

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ miR-126, miR-155, miR-221 И miR-222 У БОЛЬНЫХ С ПОСТИНФАРКТНЫМ КАРДИОСКЛЕРОЗОМ

Н. Е. ЩЕГЛОВА

ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России
ул. Советская, д. 4, г. Тверь, Россия, 170100

Аннотация. Было обследовано 20 мужчин, имеющих верифицированный диагноз ИБС постинфарктный кардиосклероз (ИБС ПИКС) и 15 здоровых мужчин. При изучении проангиогенных miR-126 и miR-155 уровень экспрессии miR-126 оказался почти в 267 раз выше раз у больных ИБС ПИКС, при этом уровень экспрессии miR-155 оказался неизменным. При изучении антиангиогенных miR-221 и miR-222 показано, что уровень экспрессии miR-221 оказался в 261 раз выше в группе ИБС ПИКС в сравнении с группой здоровых мужчин, а уровень экспрессии miR-222 в данной группе оказался в 196 раз выше. Проведенное исследование подтверждает участие miR-126, miR-221 и miR-222 в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: микроРНК, постинфарктный кардиосклероз, уровень экспрессии.

THE FEATURES OF EXPRESSION miR-126, miR-155, miR-221 AND miR-222 IN PATIENTS WITH CARDIOSCLEROSIS

N. E. SHCHEGLOVA

Tver State Medical University
st. Sovetskay, 4, Tver, Russia, 170100

Resume. We examined 20 men who have the diagnosis of cardiosclerosis and 15 healthy men. In the study level of expression of pro-angiogenic miR-126 and miR-155 of miR-126 was in 267 times more in patients with cardiosclerosis, the level of expression of miR-155 appeared unchanged. In the study of anti-angiogenic miR-221 and miR-222 was shown that the level of expression miR-221 was in 261 times more in the patients with cardiosclerosis compared with a group of healthy men, and the level of expression of miR-222 in this group was in 196 times higher. This study confirms the role of miR-126, miR-221 and miR-222 in the pathogenesis of cardiovascular disease.

Key worlds: cardiosclerosis, microRNA, the level of expression.

За исключением достаточно редко встречающихся моногенных болезней, патофизиологические основы заболеваний сердечно-сосудистой системы, достаточно сложны. В последнее время становится очевидной важная роль микрорибонуклеиновых кислот (микроРНК) – малых некодирующих молекул рибонуклеиновых кислот (РНК), обычно имеющих длину 19-24 нуклеотида, образуемых из более длинных РНК-предшественников и имеющих специфическую шпилечную структуру.

Согласно данным литературы, нарушение функционирования определенных микроРНК может способствовать развитию сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, ишемической болезни сердца (ИБС), атеросклероза, постинфарктного ремоделирования миокарда, хронической сердечной недостаточности и сократительной дисфункции сердца. В последнее время в литературе стали появляться данные о различных биологических эффектах микроРНК на компоненты сердечно-сосудистой системы. Было показано, что микроРНК могут вызывать индукцию, или, наоборот, подавлять гипертрофию миокарда, регулировать ангиогенез в миокарде, индуцировать и редуцировать фиброз. Исходя из этого, по механизму действия микроРНК могут быть разделены на проангиогенные микроРНК (например, miR-126, miR-155), запускающие ангиогенез, и антиангиогенные микроРНК (например, miR-221, miR-222), подавляющие его. МикроРНК не только важны для развития сердца и сосудов, но и играют особую роль при патологии сердечно-сосудистой системы, таких как гипертрофия и ишемия миокарда, аритмии. Тем не менее, их потенциальная роль как биомаркеров в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний еще более значима.

Цель исследования – изучение экспрессии miR-126, miR-155, miR-221 и miR-222 у больных с ИБС постинфарктным кардиосклерозом (ИБС ПИКС).

Материалы и методы исследования. Было обследовано 20 мужчин, находившихся на стационарном лечении в кардиологическом отделении Областной клинической больницы города Твери, и 15 здоровых мужчин. Сформированы выборки из двух групп сравнения. В I группу включили 15 здоровых мужчин от 29 до 47 лет (средний возраст $33,93 \pm 1,14$ лет), данная группа рассматривалась как контрольная. II группа состояла из 20 мужчин, имеющих в анамнезе подтвержденный клинически и лабораторно инфаркт миокарда в возрасте от 46 до 84 лет (средний возраст $60,4 \pm 1,9$ лет).

Критерии включения в данную группу больных: наличие верифицированного диагноза ИБС ПИКС. Критерии исключения: лица, страдающие сахарным диабетом, сопутствующими заболеваниями почек, легких, желудочно-кишечного тракта, печени, заболеваниями крови и нарушениями обмена веществ, отягощенным аллергологическим анамнезом, аллергическими заболеваниями и профессиональными вредностями.

Общая РНК, включая микроРНК, была получена комбинированным методом из плазмы крови с помощью набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) и лизирующего реагента TRIzol® LS Reagent (Invitrogen, США), описанным в литературе. Для образцов микроРНК с концентрациями от 25 нг/мкл проводили обратную транскрипцию на четырехканальном амплификаторе «Veriti» («Applied Biosystems», США) для получения комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) с использованием набора TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit по стандартной схеме, представленной производителем. Реакционную смесь, содержащую тотальную микроРНК и смесь для проведения обратной транскрипции, подвергали нагреванию в несколько циклов:

- 30 минут при 16°C,
- 30 минут при 42°C,
- 5 минут при 85 °C,
- и далее нагревание при 4°C.

Экспрессию miR-221 и miR-222 оценивали с помощью показателя ΔC_t , который определяли трижды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе «ABI Prism 7500» с помощью набора Taq Man Small RNA Assays («Applied Biosystems», США) с применением полученной кДНК и праймеров miR-221, miR-222 с использованием стандартного протокола, предложенного производителем. В качестве эндогенного контроля использовали праймер RNU6B, который

показывает относительно стабильную экспрессию, независимо от того в каких тканях и клеточных культурах определяется.

Методы статистической обработки данных.

Накопление, корректировка, систематизация и визуализация полученных результатов проводилась в электронных таблицах «Excel». Для расчета количественного изменения микроРНК использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$, предложенный К. J. Livak и Т. D. Schmittgen, где Ct – пороговое значение цикла, где флуоресценция впервые фиксируется достоверно выше порогового уровня.

Попарное сравнение показателей ΔCt контрольной группы с группой ИБС ПИКС проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни, который используется для оценки различий между двумя малыми выборками по уровню количественно измеряемого признака. Биометрический анализ осуществлялся с использованием пакета WINPEPI (PEPI-for-Windows).

За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Как правило, при патологии меняется экспрессия не одной, а множества микроРНК, а для ряда патологий спектр задействованных микроРНК перекрывается. О неслучайности выявленных ассоциаций различных микроРНК с развитием патологических процессов, указывают многие авторы. При этом считается, что достоверным повышением или понижением уровня экспрессии микроРНК в исследуемом образце крови или ткани является изменение значения уровня этой экспрессии в пять и более раз по отношению к контрольному образцу.

Полученные результаты изучения уровня экспрессии микроРНК у больных ИБС ПИКС представлены в таблицах 1 – 2.

В таблице 1 показано, что уровень экспрессии miR-126 оказался почти в 267 раз выше раз у больных ИБС ПИКС по сравнению с контрольной

группой, а уровень экспрессии miR-155 у данной группы больных остается неизменным.

Таблица 1

Показатели уровня экспрессии проангиогенных miR-126 и miR-155 у больных ИБС ПИКС

| Исследуемая микроРНК | ΔCt (M \pm m) | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|----------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|
| miR-126 | -9,77 \pm 0,92 | -8,06 | 266,87 |
| miR-155 | -5,02 \pm 0,94 | -1,9 | 3,73 |

Примечание: ΔCt – разность между значениями Ct исследуемой микроРНК и эндогенного контроля, M – среднее значение уровня экспрессии микроРНК, m – стандартная ошибка среднего, $\Delta\Delta Ct$ – разность между значениями ΔCt исследуемого образца и контрольного, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ – формула для подсчета уровня экспрессии исследуемой микроРНК.

Прямых доказательств участия miR-126 в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний в литературе не описано, хотя по данным некоторых авторов может играть важную роль в развитии сосудистой патологии и процессах внутрисосудистого ремоделирования. Также проведенное в 2011 году исследование, показало существование обратной корреляции увеличения уровня miR-126 с улучшением ряда физиологических параметров у пациентов с сердечной недостаточностью.

Как показано в таблице 2, уровень miR-221 оказался в 261 раз выше, а уровень miR-222 в 196 раз выше у больных ИБС ПИКС по сравнению со здоровыми людьми.

Таблица 2

Показатели уровня экспрессии антиангиогенных miR-221 и miR-222 у больных ИБС ПИКС

| Исследуемая микроРНК | ΔCt (M \pm m) | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|----------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|
| miR-221 | -8,96 \pm 1,13 | -8,03 | 261,38 |
| miR-222 | -7,69 \pm 0,81 | -7,62 | 196,72 |

Примечание: ΔCt – разность между значениями Ct исследуемой микроРНК и эндогенного контроля, M – среднее значение уровня экспрессии микроРНК, m –

стандартная ошибка среднего, $\Delta\Delta Ct$ - разность между значениями ΔCt исследуемого образца и контрольного, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ – формула для подсчета уровня экспрессии исследуемой микроРНК.

По данным литературы miR-221, наряду с miR-222 блокирует пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез, а также участвует в подавлении пролиферации эндотелиальных клеток и процессах ангиогенеза. В тоже время следует отметить, что роль miR-222 в патологии сердечно-сосудистой системы в литературе до сих пор достаточно информативно не описана.

Правильность сделанных выводов была подтверждена проведением попарного сравнения показателей ΔCt контрольной группы с группой ИБС ПИКС с помощью U-критерия Манна-Уитни. При этом были получены сходные результаты. Так, было показано, что группой ИБС ПИКС достоверно отличается от контрольной группы по уровню плазменной miR-126 ($p < 0,001$), для miR-155 достоверных различий получено не было (таблица 3).

Таблица 3

Сравнение показателей ΔCt в контрольной группе и у больных ИБС ПИКС с помощью U-критерия Манна-Уитни, (M \pm δ)

| Показатель | Группа контроля (n = 15) | Больные ИБС ПИКС (n = 20) |
|---------------------|-----------------------------|------------------------------|
| ΔCt miR-126 | -1,71 \pm 3,37 | -9,77 \pm 4,10* |
| ΔCt miR-155 | -3,12 \pm 1,33 | -5,02 \pm 4,22 |
| ΔCt miR-221 | -0,93 \pm 2,47 | -8,96 \pm 5,07* |
| ΔCt miR-222 | -0,07 \pm 2,73 | -7,69 \pm 3,63* |

Примечания: * - статистическая значимость различий ($p < 0,05$) между группой больных ИБС ПИКС и контрольной.

Выводы. Таким образом, согласно результатам проведенных нами исследований обнаружено, что уровни экспрессии miR-126, miR-221, miR-

222 у больных ИБС ПИКС достоверно превышают аналогичные показатели контрольной группы здоровых людей. С другой стороны, изменение уровня экспрессии miR-155 с исследуемым заболеванием ассоциировать не удалось, что, возможно, указывает на менее значимую или иную роль miR-155 в патогенезе сердечно-сосудистой патологии.

Полученные данные свидетельствуют о том, что miR-126, miR-221, miR-222 могут, несомненно, использоваться для изучения патогенеза молекулярно-генетических основ и патогенетической терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

Список литературы.

1. Ишемическая болезнь сердца: регулирование с помощью микроРНК / Коробов Г.А. [и др.] // Кардиологический вестник. – 2011. – Т. VI (XVIII). - №2. – С. 5-9.

2. Кучер А.Н. Роль микро-РНК, генов их биогенеза и функционирования в развитии патологических состояний у человека / А.Н. Кучер, Н.П. Бабушкина // Медицинская генетика. – 2011. - №1. - С. 3 – 13.

3. Перспективы применения микроРНК в диагностике и терапии сердечной недостаточности / Кочетов А.Г. [и др.] // Кардиологический вестник. – 2014. - №2. - С. 62 – 67.

4. Шевченко С. П. Современные клинические и молекулярно-генетические подходы к диагностике и лечению рака щитовидной железы: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.011.12 / С.П. Шевченко. – Новосибирск, 2011. – 40 с.

5. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation / Lambal V. [et al] // BMC Research Notes 2014, 7:129 doi:10.1186/1756-0500-7-129.

6. Livak K. J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // METHODS 25. - 2001. - P. 402–408.

7. Meder B., Keller A., Vogel B., Haas J., Sedaghat-Hamedani F., Kayvanpour E., Juas S., Borries A., Rudloff J., Leidinger P., Meese E., Katus H.A., Rottbauer W. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction // Basic Res. Cardiol. 2010. DOI 10.1007/s00395-010-0123-2.

8. MiRNA in lung cancer – Studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments / Keller A. [et al] // BMC Cancer 2009, 9:353 doi:10.1186/1471-2407-9-3.

9. M. Tevfik Dorak Real-time PCR. - Taylor & Francis Group, an informa business. - 2006. – 333 p.

10. Rakesh C. Kukreja, Chang Yin, Fadi N. Salloum MicroRNAs: New Players in Cardiac Injury and Protection // Molecular Pharmacology. 2011. Vol. 80. P. 558 – 564.

11. Shah A. A. Profiling of regulatory microRNA transcriptomes in various biological processes: a review / A. A. Shah, E. Meese, N. Blin // J. Appl. Genet. 2010. Vol. 51(4). - P.501-507.

12. Urbich C., Kuehbach A., Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis // Cardiovascular Research. - 2008. Vol. 79. - P. 581-588.