ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Рожков Андрей Николаевич

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

3.1.20. Кардиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Копылов Филипп Юрьевич

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ……..... 4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……. 13
1.1 Циркулирующие регуляторные РНК - потенциальный маркер оценки тяжести атеросклероза коронарных артерий …… 13
1.1.1 Микро-РНК: описание особенностей нового класса молекул ……... 13
1.1.2 Методы исследования микроРНК ……..... 15
1.1.3 О роли микроРНК в функционировании организма …….. 18
1.1.4 Циркулирующие микроРНК у пациентов с ишемической болезнью сердца и коронарным атеросклерозом……..... 20
1.1.5 Роль регуляторных РНК в развитии острого коронарного синдрома ….. 24
1.1.6 МикроРНК в атеросклеротических бляшках …….. 29
1.1.7 Циркулирующие микроРНК и сосудистое воспаление ……. 33
1.1.8 Циркулирующие микроРНК и липидный обмен ……... 36
1.1.9 Циркулирующие микроРНК, степень выраженности атеросклероза и уязвимость атеросклеротических бляшек ……..... 39
1.2 Проблема оценки рисков сердечно-сосудистых осложнений……... 45
1.3 Значение методов КТ-визуализации коронарного русла в стратификации риска сердечно-сосудистых осложнений ……. 46
1.3.1 Использование коронарного кальциевого индекса в клинической практике……..... 47
1.3.2 Роль КТА в современной медицинской практике …….. 51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ……. 59
2.1 Дизайн исследования…… 59
2.2 Критерии соответствия……. 61
2.3 Описание медицинского вмешательства……..... 63
2.4 Статистическая обработка данных……..... 70
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ……. 72
3.1 Результаты первого этапа исследования ……..... 72

3.1.1 Ассоциация уровней микроРНК с типом атеросклеротических бляшек.. 74
3.1.2 Ассоциация уровней микроРНК с показателями риска сердечно-сосудистых катастроф ……..... 76
3.1.3 Ассоциация уровней микроРНК с клинико-демографическими характеристиками пациентов ……. 78
3.2 Результаты второго этапа исследования…….…… 79
3.2.1 Анализ профиля циркулирующих микроРНК в итоговой выборке…….. 79
3.2.2 Ассоциация уровней микроРНК с типом атеросклеротических бляшек.. 82
3.2.3 Ассоциация уровней микроРНК с расчётными значениями риска сердечно-сосудистых катастроф……..... 84
3.2.4 Ассоциация уровней микроРНК с различными клинико-демографическими характеристиками ……..... 86
3.2.5 Результаты исследования ассоциации данных КТ и сердечно-сосудистых рисков в подгруппе бессимптомных больных второго этапа.…… 87
3.2.6 Клинический пример…….. 91
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ……... 95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……..…….……..... 112
ВЫВОДЫ…….……. 114
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ……..... 115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАНЧЕНИЙ ……... 116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ …….. 117

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Во многих развитых и развивающихся странах на первом месте в структуре смертности находятся заболевания сердечно-сосудистой системы. Так, в Российской Федерации по данным Росстата за 2019 год доля смертей от сердечно-сосудистых причин составила 46,8%, со снижением до 43,8% к 2022 году на фоне реализации Федеральных программ здравоохранения. Из них 54,4% приходилось на ишемическую болезнь сердца (ИБС) [8]. Согласно статистическим данным в России не более чем у половины пациентов имеются симптомы ИБС, по которым установлен соответствующий диагноз и назначено лечение. Другая половина пациентов находится за пределами врачебного наблюдения и, соответственно, не проводятся должные профилактические и лечебные мероприятия [101]. В целях снижения высокого бремени сердечно-сосудистой смертности у бессимптомных пациентов в качестве начальных этапов диагностики часто проводится оценка различных факторов риска, стресс-тесты и анализ ряда биологических маркеров. Одной из основных задач врача-кардиолога на амбулаторном этапе оказания медицинской помощи является диагностика риска развития сердечно-сосудистых осложнений (ССО). Значения риска ССО позволяют выбрать наиболее целесообразную тактику медицинского вмешательства [21, 85]. В настоящее время принято оценивать эти риски применением следующих популяционных методов: шкал Systematic COronary Risk Evaluation версии 2 (SCORE2), SCORE2-Older Persons (OP), Framingham и шкал риска сердечно-сосудистых осложнений сообществ American College of Cardiology и American Heart Association (ACC/AHA) и др. Однако использование этих методов в группах молодого или пожилого возраста, как правило, приводит к недооценке или переоценке значений рисков, соответственно. Это приводит к необходимости использования дополнительных методов стратификации [231]. Учитывая значимость первичной и вторичной профилактики ССО, в качестве дополнительных методов

исследований используются способы лучевой диагностики с непосредственной визуальной оценкой состояния, как сердца, так и артериального русла. Кроме того, важным направлением является выделение специфических биологических маркеров, в том числе циркулирующих в крови. Лучевая диагностика состояния артериального русла в настоящее время основывается на рентгенологических методах и включает количественную оценку значения коронарного кальциевого индекса (ККИ) [250], а также коронарную компьютерную томографическую ангиографию (КТА) и занимает уверенные позиции в современных клинических рекомендациях [11, 20, 21, 231]. Поскольку автогенетическую основу атеросклероза и, соответственно, ИБС составляют процессы сосудистого воспаления, важным направлением совершенствования стратификации рисков развития ССО является выявление в плазме крови специфических маркеров и оценки их ассоциаций с расчетными значениями рисков ССО [140]. Одним из перспективных направлений в медицинской науке является изучение роли некодирующих регуляторных РНК в физиологических и патофизиологических процессах в организме человека. Наиболее распространенным представителем этой группы являются микроРНК (miRNA), представляющие собой небольшие одноцепочечные молекулы рибонуклеиновых кислот, не несущих функцию синтеза белка, однако, регулирующие экспрессию генов. Участие miRNA в развитии различных сердечно-сосудистых заболеваниях, включая атеросклероз, отражается во многих исследованиях, описаны как их инициирующие и потенцирующие роли, так и защитные роли для различных молекул в рамках патофизиологии болезней сердечно-сосудистой системы [1, 270, 275]. Установлено, что изменения уровней как циркулирующих, так и тканевых miRNA связаны с риском развития сердечно-сосудистых катастроф у пациентов с ИБС [46, 218]. Вопросы оценки связи уровней циркулирующих miRNA с клиническими и демографическими признаками пациентов, а также расчётными показателями риска ССО с применением соответствующих шкал в отечественной и зарубежной медицинской практике исследованы недостаточно полно. Также дополнительный интерес представляет возможность оценки уязвимости

атеросклеротической бляшки [14], поскольку это позволило бы более точно оценить риски сосудистых событий и оптимизировать терапевтическую стратегию.

В целях унификации с международными терминами в данной работе используется термин «уязвимая атеросклеротическая бляшка», аналогичный англоязычному термину «vulnerable atherosclerotic plaque». В отечественной литературе часто встречается термин «нестабильная атеросклеротическая бляшка», который иногда используется в качестве эквивалента «vulnerable plaque», что не совсем корректно, поскольку нестабильность атеросклеротической бляшки подразумевает повреждение фиброзной капсулы. Уязвимая бляшка является склонной к дестабилизации мягкой бляшкой, обладающей рядом признаков, которые будут описаны ниже.

Степень разработанности темы исследования

Современные исследования показали, что уровни экспрессии широкого спектра микроРНК ассоциированы с прогнозом сердечно-сосудистыми событий у пациентов с ИБС [46]. Учитывая значимость микроРНК в патогенезе ССЗ, исследования их связи с уязвимостью атеросклеротических бляшек представляются актуальными. Большинство работ относятся к каротидным артериям и лишь несколько исследований проведены с целью оценки атеросклеротического процесса в коронарных артериях [12]. Работы по изучению ассоциаций уровней микроРНК с наличием уязвимых коронарных атеросклеротических бляшек значительно отличаются по дизайну и, как правило, предполагают инвазивное исследование сосудов методами коронарной ангиографии [70], внутрисосудистое УЗИ [240] или оптической когерентной томографии [262]. При этом оценка уязвимости атеросклеротических бляшек более целесообразна на амбулаторном этапе, где основным методом визуализации является КТ [73]. Однако подобные исследования весьма ограничены и их результаты недостаточно репрезентативны. Анализ профилей циркулирующих

микроРНК у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий остаётся актуальной и в значительной степени неисследованной задачей.

Цель и задачи исследования

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

Задачи исследования:

1. Выявить циркулирующие микроРНК, ассоциированные со стадиями атеросклероза по данным КТ-ангиографии (исходя из объёма выборки в качестве стадий рассматривалось отсутствие атеросклероза, наличие уязвимых бляшек с невыраженной кальцификацией и наличие стабильных, кальцинированных бляшек).
2. Валидизировать результаты на более крупной выборке пациентов с атеросклерозом коронарных артерий без клиники типичной стенокардии.
3. Определить ассоциации уровней микроРНК со стабильными и уязвимыми атеросклеротическими бляшками по данным КТ-ангиографии.
4. Оценить ассоциации уровней микроРНК с риском сердечно-сосудистых катастроф и клинико-демографическими данными пациентов.

Научная новизна

Впервые получены данные сопоставления профилей циркулирующих микроРНК у пациентов с различными стадиями атеросклероза по данным КТА. Так, miR-143-3p и miR-181b-5p показали значимую связь с наличием уязвимых или стабильных атеросклеротических бляшек в венечных артериях. Оценка морфологии атеросклеротических бляшек проводилась при помощи 640-срезового компьютерного томографа.

Уровни ряда других микроРНК ассоциировались с расчётными рисками сердечно-сосудистых осложнений, что позволяет рассматривать их в качестве дополнительных модификаторов при формировании прогноза ССО.

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Определение профиля циркулирующих регуляторных РНК у пациентов с атеросклерозом позволяет расширить теоретическое представление об этом процессе, особенно в отношении вопроса уязвимости бляшек и процесса их кальцификации.

Данное исследование демонстрирует новую, ранее не описанную роль miR-181b-5p в качестве одного из регуляторов процесса повышения плотности фиброатеромы. Результаты оценки ассоциаций уровней циркулирующих микроРНК с другими эпигенетическими факторами дополняют фундаментальную теоретическую платформу, необходимую для дальнейших исследовательских работ.

Выявленные особенности экспрессии циркулирующих микроРНК позволят использовать их в качестве маркеров коронарного атеросклероза различной степени тяжести, а также для дифференцировки уязвимых и стабильных атеросклеротических бляшек. Оценка уровней циркулирующей miR-143-3p может служить биологическим маркером уязвимости бляшки.

Такая диагностика способствует раннему выявлению уязвимых атеросклеротических поражений и проведению соответствующих лечебных и профилактических мероприятий. Оценка уровней микроРНК как дополнительных компонентов к популяционным моделям расчёта риска ССО позволит персонализировать прогноз развития сосудистых событий.

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Рожкова Андрея Николаевича на тему: «Особенности профиля циркулирующих регуляторных РНК у пациентов с различными стадиями атеросклероза по данным МСКТ» внедрены в учебный процесс кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по специальности 3.1.20. Кардиология. Акт № 249-У от 15.05.2023 г., а также в лечебный процесс отделения Кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского, УКБ №1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по специальности 3.1.20. Кардиология. Акт № 250-Л от 15.05.2023 г.

Методология и методы исследования

Проведено исследование типа серии случаев, состоящее из этапов профилирования и валидации на выборке из 99 пациентов.

В ходе исследовательской работы проведен анализ данных отечественных и зарубежных литературных источников, сформирован дизайн исследования, проведены сбор и систематизация данных анамнеза, лабораторных и инструментальных исследований, включая оценку уровня кальциноза коронарных артерий и визуализацию коронарного русла методом МСКТ с внутривенным контрастированием.

Отобраны образцы плазмы крови, в которых исследовались относительные уровни циркулирующих микроРНК.

Выполнена обработка полученных данных при помощи современного программного обеспечения, полученные результаты сопоставлены с опубликованными исследованиями в рамках схожей проблематики.

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.20. Кардиология.

Согласно формуле данной специальности, решается вопрос, связанный с патологией сердечно-сосудистой системы – ишемической болезнью сердца, а именно пунктами:

3 – заболевания коронарных артерий сердца,

6 – атеросклероз,

11 – генетика (генодиагностика и генотерапия) сердечно-сосудистых заболеваний,

13 – современные инвазивные и неинвазивные диагностические технологии у больных с сердечно-сосудистой патологией.

Степень достоверности и апробация результатов

Достаточный размер выборки пациентов, современные и репрезентативные методы исследования, которые позволяют достичь поставленных в работе целей и задач, обеспечивают достоверность результатов настоящей диссертационной работы. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках. Сбор данных, математический анализ, оценка и интерпретация полученных результатов проведены с использованием актуальных методов обработки информации и статистического анализа.

Результаты доложены на научных конференциях:

1) The International Conference on Nuclear Cardiology and Cardiac CT 2021. «CT-based cardiovascular risk stratification benefits in asymptomatic patients». https://esc365.escardio.org/presentation/232314 (Онлайн, 08.05.2021);

2) Sechenov International Biomedical Summit 2021 (SIBS 2021). Session «Digital Cardiology» (Москва, 08.11.2021);

3) Sechenov International Biomedical Summit 2022 (SIBS 2022). Session «Digital Cardiology» (Москва, 09.11.2022).

На заседании кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) от 25.12.2024 (протокол № 12) состоялась апробация диссертационного исследования.

Личный вклад автора

Научное исследование, проведенное и представленное в диссертационной работе Рожкова А.Н., выполнено автором самостоятельно на базах Клинического Центра (Университетская клиническая больница №1) и кафедры кардиологии,

функциональной и ультразвуковой диагностики Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» МЗ РФ (Сеченовский Университет).

Автору принадлежит ведущая роль в планировании научной работы, включая определение целей и задач. Также автором самостоятельно проведен, анализ имеющейся на момент начала исследования литературы, связанной с темой диссертации с последующей разработкой дизайна исследования, набора пациентов, сбора клинических данных, проведения забора крови и подготовки образцов плазмы для дальнейшего анализа, участие в проведении КТ и анализе данных КТ. Определяющим является вклад автора в подготовку базы полученных данных и анализ полученных результатов, формирование выводов и практических рекомендаций.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследований автором опубликовано 8 печатных работ, в том числе: 5 научных статей в изданиях, индексируемых в международных базах (Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer), 2 иные публикации по результатам исследования; 1 публикация в сборнике материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем и диссертации

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

Диссертация написана на русском языке в объеме 147 страниц, иллюстрирована 14 таблицами и 15 рисунками. В списке литературы указано 279 источников: 16 отечественных и 263 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Циркулирующие регуляторные РНК - потенциальный маркер оценки тяжести атеросклероза коронарных артерий

Атеросклероз лежит в основе развития ишемической болезни сердца, нарушений мозгового кровообращения и других состояний. При этом атеросклероз является сложным и комплексным процессом, базирующемся на повреждении и воспалении эндотелия с вовлечением вазоактивных молекул и иммунных механизмов [207]. Одним из перспективных исследовательских направлений в этой области можно считать оценку относительно недавно открытой группы регуляторных молекул – микроРНК. Участию микроРНК в патогенезе коронарного атеросклероза и развитии сердечно-сосудистых осложнений будет посвящена вторая часть обзора литературы.

1.1.1 Микро-РНК: описание особенностей нового класса молекул

С момента открытия класса некодирующих рибонуклеиновых кислот продолжается процесс интенсивного изучения их роли в физиологических и патофизиологических процессах в организме человека. Первые работы в этой области начали появляться в 90-х годах прошлого века, когда при исследованиях регуляции экспрессии генов был открыт механизм «замолкания генов» (gene silencing, gene quelling) [233]. При этом установлено, что «выключение гена» происходит уже после его транскрипции. Ключевые исследования в этой области были выполнены уже в начале XXI века, за что в 2006 году A. Z. Fire и C.C. Mello была вручена Нобелевская премия по медицине и физиологии. Авторы вводили в клетки *Caenorhabditis elegans* вирусные двухцепочечные молекулы РНК, которые снижали экспрессию определённых целевых генов [213]. Этот механизм получил название РНК-интерференции (RNAi). Изначально механизм РНК-интерференции описывался применительно к посттранскрипционному замолканию генов, однако,

вскоре в эту концепцию был включён и транскрипционный сайленсинг, явления которого были описаны ранее [215].

Процесс РНК-интерференции осуществляется посредством действия трёх основных некодирующих РНК: малые интерферирующие РНК (siRNA), обычно описываются в качестве внешних синтетических или вирусных индукторов, PIWI-РНК (piRNA), экспрессирующиеся в основном в клетках зародышевой линии, и микроРНК (miRNA) [135, 271]. Последние представляют собой двухцепочечные полностью комплиментарные молекулы РНК, состоящие из 20-25 нуклеотидных пар.

Кратко механизм синтеза микроРНК можно сформулировать следующим образом. Первый этап осуществляется в клеточном ядре на уровне целевых генов ДНК, где происходит процесс транскрипции посредством работы фермента РНК-полимераза II. Получившаяся молекула – ранний предшественник микроРНК (pri-miRNA) – состоит из пятидесятикратно превосходящего числа пар нуклеотидов. Эта относительно крупная молекула прежде, чем попасть в цитоплазму клетки, связывается с группой ядерных белков, имеющих названия Drosha и DGCR8 (хромосомный регион (или критическая область) 8, синдрома Ди Джорджи) и составляющих так называемый микропроцессорный комплекс. Роль DGCR8 заключается в распознавании и связывании pri-miRNA, в то время как Drosha, будучи подтипом РНКазы III, расщепляет её часть, образуя укороченный вариант предшественника микроРНК (пре-микроРНК), который активным транспортом через белок экспортин 5 попадает в цитоплазму клетки [135]. Далее происходит процессинг (разрезание) пре-микроРНК другим белком-подтимом РНКазы III – Dicer с образованием двухцепочечной микроРНК и остаточной siRNA. МикроРНК входит в состав РНК-индуцируемого комплекса выключения гена (RISC). Кроме неё в состав комплекса входят Dicer, белки Ago (из семейства белков Argonaute), белок, связывающий трансактивирующую РНК TAR (TRBP) и другие [225]. Группа белков RISC образует комплекс с целевой РНК, что приводит к снижению экспрессии генов-мишеней как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном и трансляционном уровнях; однако существует

описание процессов, при которых компоненты RISC могут активировать трансляцию [129; 267]. Описано девять механизмов действия микроРНК [135]. В зависимости от степени комплементарности между микроРНК и целевой мРНК возможны разные пути выключения гена. Так, высокая степень комплементарности между микроРНК и ее целевой мРНК приводит к расщеплению и последующей деградации мРНК комплексом RISC. Более низкая степень комплементарности приводит к процессу ингибирования трансляции [52]. Другим путём воздействия на процесс трансляции является непосредственная перестройка хроматина под действием микроРНК [135]. Структура микроРНК, обусловленная неполной комплементарностью, позволяет влиять одной микроРНК на различные локусы. В то же время, один ген может быть подвержен регулирующему влиянию сразу нескольких микроРНК [9].

1.1.2 Методы исследования микроРНК

Проблема выявления микроРНК представляется достаточно сложной, поскольку эти молекулы относительно короткие, имеют схожие друг с другом последовательности нуклеотидов [156]. Существует целый ряд различных методик для качественного и количественного анализа содержания микроРНК в биоматериале. Классическими методами выявления микроРНК считаются Нозерн-блоттинг (Northern blot), определенные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) и метод микрочипов (Microarray) [110].

Нозерн-блоттинг – это электрофоретический метод выявления определенных последовательностей РНК с использованием радиоактивных или хемилюминесцентных олигонуклеотидных меток. МикроРНК под действием электрофореза проходят через специальный гель, дифференцируясь по размеру, форме и заряду. После этого МикроРНК попадают на специальную мембрану, где гибридизируются с меченными олигонуклеотидами. Это позволяет визуализировать и провести количественную оценку микроРНК, определить концентрацию каждого из видов микроРНК, содержащихся в исследуемом

образце. Кроме того, нозерн-блоттинг позволяет определить размер исследуемых микроРНК. Однако данный метод является достаточно трудоёмким, при этом из-за особенностей гибридизации, приводящих к контаминации исследуемого материала, его чувствительность ниже, чем при использовании других методик [110, 258].

Полимеразная цепная реакция – это метод идентификации определенных нуклеотидных последовательностей, основанный на их амплификации в специальных температурных условиях с использованием ДНК-полимеразы, синтетических олигонуклеотидных праймеров в буферном растворе, содержащем свободные нуклеотиды. Диагностика микроРНК требует определённой методологической специфики и изменений стандартной полимеразной цепной реакции. Так, анализ РНК исходно требует проведения обратной транскрипции кода (путём введения специального фермента) с последующим синтезом комплиментарной ДНК (кДНК). Затем проводится амплификация исследуемых нуклеотидных последовательностей, при этом для выявления микроРНК используются специальные праймеры в виде «шпильки» (stem-loop), что придаёт им большую стабильность [110]. Помимо этого, осуществляется количественная оценка амплифицированных участков с использованием специфичных флуоресцентных зондов, которые связываются с кДНК. По мере проведения циклов ПЦР проводится анализ изменений флуоресценции по сравнению с фоновым шумом. Интенсивность флуоресценции определяется числом циклов ПЦР, необходимых для достижения порогового уровня флуоресценции над шумом, и обозначается C_t величиной [252]. Может проводиться сравнительный анализ C_t для определения относительных значений разных целевых последовательностей. Этот метод получил название полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР РВ). В настоящее время ОТ-ПЦР РВ считается наиболее репрезентативным методом исследований микроРНК [110, 198, 274]. Первые анализы микроРНК методом ОТ-ПЦР РВ осуществлялись за счёт амплификации пре-микроРНК, которая количественно коррелирует со зрелыми микроРНК. В последствии были

разработаны высокоточные и чувствительные алгоритмы диагностики непосредственно зрелых микроРНК [110]. Несмотря на то, что ОТ-ПЦР РВ на сегодняшний день является основным методом диагностики микроРНК, необходимо осуществлять тщательный контроль целостности РНК, синтеза кДНК, внимательно подходить к дизайну праймеров, детекции ампликона и нормализации экспрессии микроРНК [274]. Для решения этих проблем требуется применение дорогостоящего оборудования и материалов, а также, возможно, использование модифицированных протоколов под конкретное оборудование, что в определенной степени ограничивает применение этого метода [274, 258].

Ещё одним классическим методом диагностики микроРНК является метод микрочипов. Основным преимуществом этого метода является его способность выявлять небольшие количества микроРНК, проводить быстрый и одновременный скрининг генов микроРНК в рамках одного исследования [90]. В качестве подготовки к проведению исследования сначала синтезируются кДНК, меченные флуоресцином, для всех видов микроРНК в исследуемом образце с использованием неспецифических праймеров в ПЦР. Затем производится гибридизация амплифицированных кДНК со специальными зондами, прикреплёнными к микрочипу. После этого чипы вынимаются, промываются специальными растворами и сканируются для определения силы флуоресценции. Дальнейший математический анализ проводится для определения участка микрочипа, на котором произошла гибридизация [90, 110]. Метод микрочипов часто используется в качестве скринингового инструмента или для сравнительного анализа, поскольку из-за низкой чувствительности и узкого динамического диапазона не всегда удается получить достаточно точный количественный анализ [110, 277]. Ещё одним недостатком метода является высокая стоимость и зависимость от специфического оборудования [110, 258].

Учитывая актуальность исследований в области малых некодирующих РНК, разрабатываются и применяются новые способы их диагностики [258]. К этим методам можно отнести применение электрохимических геносенсоров, в том числе с использованием наноматериалов, различные модификации

изотермической амплификации, методы оптической диагностики, поверхностный плазменный резонанс (SPR-диагностика), секвенирование «нового поколения» (NGS), масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой (ICPMS) и другие [258, 276].

Найденные новые микроРНК вносятся в онлайн базы данных (http://www.mirbase.org, http://mirdb.org), где аккумулируется информация об их генах. Для биоинформатической оценки предполагаемых «целей» микроРНК используются специальные аналитические системы, например, *miRanda* или *Targetscan*.

1.1.3 О роли микроРНК в функционировании организма

Помимо внутриклеточных микроРНК были открыты секретируемые внеклеточные микроРНК [204]. Предполагаются различные пути попадания микроРНК в кровь [204, 236]. Это может быть пассивное проникновение микроРНК в кровь вследствие разрушения клеток. Другой путь – активная секреция через микровезикулы. Впервые внеклеточные везикулы были выделены из ретикулоцитов овец в 1980 году. Содержимое экзосом поступает в них из цитоплазмы «материнской» клетки. Во внеклеточных везикулах могут содержаться белки, микроРНК, мРНК и липиды. Везикулы поглощаются другими клетками прямым слиянием мембран, эндоцитозом или специфическим клеточным фагоцитозом [62]. Ещё один путь – активная секреция микроРНК в связке с РНК-связывающими белками ЛПВП или другими РНК-связывающими белками, например, Ago 1 и 2, NPM1 [204, 236].

Кроме того, доказано участие циркулирующих микроРНК в качестве посредника межклеточных взаимодействий. Описаны различные механизмы межклеточных взаимодействий на основе микроРНК, например, при адгезивном контакте клеток, аутокринный, паракринный, эндокринный и вследствие секреции микроРНК [27]. Эти данные имеют особое значение в онкогенезе, поскольку микроРНК могут стимулировать изменения опухолевого

микроокружения или влиять на метастатическое прогрессирование. Выборочное секретирование микроРНК сразу способствует изменению уровня синтеза внутриклеточных микроРНК. Описаны активные и селективные механизмы контроля специфической секреции микроРНК. Первым белком, показавшим влияние на перемещение микроРНК в экзосомы, была нейтральная сфингомиелиназа 2 (nSMase2). Помимо секреции, на стабильность микроРНК может непосредственно влиять ее субклеточное расположение внутри органелл. Некоторые микроРНК, такие как miR-29b, могут быть найдены преимущественно в ядре за счёт работы сигнала ядерной локализации (NLS) в их 3’ области [204].

С момента открытия микроРНК имеется огромный интерес определения их участия в развитии различных заболеваниях. Нарушения регуляции экспрессии микроРНК играет важную роль в прогрессировании заболеваний и анализ уровня их экспрессии может стать важным диагностическим и прогностическим инструментом [62]. МикроРНК участвуют в регуляции трансляции более чем 60% генов, кодирующих белки. Они вовлечены в регуляцию множества биологических процессов в организме, таких как пролиферация и дифференцировка клеток, апоптоз, рост и развитие клеток и тканей, межклеточные и внутриклеточные взаимодействия и другие [62, 139, 147]. Наибольшее количество исследований взаимосвязи микроРНК и заболеваний лежит в сфере онкологии. Действительно, крупные исследования профилирования микроРНК показали, что различные паттерны экспрессии микроРНК специфичны для различных типов рака и способны отражать происхождение и дифференцировку опухолей. Причем микроРНК могут функционировать и как онкогены и как опухолевые супрессоры [103, 139, 230]. Помимо онкологических заболеваний, описано участие микроРНК во многих сферах патологии: в аутоиммунных, неврологических, гастроэнтерологических и респираторных заболеваниях, особенностях противовирусного иммунитета, в процессах оксидативного стресса, сепсиса, влияние на ход беременности и других [103, 139, 230, 253, 273].

Многие исследования показывают, что микроРНК играют определенную роль в развитии кардиологических заболеваний [253]. Изменения экспрессии

миокардиальных микроРНК исследовались при многих кардиологических заболеваниях, а уровни циркулирующих в крови микроРНК исследуются в качестве биомаркеров сердечно-сосудистых заболеваний [95]. Первые исследования влияния микроРНК на процессы развития и патологические процессы сердца проводились в основном на биологических моделях или *in silico* [29, 142, 279]. К настоящему времени проведено большое количество исследований влияния микроРНК на развитие и особенности физиологии сердца, а также на различные патологические процессы сердечно-сосудистой системы. Большинство исследований выполнено на биологических моделях (мыши, свиньи). Эти исследования указывают на колоссальную роль специфических (кардиотропных) микроРНК в развитии заболеваний сердца. Способность микроРНК влиять на несколько факторов в рамках одного биологического пути побудила исследователей к созданию небольших микроРНК-направленных молекул, которые могут быть легко доставлены и устойчивы *in vivo*. Эти достижения создают основу для новых способов диагностики и новых терапевтических подходов при ишемической болезни сердца, гипертрофии миокарда, сердечной недостаточности и других патологических состояниях [95; 137; 259].

1.1.4 Циркулирующие микроРНК у пациентов с ишемической болезнью сердца и коронарным атеросклерозом

Современные исследования показали, что уровни экспрессии определенных микроРНК ассоциированы с прогнозом или основными неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями у пациентов с ИБС [1, 46, 218].

Так, в исследовании B. Siddeek и соавт. был проведён обзор микроРНК, которые могут быть ассоциированы с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями [46]. С ИБС были ассоциированы 53 разные микроРНК (miR-1, -10, -17-3p, кластер 17-92, miR-19, -21, -34, -92, -93, -122, кластер 122-370, miR-124, -126, -132, -133, кластер 134-3135b, miR-140, -142, -143, -145, -146, -149, -150, -

154, -155, -182, -186, -197, -199a, -206, -208, -210, -221, -222, -223, -339, -340, -361, -370, -424, -451, -454-5p, -455, -499, -519, -545, -574, -584, -585, -590, -624, -765, -1257).

В одном из ранних исследований S. Fichtlscherer и соавт. у пациентов с ишемической болезнью сердца отмечалось снижение уровней циркулирующих в плазме крови miR-17, -92a, -126, -145, -155, определяемых методом ОТ-ПЦР РВ, по сравнению с когортой пациентов с интактными коронарными артериями [72]. Анализ ассоциаций, определяющих потенциальную связь исследуемых микроРНК с ИБС показал следующие данные: для miR-155 – возраст (обратная корреляция) и женский пол (более высокие уровни). Уровни других циркулирующих микроРНК не коррелировали с полом и возрастом. Кроме вышеуказанных факторов, было отмечено достоверное снижение уровней циркулирующих miR-17, -155 и -199 у пациентов с сахарным диабетом. Исследование проводилось на 36 пациентах с ИБС в сравнении с 17 здоровыми добровольцами.

В исследовании циркулирующих микроРНК-145,155 методом ОТ-ПЦР РВ на более крупной выборке – группе из 69 пациентов с ИБС и 32 пациентов группы контроля – была выявлена достоверная ($p=0,003$ для miR-145 и $p=0,040$ для miR-155) разница в уровне циркулирующих микроРНК в этих группах. Анализ площади под ROC-кривой для оценки miR-145 и miR-155 в качестве предикторов ИБС показал значения 0,670 (95% ДИ: 0,556–0.785, $p=0,006$) и 0,620 (95% ДИ: 0,491–0,747, $p=0,056$) соответственно [76].

При исследовании уровней циркулирующих микроРНК у пациентов с нестабильной стенокардией по сравнению с пациентами, у которых боль в грудной клетке не была связана с сердечно-сосудистой патологией, методом микрочипов было выявлено достоверное изменение уровней miR-19a/b, -132, -140-3p, -142-5p, -150, -186, -210 в исследуемых группах. Наибольшей диагностической ценностью в качестве биомаркера нестабильной стенокардии обладала комбинация miR-132, -150 и -186 [37].

Оценка экспрессии ряда микроРНК в выборке из 95 пациентов в группах пациентов с коронарным атеросклерозом, включающих стабильную ИБС и ОКС

выявила увеличения относительных уровней циркулирующих в плазме крови miR-486, -122 и -92a по сравнению с группой здоровых добровольцев. Детальный анализ транспорта указанных микроРНК позволил предположить, что плазменная концентрация $ЛПВП_2$ и $ЛПВП_3$ (подвидов липопротеинов высокой плотности) совместно с уровнями miR-486 и miR-92a могут быть предикторами нестабильности атеросклеротической бляшки [192]. Повышение экспрессии miR-92a/b, наряду со снижением экспрессии целевых генов для этих микроРНК, у пациентов с ИБС, проходящих реабилитацию после аортокоронарного шунтрирования (АКШ), также отмечено в исследовании C. Taurino и соавт. Кроме того, авторы указывают на снижение экспрессии целевых генов для miR-140-3p и miR-182 в исследуемой группе пациентов [115].

В одном из ранних исследований B. Sondermeijer и соавт. указывают на достоверное увеличение экспрессии ассоциированных с тромбоцитами miR-340, -451, -454, -545:9.1, -615-5p и уменьшение экспрессии miR-1280 при использовании метода микрочипов. Дальнейшая валидация ОТ-ПЦР РВ позволила рассмотреть miR-623 и miR-340 в качестве потенциальных маркеров ИБС по сравнению с группой контроля [212].

В исследовании J. F. O'Sullivan и соавт. экспрессия ряда микроРНК, определяемая методом ОТ-ПЦР РВ в плазме крови (miR-15a-5, -16-5, -93-5p и -146a-5) у пациентов с ишемической болезнью сердца (N = 50), была достоверно выше. После проведения статистического анализа с коррекцией по факторам риска, было доказано, что уровень miR-93 является независимым предиктором ИБС (ОШ = 8,76, p = 0,002) [196].

При анализе методом ОТ-ПЦР РВ экспрессии miR-126 в группе пациентов с ИБС отмечено достоверное её снижение по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$) [107]. Эти данные подтверждаются в исследовании бремени коронарного атеросклероза на выборке из 40 пациентов, в которой снижение концентрации miR-126-5p коррелировало с повышением тяжести атеросклероза по шкале SYNTAX [209]. Однако, в крупном проспективном исследовании Athero*Gene*, уровни miR-126 не имели значимого прогностического значения ни в общей

группе, ни в подгруппах (стабильная ИБС, ОКС). Также, уровни miR-126 не показали достоверного влияния на частоту сердечно-сосудистых событий и смертность, в то время как повышенные уровни циркулирующих miR-197 и -223 приводили к достоверному увеличению смертности (p = 0,029 и p = 0,012 соответственно). В исследовании участвовало 873 пациента (340 в группе ОКС и 533 в группе стабильной стенокардии), средний период наблюдения составил 4 года. Исходные уровни всех трех микроРНК были выше у пациентов, умерших от сердечно-сосудистых причин, по сравнению с пациентами, у которых за время наблюдения сердечно-сосудистые осложнения не случились. Дальнейшая статистическая оценка с поправкой на возраст и пол выявила соответствующую прогностическую силу miR-197 и miR-223 в отношении первичной конечной точки сердечно-сосудистой смерти в общей группе (miR-197: ОР 1,77 (95% ДИ 1,20; 2,60), p = 0,004; miR-223: ОР 2,23 (95% ДИ 1,20; 4.14), p = 0,011). При анализе подгрупп достоверные корреляции были выявлены только у пациентов с ОКС. Также авторы пытались оценить дополнительные диагностические преимущества анализа комбинаций исследуемых микроРНК, однако никаких преимуществ выявлено не было [195].

В исследованиях Md Sayed Ali Sheikh и соавт. оценивались уровни ряда циркулирующих микроРНК у пациентов со стабильной ИБС (стенокардией напряжения, N = 102) и нестабильной стенокардией (N = 62), а также сравнивались с контрольной группой (N = 52) [79, 248]. Анализ проводился методом ОТ-ПЦР РВ. Авторами было отмечено достоверное повышение уровней miR-765 и снижение уровней miR-149 и -424 в группах со стабильной и нестабильной стенокардией. При этом при нестабильной стенокардии изменения уровней исследуемых микроРНК были более выраженными (за исключением miR-149, поскольку не отмечалось достоверной разницы между группами стабильной и нестабильной стенокардии). Анализ площади под ROC-кривой достоверно указывал на возможность использования miR-149, -424 и -765 в качестве независимых маркеров ИБС.

Значимое повышение miR-206, наряду с miR-574-5p ($p < 0,05$) отмечалось в исследовании J. Zhou и соавт. [193]. Анализ площади под ROC- кривой (AUC) показал, что каждая из этих микроРНК достоверно может быть чувствительным и специфичным маркером ИБС.

При оценке уровней циркулирующих miR-208a и miR-370 методом ОТ-ПЦР РВ было выявлено их значимое повышение по сравнению с группой контроля ($p = 0,006$ и $p = 0,003$ соответственно). В исследуемую группу были включены 95 пациентов, в группу контроля – 50. При исследовании диагностической значимости данных микроРНК, было показано, что miR-208a и miR-370 как по-отдельности, так и вместе могут достоверно быть биомаркерами ИБС [34].

В исследовании S. G. Yilmaz и соавт. проводилась оценка ряда циркулирующих микроРНК в качестве биомаркеров атеросклероза. МикроРНК были выбраны после биоинформационного анализа ряда баз данных. На двух группах пациентов (с признаками атеросклероза и без них) проводилась оценка уровней miR-122a, -133a/b, -143, -145, -221, -222, -223, -494 b -499 методом ОТ-ПЦР РВ. У пациентов в исследуемой группе было отмечено снижение экспрессии miR-221, -222, -133b, -143 и 122a, в то время как уровни miR-145, -133a, -494, -499 были повышены. После проведения логистического регрессионного анализа и стратификации по факторам риска достоверным оказалось изменение уровней miR-221 ($p = 0,011$) и miR-222 ($p = 0,004$). По результатам оценки площади под ROC-кривой авторы сделали вывод о возможности использования данных микроРНК в качестве биомаркеров атеросклероза [69].

1.1.5 Роль регуляторных РНК в развитии острого коронарного синдрома

Описано достаточно много микроРНК, регуляция которых изменяется при ОКС, однако возможность их использования в качестве биомаркеров заболевания остается вопросом продолжающегося изучения [239]. Кроме того, серьёзным фактором, влияющим на результаты оценки роли микроРНК, является наличие

факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, что создаёт необходимость дополнительной стратификации [38].

В одном из первых исследований микроРНК при инфаркте миокарда у людей оценивались уровни экспрессии циркулирующих miR-1, 133a, 208a и 499. Выбор микроРНК осуществлялся по результатам предыдущих патоморфологических исследований авторов, в которых методом ОТ-ПЦР РВ было показано, что miR-208a экспрессируется только в сердечной мышце, в то время как miR-1, 133a и 499 экспрессируются как в миокарде, так и в скелетных мышцах. Всего в исследовании участвовало 33 пациента с инфарктом миокарда и 33 пациента без инфаркта с болями в грудной клетке, которые позднее были разделены на группы с ангиографическим подтверждением ИБС (n = 16) и без него (n = 17). Анализ ОТ-ПЦР РВ показал, что в группе пациентов с инфарктом миокарда уровни miR-1, 133a и 499 были достоверно ($p < 0,01$) повышены, по сравнению с группой пациентов без инфаркта. При этом не было получено достоверных различий в подгруппе с коронарным атеросклерозом и без него. Циркулирующая miR-208a выявлялась только в плазме пациентов с инфарктом миокарда. При дальнейшем наблюдении 5 пациентов, которым было выполнено чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ), через 2 месяца отмечалось снижение уровня всех исследуемых циркулирующих микроРНК. Дальнейший ROC анализ роли циркулирующих микроРНК в качестве биомаркеров показал высокую чувствительность и специфичность (90,9% и 100%, соответственно) miR-208a [67]. Однако в другом исследовании того же года, были получены отличающиеся результаты. Методом микрочипов при исследовании 671 патоморфологического образца различных тканей человека было установлено, что miR-499 экспрессируется преимущественно в миокарде, в то время как уровень экспрессии miR-208a/b в миокарде очень низкий. При исследовании циркулирующей miR-499 было отмечено достоверное повышение её уровня в группе пациентов с инфарктом миокарда при поступлении в клинику (n = 9) по сравнению с другими группами пациентов: с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) различной этиологии (n = 10) и здоровых добровольцев

(n = 10). При повторном анализе циркулирующей miR-499 у пациентов при выписке отмечалось её снижение до уровня, сопоставимого с остальными группами [207].

Противоречивые данные предыдущих исследований M. I. F. J.Oerlemans и соавт. объяснили небольшими выборками пациентов. Авторы провели оценку циркулирующих микроРНК на более крупной выборке: 106 пациентов, госпитализированных с острым коронарным синдромом (ОКС), из которых – 82 с инфарктом миокарда без подъёма сегмента ST (ИМбпST), 24 с нестабильной стенокардией (НС) и 226 пациентов, госпитализированных с болью в груди, не связанной с инфарктом миокарда. В группе с ОКС было выявлено достоверное повышение уровней циркулирующих miR-1 ($p < 0,001$), miR-21 ($p < 0,001$), miR-146a ($p < 0,001$), miR-208a ($p = 0,002$) и miR-499 ($p < 0,001$) [96]. При анализе подгрупп было отмечено, что miR-1 и miR-499 повышаются как при ИМбпST, так и при НС, в то время как повышение уровня miR-208a характерно только для инфаркта миокарда.

В исследовании E. Kazimierczyk и соавт. у пациентов с инфарктом миокарда также отмечалось повышение уровней циркулирующих miR-1 ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля с последующим снижением за время наблюдения. Схожая динамика отмечалась и для miR-126 с большей достоверностью ($p < 0,00005$). Основываясь на результатах исследований на биологических моделях авторы отнесли miR-1 к маркерам повреждения кардиомиоцитов, а miR-126 к прогрессирующей эндотелиальной дисфункции [32].

Проспективное исследование ассоциации уровней 19 микроРНК с последующим развитием инфаркта миокарда на выборке из 820 пациентов в течение 10 лет показало достоверное увеличение экспрессии miR-126 ($p = 0,002$) в группе инфаркта, кроме того, была выявлена обратная корреляция уровней miR-223 ($p = 0,002$) и miR-197 ($p = 0,036$) с рисками сердечно-сосудистых осложнений по шкале Framingham [220].

Более позднее исследование J. Gacoń и соавт. 43 пациентов с неосложненным ОКС, распределенных в группы инфаркта миокарда с подъёмом

ST (ИМспST) и ИМбпST показало более чем трёхкратное повышение экспрессии miR-134 и уровня тропонина Т в группе ИМспST ($p < 0,025$). Кроме этого, у пациентов с окклюзией инфаркт-связной артерии (ИСА) уровни miR-133a, -133b, -34a, -124, -134 были выше, чем у пациентов с «проходимой» ИСА при отсутствии разницы уровней тропонина Т. При анализе площади под ROC-кривой диагностическая значимость в качестве биомаркеров окклюзии была отмечена для miR-124 ($p < 0,001$), miR-133b ($p = 0,006$) и miR-134 ($p = 0,016$). В отношении ИМспST, прогностическую значимость показал только уровень miR-134 ($p = 0,002$) [89].

В другом исследовании потенциальных биомаркеров ОКС достоверную предиктивную способность показали miR-122-5p, miR-150, miR-195 и miR-16 как в рамках сочетанного показателя в ROC анализе ($p = 0,003$), так и по отдельности. Кроме этих микроРНК в группе пациентов с ОКС достоверно повышались miR-186, -223-5p и -92a [125]. Это исследование подтверждает полученные ранее данные работы R. Zhang и соавт., где экспрессия miR-150, наряду с miR-486, была достоверно ($p < 0,001$) выше по сравнению в группе пациентов с ИМ. Наибольшая разница отмечалась у в когорте ИМ без подъёма сегмента ST. Наибольшей чувствительностью и специфичностью обладала оценка комбинации miR-150 и -486 [105]. В схожем исследовании ОКС у пациентов с сахарным диабетом 2 типа было выявлено увеличение ($p < 0,001$) относительных уровней miR-92a по сравнению с группой стабильной ИБС. Интересно, что уровни miR-92a при у пациентов с сахарным диабетом были выше при развитии инфаркта миокарда по сравнению с пациентами без СД и инфарктом [68].

Еще одной микроРНК, также вызывающей интерес в рамках динамики ишемической болезни сердца, представляется miR-10a. Циркулирующие в плазме miR-10a исследовались в группе пациентов ($N = 60$) с ИБС. Было отмечено снижение уровней циркулирующей miR-10a по сравнению с группой контроля ($p < 0,0001$). Также было отмечено, что чем сильнее тяжесть ИБС, тем ниже уровень циркулирующих miR-10a [210].

В исследовании F. Chen и соавт. у 25 пациентов с ИБС (инфаркт миокарда + стенокардия напряжения) методом микрочипов были выделены 10 микроРНК тромбоцитов, уровни экспрессии которых более чем в 1,5 раза отличались от уровней в группе контроля. Исследователи выявили повышение экспрессии генов miR-340, 451, 454-5p, 545, 624, 585 и понижение экспрессии генов miR-17-3p, 154, 199a, 339 [133].

В исследовании [47] циркулирующих микроРНК при инфаркте миокарда оценивались уровни miR-21-5p, -361-5p и -519e-5p. При инфаркте миокарда повышались уровни miR-21-5p и 361-5p ($p < 0,05$; $p < 0,01$), в то время как уровень miR-519e-5p ($p < 0,01$) снижался. Авторы провели сравнение с другими острыми тромботическими событиями: ишемический инсульт, тромбоэмболия лёгочных артерий (ТЭЛА). В результате при указанных событиях уровни miR-21-5p и 361-5p также достоверно повышались, в то время как уровень miR-519e-5p не снижался.

Проведя статистическую обработку данных, авторы пришли к выводу, что все три исследуемые микроРНК могут служить биомаркерами инфаркта миокарда, но кардиоспецифической микроРНК является только miR-519e-5p [47].

Изучение циркулирующих микроРНК у пациентов определенной возрастной группы позволяет минимизировать влияние возраста пациентов на результаты исследования. Известно, что у пациентов молодого возраста ОКС часто вовремя не диагностируется.

Проведя двухэтапное исследование в данной группе пациентов (профилирование микроРНК методом *sRNA-Seq*, относящимся к секвенированию следующего поколения (NGS) с последующей валидизацией результатов методом ОТ-ПЦР РВ), K.-L. Tong и соавт. выявили достоверные изменения экспрессии miR-183, 134, 15a и let-7i. При исследовании AUC наибольшей диагностической точностью при сравнении с группой контроля обладали miR-183 для ИМбпST ($p < 0,0001$) и miR-134, 15a, let-7i для ИМспST ($p < 0,005$). Схожие показатели отмечались при сравнении исследуемых групп пациентов с группой стенокардии напряжения [74].

1.1.6 МикроРНК в атеросклеротических бляшках

Длительное время атеросклероз считался «болезнью накопления липидов», однако последующие исследования показали, что механизм атеросклеротического процесса гораздо сложнее. С клинической точки зрения, особый интерес представляют понятия стабильности, нестабильности или уязвимости атеросклеротической бляшки, поскольку позволяют персонализировать подход к лекарственной терапии, учитывая тот факт, что уязвимые атеросклеротические поражения с большей вероятностью приведут к развитию осложнений [224]. Классические представления об уязвимой атеросклеротической бляшке как о бляшке с тонкой фиброзной покрышкой и большим липидным ядром в настоящее время пересматриваются. Патофизиологические, демографические и эпидемиологические исследования указывают на то, что лишь небольшой процент бляшек, соответствующих классическим критериям уязвимости, приводит к сосудистым событиям [206]. Большее внимание уделяется процессам повреждения и эрозирования фиброзной покрышки и факторам, на них влияющим. Поэтому на сегодняшний день глубокое изучение процессов, происходящих в атеросклеротических бляшках, приводящих к их повреждению, является актуальной задачей [141].

Поскольку микроРНК активно участвуют в патофизиологических процессах в организме человека, многие исследования показали ассоциации тех или иных микроРНК с сердечно-сосудистыми заболеваниями. По сравнению с циркулирующими микроРНК, исследований микроРНК *in situ* в атеросклеротических бляшках не так много [176] .

В исследовании T. Li и соавт. в группе пациентов (n = 51) с ишемией нижних конечностей, которым проводилось оперативное вмешательство, были забраны биологические образцы атеросклеротических бляшек. Исследование тканевых микроРНК в интиме изменённых атеросклерозом артерий показало повышение уровней miR-21, -130a, -27b, let-7f и miR-210 ($p < 0,05$) и снижение уровней miR-221 и -222 по сравнению с неизмененными артериями ($p < 0.05$)

[126]. При патоморфологическом изучении биоматериалов каротидных атеросклеротических бляшек по сравнению со здоровыми артериями, было выявлено достоверное ($p < 0,05$) повышение экспрессии miR-30e-5p, -26b и -125a и снижение экспрессии miR-520b и -105 [153]. Разница экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках отмечается не только в сравнении с неповрежденной артерией, но и при симптомных и бессимптомных поражениях. В двухэтапном исследовании F. Cipollone и соавт. с использованием метода микрочипов и ОТ-ПЦР РВ было выявлено достоверное повышение экспрессии miR-100, -127, -133a, -133b и -145 у пациентов с симптомным атеросклерозом сонных артерий [263]. Эти данные были подтверждены в более поздних исследованиях, где была выявлена достоверная разница в экспрессии miR-21, -125a, -143, -155, -221 [91, 149]. Другой анализ профилей экспрессии микроРНК *in situ* в различных периферических артериях (сонных, бедренных артериях и брюшном отделе аорты) выявил общее для большинства атеросклеротических бляшек повышение уровней miR-21, -34a, -146a, -146b-5p и -210 по сравнению с интимой неизмененных артерий [190]. Отмечалось, что особенности экспрессии некоторых циркулирующих микроРНК в крови пациентов с ИБС, также в определенной степени демонстрируют аналогичные различия экспрессии в атеросклеротических бляшках (miR-126, -134, -145, -146a, -198, -210, -340 и -92a) [224]. По данным ряда исследований, miR-21 может быть использована как маркер рестеноза артерий нижних конечностей после оперативного вмешательства [80]. Более того, исследование стентов, покрытых анти-miR-21 антителами, показало более низкую частоту рестенозов по сравнению с голометаллическими стентами [143].

A. Bildirici и соавт. исследовали miR-221 и miR-222 в коронарных атеросклеротических бляшках и сравнивали показатели с данными, полученными на интактных внутренних грудных артериях тех же пациентов, которым по медицинским показаниям проводилось маммарокоронарное шунтирование (МКШ). Также проводился сравнительный анализ уровней циркулирующих miR-221, -222 методом ОТ-ПЦР РВ.

Результаты оценки экспрессии микроРНК в тканях показали, что уровень miR-221 в коронарной атеросклеротической бляшке достоверно (p = 0,015) выше, по сравнению с интактной интрамедиарной артерией (ИМА). При этом достоверных различий в отношении miR-222 получено не было [170]. В аналогичном по дизайну исследовании Ö. Berkan и соавт. при сравнении экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках и интактной ИМА методом микрочипов было выявлено повышение экспрессии miR-187-5p, -3202, -328-5p, -4634, -4299, -4687-3p, -7107-5p, -6090, -345-3p, -6806-5p, -6775-5p, -6867-5p, -6861-5p и снижение экспрессии miR-25-3p, -19b-3p, -19a-3p, -7977, -106b-5p, -1260b, -1-3p, -486-5b, -10a-5p, -10b-5p и 451a. Причём последние четыре микроРНК имели более чем двукратное снижение экспрессии. При сетевом анализе генов-микроРНК ассоциации с атеросклерозом показали miR-19a-3p, -19b-3p, -148a-3p, -451a и -486-5p. Впоследствии методом ОТ-ПЦР РВ было валидизировано снижение экспрессии miR-486-5p в бляшке (p = 0,01) [51].

Особенности экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках определенного сосудистого бассейна имеют важное клиническое значение. Несмотря на то, что патофизиология атеросклеротического процесса представляется схожей для разных сосудистых бассейнов, существуют различия в морфологии и характеристиках бляшек. Так, эрозирование бляшек, кальцинированные узелки, толщина фиброзной покрышки и накопление макрофагов могут различаться в условиях коронарного и каротидного атеросклероза. Периваскулярная жировая ткань, окружающая коронарные артерии (но не сонные артерии), также может влиять на строение бляшек [86]. Будучи «новым» регуляторным кластером, микроРНК исследуются в модуляции функций эндотелиальных клеток, гладкомышечных клеток, макрофагов на разных стадиях развития атеросклеротического процесса. M. Parahuleva и соавт. провели оценку профиля экспрессии уязвимой атеросклеротической бляшки.

Методом микрочипов была анализирована глобальная экспрессия 352 микроРНК. Из них, на основании данных *in silico* и других исследований были отобраны 11 микроРНК (let-7f, miR-1, -9, -19b, -21, -22, -29b, -92a, -99a, -143, -

223), которые ассоциировались с воспалительными процессами в эндотелии и бляшке. При дальнейшей валидации методом ОТ-ПЦР РВ, по сравнению с интактными артериями, было достоверно подтверждено увеличение экспрессии miR-21, -92a и -99a и снижение экспрессии miR-1 и -22 и let-7f [152]. Авторы уточняют, что оверэкспрессия miR-21 отмечается как в коронарных, так и в бляшках брахиоцефальных артерий, а увеличение экспрессии miR-92a и miR-99a является специфичным только для коронарных атеросклеротических бляшек [91; 152].

Среди неинвазивных методов оценки степени атеросклеротического поражения коронарного русла особое внимание уделяется определению уровня кальцификации по данным мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ).

При исследовании пациентов с высокими значениями коронарной кальцинированности по сравнению с группой контроля методом микрочипов было выявлено 34 микроРНК, экспрессия которых была различной. Из этих 34 микроРНК лишь 8 показали достоверную ($p < 0,05$) разницу при валидации методом ОТ-ПЦР РВ (miR-223, -3135b, -133a, -2861, -134, -191, -3679, -1229). Достоверная положительная корреляция уровней микроРНК со степенью выраженности кальцификации коронарного русла отмечалась для miR-2861, 134, -1229 и -3135b.

При выполнении коронарографии (КАГ) (как методом дополнительной валидизации) в независимой группе пациентов ИБС было выявлено достоверное повышение экспрессии miR-134, -3135b, -2861 [123]. В другом исследовании отмечалось снижение экспрессии miR-138-2, -1181, -6816 и -8059 у пациентов со значениями уровня коронарной кальцификации >100 единиц Агатсона (AU). При валидизации результатов методом ОТ-ПЦР РВ только снижение экспрессии miR-8059 оказалось достоверным ($p = 0,03$). Обращает на себя внимание тот факт, что, несмотря на разделение пациентов по группам в зависимости от степени кальцификации, сравнение проводилось фактически между группами с кальциевым индексом равным 0 и более 100 AU [148].

1.1.7 Циркулирующие микроРНК и сосудистое воспаление

Как уже говорилось выше, в основе патофизиологии формирования атеросклеротической бляшки лежит процесс воспаления. МикроРНК принимают участие во всех этапах и проявлениях сосудистого воспаления, играя провоцирующие и протективные роли [270]. Так, например, уровень miR-10a зависит от напряжения сдвига (shear stress) ламинарного кровотока. В зонах артериального русла с низким напряжением сдвига уровень экспрессии miR-10a снижается, что ассоциировано с более высоким риском воспаления, эндотелиальной дисфункции и последующего атерогенеза [176]. При патоморфологическом исследовании сосудов с атеросклеротическими изменениями, по сравнению со здоровыми образцами, было установлено достоверное ($p < 0,01$) повышение экспрессии miR-19b, -221, -222 в интиме, сопровождающееся достоверным ($p < 0,05$) снижением уровня белка PGC-1α, который обладает протективными свойствами в отношении эндотелиальной функции, воспаления и атеросклероза [169]. Кроме того, было установлено, что индукция miR-19b, -221, -222 провоспалительными цитокинами приводит к снижению активности белка PGC-1α. Генетический анализ показал, что PGC-1α является непосредственным целевым геном для указанных микроРНК [169]. Таким образом, был продемонстрирован непосредственный, генетически обусловленный механизм регуляции эндотелиальной функции, приводящий к атеросклерозу при участии микроРНК. Согласно результатам исследования E. Raitoharju и соавт. miR-126, содержащаяся в тромбоцитах, также участвует в контроле сосудистого гомеостаза и воспаления [224]. Описаны и другие пути участия miR-126 в процессах воспаления сосудистой стенки при атеросклерозе посредством регуляции функции лейкоцитов, эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), процессов ангиогенеза, пролиферации [62], однако, как уже говорилось выше, однозначных данных о клинической роли этой микроРНК пока не получено.

В одном из ранних двухэтапных исследований циркулирующих микроРНК при ИБС методом микрочипов осуществлялся анализ циркулирующих микроРНК. После этого проводилась верификация методом ОТ-ПЦР РВ. Достоверная разница в уровнях циркулирующих микроРНК ($p < 0,05$) наблюдалась для miR-19a, -29a, -30e-5p, -145, -150, -155, -181d, -222, -342, -378 и -584, уровни которых были снижены в группе пациентов с ИБС. Кроме этого в исследовании были получены данные о том, что аналогичное снижение экспрессии исследуемых микроРНК наблюдалось в группе пациентов без ангиографических признаков атеросклероза, но с двумя и более факторами риска, в связи с чем авторы пришли к выводу, что данные микроРНК в большей степени отражают воспалительные изменения сосудов, а не являются маркерами ИБС [151].

Лабораторные исследования miR-155 указывают на её связь с сосудистым воспалением и воспалительными процессами в атеросклеротической бляшке. Точных данных о роли miR-155 в этих процессах на сегодняшний день нет, разные исследования показывают противоречивые результаты [62].

В исследовании J. Ren и соавт. в группах пациентов со стабильной ИБС и нестабильной стенокардией сравнивались уровни ряда циркулирующих микроРНК (miR-17, -20a, -21, -92a), которые имели ассоциации с процессом сосудистого воспаления при атеросклерозе. Авторы отмечают, что, в то время как уровень экспрессии вышеуказанных микроРНК при стабильной стенокардии был снижен, у пациентов с нестабильной стенокардией он повышался ($p < 0,01$). При этом уровни miR-21 и miR-92a ассоциировались с нестабильной стенокардией независимо от факторов риска и приёма статинов и антитромбоцитарных препаратов [240].

Одним из провоспалительных факторов, участвующих в процессе атеросклероза, является эндотелин-1 (ЕТ-1). L. Hao и соавт. оценивали регуляцию экспрессии ЕТ-1 посредством микроРНК. Для этого был выполнен сравнительный патоморфологический анализ образцов коронарных артерий и перикардиальной жидкости у пациентов, скончавшихся в результате инфаркта миокарда (группа 1) и от других причин (группа 2). Результаты показали, что уровень ЕТ-1 достоверно

выше как в перикардиальной жидкости, так и в коронарных артериях 1 группы. После определения *in silico* и *in vitro* микроРНК, потенциально влияющих на ЕТ-1, были определены miR-125a/b, 155, 199a/b для дальнейшей оценки уровней экспрессии. При сравнительном анализе экспрессии данных микроРНК было показано достоверное снижение уровней miR-125a, 155, 199 a/b ($p < 0,01$ для miR-125a и -199a/b и $p < 0,05$ для miR-155) [256]. Более ранние исследования также предполагали протективную роль miR-125a в отношении сосудистого воспаления и атеросклероза [176]. Также, в качестве противовоспалительной микроРНК расценивается и miR-451a, введение которой на биологических моделях достоверно ($p < 0,05$) тормозит каскад MMP-2/MMP-9 реакций, запущенных ЕТ-1 [172]. Противовоспалительная активность miR-451a демонстрировалась и в исследовании L. Feng и соавт. на биологической модели спровоцированного наночастицами кремния сосудистого воспаления посредством регуляции сигнального пути рецептора интерлейкина-6 [241].

В исследовании циркулирующей miR-206 у пациентов с ИБС (в подгруппах стабильной ИБС, нестабильной стенокардии, инфаркта миокарда) отмечалось достоверное ($p <0,05$) повышение уровня данной микроРНК, по сравнению с группой контроля. При этом достоверная разница уровней miR-206 в подгруппах отмечалась только у пациентов с нестабильной стенокардией и инфарктом миокарда. Оценка проводилась методом ОТ-ПЦР РВ. Также, авторы путём выделения из крови пациентов эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) и непосредственного воздействия на них miR-206 и anti-miR-206, описали возможный механизм патологического действия исследуемой микроРНК. Так, было показано, что жизнеспособность выделенных ЭПК снижалась при введении miR-206 и повышалась при введении anti-miR-206. Такой же эффект отмечался при оценке изменений эндотелиального фактора роста сосудов. Ещё одним путём патологического воздействия miR-206 было снижение миграции ЭПК у пациентов с ИБС, а также увеличение частоты апоптоза [188].

В крупном многоэтапном исследовании F. Pankratz и соавт., включавшем как *in vitro* и *in vivo* части, так и участие человека, оценивалась роль miR-100 в

процессах сосудистого воспаления [154]. Авторы выявили потенциальную мишень miR-100 – сигнальный путь, опосредованный белком-мишенью рапамицина млекопитающих (mTOR). При экспериментах *in vivo* было определено противовоспалительное действие miR-100. При анализе человеческих патоморфологических образцов стабильных и нестабильных атеросклеротических бляшек, и участков непораженных артерий была установлена обратная корреляция уровня miR-100 и компонентов воспалительной реакции: растворимая межклеточная молекула адгезии-1 (sICAM-1), интерлейкин-8 (ИЛ-8), моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1), воспалительный белок макрофагов-1 (MIP-1) [9], и абсолютным количеством инфильтрирующих макрофагов. Резюмировав свои наблюдения, авторы отметили выраженный противовоспалительный эффект miR-100 в отношении эндотелиальных клеток [154].

Одними из факторов сосудистого воспаления являются окисленные липопротеины низкой плотности (oxLDL). В рамках регистрового исследования REGICOR (REgistre GIroní del COR) проведено сопоставление уровней микроРНК, ассоциированных с oxLDL (указанные ассоциации были получены в первом этапе исследования, выполненном на образцах человеческих эндотелиальных и гладкомышечных сосудистых клеток) у пациентов с инфарктом миокарда и группой контроля. В группе пациентов с инфарктом миокарда наибольшая разница была отмечена для miR-499a-5p, -16-5p и -133a-3p. Кроме этого, для другой микроРНК – miR-143-3p, была выявлена способность быть независимым предиктором ИБС ($p = 0,008$) [232].

1.1.8 Циркулирующие микроРНК и липидный обмен

Специфическая роль микроРНК в регуляции липидного обмена является быстро развивающейся областью исследования. Ранние лабораторные исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что различные микроРНК являются активными участниками процессов метаболизма и транспорта липидов, а

нарушения их регуляции связаны с прогрессированием атеросклеротического процесса [174, 177, 179]. Результаты экспериментальных исследований показывают вовлеченность большого числа миркроРНК в процессы липидного обмена: описаны различные механизмы активности miR-122, -10b, -26, -27a/b, -30, -33a, -100, -122, -128, -130b, -144, -148a, -185, -221, -222, -223, -758 и ряда других [118, 136, 177].

Наибольший интерес и практическую значимость представляют клинические исследования регуляции липидного обмена посредством микроРНК.

Так, K.C. Vickers и соавт. показали, что микроРНК транспортируются в плазме крови и доставляются в клетки-мишени в составе липопротеинов высокой плотности [175]. Учитывая указанную специфику, были проанализированы транскоронарные (оценка производилась при прицельном анализе крови из венозной системы сердца - коронарного синуса, а также из полости правого предсердия) уровни микроРНК, ассоциированных с липопротеидами высокой плотности (ЛПВП) у пациентов с ОКС и стабильной ИБС, а также с пациентами без признаков атеросклероза венечных артерий. Транскоронарный градиент ряда микроРНК, таких как miR-223, -92a, -16 и -20a показывал обратную корреляцию в группах пациентов с ОКС, стабильной ИБС и отсутствием коронарного атеросклероза соответственно. Интересно, что дополнительно выделялись достоверные различия в уровнях микроРНК, транспортируемых в составе ЛПВА у пациентов с ОКС и стабильной ИБС, причем данные различия не сопровождались изменениями структуры и размеров частиц ЛПВП [254, 260, 261].

Методы исследования общегеномных ассоциаций (genome-wide association studies - GWAS) дают возможность оценки множественных связей генетических полиморфизмов и отдельных признаков, включая патогенетические звенья заболеваний, что способствует выявлению новых механизмов развития тех или иных птологических состояний. A. Wagschal и соавт. провели GWAS мета-анализ более чем 188000 геномов для определения ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) и 69 различных микроРНК с различными аномалиями уровней липидов в крови. В результате были выявлены четыре микроРНК (miR-

128-1, miR-148a, miR-130b и miR-301b), которые регулируют поглощение липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и обратный транспорт холестерина посредством экспрессии белков рецепторов ЛПНП и ABCA1 в клетках печени и макрофагах. Исследование локусов количественных признаков (QTL или ЛКП) экспрессии микроРНК (miR-ЛКП) с использованием образцов ткани печени 424 пациентов с ожирением выявило ассоциацию экспрессии miR-128-1 и miR-148a с ОНП, связанными с аномальными уровнями липидов в крови, что свидетельствует о вовлеченности этих микроРНК в процессы кардиометаболических расстройств человека [116].

Анализ методом ОТ-ПЦР РВ циркулирующих miR-92a, miR-106b, и miR-18a показал достоверное ($p = 0{,}003$, $p < 0{,}001$ и $p = 0{,}001$, соответственно) снижение их уровня у пациентов с ИБС (81 человек) по сравнению с группой контроля (50 человек), в то время как уровень циркулирующей miR-17 был выше у пациентов с ИБС ($p=0{,}008$). Также, исследователи выявили корреляцию уровней циркулирующих микроРНК и продуктов липидного обмена. Так, была отмечена положительная корреляция уровня miR-17 с уровнями общего холестерина, ЛПНП и аполипопротеина B, уровни экспрессии miR-106b и miR-92a положительно коррелировали с уровнями липопротеидов высокой плотности и аполипопротеином A-1 [44].

МикроРНК 221 и 222 исследовались методом ОТ-ПЦР РВ для оценки функции эндотелиальных прогениторных клеток и липидного обмена у пациентов, принимающих и не принимающих ингибиторы ГМГ-КоА редуктазы (статины). Исходная выборка пациентов с ишемической болезнью сердца составляла 44 человека (22 принимали аторвастатин, 22 – правастатин), в группе контроля было 22 пациента. По результатам исследования было показано, что в группе пациентов с ИБС уровни miR-221, -222 были достоверно повышены, по сравнению с группой контроля ($p < 0{,}01$). Спустя 12 месяцев у пациентов, принимавших аторвастатин, наблюдалось выраженное повышение уровня циркулирующих ЭПК, сопровождавшееся снижением уровня miR-221, -222 ($p<0{,}05$), в то время как достоверных изменений на фоне терапии правастатином

выявлено не было [98]. Интересно, что в исследовании S. G. Yilmaz и соавт. корреляции miR-221 и miR-222 с липидными нарушениями выявлено не было, в то время как в том же исследовании сопоставление липидных профилей и уровней экспрессии микроРНК показало положительную корреляцию между уровнями miR-122a и уровнями триглицеридов (p = 0,046) и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) (p = 0,029) [69].

Многоэтапное (*in silico, in vitro, in vivo* и на человеческих гепатоцитах) исследование роли miR-223 в процессах обмена холестерина показало, что miR-223 является ключевым посттранскрипционным регулятором обмена холестерина. Исследователи показали, что данная микроРНК напрямую и опосредованно регулирует 3 ключевых процесса, которые влияют на внутриклеточные и системные уровни холестерина: биосинтез, обратный захват и выведение (эффлюкс). Кроме того, в *in vivo* этапе исследования, miR-223 показала возможное участие в преобразовании холестерина в желчные кислоты и билиарной экскреции. Наиболее важное наблюдение заключается в том, что снижение содержания холестерина приводило к уменьшению транскрипции и экспрессии miR-223. Подавление активности miR-223 в условиях низкого уровня холестерина, вероятно, приводит к снижению торможения биосинтеза и обратного захвата холестерина и препятствует его выведению ЛПВП для увеличения внутриклеточной концентрации. При исследовании на людях miR-223, помимо влияния на процессы биосинтеза холестерина, также подавляла его обратный захват посредством контроля экспрессии и функции скавенджер-рецептора класса B типа I [171].

1.1.9 Циркулирующие микроРНК, степень выраженности атеросклероза и уязвимость атеросклеротических бляшек

Проблема уязвимости атеросклеротических бляшек исследуется на протяжении длительного времени. Учитывая значимость микроРНК в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, исследования потенциальной взаимосвязи

уровней микроРНК и уязвимости атеросклеротических бляшек представляются актуальными. В настоящее время большинство данных получено применительно к каротидным артериям и лишь несколько исследований проведены с целью оценки атеросклеротического процесса в коронарных артериях [12].

В исследовании Z. Zhang и соавт. отмечалось снижение уровней циркулирующих miR-126 у пациентов с нестабильной стенокардией, инфарктом миокарда и некоронарной патологией сердца по сравнению со стабильной стенокардией ($p < 0,05$), что может указывать на возможность использования данной микроРНК как маркера стабильности атеросклеротической бляшки. Кроме того, авторы отметили увеличение экспрессии miR-143 в группе пациентов с инфарктом миокарда ($p < 0,05$) [249].

Так, J. Ren и соавт. провели многоступенчатое исследование целого ряда циркулирующих микроРНК. Тестовая (деривационная) когорта включала две группы пациентов с болью в груди: с ангиографическим подтверждением ИБС (группа нестабильной стенокардией) и без него (группа контроля). У этих пациентов методом микрочипов был выявлен пул из 34 циркулирующих микроРНК, достоверно различающийся в группах НС и контроля. Для дальнейшей валидации методом ОТ-ПЦР РВ в более крупной независимой когорте (45 пациентов - с нестабильной стенокардией, у 10 из них было выявлено повреждение бляшки методом внутрисосудистого ультразвукового исследования (ВСУЗИ), 31 пациент – со стабильной стенокардией, 37 пациентов – контрольная группа) были выбраны 7 микроРНК (miR-21, -25, -92a, -106b, -126, -451 и 590-5p), исходя из предыдущих научных данных об их участии в патогенезе уязвимости бляшек и достаточного уровня в плазме крови. Уровни исследуемых 7 микроРНК были достоверно ($p < 0,01$) повышены в группе нестабильной стенокардии по сравнению как со стабильной, так и с группой контроля. Авторы провели логистический регрессионный анализ с НС в качестве зависимой переменной и включая известные факторы риска. После корректировки по факторам риска ассоциация всех 7 микроРНК с нестабильной стенокардией была подтверждена [240].

В исследовании структурных признаков уязвимости коронарной атеросклеротической бляшки методом внутрисосудистого УЗИ и ряда циркулирующих микроРНК (miR-92a, -100, -126, -127, -133, -145, -155, -223) забор крови для дальнейшего анализа осуществлялся из аорты и коронарного синуса при проведении КАГ до введения контрастных препаратов и начала интервенционных вмешательств. В исследование были включены 32 пациента со стенокардией напряжения и наличием документированных стенозов коронарных артерий (более 50%). При анализе плазмы крови методом ОТ-ПЦР РВ достоверная разница уровней циркулирующих микроРНК (в аорте и коронарном синусе), обладающая статистической значимостью, была выявлена только для miR-100 ($p = 0,009$). При дальнейшем исследовании взаимосвязи уровня miR-100 и характеристик атеросклеротической бляшки была показана достоверная положительная корреляция уровня miR-100 и процента липидного объёма (%LV; $p < 0,01$) и отрицательная корреляция с процентом объёма фиброза (%FV; $p < 0,05$) по данным ВСУЗИ. При этом корреляция коронарного уровня miR-100 с %LV и %FV была более сильной, в то время как достоверных корреляций для других микроРНК выявлено не было. Авторы также отмечают, что выборки было недостаточно для полноценного анализа проблемы, кроме того не до конца понятны механизмы, приводящие к изменениям уровней циркулирующих микроРНК [134, 208]. Это может объяснять отсутствие достоверных корреляций микроРНК, имевшихся в исследовании J. Ren и соавт.

В исследовании D. M. Leistner и соавт. также оценивалась взаимосвязь атеросклероз-ассоциированных микроРНК с характеристиками атеросклеротической бляшки. Для анализа структурных особенностей использовалась оптическая когерентная томография (ОКТ). Оценивались такие параметры как протяженность и степень стенозирования просвета сосуда, а также различные типы бляшек: фибротические, атерома, фиброатерома, кальцифицированная фиброатерома, бляшка, инфильтрированная макрофагами, фиброатерома с тонкой покрышкой (TCFA) и повреждённые бляшки (согласно стандартизированному протоколу ОКТ). Уровни микроРНК оценивались методом

ОТ-ПЦР РВ в луковице аорты и в коронарных венозных синусах с определением транскоронарного градиента (ТКГ) микроРНК, чтобы оценить изменения уровней микроРНК после прохождения коронарного русла. MiR-155 достоверно ассоциировалась с общей степенью атеросклеротического поражения коронарных артерий (coronary plaque load) ($p = 0,009$). Вместе с тем при исследовании ТКГ достоверная корреляция общей степени атеросклеротического поражения коронарных артерий была с miR-126-3p/5p, -145, -29b, и -155. Достоверной корреляции для miR-92a, -486, -550a-3p/5p, -574, -3680 выявлено не было [109]. При исследовании корреляций уровней микроРНК и характеристик атеросклеротической бляшки miR-126-3p/5p, -145, -29, и -155 имели достоверную обратную корреляцию с общим объёмом фиброатеромы. Кроме того, была выявлена прямая корреляция уровня miR-155 с кальцинированными бляшками, в то время как для miR-126-5p отмечалась обратная корреляция с TCFA, а для miR-29b отмечалась обратная корреляция с общим объёмом фиброатером. При анализе ТКГ микроРНК и характеристик атеросклеротических бляшек авторы выявили достоверную положительную корреляцию ТКГ miR-29b с общим объёмом фиброатером и ТКГ miR-155 с общим объёмом кальцифицированных бляшек. Кроме того ТКГ miR-126-3p/5p, -145, -29b, и -155 продемонстрировали значительную отличительную способность предсказывать наличие TCFA ($p < 0,05$) [262].

В 2018 году в Китае завершились три крупных исследования циркулирующих miR-122, -155, -223. Исследования каждой из трёх молекул проводилось в разных медицинских центрах, при этом дизайн исследований был одинаков. Выборка для каждой из микроРНК составила 300 пациентов со стабильной ИБС и 100 пациентов без признаков коронарного атеросклероза в качестве контроля. Анализ микроРНК проводился с помощью ОТ-ПЦР РВ. Экспрессия всех трёх микроРНК была достоверно выше в исследуемой группе по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). При этом исследовалась корреляция тяжести атеросклероза по шкале Gensini и уровней микроРНК. Все исследуемые

микроРНК показали достоверную ($p < 0,001$) положительную корреляцию со степенью тяжести атеросклеротического процесса по шкале Gensini [39, 223, 269].

Исследование Z. Zhong и соавт. было направлено на оценку профиля циркулирующих микроРНК у пациентов с интактными коронарными артериями ($n = 6$), с нестабильной стенокардией ($n = 6$) и с инфарктом миокарда с подъёмом сегмента ST ($n = 6$). Для выявления профиля циркулирующих микроРНК использовался метод *sRNA-Seq*, а для верификации полученных данных авторы использовали «классическую» ОТ-ПЦР РВ. Достоверные изменения экспрессии ($p < 0,05$) были выявлены для miR-126, -142, -17, -340 (повышение экспрессии) и для miR-125b, -4661, -511, -6726 (снижение экспрессии). Последующий анализ ROC-кривых показал, что miR-142 и miR-17 могут служить биомаркерами нестабильной стенокардии и ИМспST [65].

В упомянутом выше исследовании H. Pankratz и соавт. оценивалась экспрессия miR-100 в атеросклеротических бляшках человека. Образцы каротидных атеросклеротических бляшек были получены из Биобанка Athero-Express. Авторы проанализировали уровень экспрессии miR-100 в 37 уязвимых бляшках с высоким содержанием жиров и макрофагов и в 40 стабильных бляшках, характеризующихся низким числом макрофагов и с содержанием жировых включений менее 40%, в качестве контроля были отобраны 10 маммарных артерий без признаков атеросклероза. Авторы не выявили разницу в экспрессии miR-100 между стабильными бляшками и здоровыми артериями, но при этом было показано значительное снижение экспрессии miR-100 в уязвимых атеросклеротических бляшках, по сравнению с другими группами [154]. Интересно, что в более раннем исследовании E. Raitoharju и соавт. достоверной разницы между уровнем экспрессии miR-100 в атеросклеротически измененных сонных, бедренных артериях, брюшном отделе аорты и в интактных артериях отмечено не было [190]. Кроме того, в исследовании F. Cipollone и соавт. различий уровней микроРНК в атеросклеротических бляшках у пациентов с симптомным атеросклерозом сонных артерий были получены обратные

результаты [263], что указывает на неоднозначность возможности использования данной микроРНК как биомаркера.

Интересный подход к оценке уязвимости атеросклеротической бляшки применили в своём исследовании S. Li и соавт. Поскольку при проведении баллонной ангиопластики и стентирования происходит непосредственное повреждение атеросклеротической бляшки, авторы произвели повременную оценку профиля и уровней экспрессии микроРНК у пациентов со стабильной ИБС, которым по медицинским показаниям проводилось ЧКВ с имплантацией одного стента. Исследование проводилось в три этапа на трёх разных группах пациентов.

В первой группе (n = 10) проводилась оценка уровней циркулирующих микроРНК до и через 1 час после стентирования методом микрочипов, в результате было выделено 754 микроРНК, из которых были отобраны 24 для дальнейшего анализа.

Во второй группе исследование проводилось с использованием ОТ-ПЦР РВ у пациентов, которым были имплантированы стенты (n = 10) и у пациентов, прошедших только коронароагниографию (КАГ) (n = 10) в качестве контроля, при этом анализ крови производился до и через 1 час после вмешательства; в результате были выявлены 6 микроРНК с достоверной разницей уровней экспрессии (miR-155, -483, -20b, -122, -451a и -486).

Третий этап исследования (валидационный) включал в себя оценку экспрессии 6 полученных микроРНК методом ОТ-ПЦР РВ у 29 пациентов, которым проводилось стентирование. На данном этапе сравнивались уровни экспрессии до проведения вмешательства, через 30 минут и через 60 минут после. Повышение уровней miR-155 и miR-483 отмечалось как через 30, так и через 60 минут после баллонной дилатации; уровень miR-451a достоверно снижался только при исследовании через 30 минут. Напротив, уровни miR-20b, -122 и -486 не изменились со временем. В результате, для статистической оценки возможности использования микроРНК как биомаркеров повреждения атеросклеротической бляшки были отобраны miR-155, -451a и -483. При

исследовании AUC всех трёх микроРНК и различных их комбинаций показали достоверную (p <0,001) диагностическую значимость. Среди них самой высокой диагностической силой обладали комбинации miR-451a и 483 через 30 минут после повреждения и miR-483 и 155 через 60 минут [70].

1.2 Проблема оценки рисков сердечно-сосудистых осложнений

Заболевания сердечно-сосудистой системы в настоящее время всё ещё остаются лидирующей причиной смертности во всём мире. Несмотря на рост хронической сердечной недостаточности, в структуре сердечно-сосудистой смертности доминирующее положение занимают сосудистые осложнения – инфаркты миокарда и нарушения мозгового кровообращения, имеющие общий патофизиологический базис - атеросклероз [6].

Обзор литературы в рамках настоящего диссертационного исследования посвящён актуальным современным и перспективным направлениям совершенствования амбулаторной диагностики с целью предотвращения наступления ССО.

Вопрос как популяционного, так и индивидуального риска развития ССО – «краеугольный камень» амбулаторного ведения пациентов с ишемической болезнью сердца. Тактика стратификации риска ССО, согласно рекомендациям Европейского кардиологического общества по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний (European Society Cardiology, 2021), подразумевает его оценку у всех пациентов, наследственность которых отягощена по раннему развитию инфарктов и инсультов, имеющих семейные формы гиперхолестеринемии [24].

Также оценка риска ССО в рамках приёма врача показана для пациентов, имеющих нарушения углеводного и липидного обмена, курящих, страдающих артериальной гипертензией. Кроме того, в рамках общего скрининга оценка рисков рекомендована всем мужчинам от 40 и женщинам от 50 лет вне зависимости от наличия указанных выше факторов, что также отражено и в

клинических рекомендациях Министерства Здравоохранения Российской Федерации (2018), Американского колледжа кардиологии и Американской ассоциации сердца (2019) [10, 19, 20, 24].

На сегодняшний день имеется достаточно много способов оценки риска ССО, отличающихся по своей точности, а также по специфичности к отдельным группам пациентов [60, 117, 146]. Например, у пациентов со средним или промежуточным риском ССО показания к липидснижающей терапии отличаются в рекомендациях различных профильных сообществ в разных странах, и пока консенсуса по этому вопросу не найдено [146]. Помимо этого, реальная прогностическая способность отдельных шкал даже в популяционном масштабе представляется неоднозначно [27, 33].

1.3 Значение методов КТ-визуализации коронарного русла в стратификации риска сердечно-сосудистых осложнений

Одним из современных методов неинвазивной диагностики атеросклероза коронарных артерий является компьютерная томография коронарных артерий как с применением внутривенного контрастирования, так и без него. Проведение оценки рисков ССО с применением данных исследований, особенно в группе бессимптомных больных, является крайне актуальной в современной амбулаторной кардиологии.

При оценке изменений в клинических рекомендациях прослеживается отчетливая тенденция к внедрению более технологичных методов диагностики бремени атеросклероза.

Неинвазивная оценка состояния коронарного русла лучевыми методами – коронарный кальциевый индекс (КИ) и компьютерная томография коронарных артерий (КТА) – позволяет непосредственно оценить наличие и степень коронарного атеросклероза [4]. У пациентов без клинических проявлений ИБС оценки КИ и КТА показали, что наличие, и выраженность коронарного

атеросклероза несут дополнительную прогностическую значимость для пациентов, находящихся «за пределами» популяционной оценки [265].

1.3.1 Использование коронарного кальциевого индекса в клинической практике

Оценка индекса кальциноза коронарных артерий методом компьютерной томографии является неинвазивной и не требующей контрастного усиления процедурой. В данной методике под кальцификатом подразумевается область (1 мм^2), обладающая рентгеновской плотностью от 130 единиц Хаунсфилда (HU) [4, 60]. Степень выраженности отложения солей кальция в стенке коронарных артерий определяется по шкале Агатсона в соответствующих единицах – Agatson Units (AU) [197].

Значение индекса коронарного кальция может использоваться как самостоятельный независимый предиктор ССО и как компонент комплексных систем оценки сосудистых рисков. Значимость оценки ККИ наиболее полно показана в исследовании Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). В соответствии с ним, при использовании популяционных шкал (ACC/AHA и на основе Framingham) имеет место завышение рисков на 37-154% у мужчин и 8-67% у женщин [33]. Эти данные подтверждаются в исследовании A. Alashi и соавт., в котором при определении десятилетних рисков ССО по ACC/AHA выявлялась недооценка, а по шкале Рейнольдса – переоценка рисков, по сравнению со шкалой MESA [227].

В исследовании MESA на основании анализа большого количества проспективных данных был создан калькулятор рисков сосудистых осложнений, включающий КИ. Использование нового алгоритма оценки сосудистых рисков приводило к значительному улучшению точности прогнозирования осложнений ($p < 0,0001$) [17].

Определение рисков ССО стандартными популяционными методами сильно зависит от пола, возраста и этнической принадлежности. Включение КИ в

систему оценки риска персонализирует результат и снижает влияние демографических факторов на него. Например, согласно шкале SCORE 2 для популяции очень высокого риска все мужчины старше 40 лет относятся к категории среднего или высокого риска ССО вне зависимости от уровня липидов, артериального давления и статуса курения. Положительные результаты добавления КИ к стандартным системам прогнозирования ССО объясняются тем, что коронарный кальций является, по сути, результатом сочетанного действия измеренных (и неизмеренных) факторов риска от рождения человека и до момента исследования. В настоящее время накапливается всё больше данных о том, что оценка КИ является независимым предиктором сердечно-сосудистых катастроф и может использоваться как у симптомных, так и у бессимптомных пациентов [217].

Клинические рекомендации европейского общества кардиологии (ESC) по профилактике сердечно-сосудистых заболеваний от 2016 и 2021 года указывают возможность использования КИ в качестве дополнительного метода диагностики у пациентов с риском ССО от 5 до 10 % по шкале SCORE [4, 24]. Кроме того, пациентов с КИ более 300 AU рекомендуется относить к группе, как минимум, высокого риска вне зависимости от SCORE2 [19]. Стоит отметить, что в рекомендациях ESC по дислипидемиям от 2019 года в качестве модификатора риска используют порог в > 100 AU [22]. Помимо этого, в рекомендациях ESC от 2019 года по хроническому коронарному синдрому подтверждается прогностическая значимость КИ, которая указывает на низкую вероятность наличия значимых стенозов коронарных артерий (<5%) и низкий риск сосудистых осложнений (<1%) [21]. Однако, несмотря на накопленные данные, в рекомендациях ESC по хроническому коронарному синдрому и дислипидемиям класс рекомендаций достаточно скромный IIb (B).

В американских рекомендациях по первичной профилактике ССО (ACC/AHA) от 2019 года применению оценки КИ уделено больше внимания. Так, оценка КИ рекомендована для определения тактики лечения (IIa, B-NR) взрослых пациентов пограничного и промежуточного риска ССО. У этих пациентов оценка

КИ способствует реклассификации риска как в большую (например, при КИ ≥100 AU), так и в меньшую стороны (при КИ = 0) у значительной части пациентов [20].

До настоящего времени общепризнанного распределения пациентов на группы по КИ нет. В клинических исследованиях наиболее распространенными отсечками при разделении на группы считаются AU = 0; AU от 1 до 99; AU от 100 до 399; AU от 400 до 999 и от тысячи и более единиц Агатсона. Считается, что риски сосудистых осложнений проградиентно увеличиваются с ростом степени кальцфицированности КА [31]. Стоит отметить, что окончательного консенсуса в отношении определения степени риска ССО у пациентов различных групп КИ, например, в диапазоне от 1 до 100 AU нет, а использование фиксированных порогов (>100 или >300 AU) может способствовать недооценке рисков, особенно у симптомных пациентов или бессимптомных пациентов высокого риска [202]. Кроме того, значимость коронарного кальция от 1 и выше заключается еще и в том, что сам факт его наличия означает имеющееся атеросклеротическое поражение коронарных артерий и может сыграть решающую роль в назначении липиднижающей терапии даже у пациентов с низким расчётным риском ССО.

Кальциевый индекс, равный нулю, свидетельствует о минимальной вероятности наличия атеросклеротических бляшек коронарных артерий, влияющих на гемодинамику, однако, не исключает полного отсутствия атеросклероза [87]. При исследовании в рамках масштабного регистра MESA расчётный риск сосудистых осложнений в группе пациентов с КИ = 0 был очень низким и составлял 2-5 эпизодов в расчёте на тысячу пациенто-лет, то есть менее 1% в год [127]. Показатель КИ более 100 AU указывает на 10% риск развития ССО в течение десяти лет [265]. Интересной группой являются пациенты, имеющие атеросклеротические бляшки при нулевом индексе коронарного кальция. Их доля среди всех пациентов с КИ равным 0 может достигать 10-20% [113, 132, 214]. Несмотря на имеющиеся данные об очень низком риске ССО при кальциевом индексе равном нулю, наличие уже сформировавшихся изменений у таких пациентов может считаться более опасным состоянием, поскольку морфологически такие атеросклеротические поражения являются уязвимыми, что

подтверждается данными исследований особенностей инфаркт-связанных бляшек [55, 200]. Однако, несмотря на потенциальную опасность, нулевой КИ – это прогностически более благоприятный вариант [53]. Впрочем, основные исследования групп пациентов с нулевым КИ проводились на 64-срезовых компьютерных томографах с относительно большой толщиной среза, что может быть причиной плохого выявления небольших кальцинатов за счёт попадания исследуемого участка между срезами и недостаточно эффективных алгоритмов компьютерного определения коронарного кальциноза [84, 216]. Применительно к бессимптомным пациентам с КИ = 0 общепринятыми считаются рекомендации об отсутствии необходимости дальнейших этапов обследования и визуализации коронарного русла [251], однако, насчёт бессимптомных пациентов высокого риска такой подход может быть неоправдан [247].

M. H. Criqui и соавт. указывают на необходимость разделения понятий объёма коронарного кальциноза и степени плотности атеросклеротической бляшки, что объясняет противоречие морфологических и обсервационных данных [57]. Такие же противоречия описаны и для категории пациентов с 1000+ КИ. A. Peng и соавт. в своих двух крупных исследованиях приводят данные, указывающие на высокий риск смертности и сосудистых осложнений в данной группе [144, 268]. Этим данным противоречит анализ подгруппы тяжёлого кальциноза исследования MESA [94], а также результаты A. R. van Rosendael, в исследовании которого наличие атеросклеротических бляшек с индексом более 1000 было связано с более низким риском развития сосудистых осложнений [43].

Резюмируя вышесказанное, можно констатировать, что оценка коронарного кальциевого индекса в целом является крайне полезным инструментом стратификации риска развития сердечно-сосудистых осложнений. Однако проведенный анализ наиболее распространённых методов вычисления этого параметра показывают, что они не учитывают такой значимый фактор, как стабильность атеросклеротической бляшки. Стабильность атеросклеротической бляшки – ключевой фактор патогенеза развития атеротромбоза, поэтому его анализ, особенно в группах молодых пациентов с нулевым и низким уровнем

коронарного кальция, а также у пациентов с тяжёлым коронарным кальцинозом представляется важной задачей.

Для более точной персонализированной оценки состояния коронарного русла применяется компьютерная визуализация с контрастным усилением. Так, в рекомендациях Канадского кардиологического общества (Canadian Cardiovascular Society, CCS, 2014) отражены вопросы нулевой или тяжёлой коронарной кальцификации. Отсутствие кальциноза не означает отсутствия атеросклероза, а массивная кальцификация коронарных артерий не обязательно должна сопровождаться формированием гемодинамически значимых сужений. Имея ввиду отмеченную специфику бесконтрастного метода оценки КИ, в рекомендациях CCS, а также в рекомендациях Национального института здравоохранения и совершенствования медицинской помощи Великобритании (National Institute for Health and Care Excellence, NICE, 2017) для пациентов, имеющих низкую и промежуточную претестовую вероятность ИБС, отдаётся предпочтение именно методу компьютерной коронарной ангиографии [58, 255].

1.3.2 Роль КТА в современной медицинской практике

Разделение компьютерной коронарной ангиографии и компьютерной оценки коронарного кальция, как правило, происходит по факту наличия симптомов стенокардии при отсутствии показаний к инвазивному исследованию. У таких пациентов КТА значительно превосходит нагрузочные тесты или определение толщины комплекса интима-медиа при УЗИ брахиоцефальных артерий в прогностической ценности, а также позволяет определять гемодинамически значимые стенозы [60, 151, 265]. В то же время, для некоторых категорий пациентов без симптомов ИБС, но имеющих очень высокий риск развития сердечно-сосудистых осложнений, например, с атеросклерозом других артериальных бассейнов, сахарным диабетом 2 типа, ожирением или семейной гиперхолестеринемией проведение КТ-коронарографии имеет высокую ценность в рамках диагностики и определения прогноза, а также может проводиться вместо

инвазивной КАГ, [59, 82, 83, 122, 244, 257]. Вопрос значимости проведения КТА у бессимптомных больных изучался с момента внедрения метода в клиническую практику. Дальнейшее свое развитие он получил с начала эксплуатации 64-срезовых аппаратов. Ряд работ, посвящённых скринингу ИБС, показывает, что даже в группах промежуточного и низкого риска ССО стенозы коронарных артерий более 50% выявлялись в 21,9% случаев [214]. Более того, даже в популяции пациентов с нулевым кальциевым индексом у пятой части (20%) КТА выявляла признаки атеросклероза, а значимые поражения определялись в 4% случаев, что свидетельствует о более высокой прогностической точности метода с контрастным усилением [132]. Вместе с тем, при оценке десятилетнего прогноза сосудистых осложнений малый объём коронарного атеросклероза ассоциировался с низкой вероятностью достижения конечных точек, и метод КТА реклассифицировал расчётные риски ССО в сторону низких у 68% участников исследования, преимущественно, за счёт сокращения группы промежуточного риска [18]. Несмотря на преимущества КТА над оценкой коронарного кальциноза и расчётных рисков ССО, соотношение риска, ассоциированного с применением контраста и дополнительной диагностической пользы в когорте бессимптомных пациентов, является неубедительным и не находит отражения в актуальных руководствах ESC и ACC/AHA [23, 24, 202]. Иной подход демонстрируется в клинических рекомендациях NICE (2017), где всем симптомным пациентам (то есть, с болями за грудиной) надлежит проводить КТА, минуя расчёты предтестовой вероятности ИБС и проведение оценки КИ [255].

Важным преимуществом проведения КТ-КИ, как уже упоминалось выше, является детализация морфологии атеросклеротического поражения сосуда. На основании особенностей бляшек выделяют группу уязвимых поражений, которые имеют более высокую вероятность дестабилизироваться и привести к развитию сосудистой катастрофы.

Учёт уязвимости атеросклеротической бляшки в сравнении со скринингом на основе оценки коронарного кальция и расчётных рисков по шкале Framingham (ATP III) приводил к значимой рестратификации риска и демонстрировал более

высокую ассоциацию с прогнозом развития ССО в когорте бессимптомных пациентов [131].

Исходя из современных представлений, основными показаниями к компьютерной томографии коронарной ангиографии являются [3, 13, 23, 25, 26]:

• исключение гемодинамически значимых или подтверждение наличия незначимых стенозов коронарных артерий у пациентов с болью в груди при недостаточной информативности функциональных исследований и возрасте менее 65 лет;

• острая кардиалгия у пациентов промежуточного риска ССО (без известного атеросклероза КА и ИБС, или с пограничными результатами стресс-тестов) в качестве метода исключения;

• скрининг бессимптомных пациентов с сахарным диабетом 2 типа, имеющих незаживающие язвы ног и/или заболевания артерий нижних конечностей;

• исключение значимого коронарного атеросклероза у пациентов без стенокардии, имеющих низкую или промежуточную предтестовую вероятность ИБС, имеющих дополнительные факторы риска ССО, не учитывающиеся в расчётных параметрах;

• оценка эффективности реваскуляризации у пациентов после коронарного шунтирования или стентирования КА стентами более 3 мм в диаметре, в особенности, у пациентов с наличием неспецифических болей в груди;

• исключение коронарного атеросклероза у пациентов с предполагаемой неишемической кардиомиопатией;

• оценка гемодинамической значимости известных стенозов коронарных артерий при выполнении сопутствующей КТ оценки фракционного резерва кровотока;

• сочетанная диагностика особенностей развития коронарных артерий, аорты и лёгочных артерий.

Противопоказаниями к КТА считаются следующие состояния [26]:

• аллергические реакции на вводимое при исследование контрастное вещество (наиболее актуально для использования ионогенных препаратов);

• невозможность взаимодействовать с оператором во время проведения исследования (например, выполнения команд по задержке дыхания), а также клаустрофобия;

• пациенты в критическом состоянии, с нестабильными показателями гемодинамики;

• наличие почечной недостаточности тяжелой степени (пороговые значения скорости клубочковой фильтрации могут отличаться в зависимости от используемого контрастного препарата, а также локальных клинических протоколов);

• тахикардия и/или нерегулярный сердечный ритм на время проведения исследования, при невозможности достижения целевого пульса, в зависимости от используемого оборудования;

• избыточная масса тела, учитывая характеристики томографа;

• беременность, период грудного вскармливания;

• известные заранее особенности коронарного русла, препятствующие адекватной оценке (выраженный кальциноз, наличие многочисленных стентов, в особенности, малого диаметра, высокая извитость и истончённость КА).

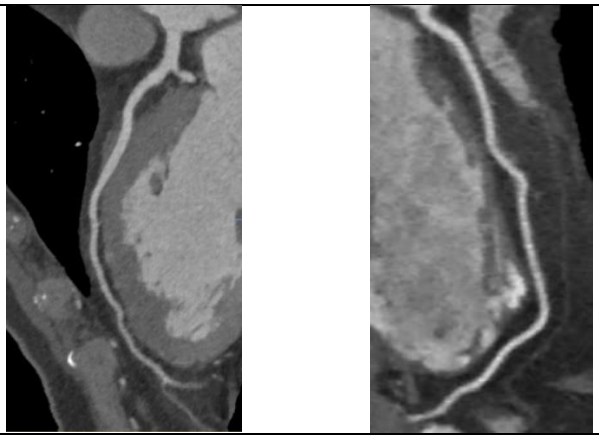
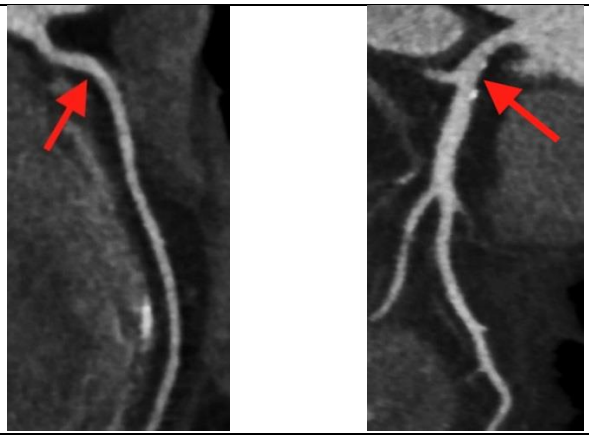
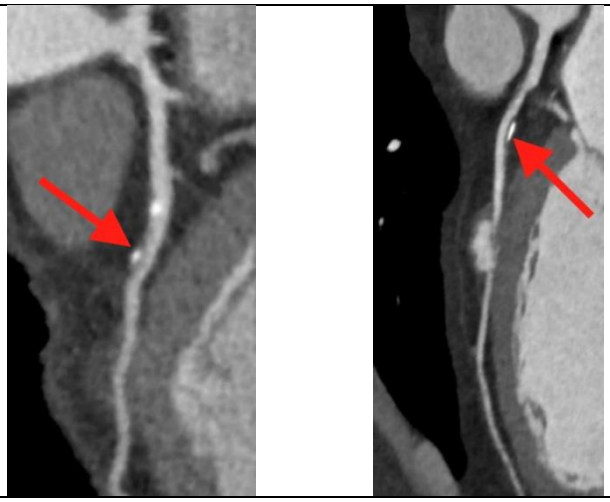
Стандартная радиологическая шкала оценки коронарного атеросклероза, называемая CAD-RADS (Coronary Artery Disease – Reporting and Data system), основана на измерении степени выраженности стенозов коронарных артерий.

Несмотря на относительную простоту и высокую репрезентативность, указанная шкала используется лишь в небольшом количестве локальных клинических протоколов и не имеет широкого распространения в Российской Федерации. Степень выраженности атеросклероза по CAD-RADS распределена от 1 (отсутствие атеросклероза) до 5 (окклюзия коронарных артерий).

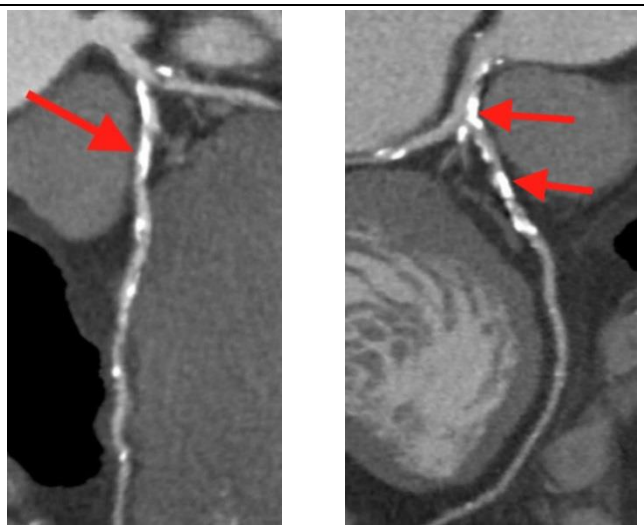
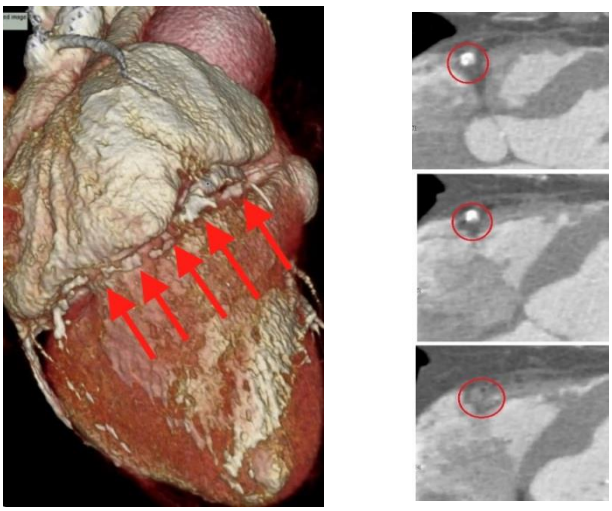
В Таблице 1 указаны характеристики всех степеней выраженности атеросклероза по данной шкале с графическими примерами из выборки пациентов данного диссертационного исследования, за исключением изображения окклюзии

коронарной артерии, которое взято из архива исследований кабинета мультиспиральной компьютерной томографии отделения лучевой диагностики №2 Университетской клинической больницы №1 Сеченовского Университета [4].

Таблица 1 – Тяжесть атеросклеротического поражения коронарных артерий по системе CAD-RADS

CAD-RADS	Максимальная степень стенозирования	Изображение
CAD-RADS 0	0%	
CAD-RADS 1	1-24%	
CAD-RADS 2	25-49%	

Продолжение Таблицы 1

CAD-RADS	Максимальная степень стенозирования	Изображение
CAD-RADS 3	50-69%	
CAD-RADS 4	70-99% или 50% стеноз ствола или проксимального отдела ЛКА ≥ 70% трёхсосудистое поражение КА	
CAD-RADS 5	100% – окклюзия КА	

Примечание: CAD-RADS - Coronary Artery Disease – Reporting and Data system; КА - коронарные артерии; ЛКА - левая коронарная артерия

Простота и универсальность определения тяжести коронарного атеросклероза по CAD-RADS являются как преимуществом, так и недостатком, поскольку не учитывают чрезвычайно важный и значимый аспект атеросклероза – строение атеросклеротической бляшки, в особенности, маркеры её уязвимости. Это подтверждается исследованием U. Hoffmann и соавт., которые показали несоответствие частоты ССО со степенью выраженности коронарного атеросклероза по CAD-RADS [219].

Современные аппараты компьютерной томографии с высоким разрешением успешно позволяют оценить и аспекты уязвимости атеросклеротической бляшки, что важно в персонализации лечебного подхода [86].

В исследовании A. R. van Rosendael и соавт. был предложен новый подход к оценке персонифицированных сердечно-сосудистых рисков с использованием комплексной КТ-ангиографической шкалы, основанной на 17-сегментарной модели коронарного русла (по критериям AHA), данным о структуре, локализации, объёму и степени стенозирования.

Новая система оценки (шкала Leiden) по сравнению с CAD-RADS обеспечила более точный прогноз сердечно-сосудистых событий и, соответственно, реклассификацию рисков ССО.

Так, авторы отмечают, что этот подход может быть использован для адаптации лечения каждого пациента, например, путем интенсификации терапии для пациентов из группы высокого риска: достижение низкого целевого уровня холестерина и более строгий контроль артериального давления, а также, возможно, снижение интенсивности терапии для пациентов из группы низкого риска с целью снижения полипрагмазии и вероятности побочных эффектов препаратов [245].

Проведя анализ возможностей лучевой диагностики коронарного атеросклероза, мы в нашем исследовании постарались максимально полно использовать информацию, полученную в ходе оценки КИ и КТА. Более точное определение рисков ССО с учётом коронарного кальция, а также морфологическая оценка бляшки при проведении КТА позволяют оценивать

пациентов не только с позиции расчётного популяционного риска, но и с позиции структурных особенностей бляшек.

Как видно из представленного анализа данных литературы, вопросы амбулаторной неинвазивной диагностики коронарного атеросклероза, а также рисков развития ССО вызывают стабильно высокий интерес у специалистов. На сегодняшний день в амбулаторной практике наибольшее распространение получила компьютерная рентгеновская визуализация, как с контрастным усилением, так и без него как метод неинвазивной диагностики атеросклеротических изменений коронарных артерий.

У бессимптомных больных в большей степени рассматривается визуализация коронарного кальция, в то время как для симптомных больных более целесообразным считается применение КТА. Однако, отдельные группы пациентов, например, молодые с низким расчётным риском или, наоборот, пожилые не всегда вписываются в рамки имеющихся алгоритмов КТ-диагностики. Поэтому использование в качестве опоры для тактики ведения пациента только данных визуализации или расчётных рисков сердечно-сосудистых осложнений может приводить к ограниченному восприятию целостного образа патологии пациента.

Во избежание этого следует применять лабораторные модификаторы риска сердечно-сосудистых осложнений. В связи с этим одним из наиболее интересных и новых направлений лабораторной диагностики является исследование циркулирующих регуляторных микроРНК.

В этой области, как видно из обзора, практических данных накоплено недостаточно, и многие из них противоречивы.

Проведенный анализ актуальных вопросов неинвазивной амбулаторной диагностики показал целесообразность проведения исследования, в котором в качестве базиса выступали бы данные визуализации коронарного атеросклероза, а в качестве дополнительных модификаторов – микроРНК, при этом оценка этих двух составляющих будет производиться через призму классических расчётных рисков сердечно-сосудистых осложнений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн исследования

Данная работа по типу является одноцентровым исследованием серии случаев у пациентов с подозрением на коронарный атеросклероз, без клиники типичной стенокардии.

Работа осуществлялась в два этапа: профилирование и валидизация результатов исследования циркулирующих микроРНК, в рамках которой проводилась оценка ассоциаций уровней микроРНК с расчётными рисками сердечно-сосудистых катастроф, клинико-демографическими показателями и данными МСКТ.

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

На первом этапе проводился анализ уровней микроРНК в плазме крови малой выборки из 16 бессимптомных пациентов, участвовавших в клиническом исследовании Сеченовского университета, зарегистрированном на международной платформе clinicaltrials.gov (идентификационный номер NCT038558910).

Этой группе исследование КТА проводилось в качестве скринингового. Исходно планировалась группировка пациентов согласно степени риска сердечно-сосудистых осложнений по шкале SCORE, учитывая обновленные рекомендации ESC и министерства здравоохранения Российской Федерации, данные реклассифицировались согласно шкалам SCORE2 и SCORE2 OP.

Также использовались способы оценки риска сердечно-сосудистых осложнений по ACC/AHA, Framingham и калькулятору MESA. В качестве независимых переменных рассматривались также курение, пол, возраст, артериальное давление, уровни холестерина.

Кроме того, на первом этапе проводилась дифференцировка уязвимых или стабильных атеросклеротических бляшек [1].

Компьютерная томография проводилась на базе отделения лучевой диагностики №2 Университетской клинической больницы №1 Сеченовского Университета.

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

На втором этапе исследования условия набора пациентов и проведения КТ исследований были идентичными с первым этапом. Единственное отличие заключалось в том, что забор крови у пациентов проводился одномоментно с подготовкой к проведению ангиографии.

Для валидизации были отобраны микроРНК, показавшие значимые ассоциации с клинико-демографическими данными расчётных рисков сердечно-сосудистых осложнений.

Также были отобраны микроРНК, значения экспрессии которых обладали широким разбросом и в рамках выборки малого объема не могли быть включены в анализ на первом этапе. К ним относятся miR-21-5p, 145-5p, 29b-3p, 23a-3p, 181b-5p.

Кроме того, было решено ввести еще 9 микроРНК, ассоциированных с коронарным атеросклерозом, отобранных на основании анализа данных научных публикаций.

Также исследовались ассоциации микроРНК с отдельными независимыми клиническими, демографическими и лабораторными показателями.

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

Итоговый дизайн всего исследования представлен на Рисунке 1.

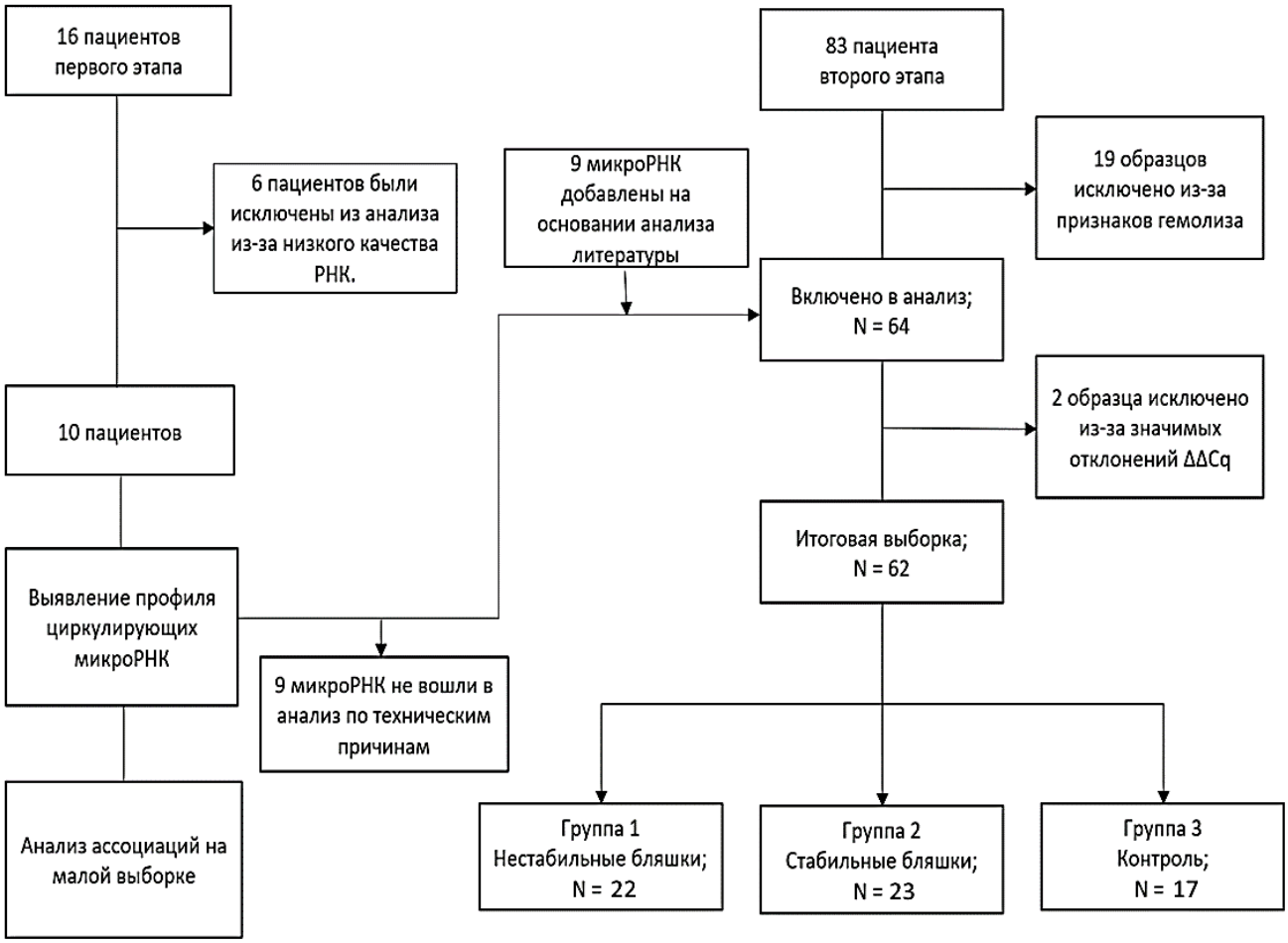


Рисунок 1 – Схематическое изображение дизайна исследования

2.2 Критерии соответствия

Критерии соответствия на 1 и 2 этапах идентичны.

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Возраст пациентов от 18 до 80 лет.

2. Пациенты, имеющие показания к КТА:

а) пациенты с атипичными болями за грудиной с низким или промежуточным риском ССО;

б) бессимптомные пациенты с высоким риском ССО.

3. Пациенты, отказавшиеся от проведения инвазивной диагностической селективной коронарографии.

4. Наличие подписанного информированного согласия на участие в клиническом исследовании.

Критерии невключения пациентов в исследование [1, 4, 250]:

1. Известная на момент включения в исследование ИБС или клиника типичной стенокардии.

2. Любые вмешательства на сердце в анамнезе (в том числе чрескожные коронарные вмешательства, радиочастотная абляция, оперированные врождённые пороки сердца).

3. Известный атеросклероз коронарных артерий, а также наличие атеросклероза других артериальных бассейнов.

4. Тяжёлая сердечная недостаточность (III–IV классы по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации NYHA).

5. Нарушения функции почек со снижением СКФ < 30 мл/мин/1,73м^2.

6. Беременность, кормление грудью.

7. Сахарный диабет.

8. Вес пациентов 120 кг и более (ограничение обусловлено спецификой томографа).

9. Наличие тяжелой соматической патологии, на момент исследования (в том числе онкологических заболеваний, системных заболеваний, воспалительных процессов).

10. Психические расстройства, не позволяющие принимать участие в исследовании.

11. Возраст менее 18 лет или более 80 лет.

В настоящее исследование не включались пациенты с сахарным диабетом (как 1, так и 2 типов), поскольку указанное заболевание оказывает существенное влияние на работу сердечно-сосудистой системы и, как следствие, на уровни циркулирующих микроРНК.

Кроме того, пациенты с сахарным диабетом исходно имеют очень высокий риск сердечно-сосудистых осложнений.

Критерии исключения пациентов из исследования [1, 4, 250]:

1. Высокий уровень гемолиза в образцах плазмы крови пациентов.

2. Значительный разброс значений экспрессии микроРНК в исследуемых образцах плазмы.

3. Нежелание пациента участвовать в исследовании.

2.3 Описание медицинского вмешательства

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

Пациенты приглашались в клиническое исследование, после чего осуществлялся забор из вены одной пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) до 10 мл крови с дальнейшей подготовкой к исследованию микроРНК.

Поскольку дизайн исследования не предполагал проспективного наблюдения, дальнейшее общение с пациентом по клиническим вопросам осуществлялось по телефону или в рамках регулярных визитов к лечащему врачу.

Риски сердечно-сосудистых осложнений по стандартным шкалам рассматривались стандартно в качестве низких, средних, высоких и очень высоких для шкал SCORE2, SCORE2 OP и Framingham согласно действующим европейским и российским клиническим рекомендациям, риски по ACC/AHA и MESA распределялись на низкие, пограничные, умеренные и высокие, согласно соответствующим рекомендациям.

Кроме того, в качестве отсечки использовался риск в 10% для всех шкал, кроме SCORE2 и SCORE2 OP.

Показатели, входящие в шкалы, которые используются в настоящем исследовании, сгруппированы в Таблице 2.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика шкал по используемым для оценки риска показателям

	SCORE2	Framingham	ACC/AHA	MESA
Пол	+	+	+	+
Курение	+	+	+	+
Возраст	+	+	+	+
Систолическое АД	+	+	+	+
Общий холестерин/ЛПВП	+	+	+	+
Раса	-	-	+	+
Сахарный диабет	-	-	+	+
Прием антигипертензивных препаратов	-	-	+	+
Прием липидснижаюших препаратов	-	-	-	+
Анамнез ССО	-	-	-	+
Коронарный кальциноз	-	-	-	+

В качестве независимых показателей в исследовании рассматривались: уровни в плазме крови общего холестерина, липопротеидов высокой, низкой и очень низкой плотности, триглицеридов, глюкозы натощак, креатинина, а также индекс массы тела (ИМТ), расчётная скорость клубочковой фильтрации (рСКФ) [1], приём основных кардиотропных препаратов (ингибиторов ангиотензин превращающего фермента (иАПФ), блокаторов рецепторов ангиотензина II (БРА), бета-адреноблокаторов (ББ), блокаторов кальциевых каналов (БКК), статинов, оральных антикоагулянтов, антиаритмических препаратов 1 и 3 классов, ацетилсалициловой кислоты [1].

Проведение компьютерной томографии коронарной ангиографии осуществлялось на компьютерном томографе Canon Aquilion ONE (Canon, Япония) с широким датчиком, обеспечивающим разрешающую способность в 640 срезов с усилением рентгенкотрастным неионогенным веществом йопромид-370, объём которого рассчитывался исходя из массы тела пациента (в среднем, 40-70 мл) согласно клиническим протоколам Сеченовского университета на момент выполнения исследований, а также на основе руководства Общества Сердечно-

сосудистой Компьютерной Томографии (Society of Cardiovascular Computed Tomography – SCCT) [15, 234]. Для обеспечения наиболее точной оценки состояния коронарного русла, согласно эксплуатационным характеристикам томографа, целевой пульс пациента должен был составлять до 80 ударов в минуту; в случае превышения этого порога до проведения исследования назначались пероральные (пропранолол) или внутривенные (эсмолол) бета-блокаторы в индивидуальной дозировке. Анализ рентгенологических изображений осуществлялся на основе проприетарного программного обеспечения Vitrea (Vital Images, Inc., США). Проведение оценки степени коронарного кальциноза с последующей контрастной компьютерной ангиографией проводились в один этап [15].

Разделение атеросклеротических бляшек на уязвимые и стабильные проводилось согласно стандартным критериям, которые используются как в Российской Федерации, так и признаны международным сообществом [16, 88].

К ним относятся:

- изрытость, шероховатость контура атеросклеротической бляшки;
- невысокая рентгеновская плотность бляшки (менее 30 единиц Хаунсфилда);
- наличие в структуре бляшки вкраплений микрокальцинатов;
- индекс ремоделирования сосуда более 1,1.

При отсутствии указанных выше признаков атеросклеротические бляшки идентифицировались как стабильные.

Получение свободной от тромбоцитов плазмы

Венозную кровь собирали в пробирки с ЭДТА К3 для последующего анализа уровней микроРНК в плазме. После этого проводили центрифугирование при комнатной температуре с ускорением 1500g в течение 15 минут. Затем отбирали 2/3 плазмы сверху (не касаясь осадка) и центрифугировали в течение 10 минут с ускорением 2300g. После этого отбирали около 3/4 плазмы сверху и снова центрифугировали с ускорением 2300g в течение 10 минут. 3/4 оставшейся плазмы собирали в пробирки типа Эппендорф и замораживали в камерах при

температуре -20°С. После этого осуществлялась транспортировка образцов в специальных контейнерах в лабораторию для последующего анализа

Изоляция микроРНК

Образцы бестромбоцитарной плазмы размораживались и при использовании набора лабораторного оборудования и реагентов miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Нидерланды) в соответствии с протоколом производителя производилось выделение микроРНК [190]. Концентрацию выделенных микроРНК определяли с применением спектрофотометра NanoDrop ™ ND-2000 (ThermoFisher Scientific, США).

Синтез комплементарной ДНК и количественное определение уровней микроРНК

Обратная транскрипция с синтезом комплементарных ДНК (кДНК) в количестве 250 нг для каждого образца проводилась с использованием реактивов и лабораторного оборудования miScript II RT Kit с буфером miScript HiSpec (Qiagen, Нидерланды), строго в соответствии с протоколом производителя. Оценка уровней микроРНК проводилась с использованием панели со зрелыми микроРНК-специфичными праймерами miScript miRNA PCR Array из специального набора, ориентированного на систему воспалительных реакций (Human Inflammatory Response & Autoimmunity MIHS-105Z) (Qiagen, Нидерланды). Данный специфический набор имеет фиксированные на панели праймеры 84 микроРНК, список которых указан в Таблице 3.

Дальнейшее количественное исследование уровней циркулирующих микроРНК осуществлялась путём полимеразной цепной реакции реального времени (ПЦР-РВ). Измерения пороговых циклов (Cq) выполнялись на одном техническом репликате (то есть тест, выполняемый на одном и том же образце несколько раз) для каждого микроРНК праймера. Учитывая специфику исследований микроРНК, проводилась нормализация данных для каждой микроРНК-мишени. Для этой цели использовалось значение Cq клеточной cel-miR-39-3p, которая в фиксированном количестве добавлялась в каждый образец на момент выделения микроРНК. Для каждой проанализированной микроРНК ее

относительный уровень экспрессии в плазме рассчитывали, как $2^{-\Delta Cq\ (\text{целевая микроРНК - hsa-miR-39-3p})}$.

Таблица 3 – Перечень микроРНК, уровень которых оценивается в наборе miScript miRNA PCR Array Inflammatory Response & Autoimmunity MIHS-105Z [1]

N	микроРНК	N	микроРНК	N	микроРНК
1	hsa-let-7a-5p	29	hsa-miR-19a-3p	57	hsa-miR-374a-5p
2	hsa-let-7b-5p	30	hsa-miR-19b-3p	58	hsa-miR-381-3p
3	hsa-let-7c-5p	31	hsa-miR-202-3p	59	hsa-miR-410-3p
4	hsa-let-7d-5p	32	hsa-miR-20a-5p	60	hsa-miR-424-5p
5	hsa-let-7e-5p	33	hsa-miR-20b-5p	61	hsa-miR-449a
6	hsa-let-7f-5p	34	hsa-miR-21-5p	62	hsa-miR-449b-5p
7	hsa-let-7g-5p	35	hsa-miR-211-5p	63	hsa-miR-454-3p
8	hsa-let-7i-5p	36	hsa-miR-23a-3p	64	hsa-miR-497-5p
9	hsa-miR-101-3p	37	hsa-miR-23b-3p	65	hsa-miR-511-5p
10	hsa-miR-106b-5p	38	hsa-miR-29a-3p	66	hsa-miR-513b-5p
11	hsa-miR-125a-5p	39	hsa-miR-29b-3p	67	hsa-miR-519c-3p
12	hsa-miR-125b-5p	40	hsa-miR-29c-3p	68	hsa-miR-519d-3p
13	hsa-miR-128-3p	41	hsa-miR-300	69	hsa-miR-520d-3p
14	hsa-miR-130a-3p	42	hsa-miR-301a-3p	70	hsa-miR-520e
15	hsa-miR-130b-3p	43	hsa-miR-301b-3p	71	hsa-miR-524-5p
16	hsa-miR-1324	44	hsa-miR-302a-3p	72	hsa-miR-543
17	hsa-miR-144-3p	45	hsa-miR-302b-3p	73	hsa-miR-545-3p
18	hsa-miR-145-5p	46	hsa-miR-302c-3p	74	hsa-miR-548c-3p
19	hsa-miR-15a-5p	47	hsa-miR-30a-5p	75	hsa-miR-548d-3p
20	hsa-miR-15b-5p	48	hsa-miR-30b-5p	76	hsa-miR-548e-3p
21	hsa-miR-16-5p	49	hsa-miR-30c-5p	77	hsa-miR-590-5p
22	hsa-miR-17-5p	50	hsa-miR-30d-5p	78	hsa-miR-607
23	hsa-miR-181a-5p	51	hsa-miR-30e-5p	79	hsa-miR-655-3p
24	hsa-miR-181b-5p	52	hsa-miR-340-5p	80	hsa-miR-656-3p
25	hsa-miR-181c-5p	53	hsa-miR-34a-5p	81	hsa-miR-875-3p
26	hsa-miR-181d-5p	54	hsa-miR-34c-5p	82	hsa-miR-9-5p
27	hsa-miR-186-5p	55	hsa-miR-372-3p	83	hsa-miR-93-5p
28	hsa-miR-195-5p	56	hsa-miR-373-3p	84	hsa-miR-98-5p

На втором этапе при описании атеросклероза КА использовалась шкала CAD-RADS, оценивался КИ, а также прицельная характеристика стенозов с учётом их уязвимости.

В процедурном кабинете перед постановкой внутривенного катетера забиралась венозная кровь, как и на первом этапе исследования. Пробирки центрифугировались до выделения бестромбоцитарной плазмы. В анализ включались только образцы без визуально наблюдаемого гемолиза и хилёза.

Метод ОТ-ПЦР РВ подразумевал строгий контроль уровня гемолиза, поэтому дополнительно проводились измерения поглощения светового излучения на длине волны, соответствующей свободному гемоглобину ($\lambda = 414$ нм).

После разморозки при комнатной температуре и дополнительного центрифугирования в течение 30 минут для каждого образца отбирались по две пробирки с супернатантом объёмом до 10 мкл.

Затем производилась серия из трёх спектрофотометрических измерений (для каждой пробирки) на аппарате *Thermo Scientific NanoDrop™ 2000* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, США) с оценкой разницы поглощения излучений 414 нм и 385 нм согласно стандартной формуле: $HS = \Delta(A414\text{-}A385) + 0{,}16 \times A385$. Длина волны 385 нм, относительно которой осуществляется нормирование значений разницы, является базовой линией сигнала, где не происходит пика гемолиза. При получении значений, превышающих порог $HS \geq 0{,}25$, образцы исключались из исследования [250].

Нормализацию данных qPCR для каждой исследуемой микроРНК проводили с использованием значения Cq hsa-miR-16-5p. Для каждой анализируемой микроРНК ее относительный уровень экспрессии в плазме был рассчитан как ΔΔCq (исследуемая микроРНК - hsa-miR-16-5p). Если значение Cq анализируемой микроРНК не было обнаружено в течение 45 циклов qPCR, значение Cq принималось равным 45. Влияние гемолиза эритроцитов на циркулирующие микроРНК оценивали по обнаруженному qPCR соотношению гемолиз-ассоциированной miR-451a, содержащейся в эритроцитах, и miR-23a-3p,

которая не зависит от гемолиза. Разница между значениями Cq этих микроРНК рассчитывалась по формуле (1) [250]:

$$\Delta Cq\text{miR-23a-3p - miR-451a} = Cq(\text{hsa-miR-23a-3p}) - Cq(\text{hsa-miR-451a}) \quad (1)$$

Из-за глобальных логистических изменений часть специализированных наборов оборудования, необходимых для выделения микроРНК в реакции ОТ-ПЦР РВ, не смогла быть доставлена к началу проведения основного этапа молекулярной диагностики. Поэтому исследования miR-211-5p, 29a-3p, 30a-5p, 30e-5p, 410-3p, 449a, 656-3p, 9-5p и let-7b-5p не проводились.

Отдельно стоит отметить вопрос выбора микроРНК для анализа. На первом этапе предполагалось оценить широкий профиль микроРНК, ассоциированных с воспалением при применении уже готового набора векторов на чипе, после чего валидировать результаты. Однако в рамках «провоспалительного» чипа отсутствовал ряд микроРНК, о которых в литературе нет достоверных данных об их участии или неучастии в различных звеньях патогенеза коронарного атеросклероза и инфаркта миокарда.

Поэтому было отобрано эквивалентное количество микроРНК, которые исследовались в патогенезе ишемической болезни сердца, её осложнений и липидного обмена, поскольку большая часть из них имелась в наличии в лаборатории.

К ним относятся miR-143-3p, -223-3p, -146a-5p, 92a-3p и miR-126, представленная двумя разными молекулярными формами -3p и 5p, что не учитывалось многими исследователями, особенно на ранних этапах.

Кроме этого, к анализу были добавлены miR-205-5p, которая практически не исследована в рамках ишемической болезни сердца и имеет лишь слабую потенциальную взаимосвязь с уровнем коронарного кальциноза, и miR-150-5p, которая тесно ассоциирована с воспалением, но отсутствовала в наборе первого этапа.

Сводная таблица, описывающая источники выбора микроРНК приведена ниже (Таблица 4).

Таблица 4 – Перечень микроРНК, дополнительно включенных на этапе валидизации результатов

микроРНК	ИБС	ОКС	Бляшки	Воспаление	Липиды
126-3	[72, 107, 195, 249]	[32, 220]	[65, 118, 224, 240, 262]	[62, 224]	[175, 218]
126-5	[209]		[262]		[218]
143	[69]	[249]	[91]	[91]	[232]
223	[195]	[125, 218, 220]	[39, 71, 152]	[218]	[118, 171, 175, 218, 226]
146a	[196]	[96, 190]	[190, 224]	[118, 219]	[218]
150	[37]	[105, 125]		[114, 151, 226]	[114]
451a	[212]	[133]	[69, 70]	[172, 241]	[51]
92a	[72, 192]	[68, 125]	[152, 224, 240, 262]	[118, 240]	[44, 175, 218]

2.4 Статистическая обработка данных

В первой части исследования полученные количественные характеристики являются средними значениями со стандартным отклонением. Учитывая небольшой объём выборки, сравнительная оценка уровней исследуемых циркулирующих микроРНК производилась по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты с $p < 0,05$ оценивались как статистически значимые.

Анализ корреляций проводился методом ранговой корреляции Спирмена. Основным программным обеспечением, с помощью которого проводились расчёты, было приложение *IBM SPSS Statistics* версии 24 (IBM Inc., США) [1].

На втором этапе при исследовании ассоциаций рисков ССО с данными КТ полученные количественные данные представляют собой средние значения (медианы) со стандартным отклонением.

Оценка площади под кривой (AUC) в рамках ROC-анализа использовалась с целью выявления значимости изменений уровней микроРНК и шкал для прогноза. Статистически значимыми считали результаты с $p < 0,05$.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета компьютерного программного обеспечения *IBM SPSS Statistics* версии 25 (IBM Inc., США) [15, 250].

Статистический анализ особенностей профиля циркулирующих микроРНК в итоговой выборке проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Software Prism (версия 9.0.0 (86)) и набора библиотек Pandas на программном коде Python (версия 3.9.4). Полная база данных была обработана и подготовлена для анализа несколькими приложениями.

Анализ соответствия данных нормальному распределению производился на основе критерия Андерсона-Дарлинга. Учитывая имеющийся объём выборки, а также специфику исследования микроРНК, все полученные количественные данные имели распределение отличное от нормального.

Дополнительно использовался программный метод очистки генеральной совокупности от выбросов ROUT (Q=1%) [250].

Числовые значения исходных характеристик пациентов и уровней экспрессии микроРНК были проанализированы с использованием программного комплекса ANOVA для непрерывных переменных с нормальным распределением и U-критерия Манна-Уитни для парного сравнения. Для нескольких групп ненормально распределенных числовых переменных использован критерий Крускала-Уоллиса, а для качественных переменных – критерий Хи-квадрат. Для выявления предикторов развития бляшки и ее стабильности использовалась простая логистическая регрессия с поправкой на возраст и пол [250]. Для выявления предикторов различных значений риска сердечно-сосудистых осложнений и для различных клинических и лабораторных параметров использовалась простая линейная регрессия с поправкой на возраст и пол или регрессия Деминга (поскольку данный метод учитывает возможные погрешности как независимых, так и зависимой переменных). При необходимости мы использовали коррекцию множественных тестов Холма-Сидака. Значение $p \leq 0,05$ считалось значимым для всех статистических анализов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объем выборки пациентов за оба этапа исследования составил 99 пациентов. Набор пациентов и анализ данных осуществлялись последовательно.

3.1 Результаты первого этапа исследования

В исследование изначально вошло 16 пациентов с коронарным атеросклерозом. Из-за признаков гемолиза в образцах крови из исходного числа пришлось исключить 6 пациентов. Итоговый объем выборки, таким образом, составил 10 пациентов. Характеристики выборки указаны в Таблице 5.

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

Как уже упоминалось в разделе «Материалы и методы», микрочип miScript miRNA PCR Array Inflammatory Response & Autoimmunity позволял одномоментно определять уровни 84 циркулирующих микроРНК. Учитывая небольшую выборку пациентов на первом этапе исследования, было принято решение использовать уровни только тех микроРНК, которые выделялись из плазмы более чем у 60% пациентов.

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

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

риска ССО. Кроме того, уже без группового распределения, исследовались ассоциации уровней циркулирующих miR и клинических параметров пациентов.

Таблица 5 – Клинические характеристики пациентов, разделённых по наличию признаков уязвимости атеросклеротической бляшки по данным КТ

Параметры	Больные с нестабильными атеросклеротическим и бляшками (N=5)	Больные со стабильными атеросклеротическим и бляшками (N=5)	P-value
Возраст, годы	69,4 ± 10,5	63,4 ± 7,4	0,33
Женский пол, %	40	40	1,00
Курящие, %	40	40	1,00
ИМТ, кг/м^2	27,99 ± 2,45	26,73 ± 3,86	0,55
Креатинин, мкмоль/л	82,12 ± 5,45	95,70 ± 14,48	0,08
рСКФ по CKD-EPI, мл/мин/1,73 м^3	71,74 ± 16,79	62,05 ± 7,09	0,27
Общий холестерин, ммоль/л	5,86 ± 1,06	5,29 ± 1,04	0,42
Триглицериды, ммоль/л	1,60 ± 0,93	1,20 ± 0,43	0,41
ЛПНП, ммоль/л	3,31 ± 1,29	3,25 ± 0,82	0,93
ЛПВП, ммоль/л	1,37 ± 0,18	1,62 ± 0,61	0,40
Кальциевый индекс, AU	35,6	196,6	0,08
Шкала CadRads, баллы	2,0	2,2	0,35
Шкала ACC/AHA, баллы	22,2	11,2	0,13
Шкала Framingham, баллы	15,3	7,6	0,12
Шкала SCORE, баллы	7,0	5,6	0,71
Шкала MESA, баллы	9,8	15,04	0,23
Примечание: ИМТ – индекс массы тела; рСКФ – скорость клубочковой фильтрации; ЛПНП – липопротеины низкой плотности. ЛПВН – липопротеины высокой плотности.			

3.1.1 Ассоциация уровней микроРНК с типом атеросклеротических бляшек

Клинические характеристики пациентов с уязвимыми и стабильными бляшками отражены выше в Таблице 5. Исследуемые группы не имели статистически значимых различий по всем клиническим и демографическим показателям. В то же время обращает на себя внимание наличие разницы уровней коронарного кальциноза, не достигшей статистической значимости. Дополнительно стоит отметить, что по шкалам SCORE2, Framingham и ACC/AHA риск сосудистых осложнений в группе уязвимых бляшек оценивался более значимым, чем по шкале MESA, что объясняется более низким уровнем кальциноза уязвимых бляшек. Тем не менее, между группами разницы в расчётных рисках ССО не отмечалось.

При сравнении уровней циркулирующих микроРНК в исследуемых группах пациентов значимое (p = 0,032) различие отмечалось для let-7b-5p. Различие было вызвано тем, что данная микроРНК обнаруживалась только в плазме крови пациентов с уязвимыми бляшками и отсутствовала в группе стабильных (Рисунок 2).

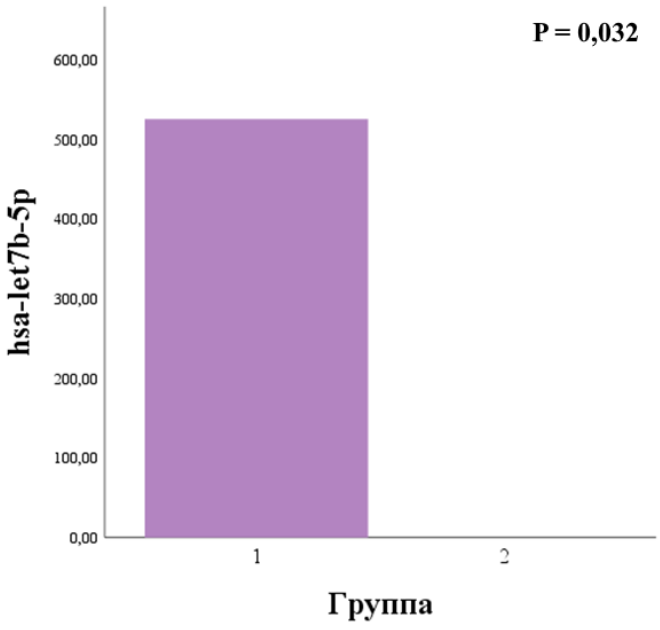


Рисунок 2 – Относительные уровни let-7b-5p в плазме крови пациентов с уязвимыми (группа 1) и стабильными (группа 2) бляшками

Другие уровни циркулирующих микроРНК в исследуемых группах значимо не отличались (Таблица 6).

Таблица 6 – Различия относительных уровней 28 микроРНК из микрочипа *miScript miRNA PCR Array Inflammatory Response & Autoimmunity* в группах пациентов с уязвимыми и стабильными атеросклеротическими бляшками

микроРНК	N	Среднее значение уровня	Среднекв. отклонение (SD)	P-value
let-7b-5p	10	195,59	616,94	0,032
let-7e-5p	10	11,611000	36,6574774	0,841
let-7g-5p	10	26066,86	74221,48	0,841
let-7i-5p	10	0,211170	0,67	1,000
miR-125b	10	1358,27	4270,69	0,690
miR-15a	10	26026,98	61762,15	0,548
miR-16	10	0,47	0,82	0,841
miR-181b	10	0,15	0,25	0,690
miR-181c	10	882,50	2125,07	0,841
miR-181d	10	62945,99	198917,59	0,222
miR-186	10	116606,08	368740,80	0,310
miR-195	10	0,19	0,42	0,690
miR-19b	10	0,26	0,36	0,690
miR-202	10	1,19	1,25	0,690
miR-211	10	0,23	0,31	0,310
miR-29a	10	9,73	9,83	0,690
miR-302c	10	1151414,83	2490269,71	1,000
miR-30a	10	0,73	0,67	0,548
miR-30b	10	2752,53	8700,64	0,548
miR-30c	10	0,22	0,27	0,690
miR-30d	10	0,68	0,68	0,548
miR-30e	10	0,72	0,65	1,000
miR-410	10	1199501.96	3687837,66	0,690
miR-424	10	99,89	315,66	0,841
miR-449a	10	0,67	1,24	0,222
miR-524	10	9,86	30,87	0,548
miR-656	10	99,62	91,15	1,000
miR-9	10	0,17	0.31	0,841

3.1.2 Ассоциация уровней микроРНК с показателями риска сердечно-сосудистых катастроф

Показатели риска ССО формируются исходя из возраста, пола, уровней артериального давления, холестерина и ряда других факторов. Согласно распределению пациентов на стандартные для каждой шкалы группы, а также на группы с расчётными показателями более или менее 10% была произведена соответствующая оценка уровней циркулирующих микроРНК, значимые отличия которых отражены на Рисунках 3, 4.

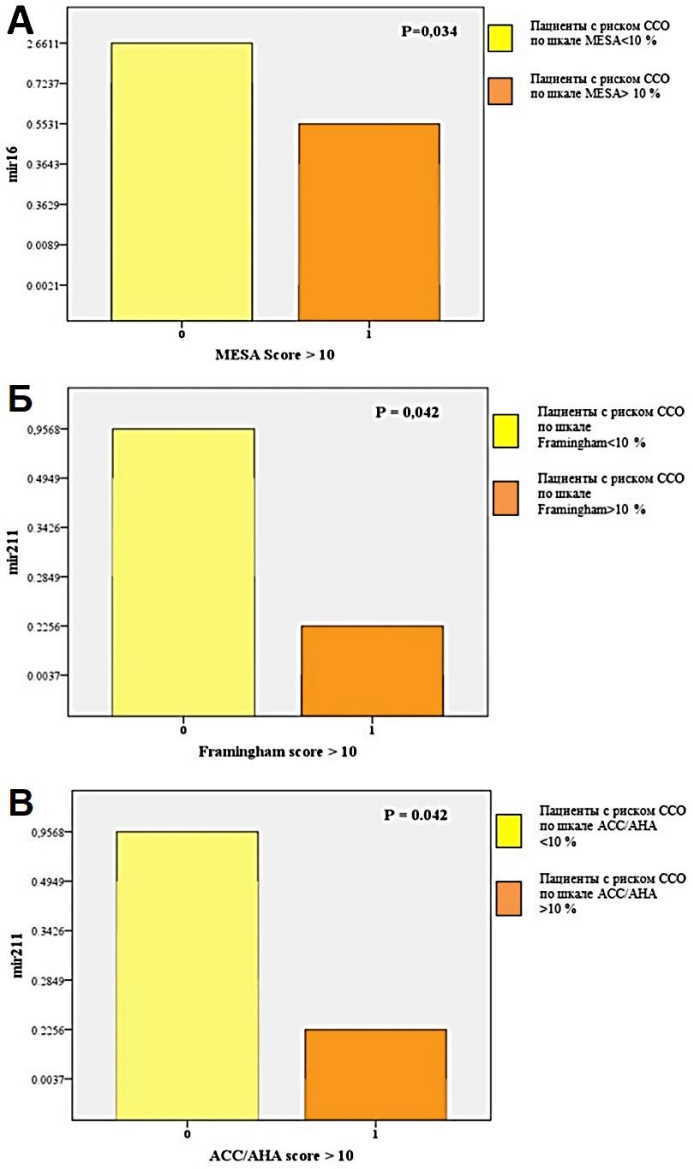


Рисунок 3 – Значимые различия в уровнях miR-16-5p (А) и -211-5p (Б, В) у пациентов с расчётными 10-летними рисками ССО по шкалам MESA, Framingham и ACC/AHA с отсечкой в 10%

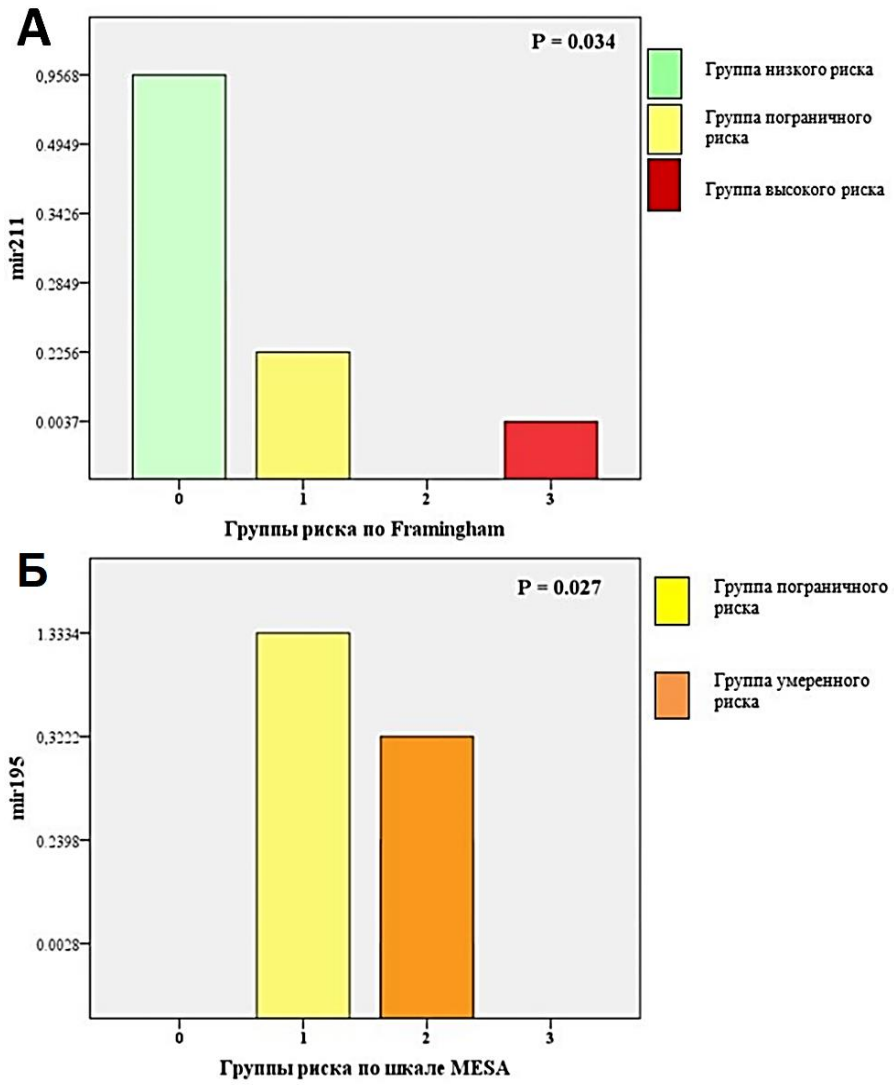


Рисунок 4 – Распределение уровней микроРНК по группам риска:
А – уровни miR-211-5p по группам Framingham;
Б – уровни miR-195-5p по группам MESA

Так, при использовании шкалы MESA и разделении по группам риска или по границе 10%, для пациентов с более низким риском отмечалось повышение относительных уровней miR-16-5p и -195-5p.

Для остальных шкал, в которых отсутствует в качестве модификатора значение кальциевого индекса (КИ), разница ($p < 0,05$) отмечалась только для циркулирующей miR-211-5p.

В подгруппах пациентов с более высоким риском сердечно-сосудистых осложнений отмечалось снижение этой микроРНК, причём для шкалы Framingham отмечалось проградиентное снижение по мере роста риска [1].

3.1.3 Ассоциация уровней микроРНК с клинико-демографическими характеристиками пациентов

Анализ ассоциаций с клинико-демографическими показателями пациентов проводился без распределения по группам ввиду маленькой выборки. Тем не менее, ряд циркулирующих микроРНК продемонстрировал значимые взаимосвязи.

Так, уровни циркулирующих miR-16-5p показали значимую корреляцию с индексом массы тела пациента ($p = 0,034$). С индексом массы тела также положительно коррелирует уровень miR-30a-5p ($p = 0,029$).

Наибольшее количество положительных корреляций у исследуемых микроРНК было с уровнем липопротеидов низкой плотности, статистическую значимость показали уровни miR-29a-3p, -30a-5p, -30e-5p и let-7b-5p. Последняя микроРНК также имела положительную корреляцию с уровнем креатинина плазмы крови.

Уровни циркулирующей в плазме miR-195-5p обладали значимой отрицательной корреляцией с индексом массы тела ($p = 0,003$) и положительной с уровнем липопротеидов высокой плотности – ЛПВП ($p = 0,005$).

Положительная корреляция с женским полом регистрировалась для miR-410-3p ($p = 0,046$), также эта микроРНК отрицательно коррелировала со статусом курения ($p = 0,046$).

Интересно, что уровни miR-211-5p, сниженные в группах более высокого расчётного риска сердечно-сосудистых осложнений, имели положительную корреляцию с возрастом пациентов ($p = 0,021$).

Положительная корреляция с возрастом выявлена и для miR-9-5p, уровень которой также имел положительную корреляцию с уровнем общего холестерина [1].

Данные резюмированы в Таблице 7.

Таблица 7 – Корреляции между уровнями циркулирующих микроРНК и клинико-демографическими показателями пациентов

микроРНК	ИМТ	Креатинин	ОХ	ЛПНП	ЛПВП	Возраст	Курение	Женский пол
miR-9	p>0,05	p>0,05	**p=0,016**	p>0,05	p>0,05	**p=0,001**	p>0,05	p>0,05
miR-16	**p=0,034**	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
miR-195	**p=0,003**	p>0,05	p>0,05	p>0,05	**p=0,005**	p>0,05	p>0,05	p>0,05
miR-211	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	**p=0,021**	p>0,05	p>0,05
miR-29a	p>0,05	p>0,05	p>0,05	**p=0,029**	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
miR-30a	**p=0,029**	p>0,05	p>0,05	**p=0,029**	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
miR-30e	p>0,05	p>0,05	p>0,05	**p=0,029**	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
miR-410	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	**p=0,046**	**p=0,046**
miR-656	p>0,05	**p=0,038**	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
let-7b	p>0,05	**p>0,05**	p>0,05	**p>0,05**	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Примечание: ИМТ – индекс массы тела, кг/м^2; ОХ – общий холестерин, ммоль/л; ЛПНП – липопротеиды низкой плотности, ммоль/л; ЛПВП – липопротеиды высокой плотности, ммоль/л. Салатовым цветом обозначены положительные корреляции, голубым – отрицательные.

3.2 Результаты второго этапа исследования

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

3.2.1 Анализ профиля циркулирующих микроРНК в итоговой выборке

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

Характеристики пациентов приведены в Таблицах 8, 9.

Таблица 8 – Количественные характеристики пациентов

Параметр	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p-value
Возраст	62,18	67,09	65,94	0,217
ИМТ, кг/м^2	30,04	27,69	28,36	0,152
Кальциевый индекс, AU	45,50	336,78	0,00	**0,003**
Глюкоза, ммоль/л	5,81	5,16	5,18	**0,007**
Креатинин, мкмоль/л	88,42	87,73	86,46	0,925
СКФ $_{(CRD-EPI),}$ мл/мин/1,73 м^2	69,43	64,90	67,14	0,609
Холестерин, ммоль/л	5,94	5,34	5,73	0,287
Триглицериды, ммоль/л	1,92	1,38	1,39	**0,030**
ЛПНП, ммоль/л	3,78	3,33	3,61	0,424
ЛПВП, ммоль/л	1,33	1,42	1,56	0,162
SCORE2 (+ОР)	3,84	3,93	4,32	0,765
ATP III	9,77	10,16	8,14	0,622
ACC/AHA	12,02	17,04	17,38	0,333
MESA	9,26	14,52	3,62	**<0,001**

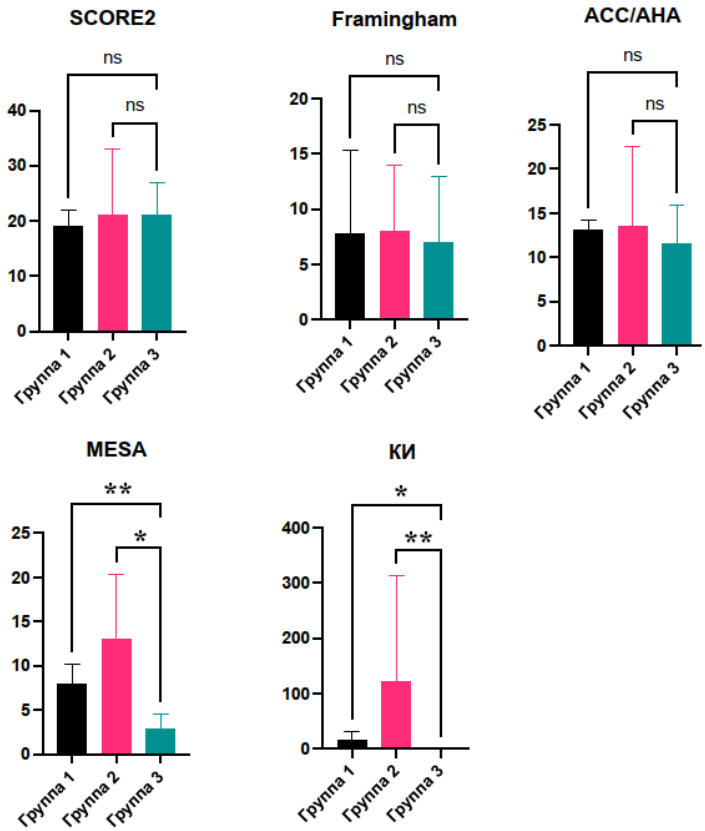
Таблица 9 – Качественные характеристики пациентов

Параметр, %	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p-value
Женский пол	59,09	82,61	76,47	0,192
Атипичная стенокардия	45,45	34,78	0,00	**0,006**
Артериальная гипертензия	95,45	82,61	88,24	0,395
Артериальная гипертензия 3 степени	50,00	43,48	41,18	0,842
Положительный стресс-тест	40,91	60,87	23,53	0,060
ФВ > 50%	90,91	95,65	88,24	0,679
Пароксизмальная форма фибрилляции предсердий	9,09	13,04	41,18	**0,027**
Курящие	18,18	13,04	5,88	0,524
Принимаемые группы препаратов				
Статины	36,36	73,91	41,18	**0,025**
иАПФ	31,82	34,78	23,53	0,739
БРА	36,36	52,17	29,41	0,312
Бета-блокаторы	72,73	52,17	47,06	0,211
БКК	36,36	39,13	11,76	0,137
НОАК	13,64	4,35	35,29	**0,029**
АСК	31,82	47,83	35,29	0,514

В рамках этой части исследования определялись уровни 15 циркулирующих микроРНК: miR-21-5p, -23a-3p, -29b-3p, -92a-3p, -126-3p, -126-5p, -143-3p, -145-5p, -146a-5p, -150-5p, -181b-5p, -195-5p, -205-5p и -451a [190]. Особенности выбора микроРНК отражены в разделе «Материалы и методы».

В группах пациентов со стабильными и уязвимыми бляшками не регистрировалось значимых различий по полу и возрасту, значениям расчётных рисков сосудистых осложнений (SCORE2(+OP), Framingham (ATP III), ACC/AHA), индексу массы тела, уровням креатинина, холестерина, липопротеидов высокой, низкой и очень низкой плотности, а также СКФ [189].

В группе контроля отсутствовали пациенты с атипичной стенокардией, при этом в ней отмечалось значимое количество пациентов с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий. Между группами закономерно наблюдалась разница степени коронарного кальциноза (Рисунок 5).



Тест Крускалла-Уоллиса с поправкой Данна для попарного сравнения

Рисунок 5 – Сравнение значений риска ССО, определённого согласно шкалам SCORE2(+OP), Framingham (ATPIII), ACC/AHA, MESA и по значениям КИ: Группа 1 – уязвимые бляшки, Группа 2 – стабильные бляшки, Группа 3 – контроль; КИ – кальциевый индекс; ns – $p > 0,05$; * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$

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

3.2.2 Ассоциация уровней микроРНК с типом атеросклеротических бляшек

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

На Рисунке 6 представлен непараметрический тест сравнения множественных групп Крускалла-Уоллиса в связи с распределением данных, отличных от нормального. Попарное сравнение выполнено с использованием теста Манна-Уитни. Данные экспрессии представлены в виде среднее ± стандартное отклонение. Уровень $p < 0,05$ считался статистически значимым.

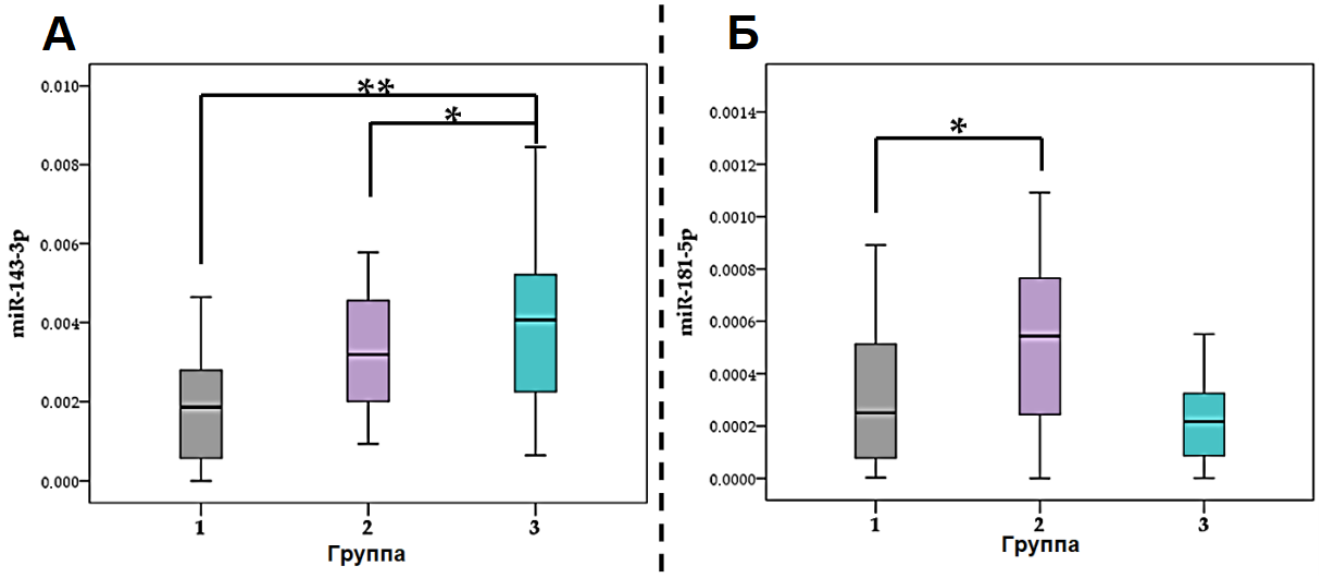


Рисунок 6 – Результаты сравнения значений экспрессии микроРНК у пациентов с различными характеристиками атеросклеротических бляшек:
А * – p-value = 0,0457, ** – p-value = 0,0046; Б * – p-value = 0,0179
1 – группа пациентов с уязвимыми бляшками; 2 – группа пациентов со стабильными бляшками; 3 – контрольная группа

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

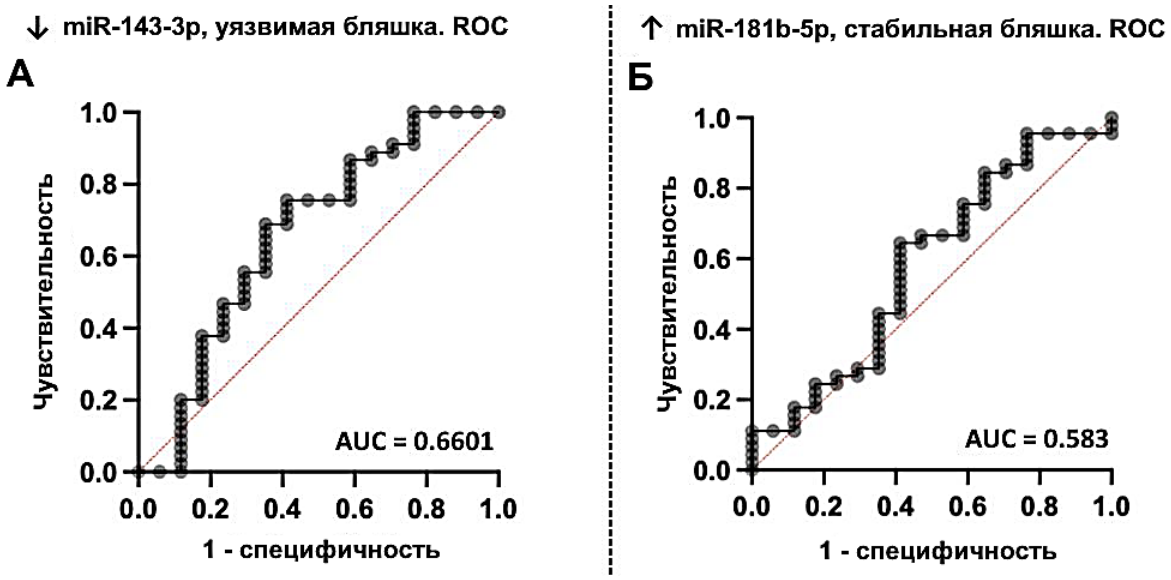


Рисунок 7 – Результаты анализа чувствительности и специфичности снижения относительных уровней циркулирующей miR-143-3p в плазме крови в качестве маркера уязвимости атеросклеротической бляшки и повышения miR-181b-5p в качестве маркера стабильности атеросклеротической бляшки. ROC-кривые

Для оценки возможной связи показателей экспрессии выбранных микроРНК с развитием атеросклеротического поражения и стабильность бляшки был использован метод простой логистической регрессии.

Несмотря на отсутствие статистически значимых отличий, вызванным малым объемом выборки пациентов, обращает на себя внимание то, что более высокие значения циркулирующей miR 126-5p в полтора раза чаще выявлялись в кумулятивной группе пациентов с атеросклерозом, чем в контрольной, а также повышенные уровни в плазме крови miR 92a-3p в 2,5 раза чаще отмечались в группе пациентов с уязвимыми бляшками [250].

3.2.3 Ассоциация уровней микроРНК с расчётными значениями риска сердечно-сосудистых катастроф

При оценке различий уровней микроРНК у пациентов, имеющих разные риски по наиболее популярным популяционным системам оценки, для SCORE2 и Framingham не было получено достоверных отличий.

При оценке по ACC/AHA получены значимые ($p < 0,05$) отличия уровней hsa-miR-21-5p, 92a-3p, 126-3p, 146a-5p, 150-5p, 181b-5p для пациентов с риском >7,5% и > 10%. Диагностически значимым считался результат $p < 0,05$, который выделен зеленым цветом. (Таблица 10).

Таблица 10 – Ассоциации уровней микроРНК с риском сердечно-сосудистых осложнений по ACC/AHA

ACC/AHA	ACC/AHA > 10%		ACC/AHA > 7,5%	
p-value, adj.p-value	p-value	adj. p-value	p-value	adj. p-value
miRNA 126-5p	**0,003**	**0,0412**	0,110	0,4773
miRNA 21-5p	**0,014**	0,1453	**0,024**	0,3054
miRNA 146a-5p	**0,019**	0,1746	**0,041**	0,3949
miRNA 92a-3p	**0,013**	0,1453	0,094	0,4773
miRNA 150-5p	**< 0,001**	**0,0149**	**0,025**	0,3054
miRNA 23a-3p	**0,005**	0,0631	0,110	0,4773
miRNA 181b-5p	**0,023**	0,1889	0,121	0,4773

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

коронарного кальция уровни данной микроРНК также были выше (p = 0,039). У пациентов с высоким (100 + AU) уровнем кальциевого индекса (КИ) отмечалось значимое (p = 0,036) повышение уровней циркулирующей miR-181b-5p.

Анализ линейных взаимоотношений показал значимую (p = 0,0164) связь уровней miR-145-5p с расчетным риском по ACC/AHA, а также связь (p = 0,0484) уровней miR-126-3p со значениями КИ (Рисунки 8, 9).

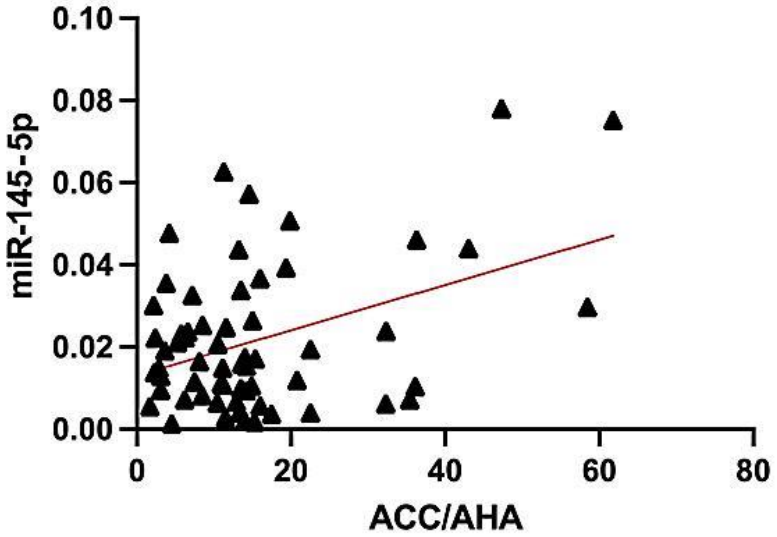


Рисунок 8 – Линейные взаимоотношения уровней miR-145-5p у пациентов с различными значениями сердечно-сосудистых рисков по ACC/AHA

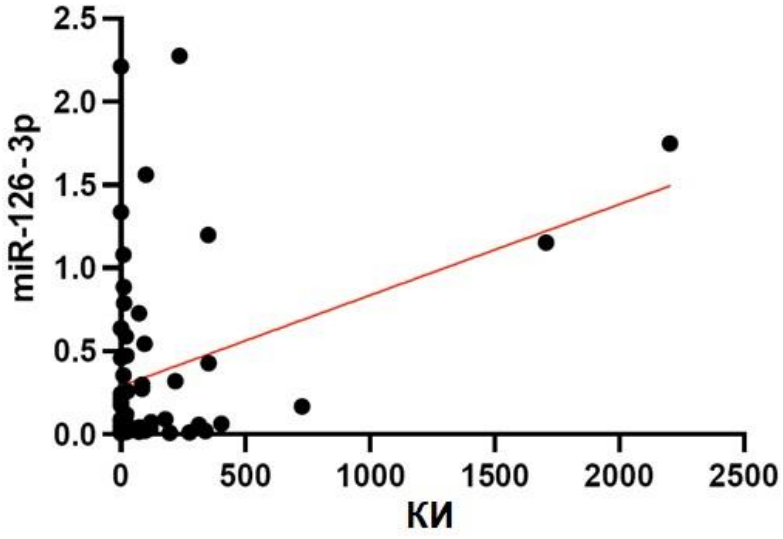
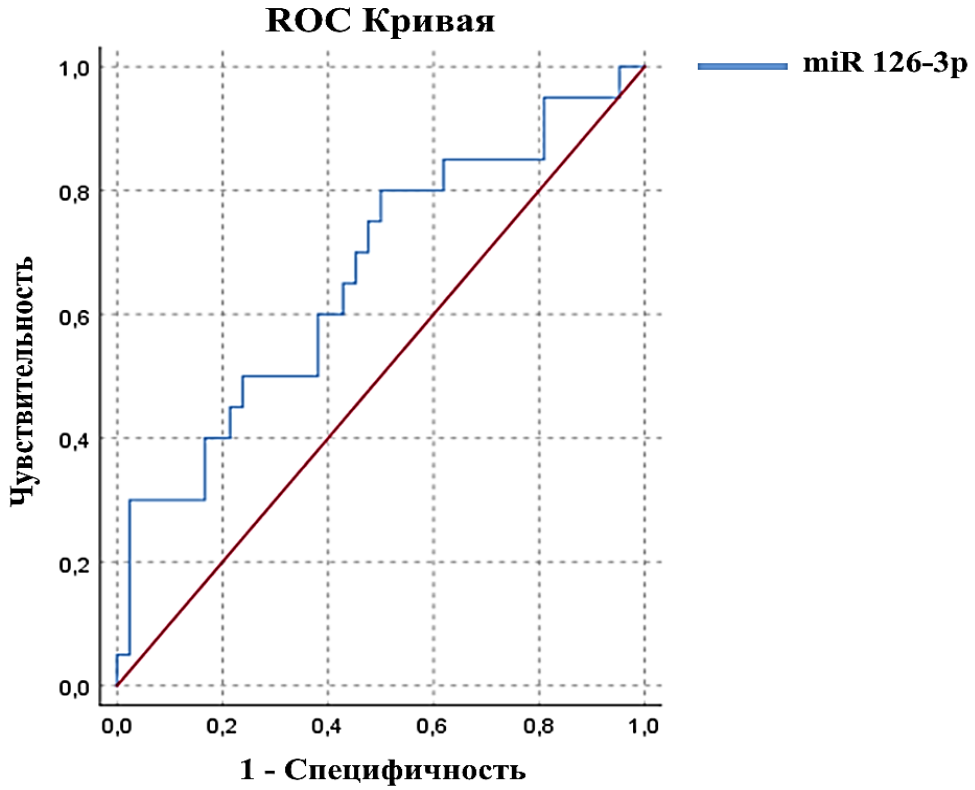


Рисунок 9 – Линейные взаимоотношения уровней miR-126-3p у пациентов с различными значениями коронарного кальциноза

Для остальных шкал линейной связи с уровнями циркулирующих микроРНК выявлено не было. Учитывая ассоциации с уровнем КИ, miR-126-3p продемонстрировала потенциальную способность выявления значимых (>70%) стенозов, согласно данным КТ (Рисунок 10).



микроРНК	AUC	SD	P	95% ДИ	
hsa-miR-126-3p	0,664	0,076	0,030	0,516	0,813

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

3.2.4 Ассоциация уровней микроРНК с различными клинико-демографическими характеристиками

Значимые ассоциации, наблюдаемые для анализируемых микроРНК представлены в Таблице 11.

Таблица 11 – Ассоциации уровней микроРНК с различными клинико-демографическими данными пациентов

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

Примечания: СКФ – скорость клубочковой фильтрации (по формуле CKD-EPI); ЛПВП – липопротеиды высокой плотности, N*т – условные нормальные значения, составляющие 1,0 ммоль/л для мужчин и 1,2 ммоль/л для женщин; ИМТ – индекс массы тела; АГ – артериальная гипертензия. Салатовым цветом обозначены положительные корреляции, голубым – отрицательные.

3.2.5 Результаты исследования ассоциации данных КТ и сердечно-сосудистых рисков в подгруппе бессимптомных больных второго этапа

Подгруппа бессимптомных пациентов из исходной выборки второго этапа исследования составила 60 человек. Их клиническая характеристика представлена в Таблице 12.

С целью унификации и упрощения сравнительной оценки в условиях небольшой выборки распределения пациентов по степени риска ССО согласно используемым в исследовании шкалам, пограничный и промежуточный риски для ACC/AHA и MESA были объединены в общую группу «среднего». Распределение пациентов по группам риска указано в Таблице 13.

Таблица 12 – Клиническая характеристика пациентов, участвующих в исследовании ассоциации данных КТ и сердечно-сосудистых рисков

Параметр	Показатель	M ± SD
Возраст	65,2	61,5 (11,33)
Женский пол	65%	
Курение	23,3%	
Артериальная гипертензия	91,7%	
ИМТ, кг/м^2	28,8	28,2 (3,92)
Пароксизмальная форма фибрилляций предсердий	25%	
Риск SCORE	4,86	4,0 (3,63)
Риск Framinmgham (ATP-III)	10,93	8,99 (7,52)
Риск ACC/AHA	17,19	13,77 (14,16)
Риск MESA	9,88	7,05 (8,30)
КИ, AU	168,08	11,50 (440,42)
CAD-RADS, балл	1,62	2,00 (1,40)
Статины	33%	
Гипотензивные препараты	95%	
Общий холестерин, ммоль/л	5,76	5,75 (1,35)
Триглицериды, ммоль/л	1,52	1,34 (0,78)
ЛПНП, ммоль/л	3,64	3,65 (1,18)
ЛПВП, ммоль/л	1,45	1,45 (0,37)
Примечанияе: M – медиана (среднее значение признаков в группе); SD – стандартное отклонение; ИМТ – индекс массы тела; КИ – кальциевый индекс; ЛПНП – липопротеиды низкой плотности; ЛПВП – липопротеиды высокой плотности.		

Таблица 13 – Распределение пациентов по группам риска в зависимости от выбранной шкалы

Риск ССО	SCORE2(ОР),%	Framingham,%	ACC/AHA,%	MESA
Низкий	46,7	53,3	23,4	31,6
Средний	35,0	30,0	46,6	53,4
Высокий	18,3	16,7	30,0	15,0

За условные 100% была взята группа пациентов без атеросклероза коронарных артерий, относительно которой проводилась оценка распределения рисков по шкалам (Рисунок 11). Важно отметить, что шкалы применяются для

оценки рисков ССО, но не рисков наличия атеросклероза. Тем не менее, их предиктивная способность в этом отношении вызывает определённый интерес.

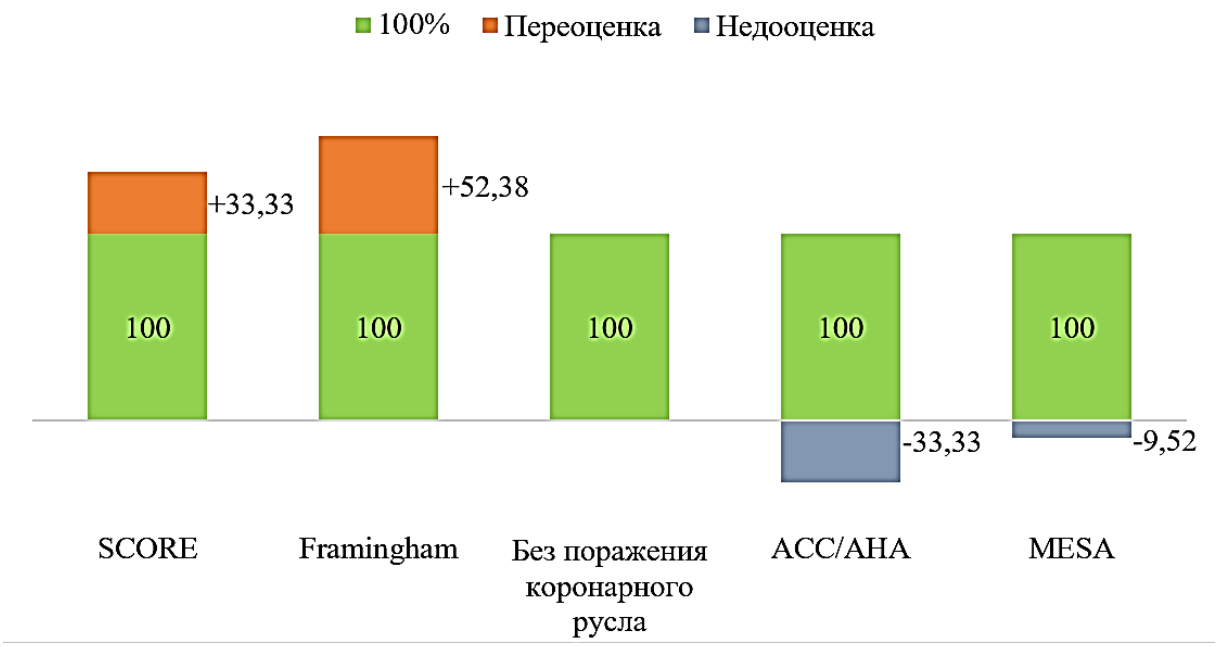
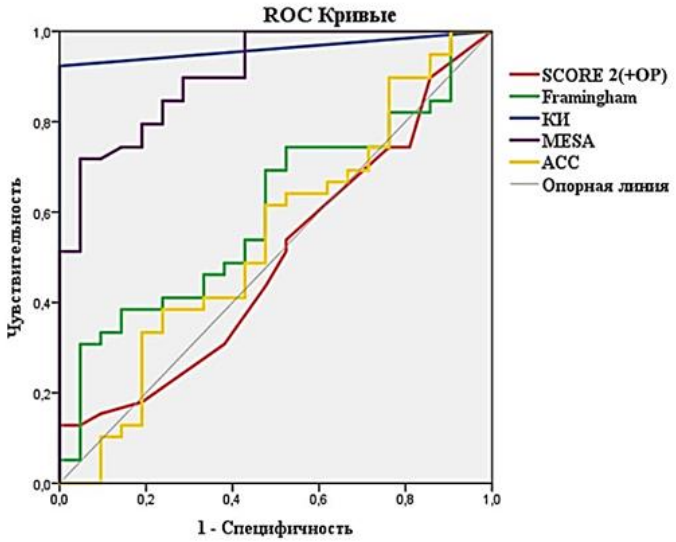


Рисунок 11 – Распределение рисков ССО у пациентов с отсутствием коронарного атеросклероза

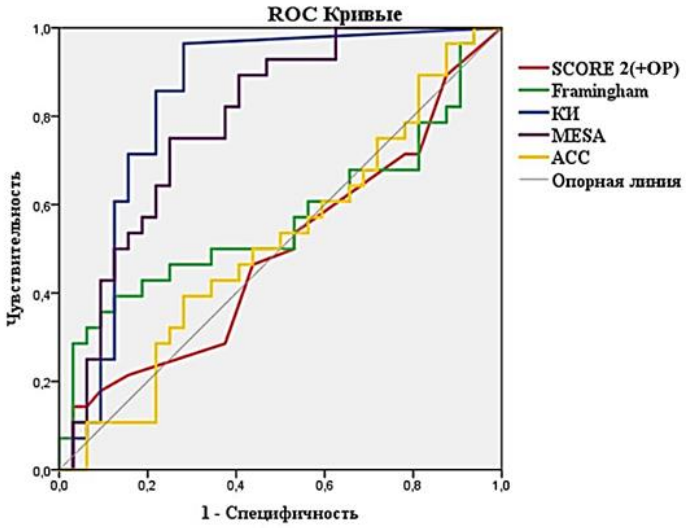
Для оценки чувствительности и специфичности указанных шкал в отношении выявления и степени выраженности атеросклеротического процесса был проведён ROC анализ. Также к шкалам были добавлены значения коронарного кальция. Показатели визуализации коронарного русла (и, соответственно, шкала CAD-RADS) использовались в качестве 1 для чувствительности и специфичности в этом анализе.

Также, учитывая потенциальную погрешность определения небольших стенозов (менее 30%) отдельно рассматривались пациенты с ≥ 30% стенозами. Так как согласно большинству клинических рекомендаций стенотическое поражение более 30% является показанием для инициации гиполипидемической терапии, то именно значение в 30% по данным КТ мы использовали как значение отсечки. Результаты представлены на Рисунках 12–14.



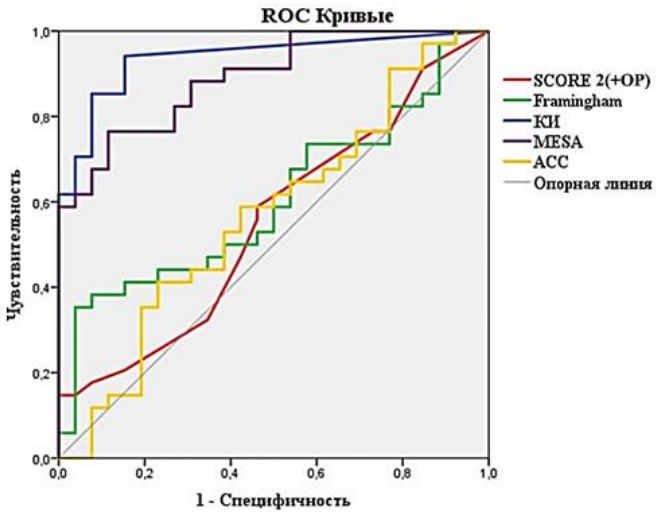
	AUC	SD	P	95% ДИ	
SCORE2(OP),%	0,496	0,079	0,957	0,342	0,650
Framinmgham	0,603	0,075	0,190	0,457	0,749
ACC	0,542	0,081	0,593	0,384	0,700
MESA	0,907	0,037	<0,0001	0,833	0,980
КИ	0,962	0,026	<0,0001	0,911	1,000

Рисунок 12 – Сопоставление шкал в выявлении интактных артерий по данным КТ. ROC



	AUC	SD	P	95% ДИ	
SCORE2(OP),%	0,492	0,076	0,917	0,343	0,641
Framinmgham	0,569	0,078	0,358	0,416	0,723
ACC	0,513	0,076	0,859	0,365	0,661
MESA	0,790	0,059	<0,0001	0,675	0,905
КИ	0,836	0,057	<0,0001	0,725	0,948

Рисунок 13 – Сопоставление шкал в выявлении атеросклероза при наличии 30–69% стенозов по данным КТ. ROC



	AUC	SD	P	95% ДИ	
SCORE2(OP),%	0,551	0,075	0,502	0,403	0,699
Framinmgham	0,605	0,073	0,165	0,462	0,749
ACC	0,568	0,076	0,371	0,419	0,717
MESA	0,891	0,039	<0,0001	0,814	0,969
КИ	0,938	0,031	<0,0001	0,876	0,999

Рисунок 14 – Сопоставление шкал в выявлении атеросклероза при наличии 30–99% стенозов по данным КТ. ROC

В исследуемой выборке стоит отметить группу из трёх пациентов, имеющих атеросклеротическое поражение коронарного русла при отсутствии коронарного кальциноза (0 AU).

3.2.6 Клинический пример

Пациентка Л. пятидесяти девяти лет, без клиники стенокардии, имеющая длительный анамнез повышения артериального давления (в покое 140/90 мм рт.ст.) и употребления табака, отрицательный результат стресс-эхокардиографии и отсутствие поражения брахиоцефальных артерий по данным ультразвукового исследования, с уровнем ХС-неЛПВП – 3,6 ммоль/л и индексом массы тела 34,7 кг/м^2, при расчете риска сердечно-сосудистых осложнений имела: 3% по

Framingham, 11,6% по ACC и 13,5% по AHA, что указывает на наличие промежуточного риска (при использовании SCORE2 – очень высокого риска).

При дообследовании по результатам рутинной КТ ангиографии без контрастирования индекс Агатстона составил 0, что переместило пациентку в группу низкого риска (шкала MESA), не подразумевающую назначение препаратов, снижающих атерогенные липиды крови.

Однако при обследовании с контрастом в проксимальном сегменте правой коронарной артерии была обнаружена мягкая бляшка, суживающая просвет сосуда до 50% (Рисунок 15).

Рисунок 15 – Стеноз проксимального сегмента ПКА за счет мягкой бляшки

Учитывая факторы, перечисленные выше, пациентка была реклассифицирована в группу очень высокого риска, в связи с чем, была индуцирована липиднижающая терапия.

Если бы решение в отношении стратификации риска у данной пациентки принимались лишь на основании существующих рекомендаций, имея крайне

высокие риски фатальных событий, она могла остаться без необходимого лечения.

Представленный случай показывает несовершенство существующих моделей оценки риска и практическую значимость более персонализированного подхода к его стратификации у пациентов сердечно-сосудистого профиля.

Наиболее наглядным является сопоставление клинического случая с рекомендациями ACC/AHA по дислипидемиям от 2018 г. (Таблица 14).

Таблица 14 – Использование оценки 10-летнего риска ССО и КИ для назначения терапии статинами *(адаптировано из P.Greenland et al. [85])*

Использование оценки 10-летнего риска ССО и КИ для назначения терапии статинами				
Риск ССО (ACC/AHA)	< 5%	5 – 7,5%	>7,5% – 20%	> 20%
Тактика на основе риска	Не назначать	Дообследовать	Назначать	Назначать
Тактика на основе риска + КИ				
КИ = 0 AU	Не назначать	Не назначать	Не назначать	Назначать
КИ > 0 AU	Не назначать	Дообследовать	Назначать	Назначать
Повлияет ли КИ на тактику?	Нет	Да	Да	Нет

Стоит отметить, что использование новой шкалы SCORE2 в данном случае подразумевало назначение коррекции образа жизни с последующей медикаментозной терапией и достижением ЛПНП < 2,6 ммоль/л, что также является недостаточным целевым уровнем.

Нежелательные явления, связанные с исследованием

Учитывая характер исследовательской работы, медицинское вмешательство было ограничено пункцией периферических вен и проведением исследований с неионным рентген-контрастным препаратом.

Ни у одного из пациентов не было зафиксировано случаев каких-либо осложнений от указанных выше манипуляций.

Ограничения исследования

Основным ограничением настоящей работы является небольшой объем выборки пациентов.

В связи с этим не представилось возможным произвести разбиение пациентов на подгруппы: пациенты с атеросклеротическими бляшками и нулевым кальциевым индексом, пациенты с очень высоким уровнем коронарного кальциноза (>1000 AU) и провести дополнительные исследования.

Ещё одним значимым ограничением исследования является его специфика, поскольку зависимость прогрессирования атеросклероза и его исходы (то есть прогноз ССО) от значений уровней микроРНК можно оценить только в рамках проспективной работы.

Ограничением можно считать выявление в ходе исследования большого числа образцов плазмы с гемолизом (22,9%). Это может быть вызвано как техникой выполнения манипуляций по забору крови и постановке периферического венозного катетера, так и спецификой предварительного анализа образцов.

В большинстве исследований, связанных с оценкой уровней микроРНК в крови, вопрос гемолиза или не описан, или решался на уровне визуального контроля.

Также фактором, косвенно влияющим на результат, можно считать значимо более высокую долю пациентов с фибрилляцией предсердий в группе контроля.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обсуждение результатов настоящего исследования целесообразно начать с вопроса о потенциальной возможности диагностики уязвимых атеросклеротических бляшек. Возможность выявления маркеров уязвимости атеросклеротической бляшки очень важна в клинической кардиологии, поскольку ее наличие позволяет персонализировать оценку риска развития сосудистых катастроф и предпринять соответствующие превентивные меры.

Циркулирующие микроРНК рассматриваются как один из наиболее перспективных классов биомаркеров. Биомаркер считается полезным, если соблюдаются следующие критерии: он дополняет клиническую картину; он предоставляет информацию о риске, которая не зависит от уже имеющихся предикторов; его можно измерить и интерпретировать в условиях амбулаторного звена медицинской помощи; он является точным, воспроизводимым и стандартизированным на международном уровне, и он имеет благоприятное соотношение затрат и пользы [266]. Скрининг биомаркеров также должен улучшить ведение пациентов, особенно за счет более точной классификации рисков и руководства при выборе терапии [266].

В качестве биомаркеров риска сердечно-сосудистых осложнений в основном используются метаболомные показатели – высокочувствительный С-реактивный белок, натрийуретические пептиды, гомоцистеин, высокочувствительные тропонины, показатели, ассоциированные с обменом липидов, углеводов, функцией почек и другие [111]. И если до 2013 года метаболомные маркеры были единственной лабораторной возможностью стратификации рисков, то после открытия внеклеточного транспорта посредством микровезикул появилась возможность более точной стратификации рисков, поскольку в рамках такого вида адресации сигналов проводится тонкая регуляция функции клеток на геномном уровне при помощи некодирующих РНК. Новые биомаркеры могут служить в прогностических целях, поскольку имеющиеся инструменты лабораторной диагностики способны выявлять этот класс веществ.

Очевидно, однако, что требуется провести еще достаточное количество фундаментальных и клинических исследований, чтобы могло сложиться определенное медицинское представление об участии микроРНК в патогенезе заболеваний, в том числе, сердечно-сосудистых. Именно в этой плоскости фундаментальной и клинической медицины находится данное исследование.

По итогам нашего исследования в качестве предикторов стабильности или уязвимости атеросклеротической бляшки могут рассматриваться три вида микроРНК. Это let-7b-5p (на первом этапе) и miR-143-3p, miR-181-5p (на втором этапе). На малой выборке let-7b-5p выявлялась только в группе пациентов с уязвимыми бляшками, что выделяло её в качестве кандидата на роль маркера уязвимости бляшки.

Биологическая роль этой микроРНК исследовалась в ряде работ. В исследовании препаратов человеческих гладкомышечных клеток и атеросклеротических бляшек у пациентов с сахарным диабетом E. Brennan и соавт. экспрессия let-7b-5p снижена по сравнению с контролем. Кроме того, снижение экспрессии данной микроРНК коррелировало с активизацией сосудистого воспаления и повышением соответствующих маркеров [221]. Этот факт подтверждается исследованием M. Parahuleva и соавт., где в препаратах участков артерий с атеросклеротическим поражением экспрессия let-7b-5p была ниже аналогичного показателя у неповреждённых сосудов [152]. Стоит отметить, что исследование циркулирующих уровней данной микроРНК у пациентов с инфарктом миокарда и здоровых людей продемонстрировало обратные результаты [78]. Биологическая роль данной микроРНК, согласно имеющимся данным, представляется атеропротективной по нескольким путям. Отмечается участие let-7b-5p в регуляции эндотелиальной функции за счёт ингибирования экспрессии лектиноподобных рецепторов 1 типа (OLR-1), также известных как рецепторы окисленных ЛПНП (LOX-1). Окисленные липопротеиды (oxLDL), воздействуя на эти рецепторы, запускают каскад воспалительных реакций, что приводит к разрушению клеток эндотелия и, соответственно, потенцирует атеросклероз. В свою очередь, повышение уровня oxLDL подавляет экспрессию

let-7b-5p, стимулируя экспрессию OLR-1/LOX-1 и тем самым замыкает порочный круг [1, 222]. В то же время, в пути интерлейкина-6 (IL-6) повышение экспрессии let-7b-5p оказывает, наоборот, противовоспалительное действие [123]. Основываясь на результатах собственного исследования, а также данных литературы можно предположить волнообразную динамику уровней циркулирующих и клеточных let-7b-5p. Так, на ранних этапах экспрессия этой микроРНК повышается для подавления воспалительных процессов в эндотелии. При прогрессировании патологического состояния, в том числе, за счёт повышения уровня oxLDL, экспрессия этой микроРНК снижается, что стимулирует уже провоспалительные эффекты, реализуемые различными путями. Косвенно эта гипотеза подтверждается данными исследования динамики уровней let-7b-5p во время проведения чрескожного коронарного вмешательства, где в течение часа после ангиопластики отмечалось снижение интракоронарного уровня этой микроРНК [70]. Предположение о значимости характера динамики уровней циркулирующей let-7b-5p при развитии сердечно сосудистых осложнений, в особенности, с учётом уязвимости атеросклеротической бляшки, требует дальнейших исследований.

Из всех выбранных для второго этапа нашей работы микроРНК ассоциации с типом атеросклеротической бляшки показали miR-143-3p и -181b-5p. Известно, что miR-143-3p активно участвует в регуляции активности эндотелиальных клеток и ГМК сосудов [278]. Анализ, проведённый I. Degano и соавт. в рамках исследования REGICOR, выявил её участие в воспалительном ответе на острое повреждение миокарда. На это же указывают данные роста концентрации этой микроРНК в крови пациентов сразу после сосудистого события [41]. Анализ таргетных генов для miR-143-3p показывает как провоспалительные, так и противовоспалительные пути. Через гены MAPK7, PLPP3, SERPINE1, THBS1 регулируются процессы активации эндотелиальных клеток, через CTGF, NRG1 – процессы пролиферации, миграции и апоптоза. Также miR-143-3p регулирует экспрессию CACNA1C, COL1A1, COL5A2 и PTGS2 гладкомышечных клеток сосудов, которые отвечают за процессы пролиферации и синтеза

экстрацеллюлярного матрикса [41, 238]. В настоящем исследовании отмечается повышение экспрессии miR-143-5p в группе с интактными коронарными артериями, что согласуется с данными I. Degano и соавт. и указывает на возможную противовоспалительную и атеропротективную роль данной микроРНК. Однако стоит отметить, что в условиях острого коронарного синдрома уровень miR-143-3p повышается [41]. В работе Gonzalo-Calvo и соавт. экспрессия miR-143-3p снижалась по мере увеличения объёма коронарного атеросклероза, что также сопоставимо с результатами данного диссертационного исследования [73]. Таким образом, учитывая динамику уровней miR-143-3p по мере увеличения степени выраженности и дестабилизации атеросклеротического процесса можно рассматривать эту микроРНК как маркер уязвимости бляшки, однако необходимо проведение дополнительных исследований, учитывая специфическую динамику.

В отличие от описанных выше молекул, miR-181b-5p рассматривается преимущественно как атеропротективная микроРНК [165]. В качестве основных путей реализации её регулирующей функции рассматриваются импортин-α3, PI3K, MAPK, KPNA4, которые приводят к снижению интенсивности процессов воспаления, пролифирации и миграции ГМК эндотелиоцитов [7, 235]. Так, в исследованиях *in vivo* оверэкспрессия miR-181b-5p приводила к снижению нестабильности атеросклеротической бляшки посредством регуляции Notch1 и фактора транскрипции NF-kB [183]. Также описано ингибирующее влияние miR-181b-5p на ген Круппель-подобного фактора 6 (KLF6), являющегося ко-активатором NF-kB в клетках почечного интерстиция [184], возможно, с этим связано выявление положительной корреляции с расчётной скоростью клубочковой фильтрации в нашем исследовании. Однако при исследовании каротидных бляшек уровень экспрессии был выше в группе без атеросклероза в одном исследовании [138] и, наоборот, в уязвимых бляшках [166]. Такие различия можно объяснить исследованиями разных сосудистых бассейнов, оценками уровней микроРНК в тканях, в макрофагах, а также исключительно молекулярными критериями уязвимости атеросклеротической бляшки. В нашем исследовании уровни циркулирующих miR-181b-5p на уровне сильного тренда

коррелировали с риском ССО >10% согласно ACC/AHA и были наиболее высокими в группе стабильных атеросклеротических бляшек и наиболее низкие в контрольной группе. Вероятнее всего, такая динамика уровней этой микроРНК обусловлена влиянием степени коронарного кальциноза, с которым также отмечается сильная корреляция.

Атеропротекторная роль miR-181b-5p также предполагалась в исследовании A. J. Patterson и соавт., где они проанализировали экспрессию большого пула микроРНК с использованием метода микрочипов [97]. Экспрессия этой микроРНК была выше у пациентов с коронарным атеросклерозом и низким риском ССО согласно шкале Framingham. В той же группе пациентов наблюдалось увеличение экспрессии miR-21-5p, которая в нашем исследовании была связана с высоким риском осложнений по данным ACC/AHA. Интересно, что многие микроРНК из исследования A. J. Patterson и соавт., пересекающиеся с нашей работой (miR-23a-3p, -92a-3p, -126-3p, -143-3p, -145-5p, -146a-5p, -150-5p и -195-5p) [2, 104, 250], не выявили каких-либо ассоциаций с рисками сердечно-сосудистых осложнений или атеросклерозом. Такие отличия в результатах могут быть обусловлены различными методами анализа микроРНК, отсутствием других шкал для оценки сосудистых рисков, коронарного кальция и выявлением уязвимых бляшек. В другом исследовании тканеспецифичных микроРНК у пациентов со стабильной и нестабильной ИБС были выявлены значительные различия в экспрессии miR-29b-3p, -92a-3p, -126-3p, -126-5p, -143-3p, -145-5p, -146a-5p, -150-5p, -195-5p и ряда других; однако ни одна из корреспондирующихся с нашей работой микроРНК не была подтверждена на последующих этапах [191]. Фундаментальным отличием нашей работы является оценка циркулирующих микроРНК, а не тканеспецифичных, поскольку они наиболее применимы в качестве биомаркеров. Так, в исследовании A. J. Patterson и соавт. экспрессия miR-451a была снижена у пациентов с высоким риском ССО без ИБС [97], а S. Li и соавт. предположили, что эта микроРНК может быть биомаркером раннего разрыва бляшки [70]. Однако в этих работах не учитывался уровень гемолиза, который может существенно влиять на уровни циркулирующих микроРНК, и

поскольку уровень miR-451a, как упоминалось выше, зависит от гемолиза, полученные с ним ассоциации являются неопределенными.

Феномен взаимосвязи miR-181b-5p с кальцификацией атеросклеротического поражения может быть обусловлен уже известными механизмами атеропротекции, но требует дальнейшего изучения. Возможно, отклонения уровней этой микроРНК наряду с miR-141-3p, можно будет использовать как маркер стабильности атеросклеротического поражения.

Вторым важным аспектом настоящего исследования являлась оценка связи уровней циркулирующих микроРНК с расчётными рисками развития сосудистых осложнений и клинико-демографическими параметрами.

Способы популяционной оценки риска ССО имеют значительный разброс в распределении пациентов по группам. Так, в нашей популяции шкалы SCORE и Framingham (основанные на одних критериях оценки риска) имели тенденцию к переоценке, а шкала ACC/AHA к недооценке, что особо показательно представлено в группе бессимптомных пациентов. По данным других исследований шкал оценки ССО данные достаточно противоречивы. C. Santos-Ferreira и соавт. указывают на недооценку рисков ССО шкалами SCORE и ACC/AHA [192], а A. P. DeFilippis и соавт., наоборот, указывают на переоценку рисков ССК шкалой ACC/AHA [33]. Важным обстоятельством является влияние этнической принадлежности пациентов на прогноз заболевания, этому авторы указанных исследований уделяют особое внимание. По данным исследований, наибольшие прогностические отличия наблюдаются в азиатских и латинских группах, однако, и более мелкие этнические группы также имеют свои особенности [48, 61, 246]. Крупных исследований особенностей условной российской популяции в рамках шкал SCORE и ATP-III не проводилось. Российские клинические рекомендации, как и европейские, базируются на шкале SCORE, а точнее, на её варианте для регионов с высоким риском ССО. Кроме этнической принадлежности существует большое количество факторов, которые оказывают значимое влияние на прогноз ССО, но не учитываются большинством шкал. К ним относятся бремя сахарного диабета (а не просто его наличие),

уровень гликированного гемоглобина, индекса массы тела, высокочувствительного с-реактивного белка и других биомаркеров [61, 112]. Кроме того, основные шкалы исследованы и откалиброваны для определённых возрастных групп, что затрудняет оценку риска ССК у пациентов вне имеющихся возрастных рамок [61].

Большая доля исследований роли микроРНК в развитии сердечно-сосудистых осложнений направлена на диагностику критических состояний, значительно меньшее количество работ посвящено изучению влияния уровней различных микроРНК на прогноз, из них лишь небольшое количество направлено на оценку уровней циркулирующих регуляторных РНК и сопоставление их с расчётными рисками. Одно из первых исследований по данному вопросу проведено A. Zampetaki и соавт., в работе которых ряд микроРНК (miR-126, -197 и -223) косвенно подтвердили возможность служить в роли модификатора риска к стандартной оценке по Framingham, однако статистической значимости достичь не удалось [220].

Другой набор циркулирующих в плазме микроРНК, включавший miR-34a, -133, -223, -378 и -499, в своем исследовании использовали T. Keller и соавт., где оценивались ассоциации со значениями расчетных рисков ССО по Framingham и SCORE. Точная оценка индекса чистой реклассификации (Net Reclassification Index, NRI) подтвердила способность оценки уровней исследуемой группы микроРНК модифицировать расчётный риск ССО по SCORE и Framingham ($p = 0.005$ и 0.014 соответственно) [128].

Наше исследование в качестве начального этапа предполагало исследования профиля именно провоспалительных микроРНК, поэтому использовавшийся набор молекул практически не пересекался с A. Zampetaki и соавт. и T. Keller и соавт., за исключением miR-34a, которая, впрочем, не показала значимых ассоциаций с расчётными рисками ССО. Это позволило нам впервые получить данные о потенциальной возможности miR-16, 195 и 211 модифицировать риск развития ССО. К сожалению, в группу валидизации не попала miR-211, по причинам, указанным выше.

Согласно результатам проведенных исследований miR-16-5p в области сердечно-сосудистой системы было установлено, что данная микроРНК выполняет защитную функцию, благодаря торможению процесса пролиферации и миграции эндотелиоцитов [93]. Кроме того, при исследовании *in vivo* (на мышах) было выявлено, что miR-16-5p снижает провоспалительную активацию макрофагов в атеросклеротических бляшках [164]. Результаты исследований, проведенных профессором O'Sullivan и соавт., свидетельствуют, что при сравнении группы пациентов со стабильной ИБС (n = 50) с группой контроля (n = 50) отмечалось значимое повышение уровня miR-16-5p при ИБС [196]. Вместе с тем, анализ исследований транскоронарных градиентов микроРНК (измерявшихся инвазивно в коронарном синусе и правом предсердии), показал, уровни miR-16-5p были значительно выше при остром коронарном синдроме по сравнению с таковыми при стабильной ишемической болезни сердца и с группой контроля [254, 260, 261].

На первом этапе нашего исследования, в малой выборке (n =10) было установлено, что уровень циркулирующей miR-16-5p в плазме крови пациентов, имеющих более высокие значения расчётного риска сердечно-сосудистых осложнений по шкале MESA, был ниже, чем у пациентов более низкого риска, однако, на следующем этапе работы связь miR-16-5p с расчётными значения рисков ССО не подтвердилась. Не исключено, что рост уровней данной микроРНК специфичен только для ОКС. Также, учитывая особенности исследуемых популяций и разницу дизайнов исследований, вполне вероятно влияние этнической принадлежности, принимаемой терапии или других факторов на уровни miR-16-5p.

В рамках этапа профилирования на малой выборке нами была отмечена положительная корреляция уровня циркулирующей miR-195-5p со значениями расчётного риска по MESA. Однако, на малой выборке сравнение проводилось фактически между группами пограничного и умеренного риска. При валидизации мы получили увеличение экспрессии miR-195-5p у пациентов с умеренным и высоким риском ССО. Наши данные вполне соответствует результатам других

исследований, в которых в группе пациентов с ИМ уровни циркулирующей miR-195-5p по сравнению контролем были выше [78, 125]. Увеличение уровней miR-195-5p отмечается в группе пациентов с постинфарктной сердечной недостаточностью по сравнению с ХСН неишемического генеза [264].

Биологическая роль miR-195-5p представляется неоднозначной. Ряд исследований указывают на противовоспалительную активность данной микроРНК посредством снижения патологической пролиферации и миграции гладкомышечных клеток сосудов и формировании неоинтимы [168]. Более того, miR-195-5p снижает провоспалительную активность макрофагов, что, в конечном счёте и обеспечивает её атеропротективную роль [186]. В исследованиях сердечной недостаточности и гипертрофии миокарда отмечается увеличение уровней miR-195 с прогрессированием заболеваний, при этом отсутствует единое понимание непосредственной роли этой микроРНК [167, 187]. Так, M. Okada и соавт. и C. Xie. и соавт. в своих исследованиях на биологических моделях делают диаметрально противоположные выводы о необходимости ингибирования или стимуляции экспрессии данной микроРНК для лечения сердечной недостаточности [30, 100], а H-Y. Cheng и соавт. предлагают использовать miR-195-5p в качестве средства лечения ишемического и геморрагического инсультов [185].

Анализ взаимосвязи уровней miR-195-5p с рядом клинико-демографических показателей на первом этапе нашей работы показал отрицательную связь уровня данной микроРНК с индексом массы тела и положительную – с уровнем липопротеидов высокой плотности. При оценке на крупной выборке методом ОТ-ПЦР РВ достоверно подтвердилась взаимосвязь с индексом массы тела. Повышение экспрессии miR-195-5p отмечалось у пациентов с ожирением и в других исследованиях [63], однако, место данной микроРНК в метаболизме липидов остаётся недостаточно изученным. Отмечается лишь потенциальная роль этой микроРНК в пролиферации и дифференцировки адипоцитов посредством регулирования активности синтазы жирных кислот [99].

Небольшое количество данных к настоящему времени получено об участии miR-211 в патогенезе ССО. В нашем исследовании на малой выборке уровни этой микроРНК снижались по мере увеличения риска ССО по шкалам ACC/AHA и Framingham (ATP-III), при этом обладала положительной корреляцией с возрастом. В исследованиях, проведённых Y. Jiang и соавт., обнаружено, что в плазме пациентов с атеросклерозом уровень циркулирующей miR-211 был выше по сравнению с контрольной группой [205]. Вместе с тем, результаты других работ демонстрируют снижение частоты как геморрагических, так и ишемических инсультов у пациентов, имеющих rs2507800*T аллель гена ангиопоэтина-1 (ANGPT1). Наличие такого аллеля ассоциируется с разрывом регулирующей связи экспрессии гена ANGPT1 и miR-211, которая у пациентов с другими аллелями этого гена оказывала тормозящее влияние [28]. Ангиопоэтин-1 имеет большую провоспалительную активность в ряде патологических процессов [35, 36]. К сожалению, подтвердить или опровергнуть данные в валидизационном исследовании по техническим причинам не удалось.

Ассоциации уровней микроРНК с рисками ССО по шкалам SCORE и Framingham (ATP-III) на втором этапе нашего исследовании отсутствовали, при этом риски по шкале ACC/AHA имели сильную линейную взаимосвязь с miR-145-5p, достоверную положительную корреляцию с miR-126-5p, 150-5p и корреляцию на уровне сильного тренда с miR-21-5p, 146a-5p, 92a-3p, 23a-3p, 181b-5p для расчётного риска более 10%.

Роль miR-145-5p в патофизиологии процессов атеросклероза, дестабилизации атеросклеротической бляшки и развития сердечно-сосудистых осложнений исследована относительно широко. Большинство исследований указывают на протективную функцию данной микроРНК, поскольку она приводит к снижению пролиферации гладкомышечных клеток сосудов путём ингибирования рецептора CD40 и снижения уровней интерлейкина-6 [182, 194]. В качестве других путей регуляции активности ГМК описывают влияние miR-145 на кальций кальмодулин зависимую протеинкиназу II (CaMKII), содержащуюся в кардиомиоцитах [159], белки SMAD4 [112], рецепторы KLF4, KLF5 и

ангиотензин превращающего фермента (АПФ) [242]. Последнее, кстати, может объяснять ассоциацию данной микроРНК с риском по ACC/AHA, поскольку в американской шкале в качестве одной из переменных рассматривается факт лечения гипертонии. В одном из ранних исследований на мышах введение этой микроРНК заметно уменьшало размер бляшек в аорте и брахиоцефальных артериях. Также значительно увеличилась площадь фиброзной капсулы, уменьшался объём некротического ядра и увеличилось содержание коллагена в бляшках [130, 158]. Соответственно, снижение экспрессии miR-145-5p приводило к прогрессированию и дестабилизации атеросклеротических бляшек в *in vivo* и *in vitro* моделях [155]. Повышение экспрессии микроРНК отмечается у пациентов с артериальной гипертензией, атеросклерозом и гипертензией, а также у пациентов с инфарктом миокарда [42, 77, 92, 201], в нашей работе уровень этой микроРНК был связан с нормальными значениями ЛПВП. При этом при оверэкспрессии miR-145 отмечается меньшая степень повреждения миокарда, меньшая подверженность повреждённого миокарда развитию желудочковой тахикардии [181, 159]. Резюмируя полученные данные, можно констатировать, что роль miR-145-5p является кардиопротективной, а её повышение по мере прогрессирования атеросклероза компенсаторным механизмом. Возможно, как раз снижение уровней этой микроРНК у пациентов с атеросклерозом будет являться предиктором плохого прогноза. Следует провести проспективное исследование уровней miR-145 и развития сердечно-сосудистых осложнений.

Помимо miR-145-5p положительная корреляция с рисками ССО по шкале ACC/AHA выявлялась для miR-126-5p и 150-5p. Стоит отметить, что во многих исследованиях описывается просто miR-126, которая в настоящий момент имеет обозначение miR-126-3p. В рамках того же семейства микроРНК находится miR-126-5p, но её биологические функции несколько отличаются. Так, при исследовании влияния микроРНК на пролиферацию ГМК сосудов *in vivo* miR-126-3p оказывала отрицательное воздействие на этот процесс, в то время как miR-126-5p положительное [203]. Механизм защитного действия miR-126-5p предположительно реализуется через суппрессию белка DLK1, который

ингибирует ряд сигнальных путей, регулирующих пролиферацию ГМК [157]. Другой интересный механизм антиатерогенного действия miR-126-5p, описанный D. Santovito и соавт., базируется на прямом ингибировании гена каспазы-3 в ядре клетки без участия комплекса RISK, что приводит к торможению процессов апоптоза эндотелиальных клеток и атеросклероза [199]. Ещё одним потенциальным механизмом протективного действия miR-126-5p является ингибирование MAPK/ERK пути, который является одним из патогенетических факторов сосудистого воспаления [119]. Кроме того, изменения напряжения сдвига при атеросклерозе приводят к увеличению экспрессии miR-126-5p без влияния на miR-126-3p [54, 180]. В качестве защитного механизма напряжение сдвига активизирует NO-синтазу, приводя к локальному улучшению кровотока, противодействию атеросклероза [237]. Данных о влиянии напряжения сдвига на симптомность атеросклероза не описано, но, учитывая факт увеличения локальной концентрации NO, это вполне возможно. Такой механизм мог бы объяснить ассоциацию уровней miR-126-5p с наличием атипичной стенокардии у пациентов в нашем исследовании. Очередным потенциальным механизмом действия miR-126 является подавление экспрессии белка VCAM-1, являющегося иммуноглобулином, участвующим в адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток, а также одним из провоспалительных факторов в процессе атеросклероза [50, 180]. Стоит отметить, что данный механизм уже является общим как для miR-126-5p, так и для miR-126-3p [156]. Предположительно, именно благодаря этому механизму miR-126 могут служить предикторами формирования хорошего коллатерального кровотока у пациентов со значительной степенью стенозирования коронарных артерий [40].

Ассоциации двух вариантов miR-126 с выраженностью атеросклероза описаны в нескольких исследованиях. У пациентов с атеросклерозом коронарных артерий уровни циркулирующих miR-126 были ниже, чем в группе контроля по результатам двух исследований [107, 150, 272]. При этом отмечалось более выраженное снижение экспрессии данной микроРНК при нестабильной стенокардии и инфаркте миокарда, по сравнению со стабильной ИБС. Кроме того,

авторы выявили корреляцию между степенью тяжести ИБС и уровнем циркулирующей miR-126, что указывает на возможность использования данной микроРНК не только как биомаркера ИБС, но и для оценки эффективности терапии [107]. Интересно, что косвенно это подтверждается и нашими данными, указывающими на положительную корреляцию miR-126-5p с наличием атипичной стенокардии. Однако этим данным противоречат результаты Z. Zhong и соавт., в исследовании которых в группе контроля экспрессия miR-126-5p была ниже, чем в группах стабильной ИБС, нестабильной стенокардии и инфаркта миокарда [66], а также данные исследований пациентов с тяжёлым атеросклерозом, где у пациентов с многососудистым поражением и большим объёмом бляшек уровни циркулирующих микроРНК были выше [40]. Более того, проведение реваскуляризации миокарда у пациентов с тяжёлым атеросклерозом приводило к снижению уровней miR-126 [23, 75]. В исследовании G. Long и соавт. у пациентов с инфарктом миокарда уровни циркулирующих miR-126 были выше, чем в группе здоровых добровольцев [124]. Наше исследование также выявляет более высокие уровни miR-126-5p в группе пациентов с коронарным атеросклерозом и, равно как и исследование A. Zampetaki и соавт. [220], показывает положительную корреляцию уровней miR-126 с риском развития сердечно-сосудистых осложнений. Возможно, эта корреляция обусловлена тем, что при увеличении бремени атеросклероза и дестабилизации бляшек компенсаторно активируются защитные механизмы, и поэтому в данном случае корреляция вовсе не означает зависимость. Также противоречивые данные исследований могут объясняться тем, что miR-126 транспортируются в том числе в составе частиц ЛПВП что подтверждается в различных исследованиях [121, 211].

Как обсуждалось выше, другим показателем бремени атеросклероза является уровень кальцификации коронарных артерий. В нашем исследовании закономерно отмечается статистически значимая линейная ассоциация уровней miR-126-3p с уровнем коронарного кальция. Механизм участия этой микроРНК в процессе кальцификации изучен слабо, но считается, что в его основе лежит уже

упоминавшийся выше MAPK/ERK путь [102]. Результаты нашего исследования соответствуют данным D. Chen и соавт., в исследовании которых наряду с рядом провоспалительных маркеров и miR146a было выявлено значимое повышение экспрессии miR126-3p у пациентов с коронарным атеросклерозом и положительная корреляция с уровнем коронарного кальция [106]. В нашем исследовании miR-146-5p не продемонстрировала ассоциаций с коронарным кальцием, а корреляция этой микроРНК с риском >10% по ACC/AHA отмечается на границе статистической значимости [250].

Стоит отметить, что оба варианта miR-126 участвуют в липидном обмене [120, 178]. При этом они ещё и транспортируются в составе липопротеидов высокой плотности [64]. В нашем исследовании отмечается положительная корреляция уровней как miR-126-5p, так и 126-3p с высокими (>1,55 ммоль/л) уровнями ЛПВП, но ответить на вопрос, достигается ли данная корреляция простым наличием микроРНК в составе ЛПВП или взаимосвязанным увеличением экспрессии этих молекул, в рамках нашего исследования сказать невозможно. В любом случае эти данные корреспондируются с результатами других исследований и увеличивают репрезентативность нашей работы.

Ещё одна микроРНК, показавшая сильную ассоциацию с риском сердечно-сосудистых осложнений >10% по ACC/AHA является miR150-5p. Исследований ассоциации уровней данной микроРНК с расчётными рисками ССО не проводилось, однако, как уже отмечалось в обзоре литературы, данная микроРНК показала значимость в качестве биомаркера нестабильной стенокардии и острого коронарного синдрома, как в рамках сочетанных показателей [37, 125], так и изолированно [105]. Впрочем, низкий уровень циркулирующей miR-150-5p являлся независимым предиктором летального исхода при ишемическом инсульте и показал способность улучшить оценку инвалидизации после инсульта по шкале Рэнкина 163].

Патофизиологическая роль miR-150-5p привычно является противоречивой. Так, ряд исследований *in vitro* и *in vivo* показывает, что указанная микроРНК способствует снижению уровней провоспалительных цитокинов ИЛ-1b, ИЛ-6 и

других факторов, а также ингибирует проатеросклеротический фактор транскрипции c-Myb, влияет на хемотаксис и миграцию моноцитов, что в конечном итоге приводит к защите миокарда от повреждения, перегрузки и последующего фиброза [160, 109, 161, 173, 229]. В то время как другие исследования указывают на активность miR-150-5p, приводящую к сосудистому воспалению, апоптозу клеток эндотелия и прогрессированию атеросклероза [162, 228]. K. Rayner и соавт. в анализе особенностей активности провоспалиельных микроРНК указывают на возможное провоспалительное действие miR-150, секретируемого моноцитами в специальных экзосомах. При этом секретируемые miR-15a и miR-133 помимо экзосом секретируются в микровезикулах, а miR-223 выявляется в составе липопротеидов высокой плотности [226]. В исследовании W. T. Garvey и соавт. описывают более широкий спектр влияния miR-150 на моделях изолированных человеческих клеток, регулирующий процессы накопления и метаболизма липидов наряду с воспалением [114]. В нашем исследовании наблюдалась положительная корреляция miR-150-5p с уровнем ЛПВП, однако, как и в случае с miR-126, это может быть связано с непосредственным наличием данной микроРНК в составе частицы, а не с биологической активностью.

Выявленная в нашем исследовании положительная корреляция miR-150-5p со скоростью клубочковой фильтрации > 60 мл/мин/1,73м^2 подтверждается и в других исследованиях, однако, причина такой взаимосвязи остаётся неясной [45, 108].

Ряд микроРНК в нашем исследовании не показал ассоциаций с атеросклерозом или расчётными рисками ССО, однако, коррелировал с некоторыми клинико-демографическими показателями. Так, уровни miR-21-5p имели положительную корреляцию со скоростью клубочковой фильтрации > 60 мл/мин/1,73м^2. Это согласуется с данными других исследований, в которых, однако, эта микроРНК рассматривается как фактор, стимулирующий развитие нефропатии и кардиоренального синдрома 2 типа [81, 130].

Интересно, что корреляции miR-21-5p и miR-146a-5p с возрастом в нашем исследовании корреспондируются с результатами исследования F. Olivieri и

соавт., описывающих провоспалительные эффекты указанных микроРНК, реализующиеся через пути NF-κB/NLRP3 [189].

Дополнительно в рамках исследования нами был проведён анализ роли лучевых методов диагностики коронарного атеросклероза у пациентов с бессимптомной ишемической болезнью сердца.

Основным методом оценки рисков сердечно-сосудистых заболеваний являются шкалы и калькуляторы. К использованию дополнительных инструментов, прежде всего, лучевых, профессиональный сообщества относятся с некоторым скептицизмом, оставляю возможность их применения с целью дихотомии среди пациентов среднего риска. Во многом такое рестриктивное использование данных методик определяется отсутствием убедительных данных об их влиянии на долгосрочный прогноз [243].

Одним из методов дополнительной стратификации риска, согласно рекомендациям Европейского общества кардиологов, является коронарный кальциевый индекс. Это мощный изученный показатель, показавший свое значение в реклассификации рисков в течение 30-летнего наблюдения. Как указывалось ранее, особое значение кальциевый индекс имеет у бессимптомных пациентов низкого или умеренного риска, что отражено и в рекомендациях по дислипидемиям [22].

Еще большую роль коронарному кальциевому индексу уделяют клинические рекомендации Американского колледжа кардиологии и Американской ассоциации сердца от 2019 года. Лучевые методы занимают достойное место у пациентов низкого и промежуточным риска. Именно лучевые методы являются наиболее доказанными для персонализации риска и определения тактики ведения [237]. Среди них лидером является определение коронарного кальция [56].

Большой нерешенной задачей является определение диагностической и прогностической значимости выявления незначимого атеросклеротического поражения без кальциноза. Мягкие атеросклеротические бляшки могут не содержать кальций, при этом указывать на повышенный риск [145].

В настоящей работе продемонстрирована роль лучевых методов диагностики в персонализации риска. Так, традиционные расчетные шкалы не определяют наличие или отсутствие ($p > 0,05$). Аналогичные тенденции видны и при атеросклеротическом поражении сосудов свыше 30% ($p > 0,05$).

Показания к инициации гиполипидемической терапии различаются среди международных рекомендаций. Так, рекомендации ESC по хроническому коронарному синдрому требуют назначения статинов всем пациентам с данным заболеванием [21]. Однако, во многих случаях, диагностика хронического коронарного синдрома невозможна без дополнительных инструментальных исследований, часто с помощью лучевых методов. Пожилым пациентам (более 75 лет) назначение статинов для первичной профилактике оправдано при наличии у них как минимум высокого риска [22].

В случаях промежуточного и пограничного риска именно инструментальные методы могут помочь с выбором тактики. Терапия статинами показана при значении коронарного кальциевого индекса более 100 в любой группе пациентов вне зависимости от риска ССО по ACC/AHA. А в группе пациентов с КИ = 0 AU терапия статинами не рассматривается в качестве первой линии. Для промежуточной группы пациентов с КИ > 0, но < 100, повлиять на назначение статинов может возраст более 55 лет и другие факторы риска [20].

Остается вопрос о значимости выявленных бляшек при нулевом кальциевом индексе. В нашем исследовании у пяти процентов были выявлены такие поражения. Преимущества КТ-ангиографии в стратификации риска в данном случае не определены [5].

Существует мнение, что наличие атеросклеротических бляшек при нулевом индексе коронарного кальция может указывать на наличие так называемых «уязвимых» бляшек. При этом встречаемость подобных изменений по данным крупных регистров с включением данных коронарного кальция значительно выше, минимум в два раза, по сравнению с нашим исследованием [49].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание роли микроРНК в процессах атерогенеза и развития сердечно-сосудистых осложнений является одним из значимых направлений развития фундаментальной кардиологии.

Наряду с морфологической оценкой бляшки и расчётными рисками сердечно-сосудистых осложнений лабораторные данные имеют неоспоримое значение.

Сочетание клинических, инструментальных и лабораторных модификаторов риска необходимо для персонализированного подхода к пациенту, формирования индивидуального прогноза развития осложнений его заболеваний и подбору адекватной медикаментозной терапии.

В данном исследовании выявлены потенциальные биомаркеры уязвимости атеросклеротической бляшки – miR-143-3p и miR-181-5p. Результаты оценки корреляций микроРНК с клиническими показателями пациентов позволяют глубже понять патогенетические процессы, выходящие за рамки локального атеросклеротического поражения.

Более того, доказана ассоциация miR-195-5p с рисками сердечно-сосудистых осложнений по шкале MESA, учитывающей данные визуализации, а также показана ассоциация уровней miR-126-5p, miR-150-5p и miR-145-5p с расчётными рисками по шкале ACC/AHA, причём последняя продемонстрировала линейную зависимость.

Показана линейная взаимосвязь уровня коронарного кальциноза с miR-126-3p, а ассоциация коронарного кальциевого индекса с miR-181b-5p выявлена впервые.

Помимо этого, отдельные группы пациентов в группе низкого расчётного риска сердечно-сосудистых осложнений могут иметь высокий риск, исходя из морфологических критериев атеросклеротической бляшки по данным коронарной КТ-ангиографии и наоборот.

Описанный нами клинический случай подтверждает тенденцию к смещению парадигмы современной медицины к персонализации рисков осложнений и требует дополнительного изучения вопроса КТ-ангиографии у бессимптомных больных.

Опыт нашего исследования уже сейчас позволяет использовать полученные данные в клинической практике.

Данная работа продемонстрировала возможную роль циркулирующих микроРНК как модификаторов риска сердечно-сосудистых осложнений, способных улучшить предсказательную способность как расчётных методов оценки риска, так и методов визуализации коронарного атеросклероза.

Использование уже доступных технологий визуализации, таких как морфологическая оценка бляшки, должны использоваться и учитываться в клинической практике, а результаты лабораторной составляющей данного исследования необходимо подтвердить в проспективных исследованиях.

ВЫВОДЫ

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

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

3. Отмечаются положительные корреляции с возрастом уровней для miR-126-56, -21-5p, -146a-5p, -150-5p; корреляции с уровнем ЛПВП для miR-126-3p, -126-5p, -145-5p, -150-5p; положительные корреляции со скоростью клубочковой фильтрации для miR-21-5p, -150-5p, -181b-5p; положительные корреляции с мужским полом для miR-21-5p; -146a-5p; положительные корреляции с наличием артериальной гипертензии для miR-223-3p, -146a-5p и отрицательная корреляция уровня miR-195-5p с индексом массы тела.

4. Профилирование провоспалительных микроРНК, проведенное методом чипов на малой выборке показало значимые ассоциации miR-16 (p = 0,034 при MESA > 10%), 211 (p = 0,042 при Framingham > 10%; p = 0,042 при ACC/AHA > 10%) и 195-5p (p = 0,027 между группами риска MESA) с рисками сердечно-сосудистых осложнений. Результаты пилотного исследования частично были валидизированы на более крупной выборке: подтвердилась ассоциация miR-195-5p (p <0,05) с риском сердечно-сосудистых осложнений по шкале MESA. При исследовании ассоциаций микроРНК с рисками ССО >10% по ACC/AHA значимые результаты отмечены для miR-126-5p (p = 0,0412), miR-150-5p (p = 0,0149) и miR-145-5p (p = 0,0164).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Возможно использование циркулирующих miR-143-3p и 181b-5p в качестве маркеров стабильности атеросклеротического процесса.

2. Оценка уровней циркулирующих miR-195-5p, 126-5p, 150-5p, 145-5p может служить дополнительным модификатором риска сердечно-сосудистых осложнений.

3. Применение лучевых методов диагностики значительно точнее определяет расчётные риски сердечно-сосудистых катастроф, способствует уточнению рисков сердечно-сосудистых осложнений. Использование КТ-коронарографии и оценки коронарного кальциноза позволят определить необходимость начала терапии статинами, а также точнее определить целевые уровни ЛПНП.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ACC – Американский колледж кардиологии

AHA – Американская ассоциация сердца

ATP-III – Adult Treatment Panel III (Фрамингемская шкала риска)

AU – Agatson units (единицы Агатсона)

CAD-RADS – Coronary Artery Disease – Reporting and Data system

MESA – Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis

NICE – The National Institute for Health and Care Excellence

RISC – RNA-induced silencing complex – РНК-индуцируемый комплекс выключения гена

SCORE – The Systematic Coronary Risk Evaluation

АСК – ацетилсалициловая кислота

БКК – блокаторы кальциевых каналов

БРА – блокаторы рецепторов ангиотензина

ГМК – гладкомышечные клетки

иАПФ – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента

ИМТ – индекс массы тела

КИ – кальциевый индекс

КТ – компьютерная томография

КТА – компьютерная томографическая ангиография

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография

НОАК – новые оральные антикоагулянты

ОКС – острый коронарный синдром

ОХ – общий холестерин

рСКФ – расчётная скорость клубочковой фильтрации

ССО – сердечно-сосудистые осложнения

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ уровней циркулирующих микро-РНК у пациентов с коронарной болезнью сердца при различной степени риска развития сердечно-сосудистых осложнений. Корреляция с данными МСКТ-КА / А.Н. Рожков, Д.Ю. Щекочихин, Н.М. Баулина [и др.] // Вестник Российской академии наук. – 2020. – Т.75. – № 4. – С. 283-291.

2. Апрегуляция микрорнк 23a-3p, 146a-5p и 150a-5p как возможный диагностический маркер нестабильной стенокардии у пациентов с аневризмой грудной аорты / Э.Ав. Нго Билонг, А.Н. Рожков, Ю.О. Митина [и др.] // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2022. – Т. 15. – № 4. – С. 385-392.

3. Вардиков, Д. Ф. Диагностические возможности мультиспиральной компьютернотомографической коронарографии при заболеваниях коронарных артерий / Д. Ф. Вардиков, Е. К. Яковлева // Вестник новых медицинских технологий. – 2014. №. 4. С. 44-48. doi.org/10.12737/7267.

4. Возможности использования МСКТ коронарных артерий для определения риска сердечно-сосудистых катастроф у бессимптомных пациентов / А.Н. Рожков, Д.Ю. Щекочихин, Е.С. Тебенькова [и др.] // Профилактическая медицина. – 2020. – Т. 23. – № 4. – С. 108–114.

5. Возможности компьютерной томографии сердца в стратификации риска и определении оптимальной стратегии первичной профилактики сердечно-сосудистых осложнений атеросклероза / Я.И. Ашихмин, В.Е. Синицын, Н.В. Плиева [и др.] // Кардиология. – 2019. – № 59(6). – С. 70-80.

6. Гайсенок, О.В. Гиполипидемическая терапия в аспекте профилактики острых нарушений мозгового кровообращения: существующие стандарты, данные доказательной медицины и реальная практика / О.В. Гайсенок, А.Н. Рожков, А.С. Лишута // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2018. – Т. 14. – № 3. – С. 434–440.

7. Гареев, И.Ф. Механизмы регуляции микроРНК при атеросклерозе / И.Ф. Гареев, О.А. Бейлери, А.Б. Алышов // Вестник Северо-Западного

государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2020. – Т.12. – № 1. – С. 11–20.

8. Здравоохранение в России 2023: Статистический сборник / Г. А. Александрова, Р. Р. Ахметзянова, Н. А. Голубев [и др.]; 1-е изд. М.: Федеральная служба государственной статистики. – 2023. – Т.1. – С. 179.

9. Камышова, Е.С. Современные представления о роли микроРНК при диабетической нефропатии: потенциальные биомаркеры и мишени таргетной терапии / Е.С. Камышова, И.Н. Бобкова, И.М. Кутырина // Сахарный диабет. – 2017. – № 20 (1). – С. 42–50.

10. Кардиоваскулярная профилактика 2017. Российские национальные рекомендации // Российский кардиологический журнал. – 2018. – № 6. – С. 7-122. doi.org/10.15829/1560-4071-2018-6-7-122.

11. Клинические рекомендации: Стабильная ишемическая болезнь сердца // Российское кардиологическое общество. – 2020. – С. 114.

12. Королева, И.А. Роль микроРНК в формировании нестабильности атеросклеротических бляшек / И.А. Королева, М.С., Назаренко, А.Н. Кучер // Биохимия. – 2017. – Т. 83, вып.1. – С. 34-35.

13. Короткевич, А.А. Гибридные технологии лучевой диагностики ишемической болезни сердца: современные возможности и перспективы / А.А. Короткевич, А.Н. Коков // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2015. – № 1. – С. 5-8.

14. Оценка динамики показателей нестабильности атеросклеротической бляшки по данным МСКТ коронарных артерий на фоне терапии аторвастатином / Х.Э. Ел Манаа, М.С. Шабанова, Д.Г. Гогниева, А.Н. Рожков [и др.] // Российский электронный журнал лучевой диагностики. – 2018. – Т. 8. – № 3. С. 164-173. doi.org/10.21569/2222-7415-2018-8-3-164-173.

15. Сопоставление лучевых и нелучевых методов стратификации риска сердечно-сосудистых катастроф у бессимптомных пациентов / А.Н. Рожков, Д.Ю. Щекочихин, Е.С. Тебенькова [и др.] // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия – 2023. – Т. 16. – № 2. – С. 190-198.

16. Терновой, С.К. Выявление нестабильных бляшек в коронарных артериях с помощью мультиспиральной компьютерной томографии / С.К. Терновой // Российский Электронный Журнал Лучевой Диагностики. – 2014. – Т. 4. – № 1. – С. 7-13.

17. 10-Year Coronary Heart Disease Risk Prediction Using Coronary Artery Calcium and Traditional Risk Factors: Derivation in the MESA with Validation in the HNR Study and the DHS / R. L. McClelland, N. W. Jorgensen, M. Budoff, [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2015. – Vol. 66. – № 15. – P. 1643-1653.

18. 10-Year Follow-Up After Coronary Computed Tomography Angiography in Patients With Suspected Coronary Artery Disease / T. Finck, J. Hardenberg, A. Will, [et al.] // JACC Cardiovascular Imaging. – 2019. – Vol. 12. – № 7. – P. 1330-1338.

19. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice / M. F. Piepoli, A. W. Hoes, S. Agewall, [et al.] // European Heart Journal. – 2016. – Vol. 37. – № 29. – P. 2315-2381.

20. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines / D.K. Arnett, R.S. Blumenthal, M.A. Albert, [et al.] // Circulation. – 2019. – Vol. 140. – № 11. – P. 596-646.

21. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes / J. Knuuti, W. Wijns, A. Saraste, [et al.] // European Heart Journal. – 2020. – Vol. 41. – № 3. – P. 407-477.

22. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk / F.Mach, C.Baigent, A.L. Catapano, [et al.] // European Heart Journal. – 2020. – Vol. 41. – № 1. – P. 111-188.

23. 2021 AHA/ACC/ASE/CHEST/SAEM/SCCT/SCMR Guideline for the Evaluation and Diagnosis of Chest Pain / M. Gulati, P.D. Levy, D. Mukherjee, [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2021. – Vol. 78. – № 22. – P. 187–285.

24. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice / F. L. J. Visseren, F. Mach, Y. M. Smulders, [et al.] // European Heart Journal. – 2021. – Vol. 42. – № 34. – P. 3227-3337.

25. 2023 AHA/ACC/ACCP/ASPC/NLA/PCNA Guideline for the Management of Patients With Chronic Coronary Disease / S.S. Virani, L.K. Newby, S.V. Arnold, [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2023. – Vol. 82. – № 9. – P. 833-955.

26. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiovascular disease in patients with diabetes / N.Marx, M.Federici, K.Schütt, [et al.] // European Heart Journal. – 2023. – Vol. 44. – № 39. – P. 4043-4140.

27. A 10- and 15-year performance analysis of ESC/EAS and ACC/AHA cardiovascular risk scores in a Southern European cohort / C.Santos-Ferreira, R. Baptista, M. Oliveira-Santos, [et al.] // BMC Cardiovascular Disorders. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 1-9.

28. A functional variant in the 3'-UTR of angiopoietin-1 might reduce stroke risk by interfering with the binding efficiency of microRNA 211 / J. Chen, T. Yang, H. Yu, [et al.] // Human molecular genetics. – 2010. – Vol. 19. – № 12. – P. 2524-2533.

29. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure / E. van Rooij, L.B. Sutherland, N.Liu, [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – Vol. 103. – № 48. – P. 18255-18260.

30. Abrogation of Age-Induced MicroRNA-195 Rejuvenates the Senescent Mesenchymal Stem Cells by Reactivating Telomerase / M. Okada, H.W. Kim, K. Matsu-ura, [et al.] // Stem Cells. – 2016. – Vol. 34. – № 1. – P. 148-159.

31. Alani, A. Coronary calcium scoring and computed tomography angiography: current indications, future applications / A. Alani, M.J. Budoff // Coronary Artery Disease. – 2014. – Vol. 25. – № 6. – P. 529-539.

32. Altered microRNA dynamics in acute coronary syndrome / E. Kazimierczyk, A. Eljaszewicz, R. Kazimierczyk, [et al.] // Advances in interventional cardiology. – 2020. – Vol. 16. – № 3. – P. 287-293.

33. An analysis of calibration and discrimination among multiple cardiovascular risk scores in a modern multiethnic cohort / A.P. DeFilippis, R. Young, C.J. Carrubba, [et al.] // Annals of internal medicine. – 2015. – Vol. 162. – № 4. – P. 266-275.

34. Analysis of plasma miR-208a and miR-370 expression levels for early diagnosis of coronary artery disease / H. Liu, N. Yang, Z. Fei, [et al.] // Biomedical Reports. – 2016. – Vol. 5. – № 3. – P. 332-336.

35. Angiopoietin-1 aggravates atherosclerosis by inhibiting cholesterol efflux and promoting inflammatory response / X. Ou, J.-H. Gao, L.-H. He, [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2020. – Vol. 1865. – № 2. – P. 158535.

36. Angiopoietin-1 promotes atherosclerosis by increasing the proportion of circulating Gr1+ monocytes / T. Fujisawa, K. Wang, X.-L. Niu, [et al.] // Cardiovascular Research. – 2017. – Vol. 113. – № 1. – P. 81-89.

37. Assessment of microRNAs in patients with unstable angina pectoris / T. Zeller, T. Keller, F. Ojeda, [et al.] // European Heart Journal. – 2014. – Vol. 35. – № 31. – P. 2106-2114.

38. Association between circulating microRNAs, cardiovascular risk factors and outcome in patients with acute myocardial infarction / E. Goretti, M. Vausort, D.R. Wagner, [et al.] // International Journal of Cardiology. – 2013. – Vol. 168. – № 4. – P. 4548-4550.

39. Association between elevated plasma microRNA-223 content and severity of coronary heart disease / J.-F. Guo, Y. Zhang, Q.-X. Zheng, [et al.] // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. – 2018. – Vol. 78. – № 5. – P. 373-378.

40. Association between plasma levels of microRNA-126 and coronary collaterals in patients with coronary artery disease / X. Nie, L. Su, Y. Zhou, [et al.] // Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi. – 2014. – Vol. 42. – № 7. – P. 561-565.

41. Association of Circulating microRNAs with Coronary Artery Disease and Usefulness for Reclassification of Healthy Individuals: The REGICOR Study / I.R.

Dégano, A. Camps-Vilaró, I. Subirana, [et al.] // Journal of clinical medicine. – 2020. – Vol. 9. – № 5. – P. 1402.

42. Association of Circulating miR-145-5p and miR-let7c and Atherosclerotic Plaques in Hypertensive Patients / E.O. Z.Minin, L.R. Paim, E.C.P. Lopes, [et al.] // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11. – № 12. – P.1840.

43. Association of High-Density Calcified 1K Plaque With Risk of Acute Coronary Syndrome / A.R. van Rosendael, J. Narula, F.Y. Lin, [et al.] // JAMA Cardiology. – 2020. – Vol. 5. – № 3. – P. 282-290.

44. Association of plasma MiR-17-92 with dyslipidemia in patients with coronary artery disease / F. Liu, R. Li, Y. Zhang, [et al.] // Medicine. – 2014. – Vol. 93. – № 23. – P. 98.

45. Associations of Circulating MicroRNAs (miR-17, miR-21, and miR-150) and Chronic Kidney Disease in a Japanese Population / R. Fujii, H. Yamada, E. Munetsuna, [et al.] // Journal of Epidemiology. – 2020. – Vol. 30. – № 4 – P. 177-182.

46. At the heart of programming: the role of micro-RNAs / B. Siddeek, C. Mauduit, C. Yzydorczyk, [et al.] // Journal of Developmental Origins of Health and Disease. – 2018. – Vol. 9. – № 6 – P. 615-631.

47. Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction / F. Wang, G. Long, C. Zhao, [et al.] // PloS One. – 2014. – Vol. 9 (9). – Article e105734.

48. Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk Prediction in Disaggregated Asian and Hispanic Subgroups Using Electronic Health Records / F. Rodriguez, S. Chung, M. R. Blum, [et al.] // Journal of the American Heart Association. – 2019. – Vol. 8. – № 14. – Article e011874.

49. Atherosclerotic Plaque in Patients with Zero Calcium Score at Coronary Computed Tomography Angiography / F.S. Gabriel, L.F.G. Gonçalves, E.V. de Melo, [et al] // Arquivos Brasileiros de Cardiologia. – 2018. – Vol. 110. – № 5. – P. 420-427.

50. Atorvastatin Upregulates the Expression of miR-126 in Apolipoprotein E-knockout Mice with Carotid Atherosclerotic Plaque / X. Pan, R. Hou, A. Ma, [et al.] // Cellular and Molecular Neurobiology. – 2017. – Vol. 37. – № 1. – P. 29-36.

51. Berkan, Ö. Regulation of microRNAs in coronary atherosclerotic plaque / Ö. Berkan, S. Arslan, T. Lalem // Epigenomics. – 2019. – Vol. 11. – № 12. – P. 1387-1397.

52. Bhat, S.S. MicroRNA biogenesis: Epigenetic modifications as another layer of complexity in the microRNA expression regulation / S.S. Bhat, A. Jarmolowski, Z. Szweykowska-Kulińska // Acta Biochimica Polonica. – 2016. – Vol. 63. – № 4. – P. 717-723.

53. Bigler, M.R. The power of zero calcium score: Is there a need for improvement? / M.R. Bigler, C. Gräni // Journal of Nuclear Cardiology. – 2020. – Vol. 29, P. 334-336.

54. Boon, R.A. MicroRNA-126 in atherosclerosis / R.A. Boon, S. Dimmeler // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2014. – Vol. 34. – № 7. – P. 15-16.

55. Budoff, M. J. Prevalence of soft plaque detection with computed tomography / M.J. Budoff // Journal of the American College of Cardiology. – 2006. – Vol. 48. – № 2. – P. 319-321.

56. CAC Score Improves Coronary and CV Risk Assessment Above Statin Indication by ESC and AHA/ACC Primary Prevention Guidelines / A. A. Mahabadi, S. Möhlenkamp, N. Lehmann, [et al.] // JACC Cardiovascular Imaging. – 2017. – Vol. 10. – № 2. – P. 143-153.

57. Calcium density of coronary artery plaque and risk of incident cardiovascular events / M.H. Criqui, J.O. Denenberg, J.H. Ix, [et al.] // JAMA. – 2014. – Vol. 311. – № 3. – P. 271-278.

58. Canadian Cardiovascular Society guidelines for the diagnosis and management of stable ischemic heart disease / G. B. J. Mancini, G. Gosselin, B. Chow, [et al.] // The Canadian Journal of Cardiology. – 2014. – Vol. 30. – № 8. – P. 837-849.

59. Cardiometabolic risk is associated with atherosclerotic burden and prognosis: results from the partners coronary computed tomography angiography registry / E. Hulten, M.S. Bittencourt, D. O'Leary, [et al.] // Diabetes Care. – 2014. – Vol. 37. – № 2. – P. 555-564.

60. Cardiovascular Imaging for the Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease Events / L.A. Weber, M.K. Cheezum, J.M. Reese, [et al.] // Current Cardiovascular Imaging Reports. – 2015. – Vol. 8 – № 9. – P. 36.

61. Cardiovascular risk-estimation systems in primary prevention: do they differ? Do they make a difference? Can we see the future? / M.T. Cooney, A. Dudina, R. D'Agostino, [et al.] // Circulation. – 2010. – Vol. 122. – № 3. – P. 300-310.

62. Cavarretta, E. MicroRNAs, Angiogenesis and Atherosclerosis / E. Cavarretta, A. Lupieri, G. Frati // Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis // Springer International Publishing. – 2017. – Vol. 6. – P. 377-392.

63. Changes in the MicroRNA Profile Observed in the Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Patients after Laparoscopic Adjustable Gastric Banding / C. Nardelli, L. Iaffaldano, V. Pilone, [et al.] // Journal of Obesity. – 2017. – Vol. 2017. – Article e6754734.

64. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs / J. Wagner, M. Riwanto, C. Besler, [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2013. – Vol. 33. – № 6. – P. 1392-1400.

65. Circulating microRNA expression profiling and bioinformatics analysis of dysregulated microRNAs of patients with coronary artery disease / Z. Zhong, J. Hou, Q. Zhang, [et al.] // Medicine. – 2018. – Vol. 97 (27). – Article e11428.

66. Circulating microRNA expression profiling and bioinformatics analysis of patients with coronary artery disease by RNA sequencing / Z. Zhong, W. Zhong, Q. Zhang, [et al.] // Journal of Clinical Laboratory Analysis. – 2020. – Vol. 34 (1). – Article e23020.

67. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans / G.-K. Wang, J.-Q. Zhu, J.-T. Zhang, [et al.] // European heart journal. – 2010. – Vol. 31. – № 6. – P. 659-666.

68. Circulating microRNA-92a level predicts acute coronary syndrome in diabetic patients with coronary heart disease / W. Wang, Z. Li, Y. Zheng, [et al.] // Lipids in Health and Disease. – 2019. – Vol. 18 (1). – Article e22.

69. Circulating microRNAs as Novel Biomarkers for Atherosclerosis / S.G. Yilmaz, S. Isbir, A.T. Kunt, [et al.] // In Vivo. – 2018. – Vol. 32. – № 3. – P. 561-565.

70. Circulating microRNAs as potential biomarkers for coronary plaque rupture /S. Li, C. Lee, J. Song [et al.] // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8. – № 29. – P. 48145–48156.

71. Circulating microRNAs correlated with the level of coronary artery calcification in symptomatic patients / W. Liu, S. Ling, W. Sun, [et al.] // Scientific Reports. – 2015. – Vol. 5. – Article 16099.

72. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease / S. Fichtlscherer, S. de Rosa, H. Fox, [et al.] // Circulation Research. – 2010. – Vol. 107. – № 5. – P. 677-684.

73. Circulating microRNAs in suspected stable coronary artery disease: A coronary computed tomography angiography study / D. de Gonzalo-Calvo, D. Vilades, P. Martínez-Camblor, [et al.] // Journal of Internal Medicine. – 2019. – V. 286. – № 3. – P. 341-355.

74. Circulating MicroRNAs in Young Patients with Acute Coronary Syndrome / K.-L. Tong, Z.A.S. Mahmood, A.W.A. Wan, [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19 (5). – Article e1467.

75. Circulating miR-126 and miR-499 reflect progression of cardiovascular disease; correlations with uric acid and ejection fraction / M. Khanaghaei, F. Tourkianvalashani, S. Hekmatimoghaddam, [et al.] // Heart International. – 2016. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-9.

76. Circulating miR-155, miR-145 and let-7c as diagnostic biomarkers of the coronary artery disease / J. Faccini, J.-B. Ruidavets, P. Cordelier, [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – Article 42916.

77. Circulating MiR-17-5p, MiR-126-5p and MiR-145-3p Are Novel Biomarkers for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction / S. Xue, D. Liu, W. Zhu [et al.] // Frontiers in Physiology. – 2019. – Vol. 10. – Article 000123.

78. Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction / G. Long, F. Wang, Q. Duan, [et al.] // PloS One. 2012. – Vol. 7 (12). – Article e50926.

79. Circulating miR-765 and miR-149: potential noninvasive diagnostic biomarkers for geriatric coronary artery disease patients / M.S.A. Sheikh, K. Xia, F. Li, [et al.] // BioMed Research International. – 2015. – Vol. 2015. – Article 74301.

80. Circulating mircoRNA-21 as a predictor for vascular restenosis after interventional therapy in patients with lower extremity arterial occlusive disease / B. Zhang, Y. Yao, Q.-F. Sun, [et al.] // Bioscience Reports. – 2017. – Vol. 37(2): BSR20160502.

81. Circulating miRNA-21 as a diagnostic biomarker in elderly patients with type 2 cardiorenal syndrome / Y. Wang, Y. Liang, W. Zhao, [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10 (1). – Article 4894.

82. Conti, C.R. Silent ischemia: clinical relevance / C.R. Conti, A.A. Bavry, J.W. Petersen // Journal of the American College of Cardiology. – 2012. – Vol. 59. – № 5. – P. 435-441.

83. Coronary artery calcium score and coronary computed tomography angiography for patients with asymptomatic polyvascular (non-coronary) atherosclerosis / A. Cecere, G. Riccioni, N. Sforza, [et al.] / Singapore medical journal. – 2017. – Vol. 58. – № 9. – P. 528-534.

84. Coronary Artery Calcium Scoring: Is It Time for a Change in Methodology? / M.J. Blaha, M.B. Mortensen, S. Kianoush, [et al.] // JACC Cardiovascular Imaging. – 2017. – Vol. 10. – № 8. – P. 923-937.

85. Coronary Calcium Score and Cardiovascular Risk / P. Greenland, M.J. Blaha, M.J. Budoff, [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2018. – Vol. 72. – № 4. – P. 434-447.

86. Coronary versus carotid artery plaques. Similarities and differences regarding biomarkers morphology and prognosis / F. Sigala, E. Oikonomou, A. S. Antonopoulos, [et al.] // Current Opinion in Pharmacology. – 2018. – Vol. 39. – P. 9-18.

87. Correlation of coronary calcification and angiographically documented stenoses in patients with suspected coronary artery disease: results of 1,764 patients / R. Haberl, A. Becker, A. Leber, [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2001. – Vol. 37. – № 2. – P. 451-457.

88. Current Concepts of Vulnerable Plaque on Coronary CT Angiography / S. M. Yoo, H.Y. Lee, K.N. Jin, [et al.] // Cardiovascular Imaging Asia. – 2017. – Vol. 1. – № 1. – P. 4-12.

89. Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome / J. Gacoń, A. Kabłak-Ziembicka, E. Stępień, [et al.] // Kardiologia Polska. – 2016. – Vol. 74. – № 3. – P. 280-288.

90. Dell'Aversana, C. MicroRNA Expression Profiling Using Agilent One-Color Microarray / C. Dell'Aversana, C. Giorgio, L. Altucci // MicroRNA Profiling. – 2017. – Vol. 1509. – P. 169-183.

91. Differential Expression of MicroRNAs in Endarterectomy Specimens Taken from Patients with Asymptomatic and Symptomatic Carotid Plaques / B. Markus, K. Grote, M. Worsch, [et al.] // PloS One. – 2016. – Vol. 11 (9). – Article e0161632.

92. Differential expression of vascular smooth muscle-modulating microRNAs in human peripheral blood mononuclear cells: novel targets in essential hypertension / J.E. Kontaraki, M.E. Marketou, E.A. Zacharis, [et al.] // Journal of Human Hypertension. – 2014. – Vol. 28. – № 8. – P. 510-516.

93. Differential microRNA expression profiles in peripheral arterial disease / P.W. Stather, N. Sylvius, J.B. Wild, [et al.] // Circulation. Cardiovascular Genetics. – 2013. – Vol. 6. – № 5. – P. 490-497.

94. Differentiation of severe coronary artery calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis / M. Coylewright, K. Rice, M.J. Budoff, [et al.] // Atherosclerosis. – 2011. – Vol. 219. – № 2. – P. 616-622.

95. Dorn, G.W. MicroRNAs in cardiac disease / G.W. Dorn // Translational Research : the journal of laboratory and clinical medicine. – 2011. – Vol. 157. – № 4. – P. 226-235.

96. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs / M.I.F.J. Oerlemans, A. Mosterd, M.S. Dekker, [et al.] // EMBO Molecular Medicine. – 2012. – Vol. 4. – № 11. – P. 1176-1185.

97. Early Detection of Coronary Artery Disease by Micro-RNA Analysis in Asymptomatic Patients Stratified by Coronary CT Angiography / A.J. Patterson, M.A. Song, D. Choe, [et al.] // Diagnostics. – 2020. – Vol. 10 (11). – P.875.

98. Effect of atorvastatin on microRNA 221/222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease / Y. Minami, M. Satoh, C. Maesawa, [et al.] // European Journal of Clinical Investigation. – 2009. – Vol. 39. – № 5. – P. 359-367.

99. Effect of miR-195 on proliferation and adipogenic differentiation of hADSCs / P. Hu, X. Tan, J. Li, [et al.] // Int J Clin Exp Pathol. – 2016. – Vol. 9. – № 2. – P.1204-1212.

100. Effect of miR-195-5p on cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure by regulating TGF-β1/Smad3 signaling pathway / C. Xie, H. Qi, L. Huan, [et al.] // Bioscience Reports. – 2020. – Vol. 40 (5). – URL: https://doi.org/10.1042/BSR20200566. Текст : электронный.

101. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome / F. Sanchis-Gomar, C. Perez-Quilis, R. Leischik, [et al.] // Annals of translational medicine. – 2016. – Vol. 4. – № 13. – P. 256-268.

102. ERK1/2 inhibition reduces vascular calcification by activating miR-126-3p-DKK1/LRP6 pathway / P. Zeng, J. Yang, L. Liu, [et al.] // Theranostics. – 2021. – Vol. 11. – № 3. – P. 1129-1146.

103. Esquela-Kerscher, A. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer / A. Esquela-Kerscher, F.J. Slack // Nature Reviews Cancer. – 2006. – Vol. 6. – № 4. – P. 259-269.

104. Evaluation of microRNA Expression Features in Patients with Various Types of Arterial Damage: Thoracic Aortic Aneurysm and Coronary Atherosclerosis /

E.A.V. Ngo Bilong, A.N. Rozhkov, D.Yu. Shchekochikhin, [et al.] // J. Pers. Med. – 2023. – Vol. 13. – № 7. – P. 1161.

105. Expression of circulating miR-486 and miR-150 in patients with acute myocardial infarction / R. Zhang, C. Lan, H. Pei, [et al.] // BMC Cardiovascular Disorders. – 2015. – Vol. 15(1) – Article e51.

106. Expression of inflammatory factors and oxidative stress markers in serum of patients with coronary heart disease and correlation with coronary artery calcium score / D. Chen, M. Liang, C. Jin, [et al.] // Experimental and therapeutic medicine. 2020. – Vol. 20. – № 3. – P. 2127-2133.

107. Expression of miR-126 and its potential function in coronary artery disease / X. Wang, Y. Lian, X. Wen, [et al.] // African Health Sciences. – 2017. – Vol. 17. – № 2. – P. 474-480.

108. Expression Profiling and Clinical Significance of Plasma MicroRNAs in Diabetic Nephropathy / J. Wang, G. Wang, Y. Liang, [et al.] // Journal of Diabetes Research. – 2019. – Vol. 2019. – URL: https://doi.org/10.1155/2019/5204394. Текст : электронный.

109. Feinberg, M. W. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis / M. W. Feinberg, K. J. Moore // Circulation Research. – 2016. –Vol. 118. – № 4. – P. 703-720.

110. Flowers, E. Measurement of MicroRNA: a regulator of gene expression/ E. Flowers, E. S. Froelicher, B. E. Aouizerat // Biological Research for Nursing. – 2013. – Vol. 15. – № 2. – P. 167-178.

111. Folsom, A. R. Classical and novel biomarkers for cardiovascular risk prediction in the United States/ A.R. Folsom // Journal of epidemiology. – 2013. – Vol. 23. – № 3. – P. 158-162.

112. Framingham, SCORE, and DECODE risk equations do not provide reliable cardiovascular risk estimates in type 2 diabetes / R.L. Coleman, R.J. Stevens, R. Retnakaran, [et al.] // Diabetes care. – 2007. – Vol. 30. – № 5. – P. 1292-1293.

113. Frequency and risk fators associated with atherosclerotic plaques in patients with a zero coronary artery calcium score / C.-K Chen, Y.-S. Kuo, C.-A. Liu,

[et al.] // Journal of the Chinese Medical Association: JCMA. – 2012. – Vol. 75. – № 1. – P. 10-15.

114. Garvey, W.T. MicroRNA-150 Regulates Lipid Metabolism and Inflammatory Response / W.T. Garvey // Journal of Metabolic Syndrome. – 2014. – Vol. 3. – № 1. – P. 1-7.

115. Gene expression profiling in whole blood of patients with coronary artery disease / C. Taurino, W.H. Miller, M.W. McBride, [et al.] // Clinical Science. – 2010. – Vol. 119. – № 8. – P. 335-343.

116. Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis / A. Wagschal, S. H. Najafi-Shoushtari, L. Wang L, [et al.] // Nature Medicine. – 2015. – Vol. 21. – № 11. – P. 1290-1297.

117. Ginghina, C. Modern risk stratification in coronary heart disease / C. Ginghina, I. Bejan, C.D. Ceck // Journal of Medicine and Life. – 2011. – Vol. 4. – № 4. – P. 377-386.

118. Giral, H. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis / H. Giral, A. Kratzer, U. Landmesser // Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2016. – Vol. 30. – № 5 – P. 665-676.

119. Hao, X.-Z. Identification of miRNAs as atherosclerosis biomarkers and functional role of miR-126 in atherosclerosis progression through MAPK signalling pathway / X.-Z. Hao, H.-M Fan // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2017. – Vol. 21. – № 11. – P. 2725-2733.

120. High density lipoprotein-associated miRNA is increased following Roux-en-Y gastric bypass surgery for severe obesity / J. H. Ho, K. L. Ong, L. F. Cuesta Torres, [et al.] // Journal of Lipid Research. – 2021. – Vol. 62. – P. 100043.

121. High-density lipoprotein remodelled in hypercholesterolaemic blood induce epigenetically driven down-regulation of endothelial HIF-1α expression in a preclinical animal model / S. Ben-Aicha, R. Escate, L. Casaní, [et al.] // Cardiovascular research. – 2020. – Vol. 116. – № 7. – P. 1288-1299.

122. Hochman, M. E. Screening for Coronary Artery Disease in Asymptomatic Patients with Diabetes / M. E. Hochman // 50 Studies Every Doctor Should Know: The

Key Studies that Form the Foundation of Evidence Based Medicine. – 2013. – P.231-234.

123. Hulsmans, M. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease / M. Hulsmans, P. Holvoet // Cardiovascular Research. – 2013. – Vol. 100. – № 1. – P. 7-18.

124. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction / G. Long, F. Wang, Q. Duan, [et al.] // International Journal of Biological Sciences. – 2012. – Vol. 8. – № 6. – 811-818.

125. Identification of a miRNA Based-Signature Associated with Acute Coronary Syndrome: Evidence from the FLORINF Study / M. Elbaz, J. Faccini, C. Laperche, [et al.] // Journal of clinical medicine. – 2020. – Vol. 9 – № 6. – P. 1674.

126. Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans / T. Li, H. Cao, J. Zhuang, [et al.] // Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry. – 2011. – Vol. 412. – № 1-2. – P. 66-70.

127. Implications of Coronary Artery Calcium Testing Among Statin Candidates According to American College of Cardiology/American Heart Association Cholesterol Management Guidelines: MESA / K. Nasir, M.S. Bittencourt, M.J. Blaha, [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2015. – Vol. 66. – № 15. – P. 1657-1668.

128. Improved risk stratification in prevention by use of a panel of selected circulating microRNAs / T. Keller, J.-N. Boeckel, S. Groß, [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 4511.

129. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex / I.J. MacRae, E. Ma, M. Zhou, [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – Vol. 105. – № 2. – P. 512–517.

130. Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis / F. Glowacki, G. Savary, V. Gnemmi, [et al.] // PloS One. – 2013. – Vol. 8 (2). – Article e0058014.

131. Incremental Prognostic Value of Coronary Computed Tomography Angiography: High-Risk Plaque Characteristics in Asymptomatic Patients / K.

Takamura, S. Fujimoto, T. Kondo, [et al.] // Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. – 2017. – Vol. 24. – № 11. – P. 1174-1185.

132. Incremental prognostic value of multi-slice computed tomography coronary angiography over coronary artery calcium scoring in patients with suspected coronary artery disease / J.M. van Werkhoven, J.D. Schuijf, O.Gaemperli, [et al.] // European Heart Journal. – 2009. – Vol. 30. – № 21. – P. 2622–2629.

133. Integrated microRNA-mRNA analysis of coronary artery disease / F. Chen, X. Zhao, J. Peng, [et al.] // Molecular biology reports. – 2014. – Vol. 41. – № 8. – P. 5505-5511.

134. Izawa, H. Plasma microRNA-100 as a biomarker of coronary plaque vulnerability – a new generation of biomarker for developing acute coronary syndrome / H. Izawa, T. Amano // Circulation Journal. – 2015. – Vol. 79. – № 2. – P. 303-304.

135. Kinetic signatures of microRNA modes of action / N. Morozova, A. Zinovyev, N. Nonne, [et al.] // RNA. – 2012. – Vol. 18. – № 9. – P. 1635-1655.

136. Laffont, B. MicroRNAs in the Pathobiology and Therapy of Atherosclerosis / B. Laffont, K.J. Rayner // Canadian Journal of Cardiology. – 2017. – Vol. 33. – № 3. – P. 313-324.

137. Li, B. microRNAs and cardiac stem cells in heart development and disease / B. Li, X. Meng, L. Zhang // Drug Discovery Today. – 2018. – Vol. 24. – № 1. – P. 233–240.

138. Li, X. Potential role of microRNA-181b on atherosclerosis / X. Li, G. Cao // Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi. – 2015. – Vol. 43. – № 6. – P. 516-520.

139. Li, Y. MicroRNAs in Common Human Diseases / Y. Li, K.V. Kowdley // Genomics, Proteomics & Bioinformatics. – 2012. – Vol. 10. – № 5. – P. 246-253.

140. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis / P. Libby // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2012. – Vol. 32. – № 9. – P. 2045-2051.

141. Libby, P. Requiem for the 'vulnerable plaque' / P. Libby, G. Pasterkamp // European Heart Journal. – 2015. – Vol. 36. – № 43. – P. 2984-2987.

142. Liu, N. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development / N. Liu, E.N. Olson // Developmental Cell. – 2010. – Vol. 18. – № 4. – P. 510-525.

143. Local MicroRNA Modulation Using a Novel Anti-miR-21-Eluting Stent Effectively Prevents Experimental In-Stent Restenosis / D. Wang, T. Deuse, M. Stubbendorff, [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2015. – Vol. 35. – № 9. – P. 1945-1953.

144. Long-Term All-Cause and Cause-Specific Mortality in Asymptomatic Patients with CAC ≥1,000: Results From the CAC Consortium / A.W. Peng, M. Mirbolouk, O.A. Orimoloye, [et al.] // JACC Cardiovascular Imaging. – 2020. – Vol. 13. – № 1(1). – P. 83-93.

145. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques / T. Quillard, G. Franck, T. Mawson, [et al.] // Current Opinion in Lipidology. – 2017. – Vol. 28. – № 5. – P. 434–441.

146. Michos, E. D. Use of the Coronary Artery Calcium Score in Discussion of Initiation of Statin Therapy in Primary Prevention / E.D. Michos, M.J. Blaha, R.S. Blumenthal // Mayo Clinic Proceedings. – 2017. – Vol. 92. – № 12. – P. 1831-1841.

147. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs / L.P. Lim, N.C. Lau, P. Garrett-Engele, [et al.] // Nature. – 2005. – Vol. 433. – P. 769-773.

148. MicroRNA 8059 as a marker for the presence and extent of coronary artery calcification / P. Howlett, J. K. Cleal, H. Wu, [et al.] // Open Heart. – 2018. – Vol. 5. – № 1. – Article e000678.

149. MicroRNA deregulation in symptomatic carotid plaque / P. Maitrias, V. Metzinger-Le Meuth, Z.A. Massy, [et al.] // Journal of Vascular Surgery. – 2015. – Vol. 62. – № 5. – P. 1245-1250.

150. MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease / F. Jansen, X. Yang, S. Proebsting, [et al.] // Journal of the American Heart Association. – 2014. – Vol. 3. – № 6. – Article e001249.

151. MicroRNA Expression Profile in CAD Patients and the Impact of ACEI/ARB / M. Weber, M.B. Baker, R.S. Patel, [et al.] // Cardiology Research and Practice. – 2011. – Vol. 2011. – № 6 – Article e532915.

152. MicroRNA expression profile of human advanced coronary atherosclerotic plaques / M.S. Parahuleva, C. Lipps, B. Parviz, [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – Article e7823.

153. MicroRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans / K. Bidzhekov, L. Gan, B. Denecke, [et al.] // Thrombosis and Haemostasis. – 2012. – Vol. 107. – № 4. – P. 619-625.

154. MicroRNA-100 Suppresses Chronic Vascular Inflammation by Stimulation of Endothelial Autophagy / F. Pankratz, C. Hohnloser, X. Bemtgen, [et al.] // Circulation Research. – 2018. – Vol. 122. – № 3. – P. 417-432.

155. MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis? / Y. Wei, M. Nazari-Jahantigh, P. Neth, [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2013. – Vol. 33. – № 3. – P. 449-454.

156. MicroRNA-126-3p/-5p Overexpression Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption in a Mouse Model of Middle Cerebral Artery Occlusion / J. Pan, M. Qu, Y. Li, [et al.] // Stroke. – 2020. – Vol. 51. – № 2. – P. 619-627.

157. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1 / A. Schober, M. Nazari-Jahantigh, Y. Wei, [et al.] // Nature Medicine. – 2014. – Vol. 20. – № 4. – P. 368-376.

158. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis / F. Lovren, Y. Pan, A. Quan, [et al.] // Circulation. – 2012. – Vol. 126. – № 11 (1). – P. 81-90.

159. MicroRNA-145 Protects against Myocardial Ischemia Reperfusion Injury via CaMKII-Mediated Antiapoptotic and Anti-Inflammatory Pathways / Z. Liu, B. Tao, S. Fan, [et al]. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2019. – Vol. 2019. – URL: https://doi.org/10.1155/2019/8948657. Текст : электронный.

160. MicroRNA-150 Inhibits the Activation of Cardiac Fibroblasts by Regulating c-Myb / P. Deng, L. Chen, Z. Liu, [et al.] // Cellular physiology and biochemistry. – 2016. – Vol. 38. – № 6. – P. 2103–2122.

161. MicroRNA-150 protects the heart from injury by inhibiting monocyte accumulation in a mouse model of acute myocardial infarction / Z. Liu, P. Ye, S. Wang, [et al.] // Circulation. Cardiovascular Genetics. – 2015. – Vol. 8. – № 1. – P. 11-20.

162. MicroRNA-150 targets ELK1 and modulates the apoptosis induced by ox-LDL in endothelial cells / B. Qin, Y. Shu, L. Xiao, [et al.] // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2017. – Vol. 429. – № 1–2. – P. 45-58.

163. MicroRNA 150-5p Improves Risk Classification for Mortality within 90 Days after Acute Ischemic Stroke / N. Scherrer, F. Fays, B. Muelle [et al]. // Journal of Stroke. – 2017. – Vol. 19. – № 3. – P. 323-332.

164. MicroRNA-16 suppresses the activation of inflammatory macrophages in atherosclerosis by targeting PDCD4 / X. Liang, Z. Xu, M. Yuan, [et al.] // International Journal of Molecular Medicine. – 2016. – Vol. 37. – № 4. – P. 967-975.

165. MicroRNA-181a-5p and microRNA-181a-3p cooperatively restrict vascular inflammation and atherosclerosis / Y. Su, J. Yuan, F. Zhang, [et al.] // Cell Death & Disease. – 2019. – Vol. 10. – № 5. – P. 365.

166. MicroRNA-181b Controls Atherosclerosis and Aneurysms Through Regulation of TIMP-3 and Elastin / K. Di Gregoli, N. N. Mohamad Anuar, R. Bianco, [et al.] // Circulation research. – 2017. – Vol. 120. – № 1. – P. 49-65.

167. MicroRNA-195 Regulates Metabolism in Failing Myocardium Via Alterations in Sirtuin 3 Expression and Mitochondrial Protein Acetylation / X. Zhang, R. Ji, X. Liao, [et al.] // Circulation. – 2018. – Vol. 137. – № 19. – P. 2052-2067.

168. MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation / Y.-S. Wang, H.-Y.J. Wang, Y.-C. Liao, [et al.] // Cardiovascular Research. – 2012. – Vol. 95. – № 4. – P. 517-526.

169. MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1α in the progression of atherosclerosis / Y. Xue, Z. Wei, H. Ding, [et al.] // Atherosclerosis. – 2015. – Vol. 241. – № 2. – P. 671-681.

170. MicroRNA-221/222 expression in atherosclerotic coronary artery plaque versus internal mammarian artery and in peripheral blood samples / A.E. Bildirici, S. Arslan, N. Özbilüm Şahin, [et al.] // Biomarkers. – 2018. – Vol. 23. – № 7. – P. 670-675.

171. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis / K.C. Vickers, S.R. Landstreet, M.G. Levin, [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. – 2014. – Vol. 111. – № 40. – P. 14518-14523.

172. MicroRNA-451a prevents activation of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human cardiomyocytes during pathological stress stimulation / N.R. Scrimgeour, A. Wrobel, M.J. Pinho, [et al.] // American Journal of Physiology. Cell Physiology. – 2020. – Vol. 318. – № 1. – P. 94-102.

173. MicroRNA-9 Inhibits Vulnerable Plaque Formation and Vascular Remodeling via Suppression of the SDC2-Dependent FAK/ERK Signaling Pathway in Mice With Atherosclerosis / R. Zhang, B. Song, X. Hong, [et al.] // Frontiers in Physiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 804.

174. MicroRNAs and cholesterol metabolism / K. J. Moore, K. J. Rayner, Y. Suárez, [et al.] // Trends in endocrinology and metabolism: TEM. – 2010. – Vol. 21. – № 12. – P. 699–706.

175. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins / K.C. Vickers, B.T. Palmisano, B.M. Shoucri, [et al.] // Nature cell biology. – 2011. – Vol. 13. – № 4. – P. 423-433.

176. MicroRNAs in atherosclerosis / A.A. Hosin, A. Prasad, L.E. Viiri, [et al]. // Journal of Vascular Research. – 2014. – Vol. 51. – № 5. – P. 338-349.

177. MicroRNAs in lipid metabolism / C. Fernández-Hernando, Y. Suárez, K.J. Rayner, [et al.] // Current Opinion in Lipidology. – 2011. – Vol. 22. – № 2. – P. 86-92.

178. MicroRNAs involved in the lipid metabolism and their possible implications for atherosclerosis development and treatment / J. Novák, J. Bienertová-Vašků, T. Kára, [et al.] // Mediators of Inflammation. – 2014. – Vol. 2014. – URL: https://doi.org/10.1155/2014/275867. Текст : электронный.

179. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting / C. Esau, S. Davis, S.F. Murray, [et al.] // Cell Metabolism. – 2006. – Vol. 3. – № 2. – P. 87-98.

180. MiR-126 Is Involved in Vascular Remodeling under Laminar Shear Stress / A. Mondadori dos Santos, L. Metzinger, O. Haddad, [et al.] // BioMed Research International. – 2015. – Vol. 2015(2). – Article e497280.

181. MiR-145-5p alleviates hypoxia/reoxygenation - induced cardiac microvascular endothelial cell injury in coronary heart disease by inhibiting Smad4 expression / L.-L. Li, C.-D. Mao, G.-P. Wang, [et al.] // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2020. – Vol. 24. – № 9. – P. 5008-5017.

182. MiR-145-5p regulates hypoxia-induced inflammatory response and apoptosis in cardiomyocytes by targeting CD40 / M. Yuan, L. Zhang, F. You, [et al.] // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2017. – Vol. 431. – № 1-2. – P. 123-131.

183. MiR-181b regulates atherosclerotic inflammation and vascular endothelial function through Notch1 signaling pathway / P. Sun, L. Li, Y.-Z. Liu, [et al.] // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2019. – Vol. 23. – № 7. – P. 3051-3057.

184. MiR-181d-5p Targets KLF6 to Improve Ischemia/Reperfusion-Induced AKI Through Effects on Renal Function, Apoptosis, and Inflammation / Y. Zhang, C. Li, C. Guan, [et al.] // Frontiers in Physiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 510.

185. miR-195 Has a Potential to Treat Ischemic and Hemorrhagic Stroke through Neurovascular Protection and Neurogenesis / H.-Y. Cheng, Y.-S.Wang, P.-Y. Hsu, [et al.] // Molecular therapy. Methods & clinical development. – 2019. – Vol. 13. – P. 121-132.

186. miR-195 inhibits macrophages pro-inflammatory profile and impacts the crosstalk with smooth muscle cells / J.P. Bras, A.M. Silva, G.A.Calin, [et al.] // PloS One. – 2017. – Vol. 12(11). – Article e0166530.

187. MiR-195-5p Promotes Cardiomyocyte Hypertrophy by Targeting MFN2 and FBXW7 / L. Wang, D. Qin, H. Shi, [et al.] // BioMed Research International. – 2019. – Vol. 2019(1). – Article e1580982.

188. MiR-206 Suppresses the Progression of Coronary Artery Disease by Modulating Vascular Endothelial Growth Factor Expression / M. Wang, Y. Ji, S. Cai, [et al.] // Medical Science Monitor. – 2016. – Vol. 22. – P. 5011-5020.

189. MiR-21 and miR-146a: The microRNAs of inflammaging and age-related diseases / F. Olivieri, F. Prattichizzo, A. Giuliani, [et al.] // Ageing Research Reviews. – 2021. – Vol. 70. – P. 101374-101393.

190. MiR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study / E. Raitoharju, L.-P. Lyytikäinen, M. Levula, [et al.] // Atherosclerosis. – 2011. – Vol. 219. – № 1. – P. 211-217.

191. MiR-223-3p and miR-122-5p as circulating biomarkers for plaque instability / S. Singh S, M.W.J. de Ronde, M.G.M. Kok, [et al.] // Open Heart. – 2020. – Vol. 7. – № 1. – Article e001223.

192. MiR-486 and miR-92a Identified in Circulating HDL Discriminate between Stable and Vulnerable Coronary Artery Disease Patients / L.S. Niculescu, N. Simionescu, G. M.Sanda, [et al.] // PloS One. – 2015. – Vol. 10 (10). – Article e0140958.

193. MiRNA 206 and miRNA 574-5p are highly expression in coronary artery disease / J. Zhou, G. Shao, X. Chen, [et al.] // Bioscience Reports. – 2015. – Vol. 36 (1). – Article e00295.

194. MiRNA-145 inhibits VSMC proliferation by targeting CD40 / X. Guo, D. Li, M. Chen, [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6(1). – Article e35302.

195. MiRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease / C. Schulte, S. Molz, S. Appelbaum, [et al.] // PloS One. – 2015. – Vol. 10 (12). – Article e0145930.

196. MiRNA-93-5p and other miRNAs as predictors of coronary artery disease and STEMI / J.F. O'Sullivan, A. Neylon, C. McGorrian, [et al.] // International Journal of Cardiology. – 2016. – Vol. 224. – P. 310-316.

197. Neves, P.O. Coronary artery calcium score: current status / P.O. Neves, J. Andrade, H. Monção // Radiologia Brasileira. – 2017. – Vol. 50. – № 3. – P. 182-189.

198. Nolan, T. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR / T. Nolan, R. E. Hands, S. A. Bustin // Nature protocols. – 2006. – Vol. 1. – № 3. – P. 1559-1582.

199. Noncanonical inhibition of caspase-3 by a nuclear microRNA confers endothelial protection by autophagy in atherosclerosis / D. Santovito, V. Egea, K. Bidzhekov, [et al.] // Science Translational Medicine. – 2020. – Vol. 12. – № 546. – P. 2294.

200. Noninvasive evaluation with multislice computed tomography in suspected acute coronary syndrome: plaque morphology on multislice computed tomography versus coronary calcium score / M.M. Henneman, J.D. Schuijf, G. Pundziute, [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2008. – Vol. 52. – № 3. – P. 216-222.

201. Overexpression of microRNA-145 in atherosclerotic plaques from hypertensive patients / D. Santovito, C. Mandolini, P. Marcantonio, [et al.] // Expert Opinion on Therapeutic Targets. – 2013. – Vol. 17. – № 3. – P. 217-223.

202. Palacio, D. Screening for coronary heart disease in asymptomatic patients using multidetector computed tomography: calcium scoring and coronary computed tomography angiography / D. Palacio, S. Betancourt, G.W. Gladish, // Seminars in Roentgenology. – 2015. – Vol. 50. – № 2. – P. 111-117.

203. Pathogenic role of microRNAs in atherosclerotic ischemic stroke: Implications for diagnosis and therapy / Q. Jiang, Y. Li, Q. Wu, [et al.] // Genes & Diseases. – 2021. – Vol. 9. – № 3 – P. 682-696.

204. Pepin, G. microRNA Decay: Refining microRNA Regulatory Activity / G. Pepin, M.P. Gantier // MicroRNA. – 2017. – Vol. 5. – № 3. – P. 167-174.

205. Peripheral blood miRNAs as a biomarker for chronic cardiovascular diseases / Y. Jiang, H. Wang, Y. Li, [et al.] // Scientific Reports. – 2014. – Vol. 4. – Article e5026.

206. Plaque Characterization by Coronary Computed Tomography Angiography and the Likelihood of Acute Coronary Events in Mid-Term Follow-Up / S. Motoyama, H. Ito, M. Sarai, [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2015. – Vol. 66. – № 4. – P. 337-346.

207. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction / T. Adachi, M. Nakanishi, Y. Otsuka, [et al.] // Clinical Chemistry. 2010. – Vol. 56. – №7. P. 1183–1185.

208. Plasma microRNA-100 is associated with coronary plaque vulnerability / T. Soeki, K. Yamaguchi, T. Niki, [et al.] // Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society. – 2015. – Vol. 79. – № 2. – P. 413-418.

209. Plasma MicroRNA-126-5p is Associated with the Complexity and Severity of Coronary Artery Disease in Patients with Stable Angina Pectoris / H.-Y. Li, X. Zhao, Y.-Z. Liu, [et al.] // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2016. – Vol. 39. – № 3. – P. 837-846.

210. Plasma miR-10a: A Potential Biomarker for Coronary Artery Disease / L. Luo, B. Chen, S. Li, [et al.] // Disease Markers. – 2016. – Vol. 2016. – URL: https://doi.org/10.1155/2016/3841927. Текст : электронный.

211. Plasma miR-142 predicts major adverse cardiovascular events as an intermediate biomarker of dual antiplatelet therapy / Q.-J. Tang, H.-P. Lei, H. Wu, [et al.] // Acta Pharmacologica Sinica. – 2019. – Vol. 40. – № 2. – P. 208-215.

212. Platelets in patients with premature coronary artery disease exhibit upregulation of miRNA340* and miRNA624* / B.M. Sondermeijer, A. Bakker, A. Halliani, [et al.] // PloS One. – 2011. – Vol. 6 (10). – Article e00225946.

213. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans / A.Z. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, [et al.] // Nature. – 1998. – Vol. 391(6669). – P. 806-811.

214. Prevalence of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with low-to-intermediate risk by 64-slice computed tomography / K. Iwasaki, T. Matsumoto, H. Aono, [et al.] // Coronary Artery Disease. – 2011. – Vol. 22. – № 1. – P. 18-25.

215. Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans / M.F. Mette, J. van der Winden, M.A. Matzke, [et al.] // The EMBO Journal. – 1999. – Vol. 18. – № 1. – P. 241-248.

216. Prognostic significance of subtle coronary calcification in patients with zero coronary artery calcium score: From the CONFIRM registry / D. Han, E. Klein, J. Friedman, [et al.] // Atherosclerosis. – 2020. – Vol. 309. – P. 33-38.

217. Prognostic value of coronary artery calcium score in symptomatic individuals: A meta-analysis of 34,000 subjects / M.S. Lo-Kioeng-Shioe, D.

Rijlaarsdam-Hermsen, R.T. van Domburg, [et al.] // International Journal of Cardiology. – 2020. – Vol. 299. – P. 56-62.

218. Prognostic Value of MicroRNAs in Coronary Artery Diseases: A Meta-Analysis / J.S. Kim, K. Pak, T.S. Goh, [et al.] // Yonsei Medical Journal. – 2018. – Vol. 59. – № 4. – P. 495-500.

219. Prognostic Value of Noninvasive Cardiovascular Testing in Patients With Stable Chest Pain: Insights From the PROMISE Trial (Prospective Multicenter Imaging Study for Evaluation of Chest Pain) / U. Hoffmann, M. Ferencik, J. E. Udelson, [et al.] // Circulation. – 2017. – Vol. 135. – № 24. – P. 2320-2332.

220. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction / A. Zampetaki, P. Willeit, L. Tilling, [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. – 2012. – Vol. 60. – № 4. – P. 290-299.

221. Protective Effect of let-7 miRNA Family in Regulating Inflammation in Diabetes-Associated Atherosclerosis / E. Brennan, B. Wang, A. McClelland, [et al.] // Diabetes. – 2017. – Vol. 66. – № 8. – P. 2266-2277.

222. Protective effects of let-7a and let-7b on oxidized low-density lipoprotein induced endothelial cell injuries / M.-H. Bao, Y.-W. Zhang, X.-Y. Lou, [et al.] // PloS One. – 2014. – Vol. 9 (9). – Article e0106540.

223. Qiu, X.-K. Alteration in microRNA-155 level corresponds to severity of coronary heart disease / X.-K. Qiu, J. Ma // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. – 2018. – Vol. 78. – № 3. – P. 219-223.

224. Raitoharju, E. MicroRNAs in the atherosclerotic plaque / E. Raitoharju, N. Oksala, T. Lehtimäki // Clinical Chemistry. – 2013. – Vol. 59. – № 12. – P. 1708-1721.

225. Rana, T.M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs / T.M. Rana // Nature reviews. Molecular Cell Biology. – 2007. – Vol. 8. – № 1. – P. 23-36.

226. Rayner, K.J. Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message / K.J. Rayner, E.J. Hennessy // Journal of Lipid Research. – 2013. – Vol. 54. – № 5. – P. 1174-1181.

227. Reclassification of 10-year coronary heart disease risk in a primary prevention setting: traditional risk factor assessment vs. coronary artery calcium scoring / A. Alashi, R. Lang, R. Seballos, [et al.] // European heart journal. – 2018. – № 39 (suppl_1). – P. 622.

228. Reduced atherosclerosis lesion size, inflammatory response in miR-150 knockout mice via macrophage effects / F.-H. Gong, W.-L. Cheng, H. Wang, [et al.] // Journal of Lipid Research. – 2018. – Vol. 59. – № 4. – P. 658-669.

229. Reduced levels of microRNAs miR-124a and miR-150 are associated with increased proinflammatory mediator expression in Krüppel-like factor 2 (KLF2)-deficient macrophages / P. Manoharan, J. E. Basford, R. Pilcher-Roberts, [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289. – № 45. – P. 31638-31646.

230. Reid, G. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers / G. Reid, M.B. Kirschner, N. van Zandwijk // Critical reviews in Oncology/Hematology. – 2011. – Vol. 80. – № 2. – P. 193-208.

231. Risk Assessment for Cardiovascular Disease With Nontraditional Risk Factors: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement / S.J. Curry, A.H. Krist, D.K. Owens, [et al.] // JAMA. – 2018. – Vol. 320. – № 3. – P. 272-280.

232. Role of miRNAs induced by oxidized low-density lipoproteins in coronary artery disease: the REGICOR Study / I.R. Dégano, I. Subirana, N. García-Mateo, [et al.] // Journal of Clinical Medicine. – 2019. – URL: https://doi.org/10.1101/19003749. Текст : электронный.

233. Romano, N. Quelling: Transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences / N. Romano, G. Macino // Molecular Microbiology. – 1992. – Vol. 6. – № 22. – P. 3343-3353.

234. SCCT guidelines for the performance and acquisition of coronary computed tomographic angiography: A report of the society of Cardiovascular Computed Tomography Guidelines Committee / S. Abbara, P. Blanke, C.D. Maroules, [et al.] // Journal of Cardiovascular Computed Tomography. – 2016. – Vol. 10. – № 6. – P. 435-449.

235. Schober, A. Mechanisms of MicroRNAs in Atherosclerosis / A. Schober, C. Weber // Annual Review of Pathology. – 2016. – Vol. 11. – P. 583-616.

236. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication / X. Chen, H. Liang, J. Zhang, [et al.] // Trends in cell biology. – 2012. – Vol. 22. – № 3. – P. 125-132.

237. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease / M. Cattaruzza, T.J. Guzik, W. Słodowski, [et al.] // Circulation research. – 2004. – Vol. 95. – № 8. – P. 841-847.

238. Shear Stress-Induced miR-143-3p in Collateral Arteries Contributes to Outward Vessel Growth by Targeting Collagen V-α2 / K. Troidl, T. Hammerschick, J. Albarran-Juarez, [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2020. – Vol. 40. – № 5. – P. 126-137.

239. Shirvani Samani, O. microRNA assays for acute coronary syndromes / O. Shirvani Samani, B. Meder // Diagnosis (Berl). – 2016. – Vol. 3. – № 4. – P. 183-188.

240. Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease / J. Ren, J. Zhang, N. Xu, [et al.] // PloS One. – 2013. – Vol. 8(12). – Article e0080738.

241. Silica nanoparticles trigger the vascular endothelial dysfunction and prethrombotic state via miR-451 directly regulating the IL6R signaling pathway / L. Feng, X. Yang, S. Liang, [et al.] // Particle and Fibre Toxicology. – 2019. – Vol. 16(1). – Article e16.

242. Small Things Matter: Relevance of MicroRNAs in Cardiovascular Disease / L.J.F. Peters, E.A.L. Biessen, M. Hohl, [et al.] // Frontiers in Physiology. – 2020. – Vol. 11. – Article 793.

243. Smetana, G. W. Should We Screen for Coronary Heart Disease in Asymptomatic Persons?: Grand Rounds Discussion From Beth Israel Deaconess Medical Center / G.W. Smetana, D.E. Cutlip, D.S. Pinto // Annals of Internal Medicine. – 2016. – Vol. 164. – № 7. – P. 479-487.

244. Subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with metabolic syndrome: The role of multi-slice computed tomography coronary angiography / A.

Reda, W. Abdou, A. Magdy, [et al.] // Atherosclerosis Supplements. – 2017. – Vol. 25. – P. 8-9.

245. Superior Risk Stratification With Coronary Computed Tomography Angiography Using a Comprehensive Atherosclerotic Risk Score / A.R. van Rosendael, L.J. Shaw, J.X. Xie, [et al.] // JACC Cardiovascular Imaging. – 2019. – Vol. 12. – № 10. – P. 1987-1997.

246. The ACC/AHA 2013 pooled cohort equations compared to a Korean Risk Prediction Model for atherosclerotic cardiovascular disease / K.J. Jung, Y. Jang, D.J. Oh, [et al.] // Atherosclerosis. – 2015. – Vol. 242. – № 1. – P. 367-375.

247. The diagnostic and prognostic value of coronary CT angiography in asymptomatic high-risk patients: a cohort study / F. Plank, G. Friedrich, W. Dichtl, [et al.] // Open Heart. – 2014. – Vol. 1(1). – Article e000096.

248. The diagnostic value of circulating microRNAs for middle-aged (40–60-year-old) coronary artery disease patients / A.S. Sayed A.S., K. Xia, F. Li, [et al.] // Clinics. – 2015. – Vol. 70. – № 4. – P. 257-263.

249. The investigation of the plasma miR-126 and miR-143 expression in patients with coronary heart disease / Z.R. Zhang, W. Yue, L. Weimin, [et al.] // Heart. – 2011. – Vol. 97(3). – Article 70.

250. The profile of circulating blood micrornas in outpatients with vulnerable and stable atherosclerotic plaques: associations with cardiovascular risks / A.N. Rozhkov, D.G. Gognieva, P.Yu. Kopylov, [et al.] // Non-Coding RNA. – 2022. – Vol. 8 – № 4. – P. 47.

251. The proper use of coronary calcium score and coronary computed tomography angiography for screening asymptomatic patients with cardiovascular risk factors / S.Y. Tay, P.-Y. Chang, W.T. Lao, [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7 (1). – Article 17653.

252. The real-time polymerase chain reaction / M. Kubista, J.M. Andrade, M. Bengtsson, [et al.] // Molecular Aspects of Medicine. – 2006. – Vol. 27. – № 2-3. – P. 95-125.

253. The role of microRNAs in human diseases / K.U. Tüfekci, M.G. Oner, R.L.J. Meuwissen, [et al.] // Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). – 2014. – Vol. 1107. – P. 33-50.

254. The transcardiac gradient of cardio-microRNAs in the failing heart / F.Z. Marques, D. Vizi, O. Khammy, [et al.] // European Journal of Heart Failure. – 2016. – Vol. 18. – № 8. – P. 1000-1008.

255. The Updated NICE Guidelines: Cardiac CT as the First-Line Test for Coronary Artery Disease / A. J. Moss, M. C. Williams, D. E. Newby, [et al.] // Current Cardiovascular Imaging Reports. – 2017. – Vol. 10. – № 5. – P. 15.

256. The up-regulation of endothelin-1 and down-regulation of miRNA-125a-5p, -155, and -199a/b-3p in human atherosclerotic coronary artery / L. Hao, X.-G. Wang, J.-D. Cheng, [et al.] // Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology. – 2014. – Vol. 23. – № 4. – P. 217-223.

257. The use of ct coronary angiography as a primary preventative strategy in patients with familial hypercholesterolaemia: A prospective introductory clinical study / M. Jordan, F. Shahid, Y.P. Teoh, [et al.] // Atherosclerosis. – 2015. – Vol. 241(1). – e160.

258. Tian, T. A review: microRNA detection methods / T. Tian, J. Wang, X. Zhou // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2015. – Vol. 13. – № 8. – P. 2226-2238.

259. Tian, Y. MicroRNAs in Cardiac Development and Function / Y. Tian // Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine. Elsevier. – 2018. – P. 340-348.

260. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs / S. de Rosa, S. Fichtlscherer, R. Lehmann, [et al.] // Circulation. – 2011. – Vol. 124. – № 18. – P. 1936-1944.

261. Transcoronary gradients of HDL-associated MicroRNAs in unstable coronary artery disease / S.A. Choteau, L.F. Cuesta Torres, J.Y. Barraclough, [et al.] // International journal of cardiology. – 2018. – Vol. 253. – P. 138-144.

262. Transcoronary gradients of vascular miRNAs and coronary atherosclerotic plaque characteristics / D.M. Leistner, J.-N. Boeckel, S.M. Reis, [et al.] // European Heart Journal. – 2016. – Vol. 37. – № 22. – P. 1738-1749.

263. Unique microRNA signature associated with plaque instability in humans / F. Cipollone, L. Felicioni, R. Sarzani, [et al.] // Stroke. – 2011. – Vol. 42. – № 9. – P. 2556-2563.

264. Upregulation of Circulating miR-195-3p in Heart Failure / X. He, J. Ji, T. Wang, [et al.] // Cardiology. – 2017. – Vol. 138. – № 2. – P. 107-114.

265. Use of cardiac CT and calcium scoring for detecting coronary plaque: implications on prognosis and patient management / S. Divakaran, M.K. Cheezum, E.A. Hulten, [et al.] // The British Journal of Radiology. – 2015. – Vol. 88. – № 1046. – P. 20140594.

266. Vasan, R. S. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations / R. S. Vasan // Circulation. – 2006. – Vol. 113. – № 19. – P. 2335-2362.

267. Vasudevan, S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs / S. Vasudevan // Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA. – 2012. – Vol. 3. – № 3. – P. 311-330.

268. Very High Coronary Artery Calcium (≥1000) and Association With Cardiovascular Disease Events, Non-Cardiovascular Disease Outcomes, and Mortality: Results From MESA / A.W. Peng, Z.A. Dardari, R.S. Blumenthal, [et al.] // Circulation. – 2021. – Vol. 143. – № 16. – P. 1571-1583.

269. Wang, Y.-L. Association of circulating microRNA-122 with presence and severity of atherosclerotic lesions / Y.-L. Wang, W. Yu // PeerJ. – 2018. – Vol. 6. – P. 5218.

270. Wei, Y. Pathogenic arterial remodeling: the good and bad of microRNAs / Y. Wei, A. Schober, C. Weber // American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. – 2013. – Vol. 304. – № 8. – P. 1050-1059.

271. Wilson, R. C. Molecular mechanisms of RNA interference / R.C. Wilson, J.A. Doudna // Annual Review of Biophysics. – 2013. – Vol. 42. – № 1. – P. 217-239.

272. Wu, H. miR-126 in Peripheral Blood Mononuclear Cells Negatively Correlates with Risk and Severity and is Associated with Inflammatory Cytokines as

well as Intercellular Adhesion Molecule-1 in Patients with Coronary Artery Disease / H. Wu, J. Zhang // Cardiology. – 2018. – Vol. 139. – № 2. – P. 110-118.

273. Xue, M. MicroRNAs, Long Noncoding RNAs, and Their Functions in Human Disease / M. Xue, Y. Zhuo, B. Shan // Methods in Molecular Biology. – 2017. – Vol. 1671. – P. 1-25.

274. Zhang, X. Conventional miRNA Detection Strategies / X. Zhang, H. Dong, Y. Tian // MicroRNA Detection and Pathological Functions. SpringerBriefs in Molecular Science. – 2015. – P. 23-35.

275. Zhang, X. MicroRNA Detection and Pathological Functions / X. Zhang, H. Dong, Y. Nian. // SpringerBriefs in Molecular Science. – 2015. – P. 101.

276. Zhang, X. Other Emerging miRNA Detection Strategies / X. Zhang, H. Dong, Y. Tian // MicroRNA Detection and Pathological Functions: SpringerBriefs in Molecular Science. – 2015. – P. 77-85.

277. Zhang, X., Introduction / X. Zhang, H. Dong, Y. Tian // MicroRNA Detection and Pathological Functions: SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Berlin, Heidelberg. – 2015. – P. 1-6.

278. Zhao, W. MicroRNA-143/-145 in Cardiovascular Diseases / W. Zhao, S.-P. Zhao, Y.-H. Zhao // BioMed Research International. – 2015. – Vol. 38. – URL: https://doi.org/10.1155/2015/531740. Текст : электронный.

279. Zhao, Y. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis / Y. Zhao, E. Samal, D. Srivastava // Nature. – 2005. – Vol. 436. – № 7048. – P. 214-220.