. 2016.
12. Berg N. W. E. van den [и др.]. MicroRNAs in Atrial Fibrillation: from Expression Signatures to Functional Implications // *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2017.

13. Bhatt D. L. Intensifying Platelet Inhibition — Navigating between Scylla and Charybdis // *New England Journal of Medicine*. 2007.
14. Biasucci L. M. [и др.]. Different modulation of microRNA by ticagrelor and clopidogrel in non STEMI patients (Tiger M study NCT02071966) // *Circulation*. 2017.
15. Braza-Boïls A. [и др.]. Circulating microRNA levels indicate platelet and leukocyte activation in endotoxemia despite platelet p2y12 inhibition // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
16. Breet N. J. [и др.]. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation // *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2010.
17. Bruhn O., Cascorbi I. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance // *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2014.
18. Campo G. [и др.]. Prospective evaluation of on-clopidogrel platelet reactivity over time in patients treated with percutaneous coronary intervention: Relationship with gene polymorphisms and clinical outcome // *Journal of the American College of Cardiology*. 2011.
19. Carino A. [и др.]. Modulation of Circulating MicroRNAs Levels during the Switch from Clopidogrel to Ticagrelor // *BioMed Research International*. 2016.
20. Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs // *Pharmacology and Therapeutics*. 2006.
21. Cascorbi I. Editorial: The promises of personalized medicine // *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2010.
22. Cascorbi I. Significance of Pharmacogenomics in Precision Medicine // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2018.
23. Cavallari L. H., Shin J., Perera M. A. Role of pharmacogenomics in the management of traditional and novel oral anticoagulants // *Pharmacotherapy*. 2011.
24. Chen S. [и др.]. Expression of miRNA-26a in platelets is associated with clopidogrel resistance following coronary stenting // *Experimental and Therapeutic*

Medicine. 2016.

25. Chyrchel B. [и др.]. Association of plasma MIR-223 and platelet reactivity in patients with coronary artery disease on dual antiplatelet therapy: A preliminary report // *Platelets*. 2015.

26. Claassens D. M. F. [и др.]. A Genotype-Guided Strategy for Oral P2Y₁₂ Inhibitors in Primary PCI // *New England Journal of Medicine*. 2019.

27. Cohen A. T. [и др.]. State of play and future direction with NOACs: An expert consensus // *Vascular Pharmacology*. 2018.

28. Cullell N. [и др.]. Pharmacogenetic studies with oral anticoagulants. Genomewide association studies in vitamin K antagonist and direct oral anticoagulants // *Oncotarget*. 2018.

29. D.A. S. [и др.]. 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.

30. Daly A. K. Genetic Polymorphisms Affecting Drug Metabolism. Recent Advances and Clinical Aspects. 2012.

31. Dean L. Clopidogrel Therapy and CYP2C19 Genotype / L. Dean, 2012.

32. Denzler R., Stoffel M. The Long, the Short, and the Unstructured: A Unifying Model of miRNA Biogenesis // *Molecular Cell*. 2015.

33. Douxfils J. [и др.]. Comparison of calibrated chromogenic anti-Xa assay and PT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with rivaroxaban // *Thrombosis and Haemostasis*. 2013.

34. Fedorinov D. S. [и др.]. Pharmacogenetic testing by polymorphic markers G1846A (CYP2D6* 4) and C100T (CYP2D6* 10) of the CYP2D6 gene in coronary heart disease patients taking $\beta\beta$ -blockers in the Republic of Sakha (YAKUTIA) // *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2018.

35. Ferguson J. J. Clopidogrel plus aspirin in patients with acute myocardial infarction treated with fibrinolytic therapy – CLARITY-TIMI 28 // *Future Cardiology*. 2005.

36. Freitas R. C. C. de [и др.]. Integrated analysis of miRNA and mRNA gene expression microarrays: Influence on platelet reactivity, clopidogrel response and drug-induced toxicity // *Gene*. 2016.
37. Frelinger A. L. [и др.]. Clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics vary widely despite exclusion or control of polymorphisms (CYP2C19, ABCB1, PON1), noncompliance, diet, smoking, co-medications (Including Proton Pump Inhibitors), and pre-existent variability in platelet f // *Journal of the American College of Cardiology*. 2013.
38. Friedman R. C. [и др.]. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // *Genome Research*. 2009.
39. Gargalionis A., Basdra E. Insights in microRNAs Biology // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2013.
40. Garzon R., Marcucci G., Croce C. M. Targeting microRNAs in cancer: Rationale, strategies and challenges // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010.
41. Gibson C. M. [и др.]. Usefulness of Clopidogrel in Abolishing the Increased Risk of Reinfarction Associated With Higher Platelet Counts in Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction (Results from CLARITY-TIMI 28) // *American Journal of Cardiology*. 2006.
42. Gómez-Outes A. [и др.]. Direct oral anticoagulants in the treatment of acute venous thromboembolism: A systematic review and meta-analysis // *Thrombosis Research*. 2014.
43. Gouin-Thibault I. [и др.]. Interindividual variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of ABCB1 genetic polymorphisms and interaction with clarithromycin // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2017.
44. Gulilat M. [и др.]. Interpatient Variation in Rivaroxaban and Apixaban Plasma Concentrations in Routine Care // *Canadian Journal of Cardiology*. 2017.
45. Haenisch S. [и др.]. Down-regulation of ATP-binding cassette C2 protein expression in HepG2 cells after rifampicin treatment is mediated by microRNA-379 // *Molecular Pharmacology*. 2011.
46. Harenberg J. [и др.]. Measurement of rivaroxaban and apixaban in serum

- samples of patients // *European Journal of Clinical Investigation*. 2014.
47. He L., Hannon G. J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation // *Nature Reviews Genetics*. 2004.
48. Hudder A., Novak R. F. miRNAs: Effectors of environmental influences on gene expression and disease // *Toxicological Sciences*. 2008.
49. Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P. Computational identification of plant MicroRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA // *Molecular Cell*. 2004.
50. Kanuri S. H., Kreutz R. P. Pharmacogenomics of novel direct oral anticoagulants: Newly identified genes and genetic variants // *Journal of Personalized Medicine*. 2019.
51. Ko Y. G. [и др.]. Comparison of 2 point-of-care platelet function tests, VerifyNow Assay and Multiple Electrode Platelet Aggregometry, for predicting early clinical outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention // *American Heart Journal*. 2011.
52. Kondkar A. A. [и др.]. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: Suggested role for platelet microRNA // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010.
53. Kubica A. [и др.]. Genetic determinants of platelet response to clopidogrel // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2011.
54. Lamba V. [и др.]. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation // *BMC Research Notes*. 2014.
55. Larsen P. D. [и др.]. Comparison of Multiplate and VerifyNow platelet function tests in predicting clinical outcome in patients with acute coronary syndromes // *Thrombosis Research*. 2017.
56. Lewis B. P. [и др.]. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets // *Cell*. 2003.
57. Lewis B. P., Burge C. B., Bartel D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // *Cell*. 2005.

58. Liu Z. [и др.]. The Expression Levels of Plasma microRNAs in Atrial Fibrillation Patients // PLoS ONE. 2012.
59. Lorenzini K. I. [и др.]. Rivaroxaban-induced hemorrhage associated with ABCB1 genetic defect // Frontiers in Pharmacology. 2016.
60. M. Witkos T., Koscianska E., J. Krzyzosiak W. Practical Aspects of microRNA Target Prediction // Current Molecular Medicine. 2011.
61. Malinin A. [и др.]. Monitoring platelet inhibition after clopidogrel with the VerifyNow-P2Y12® rapid analyzer: The VERify Thrombosis risk ASsessment (VERITAS) study // Thrombosis Research. 2007.
62. Mega J. L. [и др.]. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: A pharmacogenetic analysis // The Lancet. 2010.
63. Michelson A. D. Methods for the Measurement of Platelet Function // American Journal of Cardiology. 2009.
64. Michelson A. D., Frelinger A. L., Furman M. I. Current Options in Platelet Function Testing // American Journal of Cardiology. 2006.
65. Mirzaev K. [и др.]. Interethnic differences in the prevalence of main cardiovascular pharmacogenetic biomarkers // Pharmacogenomics. 2020.
66. Mirzaev K. B. [и др.]. Impact of the CYP3A4 metabolic activity and CYP2C19 Polymorphisms on Antiplatelet effects of clopidogrel in Russian Patients with acute Coronary Syndrome undergoing coronary stent implantation // Clinical Therapeutics. 2015.
67. Mirzaev K. B. [и др.]. Genetic Polymorphisms of Cytochrome P450 Enzymes and Transport Proteins in a Russian Population and Three Ethnic Groups of Dagestan // Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 2017.
68. Mirzaev K. B. [и др.]. CRT-100.09 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.
69. Mirzaev K. B. [и др.]. CYP2C19 polymorphism frequency in Russian patients

in central Russia and Siberia with acute coronary syndrome // *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2017.

70. Mirzaev K. B. [и др.]. 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.

71. Mirzaev K. B. [и др.]. Influence of CYP4F2*3 on response to clopidogrel in patients with acute coronary syndrome // *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2018.

72. Mirzaev K. B. [и др.]. Effects of the rs2244613 polymorphism of the CES1 gene on the antiplatelet effect of the receptor P2Y12 blocker clopidogrel // *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2019.

73. Mirzaev K. B. [и др.]. ADME pharmacogenetics: Future outlook for Russia // *Pharmacogenomics*. 2019.

74. Mirzaev K. B. [и др.]. Multi-ethnic analysis of cardiac pharmacogenetic markers of cytochrome P450 and membrane transporters genes in the Russian population // *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2019.

75. Mirzaev K. B. [и др.]. New pharmacogenetic markers to predict the risk of bleeding during taking of direct oral anticoagulants // *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2020.

76. Mohri T. [и др.]. Human CYP2E1 is regulated by miR-378 // *Biochemical Pharmacology*. 2010.

77. Mueck W. [и др.]. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban // *Clinical Pharmacokinetics*. 2014.

78. Mueck W., Schwerts S., Stampfuss J. Rivaroxaban and other novel oral anticoagulants: Pharmacokinetics in healthy subjects, specific patient populations and relevance of coagulation monitoring // *Thrombosis Journal*. 2013.

79. Nakano M., Nakajima M. Current knowledge of microRNA-mediated regulation of drug metabolism in humans // *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2018.

80. Namino F. [и др.]. Dynamics of Soluble Thrombomodulin and Circulating

miRNAs in Patients with Atrial Fibrillation Undergoing Radiofrequency Catheter Ablation // *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2019.

81. O'connor C. T., Kiernan T. J., Yan B. P. The genetic basis of antiplatelet and anticoagulant therapy: A pharmacogenetic review of newer antiplatelets (clopidogrel, prasugrel and ticagrelor) and anticoagulants (dabigatran, rivaroxaban, apixaban and edoxaban) // *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2017.

82. P. G. [и др.]. Pharmacogenetics of new anticoagulants // *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 2013.

83. Paniccia R. [и др.]. Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007.

84. Pereira N. L. [и др.]. Effect of Genotype-Guided Oral P2Y12 Inhibitor Selection vs Conventional Clopidogrel Therapy on Ischemic Outcomes after Percutaneous Coronary Intervention: The TAILOR-PCI Randomized Clinical Trial // *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2020.

85. Ramamoorthy A. [и др.]. In silico and in vitro identification of microRNAs that regulate hepatic nuclear factor 4 α expression // *Drug Metabolism and Disposition*. 2012.

86. Reiffel J. A. [и др.]. NOAC monitoring, reversal agents, and post-approval safety and effectiveness evaluation: A cardiac safety research consortium think tank // *American Heart Journal*. 2016.

87. Reilly P. A. [и др.]. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: The RE-LY trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy) // *Journal of the American College of Cardiology*. 2014.

88. Rieger J. K. [и др.]. Inflammation-associated MICRORNA-130b down-regulates cytochrome P450 activities and directly targets CYP2C9 // *Drug Metabolism and Disposition*. 2015.

89. Rose D. K., Bar B. Direct Oral Anticoagulant Agents: Pharmacologic Profile,

- Indications, Coagulation Monitoring, and Reversal Agents // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2018.
90. Rottenstreich A. [и др.]. Direct-acting oral anticoagulant drug level monitoring in clinical patient management // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2018.
91. Rytkin E. [и др.]. 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.
92. Rytkin E. [и др.]. 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.
93. Rytkin E. [и др.]. Selection of miRNAs for clopidogrel resistance prediction // *Meta Gene*. 2020.
94. Rytkin E. I. [и др.]. 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.
95. Samama M. M. [и др.]. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban - An oral, direct factor Xa inhibitor // *Thrombosis and Haemostasis*. 2010.
96. Schömig A. [и др.]. A Randomized Comparison of Antiplatelet and Anticoagulant Therapy after the Placement of Coronary-Artery Stents // *New England Journal of Medicine*. 1996.
97. Schwab M., Schaeffeler E. Pharmacogenomics: a key component of personalized therapy // *Genome Medicine*. 2012.
98. Scott S. A. [и др.]. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2013.
99. Seiffge D. J. [и др.]. Feasibility of rapid measurement of Rivaroxaban plasma levels in patients with acute stroke // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*.

2017.

100. Shen N. N. [и др.]. MicroRNA expression signatures of atrial fibrillation: The critical systematic review and bioinformatics analysis // *Experimental Biology and Medicine*. 2020.

101. Shi H. [и др.]. Walking the interactome to identify human miRNA-disease associations through the functional link between miRNA targets and disease genes // *BMC Systems Biology*. 2013.

102. Shi R. [и др.]. Decreased platelet miR-223 expression is associated with high on-clopidogrel platelet reactivity // *Thrombosis Research*. 2013.

103. Shuldiner A. R. [и др.]. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy // *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2009.

104. Simon T. [и др.]. Genetic Determinants of Response to Clopidogrel and Cardiovascular Events // *New England Journal of Medicine*. 2009.

105. Stakos D. A. [и др.]. Platelet microRNAs: From platelet biology to possible disease biomarkers and therapeutic targets // *Platelets*. 2013.

106. Steinhubl S. R. [и др.]. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: A randomized controlled trial // *Journal of the American Medical Association*. 2002.

107. Sun K. X. [и др.]. MicroRNA-186 induces sensitivity of ovarian cancer cells to paclitaxel and cisplatin by targeting ABCB1 // *Journal of Ovarian Research*. 2015.

108. Sunderland N. [и др.]. MicroRNA Biomarkers and Platelet Reactivity: The Clot Thickens // *Circulation Research*. 2017.

109. Sychev D. [и др.]. 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*. 2020.

110. Sychev D. A. [и др.]. Comparison of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, ABCB1, and SLCO1B1 gene-polymorphism frequency in Russian and nanai populations // *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2017.

111. Sychev D. A. [и др.]. CYP3A Activity and Rivaroxaban Serum Concentrations in Russian Patients with Deep Vein Thrombosis // Genetic Testing and Molecular Biomarkers. 2018.
112. Sychev D. A. [и др.]. Genetic determinants of dabigatran safety (CES1 gene rs2244613 polymorphism) in the Russian population: multi-ethnic analysis // Molecular Biology Reports. 2019.
113. Sychev D. A. [и др.]. Clinical pharmacology technologies for personalization of cardiovascular diseases drug treatment: Focus on direct oral anticoagulants // Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk. 2019.
114. Sychev D. A. [и др.]. 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.
115. Takagi S. [и др.]. Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4 // Journal of Biological Chemistry. 2008.
116. Tang Q. J. [и др.]. Plasma MIR-142 accounting for the missing heritability of CYP3A4/5 functionality is associated with pharmacokinetics of clopidogrel // Pharmacogenomics. 2016.
117. Tang Q. jie [и др.]. Plasma miR-142 predicts major adverse cardiovascular events as an intermediate biomarker of dual antiplatelet therapy // Acta Pharmacologica Sinica. 2019.
118. Tantry U. S. [и др.]. Consensus and Update on the Definition of On-Treatment Platelet Reactivity to Adenosine Diphosphate Associated With Ischemia and Bleeding // Journal of the American College of Cardiology. 2013. № 24 (62). С. 2261–2273.
119. Testa S. [и др.]. Low drug levels and thrombotic complications in high-risk atrial fibrillation patients treated with direct oral anticoagulants // Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2018.
120. Tsuchiya Y. [и др.]. MicroRNA regulates the expression of human

cytochrome P450 1B1 // *Cancer Research*. 2006.

121. Udell J. A. [и др.]. Long-term dual antiplatelet therapy for secondary prevention of cardiovascular events in the subgroup of patients with previous myocardial infarction: A collaborative meta-analysis of randomized trials // *European Heart Journal*. 2016.

122. V.V. S. [и др.]. Studying of activity of isoenzyme CYP3A4 on cortisol/6 b-hydroxycortisol ratio in human urine // *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2009.

123. Wallentin L. [и др.]. Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes // *New England Journal of Medicine*. 2009.

124. Wallentin L. P2Y12 inhibitors: Differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use // *European Heart Journal*. 2009.

125. Wallentin L. [и др.]. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: A genetic substudy of the PLATO trial // *The Lancet*. 2010.

126. Wang K. [и др.]. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma // *PLoS ONE*. 2012.

127. Wang Z. Y. [и др.]. Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: Updated review and risk management in combination therapy // *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2015.

128. Willeit P. [и др.]. Circulating MicroRNAs as novel biomarkers for platelet activation // *Circulation Research*. 2013.

129. XM L., LP D. U., B L. [Pharmacogenomic Research in Direct Oral Anticoagulants]. // *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*. 2020.

130. Y.-D. T. [и др.]. Randomized comparisons of double-dose clopidogrel or adjunctive cilostazol versus standard dual antiplatelet in patients with high posttreatment platelet reactivity results of the CREATIVE trial // *Circulation*. 2018.

131. Yokoi T., Nakajima M. Toxicological implications of modulation of gene expression by microRNAs // *Toxicological Sciences*. 2011.
132. Yu A.-M., Pan Y.-Z. Noncoding microRNAs: small RNAs play a big role in regulation of ADME? // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2012.
133. Yusuf S. [и др.]. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme: Rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease // *European Heart Journal*. 2000.
134. Zanger U. M. [и др.]. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008.
135. Zanger U. M., Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation // *Pharmacology and Therapeutics*. 2013.
136. Zastrozhin M. S. [и др.]. CYP3A4 activity and haloperidol effects in alcohol addicts // *International Journal of Risk & Safety in Medicine*. 2015.
137. Zhang X. [и др.]. MicroRNA directly enhances mitochondrial translation during muscle differentiation // *Cell*. 2014.
138. Мирзаев К., Андреев Д., Сычев Д. Оценка агрегации тромбоцитов в клинической практике // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2015.
139. Effects of Clopidogrel in Addition to Aspirin in Patients with Acute Coronary Syndromes without ST-Segment Elevation // *New England Journal of Medicine*. 2001.