

Новые подходы в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний

А. А. Кузьмина, Е. Г. Учасова, О. В. Груздева, Ю. А. Дылева

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире, и численность населения, страдающая этой патологией, в последние десятилетия лишь продолжает расти [1]. Атеросклеротические ССЗ манифестируют в молодом возрасте и прогрессируют в течение долгого времени [2]. Научно-исследовательские достижения в области поиска новых биомаркеров, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, за последние 30 лет позволили шагнуть далеко вперед с появлением высокотехнологичных и чувствительных методов, что позволило повысить качество диагностики и лечения пациентов данной категории [3]. Тем не менее полученные фундаментальные данные о новых биомаркерах ССЗ свидетельствуют о необходимости дальнейших исследований, подтверждающих их большой потенциал для клинического использования в будущем. Настоящий обзор посвящен описанию ряда современных технологий, применяемых в молекулярной биологии, объединенных одной целью — проанализировать всю совокупность процессов, происходящих в клетке или целом живом организме. Результатом применения таких технологий и подходов являются новые биомаркеры сердечно-сосудистой патологии и принципы их применения в современной клинической практике.

Мультимаркерные стратегии

Одновременное измерение и анализ нескольких биомаркеров могут давать более полную и точную клиническую информацию, поскольку отражают более широкую картину различных патофизиологических аспектов и, следовательно, будут более информативным. В нескольких исследованиях оценивалась эффективность мультимаркерных стратегий у лиц с хронической ишемической болезнью сердца (ИБС). В исследовании HOPE был оценен одновременно уровень маркеров, отражающих реакцию острой фазы, провоспалительные пути, активацию эндотелиальных клеток и сосудистую функцию в сравнении с классическими факторами риска [4]. Воспалительные маркеры СРБ и ИЛ-6 обладали ограниченной прогностической значимостью как факторы риска сердечно-сосудистых событий (хотя отдельно каждый из них значимо был связан с риском), тогда как включение NT-proBNP повышало качество прогностической модели риска сердечно-сосудистых событий.

Другой мультимаркерный подход для прогнозирования риска ИБС выявил более новые биомаркеры, отражающие воспаление (СРБ, ТФР-15), липидный обмен (аполипопротеины), почечную дисфункцию (цистатин С и креатинин), нарушение кардиоваскулярной функции и ремоделирование (включая натрийуретические пептиды и MR-proADM), представляющие собой различные патофизиологические пути развития ИБС [30]. Этот сравнительный анализ показал, что NT-proBNP, MR-proADM, цистатин С и MR-proANP и в большей степени их сочетание являются наиболее информативными биомаркерами, имеющими более высокую прогностическую значимость по сравнению с классическими факторами риска (ФР). Однако комбинация маркеров не увеличивала стратификацию риска по сравнению с отдельными биомаркерами, такими как NT-proBNP и ТФР-15 [5].

В исследовании LIPID была оценена прогностическая способность и динамика в течение года биомаркеров, отражающих микронекроз, воспаление, коагуляцию, гемодинамику, липидный обмен, нейрогуморальную активность и почечную функцию [6]. Исходный уровень биомаркеров, за исключением липопротеин-ассоциированной фосфолипазы A2 (ФЛ-А2)) и липопротеина (а) (ЛП(а)), имел прогностическую ценность в отношении вторичных сердечно-сосудистых событий у пациентов с ИБС. Наиболее чувствительным был уровень BNP и тропонина I по сравнению с классическими ФР и другими клиническими данными. Уровень цистатина С, MR-proADM, D-димера и СРБ имел меньшую прогностическую ценность. Эти ассоциации наблюдались независимо от группы пациентов — плацебо или принимающие правастатин.

Несмотря на имеющиеся доказательства того, что некоторые биомаркеры могут добавлять статистически значимую информацию о прогнозе риска сердечно-сосудистых событий, помимо их диагностической ценности при остром инфаркте миокарда (ИМ) (например, тропонины) и сердечной недостаточности (СН) (например, BNP), прямое клиническое преимущество их оценки в обычной клинической практике не было четко определено.

Таким образом, данные большинства исследований с несколькими биомаркерами позволяют предположить, что объединение маркеров, отражающих различные сердечно-сосудистые процессы в одну общую панель(и), может улучшить стратификацию риска пациентов с хронической ИБС.

Биомаркеры на основе омикс-технологий

Значительный интерес представляют новые биомаркеры для улучшения стратификации риска и принятия врачебных решений и выбора терапевтической тактики лечения [7]. Внедрение новых биомаркеров в клиническую практику находится в стадии разработки, и в настоящее время ведутся интенсивные биомедицинские исследования. Высокопроизводительные технологии, позволяющие оценивать большие панели маркеров в масштабе всего генома, — «омикс-технологии» — открывают новые профили биомаркеров [8]. Новейшие технологии позволяют изучать гены (геномика), транскрипты генов (транскриптомика), белки (протеомика),

метаболиты (метабономика) и липиды (липидономика) и тем самым открывать новые биомаркеры. Преимущество омикс-технологий по сравнению с традиционными подходами заключается в их широком применении не только для циркулирующих белков, но и для любых других молекул, например, РНК, а также в их способности одновременно анализировать большое количество молекул [9].

Таким образом, идентификация новых биомаркеров с помощью омикс-технологий может дать информацию о молекулярных и патофизиологических механизмах развития острых и хронических сердечно-сосудистых заболеваний.

Геномные биомаркеры

Геномные вариации, в основном так называемые однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), являются доминантными маркерами генетической изменчивости у людей, и множественные исследования больших геномных ассоциаций (GWAS) позволили изучить влияние геномных вариаций на хронические ССЗ. GWAS — это исследования картирования генов, которое оценивает доказательства связи между геномными вариантами и статусом заболевания или клиническими фенотипами. По своему замыслу GWAS предоставляет собой обзор эффектов геномных вариантов. Исследования GWAS стали возможны благодаря появлению высокопроизводительных платформ для генотипирования на основе микрочипов, которые позволяют оценивать миллионы генотипов в одном эксперименте и, в настоящее время, с помощью методов секвенирования, включая секвенирование экзона и всего генома, охватывать весь геном. Однако успех таких исследований напрямую зависит от размера выборки исследуемой популяции, частоты встречаемости аллелей в составе однонуклеотидных полиморфизмов, степени неравновесного сцепления между полиморфизмами и от эффектов аллелей [10]. Метаанализ результатов GWAS многих отдельных исследований показал, что чем больше размер выборки, тем точнее анализ [10]. Метаанализ исследований CARDIoGRAM (Coronary ARtery Disease Genome wide Replication and Meta-analysis), C4D (консорциумы по заболеванию коронарных артерий) и совместный консорциум CARDIoGRAMplusC4D позволили изучить более 56 однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с хроническими ССЗ с высокой статистической значимостью [11]. Патофизиологические пути, связанные с идентифицированными областями генома, включают воспаление, метаболизм липидов, ремоделирование сосудов и передачу сигналов оксида азота (NO)/циклического гуанозинмонофосфата (cGMP) [11]. Наиболее заметный геномный регион с самым высоким популяционным риском, идентифицированный до настоящего времени, находится на хромосоме 9p21.3. Примечательно, что эта область генома не содержит аннотацию генов, а SNP в этой области не связаны с каким-либо установленным фактором риска ИБС [10]. Однако этот локус кодирует различные транскрипты длинной некодирующей РНК (lncRNAs) — ANRIL, которые функционируют при сосудистых патологиях [12]. Ассоциированные SNPs обнаруживаются рядом с последним экзоном ANRIL, и исследования показали, что SNP, локализованные в регионе 9p21, нарушают ингибирующий сайт связывания STAT1, что приводит к усилению экспрессии ANRIL [13]. Эти данные подтверждают, что генетические варианты, влияя на экспрессию генов, могут функционировать как генетические биомаркеры.

Другим важным маркером является пропротеин конвертаза субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9). PCSK9 участвует в метаболизме LDL-C, приводя к деградации рецепторов LDL-C. Мутации в гене PCSK9 приводят к сильным изменениям уровня LDL-C и, следовательно, к изменению риска хронических ССЗ [11]. Таким образом, ингибиторы PCSK9 являются многообещающими с точки зрения современных терапевтических концепций. Огромный прогресс, достигнутый в области геномных сердечно-сосудистых исследований, неизбежно приводит к вопросу о том, могут ли геномные варианты быть генетическими маркерами и улучшать оценку клинически важных сердечно-сосудистых исходов.

Поскольку большинство единичных генетических вариантов обычно объясняют лишь небольшую долю дисперсии, агрегированный мультилокусный генетический показатель риска может улучшить прогнозирование риска [14]. По сути, генетический показатель риска включает в себя суммирование информации по нескольким однонуклеотидным полиморфизмам, например, путем суммирования аллелей, определяющих риск (0, 1 или 2) во всех локусах [14]. Так была оценена ассоциация липидомодулирующих однонуклеотидных полиморфизмов, а также связанных с сахарным диабетом 2 типа, гипертонией и хроническими ССЗ [10, 14]. В исследованиях генетической оценки риска возникновения хронических ССЗ использовались ИБС-связанные однонуклеотидные полиморфизмы и идентифицированы 24-SNP, а также 46-SNP [15, 16]. В обоих исследованиях показана ассоциация генетических предикторов с инцидентом ИБС. Данные модели оценки риска значительно улучшали реклассификацию риска по сравнению с традиционными ФР. Однако оценка генетических показателей при вторичной профилактике показала, что генетические подходы не являются успешными в оценке прогноза у людей с предшествующей ИБС [17]. Очевидно, что геномика дала несколько ключевых идей о предполагаемых причинах и механизмах хронических ССЗ, однако в настоящее время ни один генетический маркер или генетическая оценка риска не готовы для широкого использования в качестве маркера риска при стабильной ИБС.

Транскриптомные биомаркеры

Транскриптом — совокупность всех транскриптов, синтезируемых одной клеткой или группой клеток, включая мРНК и некодирующие РНК. Транскриптомика изучает структуру и динамику транскриптома. Технические

достижения в области транскриптомики заключаются в одновременном изучении РНК-транскриптов и паттернов их экспрессии на уровне всего генома, что дает возможность лучше понять сложные биологические системы, а также имеющийся потенциал для идентификации и разработки новых биомаркеров.

Транскриптомные технологии включают методы, основанные на микроматрицах, где десятки тысяч транскриптов одновременно анализируются путем химического мечения молекул РНК и последующей геномной гибридизацией с зондами на микроматрице, — метода, позволяющего осуществлять полногеномное сканирование хромосомного дисбаланса. С помощью новых технологий секвенирования РНК, популяция РНК конвертирована в библиотеку кДНК, которая впоследствии секвенируется высокопроизводительным способом для получения коротких последовательностей, обеспечивая тем самым более глубокий анализ многообразия транскриптов. В области биомаркеров сердечно-сосудистой системы последние достижения позволили выявить несколько основанных на транскриптоме биомаркеров, которые потенциально могут использоваться в качестве клинических маркеров при хронической ИБС.

Биомаркером, первоначально идентифицированным с помощью транскриптомных технологий, является фактор роста и дифференциации-15 (ТФР-15), член суперсемейства цитокинов ТФР-β. ТФР-15 является стресс-чувствительным цитокином, экспрессируемым в сердечно-сосудистой системе. Анализ микрочипов показал, что экспрессия гена GDF-15 была повышена в NO-обработанных кардиомиоцитах при окислительном стрессе в перегруженных давлением левых желудочках (ЛЖ) мышей со стенозом аорты и у мышей с дилатационной кардиомиопатией [18].

Другим примером биомаркера на основе транскриптомики является растворимый ST2. Weinberg и соавт. [18] с помощью анализа микрочипов идентифицировали ген ST2 (также называемый рецептором ИЛ-33) в сердечных миоцитах, подвергнутых механическому стрессу. Растворимый ST2 является секретлируемым рецептором, принадлежащим к семейству рецепторов ИЛ-1, который регулирует воспаление и иммунный ответ, участвует в ремоделировании при сердечном стрессе [19, 20]. Растворимый ST2 в комплексе с ИЛ-33 вовлечен в патогенез ИБС, главным образом СН [21, 22]. Повышенный уровень sST2 и, следовательно, нарушение передачи сигналов ИЛ-33/ST2L приводят к гипертрофии сердца, фиброзу, ухудшению функции ЛЖ и артериальной гипертензии (АГ) [23, 24]. В исследовании Framingham Heart Study было показано, что уровень растворимого ST2 имеет гендерные различия, увеличивается с возрастом, при сахарном диабете (СД) и АГ [23]. Уровень растворимого ST2 добавляет прогностическую ценность к традиционным ФР в отношении сердечно-сосудистых событий и связан с неблагоприятным исходом у пациентов с хронической СН [19, 25]. В сочетании с дополнительными биомаркерами (MR-proADM, высокочувствительным тропонином Т и высокочувствительным СРБ) уровень ST2 обеспечивает более высокую прогностическую ценность у пациентов с СН [20].

GDF-15 и ST2 являются яркими примерами того, как транскриптомный анализ идентифицировал биомаркеры сердца, которые находятся на пути к валидации и клиническому применению.

Экспрессия ключевых генов

Группирование нескольких мессенджерных РНК (мРНК) может отражать более широкую картину патофизиологических механизмов и путей и способствовать пониманию патофизиологии заболевания и разработке новых терапевтических тактик. Следовательно, комбинация различных мРНК с экспрессией ключевых генов может оказаться мощным биомаркером ИБС. На сегодняшний день был опубликован ряд исследований, посвященных профилированию экспрессии генов цельной крови для выявления лиц с высоким риском развития ИБС. Стремясь исследовать степень, в которой паттерны экспрессии генов в периферической крови могут отражать тяжесть ИБС, Sinnavee et al. [26] идентифицировали и впоследствии протестировали 160 ключевых генов при ангиографически документированной ИБС. Молекулярные сигнальные пути, охватываемые этими 160 генами, включали ангиогенез, воспалительный ответ, апоптоз, клеточную адгезию, рост клеток, остановку клеточного цикла, межклеточную коммуникацию, липидный гомеостаз и иммунный ответ. В общей сложности 35 генов показали дифференциальную экспрессию в цельной крови индивидуумов с ИБС с изменениями путей кроветворения, убиквитинирования, апоптоза и врожденного иммунного ответа [27]. В исследовании PREDICT была исследована экспрессия 23 генов в цельной крови и они были подтверждены для оценки обструктивной ИБС у пациентов без сахарного диабета.

Эффективность этой оценочной шкалы риска была дополнительно оценена в многоцентровом исследовании COMPASS среди лиц с ССЗ, использующих антикоагуляционную терапию, на предмет диагностической точности при направлении пациентов на перфузию миокарда [28]. Этот показатель экспрессии генов был значимым предиктором ИБС и при заданном пороге ассоциировался с высокой чувствительностью и отрицательной прогностической значимостью, что делает этот показатель чрезвычайно многообещающим и одним из лучших примеров биомаркеров на основе транскриптомики в сердечно-сосудистой патологии на сегодняшний день. Однако при сравнении генов, идентифицированных в подобных исследованиях, стало очевидным, что существуют небольшие расхождения в интерпретации полученных данных. Ряд причин объясняет эти расхождения. Во-первых, мультиплексные тесты часто являются сложными и содержат несколько этапов обработки пробы, операторов, типов реагентов, которые могут повлиять на изменчивость анализа. Во-вторых, отсутствие

согласованности в клиническом фенотипе заболевания может вносить основной вклад в различные результаты исследования. Например, использование разных контрольных групп или их отсутствие может приводить к снижению выявления истинных результатов. Кроме того, большое разнообразие доступных технологий оценки экспрессии генов может также приводить к расхождению результатов. Поэтому необходимо использование стандартизированных контрольных групп, важна также клиническая валидация в различных технологических условиях эксперимента, что будет являться предпосылками для клинического внедрения транскриптомных биомаркеров.

Некодирующая РНК

РНК долгое время считалась молекулой-посредником между генами и белками, где РНК транскрибируется с ДНК на мРНК и впоследствии транслируется в белок [14]. Однако в последние годы были охарактеризованы некодирующие виды РНК (нкРНК) (помимо транспортной и рибосомальной РНК), включая микроРНК (miRNAs) [29], длинные некодирующие РНК (lncRNAs) [13] и большинство циклических РНК (circRNAs) [30]. Некодирующие РНК могут представлять собой небольшие молекулы длиной от 20 до 23 нт (miRNAs), молекулы длиннее 200 нт (lncRNAs) или могут образовывать ковалентно замкнутые кольцевые молекулы РНК (circRNAs) [30]. Общее между видами нкРНК то, что они являются непротеиновыми кодирующими транскриптами с регуляторными функциями важных клеточных физиологических и патологических процессов. нкРНК соответствуют нескольким критериям, по которым следует рассматривать их как потенциальные биомаркеры:

- 1) некоторые виды количественно изменяются при сердечно-сосудистых заболеваниях;
- 2) демонстрируют паттерны экспрессии, специфичные для органов и клеток, и, таким образом, могут выступать в качестве индикаторов патогенных процессов [31];
- 3) легко доступны;
- 4) способны длительно храниться, многократно замораживаться/размораживаться, имеют различные значения pH и показывают высокую степень стабильности в жидкостях организма [32].

Высвобождение нкРНК во внеклеточные компартменты, в частности в кровоток, представляет возможность неинвазивного обнаружения и использования их в качестве биомаркеров заболевания. Многочисленные исследования посвящены изучению нкРНК при ССЗ как циркулирующих биомаркеров, что делает возможным внедрение их в клиническую практику для оценки заболеваний [33].

МикроРНК

На сегодняшний день miRNAs являются наиболее исследованными некодируемыми нкРНК. С момента их открытия в 1993 г. были аннотированы около 1800 miRNAs (см. <http://www.mirbase.org/>). МикроРНК продуцируются всеми типами клеток и взаимодействуют главным образом с 3'-нетранслируемой областью кодирующих белок генов, тем самым ингибируя трансляционный процесс. Потенциал циркулирующих miRNAs как сердечно-сосудистых биомаркеров широко изучен. Например, у пациентов со стабильной ИБС обнаружено снижение уровня miR-126 и членов miR-17-92a, кластера miR-145-5p [9]. В другом исследовании показана значимость miRNAs для выявления нестабильной стенокардии и стабильной ИБС: более высокий уровень miRNA-21, miRNA-133a/b, miRNA-199a и более низкий уровень miRNA-145, miRNA-155 [34]. Поскольку исследуемые когорты были немногочисленны, необходима валидация в более крупных когортах. Однако, в соответствии с этим исследованием, более низкий уровень miRNA-145 и miRNA-155 показал обратную корреляцию с показателями тяжести ИБС [34]. В другом крупном исследовании было оценено значение восьми miRNAs, ранее показанных для диагностики острого коронарного синдрома, для стратификации вторичных коронарных событий у пациентов с ИБС [35]. MiR-132, miR-140-3p и miR-201 были ассоциированы с сердечно-сосудистой смертью.

Аналогичным образом, у пациентов с СН был оценен потенциал miRNAs в качестве циркулирующих биомаркеров. Скрининг miRNAs у пациентов с СН выявил 186 циркулирующих мкРНК [33], среди которых miR-423-5p, miR-320a, miR-22 и miR-92b были активированы у пациентов с СН по сравнению со здоровыми лицами. Впоследствии была успешно разработана шкала риска СН на основе этих miRNAs. Показана значительная связь с некоторыми параметрами СН, такими как NT-proBNP, широкий комплекс QRS и дилатация ЛЖ [33]. Эти miRNAs также были идентифицированы в дополнительных исследованиях с участием пациентов с СН [36–38], что указывает на их специфическую роль в основных молекулярных путях формирования СН. Исследования одиночных miRNAs показали потенциал ключевых miRNAs в качестве биомаркеров ИБС, в основном это miR-126, miR-223 и miR-197 [39, 40]. Результаты, полученные в этих исследованиях, подчеркивают огромный потенциал и клиническую значимость использования miRNAs в качестве биомаркеров ИБС. Тем не менее все еще существует необходимость в более крупных эпидемиологических и клинических исследованиях для оценки и подтверждения полученных результатов.

Длинные некодируемые РНК

Длинные некодируемые РНК (miRNAs) транскрибируются либо из межгенных областей, либо из интронов генов, кодирующих белки, либо из антисмысловой цепи генов [13]. В отличие от последовательностей miRNA, первичная

последовательность lncRNAs низко консервативна. Установлено, что количество lncRNAs в клетках составляет приблизительно 9000 [41]. Однако количество изученных lncRNAs все еще очень ограничено. В общей сложности восемь различных транскриптов были оценены как потенциальные биомаркеры ИБС [34, 42]. Анализ транскриптомики пациентов с СН (2015 г.) подтвердил гипотезу о возможном использовании lncRNAs в качестве биомаркеров ИБС [42]. Известны большие межгенные некодируемые РНК, объединенные в группу LIPCAR, для которых доказана ассоциация с ремоделированием сердца. Высокий уровень таких РНК связан с более высоким риском сердечно-сосудистой смертности у пациентов с СН в дополнение к традиционным ФР. Другие lncRNAs, включая aHIF, ANRIL, KCNQ1OT1, MIAT и MALAT1, также идентифицируются в качестве потенциальных биомаркеров СН. Особый интерес из них представляет ANRIL, которая кодируется на хромосоме 9p21, геномной области, которая была идентифицирована GWAS как наиболее значимый локус восприимчивости к ИБС (см. раздел «Геномные биомаркеры»). Область 9p21 является областью с белок-кодирующими генами, и эффе́ктор этой области долгое время был неизвестен. Идентификация ANRIL обеспечила возможные функциональные связи с регионом 9p21. Генетические варианты (SNP), идентифицированные GWAS, нарушают сайт связывания транскрипционного фактора STAT1 в гене ANRIL, что приводит к усилению регуляции ANRIL [13]. Дальнейшие исследования, посвященные роли ANRIL, показали участие в жизнеобеспечении клеток, пролиферации, адгезии и апоптозе [13]. В 2015 г. длинные некодируемые РНК — CoroMarker [43] и lncPPARδ [44] — были идентифицированы в качестве прогностических биомаркеров ИБС. Несмотря на этот прогресс, клеточное происхождение циркулирующих lncRNAs часто неясно [45], и в настоящее время мало известно, в патогенез какой болезни они вовлечены.

Циклические РНК

Циклические РНК (circRNAs) являются продуктами альтернативного сплайсинга генов: два экзона соединяются не последовательно, а по принципу «голова к хвосту». На сегодняшний день все больше исследований указывают на то, что циклические РНК играют важную роль в регуляции различных биологических процессов. Транскрипты этого класса являются перспективными объектами для исследований и активно изучаются. Несмотря на то, что о существовании circRNAs было известно, этот класс нкРНК только недавно приобрел интерес в качестве потенциальных биомаркеров [30]. Благодаря своему кольцевому состоянию эти молекулы РНК демонстрируют эволюционную стабильность. Высокие уровни circRNAs воспроизводимо обнаруживаются в периферической крови и других биожидкостях организма. Исследование 2016 г. выявило более 9000 кандидатов circRNAs в тканях сердца [46]. Однако их регуляторная функция при ИБС по-прежнему остается в полной мере неисследованной, и предстоящие исследования должны оценить потенциал circRNAs в качестве клинически значимых биомаркеров. С учетом существующих преаналитических и аналитических факторов, влияющих на качество получаемых данных, как и для любых других биомаркеров, необходимо использование стандартизированных контрольных групп, независимых крупных выборок и клинических контрольных групп для валидации получаемых данных. Было показано, что имеются факторы, влияющие на уровень circRNAs. В частности, антиагрегантная терапия, лечение гепарином и статинами могут влиять на уровень циркулирующей РНК и кинетику высвобождения [34]. Основным ограничением в исследованиях некодируемой РНК является отсутствие в настоящее время стандартизации выделения образцов [47], методов обработки и обнаружения [48], а также эндогенного и внешнего контроля для нормализации данных. Поскольку стабильность уровня некодируемой РНК является образец-зависимой и разная в плазме, сыворотке, моче и клеточном материале [49], выбор биологического образца также необходимо тщательно исследовать.

Биомаркеры метаболомики

Метаболомика основана на профилировании всех низкомолекулярных метаболитов, присутствующих в биологических образцах. Большинство метаболитов представляют собой липиды (фосфолипиды, глицерофосфолипиды, сфинголипиды), ацилкарнитины, аминокислоты, биогенные амины, гормоны, желчные кислоты, жирные кислоты. По сравнению с другими омикс-технологиями количество метаболитов (3×10^3) меньше, чем генов (2×10^4), транскриптов ($> 10^6$), белков ($> 10^6$) и посттрансляционных модифицированных белков ($> 10^7$) [50]. С помощью современных подходов метаболомики оценено несколько сотен молекул, но ни одна технология не может измерить весь метаболом. Для обнаружения новых метаболитов или различий между ними используются nontargeted-подходы, которые осуществляются с помощью ядерного магнитного резонанса или масс-спектрометрии, в то время как при target-подходах используются заранее определенные панели метаболитов (например, панель метаболом или набор метаболитов Biocrates). Оценка конкретного выделенного метаболита не будет полностью информативной и затруднит правильную интерпретацию. Однако профили метаболитов (группы метаболитов) могут значительно улучшить интерпретацию измененного пути метаболизма, в особенности в сочетании с другими результатами омикс-технологий [51]. Что касается ИБС, с помощью метаболомики идентифицированы некоторые метаболиты как потенциально новые клинические биомаркеры [52, 53]. Так, метаболиты, полученные из пищевого холина и L-карнитина, играют важную роль в формировании дегенеративных поражений аорты у мышей и являются ФР развития ИБС у людей [54]. Shah et al. идентифицировали метаболиты аминокислот с разветвленной цепью и метаболиты цикла мочевины как потенциальные биомаркеры ИБС [55]. Особый интерес представляет исследование 2016 г., которое объединило target-метаболомику с генетическим скринингом и выявило локусы на хромосомах 2q34 и 5q14.1, связанные с уровнем метаболитов бетаина в плазме, а

также сниженным риском ИБС [54]. Эти данные свидетельствуют о том, что метаболизм глицина и цикл мочевины являются потенциальными метаболическими путями, участвующими в ИБС. Несмотря на то, что метаболомика еще находится в стадии становления в отношении биомаркеров ИБС, она имеет большой потенциал для клинического использования в ближайшем будущем.

Протеомика и липидомика

Есть несколько других областей омикс-исследований, интерес к которым все больше возрастает в области биомаркеров ИБС. Одной из областей является протеомика — анализ белкового профиля данного типа клеток, основанного на технологии масс-спектрометрии. Протеомика дает уникальное представление о болезнях, потому как белки и их биоферментные функции в значительной степени определяют фенотипическое разнообразие. Было подсчитано, что в протеоме плазмы человека представлено более 300 000 видов полипептидов человека. Особый интерес в исследованиях биомаркеров протеомики представляют посттрансляционные модификации, то есть изменения в белках (такие как фосфорилирование, ацетилирование или убиквитинилирование), произошедшие ковалентно и/или ферментативно, во время или после трансляции, которые регулируют активность, стабильность и фолдинг белков. По сравнению с другими омикс-подходами, описанными ранее, на сегодняшний день было проведено лишь небольшое количество исследований протеома, связанных с ИБС. Например, в образцах мочи были обнаружены более 100 пептидов у лиц с СН со сниженной фракцией выброса. Комбинация всех маркеров, значимо различаемых между пациентами с СН и контрольной группой, указывает на то, что протеом мочи может иметь диагностическую и прогностическую значимость при СН [56].

Кроме того, значимость некоторых посттрансляционных модификаций как потенциальных биомаркеров ИБС, например, гликозилирование, уже была показана [9]. Оценка полного спектра липидов может быть осуществлена с помощью масс-спектрометрии или технологий ядерного магнитного резонанса. Плазменные липиды солюбилизируются и диспергируются посредством их ассоциации со специфическими группами белков, например, с альбумином или липопротеинами плазмы [57]. Структурное разнообразие липидов отражается в огромных вариациях их физиологических функций [57]. Такие липиды, как HDL-C, LDL-C и Lp(a) являются важными молекулами, вовлеченными в физиологию ИБС, изучение всех форм липидов и липидного метаболизма представляет большой интерес в исследованиях ИБС биомаркеров.

В исследовании пациентов с ИБС с длительным периодом наблюдения были оценены различные виды церамидов (семейство восковых липидов), которые были ассоциированы с летальным исходом, что подтверждает прогностическую значимость этих биомаркеров независимо от традиционных ФР [57]. В этом исследовании было также оценено влияние гиполипидемической терапии на уровень липидов. Симвастатин снижал уровень плазменных церамидов примерно на 25%, но в группе эзетимиба подобных изменений выявлено не было. Дефицит PCSK9 был в значительной степени связан со сниженным уровнем холестерина липопротеидов низкой плотности (на 13%), что сопровождалось выраженным снижением на 20% уровня церамидов, что было связано с риском неблагоприятных исходов ИБС [58].

Заключение

Несмотря на широкое использование установленных биомаркеров, таких как NT-proBNP и сердечные тропонины, которые входят в рекомендации по диагностике СН и острого коронарного синдрома, определение уровня данных биомаркеров у пациентов со стабильной стенокардией и хронической ИБС — помимо определения липидов — не используется в клинической практике. На сегодняшний день выявлено несколько новых биомаркеров, включая экспрессию генов и некодируемых РНК, клиническая значимость которых подтверждается в различных исследованиях. Тем не менее необходимы дальнейшие исследования с тщательно продуманным дизайном и материалами исследования, стандартизированными аналитическими методами и, самое главное, валидацией в независимых и широкомасштабных исследованиях. Чтобы достичь применения биомаркера в клинической практике, необходимо ответить на основные вопросы о его клиническом потенциале, изложенные Morrow и de Lemos [59]:

1. Может ли врач оценить уровень биомаркера?
2. Добавляет ли биомаркер новую клиническую и прогностическую информацию к уже имеющимся?
3. Помогает ли биомаркер врачу управлять пациентами?

Литература

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> [accessed 23.07.16].
2. Balagopal P. B., de Ferranti S. D., Cook S., Daniels S. R., Gidding S. S., Hayman L. L. et al. Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association // *Circulation*. 2011, 123 (23): 2749–2769. DOI: 10.1161/cir.0b013e31821c7c64.
3. Goff D. C., Lloyd-Jones D. M., Bennett G., Coady S., D'Agostino R. B., Gibbons R. et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines // *Circulation*. 2014, 129: S49–73. DOI: 10.1161/01.cir.0000437738.63853.7a.

4. Blankenberg S., McQueen M. J., Smieja M., Pogue J., Balion C., Lonn E. et al. Comparative impact of multiple biomarkers and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in the context of conventional risk factors for the prediction of recurrent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study // *Circulation*. 2006, 114: 201–8. DOI: 10.1161/circulationaha.105.590927.
5. Schnabel R. B., Schulz A., Messow C. M., Lubos E., Wild P. S., Zeller T. et al. Multiple marker approach to risk stratification in patients with stable coronary artery disease // *Eur Heart J*. 2010, 31 (24): 3024–3031. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq322.
6. Tonkin A. M., Blankenberg S., Kirby A., Zeller T., Colquhoun D. M., Funke-Kaiser A. et al. Biomarkers in stable coronary heart disease, their modulation and cardiovascular risk: the LIPID biomarker study // *Int J Cardiol*. 2015, 201: 499–507. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.07.080.
7. Sarwar N., Butterworth A. S., Freitag D. F., Gregson J., Willeit P., Gorman D. N. et al. IL6R Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration: Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies // *Lancet*. 2012, 379: 1205–1213. DOI: 10.1016/s0140-6736(11)61931-4.
8. Valdes A. M., Glass D., Spector T. D. Omics technologies and the study of human ageing // *Nat Rev Genet*. 2013, 14: 601–607. DOI: 10.1038/nrg3553.
9. Hoefer I. E., Steffens S., Ala-Korpela M., Bäck M., Badimon L., Bochaton-Piallat M. L. et al. Novel methodologies for biomarker discovery in atherosclerosis // *Eur Heart J*. 2015, 36: 2635–42. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv236.
10. Zeller T., Blankenberg S., Diemert P. Genomewide association studies in cardiovascular disease an update // *Clin Chem*. 2011, 58 (1): 92–103. DOI: 10.1373/clinchem.2011.170431.
11. Kessler T., Vilne B., Schunkert H. The impact of genome-wide association studies on the pathophysiology and therapy of cardiovascular disease // *EMBO Mol Med*. 2016, 8: 688–701. DOI: 10.15252/emmm.201506174.
12. Chen H. H., Almontashiri N. A., Antoine D., Stewart A. F. Functional genomics of the 9p21.3 locus for atherosclerosis: clarity or confusion? // *Curr Cardiol Rep*. 2014, 16 (7): 502. DOI: 10.1007/s11886-014-0502-7.
13. Boon R. A., Jae N., Holdt L., Dimmeler S. Long noncoding RNAs: from clinical genetics to therapeutic targets? // *J Am Coll Cardiol*. 2016, 67: 1214–26. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.12.051.
14. Smith J. A., Ware E. B., Middha P., Beacher L., Kardina S. L. Current applications of genetic risk scores to cardiovascular outcomes and subclinical phenotypes // *Curr Epidemiol Rep*. 2015, 2: 180–190. DOI: 10.1007/s40471-015-0046-4.
15. Tikkanen E., Havulinna A. S., Palotie A., Salomaa V., Ripatti S. Genetic risk prediction and a 2-stage risk screening strategy for coronary heart disease // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013, 33: 2261–2266. DOI: 10.1161/atvbaha.112.301120.
16. Ganna A., Magnusson P. K., Pedersen N. L., de Faire U., Reilly M., Arnlöv J. et al. Multilocus genetic risk scores for coronary heart disease prediction // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013, 33: 2267–2272. DOI: 10.1161/atvbaha.113.301218.
17. Weijmans M., de Bakker P. I., van der Graaf Y. 3., Asselbergs F. W., Algra A., Jan de Borst G. et al. Incremental value of a genetic risk score for the prediction of new vascular events in patients with clinically manifest vascular disease // *Atherosclerosis*. 2015, 239: 451–458. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.008.
18. Siemeling M. A., Zeller T. Biomarkers of coronary artery disease: the promise of the transcriptome // *Curr Cardiol Rep*. 2014, 16 (8): 513. DOI: 10.1007/s11886-014-0513-4.
19. Sinning C., Zengin E., Zeller T., Schnabel R. B., Blankenberg S., Westermann D. Candidate biomarkers in heart failure with reduced and preserved ejection fraction // *Biomarkers*. 2015, 20: 258–65. DOI: 10.3109/1354750x.2015.1068856.
20. Jackson C. E., Haig C., Welsh P., Dalzell J. R., Tsorlalis I. K., McConnachie A. The incremental prognostic and clinical value of multiple novel biomarkers in heart failure // *Eur J Heart Fail*. 2016, 18 (12): 1491–1498. DOI: 10.1002/ehfj.543.
21. Копьева К. В., Гракова Е. В., Тепляков А. Т. Новые маркеры сердечной недостаточности: значение для диагностики и прогнозирования Nt-proBNP и интерлейкиновых рецепторов — членов семейства ST2 // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2018, 7 (1): 94–101. DOI: 10.17802/2306-1278-2018-7-1-94-101.
22. Дылева Ю. А., Груздева О. В., Учасова Е. Г., Кузьмина А. А., Каретникова В. Н. Стимулирующий фактор роста ST2 в кардиологии: настоящее и перспективы // *Лечащий Врач*. 2017, 11: 14–38.
23. Coglianese E. E., Larson M. G., Vasan R. S., Ho J. E., Ghorbani A., McCabe E. L. Distribution and clinical correlates of the interleukin receptor family member soluble ST2 in the Framingham Heart Study // *Clin Chem*. 2012, 58: 1673–1681. DOI: 10.1373/clinchem.2012.192153.
24. Ho J. E., Larson M. G., Ghorbani A., Cheng S., Vasan R. S., Wang T. J. et al. Soluble ST2 predicts elevated SBP in the community // *J Hypertens*. 2013, 31: 1431–1436. DOI: 10.1097/hjh.0b013e3283611bdf.
25. Wang T. J., Wollert K. C., Larson M. G., Coglianese E., McCabe E. L., Cheng S. et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: the Framingham Heart Study // *Circulation*. 2012, 126: 1596–604. DOI: 10.1161/circulationaha.112.129437.
26. Sinnaeve P. R., Donahue M. P., Grass P., Seo D., Vondersch J., Chibout S. D. et al. Gene expression patterns in peripheral blood correlate with the extent of coronary artery disease // *PloS One*. 2009, 4: e7037. DOI: 10.1371/journal.pone.0007037.
27. Joeannes R., Ying S., Huan T., Johnson A. D., Raghavachari N., Wang R. et al. Gene expression signatures of coronary heart disease // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013, 33: 1418–1426. DOI: 10.1161/atvbaha.112.301169.
28. Thomas G. S., Voros S., McPherson J. A., Lansky A. J., Winn M. E., Bateman T. M. et al. A blood-based gene expression test for obstructive coronary artery disease tested in symptomatic nondiabetic patients referred for

- yocardial perfusion imaging the COMPASS study // *Circ Cardiovasc Genet*. 2013, 6: 154–162. DOI: 10.1161/circgenetics.112.964015.
29. Kaudewitz D., Zampetaki A., Mayr M. MicroRNA biomarkers for coronary artery disease? *Curr Atheroscler Rep*. 2015, 17 (12): 70. DOI: 10.1007/s11883-015-0548-z.
 30. Memczak S., Papavasileiou P., Peters O., Rajewsky N. Identification and characterization of circular RNAs as a new class of putative biomarkers in human blood // *PloS One*. 2015, 10: e0141214. DOI: 10.1371/journal.pone.0141214.
 31. Van Rooij E. The art of microRNA research // *Circ Res*. 2011, 108: 219–234. DOI: 10.1161/circresaha.110.227496.
 32. Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., Fritz B. R., Wyman S. K., Pogosova-Agadjanyan E. L. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, 105: 10513–10518. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.
 33. Schulte C., Zeller T. MicroRNA-based diagnostics and therapy in cardiovascular disease-summing up the facts // *Cardiovasc Diagn Ther*. 2015, 5: 17–36. DOI: 10.3978/j.issn.2223-3652.2014.12.03.
 34. Busch A., Eken S. M., Maegdefessel L. Prospective and therapeutic screening value of non-coding RNA as biomarkers in cardiovascular disease // *Ann Transl Med*. 2016, 4: 236. DOI: 10.21037/atm.2016.06.06.
 35. Karakas M., Schulte C., Appelbaum S., Ojeda F., Lackner K. J., Münzel T. et al. Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease — results from the large AtheroGene study // *Eur Heart J*. 2017, 14: 38 (7): 516–523. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw250.
 36. Ellis K. L., Cameron V. A., Troughton R. W., Frampton C. M., Ellmers L. J., Richards A. M. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients // *Eur J Heart Fail*. 2013, 15: 1138–1147. DOI: 10.1093/eurjhf/hft078.
 37. Luo P., He T., Jiang R., Li G. MicroRNA-423-5p targets O-GlcNAc transferase to induce apoptosis in cardiomyocytes // *Mol Med Rep*. 2015, 12: 1163–1168. DOI: 10.3892/mmr.2015.3491.
 38. Luo P., Zhang W. MicroRNA4235p mediates H2O2-induced apoptosis in cardiomyocytes through OGlcNAc transferase // *Mol Med Rep*. 2016, 14: 857–864. DOI: 10.3892/mmr.2016.5344.
 39. Zampetaki A., Willeit P., Tilling L., Drozdov I., Prokopi M., Renard J. M. et al. Prospective study on circulating microRNAs and risk of myocardial infarction // *J Am Coll Cardiol*. 2012, 60 (4): 290–299. DOI: 10.1016/j.jacc.2012.03.056.
 40. Schulte C., Molz S., Appelbaum S., Karakas M., Ojeda F., Lau D. M. et al. miRNA-197 and miRNA-223 predict cardiovascular death in a cohort of patients with symptomatic coronary artery disease // *PloS One*. 2015, 10 (12): e0145930. DOI: 10.1371/journal.pone.0145930.
 41. Pennisi E. Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA // *Science*. 2012, 337: 1159–1161. DOI: 10.1126/science.337.6099.1159.
 42. Archer K., Broskova Z., Bayoumi A. S., Teoh J. P., Davila A., Tang Y. et al. Long non-coding RNAs as master regulators in cardiovascular diseases // *Int J Mol Sci*. 2015, 16: 23651–23667. DOI: 10.3390/ijms161023651.
 43. Yang Y., Cai Y., Wu G., Chen X., Liu Y., Wang X. et al. Plasma long non-coding RNA, CoroMarker, a novel biomarker for diagnosis of coronary artery disease // *Clin Sci (Lond)*. 2015, 129 (8): 675–685. DOI: 10.1042/cs20150121.
 44. Cai Y., Yang Y., Chen X., He D., Zhang X., Wen X. et al. Circulating «LncPPARdelta» from monocytes as a novel biomarker for coronary artery diseases // *Medicine (Baltimore)*. 2016, 95 (6): e2360. DOI: 10.1097/md.0000000000002360.
 45. Skroblin P., Mayr M. «Going long»: long non-coding RNAs as biomarkers // *Circ Res*. 2014, 115 (7): 607–609. DOI: 10.1161/circresaha.114.304839.
 46. Werfel S., Nothjunge S., Schwarzmayr T., Strom T. M., Meitinger T., Engelhardt S. Characterization of circular RNAs in human, mouse and rat hearts // *J Mol Cell Cardiol*. 2016, 98: 103–107. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.07.007.
 47. Häntzsch M., Tolios A., Beutner F., Nagel D., Thiery J., Teupser D. et al. Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and MiRNA profiles // *PloS One*. 2014, 9: e113298. DOI: 10.1371/journal.pone.0113298.
 48. Schwarzenbach H., da Silva A. M., Calin G., Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification // *Clin Chem*. 2015, 61: 1333–1342. DOI: 10.1373/clinchem.2015.239459.
 49. Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases // *Cell Res*. 2008, 18 (10): 997–1006. DOI: 10.1038/cr.2008.282.
 50. Atzler D., Schwedhelm E., Zeller T. Integrated genomics and metabolomics in nephrology // *Nephrol Dial Transplant*. 2014, 29: 1467–1474. DOI: 10.1093/ndt/gft492.
 51. Marcinkiewicz-Siemion M., Ciborowski M., Kretowski A., Musial W. J., Kaminski K. A. Metabolomics — A wide-open door to personalized treatment in chronic heart failure? // *Int J Cardiol*. 2016, 219: 156–163. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.06.022.
 52. Roberts L. D., Gerszten R. E. Toward new biomarkers of cardiometabolic diseases // *Cell Metab*. 2013, 18: 43–50. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.05.009.
 53. Wang Z., Klipfell E., Bennett B. J., Koeth R., Levison B. S., Dugar B. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease // *Nature*. 2011, 472: 57–63. DOI: 10.1038/nature09922.
 54. Hartiala J. A., Tang W. H., Wang Z., Crow A. L., Stewart A. F., Roberts R. et al. Genome-wide association study and targeted metabolomics identifies sex-specific association of CPS1 with coronary artery disease // *Nat Commun*. 2016, 7: 10558. DOI: 10.1038/ncomms10558.
 55. Shah S. H., Bain J. R., Muehlbauer M. J., Stevens R. D., Crosslin D. R., Haynes C. et al. Association of a peripheral

- blood metabolic profile with coronary artery disease and risk of subsequent cardiovascular events // *CircCardiovasc Genet*. 2010, 3 (2): 207–214. DOI: 10.1161/circgenetics.109.852814.
56. Rossing K., Bosselmann H. S., Gustafsson F., Zhang Z. Y., Gu Y. M., Kuznetsova T. et al. Urinary proteomics pilot study for biomarker discovery and diagnosis in heart failure with reduced ejection fraction // *PloS One*. 2016, 11 (6): e0157167. DOI: 10.1371/journal.pone.0157167.
57. Quehenberger O., Dennis E. A. The human plasma lipidome // *N Engl J Med*. 2011, 365: 1812–1823. DOI: 10.1056/nejmra1104901.
58. Tarasov K., Ekroos K., Suoniemi M., Kauhanen D., Sylvänne T., Hurme R. et al. Molecular lipids identify cardiovascular risk and are efficiently lowered by simvastatin and PCSK9 deficiency // *J Clin Endocrinol Metab*. 2014, 99: E45–52. DOI: 10.1210/jc.2013–2559.
59. Morrow D. A., de Lemos J. A. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers // *Circulation*. 2007, 115 (8): 949–952. DOI: 10.1161/circulationaha.106.683110.
-

Ю. А. Дылева¹, кандидат медицинских наук

О. В. Груздева, доктор медицинских наук

Е. Г. Учасова, кандидат медицинских наук

А. А. Кузьмина

ФГБНУ НИИ КПССЗ, Кемерово

¹ Контактная информация: dyleva87@yandex.ru

Новые подходы в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний/ Ю. А. Дылева, О. В. Груздева, Е. Г. Учасова, А. А. Кузьмина

Для цитирования: Лечащий врач № 2/2019; Номера страниц в выпуске: 16-22

Теги: атеросклеротические изменения, биомаркеры, диагностика
