

Результаты пилотного исследования микроРНК у больных с ишемическим инсультом

О.В.Лянг^{✉1,2}, А.Г.Кочетов¹⁻³, Р.Р.Гимадиев⁴, А.А.Абрамов², Н.А.Шамалов¹, Л.В.Стаховская¹

¹ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова» Минздрава России. 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов». 117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

³ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России. 121552, Россия, Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А;

⁴АНО ДПО «Институт лабораторной медицины». 125315, Россия, Москва, Ленинградский пр-т, д. 80Г, пом. XI

✉ov_lyang@dpo-ilm.ru

Актуальность. Высокая медико-социальная значимость ишемического инсульта (ИИ) обуславливает поиск новых диагностических и прогностических биомаркеров, которыми могут стать микроРНК – некодирующие РНК малой длины, супрессирующие экспрессию белок-кодирующих генов. До настоящего момента исследований уровней и роли микроРНК у больных с ИИ в России не проводилось.

Цель – определение уровней микроРНК-21, 125, 126, 145 в плазме и буккальном соскобе у больных с ИИ.

Материалы и методы. В исследование были включены 36 пациентов в острейшем периоде ИИ. Биоматериал для исследования микроРНК-21, 125, 126, 145 в ЭДТА-плазме и буккальном соскобе забирали на 1 и 4-е сутки от начала развития заболевания. Определение уровня микроРНК включало этапы выделения, обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Статистическая обработка данных исследования проведена с использованием программного обеспечения SPSS 8.0, Microsoft Excel 2013.

Результаты. Статистически значимая динамика к 4-м суткам наблюдения у больных с ИИ была выявлена по уровням микроРНК-125 в плазме, микроРНК-126 в соскобе и микроРНК-145 в соскобе. Также были выявлены статистически значимые различия по уровню в соскобе и плазме микроРНК-126 на 1 и 4-е сутки, а также микроРНК-125 на 4-е сутки наблюдения. По развитию летального исхода были выявлены статистически значимые различия по уровню микроРНК-125 в буккальном соскобе на 1-е сутки, микроРНК-145 в буккальном соскобе на 1-е сутки и микроРНК-21 в плазме на 1-е сутки наблюдения. Также были выявлены различия по таким осложнениям, как пневмония, тромбоэмболия легочной артерии, пиелонефрит. Статистически значимых различий в уровнях микроРНК по типам ИИ, а также по наличию и типу геморрагической трансформации зафиксировано не было.

Выводы. МикроРНК-21, 125, 145 на 1-е сутки наблюдения от развития ИИ могут иметь значимость в прогнозе летального исхода, микроРНК-21, 125 на 1-е сутки – в прогнозе развития пневмонии, микроРНК-125 на 1-е сутки – тромбоэмболии легочной артерии, микроРНК-126 на 4-е сутки – пиелонефрита. Выявленное отсутствие различий в уровнях микроРНК-21 и 125 в соскобе и плазме представляет собой возможную основу для применения неинвазивного метода взятия биоматериала с целью исследования микроРНК.

Ключевые слова: ишемический инсульт, микроРНК, биомаркеры.

Для цитирования: Лянг О.В., Кочетов А.Г., Гимадиев Р.Р. и др. Результаты пилотного исследования микроРНК у больных с ишемическим инсультом. Consilium Medicum. 2018; 20 (9): 8–11. DOI: 10.26442/2075-1753_2018.9.8-11

Journal Article

Results of a pilot study of microRNA in patients with ischemic stroke

O.V.Lyang^{✉1,2}, A.G.Kochetov¹⁻³, R.R.Gimadiev⁴, A.A.Abramov², N.A.Shamalov¹, L.V.Stakhovskaya¹

¹N.I.Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation. 117997, Russian Federation, Moscow, ul. Ostrovitianova, d. 1;

²People's Friendship University of Russia. 117198, Russian Federation, Moscow, ul. Miklukho-Maklaya, d. 6;

³National Medical Research Center for Cardiology of the Ministry of Health of the Russian Federation. 121552, Russian Federation, Moscow, ul. 3-ia Cherepkovskaia, d. 15A;

⁴Institute of Laboratory Medicine. 125315, Russian Federation, Moscow, Leningradskiy pr-t, d. 80G, pom. XI

✉ov_lyang@dpo-ilm.ru

Abstract

Actuality. The high medical and social significance of ischemic stroke determines the search for new diagnostic and prognostic biomarkers, which can be microRNAs – non-coding RNAs of small length, which suppress the expression of protein-coding genes. Until now, no studies of the levels and role of microRNAs in patients with ischemic stroke have been conducted in Russia.

The aim was to determine the levels of microRNA-21, 125, 126, 145 in plasma and buccal scraping in patients with ischemic stroke.

Materials and methods. The study included 36 patients with acute ischemic stroke. A biomaterial for the study of microRNA-21, 125, 126, 145 in EDTA-plasma and buccal scrapings were taken on the 1st and 4th day from the beginning of the development of the disease. Determination of the level of microRNA included the stages of isolation, reverse transcription and real-time PCR. Statistical processing of the study data was carried out using software SPSS 8.0, Microsoft Excel 2013.

Results. Statistically significant dynamics by 4 days of observation in patients with AI was revealed by levels of microRNA-125 in plasma, microRNA-126 in scraping and microRNA-145 in scraping. There were also statistically significant differences in the level of microRNA-126 in 1 and 4 days, and microRNA-125 in 4 days of observation. The development of the lethal outcome revealed statistically significant differences in the level of miRNA-125 in buccal scraping on 1 day, miRNA-145 in buccal scraping on 1 day and microRNA-21 in plasma on 1 day of observation. Also, the differences in such complications as pneumonia, pulmonary embolism, pyelonephritis. There were no statistically significant differences in the levels of miRNAs by type of AI, as well as by the presence and type of hemorrhagic transformation.

Conclusion. MicroRNA-21, 125, 145 for 1 day of observation from the development of AI may have significance in the prognosis of fatal outcome, microRNA-21, 125 for 1 day in the forecast for the development of pneumonia, microRNA-125 for 1 day – the forecast PE, microRNA-126 on the 4th day – in the prediction of pyelonephritis. The revealed absence of differences in levels of microRNA-21 and 125 in scraping and plasma is a possible basis for the application of a non-invasive method of taking biomaterial for the study of microRNA.

Key words: ischemic stroke, microRNA, biomarkers.

For citation: Lyang O.V., Kochetov A.G., Gimadiev R.R. et al. Results of a pilot study of microRNA in patients with ischemic stroke. Consilium Medicum. 2018; 20 (9): 8–11. DOI: 10.26442/2075-1753_2018.9.8-11

Введение

Ишемический инсульт (ИИ) в настоящее время продолжает оставаться серьезной медико-социальной проблемой, несмотря на высокие темпы развития здравоохранения, диагностических, терапевтических и реабилитационных технологий [1]. Высокие цифры смертности, летальности и инвалидизации пациентов после ИИ обуславливают поиск новых диагностических и прогностических биомаркеров, которые позволят снизить частоту осложнений, нередко приводящих к неблагоприятному исходу.

Таковыми биомаркерами могут стать микроРНК – новый класс молекул, показавший значимость в различных отраслях клинической медицины.

МикроРНК являются некодирующими РНК малой длины – 20–25 нуклеотидов. Они супрессируют экспрессию белок-кодирующих генов на посттранскрипционной стадии с помощью механизмов, ингибирующих процесс трансляции или деградации матричной РНК (мРНК), либо их комбинацией [2].

МикроРНК способны локализоваться в клетках различных тканей, а также циркулировать в кровотоке, о чем впервые было сообщено в 2008 г. [3]. Появление микроРНК в кровотоке до конца не изучено и может являться результатом как гибели клеток и их последующего лизиса [4], так и активной секреции микроРНК клетками в ответ на различные стимулы [5]. Известно, что микроРНК сохраняют высокую стабильность (более 24 ч) в клетках и плазме крови [6, 7]. В плазме крови циркулирующие микроРНК транспортируются микровезикулами в комплексе с РНК-связывающими белками или липопротеинами во внеклеточной жидкости.

На основе анализа литературных данных мы отобрали 4 микроРНК, которые могут играть роль в патогенезе ИИ и развитии осложнений. Обобщенные данные по ним представлены в табл. 1.

Несмотря на большое количество научных работ и публикаций по изучению микроРНК, исследований уровня и роли микроРНК у больных с ИИ до настоящего момента в России не проводилось. В базе данных РИНЦ присутствуют две работы обзорного характера, посвященные роли микроРНК в патогенезе ИИ [18, 19].

Тяжесть состояния больных обуславливает также поиск простых и неинвазивных методов взятия биоматериала для исследования, одним из которых может быть буккальный соскоб (эпителий ротовой полости), часто используемый как образец для генетических исследований.

Таким образом, целью нашей работы явилось определение уровней микроРНК-21, 125, 126, 145 в плазме и буккальном соскобе у больных с ИИ.

Материалы и методы

В исследование были включены 36 пациентов, поступивших в нейрореанимационное отделение ГКБ №31 г. Москвы. Критериями включения были острый ИИ, подтвержденный методами нейровизуализации, поступление в течение 24 ч от начала развития заболевания, отсутствие острых и хронических заболеваний внутренних органов в стадии декомпенсации. Возраст пациентов по медиане составил 74 (65; 80) года. Среди больных преобладали женщины – 21 (61%). По патогенетическому варианту инсульта пациенты распределились следующим образом: атеротромботический вариант – 14 (40%), кардиоэмболический 11 (30%), неуточненной этиологии – 11 (30%). Объем очага составил 4 (0; 40) см³. У 33 пациентов очаг поражения был локализован в полушариях, 3 – в стволе головного мозга. Летальный исход на госпитальном этапе наблюдался в 9 (25%) случаях. Среди сопутствующей патологии наиболее часто встречалась гипертоническая болезнь – у всех пациентов (100%) и хроническая сердечная недостаточность – 24 (67%). У 4 (11%) больных развилась симптомная геморрагическая трансформация очага поражения, у 4 (11%) – асимптомная. Осложнения (пиелонефрит, пневмония, тромбоэмболия легочной артерии – ТЭЛА) регистрировались у 20 (56%) человек.

Всем больным проводилась базисная терапия в соответствии с порядком оказания помощи и клиническими рекомендациями, по показаниям 30 (83%) пациентам была проведена патогенетическая (тромболитическая) терапия препаратом rt-PA по стандартной схеме.

Биоматериал для исследования забирали на 1 и 4-е сутки наблюдения от начала развития заболевания. Для исследования уровня циркулирующих микроРНК использовалась ЭДТА-плазма, которую получали путем центрифугирования в течение 10 мин при 3000 г цельной крови, взятой в пробирку с K2 ЭДТА, и последующего аликвотирования. До исследования образцы плазмы хранились в морозильной камере при -70°C. Буккальный соскоб брали утром натощак, вводя ватный зонд в ротовую полость пациента и аккуратно потерев зондом с внутренней стороны одной из щек 20 раз, при этом медленно поворачивая его для сбора буккальных клеток.

Процедура определения уровня микроРНК включала следующие этапы: выделение, обратную транскрипцию,

Таблица 1. Биологическая роль микроРНК-21, 125, 126, 145

МикроРНК	Биологическая роль
МикроРНК-21	Профибротический эффект [8]
	Антиапоптотический эффект [9]
	Противовоспалительный эффект [10]
МикроРНК-125	Пролиферация и дифференцировка клеток [11, 12]
	Участие в обмене липидов, регуляция захвата липидов макрофагами [13]
МикроРНК-126	Эндотелий-специфическая микроРНК
	Прогностический биомаркер макро- и микрососудистых повреждений и эндотелиальной дисфункции [14]
	Снижается при гипоперфузии [15]
МикроРНК-145	Провоспалительный эффект [16]
	Повышенный уровень – предиктор сердечной смерти [17]

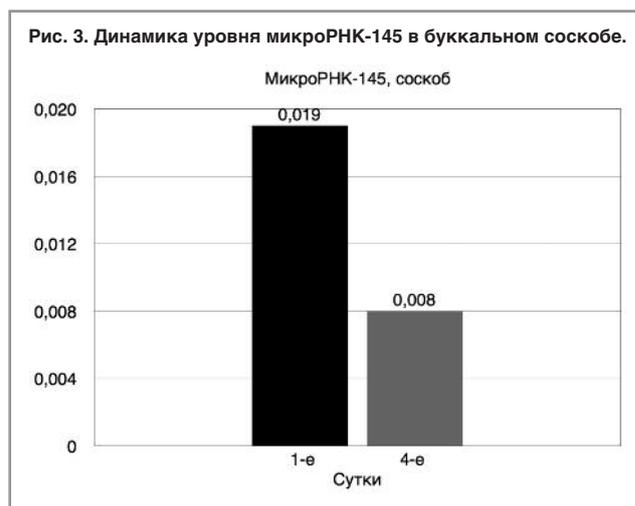
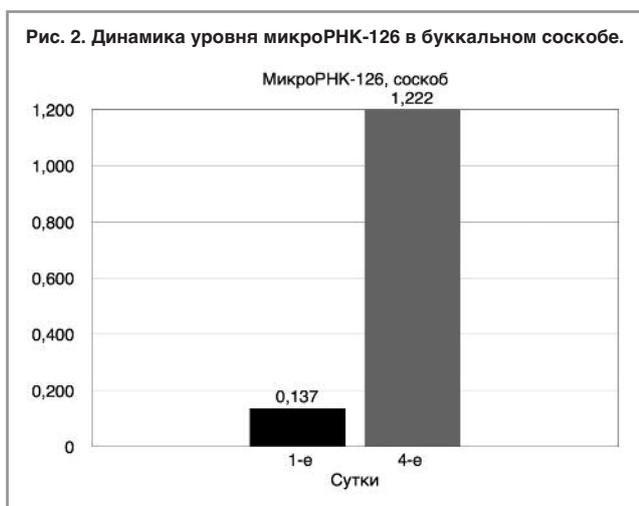
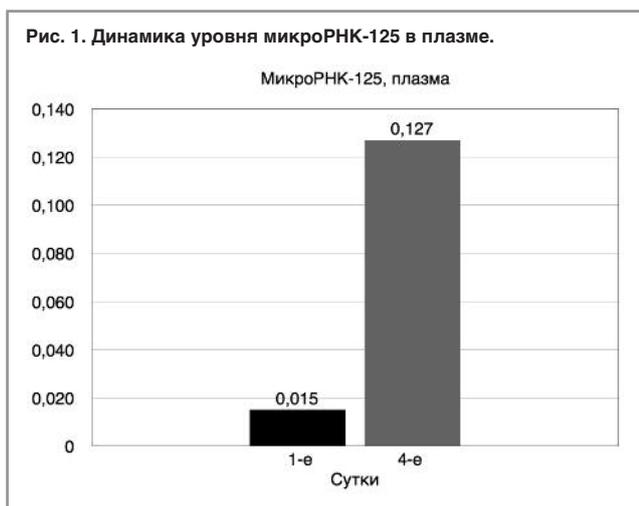


Таблица 2. Различия уровней микроРНК-126 и 145 в соскобе и плазме

МикроРНК/сут	Уровень в соскобе, у.е.	Уровень в плазме, у.е.	<i>p</i>
126/1	0,137	0,011	<i>p</i> <0,1
126/4	0	1,222	
145/4	0,019	0,006	

горова–Смирнова от теоретически нормального распределения был более 0,05. Аналитическая статистика выполнялась с использованием дисперсионного анализа ANOVA, t-теста Стьюдента для количественных данных с нормальным распределением или критерия суммы рангов Уилкоксона, Манна–Уитни для количественных данных с распределением, отличным от нормального. Значение вероятности (*p*) менее 0,1 (двухсторонняя проверка) с учетом того, что исследование является пилотным, демонстрировало статистическую значимость.

Результаты и обсуждение

Статистически значимая динамика к 4-м суткам наблюдения у больных с ИИ была выявлена по уровням микроРНК-125 в плазме, микроРНК-126 в соскобе и микроРНК-145 в соскобе (рис. 1–3).

Также были выявлены статистически значимые различия по уровню в соскобе и плазме микроРНК-126 на 1 и 4-е сутки и микроРНК-125 на 4-е сутки наблюдения (табл. 2).

По развитию летального исхода были выявлены статистически значимые различия по уровню микроРНК-125 в буккальном соскобе на 1-е сутки – у выживших пациентов уровень был ниже в 5 раз (0,03 и 0,156 у.е. соответственно), также у выживших был ниже уровень микроРНК-145 в буккальном соскобе на 1-е сутки (0,001 у.е. у выживших, 0,029 у.е. при развитии летального исхода) и микроРНК-21 в плазме на 1-е сутки наблюдения (1,283 у.е. у выживших, 0,361 у.е. при развитии летального исхода).

По таким осложнениям, как пневмония, ТЭЛА, пиелонефрит, тоже были выявлены значимые различия. Уровень микроРНК-125 в соскобе на 1-е сутки наблюдения был выше у больных с развившейся затем пневмонией (0,93 и 0,029 у.е. соответственно) и ТЭЛА (0,155 и 0,03 у.е. соответственно). Уровень микроРНК-126 в плазме на 4-е сутки наблюдения у пациентов с развившимся пиелонефритом был ниже в 11 раз (0,002 и 0,023 у.е. соответственно). Уровень микроРНК-21 в плазме на 1-е сутки наблюдения был ниже у пациентов с пневмонией (0,356 и 1,27 у.е. соответственно).

Статистически значимых различий в уровнях микроРНК по типам ИИ, а также по наличию и типу геморрагической трансформации выявлено не было.

полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени.

Выделение микроРНК проводили по протоколам коммерческого набора miRCURYTM RNA Isolation Kit – Biofluids (Exiqon, Дания). Обратная транскрипция микроРНК осуществлялась по протоколам коммерческого набора Universal cDNA Synthesis Kit II (Exiqon, Дания). Определение уровня микроРНК делали по технологии SYBR Green с помощью микроРНК специфичных праймеров microRNA LNATM PCR primer sets по протоколам коммерческого набора ExiLent SYBR® Green master mix на приборе Applied Biosystems 7900 HT (Applied Biosystems, США). Данные по уровню микроРНК нормализовали на исходный объем цельной крови. Для этого на этапах синтеза кДНК и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени использовали набор синтетических РНК-транскриптов UniSp6. За условную единицу (у.е.) была принята концентрация, эквивалентная 10^3 копий/мкл UniSp6. Затем, согласно рекомендациям ряда исследователей, проводилась нормализация количества микроРНК по уровню микроРНК-16, концентрация которой относительно стабильна [20, 21].

Статистическая обработка данных исследования проведена с применением программного обеспечения SPSS 8.0, Microsoft Excel 2013. Описательная статистика непрерывных количественных данных после анализа нормальности распределения представлена в виде среднего значения (*M*) и 95% доверительного интервала (2,5–97,5%) при нормальном распределении, в виде медианы (*Md*) и значений 25% нижнего и 75% верхнего квартилей (*Q* 25–75%) при ненормальном распределении. Нормальным принималось распределение, у которого критерий отличия Колмо-

Заключение

Результаты проведенного пилотного исследования уровня микроРНК у больных с ИИ показали возможную прогностическую значимость микроРНК. МикроРНК-125, 21, 145 на 1-е сутки наблюдения от развития ИИ могут иметь значимость в прогнозе летального исхода, микроРНК-125, 21 на 1-е сутки наблюдения от развития ИИ – в прогнозе развития пневмонии, микроРНК 125 на 1-е сутки наблюдения от развития ИИ – в прогнозе ТЭЛА, микроРНК-126 на 4-е сутки наблюдения от развития ИИ – в прогнозе пиелонефрита.

Выявленное отсутствие различий в уровнях микроРНК-21 и 125 в соскобе и плазме являет собой возможную основу для применения неинвазивного метода взятия биоматериала с целью исследования микроРНК.

Не все полученные результаты можно объяснить биологическими эффектами микроРНК, что свидетельствует о необходимости проведения дальнейших исследований на более крупных выборках, а также экспериментальных исследований с целью уточнения роли данных микроРНК в патогенезе ИИ и его осложнений.

Литература/References

- Алферова В.В., Белкин А.А., Вознюк И.А. и др. Клинические рекомендации по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторными ишемическими атаками. Монография. Под ред. Л.В.Стаховской. М., 2017. / Alferova V.V., Belkin A.A., Vozniuk I.A. i dr. Klinicheskie rekomendatsii po vedeniiu bol'nykh s ishemicheskim insultom i tranzitornymi ishemicheskimi atakami. Monografiia. Pod red. L.V.Stakhovskoi. M., 2017. [in Russian]
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116 (2): 281–97.
- Chen X, Ba Y, Ma L et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997–1006.
- Pritchard CC, Kroh E, Wood B et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5: 492–7.
- Wang K, Zhang S, Weber J et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 7248–59.
- Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S et al. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem* 2002; 48: 1883–90.
- Ai J, Zhang R, Li Y et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 73–7.
- Thum T, Gross C, Fiedler J et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008; 456: 980–4.
- Dong S, Ma W, Hao B et al. microRNA-21 promotes cardiac fibrosis and development of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction by up-regulating Bcl-2. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7 (2): 565–74.
- Sheedy F, Palsson-McDermott E, Hennessy E et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol* 2010; 11: 141–7.
- Wojtowicz EE, Walasek MA, Broekhuis MJ et al. MicroRNA-125 family members exert a similar role in the regulation of murine hematopoiesis. *Exp Hematol* 2014; 42 (10): 909–18.
- Le MT, Shyh-Chang N, Khaw SL et al. Conserved regulation of p53 network dosage by microRNA-125b occurs through evolving miRNA-target gene pairs. *PLoS Genet* 2011; 7 (9): e1002242.
- Rink C, Khanna S. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology. *Physiol Genomics* 2011; 43 (10): 521–8.
- Ishizaki T, Tamiya T, Taniguchi K et al. miR126 positively regulates mast cell proliferation and cytokine production through suppressing Spred1. *Genes Cells* 2011; 16: 803–14.
- Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2010; 107 (5): 677–84.
- Jia L, Hao F, Wang W, Qu Y. Circulating miR-145 is associated with plasma high-sensitivity C-reactive protein in acute ischemic stroke patients. *Cell Biochem Funct* 2015; 33 (5): 314–9.
- Dong YM, Liu XX, Wei GQ et al. Prediction of long-term outcome after acute myocardial infarction using circulating miR-145. *Scand J Clin Lab Invest* 2015; 75 (1): 85–91.
- Шляхто Е.В., Баранцевич Е.Р., Щербак Н.С., Галагудза М.М. Молекулярные механизмы формирования ишемической толерантности головного мозга (обзор литературы. Часть 2). *Вестн. РАМН*. 2012; 7: 20–9. / Shliakhto E.V., Barantsevich E.R., Shcherbak N.S., Galagudza M.M. Molekuliarnye mekhanizmy formirovaniia ishemicheskoi tolerantsnosti golovnogo mozga (obzor literatury. Chast' 2). *Vestn. RAMN*. 2012; 7: 20–9. [in Russian]
- Новикова Л.Б., Минибаева Г.М. Роль микроРНК в патогенезе ишемического инсульта. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова*. 2018; 118 (2–3): 43–7. / Novikova L.B., Minibaeva G.M. Rol' mikroRNK v patogeneze ishemicheskogo insulta. *Zhurn. neurologii i psikiatrii im. S.S.Korsakova*. 2018; 118 (2–3): 43–7. [in Russian]
- Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* 2015; 61 (11): 1333–42.
- Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification? *Clin Chem* 2015; 61 (11): 1333–42.
- Zampetaki A, Willeit P, Drozdov I et al. Profiling of circulating microRNAs: from single biomarkers to re-wired networks. *Cardiovasc Res* 2012; 93 (4): 555–62.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Лянг Ольга Викторовна – канд. биол. наук, доц., науч. сотр. НИИ цереброваскулярной патологии и инсульта ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И.Пирогова», доц. каф. госпитальной терапии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГАУ ВО РУДН. E-mail: ov_lyang@fpo-ilm.ru

Кочетов Анатолий Глебович – д-р мед. наук, доц., зав. отд. НИИ цереброваскулярной патологии и инсульта ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И.Пирогова», проф. каф. госпитальной терапии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГАУ ВО РУДН, зам. ген. дир. ФГБУ «НИИЦ кардиологии»

Гимадиев Ринат Рашитович – преподаватель АНО ДПО ИЛМ

Абрамов Александр Андреевич – ассистент каф. госпитальной терапии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГАУ ВО РУДН

Шамалов Николай Анатольевич – д-р мед. наук, проф. каф. неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И.Пирогова»

Стаховская Людмила Витальевна – д-р мед. наук, проф. каф. неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И.Пирогова»