

УДК 577.213/.217-092:616.12-02

Калинкин М.Н., Щеглова Н.Е.

**ОСОБЕННОСТИ АНТИАНГИОГЕННЫХ miR-221 и miR-222
У БОЛЬНЫХ С ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ
И ПОСТИНФАРКТНЫМ КАРДИОСКЛЕРОЗОМ***ГБОУ ВПО Тверская государственная медицинская академия, г. Тверь*

Резюме. Было обследовано 30 мужчин, страдающих гипертонической болезнью (ГБ), 20 мужчин, имеющих верифицированный диагноз ИБС постинфарктный кардиосклероз (ИБС ПИКС) и 15 здоровых мужчин. При изучении антиангиогенных miR-221 и miR-222 показано, что уровень экспрессии miR-221 оказался в 195 раз выше у больных ГБ и в 261 раз выше в группе ИБС ПИКС в сравнении с группой здоровых мужчин. Уровень экспрессии miR-222 оказался в 213 раз выше в группе ГБ и в 196 раз выше в группе ИБС ПИКС. Проведенное исследование подтверждает участие miR-221 и miR-222 в атерогенезе.

Ключевые слова: гипертоническая болезнь, постинфарктный кардиосклероз, микроРНК, экспрессия, атерогенез.

*Kalinkin M.N, Shcheglova N.E***FEATURES ANTIANGIOGENIC miR-221 AND miR-222 IN PATIENTS WITH HYPERTENSION
AND MYOCARDIAL INFARCTION**

Summary. The study included 30 men suffering from essential hypertension, 20 men who have the diagnosis of myocardial infarction and 15 healthy men. In the study of anti-angiogenic miR-221 and miR-222 we found that the expression level of miR-221 was in 195 times more in hypertensive patients and 261 times more in the patients with myocardial infarction than in a group of healthy men. The level of expression miR-222 was in 213 times more in a group with arterial hypertension and in 196 times more in a group with myocardial infarction. This study confirms the role miR-221 and miR-222 in atherogenesis.

Key words: essential hypertension, myocardial infarction, microRNA, expression, atherogenesis.

Введение. В последнее время все более пристальное внимание уделяется вопросам, связанным с участием в биологических и патологических процессах микроРибонуклеиновых кислот (микроРНК) – малых некодирующих молекул рибонуклеиновых кислот (РНК), обычно имеющих длину 19-24 нуклеотида, образуемых из более длинных РНК-предшественников и имеющих специфическую шпилечную структуру [12]. Так, предполагается, что мутации, поражающие микроРНК, могут играть существенную патогенетическую роль в болезнях человека [8, 10, 13].

Согласно данным литературы, нарушение функционирования определенных микроРНК может способствовать развитию сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, ишемической болезни сердца (ИБС), атеросклероза, постинфарктного ремоделирования миокарда, хронической сердечной недостаточности и сократительной дисфункции сердца [3]. При этом по механизму действия микроРНК могут быть разделены на проангиогенные микроРНК, запускающие ангиогенез, и антиангиогенные микроРНК, подавляющие его [13].

Объектом настоящего исследования явились антиангиогенные микроРНК, в частности miR-221 и miR-222, в условиях выраженного атерогенеза. Результаты подобных исследований в литературе отсутствуют. В тоже время известно, что miR-221/222 блокируют пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез, связываясь с 3'-UTR гена c-Kit и снижая его экспрессию. Ген c-Kit является важным звеном в регуляции ангиогенеза и восстановлении сосудистой стенки. Также они ингибируют формирование, миграцию и заживление ран *in vitro*, опосредованно уменьшают уровень экспрессии эндотелиальной NO-синтазы [1, 13].

Цель исследования – изучение экспрессии miR-221 и miR-222 у больных с гипертонической болезнью (ГБ) и ИБС постинфарктным кардиосклерозом (ИБС ПИКС).

Материалы и методы. Было обследовано 50 мужчин, находившихся на стационарном лечении в кардиологическом отделении Областной клинической больницы города Твери, и 15 здоровых мужчин.

Сформированы выборки из трех групп сравнения. В I группу включили 15 здоровых мужчин от 29 до 47 лет (средний возраст $33,93 \pm 1,14$ лет), данная группа рассматривалась как контрольная. II группа состояла из 30 пациентов, страдающих ГБ, в возрасте от 29 до 65 лет (средний возраст $47,73 \pm 1,97$ лет). Критерии групповой принадлежности: мужской пол и наличие ГБ I-II стадии без систолической дисфункции миокарда левого желудочка [4] и отсутствие на момент обследования диагноза ИБС. В III группу были включены 20 мужчин, имеющих в анамнезе подтвержденный клинически и лабораторно инфаркт миокарда в возрасте от 46 до 84 лет (средний возраст $60,4 \pm 1,9$ лет). Критерии включения в данную группу больных: наличие верифицированного диагноза ИБС ПИКС. Критерии исключения: лица, страдающие сахарным диабетом, сопутствующими заболеваниями почек, легких, желудочно-кишечного тракта, печени, заболеваниями крови и нарушениями обмена веществ, отягощенным аллергологическим анамнезом, аллергическими заболеваниями и профессиональными вредностями.

Общая РНК, включая микроРНК, была получена комбинированным методом из плазмы крови с помощью набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) и лизирующего реагента TRIzol® LS Reagent (Invitrogen, США), описанным в литературе [9]. Для образцов микроРНК с концентрациями от 25 нг/мкл проводили обратную транскрипцию на четырехканальном амплификаторе «Veriti» («Applied Biosystems», США) для получения комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) с использованием набора TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit по стандартной схеме, представленной производителем. Реакционную смесь, содержащую тотальную микроРНК и смесь для проведения обратной транскрипции, подвергали нагреванию в несколько циклов:

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

Экспрессию miR-221 и miR-222 оценивали с помощью показателя ΔC_t [11], который определяли трижды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе «ABI Prism 7500» с помощью набора Taq Man Small RNA Assays («Applied Biosystems», США) с применением полученной кДНК и праймеров miR-221, miR-222 с использованием стандартного протокола, предложенного производителем. В качестве эндогенного контроля использовали праймер RNU6B, который показывает относительно стабильную экспрессию, независимо от того в каких тканях и клеточных культурах определяется [6].

Методы статистической обработки данных.

Накопление, корректировка, систематизация и визуализация полученных результатов проводилась в электронных таблицах «Excel». Для расчета количественного изменения микроРНК использовали метод $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$, предложенный К. J. Livak и Т. D. Schmittgen [7], где C_t – это пороговое значение цикла, где флуоресценция впервые фиксируется достоверно выше порогового уровня.

Попарное сравнение показателей ΔC_t контрольной группы с группами ГБ и ИБС ПИКС проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни. Биометрический анализ осуществлялся с использованием пакета WINPEPI (PEPI-for-Windows). За критический уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждения.

В ходе проведенного исследования miR-221 и miR-222 были получены следующие результаты ΔC_t , представленные в таблице 1.

Таблица 1

Показатели ΔC_t для miR-221 и miR-222 в контрольной группе, группах больных ГБ и ИБС ПИКС

Исследуемая группа	Контрольная группа (n = 15)	Больные ГБ (n = 30)	Больные ИБС ПИКС (n = 20)
miR-221 ΔC_t (M \pm m)	-0,93 \pm 0,64	-8,54 \pm 0,98	-8,96 \pm 1,13
miR-222 ΔC_t (M \pm m)	-0,07 \pm 0,71	-7,81 \pm 0,59	-7,69 \pm 0,81

Примечание: ΔC_t – разность между значениями C_t исследуемой микроРНК и эндогенного контроля (RNU6B), M – среднее значение уровня экспрессии микроРНК, m – стандартная ошибка среднего.

Согласно современным представлениям, изменение уровня экспрессии исключительно одной микроРНК не может быть надежным индикатором развития патологического состояния организма. Значение может иметь только анализ изменения уровня экспрессии нескольких микроРНК [2]. При этом считается, что достоверным повышением или понижением уровня экспрессии микроРНК в исследуемом образце крови или ткани является изменение значения уровня этой экспрессии в пять и более раз по отношению к контрольному образцу [5].

Полученные результаты определения уровня экспрессии микроРНК у больных ГБ и ИБС ПИКС представлены в таблицах 2 – 3.

В настоящем исследовании было установлено, что уровень экспрессии miR-221 оказался в 196 раз выше у больных ГБ и в 261 раз выше у больных ИБС ПИКС по сравнению с контрольной группой (таблица 2).

Таблица 2

Показатели уровня экспрессии miR-221 у больных ГБ и ИБС ПИКС

Исследуемая группа	$\Delta \Delta C_t$	$2^{-\Delta \Delta C_t}$	U-критерий Манна-Уитни (p)
Больные ГБ (n = 30)	-7,61	195,36	p<0,001*
Больные ИБС ПИКС (n = 20)	-8,03	261,38	p<0,001**

Примечание: $\Delta \Delta C_t$ – разность между значениями ΔC_t исследуемого образца и контрольного, $2^{-\Delta \Delta C_t}$ – формула для подсчета уровня экспрессии исследуемой микроРНК, * – статистическая значимость различий (p<0,001) между группой больных ГБ и контрольной, ** – статистическая значимость различий (p<0,001) между группой больных ИБС ПИКС и контрольной.

Правильность оценки данного исследования подтверждается рядом данных литературы, где описано, что miR-221 участвует в подавлении пролиферации эндотелиальных клеток и процессах ангиогенеза, а уровень данной микроРНК повышается в интиме после повреждения стенки сосуда. Таким образом, miR-221 может быть одним из регуляторов и маркеров пролиферативного и сократительного фенотипов гладкомышечных клеток [1].

Как показано в таблице 3, уровень экспрессии miR-222 оказался в 213 раз выше у больных ГБ и в 196 раз выше у больных ИБС ПИКС по сравнению со здоровыми людьми.

Таблица 3

Показатели уровня экспрессии miR-222 у больных ГБ и ИБС ПИКС

Исследуемая группа	$\Delta \Delta C_t$	$2^{-\Delta \Delta C_t}$	U-критерий Манна-Уитни (p)
Больные ГБ (n = 30)	-7,74	213,78	p<0,001*
Больные ИБС ПИКС (n = 20)	-7,62	196,72	p<0,001**

Примечание: $\Delta \Delta C_t$ – разность между значениями ΔC_t исследуемого образца и контрольного, $2^{-\Delta \Delta C_t}$ – формула для подсчета уровня экспрессии исследуемой микроРНК, * – статистическая значимость различий (p<0,001) между группой больных ГБ и контрольной, ** – статистическая значимость различий (p<0,001) между группой больных ИБС ПИКС и контрольной.

По данным литературы miR-222, наряду с miR-221 блокирует пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез [13]. В то же время следует отметить, что роль miR-222 в па-

тологии сердечно-сосудистой системы в литературе до сих пор достаточно информативно не описана.

Для подтверждения правильности сделанных выводов было проведено попарное сравнение средних показателей ΔCt исследуемых микроРНК контрольной группы с группами ГБ и ИБС ПИКС с помощью U-критерия Манна-Уитни, данные которого также приведены в таблицах 2-3. Получены сходные результаты, которые подтверждают, что больные ГБ и ИБС, ПИКС статистически значимо отличаются от контрольной группы по уровню экспрессии плазменных miR-221 и miR-222 ($p < 0,001$).

Выводы. Таким образом, полученные данные указывают, что наличие у больных сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ГБ и ИБС ПИКС, резко повышает уровень экспрессии изученных нами miR-221 и miR-222 по сравнению с группой здоровых людей. Результаты проведенного исследования, безусловно, подтверждают участие miR-221 и miR-222 в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, а именно, ГБ и ИБС ПИКС. В силу данного положения фиксация изменения количества нескольких ключевых микроРНК, несомненно, может быть использована для понимания как патофизиологических основ развития конкретного заболевания, так и поиска молекулярно-генетических подходов к его ранней диагностике.

Литература:

1. Ишемическая болезнь сердца: регулирование с помощью микроРНК / Коробов Г.А. [и др.] // Кардиологический вестник. – 2011. – Т. VI (XVIII). – №2. – С. 5-9.
2. Кучер А.Н. Роль микроРНК, генов их биогенеза и функционирования в развитии патологических состояний у человека / А.Н. Кучер, Н.П. Бабушкина // Медицинская генетика. – 2011. – №1. – С. 3 – 13.
3. Перспективы применения микроРНК в диагностике и терапии сердечной недостаточности / Кочетов А.Г. [и др.] // Кардиологический вестник. – 2014. – №2. – С. 62 – 67.
4. Чазова И.Е. Диагностика и лечение артериальной гипертензии (Рекомендации Российского медицинского общества по артериальной гипертонии и Всероссийского научного общества кардиологов) // Системные гипертензии. – 2010. – № 3. – С. 5–27.
5. Шевченко С. П. Современные клинические и молекулярно-генетические подходы к диагностике и лечению рака щитовидной железы: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.011.12 / С.П. Шевченко. – Новосибирск, 2011. – 40 с.
6. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation / V. Lambal [et al] // BMC Research Notes. – 2014. – № 7. – P.129. – doi:10.1186/1756-0500-7-129.
7. Livak K. J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // METHODS 25. – 2001. – P. 402-408.
8. Meola N. microRNAs and genetic diseases / N. Meola, A.G. Alessandro, S. Banti // PathoGenetics. – 2009. – № 2. – P. 7. – doi:10.1186/1755-8417-2-7.
9. MiRNA in lung cancer – Studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments / A. Keller [et al] // BMC Cancer. – 2009. – № 9. – P.353 doi:10.1186/1471-2407-9-3.
10. MiRNA: Small Molecules as Potential Novel Biomarkers in Cancer / Shah A.A. [et al] // Current Medicinal Chemistry. – 2010. – Vol. 17. – P. 4427-4432.
11. Tefvik Dorak M. Real-time PCR // Taylor & Francis Group, an informa business. – 2006. – 333 p.
12. Shah A. A. Profiling of regulatory microRNA transcriptomes in various biological processes: a review / A. A. Shah, E. Meese, N. Blin // J. Appl. Genet. –2010. – Vol. 51(4). – P.501-507.
13. Urbich C. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis / C. Urbich, A. Kuehnbacher, S. Dimmeler // Cardiovascular Research. –2008. – Vol. 79. – P. 581-588.