

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

На правах рукописи

**ЖАНИН ИЛЬЯ СЕРГЕЕВИЧ**

**Профиль экспрессии микроРНК и генов-мишеней при нарушениях  
мозгового кровообращения в эксперименте и клинике**

Специальности: 03.02.07 – Генетика

14.03.03 – Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Асанов Алий Юрьевич

доктор медицинских наук, профессор

Пинелис Всеволод Григорьевич

Москва – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение .....</b>	<b>4</b>
Внедрение результатов исследования в практику .....	10
<b>Глава 1. Обзор литературы .....</b>	<b>12</b>
1.1 Ишемический инсульт .....	12
1.1.1 Этиология, классификация, патогенез .....	12
1.1.2 Генетические факторы исследования ишемии .....	19
1.2 микроРНК .....	23
1.2.1 История открытия и общие сведения .....	23
1.2.2 Биогенез мкРНК .....	25
1.2.3 Созревание и деградация микроРНК .....	27
1.2.4 Строение комплекса RISC .....	33
1.3 Роль мкРНК в патогенезе, диагностике и лечении ишемического инсульта .....	36
1.3.1 Роль мкРНК в патогенезе инсульта .....	36
1.3.2 Диагностика, лечение и прогнозирование исхода инсульта .....	38
Заключение .....	42
<b>Глава 2. Материалы и методы .....</b>	<b>43</b>
2.1 Материалы исследования .....	43
2.2 Методы исследования .....	45
2.2.1 Метод фотохимически индуцированного тромбоза .....	45
2.2.2 Выделение тотальной РНК и мкРНК из полученных образцов ткани, крови и плазмы .....	46
2.2.3 Критерии выбора мкРНК и генов для исследования, составления таблиц и баз данных .....	47

2.2.4 Метод обратной транскрипции мкРНК и мРНК.....	48
2.2.5 Количественная ПЦР в реальном времени для определения уровня экспрессии мкРНК и мРНК.....	48
2.2.6 Статистическая обработка данных.....	50
<b>Глава 3. Результаты.....</b>	<b>52</b>
3.1 Дифференциальная экспрессия мкРНК в ткани головного мозга крыс, подвергшихся фотохимически индуцированного тромбозу.....	52
3.2 Дифференциальная экспрессия мкРНК в лейкоцитах периферической крови крыс, подвергшихся фотохимически индуцированного тромбозу.....	58
3.3 Дифференциальная экспрессия мРНК в ткани головного мозга крыс, подвергшихся фотохимически индуцированного тромбозу.....	63
3.4 Анализ клинических данных.....	68
<b>Глава 4. Обсуждение.....</b>	<b>76</b>
4.1 Обсуждение общих результатов исследования.....	76
4.2 Обсуждение результатов эксперимента с лабораторными животными.....	78
4.3 Обсуждение результатов клинической части исследования.....	86
<b>Заключение.....</b>	<b>91</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>93</b>
<b>Практические рекомендации.....</b>	<b>95</b>
<b>Перспективы дальнейшей разработки темы.....</b>	<b>96</b>
<b>Список использованных сокращений.....</b>	<b>97</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>99</b>

## Введение

### Актуальность темы исследования

Одной из ведущих причин смерти в мире является инсульт – острое нарушение мозгового кровообращения. По данным Всемирной Организации Здравоохранения за 2016 год от этого заболевания умерло 5,7 млн. человек, что составляет 10% от показателя общей смертности. Инсульт, цереброваскулярные и нейродегенеративные заболевания являются основными причинами потери трудоспособности и инвалидности у больных с различными социально значимыми болезнями [149].

Наиболее часто встречаемым видом инсульта является ишемический инсульт или ишемия головного мозга; она составляет 70-85% от общего числа инсультов. Ишемический инсульт – это острое нарушение мозгового кровообращения с повреждением ткани мозга, нарушением его функций вследствие затруднения или прекращения поступления крови (глюкозная и кислородная депривация) к тому или иному отделу мозга [6].

Ишемический инсульт запускает каскад патологических процессов, который почти мгновенно приводит к необратимой гибели нейронов и других клеток в пораженном участке мозга. Этот каскад включает в себя глутаматную эксайтотоксичность, воспаление, отек и программируемую клеточную гибель некрозом или апоптозом [123]. Вокруг пораженного участка (ядра инфаркта) развивается область отсроченной клеточной гибели нейронов – так называемая «ишемическая полутень» или «зона пенумбра». От процессов, происходящих в ней, сильно зависит общий объем поражения головного мозга. В синапсах нейронов, попавших в зону пенумбра, происходит неконтролируемое высвобождение глутамата – основного возбуждающего медиатора центральной нервной системы. Гиперстимуляция глутаматных рецепторов приводит к нарушению ионного гомеостаза клетки (увеличивается содержание  $\text{Na}^+$  и как следствие  $\text{Ca}^{2+}$  в нейронах), обменных процессов (энергетического и метаболического), а также

сигнальных путей (в том числе происходят изменения в экспрессии генов, кодирующих основные сигнальные белки). Со временем, количество нарушений в клетке становится критическим, и она вступает в апоптоз или некроз [125].

Ранее для изучения генетических механизмов различных патологий (в том числе и ишемического инсульта) в основном использовали олиго- или кДНК-микрочипы. С их помощью возможно определить количественные изменения уровня экспрессии нескольких сотен и даже тысяч мРНК одновременно. Однако, это позволяет дать только функциональную оценку процессу, а понять механизмы его возникновения не представляется возможным. Со временем значительно возросло число работ, посвященных молекулам, модифицирующим процесс транскрипции и трансляции. Эти молекулы, по мнению ученых, могли играть важную роль патогенезе многих заболеваний. Так в 2006 году Эндрю Файер и Крейг Мелло получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины за изучение РНК-интерференции. Это процесс подавления экспрессии генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Одними из молекул, принимающими участие в РНК-интерференции, являются микроРНК (мкРНК). Эти малые некодирующие РНК при связывании с мРНК-мишенью могут вызывать ее деградацию, дестабилизацию, либо подавлять трансляцию. мкРНК можно встретить как у млекопитающих, так и у растений и даже у вирусов. У животных эти молекулы существуют во всех клетках, описан целый ряд мкРНК, экспрессирующихся в головном мозге. Более того, обнаружены внеклеточные циркулирующие мкРНК в плазме крови и в спинномозговой жидкости [29, 101].

РНК-интерференция – это очень тонкий, но мощный механизм регуляции экспрессии генов: одна мкРНК может угнетать трансляцию десятка или сотни мРНК; трансляция одной мРНК может угнетаться десятком или сотней мкРНК. Схема взаимодействия мкРНК и мРНК похожа на очень разветвленную «нейронную сеть».

Было показано, что мкРНК играют существенную роль в различных нейробиологических процессах, таких как нейрогенез, рост нейритов, а также синаптогенез [143]. К настоящему моменту известно только несколько мкРНК,

специфичных для ишемического инсульта. Они влияют на патогенетические факторы и в перспективе могут использоваться в прогнозировании исхода или даже терапии заболевания [159].

Так, в ряде работ было найдена корреляция между уровнем экспрессии мкРНК (miR-296-5p, let-7e-3p) и риском артериальной гипертензии – одной из причин инсульта [80]. В других работах было показано, что повышение экспрессии miR-15a-3p и miR-497-5p подавляет активность антиапоптотического белка Bcl2, при использовании специфических ингибиторов мкРНК (PPAR $\delta$  для miR-15a-3p или антагомиров для miR-497-5p), в результате, происходило сокращение зоны инфаркта и снижение неврологического дефицита [123].

В ряде исследований, посвященных изучению динамики изменения профиля экспрессии мкРНК, была показана зависимость профиля их экспрессии от времени взятия образца в период острого ишемического инсульта или восстановления. Также было установлено, что экспрессия мкРНК зависит от стадии инсульта и изменяется со временем [50].

Однако, несмотря на интенсивные исследования, отсутствуют данные об общем реестре мкРНК, участвующих в развитии ишемии головного мозга. Это связано со многими факторами: различными допущениями при моделировании патологии, разными способами оценки уровня экспрессии мкРНК и доказательством их активности. На данный момент существуют исследования, выполненные у экспериментальных животных с различными формами инсульта или черепно-мозговой травмой. Однако, имеются лишь единичные работы, посвященные изучению экспрессии мкРНК при ишемическом инсульте на больных; те исследования, которые есть, в основном направлены на изучение узкого спектра (иногда до единичных) мкРНК [159].

Таким образом, актуальность и перспективность исследования профиля экспрессии мкРНК в эксперименте и в клинике не вызывает сомнений. Разработка данной проблемы представляет интерес как для фундаментальной генетики, так и для практической медицины.

### **Цель исследования:**

Провести сравнительный анализ профилей экспрессии мкРНК и соответствующих генов-мишеней в ткани мозга и крови крыс с фокальной ишемией мозга и больных с инсультом (острый период) при нарушении мозгового кровообращения для оценки возможности их использования в качестве биомаркеров ишемического повреждения.

### **Задачи исследования:**

1. Определить спектр дифференциально экспрессирующихся мкРНК среди всего пула мкРНК в биоптате мозга и крови крыс в динамике острого периода фокальной ишемии мозга;
2. Провести кластерный корреляционный анализ полученных данных с целью выявления схожего профиля экспрессии мкРНК в мозге и крови;
3. Изучить изменение уровня экспрессии генов-мишеней дифференциально экспрессирующихся мкРНК в биоптате мозга крыс при ишемическом повреждении мозга;
4. Оценить функциональную роль дифференциально экспрессирующихся мкРНК и возможности их использования в качестве биомаркеров ишемического повреждения мозга;
5. Изучить у пациентов с острыми нарушениями мозгового кровообращения профиль экспрессии мкРНК в крови.

### **Научная новизна**

Новизна планируемых исследований определяется их комплексным характером: проведение исследований как в эксперименте на животных, так и в клинике у больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения.

В экспериментальных исследованиях на животных были показаны дифференциальные отличия в экспрессии мкРНК и мРНК как в зоне пенумбра, так

и в «интактном полушарии» ишемизированных крыс через 24 и 48 часов после фотохимически индуцируемого тромбоза по сравнению с ложноперирированными животными. Была обнаружена корреляция между значениями экспрессии 5 мкРНК в мозге и крови экспериментальных животных. Впервые было выявлено, что по сравнению с ложноперирированными (контрольными) животными уровни экспрессии мкРНК изменяются не только в ишемизированном полушарии, но и в интактном.

В клинических исследованиях были показаны дифференциальные отличия в экспрессии 4 мкРНК пациентов на первые и восьмые сутки после ишемического инсульта по сравнению с контрольной выборкой.

Впервые была показана значимость мкРНК *let-7i-3p* в патогенезе ишемии головного мозга как в клинике у больных с ИИ, так и в экспериментальных исследованиях на крысах с односторонней фокальной ишемией мозга.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Полученные в настоящей работе данные об изменениях экспрессии 29 мкРНК, а также 11 генов мишеней углубляют понимание патогенеза ишемии мозга. Обнаруженные в биоптатах мозга экспериментальных животных корреляции между значениями экспрессии мкРНК и их теоретическими генами мишенями иллюстрируют взаимосвязь между ними.

Были обнаружены мкРНК, которые ранее не были связаны с ишемией мозга (*let-7i-3p* и *miR-92b-3p*). В дальнейшем, их исследование может помочь обнаружить новые биомаркеры или терапевтические агенты для инсульта.

Найденная нами дифференциальная экспрессия *let-7i-3p* и *miR-23a-3p* в плазме крови всех наблюдаемых пациентов указывает на потенциальную диагностическую значимость этих мкРНК.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. В первые 24 часа после фокальной ишемии у крыс происходят изменения в экспрессии мкРНК как в ишемизированном, так и в интактном полушарии.
2. Уровни экспрессии выбранных мкРНК в ишемизированном полушарии образуют кластеры, соответствующие их физиологическим группам.
3. Через 24 и 48 часов экспрессия 22 генов мишеней была изменена в мозге ишемизированных крыс по сравнению с контрольной выборкой.
4. Установлена взаимосвязь экспрессии ряда мкРНК с их генами-мишенями.
5. Экспрессия 5 мкРНК была изменена у пациентов с ишемическим инсультом на первые и на восьмые сутки по сравнению с контрольной группой.
6. Изменение экспрессии let-7i-3p и miR-23a-3p в плазме крови пациентов могут служить потенциальными биомаркерами ишемического инсульта.
7. Изменение экспрессии miR-223-3p и miR-99a-5p в плазме крови пациентов могут служить потенциальными прогностическими факторами ишемического инсульта.

### **Апробация результатов**

Основные результаты работы представлены на I Национальном Конгрессе по регенеративной медицине, Москва, 2013; Международной конференции «RNA UK 2014», на Уииндермире, Британия, 2014; XI международном симпозиуме «Генетика человека» Новосибирск, 2014; VII съезде Российского общества медицинских генетиков, Санкт-Петербург, 2015.

Апробация диссертации состоялась на заседании апробационной комиссии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) 28 декабря 2018 года, протокол №8.

## **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты исследования используются в лабораторной практике лаборатории нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, а также в учебном процессе на кафедре медицинской генетики ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

## **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах (из перечня ВАК) и 7 тезисов в сборниках материалов научных конференций.

## **Личный вклад автора**

Автором проведен поиск и систематизация литературных данных по теме диссертации, самостоятельно разработаны дизайн и программа исследования. Автор непосредственно участвовал в организации и проведении клинического и экспериментального этапа исследования. Автор лично ассистировал при операциях на животных, выделял мкРНК и мРНК из образцов ткани головного мозга и крови животных, а также плазмы крови больных ишемическим инсультом и добровольцев; проводил реверс транскрипцию РНК и последующую ПЦР в реальном времени. Автор непосредственно осуществлял анализ, статистическую обработку и интерпретацию полученных данных. Подготовка и публикация результатов лабораторных и клинических исследований выполнены автором лично.

## **Структура и объем работы**

Диссертационная работа изложена на **116** страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов

исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и библиографического указателя. Диссертация содержит **9** таблиц и **14** рисунков. Указатель литературы включает в себя **163** библиографических источника, в том числе **7** работ на русском и **156** на иностранном языках.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Ишемический инсульт

#### 1.1.1 Этиология, классификация, патогенез

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, инсульт является ведущей причиной смертности и инвалидности среди взрослого населения во всем мире [149]. По этиологии инсульт различают на ишемический (ИИ), который возникает при недостаточном поступлении кислорода и глюкозы с кровью к тем или иным участкам мозга в результате спазма или тромбоза мозговых артерий; и геморрагический, обусловленный разрывом артерий из-за чрезмерного притока крови в мозг. ИИ – острое нарушение мозгового кровообращения в определенном артериальном бассейне, которое приводит к некротизированию очага мозговой ткани и сопровождается нарушением его функций. ИИ встречается примерно в пять раз чаще геморрагического [4], в России доля ИИ составляет порядка 80% от общего числа больных с инсультом [6].

Хотя за последние годы смертность от ИИ в России, но она до сих пор остается высокой и составляет примерно 123 случая на 100 тысяч человек в год. При этом, лишь около 20% пациентов, выживших после ИИ, способны вернуться к прежней трудовой деятельности [2].

ИИ классифицируют по патогенезу (классификация TOAST) [9] и по объему поражения. В классификации TOAST выделяют пять патогенетических подтипов ИИ:

- 1) атеротромбоэмболический инсульт – АТИ. Возникает вследствие развития атеросклероза крупных артерий головного мозга;
- 2) кардиоэмболический инсульт – КЭИ. Диагностируют у пациентов с окклюзией церебральных артерий вследствие кардиогенной эмболии;
- 3) лакунарный инсульт – ЛИ. Возникает вследствие окклюзии мелких сосудов;

- 4) инсульт другой установленной этиологии (неатеросклеротическая ангиопатия, заболевания крови и др.);
- 5) инсульт неустановленной этиологии (криптогенный). В частности, определяют при обнаружении нескольких равновероятных причин.

Ишемию мозга по объему поражения можно разделить на глобальную (общемозговую), которая поражает большую часть мозга и на очаговую (фокальную), возникающую при поражении небольшого региона мозга. Очаговые поражения преобладают над общимозговыми. При этом, поражение всегда будет возникать дистальнее места, где произошла обструкция. Можно выделить две зоны ишемического поражения – центральную плотную зону (ядро ишемии) и прилегающую менее плотную – зону penumbra («ишемическая полутень»). Ядро ишемии с большей долей вероятности некротизируется, функциональные нарушения в зоне penumbra обратимы, и клетки в ней могут выжить [18].

По этиологии ИИ может быть нетромботическим, тромботическим и возникшим в результате эмболии мозговых сосудов. Нетромботический инсульт возникает на фоне сосудисто-мозговой недостаточности, при этом критическое снижение мозгового кровотока наступает вследствие нарушения общей гемодинамики или срыва саморегуляции мозгового кровообращения при наличии стеноза или патогенной извитости крупного экстра- или интракраниального мозгового сосуда. Это может происходить в результате продолжающегося длительное время ангиоспазма или из-за замедления кровотока в связи с повышением вязкости крови, анемией, массивной кровопотерей. Срыв саморегуляции просвета мозговых сосудов чаще всего возникает в период выраженных перепадов артериального давления [4].

Причиной тромботического инсульта является тромбоз магистральных артерий головы и сосудов мозга. В основе тромбоза лежит патологическое изменение стенки сосудов, чаще обусловленное формированием атеросклеротических бляшек (повреждение эндотелия, разрастание интимы, изъязвление), что приводит к стенозу и как следствие изменению реологических

свойств крови (увеличение вязкости). Изменение белкового коэффициента в крови связано с нарастанием содержания альбуминов, а также увеличением коагуляционной активности крови. Всё это приводит к нарушению центральной гемодинамики, в частности к снижению артериального давления, замедлению артериального кровотока в бассейне сосудов, оказавшихся в состоянии стеноза. Тромб со временем приобретает большие размеры и может полностью закрыть просвет сосуда, вызвать его окклюзию [3].

Эмболический инсульт возникает при попадании в просвет сосуда мозга эмбола. Им чаще всего является частица распадающегося пристеночного тромба в полости сердца, возникшего вследствие врожденных или приобретенных клапанных пороков сердца, таких как стеноз митрального клапана, его пролапс и аортальный порок, при ревматическом, бактериальном эндокардите [4].

Возможна сочетанная форма ишемического инсульта – тромбоэмболический инсульт, который возникает при тромбозе вен конечностей, брюшной полости, малого таза в сочетании с врожденным незаращением межпредсердной или межжелудочковой перегородки сердца. Также причиной эмболии мозговых сосудов может быть и распадающаяся атеросклеротическая бляшка в восходящей части или в дуге аорты, а также в магистральных сосудах головы (артерио-артериальная эмболия) [132].

Развитие ишемического инсульта происходит быстро: в течение нескольких секунд или минут (реже на протяжении часов или дней). Оно проявляется двигательными, чувствительными, речевыми и/или другими очаговыми неврологическими нарушениями, в зависимости от пораженного сосудистого бассейна головного мозга (нейроваскулярный синдром) [5].

Ишемические инсульты чаще наблюдаются у больных с атеросклерозом, артериальной гипертензией или на фоне сочетания клинических проявлений этих заболеваний. Перед наступлением ишемического инсульта могут возникать преходящие нарушения мозгового кровообращения, которые характеризуются полной обратимостью очаговой или диффузной неврологической симптоматики в течение 24 часов. ИИ развивается чаще во сне или вскоре после пробуждения,

после горячей ванны, употребления алкоголя. В трети случаев его развитие происходит остро. Это характерно для развития ИИ в следствие эмболии мозговых сосудов.

Ишемическое повреждение имеет выраженный каскадный характер. Биохимические изменения, происходящие в первые часы после ишемическо-гипоксического повреждения, могут привести к необратимым последствиям, заканчивающимся апоптозом или некрозом клеток мозга. По данным В.И. Скворцовой с соавторами [3], ишемический каскад включает следующие этапы:

1. Снижение мозгового кровотока (энергетический дефицит);
2. Глутаматная эксайтотоксичность и избыток глутамата;
3. Внутриклеточное накопление кальция в нейронах;
4. Активация ряда внутриклеточных ферментов, например протеаз;
5. Повышение синтеза NO и генерации активных форм кислорода (АФК), а также развитие окислительного стресса;
6. Экспрессия генов раннего реагирования;
7. Отдаленные последствия ишемии (реакция местного воспаления, микроваскулярные нарушения, повреждение гематоэнцефалического барьера);
8. Апоптоз — генетически запрограммированная клеточная гибель.

Первый этап – снижение мозгового кровотока и уровня кислорода. Известно, что основным источником энергии для развития мозга является окисление глюкозы. В артериальной крови содержание кислорода и глюкозы больше, чем требуется ткани мозга. Поэтому, в случае затруднения кровотока мозг пытается компенсировать энергетический дефицит механизмом анаэробного расщепления глюкозы, в результате которого образуется 2 молекулы АТФ вместо 38. Также в процессе анаэробного гликолиза образуется молочная кислота (лактат), развивается лактат-ацидоз в тканях, что приводит к более глубоким нарушениям метаболизма.

На ранних этапах ишемии клеточный ацидоз выполняет защитную функцию, оказывая стабилизирующее действие на мембраны, предотвращая клеточную гибель. Усиленное высвобождение лактата при гипоксии дает метаболический лактат-ацидоз, который блокирует активность фермента фосфофруктокиназа, что лимитирует адаптацию. Поскольку аэробный механизм гликолиза не работает из-за кислородного дефицита, а анаэробный – из-за ацидоза, последствия метаболического лактат-ацидоза становятся более выраженными – наступает истинный дефицит АТФ [7].

Второй этап наступает через 10-30 минут после возникновения ишемии. Происходит выброс глутамата, ведущий к глутаматной «эксайтотоксичности». Глутамат является одним из основных возбуждающих нейромедиаторов ЦНС. Он отвечает за когнитивные функции такие как обучение и память. Глутаматные рецепторы разделены на два типа ионотропные и метаботропные. Ионотропные рецепторы представляют собой ионные каналы. К данным рецепторам относятся NMDA, AMPA и каинатные. Метаботропные рецепторы представляют собой трансмембранные белки, которые при связывании с глутаматом запускают каскад внутриклеточных реакций [3].

Больше всего глутамата содержится в нервных окончаниях. Он не проникает через гематоэнцефалический барьер и синтезируется в митохондриях нейронов из глюкозы (через  $\alpha$ -кето-глутарат) или глутамин [1]. Глутамат не может проникать через мембраны, поэтому концентрация глутамата во внеклеточном пространстве регулируется рядом транспортеров. Основной функцией глутаматных транспортеров является поддержание низкой концентрации возбуждающих аминокислот во внеклеточном пространстве. При ИИ происходит дисрегуляция транспортеров и глутамат накапливается в межклеточном пространстве, что приводит к избыточной активации глутаматных NMDA-рецепторов, и в последующем к клеточной гибели. Глутаматные NMDA-рецепторы – это потенциал-зависимые и лиганд-зависимые ионные каналы, избирательно пропускающие положительно заряженные ионы. Основную часть ионного тока составляют ионы кальция и натрия – они попадают внутрь клетки, а ионы калия –

из клетки [1]. При базальной синаптической передаче, активация синаптических NMDA рецепторов (в основном, содержащих NR2A субъединицу) стимулирует нейрональный сигнальный комплекс выживания (NSC). В тоже время, при патологических состояниях, таких как инсульт, увеличение концентрации внеклеточного глутамата вызывает активацию внесинаптических NMDA рецепторов (в основном, содержащих NR2B субъединицу). Гиперактивация глутаматных рецепторов приводит к нарушению регуляции ионных каналов и их проницаемости, что способствует усиленному поступлению внеклеточного  $Ca^{2+}$  в цитозоль, а затем в митохондрии. Таким образом происходит митохондриальная деполяризация, выход  $Ca^{2+}$ , цитохрома C и апоптотического белка в цитозоль, образуется неспецифическая пора высокой проводимости во внутренней мембране митохондрий. [1]. Кроме того, увеличение притока  $Ca^{2+}$  способствует связыванию активированной протеинкиназы ассоциированной со смертью (aDAPK) с NR2B субъединицей NMDA рецепторов. Это приводит к активации нейрональных сигнальных комплексов смерти (NDC), что угнетает NSC и опосредует клеточную гибель [139]. Было показано, что ингибирование связывания aDAPK с NR2B уменьшает активацию NDC и препятствует эксайтотоксическому нейрональному повреждению, вызванного ишемическим инсультом [98].

На следующем этапе активируется кальпаин – кальций зависимая протеаза, ответственная за ремоделирование цитоскелета. У человека существует две изоформы этого белка – кальпаин I (находящийся в нейронах) и кальпаин II (находящийся в глии). После того как уровень кальция становится достаточным для активации кальпаина, этот фермент вместе с прокаспазами и белком Вах (про-апоптотическими молекулами) начинают уничтожать цитоскелет и мембрану нейронов (именно кальпаин I более чувствителен к изменению кальция). Начиная с этого этапа, восстановление притока кислорода или реперфузия не позволяют сделать повреждения в клетке обратимыми .

Активация вышеуказанных процессов создает метаболический дисбаланс в клетке. При этом кислород во время реперфузии может восстанавливаться не полностью, и переходить не в воду, а в токсические свободные радикалы или же в

NO. При повышенном синтезе NO, генерации активных форм кислорода (АФК), активации свободных радикалов происходит развитие окислительного стресса. Свободные радикалы взаимодействуют с липидной стенкой мембран, вызывая перекисное окисление липидов (ПОЛ), в результате которого происходит разрушение клеточной стенки, нарушается проницаемость, и, в конечном итоге, это приводит к гибели клетки. Параллельно с этим образуются токсичные продукты свободных радикалов, которые оказывают цитотоксическое, иммуногенное и мутагенное действие на ДНК и РНК.

Головной мозг считается наиболее чувствительным органом к ПОЛ. Это связано с высоким содержанием в тканях мозга фосфолипидов и соотношением белки/липиды (в 10 раз выше, чем в скелетных мышцах), малым количеством витамина А (антиоксиданта), а также недостаточностью антиоксидантных защитных систем в головном мозге, большая часть из которых, содержится в крови.

Последним механизмом повреждения при ишемическом каскаде является угнетение трансляции белков. Это происходит по нескольким причинам: во-первых, при критическом уменьшении АТФ идет полная блокировка трансляции белков (трансляция – АТФ-зависимый процесс), во-вторых, уменьшается содержание факторов инициации транскрипции - eIF4G и eIF4E (во многом объясняется протеазной активностью кальпаина), в-третьих, эпигенетическая пост-транскрипционная регуляция и перестройка в реперфузированных нейронах цитоплазматических поли(А)-содержащих мРНК с образованием гранул ингибирует трансляцию [60]. Гранулированная мРНК не может присоединиться к 40S рибосоме и тем самым трансляция белков останавливается.

На последней стадии ишемического каскада возникают "отдаленные" последствия – реакции местного воспаления, микроваскулярные нарушения, повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Сразу после ишемии мозга целостность ГЭБ нарушается – повреждаются эндотелиальные клетки, астроциты, перициты и внеклеточный матрикс [52]. Однако наиболее выраженными нарушения становятся через несколько часов, что приводит к развитию аутоиммунных реакций на нейроспецифические белки, попавшие в кровь.

Аутоантитела способствуют повреждению нервной ткани и ГЭБ, что приводит к активации вторичной аутоиммунной реакции.

### 1.1.2 Генетические факторы исследования ишемии

Уже давно проводятся исследования различных аспектов гипоксии-ишемии в том числе и генетических. Например, с помощью моделирования ишемии на животных или клеточных культурах изучаются генетические факторы развития данной патологии и восстановления организма после повреждения [131]. В исследованиях на больных с инсультом проводится поиск более доступных диагностических маркёров заболевания, а также изучаются факторы предрасположенности, которые влияют на развитие ишемического инсульта у человека [66]. Все эти работы в перспективе дадут возможность диагностировать и прогнозировать заболевание с использованием новых более точных генетических биомаркёров [128], а также использовать их для лечения [21].

Ранее проводились исследования по поиску генетических факторов риска трех основных синдрома ишемического инсульта (болезни малых и крупных сосудов, а также кардиоэмболического инсульта). Была обнаружена взаимосвязь вариантов в ряде генов с этими синдромами. Так варианты в гене *HDAC9* связан с болезнью крупных сосудов, а варианты в генах *PITX2* и *ZFHX3* с кардиоэмболическим инсультом [138]. В ряде исследований также была показывана взаимосвязь генетических вариантов с инсультом не зависимо от синдрома, но с меньшей значимостью [83]. На сегодняшний день кажется очевидным, что ишемический инсульт не вызван одним общим патогенетическим фактором, однако, по-видимому, существует значительная взаимосвязь между различными подтипами ишемического инсульта в отношении таких факторов риска, как, например, гипертония. Так показано, что оценка риска, учитывающая несколько генетических вариаций, связанных с риском ишемического инсульта, связана с ишемическим инсультом в целом [96].

На сегодняшний день, благодаря исследованиям на нокаутных мышах была выявлена роль некоторых генов в патогенезе ишемии, в частности, генов семейства *Bcl-2*.

*Bcl-2* – это протоонкогенное семейство, состоящее из генов регуляции апоптоза, которые кодируют порядка 25 различных белков [106]. У всех этих белков есть один константный BH-домен (домен гомологичный b-клеточной лимфоме). Некоторые белки этого семейства (*Bcl-2*, *Bcl-x*, *Mcl-1* и др.) имеют все четыре домена – BH1-BH4. Гены, кодирующие эти пептиды являются анти-апоптотическими. Про-апоптотические гены чаще всего кодируют белки, которые имеют три домена BH1-BH3 (*Bax* и *Bak*) или только BH3 домен (*Bad*, *Bid*, *Bim*, *Bik*, *Noxa* и *Puma*). *Bcl-x* и *Bax* имеют альфа-цепи, которые создают каналы или поры для переноса факторов апоптоза. В первые 24 часа ишемического повреждения ген *Bax* усиленно экспрессируется, тогда как анти-апоптотические гены этого семейства не меняют свой профиль экспрессии. Увеличение *Bax* в клетке предшествует активации апоптотических механизмов эксайтотоксичности. Для неонатальных крыс (для взрослых это доказано не было) было показано, что *Bax*-ингибиторы наряду с увеличением экспрессии *Bcl2l1* (ген, кодирующий белок *Bcl-x*) являются хорошими нейропротекторами [144]. Была также выявлена роль белка *Bad* в патогенезе ишемического повреждения. Его проапоптотическая активность регулируется фосфорилированием [148].

Белки семейства *Bcl-2* контролируют внутренний, опосредованный митохондриями, путь гибели клетки. Они высвобождают цитохром С из митохондрий, который посредством белка *Araf-1* осуществляет последовательную активацию каспазы 9 и 3. Каспазы – это семейство цистеиновых протеаз, расщепляющие белки по остаткам аспартата. Многие из этих молекул участвуют в процессе запрограммированной клеточной гибели. При моделировании ишемии степень активации каспазы 3 варьируется. Было выявлено, что чем взрослее крыса, подвергшаяся ишемии, тем менее выражен профиль экспрессии гена *Casp3* [147]. В другом эксперименте было показано, что при лечении ишемизированных крыс неселективными ингибиторами каспаз 8 и 9 уменьшается потеря ткани мозга на 30-

50% по сравнению с контрольными животными [43]. Но при этом, специфическое ингибирование каспазы 3 ухудшает прогноз ишемического повреждения. Это можно объяснить тем, что, с одной стороны, угнетаются неапоптотические функции каспазы 3 (она участвует в миграции нейронов, модуляции синтетической пластичности), а с другой стороны, на смену каспаз-зависимому пути активируется каспаз-независимый путь апоптоза. [147]

Клеточная гибель может инициироваться не только внутренними механизмами, но и поверхностным рецепторным семейством TNF (фактор некроза опухолей). Сигнал клеточной гибели инициируется агрегацией домена смерти (он содержит рецепторы семейства TNF) со специфическим лигандом на поверхности клетки. Присоединение лиганда к поверхности клетки привлекает Fas-ассоциированный домен смерти (FADD). Это цитоплазматическая молекула, одна из функций которой состоит в активации каспазы 8-Bid пути клеточной гибели. Было показано, что блокирование Fas-рецептора на уровне его трансляции или активации оказывает нейропротекторное действие [45].

Апоптоз может запускаться также в результате поломки ДНК и привлечения белка p53. Активируясь, p53 связывается с промоторами генов, ответственных за контроль роста клетки и апоптоз (*Bcl2*, *Bax*, *Bcl2l1*, *Fas*), и ускоряет их транскрипцию.

Наряду с гибелью клеток идет параллельный процесс их восстановления. Первыми включаются гены раннего реагирования, такие как прото-онкогены *C-Fos* и *C-Jun*. Сразу после реперфузии увеличивается экспрессия генов, кодирующих белки теплового шока [148]. Далее, вероятнее всего, включается сигнальный путь Notch, который ответственен за ангиогенез в зоне ишемии [92], и пролиферация и дифференциацию нервных клеток-предшественников в субвентрикулярную область [88]. Функции этого сигнального пути в патогенезе ишемии до конца неизвестны. Однако установлено, что блокировка Notch сигналинга оказывает нейропротективное действие после инсульта. Более того, Notch может вызывать клеточную гибель через p53-зависимый путь, тем самым инициировать апоптоз клеток предшественников нейронов [107]. Пролиферацию клеток, миграцию их в

зону поражения и дифференциацию новых нейронов также осуществляет *Sox9* (транскрипционный фактор) и нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) [133].

Иммунные и воспалительные реакции играют важную роль в патогенезе ишемии головного мозга. Они вносят существенный вклад в повреждение нейронов. При воспалительной реакции происходит увеличение содержания лейкоцитов. После ишемии и следующей за ней реперфузии они накапливаются в ткани головного мозга. На модели МСАО было показано, что максимальная концентрации лейкоцитов в мозге устанавливается через 24-48 часов после поражения [53]. При активации лейкоцитов – посредством высвобождения протеаз, активных форм кислорода и других медиаторов воспаления – снижается проницаемость сосудов, а присущая им агрегирующая и адгезивная активность может приводить к обструкции микроциркуляторного русла в очаге ишемии и снижению тканевого кровотока [47]. Взаимодействие лейкоцитов с эндотелием опосредуется различными факторами, в том числе молекулами адгезии. В большинстве работ, посвященных изучению генетических факторов при воспалении после ишемии, была рассмотрена экспрессия только специфичных генов мишеней, например, цитокинов, хемокинов и молекул клеточной адгезии. Было показано, что в течение 4–24 часов после ишемического воздействия увеличивается экспрессия мРНК медиаторов воспаления: IL1, IL6, TNF, ICAM1 и ELAM1 [93]. При этом, максимальное значение экспрессии этих генов совпадает с лейкоцитарной инфильтрацией, образованием отека и прогрессирующей гибелью нейронов.

Другими диагностическими маркерами, которые активно изучаются не только при инсульте, но и при других патологических состояниях (рак [3], сердечно-сосудистыми заболеваниями [85], ожирение [95]), являются микроРНК (мкРНК). Они осуществляют эпигенетическую регуляцию экспрессии множества генов на трансляционном и пост-трансляционном уровнях. Литературные данные указывают на то, что мкРНК стабильно экспрессируются и циркулируют в крови довольно длительное время, устойчивы к расщеплению нуклеазами [24].

На сегодняшний день точно не определено какие мкРНК, циркулирующие в крови, секретируются поврежденными клетками мозга, отражая процессы, индуцированные ишемией. Мало известно и о корреляции между количеством циркулирующих мкРНК и их экспрессией в ткани мозга. Но не возникает сомнений в том, что циркулирующие мкРНК могут быть важными звеньями патогенеза инсульта. В перспективе, возможно использование этих молекул в качестве биомаркеров тяжести ишемического повреждения мозга, прогностических факторов, а также терапевтических мишеней для лечения ишемии [140].

## 1.2 микроРНК

### 1.2.1 История открытия и общие сведения

микроРНК (англ. microRNA, miRNA) — класс некодирующих РНК, которые имеют длину около 22 нуклеотидов. мкРНК кодируются генами, которые впервые были обнаружены у *Caenorhabditis elegans* в 1993 году. После открытия первой мкРНК, *lin-4* долгое время считалась единственной и уникальной (специфичной для нематод идиосинক্রазией), и только в 2000 году была обнаружена и описана мкРНК *let-7*, которая ингибирует экспрессию *lin-41*, *lin-14*, *lin-28*, *lin-42* и *daf-12* у *C. Elegans* [122]. Также было обнаружено, что данная мкРНК достаточно консервативна и присутствует в других организмах [111]. Было также обнаружено, что эти молекулы участвуют в феномене, называемом РНК-интерференцией — процессе подавления экспрессии гена на стадии транскрипции, трансляции, деаденилирования или деградции мРНК. В 2006 году Эндрю Файер и Крейг Мелло получили Нобелевскую премию в области физиологии и медицины за работы по изучению РНК-интерференции у нематоды *Caenorhabditis elegans*, опубликованные в 1998 году. В последующие годы было опубликовано большое количество статей, описывающих свойства и строение мкРНК и открыто множество новых мкРНК. На сегодняшний день, у человека было идентифицировано 2693 зрелых мкРНК [72].

На момент открытия мкРНК вопрос о названии этих молекул не стоял столь остро. На сегодняшний день приняты следующие правила названия мкРНК и их предшественников [12, 46]:

1. Вначале идет трехбуквенное обозначение вида организма, геному которого эта мкРНК принадлежит. Например «hsa» - Homo sapiens, «rno» - Rattus norvegicus, «mmu» - Mus musculus.
2. Все мкРНК называются по порядку и имеют приставку «miR». Первые открытые мкРНК имеют название с приставкой «let». Предшественники мкРНК (пре-мкРНК) обозначаются аналогичным образом, без заглавного «R» в приставке – «mir».
3. После приставки идет порядковый номер мкРНК.
4. Далее идут факультативные обозначения: если зрелая мкРНК имеют схожую последовательность, но отличаются на один или два нуклеотида, тогда после общей цифровой части названия идет буквенное окончание. Например – hsa-miR-30a-5p и hsa-miR-30e-5p (uguaaacaussucgacuggaag и uguaaacaussuugacuggaag)
5. Суффикс «-5p» или «-3p» обозначает с какой цепи пре-мкРНК транскрибировалась зрелая молекула – со смысловой или антисмысловой. Ранее вместо суффикса использовали значок «\*» для обозначения «пассажирской» цепи мкРНК – той, которая экспрессируется в гораздо меньшем количестве и реже присоединяется к комплексу Risc. «Ведущая» же цепь мкРНК не имела суффикса. Например – hsa-miR-30e – это hsa-miR-30e-5p, а hsa-miR-30e\* - это hsa-miR-30e-3p.
6. Пре-мкРНК, которые процессируют одинаковые зрелые мкРНК, но при этом находятся в разных участках генома, имеют в названии дополнительный числовой суффикс. Например - hsa-mir-194-1 и hsa-mir-194-2, соответственно

### 1.2.2 Биогенез мкРНК

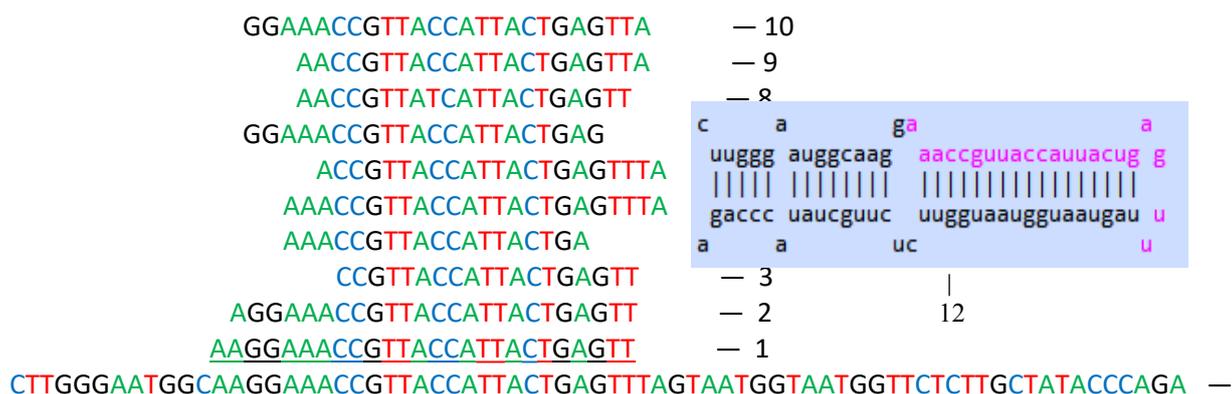
мкРНК транскрибируется из собственно генов-мишеней, из других генов (40%) или межгенного пространства (60%) при помощи РНК-полимеразы II [78]. Гены, внутри которых находится участок, кодирующий мкРНК, называются хост-генами. Эти участки чаще всего расположены на антисмысловой цепи хост-генов, поэтому мкРНК транскрибируются отдельными элементами [74], а если мкРНК лежит на смысловой цепи то, соответственно, она транскрибируется совместно со своим хост-геном [15, 103, 124]. В таком случае, можно говорить о том, что экспрессия мкРНК связана с экспрессией хост-гена, например, экспрессия hsa-miR-650 связана с экспрессией гена, кодирующего иммуноглобулин лямбда . мкРНК транскрибируется из собственно генов-мишеней, из других генов (40%) или межгенного пространства (60%) при помощи РНК-полимеразы II [78]. Гены, внутри которых находится участок, кодирующий мкРНК, называются хост-генами. Эти участки чаще всего расположены на антисмысловой цепи хост-генов, поэтому мкРНК транскрибируются отдельными элементами [74], а если мкРНК лежит на смысловой цепи то, соответственно, она транскрибируется совместно со своим хост-геном [15, 70, 103]. В таком случае, можно говорить о том, что экспрессия мкРНК связана с экспрессией хост-гена, например, экспрессия hsa-miR-650 связана с экспрессией гена, кодирующего иммуноглобулин лямбда [103].

По расположению внутри хост-гена, мкРНК можно разделить на две группы: мкРНК, располагающаяся внутри экзонов хост-гена (16%); мкРНК, располагающаяся внутри интронов хост-гена (84%).

Около 42%-48% мкРНК имеют общий промотор, включающий в себя отдельные петли, из которых процессируется зрелая мкРНК [11]. Однако, наличие общего промотора еще не говорит о сходстве в структуре и в функциях зрелой мкРНК. Более того, один и тот же предшественник мкРНК (прекурсор) может давать несколько видов мкРНК. Это так называемые изомиры [102]. Этот термин обозначает последовательности зрелых мкРНК, которые отличаются от изученных мкРНК, но имеют один и тот же предшественник. Благодаря современной

технологии глубокого секвенирования было выявлено, что один и тот же мкРНК-прекурсор может давать до семи различных вариаций зрелой мкРНК [28]. Такое разнообразие зрелой мкРНК в геномах организмов существует благодаря различным модификациям (Рисунок 1):

- 1) Неизмененные – канонические мкРНК. Это те мкРНК, которые процессируются в большинстве случаев и их последовательности представлены в базах данных.
- 2) Изменение 5' конца – эта модификация создает новый сайт распознавания для фермента Dicer и/или Drosha. Новые сайты могут находиться «ниже» или «выше» исходных.
- 3) Изменение 3' конца – эта модификация приводит к аналогичным изменениям.
- 4) Дополнение 3' конца – эта модификация проявляется в присоединении «лишних» нуклеотидов к 3'-концу зрелой мкРНК, которые не были в исходном предшественнике. Чаще всего это происходит в результате аденилирования или уридилирования 3'-конца с использованием нуклеотидных трансфераз [19, 151]
- 5) Замена любого нуклеотида в последовательности зрелой мкРНК – эта модификация возникает по разным причинам, в частности в результате дезаминирования.
- 6) Сдвиг исходной мкРНК – эта модификация смещает начало и конец зрелой мкРНК, но при этом ее длина остается прежней
- 7) Смешанное изменение – это сочетание нескольких вышеперечисленных модификаций.



**Рисунок 1.** Пример модификации мкРНК hsa-miR-45. 1 – каноническая мкРНК; 2, 3 – модификации 5'-конца мкРНК; 4,5 – модификации 3'-мкРНК; 6, 7 – сдвиг исходной мкРНК; 8 – замена нуклеотида в последовательности зрелой мкРНК, 9 – дополнение 3'-конца; 10 – смешанная модификация (дополнение 3'-конца и модификация 5'-конца); 11,12 – структурная схема петли пре-мкРНК [28, 71].

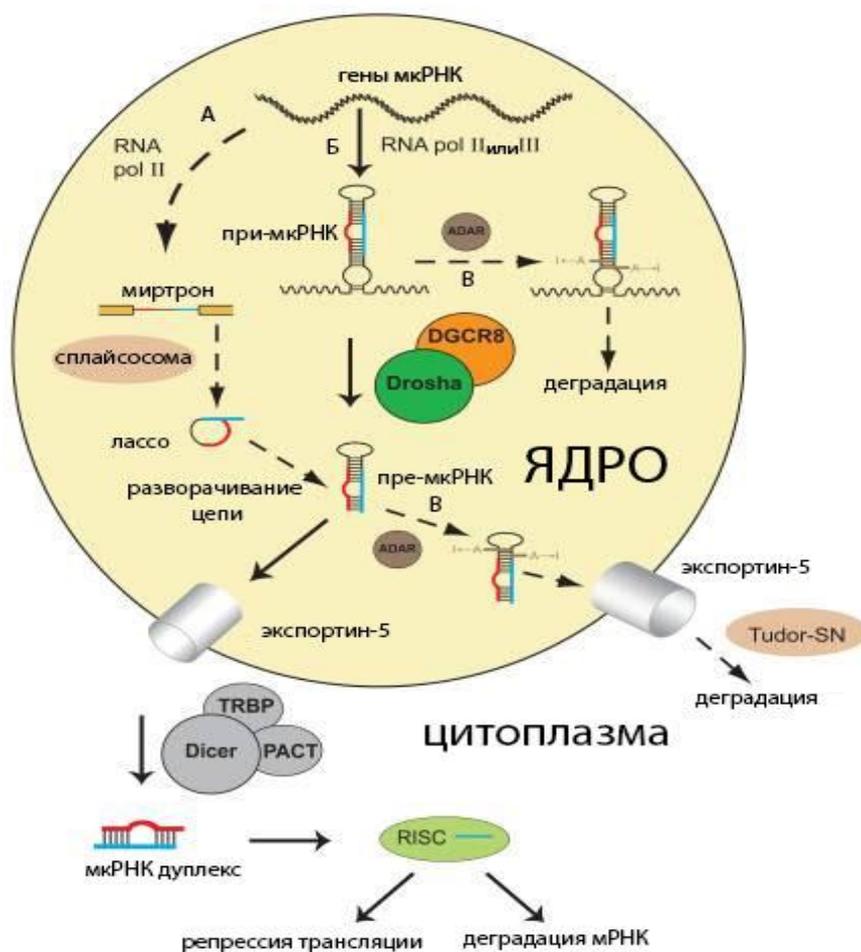
Метод глубокого секвенирования сопряжен с некоторой долей ошибочных результатов, в частности, в результате деградации образцов при пробоподготовке. Поэтому теория о модификациях мкРНК проверялась многими исследователями [37, 51, 109]. Наиболее полные и достоверные доказательства правомерности теории модификации были представлены Ли с соавт [75].

### 1.2.3 Созревание и деградация микроРНК

мкРНК проходит многоэтапный процесс созревания до воздействия на трансляцию белка. Пути созревания мкРНК можно условно поделить на основной или канонический путь созревания, который происходит у большинства мкРНК и альтернативный или неканонический [20].

Основной путь созревания мкРНК происходит в ядре клетки (Рисунок 2). Гены мкРНК чаще всего транскрибируются с помощью РНК полимеразы II. По окончании транскрипции образуется первичная мкРНК – при-мкРНК. Зачастую множество шпилек при-мкРНК могут кодироваться одним участком гена. При-мкРНК представляет собой петлю, один конец которой кепирован, а другой – полиаденилирован [22, 78]. На следующем этапе происходит специфическое

узнавание и вырезание участка при-мкРНК с помощью Рибонуклеазы III, которая носит общее название Drosha, и РНК-связывающего белка DGCR8, под названием Pasha – Partner of Drosha [54, 77]. Объединившись, эти два белка образуют микропроцессорный комплекс. Pasha распознает последовательность «стебля» при-мкРНК длиной 10 нуклеотидов, после чего этот участок расщепляется ферментом Drosha. Получившаяся петля является мкРНК-прекурсором и имеет длину 55-70 п.н. [152]. Одна при-мкРНК может содержать до шести пре-мкРНК.



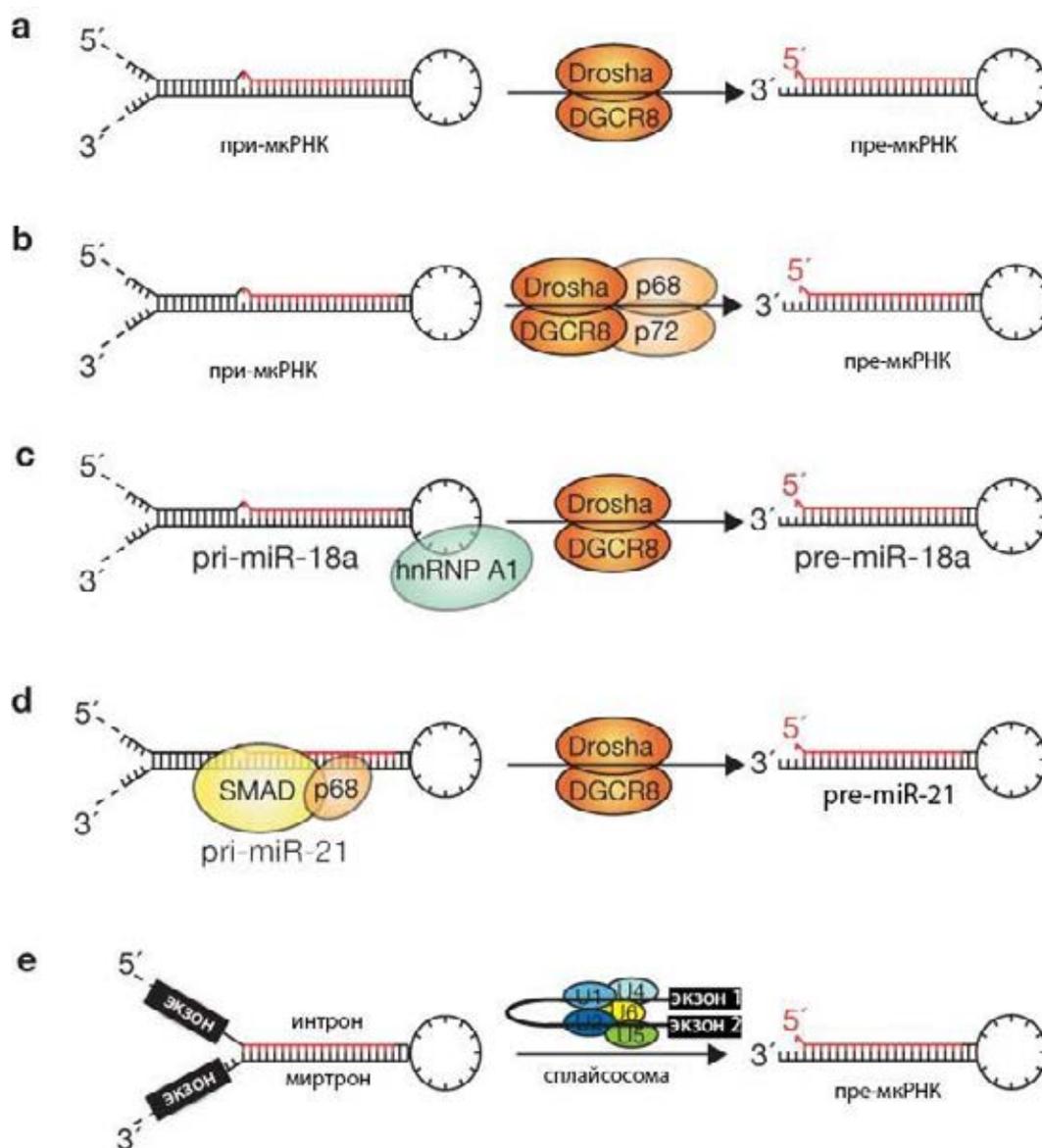
**Рисунок 2.** Путь созревания мкРНК у животных. А. Основной (канонический) путь созревания мкРНК. Гены транскрибируются РНК-полимеразой II или III в длинные транскрипты, называемые при-мкРНК. Они расщепляются ферментом Drosha и DGCR8 в промежуточную форму – пре-мкРНК. Пре-мкРНК транспортируется через мембрану ядра в цитоплазму белком переносчиком – экспортином-5. В цитоплазме пре-мкРНК расщепляется белком Dicer и образует мкРНК-дуплекс, который объединяется в комплекс RISC. В зависимости от степени комплементарности направляющей цепочки мкРНК к целевой мРНК, последняя может или полностью деградировать, или же мкРНК может репрессировать трансляцию белка, кодируемого мРНК. Б. Альтернативный путь созревания мкРНК (через миртроны). Миртрон после взаимодействия со сплайсосомой и специальным разворачивающим ферментом также становится пре-мкРНК. Дальнейшее развитие идет по основному пути. На уровне пре-мкРНК дезаминирование аденозина блокирует сайт распознавания фермента Drosha, на уровне при-мкРНК идет блокирование сайта Dicer. мкРНК, которая не подвергается процессингу деградирует, в цитоплазме млекопитающих, за что ответственен фермент Tudor-SN [42].

Большинство при-мкРНК расщепляются в пре-мкРНК основным путем (Рисунок 3 а), однако существует ряд исключений. Для успешного расщепления некоторых при-мкРНК необходимо наличие расширенного микропроцессорного комплекса, который включает не только Drosha и Pasha, а также и РНК-хеликазы (например, р68 и р72), белок, связывающий двухцепочечные фрагменты РНК, гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины и белки саркомы Юинга (Рисунок 3 б).

Существует индивидуальная регуляция некоторых мкРНК. Так, hnRNP A1 - гетерогенный ядерный рибопроtein A1, может специфически присоединяться к консервативной петле ргі-miR-18a и менять ее конформацию. Это создает более предпочтительный сайт узнавания для Drosha, тем самым, ускоряя процессинг (Рисунок 3 с). Около 14% всех человеческих при-мкРНК содержат консервативные петли (как у других видов), которые могут служить якорными участками для подобной регуляции.

Регулируя микропроцессорный комплекс, TGF-beta (трансформирующий фактор бета) и BMP (костный морфогенетический белок) индуцируют созревание miR-21 (Рисунок 3 d). Они привлекают SMAD (лиганд-специфический передатчик сигнала) к ргі-miR-21. К SMAD присоединяется р68 (РНК-хеликаза), которая ускоряет расщепление при-мкРНК, опосредованное Drosha.

Альтернативные пути созревания мкРНК включают в себя путь созревания через митроны, из эндогенных коротких шпилек РНК и из тРНК. Митроны – это короткие РНК-дуплексы, содержащиеся на шпильках интронов, и процессирующиеся сплайсосомой. При транскрипции получается структура лассо. В дальнейшем, она подвергается распрямлению специальными ферментами и образует шпильку, по сути становится пре-мкРНК [152]. Малые РНК, образующиеся из шпилек РНК и тРНК видимо имеют несколько другие функции в отличии от тех, которые образовались по каноническому пути, поэтому в дальнейшем они вероятно будут определены в другой класс молекул [8].



**Рисунок 3.** Пути созревания пре-мкРНК. а - малый микропроцессорный комплекс расщепляет при-мкРНК до пре-мкРНК, б - путь с участием расширенного микропроцессорного комплекса с белками р68 и р72, в - взаимодействие pri-miR-18a с hnRNP A1 и индуцирование последующего Drosha-зависимое расщепление, д - TGF-зависимый сигнальный путь, облегчающий присоединение SMAD к pri-miR-21, увеличение эффективности Drosha, е - альтернативный путь (через митрон) [150].

Процессинг мкРНК происходит в ядре, а для ингибирования трансляции мкРНК необходимо попасть в цитоплазму. Белок экспортин-5 при участии Ran-ГТФ распознает 3'-конец пре-мкРНК (около 2-3 п.н.) и осуществляет

энергетически зависимую транспортировку пре-мкРНК через мембрану ядра в цитоплазму, где начинается второй этап созревания мкРНК [94, 153].

В цитоплазме эндорибонуклеаза III – Dicer взаимодействует с 3'-концом шпильки пре-мкРНК и отсекает петлю, объединяющую 3'- и 5'- цепи. Получившийся двухцепочечный участок, длиной 22 п.н., называется мкРНК-дуплексом. Одна из цепочек этого дуплекса объединяется в эффекторный белок AGO (аргонавт), который является частью комплекса RISC (RNA induced silencing complex – РНК индуцирующий сайленсинг комплекс). Раньше цепочка мкРНК, которая чаще всего присоединялась к комплексу RISC называлась направляющей.

В комплекс RISC также входит Dicer, РНК-связывающий белок TRBP (трансаактивационный элемент, ответственный за распознавание вируса иммунодефицита), SMN-комплекс (комплекс выживаемости мотонейронов), *FMR1* (ген ломкой X хромосомы).

Вторая цепочка мкРНК – «пассажирская» или «цепочка-спутница» (обозначается «\*»), деградируется комплексом RISC. Для деградации пассажирской мкРНК у *Caenorhabditis elegans* используется фермент - Rat1p (5'-3' экзорибонуклеаза), у млекопитающих подобные ферменты описаны недостаточно. Пассажирская цепочка также может присоединяться к комплексу RISC и действовать на генную регуляцию. Механизмы переключения между цепочками пока не известны.

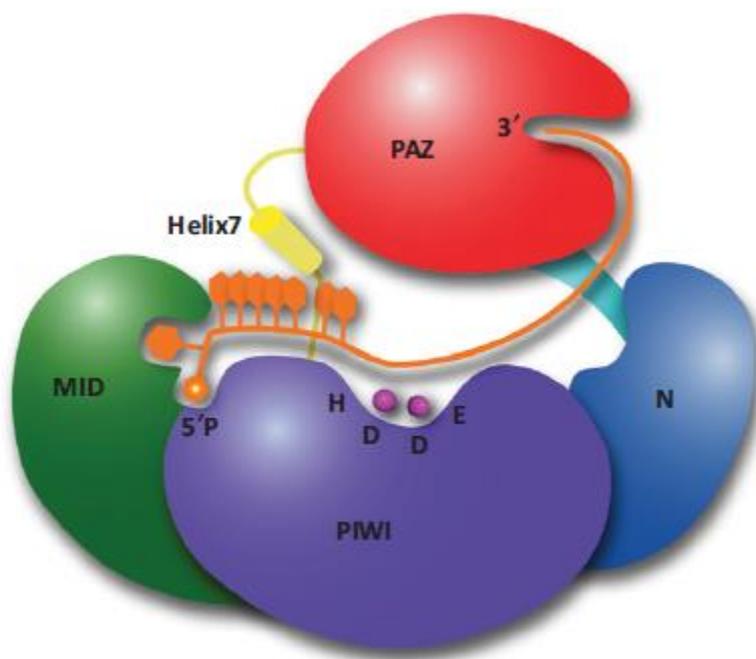
Примерно 16% мкРНК на одной из стадий созревания подвергаются модификации [67]. Модификация может происходить как на уровне пре-, так и на уровне при-мкРНК, или же затрагивать сайты зрелых мкРНК. Если регуляция идет на уровне при-мкРНК, то модификация повреждает сайт узнавания фермента Drosha, вследствие чего отщепление петли пре-мкРНК не происходит. Таким образом уменьшается экспрессия мкРНК, идущих по каноническому пути созревания. При этом не затрагивается экспрессия мкРНК идущих по альтернативному пути, так как он не зависит от фермента Drosha. На уровне при-мкРНК идет изменение сайта узнавания фермента – Dicer. мкРНК, которые не подвергается процессингу, деградируются с помощью нуклеазы. На уровне зрелой

мкРНК их модификации вместе с изменением экспрессии играют важную роль как в физиологических, так и патофизиологических процессах. Так увеличение экспрессии модифицированной miR-376a-5p при глиобластоме приводит к инвазии глиомных клеток, при этом не модифицированная мкРНК имеет противоположные свойства и расценивается как потенциальный для мультиформной глиобластомы [69].

#### 1.2.4 Строение комплекса RISC

Данный комплекс является общим звеном регуляции трансляции белков как для мкРНК – эндогенный miRISC, так и для других малых интерферирующих РНК (миРНК) – экзогенный siRISC. Центральной функциональной единицей miRISC является пептидное семейство Ago, которое состоит из трех консервативных РНК – связывающих доменов: PAZ домена, который может связывать одиночные 3'-концы зрелой мкРНК, PIWI домена, который взаимодействует с 5'-концом направляющей цепочки и MID домена, который специфически реагирует с пиримидиновым кольцом (Рисунок 4). Активный сайт PIWI домена состоит из каталитической тетрады – D, E, D, H. Также в комплекс Ago входит N-домен, который является структурной единицей, объединяющей PAZ и PIWI домены; Helix7 – спираль, служащая для уменьшения изгиба направляющей цепочки мкРНК между шестым и седьмым основаниями.

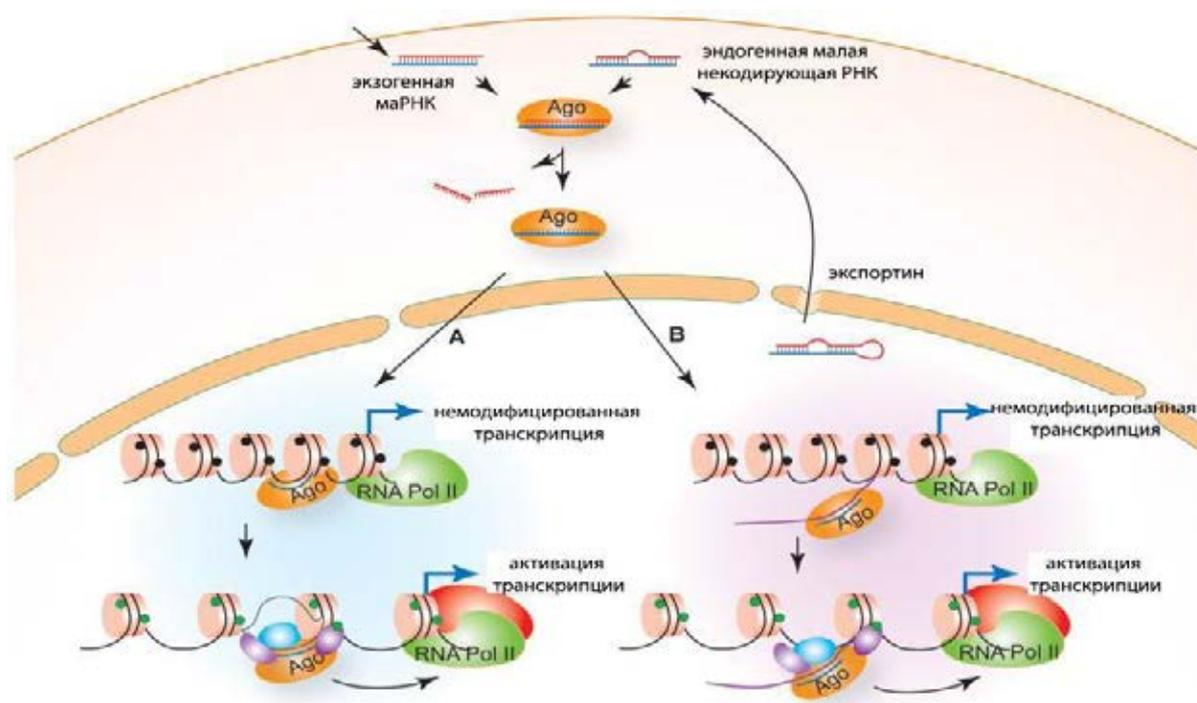
Комплекс RISC в клетках животных чаще всего присоединяется к гену в области 3'-UTR (3' - нетранслируемая область), тогда как в клетках растений регуляция генной экспрессии идет, в основном, за счет присоединения данного комплекса в кодирующей части.



**Рисунок 4.** Структура AGO млекопитающих на примере hAGO2. Оранжевая «нить» - направляющая цепочка мкРНК. Фиолетовые «гранулы» - ионы магния –  $Mg^{2+}$  [73].

Существует несколько путей при помощи которых происходит регуляция генной экспрессии комплексом RISC. При неполной комплементарности мкРНК к гену-мишени комплекс RISC может вызывать деаденилирование гена с последующей деградацией мРНК [39]. При этом, также может происходить супрессия трансляции гена при нарушении его инициализации, независимой от деаденилирования РНК [16, 39, 41]. При полной комплементарной гибридизации мкРНК к гену-мишени (чаще всего у растений или в случае миРНК) идет деградация мРНК при помощи специального комплекса Ago, например, Ago2 у человека. В этом случае мРНК попадает в каталитический центр Ago, где происходит ее разрезание. Это так называемая прямая деградация мРНК. Также предполагается, что мкРНК может вызывать модификацию гистонов и метилирование промоторной области гена, что также влияет на экспрессию соответствующей мРНК [135].

мкРНК может не только угнетать, но и активировать трансляцию гена [112]. мкРНК и ассоциированный с ней белковый комплекс (мкРНП – микроРибонуклеопротеины) могут посттранскрипционно стимулировать генную экспрессию как прямыми, так и косвенными механизмами [142]. Один из механизмов заключается в следующем (Рисунок 5) [114]: маРНК (малые активирующие РНК), которые могут быть как мкРНК, так и миРНК присоединяются к белку Ago, создается нуклеотид-белковый комплекс, как и в случае ингибирования трансляции. Этот комплекс проникает в ядро клетки пассивным (при растворении клеточной ядерной мембраны во время митоза) или активным транспортом. Существует также теория, что маРНК попадают в ядро и там уже перепрограммируют активированный Ago-РНК комплекс.



**Рисунок 5.** Механизм РНК-активации. маРНК присоединяются к белку Ago, создается нуклеотид-белковый комплекс. Этот комплекс проникает в ядро клетки пассивным или активным транспортом. В ядре комплекс может присоединяться к комплементарным ДНК (А) последовательностям или к некодирующим участкам мРНК (В). Оба пути приводят к активации транскрипции гена [114].

Большое разнообразие модификаций и варибельность в способах воздействия мкРНК на сам ген и на его трансляцию делают эти молекулы достаточно тонким механизмом управления физиологическими процессами, происходящими в клетках и позволяют оперативно реагировать на внутренние и/или внешние изменения, такие как инсульт.

### **1.3 Роль мкРНК в патогенезе, диагностике и лечении ишемического инсульта**

#### **1.3.1 Роль мкРНК в патогенезе инсульта**

Предполагается, что мкРНК участвуют в регуляции экспрессии порядка 57% белоккодирующих генов генома человека [44]. Для большинства мкРНК гены-мишени предсказаны биоинформатически, при этом, не все из них доказаны экспериментально. Регуляция экспрессии генов посредством мкРНК отличается от регуляции, осуществляемой факторами транскрипции, обратимостью, большей скоростью воздействия и возможностью локально изменять уровень генов-мишеней и белков в отдельных компартментах клетки. Это крайне важно для обеспечения синаптической пластичности нейронов. Было показано, что мкРНК принимает непосредственное участие во всех стадиях ишемического каскада. Однако, наиболее изучено влияние этих молекул на апоптоз, эксайтотоксичность и на окислительное повреждение клетки [133].

Несмотря на то, что одна мкРНК может действовать на сотни генов-мишеней, можно выделить две группы мкРНК по влиянию на апоптоз: анти-апоптотические и про-апоптотические. Гены про-апоптотического Bcl2-сигнального пути (*BAK*, *BIM*, *PUMA*) являются мишенями таких мкРНК как, miR-125b-5p и miR-29a-3p [107]. Ингибирование FADD происходит посредством мкРНК miR-21-5p. Эта мкРНК также участвует в клеточной пролиферации, способствует восстановлению тканей. Было показано, что увеличение экспрессии let-7a-5p блокирует каскад каспаз. Все вышеуказанные мкРНК можно отнести к анти-апоптотическим, увеличение уровня экспрессии которых, способствует снижению гибели клетки

[107]. В тоже время к про-апоптотическим мкРНК относятся: miR-15a-3p, miR-16-5p, miR-34a-3p, miR-29b-3p и miR-497-5p. Они блокируют гены анти-апоптотического Bcl2 сигнального пути [130]. А мкРНК miR-200c-3p индуцирует Fas-ассоциированный апоптоз, ингибируя Fas-1 (тирозин фосфатаза-1).

После ИИ гиперэкспрессия miR-107-5p приводит к уменьшению количества глутаматного транспортера 1 (GLT-1) и к накоплению глутамата, что определяет уровень эксайтотоксичности. Гиперэкспрессия miR-223-3p уменьшает экспрессию глутаматного рецептора 2 (GluR2) и субъединицы NR2A рецептора NMDA. Это уменьшает NMDA индуцируемый приток  $Ca^{2+}$  в гиппокампальные нейроны, что защищает ишемизированный мозг от эксайтотоксической клеточной гибели [56]. Проводились исследования, которые показали, что miR-125b-5p уменьшает экспрессию NR2A – одной из субъединиц NMDA рецепторов [68]. Было доказано, что активация NMDA рецепторов, содержащих NR2A субъединицу, имеет нейропротективный эффект и способствует выживанию клеток при эксайтотоксическом повреждении нейронов, в тоже время активация NMDA рецепторов, содержащих NR2B субъединицу, приводит к эксайтотоксичности и апоптозу [56].

Уровень экспрессии miR-497-5p также прямо коррелирует с индукцией эффекта кислород-глюкозной депривации: увеличение экспрессии этой мкРНК приводит к гибели клеток [155].

Было показано, что при ишемии переднего мозга, увеличивается экспрессия miR-29a-3p, которая защищает астроциты. Увеличение miR-29a-3p приводит к снижению уровня PUMA, что сохраняет GLT-1 в астроцитах. Это приводит к ослаблению окислительного стресса и выживанию нейронов [56].

Однако, многое еще не изучено в вопросе роли мкРНК в патогенезе инсульта. Проверка других неописанных мкРНК и их генов мишеней может способствовать пониманию этой тематики.

### 1.3.2 Диагностика, лечение и прогнозирование исхода инсульта

Диагностика инсульта – это многоэтапный процесс. Первый этап заключается в дифференциальной диагностике инсульта от других состояний, связанных с поражением мозга. На втором этапе устанавливают этиологический характер самого инсульта – ишемический или геморрагический. На третьем этапе уточняется локализация кровоизлияния и возможные механизмы его развития при геморрагическом инсульте или бассейн поражения сосуда и патогенез инфаркта мозга при ИИ [4]. Диагностика ИИ в основном проводится исходя из быстрого развития неврологических нарушений, характерных для поражения одного из сосудистых бассейнов мозга, а также исходя из наличия факторов риска в анамнезе (возраст > 50 лет, артериальная гипертензия (АГ), заболевания сердца, сахарный диабет, курение и др.). Подтверждают диагноз с помощью экстренного проведения рентгеновской компьютерной томографии (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ). Некоторым больным также проводят УЗИ сонных, позвоночных и церебральных артерий, реже КТ- и МР-ангиографию. Без применения подобных методов ошибки при диагностике ИИ даже в случаях типичной клинической картины составляют не менее 5—10% [5]. Например, диагноз инсульт ставят при периферическом вестибулярном головокружении или, напротив, вместо инсульта предполагают “гипертонический церебральный криз” [110].

С развитием генетики и молекулярной биологии одним из перспективных направлений в диагностике и прогнозировании исхода заболеваний стало количественное определение внеклеточных циркулирующих РНК. Внеклеточная некодирующая плазматическая РНК – это класс циркулирующих молекул РНК, которые могут на прямую изменять экспрессию одного или даже множества генов в целевой ткани [100]. мкРНК являются одним из наиболее распространенных типов внеклеточной РНК. Только недавно появились первые работы, посвящённые исследованию дифференциальной экспрессии мкРНК у пациентов при инсульте. Есть работы, посвященные исследованию мкРНК как биомаркеров ИИ, также

существует всего несколько статей, в которых рассматривается экспрессия внеклеточных мкРНК в качестве прогностического фактора [100, 126]. Разработка терапии ИИ на основе мкРНК пока проводится исключительно на лабораторных животных [81].

Выживаемость клеток после ишемии зависит от многих факторов. Одним из способов ее увеличения является ишемическая прекондиция. Это экспериментальный подход, при котором создаются гипоксические условия близкие к патологическому воздействию. В результате скринингового исследования крыс с ишемической прекондицией было выявлено увеличение уровня экспрессии мкРНК семейства miR-200, которые могут предположительно ингибировать пролил-гидроксилазу-2. Этот фермент гидроксилирует Hif-1a (hypoxia induced factor), что является «меткой» для протеосомальной деградации в условиях гипоксии. Hif-1a – это транскрипционный фактор, который индуцирует экспрессию как генов «выживания», так и генов «гибели» клетки. Тем не менее, полагают, что Hif-1a при ишемии оказывает благоприятное влияние на выживаемость клеток [123], а, следовательно, увеличение экспрессии мкРНК семейства miR-200 носит нейропротективный характер.

Другой способ нейропротекции, присущий, собственно, организму в целом – это уменьшение потребления кислорода в условиях гипоксии. Белок, связывающий метилированные CpG-островки (MeCP2) блокирует «ненужные» гены, тем самым поддерживая уровень транскрипции жизненно важных для клетки генов. Ген *MeCP2* является мишенью для мкРНК miR-132-3p, поэтому уменьшение уровня ее экспрессии приводит к увеличению выживаемости клетки [133].

Некоторые мкРНК влияют на нейротрофические факторы. Нейрогенез в стриатуме может активироваться привлечением BDNF в вентрикулярную зону. Есть предположения, что мкРНК miR-107-5p и miR-30-5p влияют на уровень BDNF, однако точных доказательств пока нет [99].

Ангиогенез также рассматривают в роли нейропротективного механизма. Гены, регулирующие данный процесс, могут контролироваться мкРНК. Например, экспрессия белков эфринов, которые вовлечены в процесс развития сосудистой

системы, обратно коррелирует со значением экспрессии miR-210-5p (увеличение мкРНК ведет к уменьшению белка). Профиль экспрессии этой мкРНК в первые часы после ишемии (особенно у животных с ишемической прекондицией) снижен. Динамика изменения профиля экспрессии имеет двухфазный характер, что совпадает с процессом ангиогенеза в мозге.

В экспериментах по изучению профиля экспрессии мкРНК в гиппокампе крыс, подвергнутых глобальной ишемии с последующей реперфузией через 30 минут или сутки, выявлено, что 32% дифференциально экспрессирующихся мкРНК относятся к семейству let-7 (let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, mir-98) [157]. Также установлено, что семейство let-7 участвует в отрицательной регуляции провоспалительных цитокинов, например TNF- $\alpha$ , IL-6, индуцибельной NO синтазы, каспазы-3 [24]. Среди мкРНК с повышенной экспрессией после ишемии и реперфузии были miR-195, miR-29a/b/c и miR-9, а среди имеющих тенденцию к повышению через 24 часа – miR-143, miR-16 и miR-181a. К мкРНК с пониженной экспрессией или с тенденцией к понижению через 24 часа относились let-7e, miR-98, miR-125a-5p, miR-139-5p, miR-150, miR-204, miR-323, miR-329, miR-352, miR-384-5p и miR-539. В данной работе также было установлено, что отсроченной гибели подвержены нейроны, которые в гиппокампе оставались морфологически интактными после ишемии и через сутки после реперфузии [157].

В ряде исследований было показано, что роль мкРНК при нарушении мозгового кровообращения может отличаться в различных типах нервных клеток. В одной из работ были проанализированы изменения в экспрессии мкРНК через 0, 2, 4, 6, 8, 12 и 24 часа после повреждения мозга [163]. Авторы исследовали экспрессию miR-21-5p, miR-29b-3p, miR-30b-5p, miR-107-3p, miR-137-5p и miR-210-5p непосредственно в нейронах и астроцитах на модели кислородно-глюкозной депривации и обнаружили, что изменения в экспрессии этих мкРНК зависят, во-первых, от типа клеток и, во-вторых, от временного периода после ишемического воздействия. Так, экспрессия miR-21-5p возрастала через 24 часов в нейронах и через 12 часов в астроцитах; экспрессия miR-29b-3p увеличивалась в

интервале 6–24 часов только в нейронах; а экспрессия miR-210-5p возрастала через 12 часов в нейронах и значительно повышалась с 8 до 24 часов в астроцитах. При этом, мкРНК miR-107-3p, miR-30b-5p и miR-137-5p дифференциально экспрессировались только в астроцитах [163].

Безусловно использование мкРНК в клинике для диагностики, прогнозирования и лечения инсульта очень перспективно. Однако, существует ряд проблем, которые необходимо для этого решить [40]:

- 1) Необходимо провести больше клинических исследований экспрессии мкРНК. На настоящий момент представлено только несколько исследований, большинство из которых имеют или маленькую выборку или методологические недостатки;
- 2) Большинство из проведенных исследований по анализу профилей экспрессии мкРНК при инсульте выполнялось на азиатской популяции. Поэтому их результаты могут не полностью совпадать для других этнических групп;
- 3) Существует большая вариативность экспрессии мкРНК внутри одной группы пациентов, что затрудняет определение референсных значений;
- 4) Большинство исследований не принимали во внимание другие клинические показатели, которые могли корректировать или дополнять значения экспрессии мкРНК
- 5) Метод ПЦР в реальном времени сейчас используется как основной для определения экспрессии циркулирующей мкРНК. Однако, он имеет ряд недостатков, которые ограничивают его эффективное использование в клинической практики. В частности умеренная чувствительность и сложное масштабирование, которое усложняет определение нескольких десятков мкРНК одновременно. Разработка и внедрение новых методов, таких как цифровое ПЦР и секвенирование нового поколения (NGS) должны улучшить ситуацию.

## Заключение

Таким образом, не вызывает сомнения тот факт, что ишемический инсульт представляет собой актуальную медицинскую и крайне остро социальную проблему. Хотя патогенез ИИ изучают уже давно, поэтому многие его стадии и факторы достаточно хорошо освещены, но лежащие в их основе генетические и эпигенетические механизмы до сих пор остаются плохо описанными. Исследование профилей экспрессии мкРНК при ИИ является перспективным направлением, поскольку оно расширяет понимание базовых механизмов заболевания, а также способствует поиску его надежных биомаркеров и прогностических факторов. В будущем подобные знания могут также быть использованы для разработки более действенной терапии.

## Глава 2. Материалы и методы

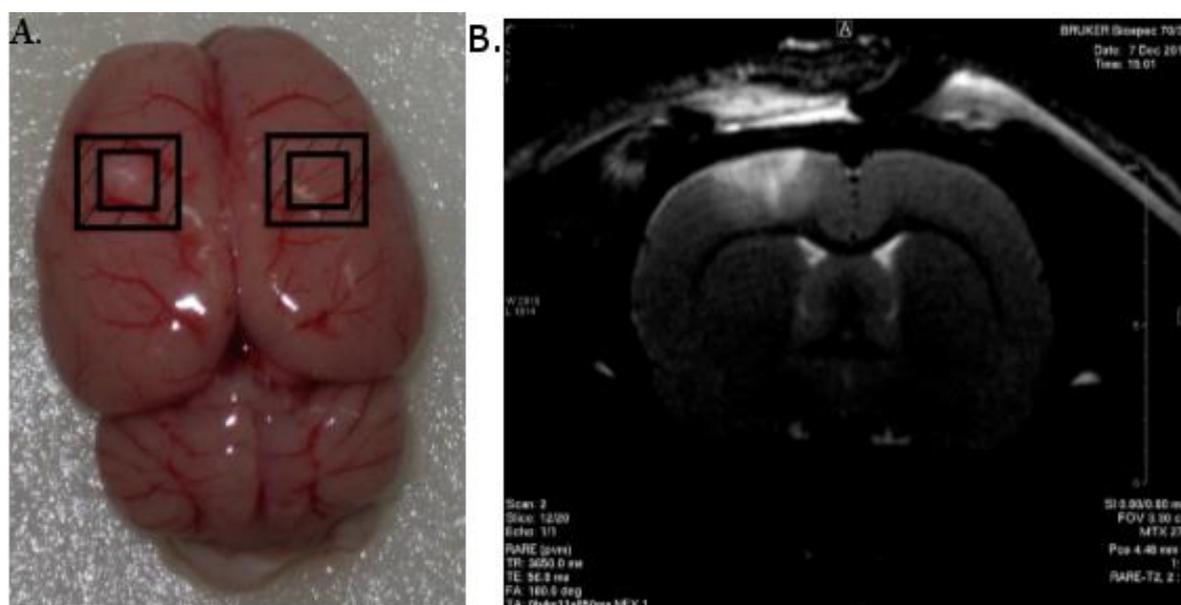
### 2.1 Материалы исследования

Исследование проводилось в 2 этапа: как в эксперименте при моделировании фокальной ишемии у крыс, так и в клинике, у больных с ИИ. На первом этапе моделировали фокальную ишемию на лабораторных животных, а также определяли экспрессию мкРНК в мозге, лейкоцитах периферической крови и в плазме. На втором этапе проводили исследование экспрессии мкРНК в плазме крови больных с ИИ, а также у контрольной выборки.

Экспериментальные исследования проводились на крысах Wistar со средней массой 240 г. Животных из трех выводков ( $n = 22$ ) распределяли по трем группам случайным образом так, чтобы в каждой группе были особи разных полов. Первую группу (группа I) составили животные с фокальной ишемией мозга через 24 часа после воздействия ( $n = 10$ ). Во вторую группу (группа II) вошли животные с ишемией мозга через 48 часов после воздействия ( $n = 6$ ). Третью группу (группа III) составили ложнооперированные животные – группа контроля ( $n = 6$ ). Образцы для исследования отбирали следующим образом: из левого полушария мозга (ишемизированного) вырезали участок коры шириной 3–4 мм по периметру предварительно удаленного очага (периинфарктная зона). Из правого (контралатерального) интактного полушария мозга вырезали такой же участок коры (Рисунок 6). Аналогично проводили отбор образцов у ложнооперированных крыс. Все образцы сразу замораживали и хранили в жидком азоте. Эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов [104], а также в соответствии с “Правилами надлежащей лабораторной практики”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.

У экспериментальных животных забор периферической крови (500 мкл) проводили до и после ишемического воздействия (через 24 или 48 часов). Образцы

цельной крови центрифугировали в течение 30 мин (при 300 x g и 4°C), собирали плазму, а осадок использовали для получения лейкоцитов. Осадок сначала обрабатывали лизирующим буфером (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA), центрифугировали, затем суспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS) и после центрифугирования получали фракцию лейкоцитов. Отобранную плазму осветляли центрифугированием при 14000 x g в течение 10 минут, и супернатант переносили в чистые пробирки. Полученные лейкоциты и плазму замораживали при -70°C для последующего выделения РНК.



**Рисунок 6.** Оценка ишемического повреждения мозга у экспериментальных животных. а – Макроскопическая визуализация очага в левом полушарии и соответствующего участка в правом контралатеральном полушарии (участки выделены квадратами). б – Магниторезонансная томография (МРТ) головного мозга крысы с видимым очагом ишемического повреждения (светлая зона) в левом полушарии.

Клинические исследования были проведены на 10 больных с ишемическим инсультом. У всех пациентов собирался анамнез и проводился КТ или МРТ анализ головного мозга для постановки точного диагноза, а также для определения объема поражения. Критериями исключения были геморрагический инсульт и острые инфекционные заболевания. У пациентов до взятия крови оценивали тяжесть инсульта по шкале NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale) [105]. Это балльный показатель неврологических расстройств, где 0 баллов считается как их

отсутствие, а 42 – максимально негативный результат. В контрольную группу сравнения входили 10 волонтеров без хронической ишемической болезни сердца и инсульта в анамнезе, подобранных в соответствии с возрастом и полом группы больных. Кровь для получения плазмы (2-5 мл) брали у пациентов на первые (не позднее 16 часов) и восьмые сутки после инсульта и однократно у контрольной выборки. Образцы крови сразу центрифугировали при +4 °С 300 x g в течение 20 минут, отбирали супернатант, который снова центрифугировали при +4°С 15000 x g в течение 15 минут. После второго центрифугирования супернатант – очищенную плазму, хранили в кельвинаторе при -80 °С до выделения РНК. Проведенные клинические исследования были одобрены в этическом комитете ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; все пациенты и волонтеры были ознакомлены с целями исследования и подписали соответствующее информационное согласие.

## **2.2 Методы исследования**

### **2.2.1 Метод фотохимически индуцированного тромбоза**

Односторонний фокальный ишемический инфаркт сенсомоторной области коры головного мозга крыс создавали методом фотохимически индуцированного тромбоза согласно методике, описанной Ватсоном с соавторами [146].

Операцию проводили под общим наркозом (хлоралгидрат 300 мг/кг, внутривенно) и с поддержанием постоянной температуры тела 37 °С. Затем крысам вводили фотосенсибилизируемый краситель бенгальский розовый (40 мг/кг, внутривенно), фиксировали на стереотаксисе, делали продольный разрез кожи и удаляли надкостницу. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника холодного света с галогеновой лампой мощностью 250Вт, теплопоглощающего и фильтрующего (максимум пропускания - 560нм) фильтров, и световода с диаметром внутреннего сечения 3мм. Световод устанавливали на расстоянии 1мм от поверхности левой лобной кости черепа над сенсомоторной областью коры левого полушария мозга: на 0,5мм роstralнее

брегмы и на 3,7мм латеральнее сагиттального шва. Затем проводили облучение в течение 15 минут. Ложнооперированные животные подвергались тем же процедурам, за исключением этапа введения фотосенсибилизируемого красителя. После выхода из наркоза крыс возвращали в клетки.

Через 24 и 48 часов крыс декапитировали, извлекали мозг, промывали в физиологическом растворе. Образцы биоптатов коры мозга (сенсомоторная область) крыс отбирали из зоны пенумбра поврежденного (левого) и контралатерального (неповрежденного) правого полушария коры мозга.

### **2.2.2 Выделение тотальной РНК и мкРНК из полученных образцов ткани, крови и плазмы**

Образцы ткани коры головного мозга крыс предварительно гомогенизировали с лизирующим буфером. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора miRNeasy Micro Kit (QIAGEN, Германия) на приборе QIAcube в соответствии с инструкцией фирмы-производителя [116]. Измерение концентрации и чистоты полученной тотальной РНК проводилось на спектрофотометре NanoVue Plus (GE Healthcare). Соотношение значений поглощения света (A) при длинах волн 260 нм и 280 нм ( $A_{260}/A_{280}$ ) для РНК находилось в пределах 2, а  $A_{260}/A_{230}$  - в пределах 2,2.

Необходимо отметить, что после выделения РНК всегда присутствует некоторая доля примесей, которые ингибируют последующие ПЦР и ОТ-ПЦР, поэтому для дополнительной очистки и концентрирования низкомолекулярной фракции РНК (таких как мкРНК и мяРНК – малые ядерные РНК) использовали набор RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя [115]. Элюция осуществлялась в 15 мкл воды без РНКаз. В среднем концентрация РНК была в пределах 1000 нг/мкл.

Выделение мкРНК из плазмы (400 мкл) проводили при помощи набора miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) согласно рекомендациям производителя. При выделении мкРНК после этапа денатурации добавляли 7 мкл

cel-miR-39 (рабочая концентрация  $1,6 \times 10^8$  копий/мкл) в качестве экзогенного контроля. Элюция осуществлялась в 10 мкл воды без РНКаз. В среднем концентрация мкРНК была в пределах 10-15 нг/мкл.

### **2.2.3 Критерии выбора мкРНК и генов для исследования, составления таблиц и баз данных**

Список мкРНК для исследования был сформирован с использованием специальных баз данных miRWalk v.2.0 и miRBase, а также на основании анализа литературных источников по генам-мишеням и мкРНК, вовлеченным в апоптоз, нейрогенез, нейропротекцию, реакции воспаления и процесс транскрипции [35, 46]. Также было учтено, что выбранные мкРНК и мРНК экспрессируются в ткани мозга (кора и/или гиппокамп). В общей сложности было отобрано 45 мкРНК и 50 генов-мишеней, участвующих в вышеуказанных процессах.

При помощи сервиса mirWalk 3.0 [36] была составлена таблица возможных взаимодействий между выбранными мкРНК и генами-мишенями. Этот сервис при помощи бионформатической модели рассчитывает вероятность полного или частично-комплементарного взаимодействия мкРНК с тем или иным участком гена-мишени (3' или 5' нетранслируемая область, а также кодирующий регион). Данные фильтровались по значению  $p$  ( $<0,05$ ) и по региону прикрепления (только 3' нетранслируемая область).

Праймеры для выбранных мкРНК, эндогенных контролей и контролей прохождения ПЦР были получены у фирмы Qiagen. Они были лифиолизованы на 96-ти луночном ПЦР планшете – Custom miScript miRNA PCR Array (QIAGEN, Германия).

Праймеры для генов-мишеней и их эндогенных контролей подбирались при помощи программы Primer 3 и были предоставлены фирмой Евrogen.

### **2.2.4 Метод обратной транскрипции мкРНК и мРНК**

Метод обратной транскрипции (ОТ) использовали для образования кДНК на матрице мкРНК и мРНК. Для проведения ОТ мкРНК применяли набор miScript II RT Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя [117]. ОТ проводилась при оптимуме температур 37 °С, денатурация обратной транскриптазы проходила при 95 °С.

ОТ мРНК генов-мишеней проводилась с использованием фермента обратной транскриптазы M-MLV (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega), смеси dNTP и 6-членных random-праймеров в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. На 1 мкг РНК использовалось 100 ЕА обратной транскриптазы M-MLV.

### **2.2.5 Количественная ПЦР в реальном времени для определения уровня экспрессии мкРНК и мРНК**

Данный метод служит для определения абсолютного или относительного количества ДНК в пробе. Для количественной ПЦР в реальном времени использовали наборы miScript SYBR Green PCR Kit, Custom miScript miRNA PCR Array (QIAGEN, Германия), iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США).

Количественную ПЦР в реальном времени для определения экспрессии мкРНК проводили согласно протоколу фирмы изготовителя. кДНК смешивалась в определённой пропорции с буферным раствором, содержащим краситель Sybr Green, универсальным обратным праймером, полимеразой и доводилось водой без нуклеаз до объема 25 мкл. Этот мастермикс раскапывался по лункам планшета, содержащего уникальный прямой праймер. После центрифугирования с относительной силой 1000 x g, планшет помещался в амплификатор CFX96 Real-Time PCR Detection System. Программа амплификации была выбрана согласно заводскому протоколу [118]. Фильтр амплификатора был настроен на флюорофор Sybr Green, время и температура амплификации, а также скорость нагрева прибора были выставлены согласно рекомендациям производителя реактивов. К

рекомендованной схеме амплификации был добавлен этап построения кривых плавления для дальнейшего анализа качества ПЦР.

Первичная обработка данных проводилась при помощи программы Bio-Rad CFX Manager. Для анализа экспрессии мкРНК в биоптате мозга и крови крыс эндогенным контролем служили 2 мяРНК - SNORD61, SNORD72. В качестве эндогенного контроля для анализа экспрессии мкРНК в плазме служила искусственная мкРНК – cel-miR-39.

Для каждого из типов образцов мкРНК (выделенные из биоптата мозга, лейкоцитов крови или плазмы) была выбрана единая величина порогового уровня, относительно которой вычислялись значения  $C_t$ .

Для каждого образца вычисляли значение RQ, считая эффективность ПЦР равной 100%:

$$RQ = (E \times 2)^{Ct_{control} - Ct_{miRNA}},$$

где E – эффективность ПЦР реакции,  $Ct_{control}$  – усредненное значение  $C_t$  для контрольной мкРНК у каждого образца;  $Ct_{miRNA}$  – усредненное значение  $C_t$  каждой мкРНК у каждого образца.

Количественная ПЦР в реальном времени для детекции экспрессии мРНК проводилась при помощи готового набора iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США). В ПЦР реакцию объемом 15мкл добавлялось 1,5 мкл 5x мастермикса, 333 нМ прямого и обратного праймера, 15 нг кДНК. Для выбора оптимальных условий для каждой из пар праймеров при ПЦР на стадии отжига делали градиент температур (55°C-68°C), а также в конце реакции добавляли этап построения кривых плавления. После реакции по совокупности данных (значение  $C_t$ , форма кривой плавления и др.) выбирались оптимальные температурные условия для конкретной пары праймеров. Генами эндогенного контроля служил *GAPDH* и *ACTB*. При этом эффективность ПЦР реакции высчитывалась индивидуально для каждой из пары праймеров при помощи построения стандартных кривых разведения.

Для каждого образца вычисляли значение RQ гена аналогично тому, как делали с мкРНК.

### 2.2.6 Статистическая обработка данных

Статистический анализ и визуализация полученных данных проводились в среде программирования R [120] и программе cluster 3.0 [57]. Для определения формы распределения данных был применен тест Шапира-Уилка. Описательная статистика для нормального распределения представлена в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего, для ненормального в виде медианы [первый квартиль, третий квартиль], а для категориальных данных в виде процентов и частот. Для оценки различий между несвязанными выборками с нормальным распределением использовали t-тест Стьюдента, с ненормальным распределением – U критерий Манна-Уитни, а между связанными выборками – критерий Уилкоксона. Некоторые мкРНК имели значения St больше 35 или оно вообще отсутствовало. Для таких мкРНК при расчете критерия Уилкоксона, мы не учитывали значения образцов, где был «выброс». Сравнение категориальных данных проводилось с использованием точного теста Фишера. Критерий Фишера (F-тест) также использовался для проверки значимости линейной регрессии. Для определения корреляции использовался корреляционный анализ по методу Спирмена. Иерархическое кластерирование значений экспрессий мкРНК осуществлялось следующим образом:

- 1) Подготовка данных [38].
  - a. Лог-трансформация всех данных,
  - b. Центрирование по медиане мкРНК и образцов
  - c. Нормализация мкРНК и образцов
- 2) Кластерирование данных по мкРНК и образцам при следующих параметрах: метрика – корреляция по Пирсону, алгоритм кластеризации – метод «средней связи».
- 3) Построение тепловой карты значений нормированной экспрессии мкРНК с дендрограммой, иллюстрирующей «расстояние» между кластерами.

Дифференциация больных с инсультом и группы сравнения осуществлялась с помощью анализа ROC кривой (операционная характеристика приёмника) и

значение площади под кривой (AUC). Для каждой мкРНК определяли оптимальное значение точки отсечения по наибольшей сумме чувствительности и специфичности.

## Глава 3. Результаты

### 3.1 Дифференциальная экспрессия мкРНК в ткани головного мозга крыс, подвергшихся фотохимически индуцированного тромбозу

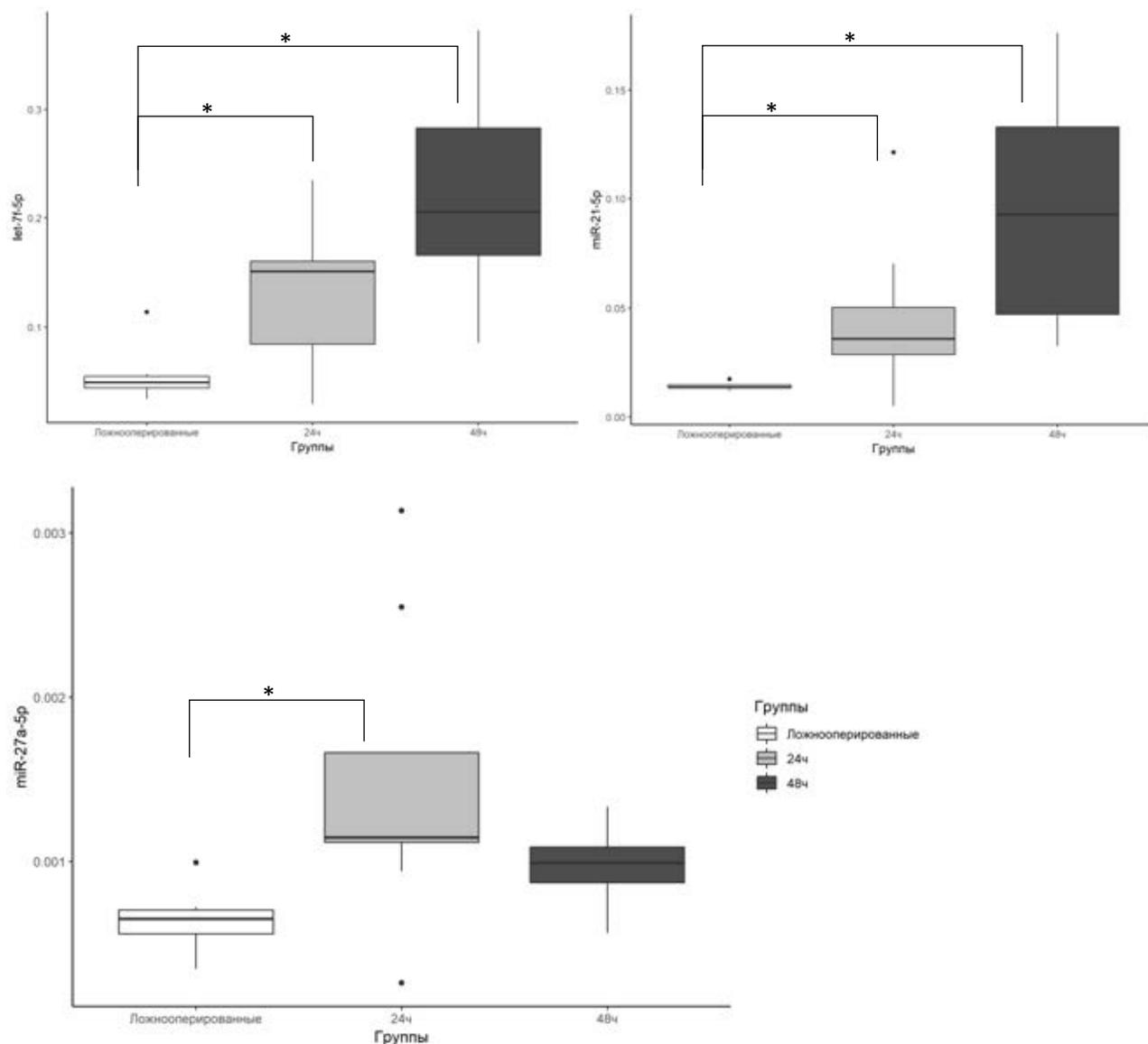
Согласно рекомендациям, предложенным Марабита с соавторами [97] осуществлялся поиск стабильных мкРНК для последующего определения нормированного значения относительной экспрессии. Среди 45ти, представленных мкРНК были выбраны те, чьи значения  $C_t$  у всех образцов не превышали 35ти циклов. Для этих мкРНК были посчитаны значения стабильности с использованием алгоритмов  $geNorm$  ( $Score_{geNorm}$ ) [141],  $Normfinder$  ( $Score_{Normfinder}$ ) [13], а также алгоритма, основанного на коэффициенте вариации ( $Score_{CV}$ ). Для определения наиболее стабильных мкРНК использовали суммарный коэффициент стабильности (SSS), который вычисляли как квадратный корень от суммы квадратов всех вышеуказанных коэффициентов.

$$SSS = \sqrt{Score_{geNorm}^2 + Score_{Normfinder}^2 + Score_{CV}^2}$$

Чем меньше значение данного коэффициента, тем более стабильной является мкРНК. В исследовании экспрессии мкРНК в биоптате и крови крыс наиболее стабильной оказался SNORD61 (SSS = 1,37 и 1,41 соответственно). При этом экспрессия SNORD72 была нестабильной (SSS = 1,83 и 1,82 соответственно), поэтому было решено не использовать данную мкРНК для нормировки данных.

Сравнительный анализ экспрессии мкРНК в коре левого (ишемизированного) полушария головного мозга крыс показал, что в группах экспериментальных животных через 24 и 48 часов после фотохимически индуцированного тромбоза уровни экспрессии 35 из 45 исследованных мкРНК различаются более чем в 1,5 раза. Среди них, в образцах, взятых через 24 часа после ишемии, идентифицировано 9 мкРНК, экспрессия которых изменялась в пределах 1,5–4,3 раз по сравнению с ложнооперированными животными (КИ – кратность изменений): miR-124-3p (КИ = 1,52), miR-129-5p (КИ = 1,51), miR-9a-5p (КИ = 1,56), miR-181b-5p (КИ = 2,19), miR-27a-5p (КИ = 2,26), let-7f-5p (КИ = 2,38), miR-223-3p

(КИ = 2,64), miR-21-5p (КИ = 3,19) и miR-200b-3p (КИ = 4,38). При этом достоверные отличия в уровнях экспрессии ( $p < 0,05$ ; U тест Манна-Уитни) были только у трех мкРНК: let-7f-5p, miR-27a-5p и miR-21-5p (Рисунок 7).



**Рисунок 7.** Уровни нормированной на SNORD61 экспрессии мкРНК let-7f-5p (А), miR-21-5p (Б), и miR-27a-5p (В), выделенных из коры левого полушария ишемизированных крыс через 24 часа (24ч) и 48 часов (48ч), а также у ложнооперированных животных. Данные представлены в виде медианы и квартилей. Точкой обозначены выбросы – значения, которые больше 3го квартиля или меньше 1го на  $1,5 \cdot \text{ИКР}$ ; где ИКР – расстояние между 1м и 3м квартилем. \* -  $p < 0,05$ , для несвязанных выборок по U критерию Манна-Уитни.

В образцах, взятых через 48 часов после ишемического воздействия, гораздо больше дифференциально экспрессирующихся мкРНК – 34 ( $p < 0,05$ ; U-test) (Таблица 1). При этом, по сравнению с ложнооперированными животными, экспрессия большинства этих мкРНК повышается в 1,3–2 раза, а для мкРНК let-7f-5p, miR-30a-3p, miR-21-5p и miR-223-3p – от 3,8 до 10,2 раз. По сравнению с 24-х часовой точкой, уровень экспрессии let-7f-5p и miR-21-5p увеличен соответственно в 1,6 и 2,1 раза, а miR-27a-5p снизился в 1,5 раза. Тем самым экспрессия miR-27a-5p через 48 часов после инсульта уже статистически не значимо отличалась от контрольной выборки ( $p = 0,064$ ).

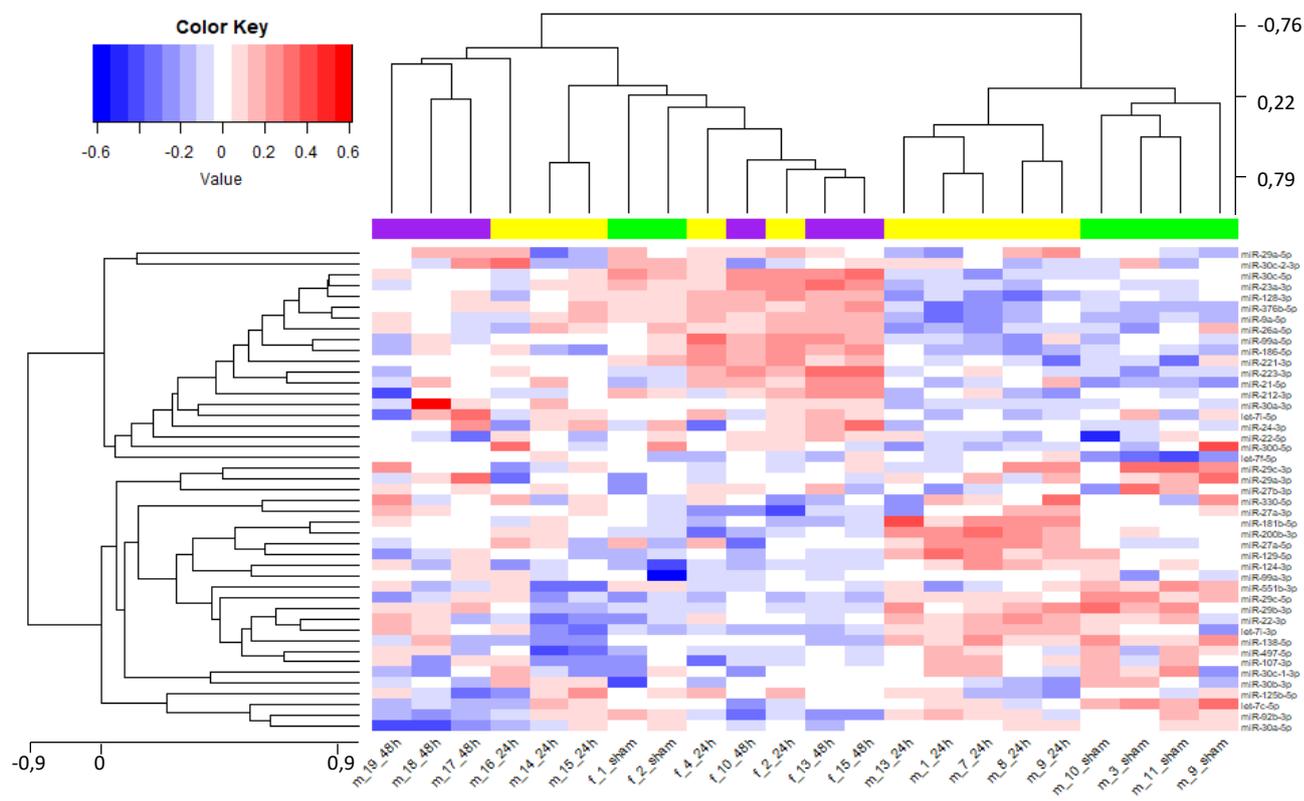
**Таблица 1.** Дифференциально экспрессирующиеся мкРНК в ткани левого полушария головного мозга крыс через 48 часов после ишемического воздействия.

мкРНК	p, U-test	КИ	мкРНК	p, U-test	КИ
miR-30c-2-3p	0,002	1,605	miR-99a-3p	0,015	2,027
miR-125b-5p	0,041	1,615	miR-221-3p	0,002	2,062
miR-300-5p	0,008	1,659	miR-27b-3p	0,002	2,099
miR-107-3p	0,004	1,667	miR-24-3p	0,002	2,103
miR-497-5p	0,008	1,703	miR-22-5p	0,015	2,120
miR-27a-3p	0,002	1,719	miR-29a-5p	0,002	2,123
miR-30b-3p	0,015	1,722	miR-186-5p	0,002	2,312
miR-29c-3p	0,002	1,736	miR-99a-5p	0,008	2,342
miR-124-3p	0,008	1,752	miR-128-3p	0,002	2,386
miR-330-5p	0,002	1,764	miR-23a-3p	0,002	2,686
miR-181b-5p	0,004	1,785	miR-376b-5p	0,004	2,711
miR-29a-3p	0,002	1,823	miR-30c-5p	0,025	2,756
let-7i-3p	0,008	1,860	miR-9a-5p	0,004	2,951
miR-22-3p	0,004	1,892	let-7f-5p	0,004	3,862
let-7i-5p	0,008	1,935	miR-30a-3p	0,004	6,060
miR-212-3p	0,015	1,938	miR-21-5p	0,002	6,704
miR-26-a5p	0,002	2,000	miR-223-3p	0,025	10,204

Статистически значимое изменение экспрессии (в основном увеличение) наблюдалось у 26 мкРНК в коре левого полушария крыс через 48 часов после фотохимически индуцированного тромбоза по сравнению с 24 часовой точкой.

Ни через 24 часа, ни через 48 часов после ишемии не обнаружено изменений в экспрессии miR-30a-5p, miR-138-5p, miR-29b-3p, miR-29c-5p, miR-92b-3p, miR-30c-1-3p, miR-551b-3p и let-7c-5p в коре левого полушария головного мозга.

Используя метод двумерного иерархического кластерирования, была проведена кластеризация экспрессии мкРНК в образцах ткани левого полушария головного мозга крыс (через 24 и 48 часов после ишемического воздействия), а также контрольной выборки (Рисунок 8). Образцы ткани ложнооперированных крыс-самцов составили отдельный кластер, а образцы ткани крыс, подвергнутых ишемическому воздействию, в основном распределились по двум кластерам (24 и 48 часов). Некоторые образцы, относящиеся к одному временному периоду, попали в кластер с образцами другого временного периода, а часть образцов не попала ни в один кластер, что, по-видимому, связано с индивидуальными особенностями ответа на ишемию у разных особей.



**Рисунок 8.** Сравнительный анализ экспрессии мкРНК в зоне пенумбра левого полушария головного мозга крыс в остром периоде ишемического инсульта 24 и 48 часов, а также контрольной выборки. Названия мкРНК указаны справа. Идентификатор каждой крысы указан внизу, первая буква обозначает пол (f – самки, m – самцы), далее идет порядковый номер, в конце указана принадлежность к одной из трех групп (sham – ложнооперированные, 24h – крысы с ишемией через 24 часа, 48h – крысы с ишемией через 48 часов). Группы также обозначены цветом сверху под дендрограммой: ложнооперированные крысы – зеленым цветом, с ишемией через 24 часа – желтым, с ишемией через 48 часов – фиолетовым. Шкалы коэффициентов корреляции по Пирсону для образцов мозга крыс (вверху), для мкРНК (слева). Цветовая (красно-синяя) шкала соответствует логарифмированному по основанию 2 и центрированному преобразованию уровней экспрессии мкРНК. Красная окраска соответствует повышенной экспрессии (гиперэкспрессии) мкРНК, синяя сниженной экспрессии (гипоэкспрессии) относительно среднего значения по используемой выборке данных.

Сравнительный анализ экспрессии мкРНК в ткани правого (не ишемизированного) полушария головного мозга крыс показал, что в группах экспериментальных животных через 24 и 48 часов после фотохимически

индуцированного тромбоза экспрессии 36 из 45 исследованных мкРНК различаются более чем в 1,5 раза. Среди них, в образцах, взятых через 24 часа после ишемии, идентифицировано 9 мкРНК, экспрессия которых изменялась в пределах 1,5–17,9 раз по сравнению с ложнооперированными животными. Однако, только четыре из них имели статистически значимые отличия: miR-200b-3p (КИ = 4,81), miR-181b-5p (КИ = 1,91), let-7f-5p (КИ = 3,62) и miR-27a-5p (КИ = 2,93). При этом, хотя экспрессия miR-92b-3p статистически значимо отличалась в группе крыс с ишемией по сравнению с контрольной выборкой, но медиана значения экспрессии данной мкРНК отличалась только в 1,19 раз.

В образцах, взятых через 48 часа после ишемического воздействия, гораздо больше дифференциально экспрессирующихся мкРНК – 38 ( $p < 0,05$ ; U-test) (Таблица 2). По сравнению с 24-х часовой точкой, уровни экспрессия miR-200b-3p и miR-92b-3p уменьшилась соответственно в 2,9 и 1,12 раза, тем самым экспрессия этих мкРНК через 48 часов после инсульта уже статистически не значимо отличалась от контрольной выборки.

Статистически значимое изменение экспрессии (в основном увеличение) наблюдалось у 21 мкРНК в коре правого полушария крыс через 48 часов после фотохимически индуцированного тромбоза по сравнению с 24 часовой точкой.

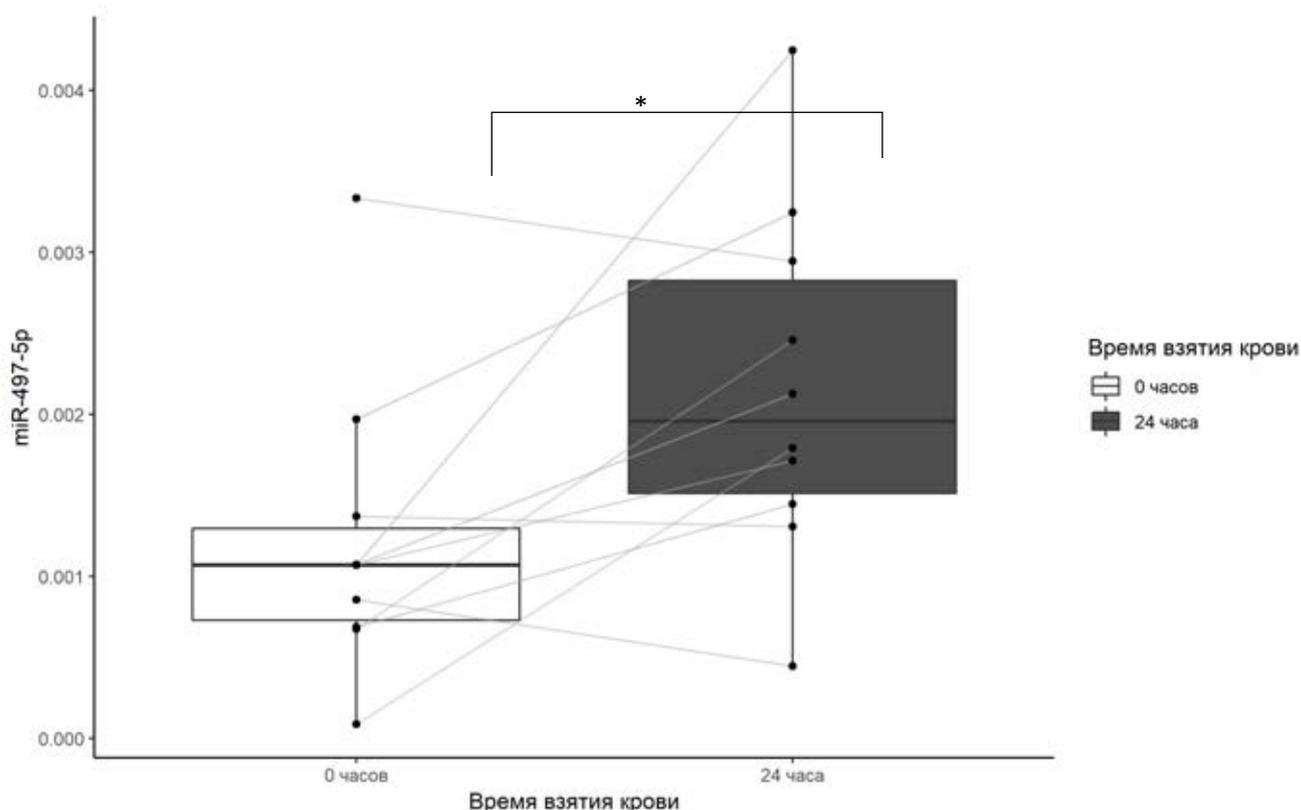
**Таблица 2.** Дифференциально экспрессирующиеся мкРНК в ткани правого полушария головного мозга крыс через 48 часов после ишемического воздействия.

мкРНК	p, U-test	КИ	мкРНК	p, U-test	КИ
miR-124-3p	0,002	1,326	miR-29a-3p	0,009	1,442
miR-29c-3p	0,002	1,413	miR-551b-3p	0,009	1,575
miR-29c-5p	0,002	1,937	miR-212-3p	0,009	1,875
let-7i-3p	0,002	2,305	miR-24-3p	0,009	1,721
let-7i-5p	0,002	2,15	miR-27b-3p	0,009	1,882
miR-181b-5p	0,002	1,91	miR-138-5p	0,015	1,517
miR-330-5p	0,002	2,189	miR-26a-5p	0,015	1,619
miR-99a-5p	0,002	2,109	miR-29a-5p	0,015	1,865
let-7f-5p	0,002	6,368	miR-9a-5p	0,015	1,86
miR-107-3p	0,002	5,714	miR-30a-5p	0,015	1,309
miR-21-5p	0,002	2,392	miR-125b-5p	0,026	1,234
miR-27a-3p	0,004	1,475	miR-22-5p	0,026	2,098
miR-129-5p	0,004	1,811	miR-23a-3p	0,026	1,942
miR-186-5p	0,004	2,227	miR-30c-5p	0,041	2,162
miR-22-3p	0,004	1,759	miR-376b-5p	0,041	2,075
miR-300-5p	0,004	2,056	miR-497-5p	0,041	1,696
miR-27a-5p	0,004	2,625	miR-376b-5p	0,041	2,075
miR-300-5p	0,004	2,056	miR-128-3p	0,004	1,64

### **3.2 Дифференциальная экспрессия мкРНК в лейкоцитах периферической крови крыс, подвергшихся фотохимически индуцированного тромбозу**

Оценку экспрессии мкРНК в лейкоцитах периферической крови крыс осуществляли только в группах животных, подвергшихся ишемическому воздействию. Кровь брали у крыс до и через 24/48 часов после фотохимически индуцированного тромбоза. В крови крыс до фотохимически индуцированного

тромбоза не было обнаружено статистически значимых различий в экспрессии мкРНК между группами 24 и 48 часов. При анализе уровней экспрессии мкРНК были выявлены изменения в их значениях у 25 мкРНК через 24 часа после ишемии ( $1,5 < \text{КИ} < 8,0$ ) и у 26 – через 48 часов ( $1,5 < \text{КИ} < 9,0$ ). При этом, у ряда мкРНК, экспрессия которых не изменялась через 24 часа после ишемии, определено увеличение экспрессии через 48 часов. К таким мкРНК относятся let-7i-3p, miR-23a-3p, miR-27a-5p, miR-29a-5p, miR-29c-5p, miR-124-3p, miR-125b-5p и miR-212-3p. Напротив, семь мкРНК перестали дифференциально экспрессироваться через 48 часов: miR-27a-3p, miR-30a-5p, miR-30c-2-3p, miR-128-3p, miR-138-5p, miR-186-5p и miR-497-5p. Уровень экспрессии miR-29a-3p, miR-29c-3p, и miR-200b-3p через 24ч/48ч постишемического периода оставался неизменным. Важно заметить, что по уровню экспрессии в лейкоцитах крови достоверные отличия зарегистрированы только для miR-497-5p через 24 часа после ишемии ( $\text{КИ} = 1,768$ ;  $p = 0,034$ ) – Рисунок 9.



**Рисунок 9.** Уровни нормированной SNORD61 экспрессии мкРНК miR-497-5p, выделенной из лейкоцитов периферической крови крыс до фотохимически-индуцированного тромбоза (0 часов) и через 24 часа после него (24 часа). Данные представлены в виде медианы и квартилей. Точками обозначены отдельные значения мкРНК; серая полоса соединяет значения экспрессии miR-497-5p одних и тех же крыс в разных временных интервалах. \* -  $p < 0,05$ , для связанных выборок по критерию Уилкоксона.

Был проведен сравнительный анализ данных изменения экспрессии мкРНК в ответ на ишемический стресс как в ткани мозга, так и в лейкоцитах крови крыс (Таблица 3). После фотохимически индуцированного тромбоза экспрессия let-7f-5p, miR-21-5p и miR-223-3p как в ткани мозга, так и в лейкоцитах крови возрастает через 48 часов. Экспрессия miR-30a-3p, miR-30c-5p, miR-99a-5p, miR-107-3p и miR-221-3p через 24 часа после ишемии изменяется только в лейкоцитах крови, но через 48 часов значительно возрастает и в ткани головного мозга. Уровни экспрессии let-7i-3p и miR-212-3p изменяются в ткани мозга и лейкоцитах крови только через 48 часов после ишемического воздействия. Экспрессия miR-497-5p изменяется через 24 часа только в лейкоцитах, а через 48 часов только в ткани мозга. В тоже

время экспрессия miR-124-3p изменяется через 24 часа только в ткани мозга, а через 48 часов – и в ткани мозга, и в лейкоцитах.

**Таблица 3.** Изменения в уровнях экспрессии мкРНК в ткани левого полушария мозга и лейкоцитах крови через 24 и 48 часов после ишемического воздействия

мкРНК	Ткань мозга, КИ (0/24 ч)	Р, U-test	Лейкоциты, КИ (0/24 ч)	Р, U-test	Ткань мозга, КИ (0/48 ч)	Р, U-test	Лейкоциты, КИ (0/48 ч)	Р, U-test
let-7f-5p	<b>2,377</b>	0,02	<b>1,724</b>	н/о*	<b>3,862</b>	0,004	<b>6,424</b>	н/о
miR-21-5p	<b>3,185</b>	0,01	<b>1,664</b>	н/о	<b>6,704</b>	0,002	<b>6,488</b>	н/о
miR-223-3p	<b>2,641</b>	н/о	<b>1,995</b>	н/о	<b>10,2</b>	0,020	<b>2,813</b>	н/о
miR-30a-3p	1,299	н/о	<b>1,683</b>	н/о	<b>6,06</b>	0,004	<b>3,480</b>	н/о
miR-30c-5p	1,137	н/о	<b>1,861</b>	н/о	<b>2,756</b>	0,020	<b>3,846</b>	н/о
miR-99a-5p	1,393	н/о	<b>1,722</b>	н/о	<b>2,342</b>	0,008	<b>2,042</b>	н/о
miR-107-3p	1,056	н/о	<b>1,822</b>	н/о	<b>1,667</b>	0,004	<b>1,653</b>	н/о
miR-221-3p	1,274	н/о	<b>2,182</b>	н/о	<b>2,062</b>	0,002	<b>7,823</b>	н/о
let-7i-3p	1,376	н/о	1,181	н/о	<b>1,86</b>	0,008	<b>2,373</b>	н/о
miR-212-3p	1,093	н/о	1,367	н/о	<b>1,938</b>	0,010	<b>2,274</b>	н/о
miR-497-5p	1,006	н/о	<b>1,768</b>	0,03	<b>1,703</b>	0,008	0,896	н/о
miR-124-3p	<b>1,517</b>	н/о	1,099	н/о	<b>1,752</b>	0,008	<b>9,006</b>	н/о
miR-23a-3p	1,261	н/о	1,307	н/о	<b>2,686</b>	0,020	<b>2,934</b>	н/о
miR-22-5p	1,224	н/о	<b>1,652</b>	н/о	<b>2,12</b>	0,015	<b>2,136</b>	н/о
miR-99a-5p	1,393	н/о	<b>1,722</b>	н/о	<b>2,342</b>	0,008	<b>2,042</b>	н/о

Примечание - статистически незначимые отличия (н/о) при  $p > 0.05$ ; U-test.

Корреляционный анализ между значениями экспрессии мкРНК в мозге и в крови крыс показал достоверную корреляцию для miR-200b-3p, miR-23a-3p, miR-99a-5p, miR-22-5p и miR-330-5p (Таблица 4).

**Таблица 4.** Корреляция уровней экспрессии мкРНК в ткани мозга и лейкоцитах крови через 24 часа и 48 часов после ишемического воздействия.

мкРНК	24 часа, p	24 часа, ρ,	48 часов, p	48 часов, ρ,
miR-200b-3p	0,048	0,85	н/о	0,02
miR-22-5p	0,016	-0,94	н/о	-0,2
miR-23a-3p	н/о	0,43	0,033	0,89
miR-330-5p	н/о	-0,49	0,033	-0,89
miR-99a-5p	н/о	-0,54	0,033	0,89

В данной работе были исследованы не только «ведущие» цепочки зрелых мкРНК, но и некоторые «пассажирские». Так экспрессия обеих цепочек была проанализирована для следующих мкРНК: let-7i, miR-22, miR-27a, miR-29a, miR-29c, miR-30a, miR-99a. В ткани мозге всех крыс экспрессии miR-22, miR-29a и miR-29c прямо коррелировали между «ведущей» и «пассажирской» цепочкой (Таблица 5). При этом достоверная корреляция у miR-22 и miR-29a присутствовала только у ишемизированных животных, тогда как у ложнооперированных она отсутствовала, более того, по значению корреляции по Спирмену она была обратной. В лейкоцитах периферической крови животных достоверная корреляция была только у let-7i после ишемии ( $p = 0,045$  и  $\rho = 0,738$ ), а также тенденция к достоверности у miR-27a ( $p = 0,057$  и  $\rho = 0,714$ ) перед ишемией.

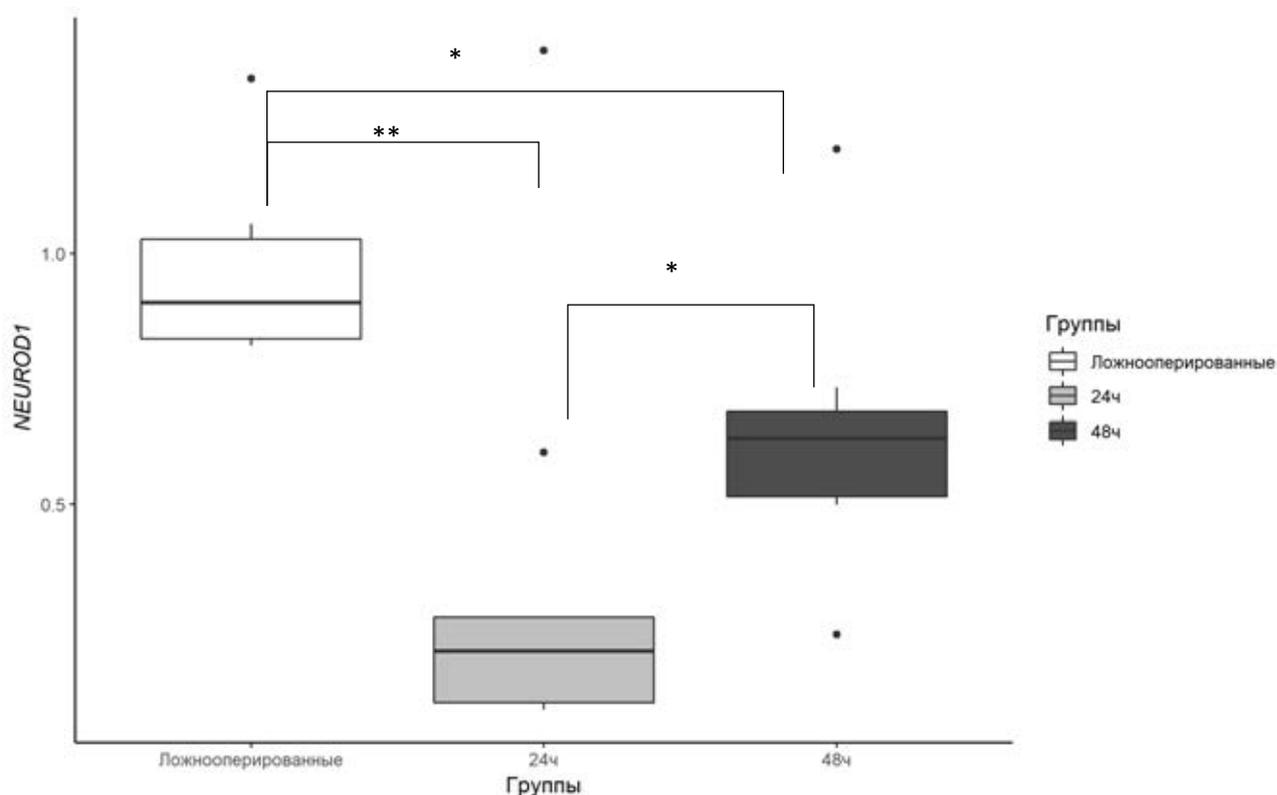
**Таблица 5.** Корреляция уровней экспрессии «ведущих» и «пассажирских» мкРНК в ткани мозга ишемизированных крыс через 24 и 48 часов после ишемического воздействия, а также у группы контроля

мкРНК	ИЖ, ρ	ИЖ, ρ	ЛОЖ, ρ	ЛОЖ, ρ	Все животные, ρ	Все животные, ρ
let-7i	0,934	-0,025	0,803	0,143	0,332	0,222
miR-22	0,036	0,550	0,297	-0,543	0,002	0,642
miR-27a	0,532	-0,175	0,175	0,657	0,495	0,157
miR-29a	0,003	0,721	0,419	-0,429	<0,001	0,803
miR-29c	0,056	0,507	0,058	0,829	0,008	0,566
miR-30a	0,382	0,243	0,919	0,086	0,224	0,277
miR-99a	0,157	0,386	0,919	-0,086	0,094	0,375
Примечание – ИЖ – ишемизированные животные, ЛОЖ – ложнооперированные животные.						

### 3.3 Дифференциальная экспрессия мРНК в ткани головного мозга крыс, подвергшихся фотохимически индуцированного тромбозу

Стабильность генов эндогенного контроля определяли также, как и в случае с мкРНК. По результатам теста наиболее стабильным оказался ген *ACTB*. Кроме того, в ряде руководств и статей указано, что ген *GAPDH* может изменять свою экспрессию под действием гипоксии [161], поэтому было решено нормировать экспрессию мРНК только на *ACTB*.

Нами было обнаружено, что экспрессия гена *NEUROD1* статистически значимо уменьшается через 24 часа после ишемического повреждения в левом полушарии экспериментальной выборки крыс по сравнению с контрольной выборкой (Рисунок 10).



**Рисунок 10.** Уровни нормированной на *ACTB* экспрессии *NEUROD1*, выделенного из коры левого полушария ишемизированных крыс через 24 часа (24ч) и 48 часов (48ч), а также у ложнооперированных животных. Данные представлены в виде медианы и квартилей. Точкой обозначены выбросы – значения, которые больше 3го квартиля или меньше 1го на 1,5хИКР; где ИКР – расстояние между 1м и 3м квартилем. \* -  $p < 0,05$  \*\* -  $p < 0,01$ , для несвязанных выборок по U критерию Манна-Уитни.

Через 48 часов после фотохимически индуцированного тромбоза экспрессия 13 генов статистически значимо уменьшилась (Таблица 6).

В тоже время, было отмечено, что экспрессия большинства генов через 48 часов после ишемии не изменяется или незначительно уменьшается. Так среди 6 мРНК, экспрессия которых статистически значимо изменилась через 48 часов по сравнению с 24 часовой точкой только ген, кодирующий транскрипционный фактор NeuroD1 был гиперэкспрессирован. Остальные гены (*FOS*, *BCL2L2*, *TNF*, *АТОН1* и *MECP2*) были гипоекспрессированы. При этом экспрессия генов *АТОН1* и *TNF* была незначительно повышена в биоптате мозга крыс через 24 часа после ишемии по сравнению с контрольной выборкой.

**Таблица 6.** Дифференциально экспрессирующиеся мРНК в ткани левого ишемизированного полушария головного мозга крыс через 48 часов после ишемического воздействия.

мРНК	p, U-test	КИ	мРНК	p, U-test	КИ
BCL2L2	0,001	0,27	HES5	0,020	0,38
NEUROG3	0,001	0,30	NEUROG1	0,020	0,32
NEUROG2	0,003	0,50	АТОН1	0,029	0,28
NFKB2	0,008	0,41	HIC1	0,029	0,63
FOS	0,013	0,34	NOTCH3	0,029	0,60
NEUROD1	0,013	0,70	CREB1	0,043	0,83
TNF	0,013	0,59			

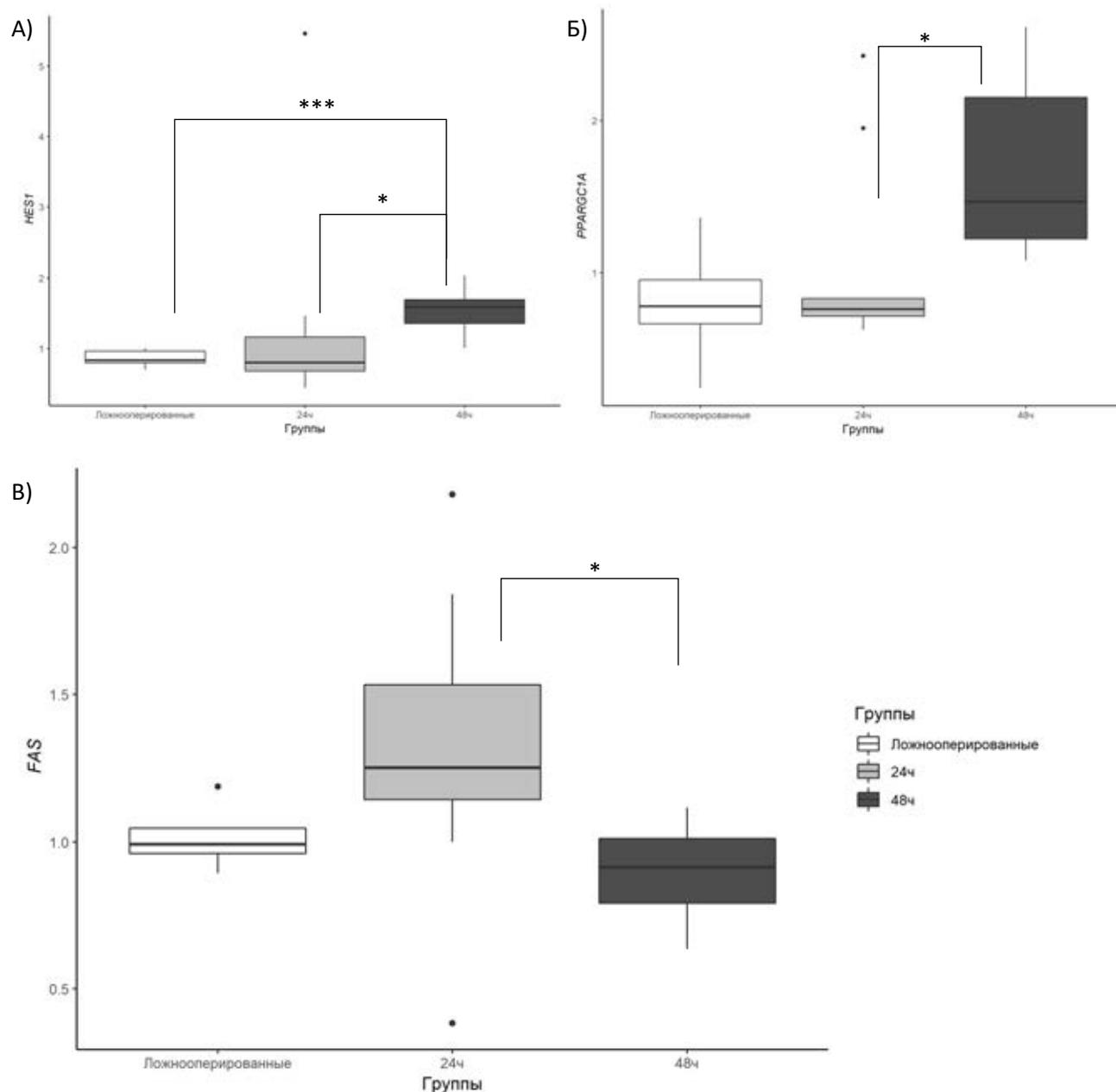
Сравнительный анализ экспрессии мРНК в ткани правого полушария головного мозга крыс показал, что в группах экспериментальных животных через 24 и 48 часов после фотохимически индуцированного тромбоза уровни экспрессии 42 из 51 исследованных мРНК различаются более чем в 1,5 раза. Среди них, в образцах, взятых через 24 часа после ишемии, идентифицировано 31 мРНК, экспрессия которых изменялась в пределах 1,5–4,4 раз по сравнению с ложнооперированными животными. При этом достоверные отличия в уровнях экспрессии были у 11 генов: *АТОН1* (КИ = 4,36), *BAD* (КИ = 1,57), *BCL2L11* (КИ = 2,51), *CASP9* (КИ = 1,91), *HES5* (КИ = 2,54), *IKKB* (КИ = 1,48), *MECP2* (КИ = 2,17), *NEUROD1* (КИ = 1,92), *NEUROD4* (КИ = 1,92), *NEUROD6* (КИ = 1,38), *SOX2* (КИ = 2,19).

В образцах, взятых через 48 часов после фотохимически индуцированного тромбоза наблюдается больше статистически значимых дифференциально экспрессирующихся генов – 21 ( $p < 0,05$ ; U-test) (Таблица 7)

В тоже время экспрессия только трех генов (*FAS*, *HES1*, *PPARGC1A*) статистически значимо отличалась между образцам мозга крыс, взятыми через 48 и 24 часа после ишемического повреждения (Рисунок 11).

**Таблица 7.** Дифференциально экспрессирующиеся мРНК в ткани правого «интактного» полушария головного мозга крыс через 48 часов после ишемического воздействия.

мРНК	p, U-test	КИ	мРНК	p, U-test	КИ
BCL2	0,02	1,79	MECP2	0,005	2,05
BCL2L11	0,003	2,05	NEUROD1	0,013	1,49
BCL2L1	0,005	1,75	NEUROD4	0,029	1,96
CASP9	0,003	2,06	NEUROD6	0,001	1,73
CREB1	0,013	1,68	NFKB1	0,029	1,75
EGLN1	0,029	1,77	NOTCH1	0,020	1,77
EGLN2	0,001	2,81	NOTCH3	0,043	1,60
HES1	0,001	1,80	PPARGC1A	0,005	2,08
HIC1	0,043	1,70	RELA	0,008	1,76
IKBKB	0,008	1,59	SOX2	0,013	2,13
MCL1	0,005	1,64			



**Рисунок 11.** Уровни нормированной на *ACTB* экспрессии *HES1* (А), *PPARGC1A* (Б) и *FAS* (В), выделенных из коры правого полушария ишемизированных крыс через 24 часа (24ч) и 48 часов (48ч), а также у ложнооперированных животных. Данные представлены в виде медианы и квартилей. Точкой обозначены выбросы – значения, которые больше 3го квартиля или меньше 1го на 1,5хИКР; где ИКР – расстояние между 1м и 3м квартилем. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ , для несвязанных выборок по U критерию Манна-Уитни.

Была построена линейная регрессионная модель взаимодействия между экспрессией в ткани мозга мРНК и их возможных генов мишеней. Статистически

значимая взаимосвязь была выявлена только для генов: *BCL2* (достоверно для предикторов miR-212-3p, miR-125b-5p, miR-376b-5p и имеющую тенденцию к достоверности для miR-497-5p и miR-30b-3p) и *BCL2L2* (достоверно для предиктора – let-7i-5p и тенденция к достоверности для miR-497-5p). Была определена стойкая отрицательная корреляция между экспрессией let-7i-5p и геном *BCL2L2* ( $\rho = -0,69$ ,  $p < 0,001$ ). Для гена *AIFM1* (достоверно для предикторов – miR-186-5p и let-7i-3p) значение статистической значимости модели составляло 0,057.

### 3.4 Анализ клинических данных

В рамках данной работы было обследовано 10 больных с острым инсультом и 10 волонтеров. Данные клинического анализа приведены в таблице 8. Статистически значимых различий в демографических и сосудистых факторов риска между больными и группой контроля обнаружено не было.

Все больные были разделены на 2 группы: группа 1 – пациенты с увеличением показателя по шкале NIHSS на 8-е сутки (4 больных) и группа 2 – пациенты с уменьшением данного параметра (6 больных). Соответственно в первой группе были пациенты с ухудшением неврологического статуса, а во второй с улучшением.

В исследовании экспрессии мкРНК в плазме крови пациентов с инсультом и контрольной выборки наиболее стабильной мкРНК оказалась miR-21-5p с SSS равным 2,68. Однако, по сравнению с данными, приведенными в статье Марабата [97] и полученными в эксперименте с лабораторными животными, такое значение SSS является крайне большим, что говорит о недостаточной стабильности данной мкРНК. Кроме того, есть работы, свидетельствующие о том, что miR-21-5p может являться одним из биомаркеров ишемического инсульта [162], что ставит под сомнение пригодность данной мкРНК в качестве внутреннего контроля. Таким образом, было решено отказаться от использования конкретной мкРНК в качестве эндогенного контроля в экспериментах по анализу экспрессии мкРНК в плазме

крови, и определять экспрессию мкРНК, опираясь на немодифицированные относительное количество мкРНК (RQ), как рекомендует фирма Qiagen [119].

**Таблица 8.** Клинические характеристики пациентов и контрольной выборки.

	Пациенты	Контрольная выборка	p
Количество человек	10	10	-
Пол (М/Ж)	5/5	5/5	1
Возраст (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего), года	64,5 $\pm$ 2,9	62 $\pm$ 2,2	0,51
Артериальная гипертензия, %	50%	30%	0,36
Атеросклероз	40%	-	-
Наличие сахарного диабета, %	40%	30%	0,64
Объем поражения мозга (медиана), мм <sup>3</sup>	5338,55	-	-
Локализация поражения (левое полушарие доля/правое полушарие)	4/6	-	-
NIHSS первые сутки (медиана)	11,5	-	-
NIHSS восьмые сутки (медиана)	9,5	-	-

Были проанализированы значения экспрессии 45 мкРНК, выделенных из плазмы крови пациентов, а также контрольной выборки. Установлено, что у больных с ишемическим инсультом, как на первые, так и на восьмые сутки, медиана отношений экспрессий исследуемых мкРНК уменьшалась по сравнению с контрольной выборкой (КИ = 1,72). На первые сутки у всех больных по сравнению с контролем достоверно уменьшалась экспрессия let-7i-3p и miR-23a-3p, а на восьмые сутки miR-22-5p (Таблица 9). Экспрессии let-7i-3p и miR-22-3p также были статистически значимо повышены у пациентов на восьмые сутки после ишемии, по сравнению с первыми сутками.

**Таблица 9.** Изменения в уровнях экспрессии мкРНК в плазме крови пациентов на первые и восьмые сутки после ишемического инсульта и контроля.

мкРНК	Пациенты с ИИ на 1-ые сутки/ лица контрольной выборки, КИ	р (Манн-Уитни тест)	Пациенты с ИИ на 8-ые сутки/ лица контрольной выборки, КИ	р (Манн-Уитни тест)	Пациенты с ИИ на 8-ые сутки/ пациенты на 1-ые сутки, КИ	р (Уил-коксон тест)
let-7i-3p	<i>0,010</i>	<i>0,024</i>	0,423	0,209	40,495	<i>0,018</i>
miR-22-3p	0,141	0,064	0,449	0,528	3,180	<i>0,028</i>
miR-22-5p	0,347	1,000	<i>0,108</i>	<i>0,019</i>	0,311	0,655
miR-23a-3p	<i>0,714</i>	<i>0,016</i>	0,387	0,083	0,541	0,674
Примечание - Курсивом в таблице обозначены полученные значения относительной экспрессии статистическая значимость которых меньше 0,05 ( $p < 0,05$ ).						

Экспрессия let-7i-3p была достоверно ниже на первые сутки у группы 2 по сравнению с группой 1 и контрольной выборкой. Её экспрессия достоверно увеличивалась более чем в 14 раз во второй группе пациентов на восьмые сутки по сравнению с первыми сутками (Рисунок 12 А). С другой стороны, была обнаружена лишь тенденция к достоверности в экспрессии let-7i-3p на восьмые сутки между первой и второй группой больных ( $p = 0,052$ ). Другой мкРНК, экспрессия которой достоверно увеличивалась во второй группе на восьмые сутки по сравнению с первыми была miR-92b-3p (Рисунок 12 В).

Экспрессия miR-23a-3p у второй группы больных на первые сутки после инсульта была статистически достоверно ниже, чем у контрольной выборки в 1,4 раза (Рисунок 12 Б).

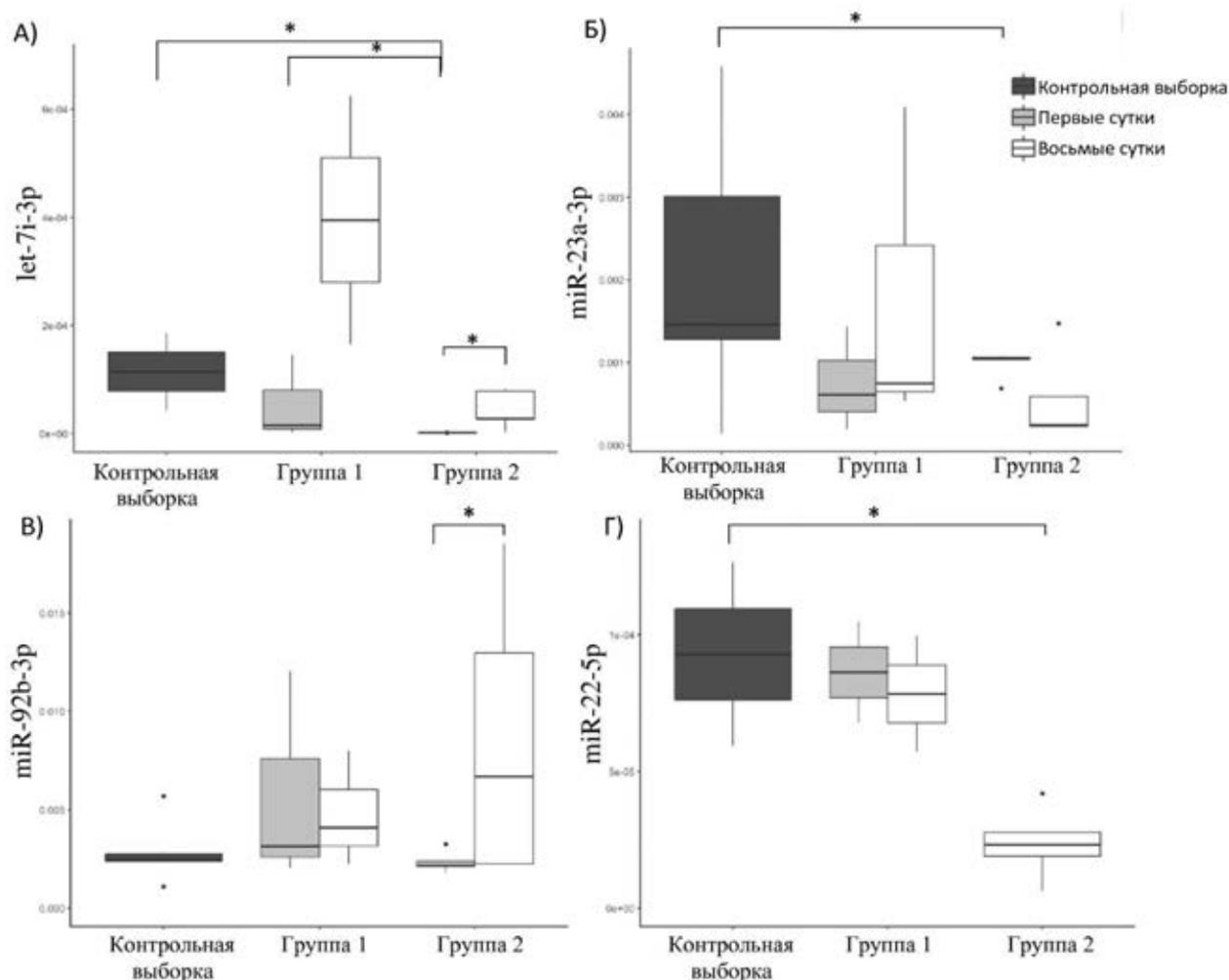
мкРНК miR-22-5p не была обнаружена ни у одного из пациентов второй группы на первые сутки, поэтому невозможно формально посчитать статистическую значимость отличия в экспрессии данной мкРНК между группами. На восьмые сутки у второй группы пациентов экспрессия данной мкРНК

увеличилась и ее можно было детектировать, хотя и значение экспрессии было ниже, чем у контрольной выборки в 13 раз (Рисунок 12 Г).

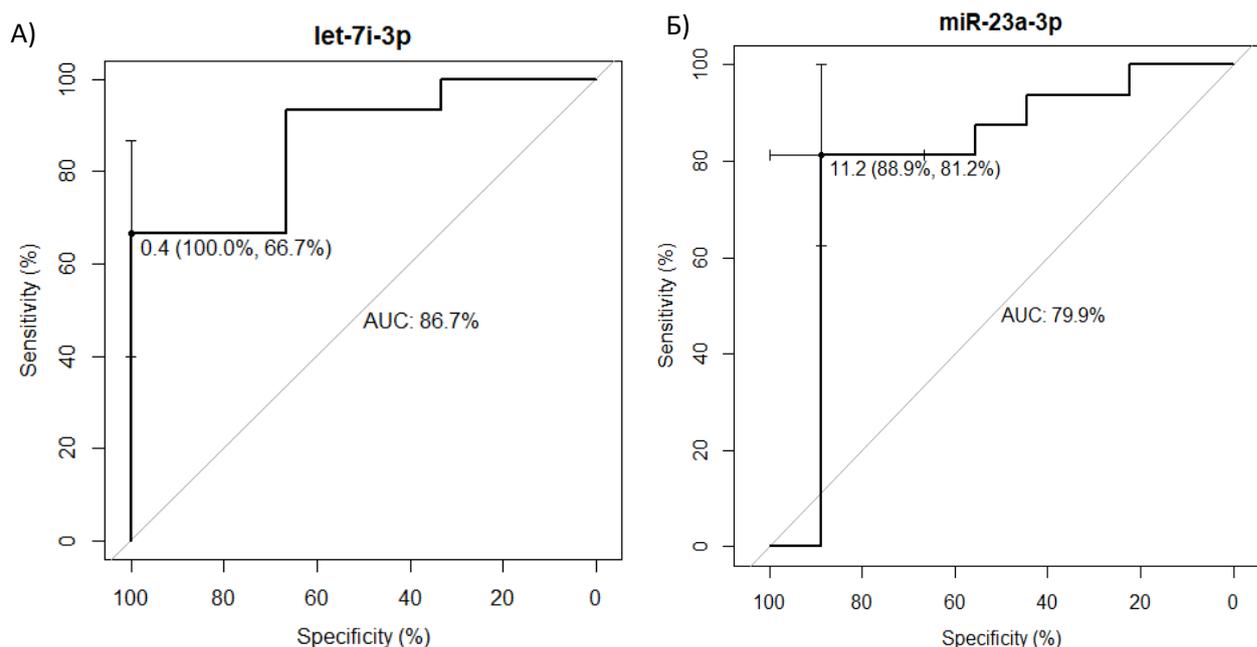
Еще одной дифференциально экспрессирующейся мкРНК была miR-99a-5p. Ее экспрессия на первые сутки в первой группе пациентов была статистически значимо выше по сравнению со второй группой, а также контрольной выборкой. Однако, уже на восьмые сутки экспрессия данной мкРНК уменьшилась и стала соответствовать значению в остальных группах.

Близкими к статистическим были также отличия в экспрессии miR-223-3p между первой группой больных на первые сутки и контрольной выборкой (КИ = 0,32,  $p = 0,058$ ). При этом экспрессия данной мкРНК в плазме второй группы пациентов не изменялась.

Для оценки диагностической значимости экспрессии let-7i-3p и miR-23a-3p как потенциальных биомаркеров инсульта, был проведен анализ ROC кривых и последующее вычисление площади под кривой (AUC). Как видно на рисунке 13, кривые для let-7i-3p (Рисунок 13 А) и miR-23a-3p (Рисунок 13 Б) показывают хорошее разделение между пациентами с инсультом и контрольной выборкой с AUC равной 86,7% (95% доверительный интервал (ДИ): 64,1–100 %) и 79,9% (95% ДИ: 57,7–100 %) соответственно. Оптимальной точкой отсечения для нормированной экспрессии let-7i-3p было  $0,4 \times 10^4$  с чувствительностью 66,7% и специфичностью 100%; для miR-23a-3p -  $11,2 \times 10^4$  с чувствительностью 81,2% и специфичностью 88,9%.

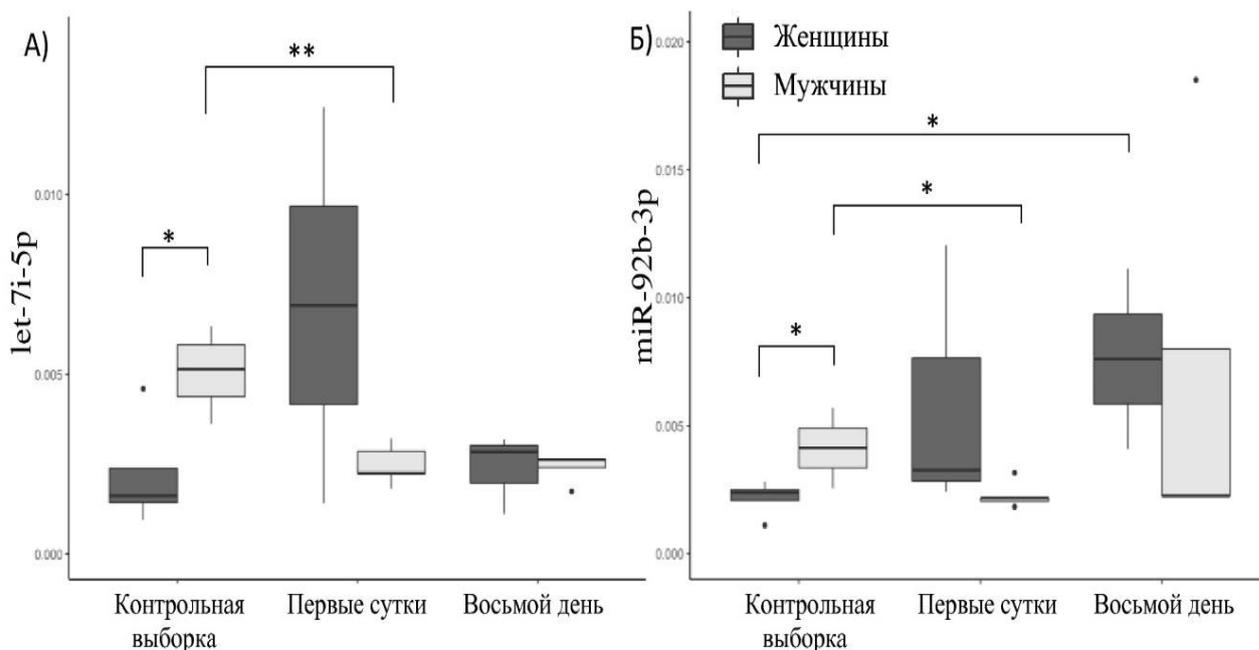


**Рисунок 12.** Уровни нормированной на *cel-miR-39* экспрессии мкРНК *let-7i-3p* (А), *miR-23a-3p* (Б), *miR-92b-3p* (В) и *miR-22-5p* (Г) у двух групп пациентов с инсультом: группы 1 (пациенты с увеличением показателя по шкале NIHSS на 8-е сутки) и группы 2 (пациенты с уменьшением показателя по шкале NIHSS на 8-е сутки) на первый и на восьмой день после ишемического инсульта и у группы контроля. Данные представлены в виде медианы и квартилей. Точкой обозначены выбросы – значения, которые больше 3го квартиля или меньше 1го на 1,5хИКР; где ИКР – расстояние между 1м и 3м квартилем. \* -  $p < 0,05$ , для связанных выборок – по критерию Уилкоксона, для несвязанных – по U критерию Манна-Уитни.



**Рисунок 13.** ROC кривая для оценки экспрессии let-7i-3p (А) и miR-23a-3p (Б). AUC для let-7i-3p и miR-23a-3p были 86,7% и 79,9% соответственно.

Было проведено сравнение экспрессии мкРНК в плазме крови больных инсультом и контрольной выборки в зависимости от пола. Было обнаружено, что let-7i-5p (Рисунок 14 А) и miR-92b-3p (Рисунок 14 Б) имеют пониженную экспрессию в крови женщин даже в норме, по сравнению с мужчинами (в 4 и 3 раза соответственно,  $p < 0,05$ ). Также, значения экспрессии этих мкРНК были ниже у пациентов мужчин на первые сутки по сравнению с контролем в 2,5 раза у let-7i-5p и в 1,6 раза у miR-92b-3p. У пациентов женщин экспрессия miR-92b-3p была выше на восьмые сутки в 4,7 раза по сравнению с контрольной выборкой.



**Рисунок 14.** Уровни нормированной на *cel-miR-39* экспрессии мкРНК *let-7i-5p* (А) и *miR-92b-3p* (Б) у женщин и мужчин пациентов на первые и на восьмые сутки после ишемического инсульта и у группы контроля. Данные представлены в виде медианы и квартилей. Точкой обозначены выбросы – значения, которые больше 3го квартиля или меньше 1го на 1,5хИКР; где ИКР – расстояние между 1м и 3м квартилем. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  для связанных выборок – по критерию Уилкоксона, для несвязанных – по U критерию Манна-Уитни.

Также как и в случае экспериментальных животных, в плазме крови больных была проанализирована корреляция значений экспрессии «пассажирской» и «ведущей» цепочки мкРНК. Однако, значения получились во многом отличными от тех, что были обнаружены в крови и в мозге крыс. Так на первые сутки после инсульта экспрессия обеих цепочек *let-7i* и *miR-99a* достоверно коррелировали между собой ( $\rho = 0,692$  и  $0,742$  соответственно), но уже на восьмые сутки корреляция пропала. При этом появлялась зависимость между экспрессиями других мкРНК: *miR-27a* ( $\rho = 0,831$ ) и *miR-30a* ( $\rho = -0,686$ ). Важно отметить, что корреляция между значениями экспрессии «пассажирской» и «ведущей» цепочки *miR-30a* также была отрицательной у пациентов на первые сутки после инсульта и у группы контроля (в обоих случаях без статистической значимости). Схожие результаты были обнаружены и в лейкоцитах крови крыс на первые и на вторые

сутки после фотохимически индуцированного тромбоза (также статистически не достоверно).

## Глава 4. Обсуждение

### 4.1 Обсуждение общих результатов исследования

В последнее время увеличивается количество исследований, посвященных роли мкРНК как ключевых регуляторов процессов, происходящих в головном мозге в ответ на патологическое состояние, например, ишемическое повреждение [32, 50, 65, 87, 127]. Большинство работ являются экспериментальными, где предметом исследования являются лабораторные животные (в основном крысы) и реже клеточные культуры [154]. Биологическими материалами для экспериментов служат как биоптаты мозга животных, так и кровь [61], и даже ликвор [129]. Есть эксперименты, которые посвящены исследованию функций отдельных мкРНК (например, miR-29b-3p [145]) и только единицы работ, где анализируются более 10 мкРНК [61].

Кроме исследований на лабораторных животных и клеточных культурах существует несколько работ, посвященных изучению экспрессии мкРНК в периферической крови или плазме больных инсультом [63, 162].

Однако, многое еще не изучено. До сих пор детально не исследованы временные паттерны экспрессии мкРНК, участвующих в патогенезе ишемии, непосредственно в лейкоцитах. Пока собрано небольшое количество данных об экспрессии мкРНК в периферической крови больных инсультом. Кроме того, почти нет исследований, которые объединяли бы экспериментальные и клинические подходы к изучению данной проблемы.

В данной работе применен комплексный подход к решению вопроса роли мкРНК в патогенезе и исходе ишемического инсульта: проведено исследование как на лабораторных животных, так и на клинических образцах (плазма крови больных с инсультом). В первой части эксперимента использовали модель фототромботического «кольцевого» инсульта с поздней спонтанной реперфузией и восстановлением тканей, которая позволяет получить воспроизводимый объем ишемического очага. Кроме того, в этой модели ишемии происходит агрегация

тромбоцитов [146], стимулируется ангиогенез и нейрогенез [26, 27]. Поскольку восприимчивость к гипоксии различных типов клеток в головном мозге не одинаково, их повреждение определяется тяжестью и продолжительностью ишемического воздействия. Как следствие, максимальная концентрация апоптотических клеток в плотных ишемизированных участках наблюдается через сутки и сохраняется до трех суток. В тоже время некротические клетки можно выявить не ранее через двое суток после ишемии [59]. Следует отметить, что работы по оценке экспрессии мкРНК с использованием подобной модели ранее не проводились.

Профиль экспрессии мкРНК в лейкоцитах крови крыс, подвергнутых фотоиндуцируемой ишемии, показывает, что в исследуемых временных точках (24 и 48 часов) экспрессия более половины из 45-ти выбранных мкРНК изменяется от 1,5 до 9 раз по сравнению с контрольной выборкой. Изменения в экспрессии одних мкРНК наблюдались либо через 24 часа, либо через 48 часов, а для других выявляется тенденция к повышению экспрессии с 24 до 48 часов. Эти результаты согласуются с данными по кинетике накопления лейкоцитов и экспрессии генов медиаторов воспаления в ишемизированной ткани мозга – их максимальные значения приходятся на тот же временной интервал [3, 17].

Недавно было показано, что в зависимости от степени и продолжительности воспалительного стимула, мкРНК эндотелиальных клеток мозга могут регулировать экспрессию генов (чтобы препятствовать цитокиновым сигналам) для поддержания состояния покоя, или, наоборот, способствовать экспрессии определенных генов, активирующих эндотелий, что, в конечном итоге, приводит к нарушению проницаемости гематоэнцефалического барьера [91]. Цитокины, в свою очередь, регулируют экспрессию мкРНК эндотелиоцитов, которые либо активируют, либо ингибируют реакции воспаления. Учитывая, что инфильтрация лейкоцитов в ишемизированной области способствует активации эндотелиальных клеток, микроглии/макрофагов и астроцитов (наряду с иммунными клетками) и стимулирует выработку и высвобождение провоспалительных цитокинов, мы

предположили, что все эти процессы могут регулироваться мкРНК, экспрессия которых изменяется при ишемии и в ткани мозга, и в лейкоцитах крови.

По нашей информации, в этом исследовании было впервые выявлено, что по сравнению с ложнооперированными (контрольными) животными уровни экспрессии мкРНК изменяются не только в ишемизированном полушарии, но и в интактном. Среди мкРНК с достоверно увеличенным уровнем экспрессии в ишемизированном полушарии более чем в 2 раза определены следующие: let-7f-5p, miR-9a-5p, miR-21-5p, miR-22-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-27a-5p, miR-27b-3p, miR-29a-5p, miR-30a-3p, miR-30c-5p, miR-99a-3p, miR-99a-5p, miR-128-3p, miR-186-5p, miR-221-3p, miR-223-3p и miR-376b-5p. Также важно отметить, что, как видно из Рисунка 8, при помощи значений экспрессии выбранных мкРНК в левом (ишемизированном) полушарии можно достаточно точно разделить крыс по группам: крысы с ишемией через 24 часа, с ишемией через 48 часов и ложнооперированные. Это говорит о том, что кроме значимого изменения отдельных мкРНК после ишемии, меняется профиль экспрессии мкРНК в целом. Эти результаты частично согласуются с данными других авторов [2, 9, 10]. Различия в уровнях и направленности экспрессии некоторых мкРНК могут быть следствием использования разных моделей ишемии и технологических подходов для оценки экспрессии мкРНК.

Сопоставить полученные значения уровней экспрессии мкРНК в интактном полушарии с подобными значениями в публикациях других авторов не представляется возможным, так как мы не нашли аналогов данному эксперименту.

#### **4.2 Обсуждение результатов эксперимента с лабораторными животными**

Особенно необходимо отметить ряд мкРНК, которые показали дифференциальную экспрессию в эксперименте на крысах через 24 часа после фотохимически индуцированного тромбоза: гиперэкспрессия let-7f-5p и miR-223-3p в ишемизированном полушарии мозга, гиперэкспрессия miR-92b-3p в контрлатеральном полушарии и miR-497-5p в лейкоцитах крови. Кроме этого,

особую роль играют другие мкРНК дифференциально экспрессирующиеся через 48 часа после фотохимически индуцированного тромбоза: let-7f-5p, let-7i-3p, miR-23a-3p, miR-99a-5p, miR-223-3p, miR-497-5p.

Как упоминалась ранее, мкРНК семейства let-7 играют важную роль в патогенезе ишемии. Они также связаны с поддержанием барьерной функции мозга. Провоспалительный цитокин TNF $\alpha$  снижает экспрессию членов семейства let-7g-3p и miR-98 в эндотелии мозга, что, в свою очередь, повышает адгезию моноцитов и миграцию клеток в условиях *in vivo* [91, 154]. С другой стороны, антагомир let-7f (искусственный блокиратор мкРНК) уменьшает объем инфаркта в коре и стриатуме, увеличивает уровень инсулин ростового фактора [24]. В нашей работе было исследовано 4 его представителя: let-7c-5p, let-7f-5p, let-7i-5p и let-7i-3p. Было обнаружено, что экспрессия let-7f-5p увеличивается через 24 и 48 часов в ткани мозга и в лейкоцитах крови крыс после ишемии. В работах других авторов указывалось понижение экспрессии let-7f-5p в мозге крыс после тотальной ишемии, вызванной окклюзией центральной мозговой артерии [10]. В тоже время в этой работе показано, что ишемическая прекондия – кратковременная и неполная блокировка кровотока, приводит к повышению экспрессии let-7f-5p и несет нейропротективный эффект. Можно предположить, что в нашем эксперименте фокальная ишемия, которая возникла в результате фотохимически индуцируемого тромбоза физиологически ближе к прекондии, чем к тотальной ишемии, поэтому наблюдается повышение экспрессии let-7f-5p.

Экспрессия let-7i-3p также как и других представителей семейства let-7 в обоих полушарий мозга и лейкоцитах крови крыс была повышена через 48 часов после ишемии. Также нами было показано, что экспрессия этой мкРНК отрицательно коррелирует с экспрессией про-апоптотического гена *AIFM1* в ткани мозга крыс после фотохимически индуцируемого тромбоза. В свою очередь значение данного апоптотического фактора в ишемии мозга еще не до конца изучено: с одной стороны он может индуцировать клеточную гибель и его ингибирование уменьшает область поражения [31, 137], а также приводит к снижению уровня активных форм кислорода [113], с другой стороны недостаток в

*AIFM1* приводит к системным метаболическим изменениям таким как ацидоз [14]. В нашей работе, изменение экспрессии данного гена обнаружено не было.

Участие именно *let-7i-3p* в развитии инсульта до этого показано не было. Однако, по литературным данным экспрессия «направляющей» цепи этой мкРНК – *let-7i-5p*, значимо уменьшается в крови пациентов после инсульта [62]. Однако, отсутствуют какие-либо данные по изменению экспрессии этой мкРНК в модели инсульта на лабораторных животных. Значения экспрессии *let-7i-5p* и *let-7i-3p* сонаправлены и коррелируют друг с другом в крови экспериментальных животных после фотохимически индуцированного тромбоза ( $\rho = 0,738$ ,  $p = 0,045$ ). Более того, нами было показано, что экспрессия *let-7i-5p* статистически значимо изменяется в коре головного мозга крыс. Судя по строению 3' нетранслируемой области анти-апоптотического гена *BCL2L2*, он может быть возможной мишенью для *let-7i-5p*. В нашей работе мы показали, отрицательную корреляцию между экспрессией этих молекул. Соответственно уменьшение экспрессии данной мкРНК, и как следствие увеличение количества анти-апоптотического *BCL2L2* может иметь нейропротективный эффект.

Регуляция экспрессии некоторых мкРНК зависит от цитокинов. Это не только члены описанного выше семейства *let-7*, но и представители семейства *miR-30* (*miR-30a*, *miR-30b*, *miR-30c-1*, *miR-30c-2*, *miR-30d*, *miR-30e*). Они задействованы в отрицательной регуляции провоспалительными цитокинами. Большинство из них (*miR-30a-3p*, *miR-30a-5p*, *miR-30b-3p*, *miR-30c-1-3p*, *miR-30c-2-3p* и *miR-30c-5p*) были включены в исследование. Ранее было обнаружено, что снижение экспрессии членов семейства *miR-30* связано с потерей клеточной адгезии. Также было показано, что эти мкРНК регулируют ангиогенез в эндотелиальных клетках. В совокупности, это дает возможность предположить возможное участие мкРНК семейства *miR-30* в регуляции барьерной функции эндотелия головного мозга [91]. При этом значение экспрессии *miR-30c-1-3p* прямо коррелирует с объемом поражения и гиперэкспрессируется на первые сутки после ишемии [85]. Кроме того, предположительно, мишенями *miR-30a-5p* являются связанные с инсультом гены *RHOV* и *BCLN* [89]. В эксперименте на животных,

было показано, что экспрессия miR-30a-5p повышается в интактном правом полушарии, тогда как miR-30a-3p, miR-30b-3p, miR-30c-2-3p в ишемизированном левом. В обоих полушариях дифференциально экспрессирующейся оказалась мкРНК miR-30c-5p, при этом уровень miR-30c-1-3p не изменялся во всех образцах.

С эндотелиальной функцией сосудов также связана мкРНК miR-221-3p: она регулирует пролиферацию эндотелиальных клеток, миграцию и формирование капиллярной трубки. Кроме того, было показано, что кластер miR-221, состоящий из miR-221-3p, miR-222-3p и miR-222-5p, индуцирует изменения в экспрессии гена эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*) [91]. В свою очередь, это приводит к повышению экспрессии белка ICAM1 в эпителиальных клетках, который служит мишенью этого гена [33, 36]. По литературным данным, экспрессия miR-221-3p повышается в плазме крови больных острым инфарктом миокарда по сравнению с контрольной выборкой [30]. В нашем исследовании данная мкРНК также гиперэкспрессирована в ишемизированном полушарии мозга крыс.

По литературным данным мкРНК miR-21-5p может рассматриваться в качестве сильного антиапоптотического фактора [2, 37]. В нашем исследовании, после фотохимически индуцированного тромбоза экспрессия miR-21-5p была повышена как через 24, так и 48 часов в ткани мозга и лейкоцитах крови крыс. Другими авторами было показано, что в нейронах, выделенных из зоны, граничащей с ишемизированным участком, уровень экспрессии miR-21-5p повышен в три раза по сравнению с нейронами из контралатеральной зоны через 2 и 7 суток после ишемии [18]. В нашем исследовании мы получили схожие результаты, когда уровень экспрессии miR-21-5p был выше в 2,5 раза в ишемизированной области головного мозга крыс по сравнению с контралатеральной через 48 часов после фотохимически индуцированного тромбоза. Ряд исследователей отмечают, что избыточная экспрессия miR-21-5p в культуре корковых нейронов индуцирует подавление апоптоза после кислородно-глюкозной депривации. Кроме того, miR-21-5p подавляет экспрессию генов Fas-лиганда, TNF $\alpha$  и ее мишеней, тем самым, оказывая, своего рода, нейропротективный эффект. Важно отметить, что экспрессия *TNF* в левом

полушарии мозга ишемизированных крыс была незначительно повышена через 24 часа после повреждения (запуск апоптоза), а уже через 48 часов экспрессия этого гена статистически значимо уменьшилась более чем в 2 раза (начало восстановления). Схожая ситуация наблюдалась и в правом полушарии с экспрессией гена *FAS*.

Было показано, что подавление экспрессии miR-21-5p приводит к снижению уровня матричной металлопротеиназы 9 (MMP9) – белка, кодируемого одноименным геном-мишенью и играющего ключевую роль в патогенезе постишемического нарушения гематоэнцефалического барьера и в процессе формирования очага повреждения [2, 8]. Таким образом, можно сказать, что увеличение miR-21-5p в мозге и крови носит протективный характер и уменьшает зону поражения.

Недавно обнаружены антиоксидантная, противовоспалительная и антиапоптотическая активности у miR-23a-3p, miR-22-3p и miR-99a-5p при ишемии [136, 156, 158]. Это говорит о возможной нейропротективной функции этих мкРНК при инсульте. В нашем исследовании значения экспрессии miR-23a-3p в мозге и в крови крыс через 48 часов после фотохимически индуцируемого тромбоза были увеличивались и коррелировали между собой. Предполагается, что miR-23a-3p может выполнять анти-апоптотическую функцию, а также участвовать в анти-оксидантной активности и нейропротекции [158].

Полученные нами данные также указывают на изменение экспрессии miR-22-5p как в ткани мозга крыс. У крыс в обоих полушариях экспрессия данной мкРНК увеличивалась после ишемии на вторые сутки. Судя по литературным данным, значимость miR-22-5p в патогенезе инсульта не была выявлена, однако, была установлена роль этой мкРНК в снижении регенерации миоцитов на животных моделях (уменьшало пролиферацию и дифференцировку клеток) [86]. Напротив, повышенная экспрессия «ведущей» цепи miR-22-3p проявлялась нейропротекцией в нейродегенеративных моделях *in vitro* [65]. Хотя действия этих мкРНК почти обратны, в нашем исследовании было показано что значения экспрессии miR-22-3p и miR-22-5p коррелируют между собой в ишемизированном

полушарии экспериментальных животных. При этом, в лейкоцитах крови крыс взаимосвязь между экспрессиями этих мкРНК была обратной (статистически не значимо). Такую ситуацию можно объяснить особенностью биоматериала, использованного в данном эксперименте. В зоне пенумбра часть клеток подвергнется апоптозу, тогда как другая выживет, поэтому работают механизмы как направленные на подавление регенерации, так и на нейропротекцию.

В ткани мозга и лейкоцитах периферической крови крыс экспрессия miR-99a-5p была повышена и имела стойкую прямую корреляцию через 48 часов после фотохимически индуцированного тромбоза. Ранее было показано, что данная мкРНК в кардиомиоцитах может ингибировать экспрессию CASP3 – представителя семейства цистеиновых протеаз, которые играют важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспаления [79]. Таким образом мкРНК проявляет свой анти-апоптотический эффект. В нашем исследовании экспрессия CASP3 не изменялась в мозге крыс после инсульта. Отчасти это можно объяснить тем, что мкРНК могут ингибировать экспрессию генов не только через деградацию мРНК-мишени, но и через предотвращение трансляции. А в вышеназванной работе был проведен количественный анализ именно белка, но не мРНК.

В последнее время проводится много исследований экспрессии miR-223-3p, которая, как считается, участвует в регуляции клеточного цикла, опухолевой инвазии, дифференцировке гемопоэтических клеток и функционировании клеток иммунной системы [55]. miR-223-3p экспрессируется, в основном, в костном мозге и играет важную роль в гранулопоэзе [64]. Ее гиперэкспрессия индуцирует снижение уровней цитокинов IL-6 и IL-1 $\beta$  в TLR-активированных макрофагах [23]. Предполагается, что в головном мозге miR-223-3p выступает в роли главного регулятора экспрессии субъединиц глутаматного рецептора GluR2 и NR2B, являющихся ее мишенями. При увеличении miR-223-3p в мозге, уровень экспрессии этих рецепторов снижается, тем самым происходит ингибирование NMDA-индуцированный приток кальция в нейроны гиппокампа, что защищает мозг от эксайтотоксичности. Возможно этот механизм определяет наблюдаемое терапевтическое действие miR-223-3p при ишемии в различных экспериментах

[56]. Ранее была показана гиперэкспрессия miR-223-3p в крови и ткани мозга животных на модели МСАО, а также в крови пациентов с острым инсультом [6, 11, 41, 42]. Полученные нами результаты экспрессии данной мкРНК в ткани мозга и крови крыс полностью согласуются с данными других авторов, подтверждают и углубляют их: экспрессия miR-223-3p через 24 часа после ишемии в левом полушарии мозга крыс повышается в 2,6 раза, а в лейкоцитах крови в 1,9 раз; через 48 часов ее уровень повышен в 10 раз в ткани мозга и в 2,8 раз в лейкоцитах крови. Стоит отметить, что дифференциальных отличий в экспрессии данной мкРНК в правом полушарии ни через 24, ни через 48 часов после ишемии обнаружить не удалось. Тот факт, что в ответ на ишемию экспрессия miR-223-3p значительно повышается не только в ткани мозга, но и в лейкоцитах крови, дает возможность предположить, что она вовлечена в механизмы воспаления и иммунного ответа.

Ранее было показано, что miR-497-5p в условиях ишемического воздействия ингибирует трансляцию анти-апоптотических генов *BCL2* и *BCL2L2*, путем связывания с их 3'-нетранслируемой областью [154]. В исследовании было обнаружено, что через сутки после реперфузии в головном мозге мышей (модель МСАО) и в культуре нейронов после кислородно-глюкозной депривации экспрессия белка *BCL2L2* значительно снижалась, а miR-497-5p повышалась. Также было показано, что при супрессии miR-497-5p с помощью специфического ингибитора, уровень *BCL-2* и *BCL2L2* повышался, что приводило к уменьшению очага ишемии и неврологического дефицита. В нашем эксперименте экспрессия miR-497-5p также была статистически значимо повышена как в левом, так и в правом полушарии крыс через 48 часов после фотохимически индуцируемого тромбоза. При этом, статистически значимое повышение экспрессии этой мкРНК в лейкоцитах крови наблюдалось только через 24 часа. Возможно, изменение экспрессии miR-497-5p через 24 часа в лейкоцитах обусловлено первичным запуском воспалительной реакции, пролонгированный эффект от которой наблюдается через 48 часов в самой ткани.

Также стоит отметить, что косвено была подтверждена связь между экспрессией miR-497-5p и *BCL2L2*. Это было показано и на линейной

статистической модели, где в качестве предикторов были взяты все мкРНК, которые теоретически могут взаимодействовать с этим геном, и при анализе корреляции между экспрессией miR-497-5p и *BCL2L2*, как в левом, так и в правом полушарии мозга крыс. Сама экспрессия данного гена была статистически значимо снижена в левом полушарии мозга ишемизированных крыс. Это согласуется с литературными данными и говорит о снижении роли анти-апоптотических механизмов в первые дни после ишемии мозга [154].

Как и в случае с *BCL2L2* было показана возможная взаимосвязь между экспрессией *BCL2* и miR-497-5p на линейной статистической модели ( $p=0,08$ ). В отличие от левого полушария экспрессия *BCL2* была статистически значимо увеличена через 48 часов после ишемии, также как и экспрессия другого анти-апоптотического гена *BCL2L1*. Это может говорить о более выраженном анти-апоптотическом эффекте в «интактном» полушарии, по сравнению с ишемизированным у экспериментальных животных.

Другим геном мишенью для miR-497-5p теоретически является *NEUROD1*. В нашем эксперименте его экспрессия статистически значимо понижалась на первые сутки после фотохимически индуцированного тромбоза, но при этом значительно увеличивалась ко вторым суткам. Корреляция между значениями экспрессии *NEUROD1* и miR-497-5p на первые сутки после ишемии была положительная, но не достоверная. Последние исследования свидетельствуют о том, что *NEUROD1* может содействовать нейрогенезу и уменьшать сигналинг реактивных астроцитов после ишемии мозга [26]. Необходимость нейрогенеза в период восстановления объясняет увеличение экспрессии данного гена на вторые сутки после ишемии.

В итоге, мкРНК miR-497-5p вероятно может регулировать экспрессию как и антиапоптотических, так и генов нейрогенеза, что обуславливает такой временной паттерн ее экспрессии.

Другой мкРНК, которая изменяет свой профиль экспрессии при ишемическом повреждении является miR-27a-5p. В нашем исследовании ее экспрессия у ишемизированных крыс увеличивается через 24 часа после фотохимически индуцированного тромбоза в левом и правом полушарии мозга, а

через 48 часов в правом полушарии и в лейкоцитах крови. Подобное увеличение экспрессии данной мкРНК описано в ряде литературных источников [128], однако механизмы и причины данного феномена до сих пор остаются полностью не изученными. Данная мкРНК теоретически может регулировать множество генов, участвующих в патогенезе ишемии мозга (*BCL2*, *NEUROG3*, *STAT3*) [72], однако достоверно доказать их взаимосвязь ни нам, ни другим ученым пока не удалось.

### 4.3 Обсуждение результатов клинической части исследования

У пациентов после ИИ был проведен анализ экспрессии тех же самых мкРНК в плазме крови. Полученные результаты не полностью совпадают с теми, что были определены у крыс. Например, разнится направление изменения экспрессии части мкРНК семейства *let-7*. Значения экспрессии *let-7f-5p* в плазме крови пациентов с инсультом незначительно снижается, тогда как в ткани мозга и в лейкоцитах крови крыс наблюдается увеличение данной мкРНК через 24 и 48 часов после ишемии. В отличие от экспериментальных данных, содержание *let-7i-3p* в плазме крови всех пациентов в целом, так и во второй группе в отдельности было достоверно ниже на первые сутки по сравнению с контрольной выборкой. При этом экспрессия данной мкРНК достоверно увеличивалась во второй группе пациентов на восьмые сутки, по сравнению с первыми (в данном случае сохраняется то же направление изменения экспрессии, что и в эксперименте). Стоит отметить, что среднее значение уровня экспрессии *let-7i-3p* у первой группы пациентов было выше, чем у второй, хотя и был большой разброс в значениях. Ранее было установлено, что повышение экспрессии *let-7i-3p* характерно для болезни Паркинсона [25].

Как было уже сказано, есть сведения, что экспрессия «направляющей» цепи *let-7i-5p* значимо уменьшается в крови пациентов после инсульта [62]. В нашей работе значение экспрессии *let-7i-5p* также уменьшалось после инсульта (статистически не значимо) и положительно коррелировало со значением экспрессии *let-7i-3p* у пациентов на первые сутки после инсульта ( $\rho = 0,692$ ,  $p = 0,04$ ). Более того, нами было показано, что экспрессия *let-7i-5p* статистически

значимо различается у мужчин и у женщин, как в группе контроля, так и у пациентов. Статистически значимые отличия были обнаружены в экспрессии данной мкРНК у пациентов мужчин на первые сутки после инсульта по сравнению с контрольной выборкой мужчин. При этом подобных отличий у женщин обнаружить не удалось. Выявленные половые различия в экспрессии let-7i-5p в целом соответствуют литературным данным: есть сведения, что мкРНК семейства let-7 коррелируют с возрастом и полом [121], а также влияют на уровень эстрогена [32], который обладает нейропротективным действием.

Для проверки гипотезы использования let-7i-3p в качестве биомаркера была построена ROC кривая по значениям экспрессии данной мкРНК и по категориям «группа контроля», «пациенты с ИИ». Для подбора оптимального референсного значения для дифференцировки групп необходима большая выборка, но используя наши данные, мы пришли к выводу, что мкРНК let-7i-3p с пороговым значением  $RQ = 0,4 \cdot 10^{-4}$  дает 100% специфичность и 66,7% чувствительность со значением AUC 86,7%. Поэтому хотя let-7i-3p ранее не рассматривалась в качестве биомаркера для ИИ, но по совокупности клинических и экспериментальных данных (изменение профиля экспрессии мкРНК и ее генов-мишеней) возможно рассматривать эту мкРНК в качестве перспективного нового маркера ишемического инсульта в первые сутки поражения.

В плазме крови больных определить какие-либо статистически значимые изменения в экспрессии мкРНК семейства miR-30 не удалось. Однако, направление изменений, которые были обнаружены у мкРНК соответствовали описанным в литературных источниках: miR-30a-5p и miR-30c-5p гипохспрессированы (КИ = 0,4 и 0,8 соответственно) [89, 128], а miR-30c-1-3p гиперхспрессирована на первые сутки после инсульта, и ее экспрессия снижается на восьмые [85]. Возможно отсутствие достоверности изменений в данном эксперименте связано с гетеронностью (размером и локализацией поражения) и малочисленностью выборки.

Значение экспрессия miR-23a-3p уменьшалась в плазме крови больных на первый день после инсульта. Это противоречит, полученным экспериментальным

результатам, где экспрессия данной мкРНК увеличивалась. Такой же парадокс присутствует в публикациях других авторов, у которых наблюдалась гипоэкспрессия miR-23a-3p в образцах периферической крови больных [128] и гиперэкспрессия в очаге некроза мозга лабораторных животных [158]. Однако, не смотря на такое противоречие, полученные в настоящей работе данные о снижении её экспрессия в плазме крови всех наблюдаемых нами пациентов указывают на возможную диагностическую значимость. Анализ ROC кривых показал значение AUC для miR-23a-3p 79,9% при  $RQ = 11,2 \cdot 10^{-3}$  и значениями чувствительности и специфичности 88,9% и 81,2% соответственно. Подобные показатели свидетельствуют о потенциальной возможности использовать miR-23a-3p в качестве биомаркера ИИ.

У пациентов происходило увеличение экспрессии miR-22-5p на восьмые сутки по сравнению с первыми. Такое направление изменения экспрессии общее для эксперимента и клиники. Судя по литературным данным, значимость miR-22-5p в патогенезе инсульта не была выявлена, однако, в клинических исследованиях была установлена роль этой мкРНК в развитии инфаркта миокарда, где повышение экспрессии miR-22-5p было характерно для больных в острой фазе [95], что соответствует нашим данным. Также как и со значениями экспрессии miR-22-5p и miR-22-3p у экспериментальных животных, корреляция в плазме крови пациентов была обратной, хотя и статистически не значимой. Судя по литературным данным гиперэкспрессия «ведущей» цепи данной мкРНК давало протективный эффект при ишемии миокарда [27].

У пациентов в первой группе мкРНК miR-99a-5p была также гиперэкспрессированной, как и в эксперименте с животными. Судя по литературным данным, miR-99a-5p предположительно участвует в патогенезе инсульта и может служить его биомаркером. Однако, данные об экспрессии miR-99a-5p в крови больных разнятся. Так есть сведения, как о ее гипер [160], так и о гипоэкспрессии [136] в плазме крови и лейкоцитах. Пока невозможно сказать является ли данная мкРНК прогностическим фактором и чем обусловлено повышение ее уровня в группе больных с ухудшением состояния на 8ые сутки.

Хотя была установлена дифференциальная экспрессия miR-223-3p у экспериментальных животных, определить ее статистически значимое изменение в плазме всех пациентов с инсультом не удалось (КИ = 0,79,  $p = 0,41$ ). При разбивке пациентов на группы (по изменению неврологического статуса на 8ые сутки), было установлено, что экспрессия данной мкРНК выше у больных с улучшением состояния (вторая группа) нежели с ухудшением (первая группа). При этом экспрессия данной мкРНК на первые сутки имеет тенденцию к снижению у пациентов с ухудшением состояния по сравнению с контрольной выборкой (КИ = 0,32,  $p = 0,058$ ). Данная мкРНК теоретически может быть прогностическим фактором инсульта, однако это предположение требуют дополнительного исследования с большей выборкой, нежели в рамках настоящего эксперимента.

В отличие от данных, полученных на экспериментальных животных, найти значимых отличий в экспрессии miR-497-5p у больных с инсультом не удалось. Была обнаружена только тенденция к достоверности ( $p = 0,087$ ) различий между экспрессией miR-497-5p у всех больных с инсультом на первые сутки и контрольной выборкой. Работ, посвященных экспрессии данной мкРНК в плазме больных инсультом также обнаружить не удалось, однако, есть исследование, посвященное определению экспрессии miR-497-5p в плазме больных инфарктом миокарда [82]. В данной работе показано, что экспрессия этой мкРНК значительно варьируется в зависимости от времени, прошедшего с начала заболевания. При этом наибольшая экспрессия miR-497-5p достигается через 8 часов, а уже через 48 часов нет значимых отличий в экспрессии данной мкРНК. Эта информация дает возможность предположить реактивный характер изменения экспрессии miR-497-5p в плазме крови больных, поэтому ее концентрация зависит не от суток прошедших с момента инсульта, а часов или даже минут.

мкРНК miR-92b-3p в экспериментальной части с животными не показала свою важную роль: ее экспрессия статистически значимо возросла только через 24 часа в ишемизированном полушарии. Но в клинической части исследования, у пациентов второй группы наблюдалась значимое ее увеличение (КИ = 5,2) на восьмые сутки по сравнению с первыми. Также обнаружена разница в экспрессии

miR-92b-3p между женщинами и мужчинами, как в контрольной выборке, так и у больных с инсультом. В целом, экспрессия miR-92b-3p была ниже у мужчин и наблюдалась положительная динамика ее изменения на 8ые сутки после инсульта. Один из генов, экспрессию которого регулирует miR-92b-3p – это *Gabra3* [90], он расположен на длинном плече X хромосомы и отвечает за синтез одной из субъединиц ГАМК рецептора. Было показано, что плотность этих рецепторов после инсульта значительно уменьшается [108], а уменьшение ГАМК-эргического ингибирования коррелирует с восстановлением двигательных функций пациентов [17]. Исходя из этого можно предположить, что увеличение экспрессии этой мкРНК играет нейропротективную роль.

## Заключение

На модели фотохимически индуцируемого тромбоза при использовании метода количественной ОТ-ПЦР в реальном времени была оценена экспрессия 45-ти мкРНК в ткани мозга и лейкоцитах крови крыс через 24 и 48 часов после воздействия. Был определен паттерн индуцированных ишемией мкРНК и их генов-мишеней. Также впервые была показана разница в экспрессии ряда мкРНК в левом и правом полушарии животных после фотохимически индуцированного тромбоза. Такая разница может объясняться активацией разных сигнальных путей в очаге повреждения и в контрлатеральной области. Была обнаружена тенденция к повышению экспрессии исследуемых мкРНК через 48 часов в ткани головного мозга и лейкоцитах крови крыс. Это может быть следствием процесса воспаления, эндотелиальной дисфункции, нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера, вызванных ишемическим воздействием.

Было обнаружено увеличение экспрессии анти-апоптотических генов (*BCL2L1*, *BCL2L2*, *BCL2*) в контрлатеральном полушарии по сравнению с ишемизированным. А также определены некоторые мкРНК, которые вероятно регулируют экспрессию этих генов (*miR-497-5p*, *let-7i-5p*).

При сравнении профилей экспрессии мкРНК, выделенных из плазмы крови пациентов и здоровых волонтеров были обнаружены значимые отличия. Более того, были показаны изменения профилей мкРНК в зависимости от стадии инсульта и от пола больного. В итоге это позволило определить ряд мкРНК (*let-7i-3p* и *miR-23a-3p*), которые потенциально могут быть дополнительными биомаркерами ишемического инсульта. Найти мкРНК, которые достоверно могут служить прогностическими факторами заболевания в рамках данного исследования не удалось в связи с маленькой выборкой больных с ишемическим инсультом. Однако, полученные данные позволяют рекомендовать определять экспрессию *miR-99a-5p* и *miR-223-3p* в качестве возможных маркеров негативной динамики инсульта.

В заключении необходимо отметить, что данная работа если не решает, то приближает решение одной из проблем применения мкРНК в клинической практике: трансляционность исследования. Оригинальный дизайн эксперимента позволил сопоставить данные, получаемые на лабораторных животных с клиническими данными. Более того, в рамках настоящей работы была представлена выборка пациентов и группы контроля, состоящая из представителей не азиатской популяции (популяции России), что является редкостью для такого исследования.

## Выводы

1. У крыс с фокальной ишемией были определены 41 дифференциально экспрессирующаяся мкРНК в ткани мозга и лейкоцитах крови; впервые показаны различия в экспрессии мкРНК в ишемизированном и контрлатеральном – «интактном» участках мозга;
2. Кластерный анализ показал, что уровни экспрессии выбранных мкРНК в левом (ишемизированном) полушарии образуют кластеры, соответствующие их физиологическим группам. Корреляция между экспрессией мкРНК в мозге и в лейкоцитах крови крыс была как прямой, так и обратной;
3. В ткани ишемизированного полушария мозга крыс после фотохимически индуцированного тромбоза обнаружено 13 дифференциально экспрессирующихся генов: ген нейрогенеза *NEUROD1* был гипозэкспрессирован как через 24, так и через 48 часов после ишемии, тогда как остальные гены, участвующие в процессах воспаления (*NFKB2*, *TNF*, *FOS*), апоптоза (*BCL2L2*), нейрогенеза (*NEUROG3*, *NEUROG2*, *NEUROG1*, *NOTCH3*) и транскрипции (*HES5*, *ATOH1*, *HIC1*, *CREB1*) были гипозэкспрессированы только через 48 часов.
4. Установлена взаимосвязь между экспрессией гена *BCL2* с экспрессией мкРНК *miR-212-3p*, *miR-125b-5p* и *miR-376b-5p* ( $p = 0,016$ ), а также экспрессией гена *BCL2L2* с экспрессией *let-7i-5p* ( $p = 0,029$ );
5. У больных с ишемическим инсультом в плазме крови было обнаружено 5 дифференциально экспрессирующихся мкРНК: у всех пациентов на первые сутки инсульта по сравнению с контрольной выборкой (гипозэкспрессия *let-7i-3p* и *miR-23a-3p*); у всех пациентов на восьмые сутки инсульта по сравнению с контрольной выборкой (гипозэкспрессия, *miR-22-5p*); у пациентов на восьмые сутки по сравнению с первыми сутками инсульта (гиперэкспрессия *miR-22-3p* и *let-7i-3p* для всех пациентов и гиперэкспрессия *let-7i-3p* и *miR-92b-3p* для пациентов с улучшением состояния на восьмые сутки);
6. По совокупности данных лабораторной и клинической части исследования (взаимодействие с генами мишенями и анализ ROC кривой), возможно

предложить использование let-7i-3p и miR-23a-3p в качестве потенциальных биомаркеров ишемического инсульта на первые сутки после поражения с пороговым нормированным значением экспрессии  $0,4 \cdot 10^{-4}$  и  $11,2 \cdot 10^{-3}$  соответственно;

7. Понижение экспрессии miR-223-3p и повышение экспрессии miR-99a-5p в плазме крови пациентов могут служить потенциальными прогностическими факторами ухудшения неврологического статуса.

## Практические рекомендации

1. Рекомендуется создание клинико-генетических баз данных пациентов с ишемией мозга, включающих результаты клинико-лабораторного и молекулярно-генетического обследования для идентификации и поиска спектра эпигенетических маркеров риска развития заболевания и прогнозирования исходов инсульта.
2. В первые сутки заболевания мкРНК let-7i-3p (по совокупности полученных экспериментальных и клинико-генетических данных) можно рассматривать в качестве перспективного нового биомаркера ишемического инсульта.
3. Понижение экспрессии miR-223-3p и повышение экспрессии miR-99a-5p у больных с ухудшением состояния неврологического статуса позволяет высказать предположение, что данные мкРНК могут быть прогностическим фактором инсульта, однако это предположение требует дополнительного исследования.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

1. Дальнейшее изучение дифференциально экспрессирующихся мкРНК на других моделях инсульта (например, перевязка средней мозговой артерии с реперфузией и без) может углубить понимание биохимических процессов и роли генетических феноменов, происходящих при нарушении мозгового кровообращения.
2. Определение расширенного списка дифференциально экспрессирующихся мкРНК у пациентов при инсульте в перспективе позволит использовать их в качестве биомаркеров повреждения мозга, а также при лечении данного заболевания.

### Список использованных сокращений

- 3'-UTR – 3'-нетранслируемая область
- AIFM1 – Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial. Митохондриальный апоптоз-индуцируемый фактор 1
- AUC – площадь под ROC-кривой
- Bcl-2 - B-cell lymphoma 2
- BDNF – нейротрофический фактор головного мозга
- BMP – костный морфогенетический белок
- dNTP – дезоксинуклеозид трифосфат
- FADD – FAS ассоциированный домен смерти
- MCAO – middle cerebral artery occlusion, экспериментальная модель ишемии
- RISC – РНК индуцирующий сайленсинг комплекс
- ROC кривая – кривая рабочей характеристики приёмника
- RQ – относительное количество
- SMAD – лиганд-специфический передатчик сигнала
- TGF-beta – трансформирующий фактор бета
- TNF – фактор некроза опухолей
- АГ – артериальная гипертензия
- АФК – активные формы кислорода
- ЕА – единицы активности
- ИИ – ишемический инсульт
- ИКР – интерквартильное размах
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- КИ – коэффициент изменения
- миРНК - малые интерферирующие РНК
- мкРНК – микроРНК
- мРНК – матричная РНК
- мяРНК – малые ядерные РНК
- ОТ – обратная транскрипция

п.н. – пара нуклеотидов

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

тРНК – транспортная РНК

шкале NIHSS – шкала инсульта Национального института здоровья

## Список литературы

1. Большаков, А.П. Глутаматная нейротоксичность: нарушения ионного гомеостаза, дисфункция митохондрий, изменение активности клеточных систем / А. П. Большаков // Нейрохимия – 2008. – Т. 25 – № 3 – 157–169с.
2. Гусев, Е.И. Ишемический инсульт. Современное состояние проблемы / Е. И. Гусев, М. Ю. Мартынов, П. Р. Камчатнов // Доктор.Ру – 2013. – Т. 5 – № 83 – 7–12с.
3. Гусев, Е.И. Ишемия головного мозга. / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова – Медицина М., 2001. – 328с.
4. Котов, С.В. Инсульт: диагностика, лечение. / С. В. Котов, Е. В. Исакова // Альманах клинической медицины – 2004. – Т. 7 – 275–294с.
5. Парфенов, В.А. Острый период ишемического инсульта: диагностика и лечение. / В. А. Парфенов // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика – 2009. – Т. 1 – № 1 – 5–12с.
6. Стаховская, Л.В. Эпидемиология инсульта в России по результатам территориально-популяционного регистра (2009-2010). / Л. В. Стаховская, О. А. Ключихина, М. Д. Богатырева, В. В. Коваленко // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова – 2013. – Т. 113 – № 5–1 – 4–10с.
7. Федин, А.И. Интенсивная терапия ишемического инсульта. / А. И. Федин, С. А. Румянцева – Москва: Медицинская книга, 2004. – 284с.
8. Abdelfattah, A.M. Update on non-canonical microRNAs. / А. М. Abdelfattah, С. Park, М. Y. Choi // Biomol. Concepts – 2014. – Т. 5 – № 4 – 275–87с.
9. Adams, H.P. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment / H. P. Adams, В. Н. Bendixen, L. J. Kappelle, J. Biller, В. В. Love, D. L. Gordon, E. E. Marsh // Stroke – 1993. – Т. 24 – № 1 – 35–41с.
10. Altintas, O. Neuroprotective effect of ischemic preconditioning via modulating the expression of cerebral miRNAs against transient cerebral ischemia in diabetic rats. / O. Altintas, M. Ozgen Altintas, M. Kumas, T. Asil // Neurol. Res. – 2016. – Т. 38 – № 11

– 1003–1011c.

11. Altuvia, Y. Clustering and conservation patterns of human microRNAs / Y. Altuvia, P. Landgraf, G. Lithwick, N. Elefant, S. Pfeffer, A. Aravin, M. J. Brownstein, T. Tuschl, H. Margalit // *Nucleic Acids Res* – 2005. – T. 33 – № 8 – 2697–2706c.

12. Ambros, V. A uniform system for microRNA annotation / V. Ambros, B. Bartel, D. P. Bartel, C. B. Burge, J. C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun, T. Tuschl // *RNA* – 2003. – T. 9 – № 3 – 277–279c.

13. Andersen, C.L. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets / C. L. Andersen, J. L. Jensen, T. F. Ørntoft // *Cancer Res.* – 2004. – T. 64 – № 15 – 5245–5250c.

14. Bano, D. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. / D. Bano, J. H. M. Prehn // *EBioMedicine* – 2018. – T. 30 – 29–37c.

15. Baskerville, S. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes / S. Baskerville, D. P. Bartel // *RNA* – 2005. – T. 11 – № 3 – 241–247c.

16. Bazzini, A.A. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish / A. A. Bazzini, M. T. Lee, A. J. Giraldez // *Science* (80-. ). – 2012. – T. 336 – № 6078 – 233–237c.

17. Blicher, J.U. GABA levels are decreased after stroke and GABA changes during rehabilitation correlate with motor improvement. / J. U. Blicher, J. Near, E. Næss-Schmidt, C. J. Stagg, H. Johansen-Berg, J. F. Nielsen, L. Østergaard, Y.-C. L. Ho // *Neurorehabil. Neural Repair* – 2015. – T. 29 – № 3 – 278–86c.

18. Buller, B. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. / B. Buller, X. Liu, X. Wang, R. L. Zhang, L. Zhang, A. Hozeska-Solgot, M. Chopp, Z. G. Zhang // *FEBS J.* – 2010. – T. 277 – № 20 – 4299–307c.

19. Burroughs, A.M. A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness / A.

- M. Burroughs, Y. Ando, M. J. de Hoon, Y. Tomaru, T. Nishibu, R. Ukekawa, T. Funakoshi, T. Kurokawa, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, C. O. Daub // *Genome Res* – 2010. – T. 20 – № 10 – 1398–1410c.
20. Butkytė, S. Splicing-dependent expression of microRNAs of mirtron origin in human digestive and excretory system cancer cells. / S. Butkytė, L. Čiupas, E. Jakubauskienė, L. Vilys, P. Mocevicius, A. Kanopka, G. Vilkaitis // *Clin. Epigenetics* – 2016. – T. 8 – 33c.
21. Caballero-Garrido, E. In Vivo Inhibition of miR-155 Promotes Recovery after Experimental Mouse Stroke / E. Caballero-Garrido, J. C. Pena-Philippides, T. Lordkipanidze, D. Bragin, Y. Yang, E. B. Erhardt, T. Roitbak // *J. Neurosci.* – 2015. – T. 35 – № 36 – 12446–12464c.
22. Cai, X. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs / X. Cai, C. H. Hagedorn, B. R. Cullen // *RNA* – 2004. – T. 10 – № 12 – 1957–1966c.
23. Chen, Q. Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1 $\beta$  production in macrophages by targeting STAT3. / Q. Chen, H. Wang, Y. Liu, Y. Song, L. Lai, Q. Han, X. Cao, Q. Wang // *PLoS One* – 2012. – T. 7 – № 8 – e42971c.
24. Chen, X. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases / X. Chen, Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang, C.-Y. Zhang // *Cell Res.* – 2008. – T. 18 – № 10 – 997–1006c.
25. Chen, Y. MicroRNA-4639 Is a Regulator of DJ-1 Expression and a Potential Early Diagnostic Marker for Parkinson's Disease. / Y. Chen, C. Gao, Q. Sun, H. Pan, P. Huang, J. Ding, S. Chen // *Front. Aging Neurosci.* – 2017. – T. 9 – 232c.
26. Chen, Y. Functional repair after ischemic injury through high efficiency in situ astrocyte-to-neuron conversion / Y. Chen, N. Ma, Z. Pei, Z. Wu, F. H. Do-Monte, P. Huang, E. Yellin, M. Chen, J. Yin, G. Lee, A. Minier, Y. Hu, Y. Bai, K. Lee, G. Quirk,

G. Chen // bioRxiv – 2018. – 294967c.

27. Chen, Z. Cardiac myocyte-protective effect of microRNA-22 during ischemia and reperfusion through disrupting the caveolin-3/eNOS signaling. / Z. Chen, Y. Qi, C. Gao // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – T. 8 – № 5 – 4614–26c.

28. Cloonan, N. MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways / N. Cloonan, S. Wani, Q. Xu, J. Gu, K. Lea, S. Heater, C. Barbacioru, A. L. Steptoe, H. C. Martin, E. Nourbakhsh, K. Krishnan, B. Gardiner, X. Wang, K. Nones, J. A. Steen, N. A. Matigian, D. L. Wood, K. S. Kassahn, N. Waddell, J. Shepherd, C. Lee, J. Ichikawa, K. McKernan, K. Bramlett, S. Kuersten, S. M. Grimmond // *Genome Biol* – 2011. – T. 12 – № 12 – R126c.

29. Cogswell, J.P. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. / J. P. Cogswell, J. Ward, I. A. Taylor, M. Waters, Y. Shi, B. Cannon, K. Kelnar, J. Kemppainen, D. Brown, C. Chen, R. K. Prinjha, J. C. Richardson, A. M. Saunders, A. D. Roses, C. A. Richards // *J. Alzheimers. Dis.* – 2008. – T. 14 – № 1 – 27–41c.

30. Coskunpinar, E. Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction / E. Coskunpinar, H. A. Cakmak, A. K. Kalkan, N. O. Tiryakioglu, M. Erturk, Z. Ongen // *Gene* – 2016. – T. 591 – № 1 – 90–96c.

31. Culmsee, C. Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. / C. Culmsee, C. Zhu, S. Landshamer, B. Becattini, E. Wagner, M. Pellecchia, M. Pellechia, K. Blomgren, N. Plesnila // *J. Neurosci.* – 2005. – T. 25 – № 44 – 10262–72c.

32. Dai, R. Sexual dimorphism of miRNA expression: a new perspective in understanding the sex bias of autoimmune diseases. / R. Dai, S. A. Ahmed // *Ther. Clin. Risk Manag.* – 2014. – T. 10 – 151–63c.

33. Dharap, A. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral MicroRNAome / A. Dharap, K. Bowen, R. Place, L. Li, R. Vemuganti // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2009. – T. 29 – № 4 – 675–687c.

34. Di, Y. MicroRNAs expression and function in cerebral ischemia reperfusion injury.

- / Y. Di, Y. Lei, F. Yu, F. Changfeng, W. Song, M. Xuming // *J. Mol. Neurosci.* – 2014. – T. 53 – № 2 – 242–50c.
35. Dweep, H. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions / H. Dweep, N. Gretz // *Nat. Methods* – 2015. – T. 12 – № 8 – 697–697c.
36. Dweep, H. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes / H. Dweep, C. Sticht, P. Pandey, N. Gretz // *J Biomed Inf.* – 2011. – T. 44 – № 5 – 839–847c.
37. Ebhardt, H.A. Meta-analysis of small RNA-sequencing errors reveals ubiquitous post-transcriptional RNA modifications / H. A. Ebhardt, H. H. Tsang, D. C. Dai, Y. Liu, B. Bostan, R. P. Fahlman // *Nucleic Acids Res* – 2009. – T. 37 – № 8 – 2461–2470c.
38. Eisen, M.B. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. / M. B. Eisen, P. T. Spellman, P. O. Brown, D. Botstein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1998. – T. 95 – № 25 – 14863–8c.
39. Eulalio, A. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. / A. Eulalio, E. Huntzinger, T. Nishihara, J. Rehwinkel, M. Fauser, E. Izaurralde // *RNA* – 2009. – T. 15 – № 1 – 21–32c.
40. Eyileten, C. MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Ischemic Stroke—A Comprehensive Review and Bioinformatic Analysis / C. Eyileten, Z. Wicik, S. De Rosa, D. Mirowska-Guzel, A. Soplinska, C. Indolfi, I. Jastrzebska-Kurkowska, A. Czlonkowska, M. Postula // *Cells* – 2018. – T. 7 – № 12 – 249c.
41. Fabian, M.R. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs / M. R. Fabian, N. Sonenberg, W. Filipowicz // *Annu Rev Biochem* – 2010. – T. 79 – 351–379c.
42. Faller, M. MicroRNA biogenesis: there’s more than one way to skin a cat. / M. Faller, F. Guo // *Biochim. Biophys. Acta* – 2008. – T. 1779 – № 11 – 663–7c.
43. Feng, Y. Inhibiting caspase-9 after injury reduces hypoxic ischemic neuronal injury in the cortex in the newborn rat / Y. Feng, J. D. Fratkin, M. H. LeBlanc // *Neurosci. Lett.* – 2003. – T. 344 – № 3 – 201–204c.
44. Friedman, R.C. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. / R. C. Friedman, K. K.-H. Farh, C. B. Burge, D. P. Bartel // *Genome Res.* – 2009. – T. 19 –

№ 1 – 92–105c.

45. Graham, E.M. Neonatal mice lacking functional Fas death receptors are resistant to hypoxic-ischemic brain injury. / E. M. Graham, R. A. Sheldon, D. L. Flock, D. M. Ferriero, L. J. Martin, D. P. O’Riordan, F. J. Northington // *Neurobiol. Dis.* – 2004. – T. 17 – № 1 – 89–98c.
46. Griffiths-Jones, S. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature / S. Griffiths-Jones, R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, A. J. Enright // *Nucleic Acids Res* – 2006. – T. 34 – № Database issue – D140-4c.
47. Grond-Ginsbach, C. Gene expression in human peripheral blood mononuclear cells upon acute ischemic stroke / C. Grond-Ginsbach, M. Hummel, T. Wiest, S. Horstmann, K. Pflieger, M. Hergenahn†, M. Hollstein, U. Mansmann, A. J. Grau, S. Wagner // *J. Neurol.* – 2008. – T. 255 – № 5 – 723–731c.
48. Gu, W. Vascular endothelial growth factor-A and -C protein up-regulation and early angiogenesis in a rat photothrombotic ring stroke model with spontaneous reperfusion. / W. Gu, T. Brännström, W. Jiang, A. Bergh, P. Wester // *Acta Neuropathol.* – 2001. – T. 102 – № 3 – 216–26c.
49. Gu, W. Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. / W. Gu, T. Brännström, P. Wester // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2000. – T. 20 – № 8 – 1166–73c.
50. Gubern, C. miRNA expression is modulated over time after focal ischaemia: up-regulation of miR-347 promotes neuronal apoptosis. / C. Gubern, S. Camós, I. Ballesteros, R. Rodríguez, V. G. Romera, R. Cañadas, I. Lizasoain, M. A. Moro, J. Serena, J. Mallolas, M. Castellanos // *FEBS J.* – 2013. – T. 280 – № 23 – 6233–46c.
51. Guo, L. Global expression analysis of miRNA gene cluster and family based on isomiRs from deep sequencing data / L. Guo, Z. Lu // *Comput Biol Chem* – 2010. – T. 34 – № 3 – 165–171c.
52. Haley, M.J. The blood-brain barrier after stroke: Structural studies and the role of transcytotic vesicles. / M. J. Haley, C. B. Lawrence // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2017. – T. 37 – № 2 – 456–470c.
53. Hallenbeck, J.M. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with

- low blood flow during the early postischemic period. / J. M. Hallenbeck, A. J. Dutka, T. Tanishima, P. M. Kochanek, K. K. Kumaroo, C. B. Thompson, T. P. Obrenovitch, T. J. Contreras // *Stroke*. – 1986. – T. 17 – № 2 – 246–53c.
54. Han, J. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing / J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin, V. N. Kim // *Genes Dev* – 2004. – T. 18 – № 24 – 3016–3027c.
55. Haneklaus, M. miR-223: infection, inflammation and cancer. / M. Haneklaus, M. Gerlic, L. A. J. O’Neill, S. L. Masters // *J. Intern. Med.* – 2013. – T. 274 – № 3 – 215–26c.
56. Harraz, M.M. MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors / M. M. Harraz, S. M. Eacker, X. Wang, T. M. Dawson, V. L. Dawson // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2012. – T. 109 – № 46 – 18962–18967c.
57. Hoon, M.J.L. de Open source clustering software. / M. J. L. de Hoon, S. Imoto, J. Nolan, S. Miyano // *Bioinformatics* – 2004. – T. 20 – № 9 – 1453–4c.
58. Hu, G. miR-221 suppresses ICAM-1 translation and regulates interferon-gamma-induced ICAM-1 expression in human cholangiocytes. / G. Hu, A.-Y. Gong, J. Liu, R. Zhou, C. Deng, X.-M. Chen // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2010. – T. 298 – № 4 – G542-50c.
59. Hu, X. Long-lasting neuronal apoptotic cell death in regions with severe ischemia after photothrombotic ring stroke in rats. / X. Hu, I.-M. Johansson, T. Brännström, T. Olsson, P. Wester // *Acta Neuropathol.* – 2002. – T. 104 – № 5 – 462–70c.
60. Jamison, J.T. Persistent redistribution of poly-adenylated mRNAs correlates with translation arrest and cell death following global brain ischemia and reperfusion / J. T. Jamison, F. Kayali, J. Rudolph, M. Marshall, S. R. Kimball, D. J. DeGracia // *Neuroscience* – 2008. – T. 154 – № 2 – 504–520c.
61. Jeyaseelan, K. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. / K. Jeyaseelan, K. Y. Lim, A. Armugam // *Stroke*. – 2008. – T. 39 – № 3 – 959–66c.
62. Jickling, G.C. Leukocyte response is regulated by microRNA let7i in patients with acute ischemic stroke. / G. C. Jickling, B. P. Ander, N. Shroff, M. Orantia, B. Stamova,

- C. Dykstra-Aiello, H. Hull, X. Zhan, D. Liu, F. R. Sharp // *Neurology* – 2016. – T. 87 – № 21 – 2198–2205c.
63. Jickling, G.C. microRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets. / G. C. Jickling, B. P. Ander, X. Zhan, D. Noblett, B. Stamova, D. Liu // *PLoS One* – 2014. – T. 9 – № 6 – e99283c.
64. Johnnidis, J.B. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. / J. B. Johnnidis, M. H. Harris, R. T. Wheeler, S. Stehling-Sun, M. H. Lam, O. Kirak, T. R. Brummelkamp, M. D. Fleming, F. D. Camargo // *Nature* – 2008. – T. 451 – № 7182 – 1125–9c.
65. Jovicic, A. MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific Huntington's disease-related mechanisms / A. Jovicic, J. F. Zaldivar Jolissaint, R. Moser, M. de F. Silva Santos, R. Luthi-Carter, F. Silva Santos Mde, R. Luthi-Carter // *PLoS One* – 2013. – T. 8 – № 1 – e54222c.
66. Kaul, S. Genetics of ischemic stroke: Indian perspective / S. Kaul, A. Munshi // *Neurol India* – 2012. – T. 60 – № 5 – 498–503c.
67. Kawahara, Y. Frequency and fate of microRNA editing in human brain / Y. Kawahara, M. Megraw, E. Kreider, H. Iizasa, L. Valente, A. G. Hatzigeorgiou, K. Nishikura // *Nucleic Acids Res* – 2008. – T. 36 – № 16 – 5270–5280c.
68. Khoshnam, S.E. Emerging Roles of microRNAs in Ischemic Stroke: As Possible Therapeutic Agents / S. E. Khoshnam, W. Winlow, Y. Farbood, H. F. Moghaddam, M. Farzaneh // *J. Stroke* – 2017. – T. 19 – № 2 – 166–187c.
69. Kim, Y.-K. Modifications of Small RNAs and Their Associated Proteins / Y.-K. Kim, I. Heo, V. N. Kim // *Cell* – 2010. – T. 143 – № 5 – 703–709c.
70. Kim, Y.K. Processing of intronic microRNAs / Y. K. Kim, V. N. Kim // *EMBO J* – 2007. – T. 26 – № 3 – 775–783c.
71. Kozomara, A. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data / A. Kozomara, S. Griffiths-Jones // *Nucleic Acids Res* – 2011. – T. 39 – № Database issue – D152-7c.
72. Kozomara, A. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep

- sequencing data. / A. Kozomara, S. Griffiths-Jones // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – T. 42 – № Database issue – D68-73c.
73. Kuhn, C.-D. Eukaryotic Argonautes come into focus. / C.-D. Kuhn, L. Joshua-Tor // *Trends Biochem. Sci.* – 2013. – T. 38 – № 5 – 263–71c.
74. Lagos-Quintana, M. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs / M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl // *Science (80-. )*. – 2001. – T. 294 – № 5543 – 853–858c.
75. Lee, L.W. Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing / L. W. Lee, S. Zhang, A. Etheridge, L. Ma, D. Martin, D. Galas, K. Wang // *RNA* – 2010. – T. 16 – № 11 – 2170–2180c.
76. Lee, S.-T. MicroRNAs induced during ischemic preconditioning. / S.-T. Lee, K. Chu, K.-H. Jung, H.-J. Yoon, D. Jeon, K.-M. Kang, K.-H. Park, E.-K. Bae, M. Kim, S. K. Lee, J.-K. Roh // *Stroke*. – 2010. – T. 41 – № 8 – 1646–51c.
77. Lee, Y. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing / Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V. N. Kim // *Nature* – 2003. – T. 425 – № 6956 – 415–419c.
78. Lee, Y. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. / Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, V. N. Kim // *EMBO J.* – 2004. – T. 23 – № 20 – 4051–60c.
79. Li, Q. Overexpression of microRNA-99a attenuates heart remodelling and improves cardiac performance after myocardial infarction / Q. Li, J. Xie, R. Li, J. Shi, J. Sun, R. Gu, L. Ding, L. Wang, B. Xu // *J. Cell. Mol. Med.* – 2014. – T. 18 – № 5 – 919–928c.
80. Li, W.Y. Circulating microRNAs as potential non-invasive biomarkers for the early detection of hypertension-related stroke. / W. Y. Li, J. Jin, J. Chen, Y. Guo, J. Tang, S. Tan // *J. Hum. Hypertens.* – 2014. – T. 28 – № 5 – 288–91c.
81. Li, Y. MicroRNA: Not Far from Clinical Application in Ischemic Stroke / Y. Li, Y. Liu, Z. Wang, H. Hou, Y. Lin, Y. Jiang // *ISRN Stroke* – 2013. – T. 2013 – 1–7c.
82. Li, Z. High association between human circulating microRNA-497 and acute myocardial infarction. / Z. Li, J. Lu, Y. Luo, S. Li, M. Chen // *ScientificWorldJournal*. – 2014. – T. 2014 – 931845c.

83. Lindgren, A. Stroke genetics: a review and update. / A. Lindgren // *J. stroke* – 2014. – T. 16 – № 3 – 114–23c.
84. Liu, D.-Z. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. / D.-Z. Liu, Y. Tian, B. P. Ander, H. Xu, B. S. Stamova, X. Zhan, R. J. Turner, G. Jickling, F. R. Sharp // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2010. – T. 30 – № 1 – 92–101c.
85. Liu, F.J. microRNAs Involved in Regulating Spontaneous Recovery in Embolic Stroke Model. / F. J. Liu, K. Y. Lim, P. Kaur, S. Sepramaniam, A. Armugam, P. T. H. Wong, K. Jeyaseelan // *PLoS One* – 2013. – T. 8 – № 6 – e66393c.
86. Liu, H.L. Identification of the microRNA Expression Profile in the Regenerative Neonatal Mouse Heart by Deep Sequencing / H. L. Liu, J. G. Zhu, Y. Q. Liu, Z. G. Fan, C. Zhu, L. M. Qian // *Cell Biochem. Biophys.* – 2014. – T. 70 – № 1 – 635–642c.
87. Liu, W. Effects of microRNA-21 and microRNA-24 inhibitors on neuronal apoptosis in ischemic stroke. / W. Liu, X. Chen, Y. Zhang // *Am. J. Transl. Res.* – 2016. – T. 8 – № 7 – 3179–87c.
88. Liu, X.S. MicroRNA profiling in subventricular zone after stroke: MiR-124a regulates proliferation of neural progenitor cells through Notch signaling pathway / X. S. Liu, M. Chopp, R. L. Zhang, T. Tao, X. L. Wang, H. Kassis, A. Hozeska-Solgot, L. Zhang, C. Chen, Z. G. Zhang // *PLoS One* – 2011. – T. 6 – № 8 – e23461c.
89. Long, G. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. / G. Long, F. Wang, H. Li, Z. Yin, C. Sandip, Y. Lou, Y. Wang, C. Chen, D. W. Wang // *BMC Neurol.* – 2013. – T. 13 – 178c.
90. Long, M. miR-92b-3p acts as a tumor suppressor by targeting Gabra3 in pancreatic cancer. / M. Long, M. Zhan, S. Xu, R. Yang, W. Chen, S. Zhang, Y. Shi, Q. He, M. Mohan, Q. Liu, J. Wang // *Mol. Cancer* – 2017. – T. 16 – № 1 – 167c.
91. Lopez-Ramirez, M.A. Regulation of brain endothelial barrier function by microRNAs in health and neuroinflammation / M. A. Lopez-Ramirez, A. Reijerkerk, H. E. de Vries, I. A. Romero // *FASEB J.* – 2016. – 1–11c.
92. Lou, Y.L. miR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia / Y. L. Lou, F. Guo, F. Liu, F. L. Gao, P. Q. Zhang, X. Niu, S. C.

- Guo, J. H. Yin, Y. Wang, Z. F. Deng // *Mol Cell Biochem* – 2012. – T. 370 – № 1–2 – 45–51c.
93. Lu, X.-C.M. Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion. / X.-C. M. Lu, A. J. Williams, C. Yao, R. Berti, J. A. Hartings, R. Whipple, M. T. Vahey, R. G. Polavarapu, K. L. Woller, F. C. Tortella, J. R. Dave // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – T. 77 – № 6 – 843–57c.
94. Lund, E. Nuclear export of microRNA precursors / E. Lund, S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, U. Kutay // *Science (80-. )*. – 2004. – T. 303 – № 5654 – 95–98c.
95. Maciejak, A. miR-22-5p revealed as a potential biomarker involved in the acute phase of myocardial infarction via profiling of circulating microRNAs / A. Maciejak, M. Kiliszek, G. Opolski, A. Segiet, K. Matlak, S. Dobrzycki, D. Tulacz, G. Sygitowicz, B. Burzynska, M. Gora // *Mol. Med. Rep.* – 2016. – T. 14 – № 3 – 2867–2875c.
96. Malik, R. Multilocus genetic risk score associates with ischemic stroke in case-control and prospective cohort studies. / R. Malik, S. Bevan, M. A. Nalls, E. G. Holliday, W. J. Devan, Y.-C. Cheng, C. A. Ibrahim-Verbaas, B. F. J. Verhaaren, J. C. Bis, A. Y. Joon, A. L. de Stefano, M. Fornage, B. M. Psaty, M. A. Ikram, L. J. Launer, C. M. van Duijn, P. Sharma, B. D. Mitchell, J. Rosand, J. F. Meschia, C. Levi, P. M. Rothwell, C. Sudlow, H. S. Markus, S. Seshadri, M. Dichgans, Wellcome Trust Case Control Consortium 2 // *Stroke* – 2014. – T. 45 – № 2 – 394–402c.
97. Marabita, F. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. / F. Marabita, P. de Candia, A. Torri, J. Tegnér, S. Abrignani, R. L. Rossi, J. Tegnér, S. Abrignani, R. L. Rossi // *Brief. Bioinform.* – 2016. – T. 17 – № 2 – 204–12c.
98. Martin, H.G.S. Blocking the deadly effects of the NMDA receptor in stroke. / H. G. S. Martin, Y. T. Wang // *Cell* – 2010. – T. 140 – № 2 – 174–6c.
99. Mellios, N. A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex / N. Mellios, H. S. Huang, A. Grigorenko, E. Rogaev, S. Akbarian // *Hum Mol Genet* – 2008. – T. 17 – № 19 – 3030–3042c.

100. Mick, E. Stroke and Circulating Extracellular RNAs. / E. Mick, R. Shah, K. Tanriverdi, V. Murthy, M. Gerstein, J. Rozowsky, R. Kitchen, M. G. Larson, D. Levy, J. E. Freedman // *Stroke* – 2017. – Т. 48 – № 4 – 828–834с.
101. Mitchell, P.S. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. / P. S. Mitchell, R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogossova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O’Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin, M. Tewari // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – Т. 105 – № 30 – 10513–8с.
102. Morin, R.D. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells / R. D. Morin, M. D. O’Connor, M. Griffith, F. Kuchenbauer, A. Delaney, A. L. Prabhu, Y. Zhao, H. McDonald, T. Zeng, M. Hirst, C. J. Eaves, M. A. Marra // *Genome Res* – 2008. – Т. 18 – № 4 – 610–621с.
103. Mraz, M. MicroRNA-650 expression is influenced by immunoglobulin gene rearrangement and affects the biology of chronic lymphocytic leukemia / M. Mraz, D. Dolezalova, K. Plevova, K. Stano Kozubik, V. Mayerova, K. Cerna, K. Musilova, B. Tichy, S. Pavlova, M. Borsky, J. Verner, M. Doubek, Y. Brychtova, M. Trbusek, A. Hampl, J. Mayer, S. Pospisilova // *Blood* – 2012. – Т. 119 – № 9 – 2110–2113с.
104. National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals / National Research Council – Washington: National Academies Press, 2010. Вып. 8–220с.
105. NIND NIH Stroke Scale [Электронный ресурс]. URL: [https://www.ninds.nih.gov/sites/default/files/NIH\\_Stroke\\_Scale.pdf](https://www.ninds.nih.gov/sites/default/files/NIH_Stroke_Scale.pdf).
106. Northington, F.J. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia / F. J. Northington, R. Chavez-Valdez, L. J. Martin // *Ann Neurol* – 2011. – Т. 69 – № 5 – 743–758с.
107. Ouyang, Y.-B. MicroRNAs affect BCL-2 family proteins in the setting of cerebral ischemia. / Y.-B. Ouyang, R. G. Giffard // *Neurochem. Int.* – 2014. – Т. 77 – 2–8с.
108. Paik, N.-J. Role of GABA plasticity in stroke recovery. / N.-J. Paik, E. Yang // *Neural Regen. Res.* – 2014. – Т. 9 – № 23 – 2026–8с.

109. Pantano, L. SeqBuster, a bioinformatic tool for the processing and analysis of small RNAs datasets, reveals ubiquitous miRNA modifications in human embryonic cells / L. Pantano, X. Estivill, E. Marti // *Nucleic Acids Res* – 2010. – Т. 38 – № 5 – e34c.
110. Parfenov, V.A. The acute period of ischemic stroke: diagnosis and treatment / V. A. Parfenov // *Neurol. neuropsychiatry, Psychosom.* – 2009. – № 1 – 5с.
111. Pasquinelli, A.E. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA / A. E. Pasquinelli, B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson, G. Ruvkun // *Nature* – 2000. – Т. 408 – № 6808 – 86–89с.
112. Place, R.F. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences / R. F. Place, L.-C. C. Li, D. Pookot, E. J. Noonan, R. Dahiya // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2008. – Т. 105 – № 5 – 1608–1613с.
113. Polster, B.M. AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a “complex” problem. / B. M. Polster // *Neurochem. Int.* – 2013. – Т. 62 – № 5 – 695–702с.
114. Portnoy, V. Small RNA and transcriptional upregulation. / V. Portnoy, V. Huang, R. F. Place, L.-C. C. Li // *Wiley Interdiscip Rev RNA* – 2011. – Т. 2 – № 5 – 748–760с.
115. Qiagen RNeasy MinElute Cleanup Handbook [Электронный ресурс]. URL: <https://www.qiagen.com/ru/resources/resourcedetail?id=06f3d3ff-5926-4915-bffe-4adcf99266aa&lang=en> (дата обращения: 10.12.2018).
116. Qiagen miRNeasy Micro Handbook [Электронный ресурс]. URL: <https://www.qiagen.com/ru/resources/resourcedetail?id=9dfe7ebc-45a2-4b1e-9ea3-d7c5ac264e00&lang=en> (дата обращения: 12.10.2018).
117. Qiagen microRNA Sample and Assay Technologies [Электронный ресурс]. URL: <https://www.qiagen.com/ru/resources/resourcedetail?id=b2adf4f8-b344-46cb-958c-e88848c7d3dc&lang=en> (дата обращения: 12.10.2018).
118. Qiagen miRNeasy Mini Handbook [Электронный ресурс]. URL: <https://www.qiagen.com/ru/resources/resourcedetail?id=632801fb-abc5-4e62-b954-ff51f126a34f&lang=en> (дата обращения: 10.12.2018).

119. Qiagen miRNeasy Serum / Plasma Handbook [Электронный ресурс]. URL: <https://www.qiagen.com/ru/resources/resourcedetail?id=710c0168-e408-408b-95af-91df5b5b1dd6&lang=en> (дата обращения: 12.10.2018).
120. R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.r-project.org/> (дата обращения: 10.12.2018).
121. Rao, Y.S. MicroRNAs in the aging female brain: a putative mechanism for age-specific estrogen effects. / Y. S. Rao, N. N. Mott, Y. Wang, W. C. J. Chung, T. R. Pak // *Endocrinology* – 2013. – Т. 154 – № 8 – 2795–806с.
122. Reinhart, B.J. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* / B. J. Reinhart, F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz, G. Ruvkun // *Nature* – 2000. – Т. 403 – № 6772 – 901–906с.
123. Rink, C. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology. / C. Rink, S. Khanna // *Physiol. Genomics* – 2011. – Т. 43 – № 10 – 521–8с.
124. Ruby, J.G. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing / J. G. Ruby, C. H. Jan, D. P. Bartel // *Nature* – 2007. – Т. 448 – № 7149 – 83–86с.
125. Sattler, R. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. / R. Sattler, M. Tymianski // *J. Mol. Med. (Berl)*. – 2000. – Т. 78 – № 1 – 3–13с.
126. Scherrer, N. MicroRNA 150-5p Improves Risk Classification for Mortality within 90 Days after Acute Ischemic Stroke. / N. Scherrer, F. Fays, B. Mueller, A. Luft, F. Fluri, M. Christ-Crain, Y. Devaux, M. Katan // *J. stroke* – 2017. – Т. 19 – № 3 – 323–332с.
127. Selvamani, A. An Antagomir to MicroRNA Let7f Promotes Neuroprotection in an Ischemic Stroke Model / A. Selvamani, P. Sathyan, R. C. Miranda, F. Sohrabji // *PLoS One* – 2012. – Т. 7 – № 2 – e32662с.
128. Sepramaniam, S. Circulating microRNAs as biomarkers of acute stroke. / S. Sepramaniam, J.-R. Tan, K.-S. Tan, D. A. DeSilva, S. Tavintharan, F.-P. Woon, C.-W. Wang, F.-L. Yong, D.-S. Karolina, P. Kaur, F.-J. Liu, K.-Y. Lim, A. Armugam, K. Jeyaseelan // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Т. 15 – № 1 – 1418–32с.

129. Sheinerman, K.S. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. / K. S. Sheinerman, S. R. Umansky // *Front. Cell. Neurosci.* – 2013. – Т. 7 – № September – 150с.
130. Shi, G. Upregulated miR-29b promotes neuronal cell death by inhibiting Bcl2L2 after ischemic brain injury. / G. Shi, Y. Liu, T. Liu, W. Yan, X. Liu, Y. Wang, J. Shi, L. Jia // *Exp. brain Res.* – 2012. – Т. 216 – № 2 – 225–30с.
131. Stankovic, S. Genetic aspects of ischemic stroke: coagulation, homocysteine, and lipoprotein metabolism as potential risk factors / S. Stankovic, N. Majkic-Singh // *Crit Rev Clin Lab Sci* – 2010. – Т. 47 – № 2 – 72–123с.
132. Sullivan, J.M. BRAIN ISCHEMIA 101 [Электронный ресурс]. URL: <http://sullydog.com/sullysites/qm/brainischemia101syllabus/index.htm>.
133. Tan, J.R. microRNAs in stroke pathogenesis. / J. R. Tan, Y. X. Koo, P. Kaur, F. Liu, A. Armugam, P. T.-H. Wong, K. Jeyaseelan // *Curr. Mol. Med.* – 2011. – Т. 11 – № 2 – 76–92с.
134. Tan, K.S. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients. / K. S. Tan, A. Armugam, S. Sepramaniam, K. Y. Lim, K. D. Setyowati, C. W. Wang, K. Jeyaseelan // *PLoS One* – 2009. – Т. 4 – № 11 – e7689с.
135. Tan, Y. Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells / Y. Tan, B. Zhang, T. Wu, G. Skogerbo, X. Zhu, X. Guo, S. He, R. Chen, G. Skogerbo, X. Zhu, X. Guo, S. He, R. Chen // *BMC Mol. Biol.* – 2009. – Т. 10 – № 1 – 12с.
136. Tao, Z. Neuroprotective effect of microRNA-99a against focal cerebral ischemia–reperfusion injury in mice / Z. Tao, H. Zhao, R. Wang, P. Liu, F. Yan, C. Zhang, X. Ji, Y. Luo // *J. Neurol. Sci.* – 2015. – Т. 355 – № 1–2 – 113–119с.
137. Thal, S.E. Role of apoptosis inducing factor (AIF) for hippocampal neuronal cell death following global cerebral ischemia in mice / S. E. Thal, C. Zhu, S. C. Thal, K. Blomgren, N. Plesnila // *Neurosci. Lett.* – 2011. – Т. 499 – № 1 – 1–3с.
138. Traylor, M. Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies. /

- M. Traylor, M. Farrall, E. G. Holliday, International Stroke Genetics Consortium // *Lancet. Neurol.* – 2012. – T. 11 – № 11 – 951–62c.
139. Tu, W. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. / W. Tu, X. Xu, L. Peng, X. Zhong, W. Zhang, M. M. Soundarapandian, C. Balel, M. Wang, N. Jia, W. Zhang, F. Lew, S. L. Chan, Y. Chen, Y. Lu // *Cell* – 2010. – T. 140 – № 2 – 222–34c.
140. Urbich, C. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis / C. Urbich, A. Kuehbacher, S. Dimmeler // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – T. 79 – № 4 – 581–588c.
141. Vandesompele, J. Elimination of Primer–Dimer Artifacts and Genomic Coamplification Using a Two-Step SYBR Green I Real-Time RT-PCR / J. Vandesompele, A. De Paepe, F. Speleman, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, S. Jeffrey, M. Van de Rijn, M. Waltham // *Anal. Biochem.* – 2002. – T. 303 – № 1 – 95–98c.
142. Vasudevan, S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs / S. Vasudevan // *Wiley Interdiscip Rev RNA* – 2012. – T. 3 – № 3 – 311–330c.
143. Volvert, M.-L. MicroRNAs tune cerebral cortical neurogenesis. / M.-L. Volvert, F. Rogister, G. Moonen, B. Malgrange, L. Nguyen // *Cell Death Differ.* – 2012. – T. 19 – № 10 – 1573–81c.
144. Wang, X. Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury / X. Wang, Y. Carlsson, E. Basso, C. Zhu, C. I. Rousset, A. Rasola, B. R. Johansson, K. Blomgren, C. Mallard, P. Bernardi, M. A. Forte, H. Hagberg // *J Neurosci* – 2009. – T. 29 – № 8 – 2588–96c.
145. Wang, Y.Y. MicroRNA-29b is a therapeutic target in cerebral ischemia associated with aquaporin 4. / Y. Y. Wang, J. Huang, Y. Ma, G. Tang, Y. Liu, X. Chen, Z. Zhang, L. Zeng, Y. Y. Wang, Y.-B. Ouyang, G.-Y. Yang // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2015. – T. 35 – № 12 – 1977–84c.
146. Watson, B.D. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. / B. D. Watson, W. D. Dietrich, R. Busto, M. S. Wachtel, M. D. Ginsberg // *Ann. Neurol.* – 1985. – T. 17 – № 5 – 497–504c.

147. West, T. Caspase-3 deficiency during development increases vulnerability to hypoxic-ischemic injury through caspase-3-independent pathways. / T. West, M. Atzeva, D. M. Holtzman // *Neurobiol. Dis.* – 2006. – Т. 22 – № 3 – 523–37с.
148. White, B.C. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury / B. C. White, J. M. Sullivan, D. J. DeGracia, B. J. O’Neil, R. W. Neumar, L. I. Grossman, J. A. Rafols, G. S. Krause // *J Neurol Sci* – 2000. – Т. 179 – № S 1-2 – 1–33с.
149. WHO The top 10 causes of death. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (дата обращения: 01.01.2017).
150. Winter, J. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. / J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, S. Diederichs // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – Т. 11 – № 3 – 228–34с.
151. Wyman, S.K. Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity / S. K. Wyman, E. C. Knouf, R. K. Parkin, B. R. Fritz, D. W. Lin, L. M. Dennis, M. A. Krouse, P. J. Webster, M. Tewari // *Genome Res* – 2011. – Т. 21 – № 9 – 1450–1461с.
152. Yang, J.-S. Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants / J.-S. Yang, E. C. Lai // *Mol. Cell* – 2011. – Т. 43 – № 6 – 892–903с.
153. Yi, R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs / R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, B. R. Cullen // *Genes Dev* – 2003. – Т. 17 – № 24 – 3011–3016с.
154. Yin, K.-J. miR-497 regulates neuronal death in mouse brain after transient focal cerebral ischemia. / K.-J. Yin, Z. Deng, H. Huang, M. Hamblin, C. Xie, J. Zhang, Y. E. Chen // *Neurobiol. Dis.* – 2010. – Т. 38 – № 1 – 17–26с.
155. Yin, K.J. Peroxisome proliferator-activated receptor delta regulation of miR-15a in ischemia-induced cerebral vascular endothelial injury / K. J. Yin, Z. Deng, M. Hamblin, Y. Xiang, H. Huang, J. Zhang, X. Jiang, Y. Wang, Y. E. Chen // *J Neurosci* – 2010. – Т. 30 – № 18 – 6398–6408с.
156. Yu, H. Neuroprotective Effects of Viral Overexpression of microRNA-22 in Rat

- and Cell Models of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury / H. Yu, M. Wu, P. Zhao, Y. Huang, W. Wang, W. Yin // *J. Cell. Biochem.* – 2015. – T. 116 – № 2 – 233–241c.
157. Yuan, Y. MicroRNA expression changes in the hippocampi of rats subjected to global ischemia. / Y. Yuan, J. Y. Wang, L. Y. Xu, R. Cai, Z. Chen, B. Y. Luo // *J. Clin. Neurosci.* – 2010. – T. 17 – № 6 – 774–8c.
158. Zhao, H. MicroRNA-23a-3p attenuates oxidative stress injury in a mouse model of focal cerebral ischemia-reperfusion. / H. Zhao, Z. Tao, R. Wang, P. Liu, F. Yan, J. Li, C. Zhang, X. Ji, Y. Luo // *Brain Res.* – 2014. – T. 1592 – 65–72c.
159. Zhao, H. MiRNA-424 protects against permanent focal cerebral ischemia injury in mice involving suppressing microglia activation. / H. Zhao, J. Wang, L. Gao, R. Wang, X. Liu, Z. Gao, Z. Tao, C. Xu, J. Song, X. Ji, Y. Luo // *Stroke.* – 2013. – T. 44 – № 6 – 1706–13c.
160. Zhao MicroRNA-99a-5p in circulating immune cells as a potential biomarker for the early diagnosis of ischemic stroke / Zhao, G. Li, Q. Ma, Z. Tao, R. Wang, Z. Fan, Y. Feng, X. Ji, Y. Luo // *Brain Circ.* – 2017. – T. 3 – № 1 – 21c.
161. Zhong, H. Direct Comparison of GAPDH,  $\beta$ -Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia / H. Zhong, J. W. Simons // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. – T. 259 – № 3 – 523–526c.
162. Zhou, J. Identification of miRNA-21 and miRNA-24 in plasma as potential early stage markers of acute cerebral infarction / J. Zhou, J. ZHANG // *Mol Med Rep* – 2014. – T. 10 – № 2 – 971–976c.
163. Ziu, M. Temporal Differences in MicroRNA Expression Patterns in Astrocytes and Neurons after Ischemic Injury / M. Ziu, L. Fletcher, S. Rana, D. F. Jimenez, M. Digicaylioglu // *PLoS One* – 2011. – T. 6 – № 2 – e14724c.