

На правах рукописи

ЖАНИН ИЛЬЯ СЕРГЕЕВИЧ

**ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ микроРНК И ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ
ПРИ НАРУШЕНИЯХ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ И КЛИНИКЕ**

03.02.07 – Генетика

14.03.03 – Патологическая физиология

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре медицинской генетики лечебного факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Асанов Алий Юрьевич

доктор медицинских наук, профессор

Пинелис Всеволод Григорьевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Кучеряну Валериян Григорьевич

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», лаборатория общей патологии нервной системы, главный научный сотрудник

доктор медицинских наук, профессор

Полоников Алексей Валерьевич

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биологии, медицинской генетики и экологии; директор научно-исследовательского института генетической и молекулярной эпидемиологии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 года в ____ час на заседании Диссертационного совета Д.208.072.16 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации» по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1 и на сайте <http://rsmu.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент

Ларина Вера Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одной из ведущих причин смерти в мире является инсульт – острое нарушение мозгового кровообращения. По данным ВОЗ 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 (WHO, 2017). По данным Министерства здравоохранения Российской Федерации за 2017 год в России перенесли инсульт 360 тысяч человек (МинЗдрав РФ, Заболеваемость всего населения России, 2017, с. 81).

Наиболее часто встречаемым видом инсульта является ишемический инсульт (ИИ) или ишемия головного мозга; она составляет 70-85% от общего числа инсультов. ИИ – 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 (Стаховская *и др.*, 2013).

Ранее для изучения генетических механизмов различных патологий (в том числе и ишемического инсульта) в основном использовали олиго- или кДНК-микрочипы. С их помощью можно 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. 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, что 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 (Mitchell *et al.*, 2008).

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. Было показано, что мкРНК играют существенную роль в различных нейробиологических процессах, таких как нейрогенез, рост нейритов, а также синаптогенез (Volvvert *et al.*, 2012). К настоящему моменту известно несколько мкРНК, специфичных для ишемического инсульта. Они влияют на патогенетические факторы и в перспективе могут использоваться в прогнозировании исхода или даже терапии заболевания (Zhao *et al.*, 2013). В ряде работ была найдена корреляция между уровнем экспрессии мкРНК (miR-296-5p, let-7e-3p) и риском артериальной гипертензии – одной из причин инсульта (Li *et al.*, 2014). 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 δ для miR-15a-3p или антагомиров для miR-497-5p), в результате, происходило сокращение зоны инфаркта и снижение неврологического дефицита (Rink and Khanna, 2011).

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 (Zhao *et al.*, 2013).

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 ложноперированными животными. Была обнаружена корреляция между значениями экспрессии 5 мкРНК в мозге и крови экспериментальных животных. Впервые было выявлено, что по сравнению с ложноперированными (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, miR-23a-3p, miR-223-3p и miR-99a-5p в плазме крови наблюдаемых пациентов указывает на потенциальную диагностическую и прогностическую 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.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

03.02.07 – Генетика (медицинские науки), охватывающей проблемы изменчивости и наследственности, закономерности процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях в области «Генетика человека. Медицинская генетика».

14.03.03 – Патологическая физиология (медицинские науки), специальность, занимающаяся изучением причин возникновения, механизмов развития и исходов патологических процессов. Специальность отличается тем, что ее основными методами являются эксперименты на животных, результаты которых могут быть экстраполированы на клинику, а также клинично-инструментальные и лабораторные исследования при различных заболеваниях человека. Значение решения научных и технических проблем

данной специальности для народного хозяйства состоит в исследовании ранее неизвестных закономерностей функционирования организма, его органов и систем в условиях болезни и разработке принципов новых эффективных методов лечения заболеваний. «Изучение механизмов, лежащих в основе различных исходов и осложнений болезни; анализ причин развития неполного выздоровления и формирования на этой основе последующего состояния предболезни.

Апробация результатов

Основные результаты работы представлены на I Национальном Конгрессе по регенеративной медицине, Москва, 2013; Международной конференции «RNA UK 2014», на Уиндере, 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.

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 обратную 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.

Реализация и внедрение полученных результатов в практику

Результаты проведенных исследований внедрены в практику работы лаборатории нейробиологии и основ развития мозга ФГАОУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, а также используются в учебном процессе кафедры медицинской генетики лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Исследование проводилось в 2 этапа: в эксперименте при моделировании фокальной ишемии у крыс, и в клинике, у больных с ИИ. На первом этапе моделировали фокальную ишемию на лабораторных животных (крысы), 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 пометов ($n = 22$) распределяли по трем группам случайным образом так, чтобы в каждой группе были особи разных полов. Первую группу составили животные с фокальной ишемией мозга через 24 часа после воздействия ($n = 10$). Во вторую группу вошли животные с ишемией мозга через 48 часов после воздействия ($n = 6$). Третью группу составили ложнооперированные животные – группа контроля ($n = 6$). Односторонний фокальный ишемический инфаркт сенсомоторной области коры головного мозга крыс создавали методом фотохимически индуцированного тромбоза согласно методике, описанной Ватсоном с соавторами (Watson *et al.*, 1985).

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 1). 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 (National Research Council, 2010).

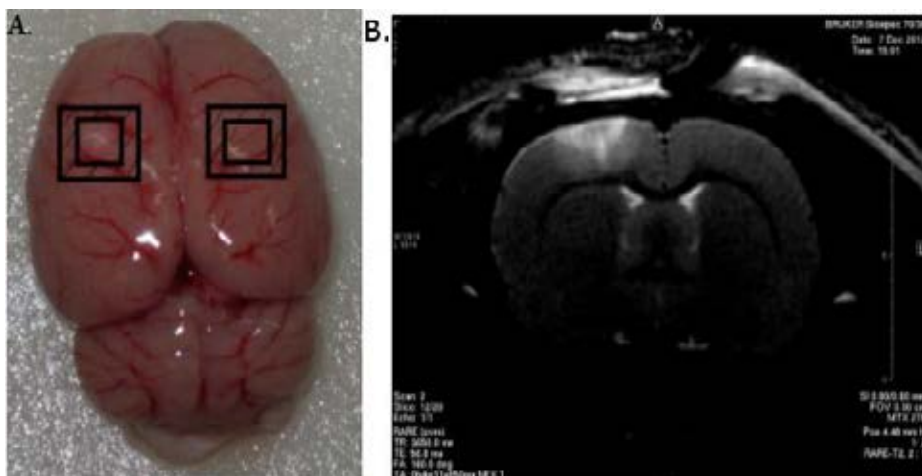


Рисунок 1. Оценка ишемического повреждения мозга у экспериментальных животных. а – Макроскопическая визуализация очага в левом полушарии и соответствующего участка в правом контралатеральном полушарии (участки выделены квадратами). б – Магниторезонансная томография (МРТ) головного мозга крысы с видимым очагом ишемического повреждения (светлая зона) в левом полушарии.

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 NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 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 до последующего выделения РНК.

Выделение тотальной РНК из крови и биоптатов мозга крыс проводили с использованием набора miRNeasy Micro Kit (QIAGEN, Германия), а мкРНК из плазмы при помощи набора miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. При выделении мкРНК из плазмы крови после этапа денатурации добавляли 7 мкл cel-miR-39 (рабочая концентрация 1,6 x 10⁸ копий/мкл) в качестве экзогенного контроля. Измерение концентрации и чистоты полученной РНК проводилось на спектрофотометре NanoVue Plus (GE Healthcare).

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) (NIND, 2016). Это балльный показатель неврологических расстройств, где 0 баллов считается 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. Выделение мкРНК из плазмы проводилось аналогичным образом, как и в эксперименте с лабораторными животными. 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.

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 (Griffiths-Jones *et al.*, 2006; Dweer and Gretz, 2015). 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.

Метод обратной транскрипции (ОТ) использовали для образования кДНК на матрице мкРНК и мРНК. В соответствии с инструкцией фирмы-производителя, для проведения ОТ мкРНК применяли набор miScript II RT Kit, а для мРНК использовали смесь, состоящую из фермента обратной транскриптазы M-MLV (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega), dNTP и 6-членных random-праймеров.

Для определения экспрессии мкРНК и генов-мишеней проводили количественную ПЦР в реальном времени. кДНК смешивалась в определённой пропорции с буферным раствором, содержащим краситель Sybr Green, прямым и обратным праймером, полимеразой и доводилось водой без нуклеаз до объема 25 мкл. 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 малые ядрышковые РНК – SNORD61, SNORD72. В качестве контроля для анализа экспрессии мкРНК в плазме служила искусственная мкРНК – cel-miR-39. Эндогенными контролями для определения экспрессии генов-мишеней служили *GAPDH* и *ACTB*.

Статистический анализ и визуализация полученных данных проводились в среде программирования R (R Core Team, 2018) и программе cluster 3.0 (de Hoon *et al.*, 2004). Для определения формы распределения данных был применен тест Шапира-Уилка. 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. 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.

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.

Результаты и их обсуждение

Согласно рекомендациям, предложенными Марабита с соавторами (Marabita *et al.*, 2016) осуществлялся поиск стабильных мкРНК и генов-мишеней для последующего определения нормированного значения относительной экспрессии. В исследовании экспрессии мкРНК в биоптате и крови крыс наиболее стабильной оказался SNORD61. В связи с тем, что SNORD72 показал большую нестабильность от него решено было отказаться в качестве контроля. В исследовании генной экспрессии 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 (Zhong and Simons, 1999), поэтому было решено нормировать экспрессию мРНК только на *ACTB*.

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

В этом исследовании было впервые выявлено, что по сравнению с ложнопериорированными (контрольными) животными уровни экспрессии мкРНК изменяются не только в ишемизированном полушарии, но и в интактном. Сравнительный

анализ экспрессии мкРНК в коре левого (ишемизированного) полушария головного мозга крыс показал, что в группах экспериментальных животных статистически значимо отличались 3 мкРНК через 24 часа после ишемии (*let-7f-5p*, *miR-27a-5p* и *miR-21-5p*) и 34 мкРНК через 48 часов после ишемии (*miR-30c-2-3p*, *miR-125b-5p*, *miR-300-5p*, *miR-107-3p*, *miR-497-5p*, *miR-27a-3p*, *miR-30b-3p*, *miR-29c-3p*, *miR-124-3p*, *miR-330-5p*, *miR-181b-5p*, *miR-29a-3p*, *let-7i-3p*, *miR-22-3p*, *let-7i-5p*, *miR-212-3p*, *miR-26-a5p*, *miR-99a-3p*, *miR-221-3p*, *miR-27b-3p*, *miR-24-3p*, *miR-22-5p*, *miR-29a-5p*, *miR-186-5p*, *miR-99a-5p*, *miR-128-3p*, *miR-23a-3p*, *miR-376b-5p*, *miR-30c-5p*, *miR-9a-5p*, *let-7f-5p*, *miR-30a-3p*, *miR-21-5p*, *miR-223-3p*). Сравнительный анализ экспрессии мкРНК в ткани правого (не ишемизированного) полушария головного мозга крыс также показал статистически значимое изменение экспрессии 4 мкРНК через 24 часа после ишемии (*miR-200b-3p*, *miR-181b-5p*, *let-7f-5p* и *miR-27a-5p*) и 38 через 48 часов после ишемии (*miR-124-3p*, *miR-29c-3p*, *miR-29c-5p*, *let-7i-3p*, *let-7i-5p*, *miR-181b-5p*, *miR-330-5p*, *miR-99a-5p*, *let-7f-5p*, *miR-107-3p*, *miR-21-5p*, *miR-27a-3p*, *miR-129-5p*, *miR-186-5p*, *miR-22-3p*, *miR-300-5p*, *miR-27a-5p*, *miR-300-5p*, *miR-29a-3p*, *miR-551b-3p*, *miR-212-3p*, *miR-24-3p*, *miR-27b-3p*, *miR-138-5p*, *miR-26a-5p*, *miR-29a-5p*, *miR-9a-5p*, *miR-30a-5p*, *miR-125b-5p*, *miR-22-5p*, *miR-23a-3p*, *miR-30c-5p*, *miR-376b-5p*, *miR-497-5p*, *miR-376b-5p*, *miR-128-3p*).

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 2). Образцы ткани ложнопериоперированных 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. 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 (Di *et al.*, 2014). Различия в уровнях и направленности экспрессии некоторых мкРНК могут быть следствием использования разных моделей ишемии и иных технологических подходов для оценки экспрессии мкРНК.

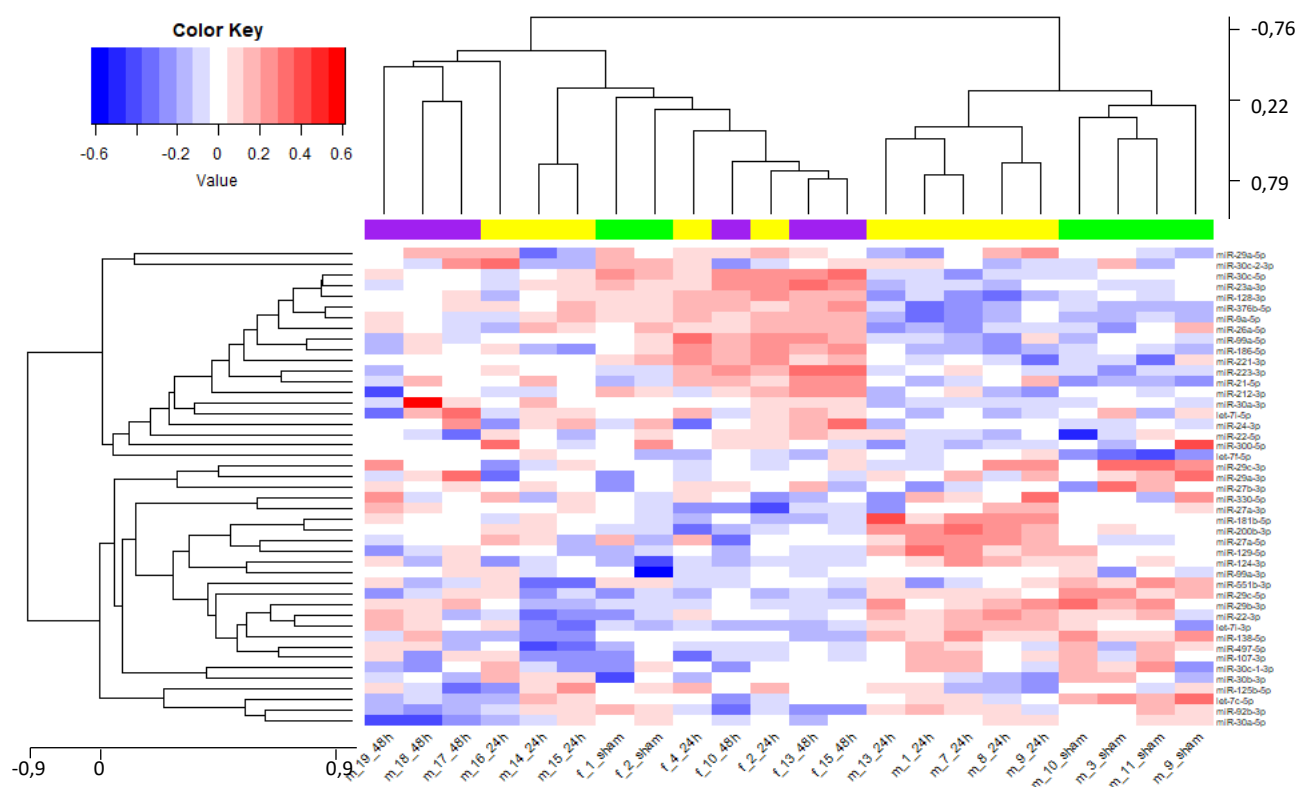


Рисунок 2. Сравнительный анализ экспрессии мкРНК в зоне пенумбра левого полушария головного мозга крыс в остром периоде ишемического инсульта 24 и 48 часов, а также контрольной выборки. Названия мкРНК указаны справа. Идентификатор каждой крысы указан внизу, первая буква обозначает пол (f – самки, m – 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.

Дифференциальная экспрессия мкРНК в 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. По уровню экспрессии в лейкоцитах крови достоверные отличия

зарегистрированы только для miR-497-5p через 24 часа после ишемии (КИ = 1,768; $p = 0,034$) – рисунок 3.

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 1).

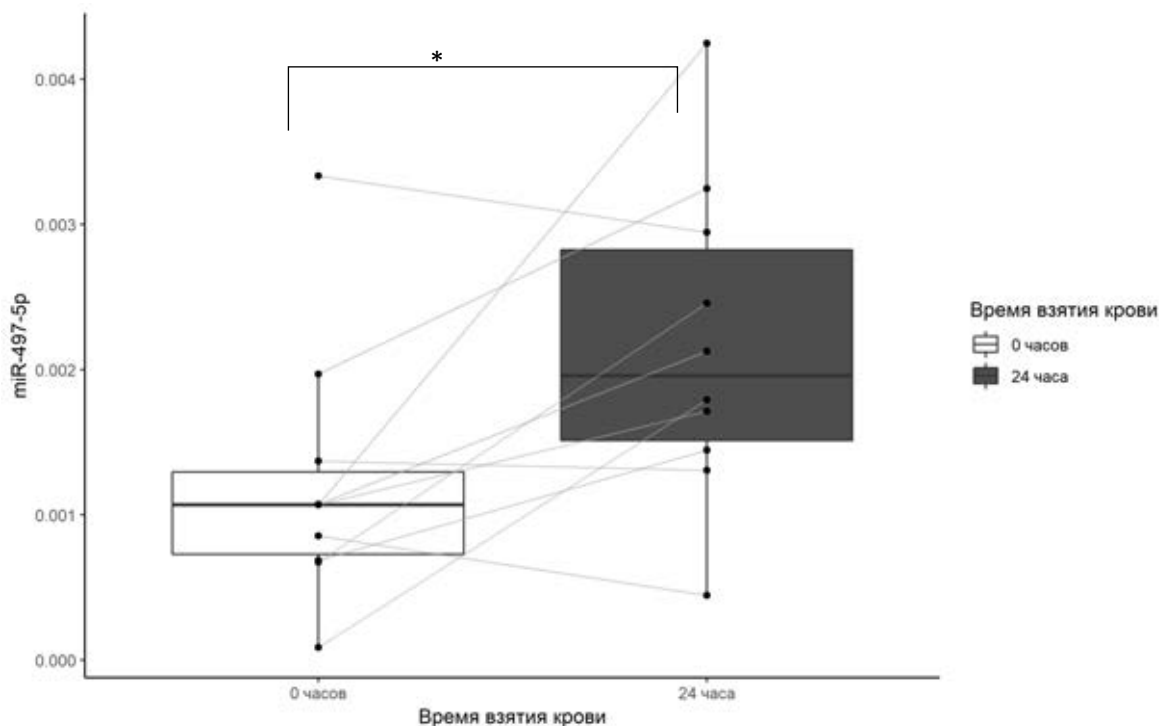


Рисунок 3. Уровни нормированной SNORD61 экспрессии мкРНК miR-497-5p, выделенной из лейкоцитов периферической крови крыс до фотохимически индуцированного тромбоза (0 часов) и через 24 часа после него (24 часа). Данные представлены в виде медианы и квартилей. Точками обозначены отдельные значения мкРНК; 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.

Таблица 1. 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

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

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 4).

Через 48 часов после фотохимически индуцированного тромбоза статистически значимо уменьшилась экспрессия 13 генов (Таблица 2).

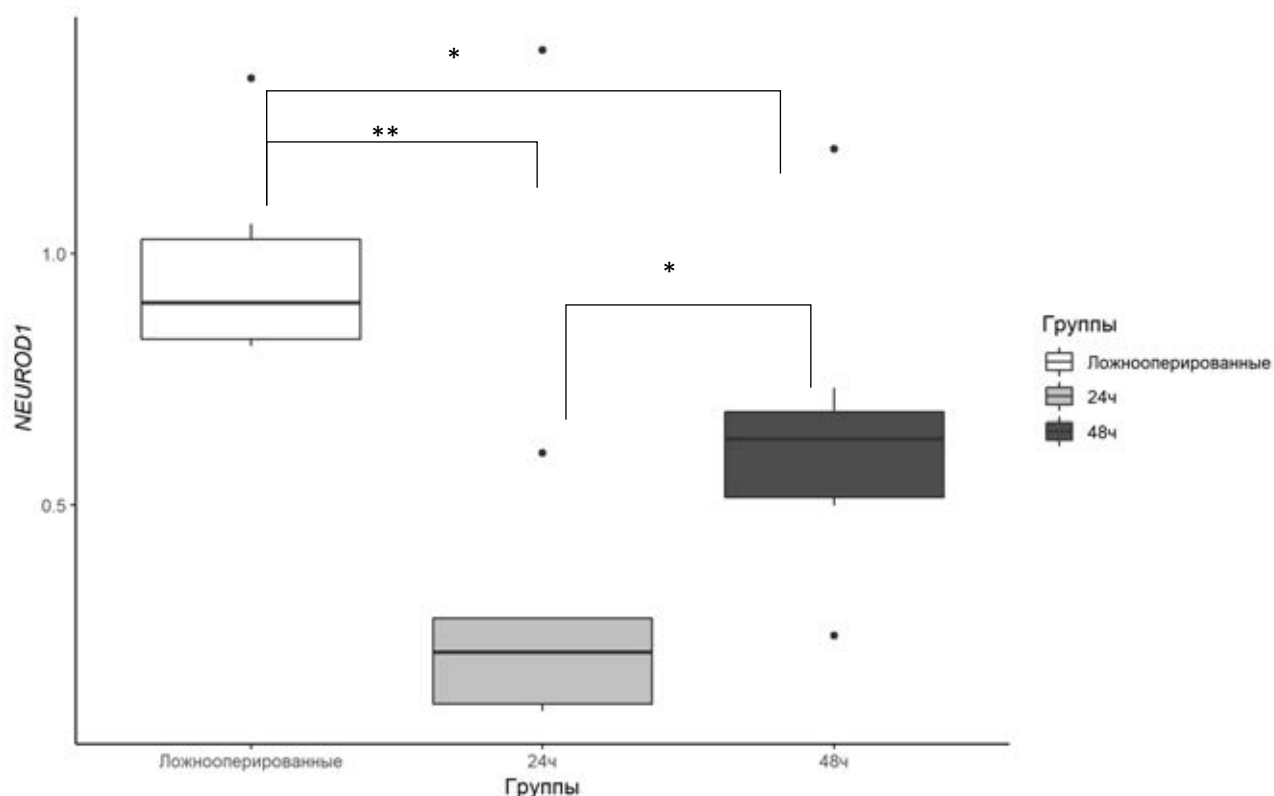


Рисунок 4. Уровни нормированной на *ACTB* экспрессии *NEUROD1*, выделенного из коры левого полушария ишемизированных крыс через 24 часа (24ч) и 48 часов (48ч), а также у ложнооперированных животных. Данные представлены в виде медианы и квартилей. Точкой обозначены выбросы – значения, которые больше 3го 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.

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 часами, только ген, кодирующий транскрипционный фактор NeuroD1 был гиперэкспрессирован. Остальные гены (*FOS*, *BCL2L2*, *TNF*, *ATOH1* и *MECP2*) были гипоекспрессированы. При этом экспрессия генов *ATOH1* и *TNF* была незначительно

повышена в биоптате мозга крыс через 24 часа после ишемии по сравнению с контрольной выборкой.

Таблица 2. 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
<i>BCL2L2</i>	0,001	0,27	<i>HES5</i>	0,020	0,38
<i>NEUROG3</i>	0,001	0,30	<i>NEUROG1</i>	0,020	0,32
<i>NEUROG2</i>	0,003	0,50	<i>ATO1</i>	0,029	0,28
<i>NFKB2</i>	0,008	0,41	<i>HIC1</i>	0,029	0,63
<i>FOS</i>	0,013	0,34	<i>NOTCH3</i>	0,029	0,60
<i>NEUROD1</i>	0,013	0,70	<i>CREB1</i>	0,043	0,83
<i>TNF</i>	0,013	0,59			

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. 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 (Culmsee *et al.*, 2005; Thal *et al.*, 2011), а также приводит к снижению уровня активных форм кислорода (Polster, 2013), с другой стороны недостаток в *AIFM1* приводит к системным метаболическим изменениям таким как ацидоз (Vano and Prehn, 2018). В нашей работе, изменение экспрессии данного гена обнаружено не было.

Анализ клинических данных

В рамках данной работы было обследовано 10 больных с острым ишемическим инсультом и 10 волонтеров. Данные клинического анализа приведены в Таблице 3. 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. 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 4). 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 3. 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 ³	5338,55	-	-
Локализация поражения (левое полушарие доля/правое полушарие)	4/6	-	-
NIHSS первые сутки (медиана)	11,5	-	-
NIHSS восьмые сутки (медиана)	9,5	-	-

Таблица 4. 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	p (Манн-Уитни тест)	Пациенты с ИИ на 8-ые сутки/ лица контрольной выборки, КИ	p (Манн-Уитни тест)	Пациенты с ИИ на 8-ые сутки/ пациенты на 1-ые сутки, КИ	p (Уил-коксон тест)
let-7i-3p	<i>0,010</i>	<i>0,024</i>	0,423	0,209	<i>40,495</i>	<i>0,018</i>
miR-22-3p	0,141	0,064	0,449	0,528	<i>3,180</i>	<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. С другой стороны, была обнаружена лишь тенденция к достоверности в экспрессии *let-7i-3p* на восьмые сутки между первой и второй группой больных ($p = 0,052$). 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. *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.

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 ($KI = 0,32$, $p = 0,058$). 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 5 А) и *miR-23a-3p* (Рисунок 5 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%.

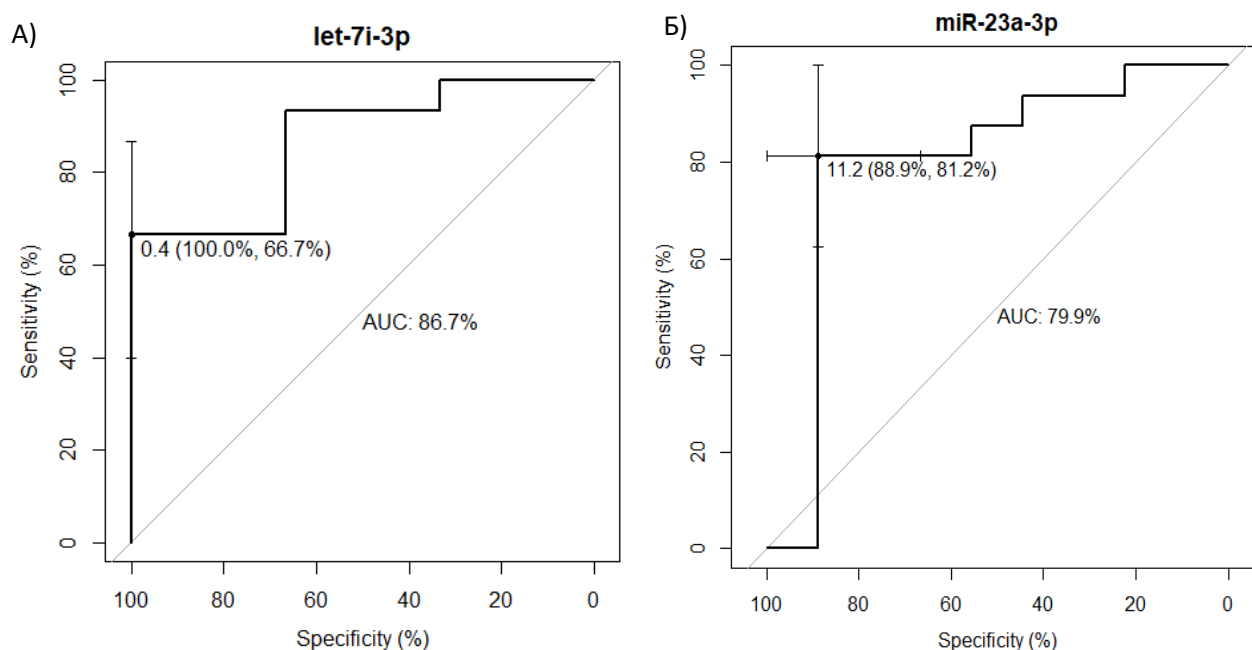


Рисунок 5. ROC кривая для оценки экспрессии let-7i-3p (А) и miR-23a-3p (Б). AUC для let-7i-3p и miR-23a-3p были 86,7% и 79,9% соответственно.

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 гипоэкспрессирован 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 гипоэкспрессированы 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 (гипоэкспрессия let-7i-3p и miR-23a-3p); у всех пациентов на восьмые сутки инсульта по сравнению с контрольной выборкой (гипоэкспрессия, 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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Жанин, И.С. Профиль экспрессии микроРНК у больных на ранних стадиях ишемического инсульта / И.С. Жанин, В.А. Гусар, А.Т. Тимофеева, В.Г. Пинелис, А.Ю. Асанов // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2018. – № 3. – С. 72-78.**
2. **Жанин, И.С. Роль микроРНК в этиологии, патогенезе, диагностике и лечении инсульта / И.С. Жанин, А.Ю. Асанов., В.Г. Пинелис // Медицинская генетика. – 2015. – № 1. – С. 3-12.**
3. **Гусар, В.А. Оценка временных паттернов экспрессии микроРНК в ткани головного мозга, плазме и лейкоцитах крови крыс в условиях фотоиндуцируемой ишемии / В.А. Гусар, А.В. Тимофеева, И.С. Жанин, С.И. Шрам, В.Г. Пинелис // Молекулярная биология. – 2017. – № 4. – С. 683-695.**
4. **Пинелис, В.Г. Сравнительный анализ профиля экспрессии мкРНК и генов-мишеней ткани мозга крыс при фокальной ишемии и в глутамат-индуцированных культивируемых нейронах гиппокампа / В.Г. Пинелис, И.С. Жанин, С.И. Шрам, В.А. Гусар, А.В. Тимофеева // Медицинская генетика. – 2015. - № 14. – С. 63-64.**
5. **Тимофеева, А.В. Дифференциальная экспрессия генов в модели ишемического повреждения нейронов in vitro / А.В. Тимофеева, В.Г. Пинелис, И.С. Жанин, М.Ю. Бобров, В.А. Гусар // Материалы конгресса I Национального Конгресса по регенеративной медицине. – 2013. – С. 246-247.**
6. **Гусар, В.А. Сравнительный анализ профиля экспрессии мкРНК и генов-мишеней ткани мозга крыс через 24 и 48 часов после начала фокальной ишемии / В.А. Гусар, А.В. Тимофеева, В.Г. Пинелис, И.С. Жанин, С.И. Шрам, А.А. Баранов // Материалы конгресса I Национального Конгресса по регенеративной медицине. – 2013. – С. 70.**
7. **Gusar, V.A. Differential miRNA expression in rat brain and blood after focal ischemia onset / V.A. Gusar, I.S. Zhanin, A.V. Timofeeva, S.I. Shram // RNA UK 2014 – 2014. – С. 18.**

8. Timofeeva, A.V. Expression profiles of miRNAs and their gene-targets at 24 h and 48 h after permanent focal cerebral ischemia onset / A.V. Timofeeva, V.A. Gusar, I.S. Zhanin, S.I. Shram // RNA UK 2014 – 2014. – С. 53.
9. Gusar, V.A. Evaluation of differential miRNA expression after permanent focal ischemia in rat brain using real-time qRT-PCR and NGS / V.A. Gusar, I.S. Zhanin, A.V. Timofeeva, S.I. Shram, A.V. Kudryavtseva, A.A. Serenko, V.G. Pinelis, M.Y Bobrov // International symposium “Human Genetics” 2014 – 2014. – С. 26.
10. Zhanin, I. S. miRNA expression profiling in cortical neurons under conditions of transient focal ischemia / I.S. Zhanin, V.A. Gusar, A.V. Timofeeva, A.Y. Asanov, S.I. Shram, N. F. Myasoedov, V.G. Pinelis // European journal of human genetics – 2013. – № Supl. 2. – С. 217-218.

Список сокращений

AIFM1 – Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial. Митохондриальный апоптоз-индуцируемый фактор 1

AUC – площадь под ROC-кривой

Bcl-2 - B-cell lymphoma 2

dNTP – дезоксинуклеозид трифосфат

ROC кривая – кривая рабочей характеристики приёмника

TNF – фактор некроза опухолей

ИИ – ишемический инсульт

ИКР – интерквартильное размах

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КИ – коэффициент изменения

мкРНК – микроРНК

мРНК – матричная РНК

ОТ – обратная транскрипция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

шкале NIHSS – шкала инсульта Национального института здоровья