

Микро-РНК как новый биомаркер активности системы цитохрома P-450: значение для прогнозирования антиагрегантного действия ингибиторов P2Y12-рецепторов

Э.И. Рыткин, К.Б. Мирзаев, И.В. Буре, Д.А. Сычев

ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация

Микро-РНК – короткие некодирующие цепочки РНК, в отношении которых обнаружено, что уровни специфических семейств микро-РНК коррелируют с уровнем активации тромбоцитов, что может быть использовано в качестве биомаркера при оценке терапии ингибиторами P2Y12-рецепторов. В обзоре обсуждены перспективы использования микро-РНК как нового транскриптомного биомаркера прогнозирования индивидуального фармакологического ответа на ингибиторы P2Y12 у пациентов с ишемической болезнью сердца.

Ключевые слова: микро-РНК, биомаркер, персонализация, антиагреганты.

Для цитирования: Рыткин Э.И., Мирзаев К.Б., Буре И.В., Сычев Д.А. Микро-РНК как новый биомаркер активности системы цитохрома P-450: значение для прогнозирования антиагрегантного действия ингибиторов P2Y12-рецепторов. *Терапевтический архив.* 2019; 91 (8): 115–117. DOI: 10.26442/00403660.2019.08.000389

Micro-RNA as a new biomarker of activity of the cytochrome system P-450: significance for predicting the antiplatelet action of P2Y12 receptor inhibitors

E.I. Rytkin, K.B. Mirzaev, I.V. Bure, D.A. Sychev

Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

MicroRNAs are short non-coding RNAs that correlate with the levels of platelet activation which can be utilized as a biomarker when guiding P2Y12 inhibitors therapy. In this literature review, the perspectives of microRNA as a novel biomarker are discussed when guiding P2Y12 inhibitors therapy among the patients with coronary artery disease.

Keywords: microRNA, biomarker, personalized therapy, antiplatelet drugs.

For citation: Rytkin E.I., Mirzaev K.B., Bure I.V., Sychev D.A. Micro-RNA as a new biomarker of activity of the cytochrome system P-450: importance for predicting the antiplatelet action of P2Y12 receptor inhibitors. *Therapeutic Archive.* 2019; 91 (8): 115–117. DOI: 10.26442/00403660.2019.08.000389

АДФ – аденозиндифосфат

Введение

Микро-РНК – это короткие некодирующие цепочки РНК, состоящие из последовательности 21 нуклеотидов [1]. Предшественники микро-РНК образуются в ядре клетки, они имеют двухцепочечную структуру, подобную «шпильке». Из ядра пре-микро-РНК транспортируются в цитоплазму. В цитоплазме под влиянием ферментов из одного плеча «шпильки» формируется молекула микро-РНК. Предшественник микро-РНК образуется из геномной ДНК, в результате чего появляется промежуточная форма – пре-микро-РНК. В пре-микро-РНК образуется петля, которая подвергается двухстадийной обработке: вначале эндонуклеаза Drosha отрезает шпильку пре-микро-РНК. Она экспортируется в цитоплазму, где узнается ферментом Dicer. Он отрезает петлю от пре-микро-РНК и получается структура зрелой микро-РНК, которая включается в состав комплекса RISC (РНК-индуцируемого комплекса выключения гена). При полной комплементарности микро-РНК происходит деградация мРНК, а при неполной – ингибирование трансляции.

Микро-РНК регулируют эффекторные молекулы, включая деацетилазы гистонов. Модификации гистонов,

такие как ацетилирование, метилирование и фосфорилирование остатков лизина, играют ключевую роль в регуляции генной экспрессии. Регуляция экспрессии генов посредством микро-РНК происходит на основе распознавания нуклеотидной последовательности информационной РНК. Изменения экспрессии генов с помощью микро-РНК осуществляются путем модуляции процесса трансляции (ингибирование или стимуляция), что приводит в конечном итоге к снижению содержания белкового продукта гена [2].

На протяжении эволюции мРНК разных генов приобрели сайты для микро-РНК [2]. И чем больше сайтов для микро-РНК приобрела мРНК, тем меньше был выход белка. Микро-РНК может связаться с мРНК или полностью, или частично, т. е. на 8, 6 или 7 нуклеотидов [3].

Неполное связывание мРНК с микро-РНК ведет к снижению трансляции, а полное связывание ведет к разрушению мРНК. И такая дестабилизация целевой мРНК может являться причиной снижения продукции белка до 85% [2].

Таким образом, экспрессия белка может продолжаться осуществляться на минимальных уровнях при неполном связывании мРНК с микро-РНК. Микро-РНК влияют на фенотип клетки, регулируя трансляцию белка и, таким образом, экспрессию гена.

Микро-РНК представлена практически во всех тканях и на всех стадиях развития организма [2]. Она как свободно циркулирует в плазме крови, так и содержится в тромбоцитах, причем в тромбоциты из мегакариоцитов переходит не только микро-РНК, но и вся своеобразная «фабрика» по сборке микро-РНК. Раз микро-РНК содержится в тромбоците, то очевидно, что микро-РНК может участвовать в регуляции экспрессии рецепторов тромбоцитов, например P2Y12-рецепторов.

Что касается использования микро-РНК в качестве биомаркера, то на данный момент накопились данные, согласно которым микро-РНК играют важную роль в регуляции генов системы ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) и в качестве «медиаторов токсичности» [4]. Известно, что каждому полиморфизму изоферментов цитохрома P-450, принимающих участие в метаболизме препаратов – ингибиторов P2Y12-рецепторов, соответствует микро-РНК, которая принимает участие в регуляции экспрессии гена, который ответственен за данный изофермент. Следует отметить, что одна и та же микро-РНК может принимать участие в регуляции экспрессии нескольких изоферментов. А значит, микро-РНК – это высокочувствительный биомаркер, который, однако, обладает ограниченной специфичностью [5, 6]. Пока что до конца не изучено влияние генетических факторов на экспрессию цитохрома CYP3A4/5, уровень его экспрессии различен, в результате чего различна и клиническая картина у пациентов. Это явление объясняется генетическими и эпигенетическими механизмами, которые регулируют гены ферментов, принимающих участие в биотрансформации антиагрегантов. Различная экспрессия микро-РНК может быть фактором, влияющим на вариабельность функционирования ферментов [7].

В проведенном ранее исследовании обнаружено, что высокий уровень экспрессии микро-РНК-142 ассоциирован с низкой экспрессией генов CYP3A4 и CYP3A5. Высокий уровень микро-РНК-142 может напрямую ингибировать трансляцию мРНК CYP3A4/5 и, помимо этого, не напрямую ингибировать активность CYP3A. Таким образом, замедляется процесс образования активного метаболита клопидогрела.

Таргетирование микро-РНК ферментов биотрансформации открывает потенциальные возможности прогнозировать индивидуальные показатели фармакокинетики клопидогрела. Микро-РНК обеспечивают эпигенетический механизм регуляции экспрессии ферментов, метаболизирующих лекарства, включая CYP1B1, CYP2E1, CYP3A4 и SULT1A1. Изменение уровня микроРНК в человеческом организме может способствовать индивидуальной вариабельности экспрессии CYP2C19. Обнаружено, что экзогенные и эндогенные уровни CYP2C19 в клетках печени и почек демонстрировали негативную корреляцию с уровнем микроРНК hsa-miR-29a-3p. Данная микро-РНК функционирует как негативный регулятор CYP2C19 через целевой узел в кодирующем участке CYP2C19.

Сведения об авторах:

Мирзаев Карин Бадавинович – к.м.н., зав. отд. персонализированной медицины НИИ молекулярной и персонализированной медицины; ORCID: 0000-0002-9307-4994

Буре Ирина Владимировна – PhD, с.н.с. НИИ молекулярной и персонализированной медицины; ORCID: 0000-0003-2043-5848

Сычев Дмитрий Алексеевич – д.м.н., проф., член-корр. РАН, зав. каф. клинической фармакологии и терапии, ректор ФГБОУ ДПО «РМАНПО»; ORCID: 0000-0002-4496-3680

Микро-РНК и ингибиторы P2Y12-рецепторов

В работе S. Chen и соавт. сделан акцент на специфических маркерах микро-РНК тромбоцитов, ассоциированных с возникновением и развитием резистентности к клопидогрелу. Авторы предположили, что микро-РНК тромбоцитов могут участвовать в регуляции транскрипции тромбоцитарного везикулярно-ассоциированного мембранного белка. Последовательный количественный ПЦР-анализ показал, что экспрессия микро-РНК-26a в тромбоцитах была значительно повышена у пациентов со слабым ответом на терапию клопидогрелом. Эти результаты дают основание полагать, что экспрессия микро-РНК-26a в тромбоцитах ассоциирована с высокой остаточной реактивностью тромбоцитов и микро-РНК-26a могут принимать участие в регуляции активности тромбоцитов на фоне применения клопидогрела [8].

Фармакологическое действие клопидогрела связано с его активным метаболитом, который необратимо связывается с рецептором P2Y12 аденозиндифосфата (АДФ) тромбоцитов. Микро-РНК-223 может регулировать экспрессию рецептора P2Y12. Исследование A.A. Kondkar и соавт. доказало, что гетерогенность ответа на клопидогрел коррелирует с экспрессией микро-РНК тромбоцитов у пациентов с ИБС [9]. Снижение уровня микро-РНК-223 связано с измененным ответом на клопидогрел. Микро-РНК-223 могут служить новым маркером при оценке уровня ингибирования рецептора P2Y12. Экспрессия микро-РНК-223 и микро-РНК-96 может влиять на ответ на терапию клопидогрелом у пациентов с ИБС [10].

У ингибитора P2Y12 тикагрелора, в отличие от клопидогрела, есть особенности биотрансформации: в превращении в активный метаболит тикагрелора принимают участие на разных уровнях следующие изоферменты: CYP3A4/CYP3A5, SLCO1B1, UGT2B7 [11]. Помимо ассоциации микро-РНК с активностью изоферментов и транспортеров лекарственных средств, показана их связь с реактивностью тромбоцитов и эффективностью антиагрегантов, включая клопидогрел и тикагрелор [5]. A. Carino и соавт. провели исследование, в ходе которого пациентам, перенесшим острый коронарный синдром, проводилась смена антиагрегантной терапии с клопидогрела на тикагрелор. В ходе исследования отмечено, что со сменой антиагреганта уровни микро-РНК у пациентов изменялись в сторону как повышения, так и понижения, в зависимости от семейства микро-РНК. Поэтому среди авторов работ по исследованию микро-РНК существует консенсус, что целесообразнее изучать панели из семейств микро-РНК и изменение их уровней относительно друг друга, нежели изучать индивидуальное изменение уровня каждой микро-РНК [12].

Еще одно исследование посвящено измерению изменению уровней микро-РНК у пациентов, принимавших прасугрел и ацетилсалициловую кислоту [13]. В ходе этих исследований отмечены семейства микро-РНК, уровни которых подвержены изменению при применении антиагрегантов.

При переходе от фундаментальной науки к прикладным аспектам возникает вопрос, как можно измерить агрегацию у пациента, принимающего ингибиторы P2Y12? Одним из самых востребованных на данный момент является измерение

Контактная информация:

Рыткин Эрик Игоревич – аспирант каф. клинической фармакологии и терапии; тел.: +7(903)194-30-77; e-mail: erytkin@gmail.com; ORCID: 0000-0003-2511-0655

индуцированной АДФ агрегации с помощью агрегометра VerifyNow (Accumetrics, США). Каждый тест-картридж системы VerifyNow, предназначенный для отдельного пациента, содержит лиофилизат, состоящий из микросфер, покрытых человеческим фибриногеном, и агонист тромбоцитов – АДФ. Тестирование агрегации основано на способности GP IIb/IIIa рецепторов на активированных тромбоцитах связываться с микросферами, покрытыми фибриногеном человека. При этом активированные тромбоциты подвергаются воздействию микросферами, покрытыми фибриногеном, агглютинация происходит пропорционально числу имеющихся тромбоцитарных рецепторов. Прибор предназначен для измерения развивающейся при этом агглютинации по пропорциональному увеличению прохождения света. Микро-РНК может позволить проводить комплексное измерение активации тромбоцитов многими агонистами, в отличие от АДФ-индуцированной активации тромбоцитов [3]. Таким образом, у клинических сформирована потребность в таком комплексном биомаркере, как микро-РНК, с целью объективизации и полного охвата целого спектра факторов, определяющих антиагрегантный эффект лекарственных средств.

Микро-РНК: какое семейство выбрать?

Определенные семейства микро-РНК могут использоваться в качестве фармакодинамических маркеров, другие семейства микро-РНК – в качестве фармакокинетических маркеров. В литературе описано более 3000 семейств микро-РНК [3]. Перед исследователем возникает вопрос, какую микро-РНК выбрать для анализа каждого конкретного гена? В качестве решения этой проблемы можно рекомендовать обратиться к литературе и посмотреть, для каких микро-РНК существуют данные по влиянию на гены. Или можно применить методы NGS (next generation sequencing) для поиска определенных микро-РНК. Также возможно обратиться к методам биоинформатики и использовать про-

граммный продукт TargetScan для того, чтобы определиться, какие семейства микро-РНК исследовать [14].

На данный момент в НИИ персонализированной и молекулярной медицины РМАНПО стартовало исследование по разработке подхода к прогнозированию антиагрегантного действия ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов у пациентов с острым коронарным синдромом на основе результатов фармакогенетических и фармакокинетических исследований.

Для этого будет оценена ассоциация между уровнем циркулирующей микро-РНК и остаточной реактивностью тромбоцитов, измеренной с помощью прибора VerifyNow. Отмечено, что активность изофермента CYP3A4 можно оценить по отношению концентрации кортизола и 6-бета-гидрокортизола в моче [15, 16]. Таким образом будет оценена ассоциация между уровнем циркулирующей микро-РНК и активностью изофермента CYP3A4. Исследователи надеются, что это позволит валидизировать определенные семейства микро-РНК в качестве биомаркеров активности системы биотрансформации лекарственных средств и прогнозировать эффективность и безопасность фармакотерапии ингибиторами P2Y₁₂-рецепторов в клинической практике.

Вывод

Микро-РНК – это новый перспективный вид биомаркеров, которые «мягко» регулируют экспрессию генов, в том числе CYP2C19, CYP3A4, важные для метаболизма ингибиторов P2Y₁₂-рецепторов. Микро-РНК как комплексный биомаркер в перспективе может применяться для персонализации выбора P2Y₁₂-ингибиторов.

Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-2617.2018.7).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Stakos DA, Gatsiou A, Stamatelopoulos K, et al. Platelet microRNAs: From platelet biology to possible disease biomarkers and therapeutic targets. *Platelets*. 2013; 24(8):579-89. doi: 10.3109/09537104.2012.724483
2. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215-33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
3. Sunderland N, Skroblin P, Barwari T, et al. MicroRNA Biomarkers and Platelet Reactivity The Clot Thickens. *Circ Res*. 2017;120:418-35. doi: 10.1161/circresaha.116.309303
4. Yu AM, Pan YZ. Noncoding microRNAs: small RNAs play a big role in regulation of ADME? *Acta Pharm Sinica B*. 2012;2(2):93-101. doi: 10.1016/j.apsb.2012.02.011
5. Nakano M, Nakajima M. Current knowledge of microRNA mediated regulation of drug metabolism in humans. *Expert Opin Drug Metabol Toxicol*. 2018 May;14(5):493-504. doi: 10.1080/17425255.2018.1472237
6. Rieger JK, Reutter S, Hofmann U, et al. Inflammation-Associated MicroRNA-130b Down-Regulates Cytochrome P450 Activities and Directly Targets CYP2C9. *Drug Metabol Dispos*. 2015;43(6):884-8. doi: 10.1124/dmd.114.062844
7. Tang QJ, Lin HM, He GD, et al. Plasma miR-142 accounting for the missing heritability of CYP3A4/5 functionality is associated with pharmacokinetics of clopidogrel. *Pharmacogenomics*. 2016. Sep; 7(14):1503-17. doi: 10.2217/pgs-2016-0027
8. Chen S, Qi X, Chen H, et al. Expression of miRNA 26a in platelets is associated with clopidogrel resistance following coronary stenting 2016. *Exper Ther Med*. 2016;12:518-24. doi: 10.3892/etm.2016.3278
9. Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, et al. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. *J Thromb Haemost*. 2010 Feb;8(2):369-78. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03700.x
10. Shi R, Ge L, Zhou X, et al. Decreased platelet miR-223 expression is associated with high on-clopidogrel platelet reactivity 2013. *Thromb Res*. 2013;131:508-13. doi: 10.1016/j.thromres.2013.02.015
11. Wang Z, Chen M, Zhu L, et al. Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: updated review and risk management in combination therapy. *Ther Clin Risk Manag*. 2015 Mar 19; 11:449-67. doi: 10.2147/TCRM.S80437
12. Carino A, De Rosa S, Sorrentino S, et al. Modulation of Circulating MicroRNAs Levels during the Switch from Clopidogrel to Ticagrelor. *Biomed Res Int*. 2016. 5. doi: 10.1155/2016/3968206
13. Willeit P, Zampetaki A, Dudek K, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ Res*. 2013 Feb 15;112(4):595-600. doi: 10.1161/circresaha.111.300539
14. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015 Aug 12;4. doi: 10.7554/eLife.05005
15. Rytkin E, Mirzaev KB, Grishina EA, et al. Do CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms and low CYP3A4 isoenzyme activity have an impact on stent implantation complications in acute coronary syndrome patients? *Pharmacogenom Personal Med*. 2017 Sep 18;10:243. doi: 10.2147/PGPM.S143250
16. Mirzaev KB, Rytkin E, Ryzhikova KA, et al. The ABCB1, CYP2C19, CYP3A5 and CYP4F2 genetic polymorphisms and platelet reactivity in the early phases of acute coronary syndromes. *Drug Metabol Personal Ther*. 2018 Sep 25;33(3):109-18. doi: 10.1515/dmpt-2018-0006

Поступила 22.05.2019