

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616.13-004.6-092

Калинкин М.Н., Щеглова Н.Е.

МикроРНК и полиморфизм генов их биогенеза в патогенезе атеросклероза

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, 170100, г. Тверь, ул. Советская, д. 4

Цель исследования — изучение экспрессии проангиогенных и антиангиогенных микроРНК, при атеросклерозе и особенностей полиморфизма генов их биогенеза. **Методика.** Обследовано 30 мужчин, страдающих гипертонической болезнью (ГБ), 20 мужчин, имеющих верифицированный диагноз ИБС постинфарктный кардиосклероз (ИБС ПИКС) и 15 здоровых мужчин. У всех больных в плазме крови определяли проангиогенные miR-126 и miR-155 и антиангиогенные miR-221 и miR-222. В ходе генотипирования определяли однонуклеотидные полиморфизмы генов, участвующих в биогенезе микроРНК, таких, как *AGO1* (A/G), *DGCR8* (G/A), *GEMIN4* (A/G), *DROSHA* (A/C). Проводили анализ ассоциации изменения экспрессии изучаемых микроРНК и полиморфизма генов, с частотой встречаемости ГБ и ИБС ПИКС. **Результаты.** Обнаружена ассоциация между генотипом AA гена *GEMIN4* и риском развития ГБ. При изучении экспрессии микроРНК, уровни проангиогенной miR-126 и антиангиогенных miR-221 и miR-222 в группах ГБ и ИБС ПИКС статистически значимо превышали аналогичные показатели в контрольной группе, в то время как уровень экспрессии проангиогенной miR-155 в плазме крови остается неизменным как в группе ГБ, так и у больных ИБС ПИКС. Изучение интегральных портретов ковариационных матриц и дисперсии микроРНК позволило сделать вывод, что в контрольной группе здоровых людей доминирующая вариационная роль отводится miR-126, а в группах больных ГБ и ИБС ПИКС — miR-221. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что количественная и качественная оценка изучаемых miR-126, miR-155, miR-221, miR-222 в группах больных ГБ и ИБС ПИКС подтверждает корреляцию данных микроРНК с исследуемыми заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: атеросклероз; патогенез; гипертоническая болезнь; постинфарктный кардиосклероз; микроРНК; полиморфизм генов; экспрессия.

Для цитирования: Калинкин М.Н., Щеглова Н.Е. МикроРНК и полиморфизм генов их биогенеза в патогенезе атеросклероза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(1): 43–50.

Для корреспонденции: Щеглова Наталья Евгеньевна, канд. мед. наук, доцент кафедры патологической физиологии, e-mail: natali.sh45@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.11.2016

Kalinkin M.N., Shcheglova N.E.

MicroRNAs and polymorphism of genes of biogenesis in the pathogenesis of atherosclerosis

FSBSI HE Tver State Medical University MU MOH Russia; 4, ul. Sovetskaya, Tver, 170100, Russia

The purpose — to determine the condition expression of pro-angiogenic and anti-angiogenic microRNAs and specifics of gene polymorphisms their biogenesis in the severe atherosclerosis and to introduce the pathophysiologic analysis of the significance of the data. **Methods.** The study included 30 men suffering from essential hypertension, 20 men who have the diagnosis of cardiosclerosis and 15 healthy men. Proangiogenic miR-126 and miR-155, angiogenic miR-221 and miR-222 were defined in the blood plasma for each patient. During genotyping single nucleotide polymorphisms of genes involved in the biogenesis microRNAs, such as *AGO1* (A/G), *DGCR8* (G/A), *GEMIN4* (A/G), *DROSHA* (A/C) were determined. The analysis of the association of changes in the expression of microRNAs and polymorphisms of genes with the incidence of essential hypertension and cardiosclerosis was carry out. **Results.** We found the association between genotype AA *GEMIN4* gene and the risk of essential hypertension. In the study of microRNAs expression levels of proangiogenic miR-126 and antiangiogenic miR-221, miR-222 in patients with essential hypertension and cardiosclerosis were significantly higher than in the control group. While the level of expression of proangiogenic miR-155 in the blood plasma remains unchanged in both groups. The study of integral portraits of covariance matrices and variance miRNAs led to the conclusion that in the control group of healthy people the dominant variation role belongs miR-126 and in the groups of patients with es-

sential hypertension and cardiosclerosis — miR-221. **Conclusion.** The results indicate that the quantitative and qualitative evaluation of the studied miR-126, miR-155, miR-221, miR-222 in patients with essential hypertension and cardiosclerosis confirms the correlation of these microRNAs with the studied diseases of the cardiovascular system.

Keywords: atherosclerosis; pathogenesis; essential hypertension; cardiosclerosis; microRNA; gene polymorphism; expression.

For citation: Kalinkin M.N., Shcheglova N.E. MicroRNAs and polymorphism of genes of biogenesis in the pathogenesis of atherosclerosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(1): 43–50. (in Russ.).

For correspondence: Natalia E. Shcheglova, Candidate of Medical Sciences, Researcher Federal State Budgetary Scientific Institution HE Tver State Medical University MU MOH Russia; 4, ul. Sovetskaya, Tver, 170100, Russian Federation, e-mail: natali.sh45@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kalinkin M.N., <http://orcid.org/0000-0001-5799-4147>

Shcheglova N.E., <http://orcid.org/0000-0003-0304-4212>

Received 15.11.2016

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) лидируют в структуре причин смертности населения экономически развитых стран. Процессы атеросклероза, тромбоза и артериальной гипертензии составляют патоморфологическую основу заболеваний сердечно-сосудистой системы, а нарушение мозгового кровообращения и ишемическая болезнь сердца (ИБС) — наиболее частые причины летальных исходов [1, 2].

В настоящее время проводятся многочисленные исследования с целью изучения роли микроРНК в молекулярно-генетических механизмах развития ССЗ. Появляются новые данные о различном биологическом влиянии микроРНК на компоненты сердечно-сосудистой системы. Согласно литературным источникам, нарушение функционирования определенных микроРНК может способствовать развитию таких патологических состояний как ИБС, постинфарктное ремоделирование миокарда, хроническая сердечная недостаточность [3—5]. Вместе с тем, следует указать, что данные количественных и качественных характеристик экспрессии микроРНК в различные периоды развития атеросклероза в литературе противоречивы. В связи с этим проведение подобных исследований представляется, безусловно, актуальным, особенно с учетом распространенности атеросклероза и его осложнений в популяции и необходимости разработки эффективных методов их терапии и профилактики.

Цель исследования — выяснение в условиях выраженного атеросклероза состояния экспрессии проангиогенных и антиангиогенных микроРНК, особенностей полиморфизма генов их биогенеза.

Методика

В исследование были включены 65 мужчин, 50 из которых находились на стационарном лечении в кардиологическом отделении ГБУЗ Областной клинической больницы города Твери, и 15 здоровых мужчин.

Сформированы выборки из 3 групп сравнения. В 1-ю группу (контроль) включили 15 здоровых мужчин от 29 до 47 лет, 2-я группа состояла из 30 пациентов, с гипертонической болезнью (ГБ) в возрасте от 29 до 65 лет. Критерии групповой принадлежности: мужской пол и наличие ГБ I—II стадии без систолической дисфункции миокарда левого желудочка [6] и отсутствие на момент обследования диагноза ИБС. В 3-ю группу были включены 20 мужчин, имеющих в анамнезе подтвержденный клинически и лабораторно диагноз ИБС постинфарктный кардиосклероз (ИБС ПИКС) в возрасте от 46 до 84 лет. Критерии исключения: лица, страдающие сахарным диабетом и другими эндокринопатиями, сопутствующими заболеваниями почек, легких, желудочно-кишечного тракта, печени, заболеваниями крови, наследственными болезнями и нарушениями обмена веществ, отягощенным аллергологическим анамнезом, аллергическими заболеваниями и лица, имеющие профессиональные вредности.

У всех обследуемых определяли следующие параметры: показатели общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и рассчитанный по классической формуле коэффициент атерогенности (КА):

$$КА = (ОХС - ХС ЛПВП) / ХС ЛПВП$$

Генетические исследования были проведены на базе молекулярно-генетической лаборатории ГБОУ ВПО Тверской ГМУ Минздрава России. Из цель-

ной крови выделяли геномную ДНК с последующим генотипированием. У всех больных в плазме крови определяли следующие микроРНК: проангиогенные miR-126 и miR-155; антиангиогенные miR-221 и miR-222.

Тотальная 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) [7, 8].

Для образцов тотальной микроРНК с концентрациями от 25 нг/мкл проводили обратную транскрипцию на четырехканальном амплификаторе «Veriti» («Applied Biosystems», США) для получения комплементарной ДНК (кДНК) с использованием набора TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit («Applied Biosystems», США) по стандартной схеме, представленной производителем.

Далее проводили ПЦР в режиме реального времени по стандартному протоколу, предложенному производителем, с помощью набора Taq Man Small RNA Assays («Applied Biosystems», США) с применением полученной кДНК и праймеров miR-126, 155, 221, 222. В качестве эндогенного контроля использовали праймер RNU6B, результаты амплификации которого использовали для нормировки [9, 10].

Тотальную геномную ДНК выделяли из цельной венозной крови сорбентным методом с использованием набора «Diatom DNA Prep 100» («Лаборатория «Изоген», Россия). В ходе генотипирования определяли однонуклеотидные полиморфизмы генов, участвующих в биогенезе микроРНК, *AGO1*, *DGCR8*, *GEMIN3*, *GEMIN4*, *DROSHA* с помощью ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием набора праймеров и аллель-специфических гибридационных зондов («Applied Biosystems», США). В качестве детектирующего амплификатора использовали систему регистрации ПЦР «ABI Prism 7500» («Applied Biosystems», США).

Математико-статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием табличного процессора Microsoft Excel, системы компьютерной математики и моделирования MATLAB с пакетами расширения *Statistics Toolbox* и *Bioinformatics Toolbox* фирмы Math Works и пакета «SPSS 19.0».

Расчет частот встречаемости гомозигот и гетерозигот проводился путем построения таблицы сопряженности с последующим применением закона Харди—Вайнберга и использованием метода χ^2 с помощью программы DeFinetti, размещенной в свободном доступе на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия). Оценку риска проводили с по-

мощью показателя отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (ДИ).

Для расчета количественного изменения микроРНК использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$, предложенный К.Ж. Livak и Т.Д. Schmittgen [11].

$\Delta\Delta Ct$ рассчитывается по формуле:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR} - Ct_{RNU6B})_{\text{опытный образец}} - (Ct_{miR} - Ct_{RNU6B})_{\text{контрольный образец}}$$

где Ct — пороговое значение цикла, полученное в ходе проведения ПЦР, при котором флуоресценция впервые фиксируется значимо выше порогового уровня [12].

Для оценки статистической значимости разности средних в двух группах при нормальном распределении признака для независимых переменных использовался *t*-критерий Стьюдента. При распределении, отличающемся от нормального, проводили попарное сравнение с помощью непараметрического *U*-критерия Манна—Уитни. За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Характеристика показателей липидного метаболизма

При изучении показателей концентрации ОХС и ХС ЛПВП средние значения уровня плазменного ОХС в контрольной группе (1-я гр.) оказались в пределах $3,74 \pm 0,19$ ммоль/л, в группе больных ГБ (2-я гр.) — $5,67 \pm 0,19$ ммоль/л, в группе больных ИБС ПИКС (3-я гр.) — $5,87 \pm 0,18$ ммоль/л. Содержание ХС ЛПВП в плазме крови в 1-й группе составило $1,17 \pm 0,04$ ммоль/л, во 2-й группе — $1,16 \pm 0,04$ ммоль/л, в 3-й группе — $0,92 \pm 0,07$ ммоль/л.

Содержание ОХС в плазме крови оказалось статистически значимо выше в группах больных ГБ и ИБС ПИКС в сравнении с контролем. Также в группе больных ИБС ПИКС было обнаружено статистически значимое снижение концентрации плазменного ХС ЛПВП по сравнению с контрольной группой. Существенных различий содержания ХС ЛПВП между группой контроля и группой больных ГБ обнаружено не было. Вместе с тем, группы пациентов с ГБ и ИБС ПИКС характеризовались высокими значениями коэффициента атерогенности ($КА \geq 4$). Как у больных ГБ, так и у больных ИБС ПИКС наблюдалось статистически значимое повышение данного показателя в сравнении с контролем.

Обобщая вышеизложенное, можно сделать заключение о наличии выраженного манифестирующего атеросклероза у обследованных пациентов, что подтверждается существованием атерогенных расстройств липидного обмена, таких, как гиперхолесте-

ринемия, гипоальфалипотеинемия, высокий показатель КА, а также сформированной артериальной гипертензией и хронической сердечной недостаточностью, возникшей вследствие расстройств коронарного кровоснабжения.

Изучение полиморфизмов генов AGO1, DGCR8, GEMIN3, GEMIN4, DROSHA. Распределение частот генотипов вышеперечисленных генов в исследуемых выборках соответствовало равновесию Харди—Вайнберга. Статистически значимого различия между частотой встречаемости полиморфизмов генов *AGO1, DGCR8, GEMIN3, DROSHA* и частотой случаев ГБ и ИБС ПИКС у мужчин выявлено не было.

Обнаружена ассоциация между частотой распределения генотипов и аллелей полиморфизма гена *GEMIN4* и частотой развития ГБ. Данные представлены в табл. 1.

Так, носительство аллеля А и генотипа АА в настоящем исследовании увеличивает частоту случаев

ГБ в 3,05 и 5,23 раза. В то же время носители генотипов АС и СС имеют пониженный риск развития ГБ (OR = 0,42 и 0,4), также как и носители аллеля С (OR = 0,33). В связи с этим, генотип АА гена *GEMIN4* можно представить в качестве генотипа риска развития ГБ. Связь между полиморфизмом гена *GEMIN4* и риском развития ИБС ПИКС не установлена.

Таким образом, только частота гомозиготного носительства мажорного аллеля А гена *GEMIN4* в настоящем исследовании коррелирует с частотой случаев развития ГБ. Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что анализ комбинации неблагоприятных генотипов по генам биогенеза микроРНК позволяет выделить среди больных группы с низким, средним и высоким риском развития различных проявлений выраженного атеросклероза.

Показатели уровня экспрессии miR-126, miR-155, miR-221, miR-222. Согласно современ-

Таблица 1

Частота генотипов и аллелей полиморфизма гена *GEMIN4*, ассоциированных с ГБ

Ген	Генотип	Распределение генотипов, n (%)				Критерий различий при df = 1, χ^2 (p)	OR (95% CI)
		Группа контроля, n = 15		Больные ГБ, n = 30			
		n	%	n	%		
<i>GEMIN4</i>	Генотип АА	3	20,0	17	56,7	4,21 (0,040) *	5,23 (1,22-2,45)
	Генотип СС	5	33,3	5	16,7		0,40 (0,09-1,69)
	Генотип АС	7	46,7	8	26,6		0,42 (0,11-1,52)
	Аллель А	0,433		0,700		5,98 (0,014) *	3,05 (1,23-7,57)
	Аллель С	0,567		0,300			0,33 (0,13-0,81)

Примечание. OR — отношение шансов; CI — 95% доверительный интервал; * — статистическая значимость различий (p<0,05).

Таблица 2

Показатели уровня экспрессии miR-126, 155, 221, 222 у больных ГБ и ИБС ПИКС

Исследуемая группа	ΔCt (M ± m)	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
<i>miR-126</i>			
Больные ГБ (n = 30)	-9,71 ± 0,74	-8,00	256,00
Больные ИБС ПИКС (n = 20)	-9,77 ± 0,92	-8,06	266,87
<i>miR-155</i>			
Больные ГБ (n = 30)	-4,23 ± 0,61	-1,20	2,29
Больные ИБС ПИКС (n = 20)	-5,02 ± 0,94	-1,90	3,73
<i>miR-221</i>			
Больные ГБ (n = 30)	-8,54 ± 0,98	-7,61	195,36
Больные ИБС ПИКС (n = 20)	-8,96 ± 1,13	-8,03	261,38
<i>miR-222</i>			
Больные ГБ (n = 30)	-7,81 ± 0,59	-7,74	213,78
Больные ИБС ПИКС (n = 20)	-7,69 ± 0,81	-7,62	196,72

Примечание. $\Delta Ct = (Ct_{miR} - Ct_{RNU6B})$, $\Delta\Delta Ct$ — разность между значениями ΔCt исследуемого образца и контрольного; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ — формула для подсчета уровня экспрессии исследуемой микроРНК.

ным представлениям, изменение уровня экспрессии только одной микроРНК не может быть надежным индикатором развития патологического состояния организма. Только изменение уровня экспрессии сразу нескольких микроРНК может иметь значение в диагностике заболеваний [13]. В табл. 2 приведены уровни экспрессии изучаемых микроРНК.

Так, у больных ГБ уровень экспрессии проангиогенной miR-126 оказался в 256 раз выше по сравнению с контролем, а у больных ИБС ПИКС этот показатель оказался выше почти в 267 раз. Прямые доказательства участия данной микроРНК в патогенезе ССЗ в литературе отсутствуют, хотя, по данным некоторых авторов, miR-126 может играть важную роль в сосудистой патологии и процессах внутрисосудистого ремоделирования [13—15]. Уровень проангиогенной miR-155 в плазме крови остается неизменным как в группе ГБ, так и у больных ИБС ПИКС.

В то же время, было установлено, что уровень экспрессии антиангиогенной miR-221 оказался в 195 раз выше у больных ГБ и в 261 раз выше у больных ИБС ПИКС по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы. Статистическая значимость оценки результатов данного исследования согласуется с рядом данных литературы, указывающих, что уровень miR-221 повышается в интиме после повреждения стенки сосуда, а также участвует в подавлении пролиферации эндотелиальных клеток и процессах ангиогенеза [16, 17]. Уровень экспрессии антиангиогенной miR-222 увеличивается в 213 раз у больных ГБ и в 196 раз у больных ИБС ПИКС по сравнению с используемыми нами контрольными данными. Следует отметить, что роль miR-222 в патологии сердечно-сосудистой системы в литературе не обозначена. Соответствующей информации в доступной нам литературе обнаружено не было.

Проведение попарного сравнения показателей ΔCt контрольной группы с группами ГБ и ИБС ПИКС с помощью U-критерия Манна—Уитни подтверждает правильность сделанных выводов о значимой роли miR-126, miR-221, miR-222 в патогенезе атеросклероза и его осложнений.

Так, согласно данным проведенных нами исследований, обнаружено, что уровни экспрессии miR-126, miR-221, miR-222 у больных ГБ и ИБС ПИКС статистически значимо превышают аналогичные показатели контрольной группы здоровых людей. С другой стороны, статистически значимого изменения уровня экспрессии miR-155 в настоящем исследовании выделено не было (табл. 3).

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что уровни экспрессии проангиогенных miR-126, и антиангиогенных miR-221, miR-222 у больных ГБ и ИБС ПИКС статистически значимо превышают аналогичные показатели контрольной группы. С другой стороны, изменение уровня экспрессии miR-155 не удалось ассоциировать с изученными нами заболеваниями, что, возможно, указывает на отсутствие выраженной роли miR-155 в патогенезе атеросклероза.

Качественные характеристики miR-126, miR-155, miR-221, miR-222. Для определения взаимосвязей между изучаемыми микроРНК в исследуемых группах был проведен корреляционный анализ Спирмена и рассчитан коэффициент ковариации [18].

В качестве специфического интегрального портрета исследуемых групп, отражающего взаимосвязи микроРНК в пределах выборки, использовалась ковариационная матрица, полученная при сведении в единую таблицу коэффициентов ковариации.

Ниже приведены интегральные портреты исследуемых групп (рис. 1—3).

Анализ интегрального портрета контрольной группы здоровых людей (рис. 1) позволяет заключить, что доминирующая роль в этой группе отводится экспрессии проангиогенной miR-126.

На рис. 2 изображен интегральный портрет группы больных ГБ, при анализе которого можно сделать вывод, что в изучаемой группе доминирующее положение занимает антиангиогенная miR-221.

При анализе данных, представленных на рис. 3, отражающего интегральный портрет группы больных

Таблица 3

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

Показатель	Группа контроля (n = 15)	Больные ГБ (n = 30)	Больные ИБС ПИКС (n = 20)
ΔCt miR-126	-1,71 \pm 3,37	-9,71 \pm 4,03*	-9,77 \pm 4,10**
ΔCt miR-155	-3,12 \pm 1,33	-4,23 \pm 3,36	-5,02 \pm 4,22
ΔCt miR-221	-0,93 \pm 2,47	-8,54 \pm 5,36*	-8,96 \pm 5,07**
ΔCt miR-222	-0,07 \pm 2,73	-7,81 \pm 3,24 *	-7,69 \pm 3,63**

Примечание. * — 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.

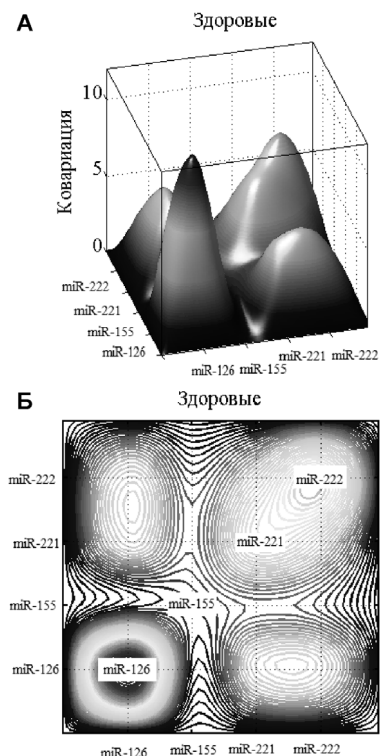


Рис. 1. Портрет группы контроля: А — объёмная визуализация ковариационной матрицы микроРНК; Б — линии одинакового уровня.

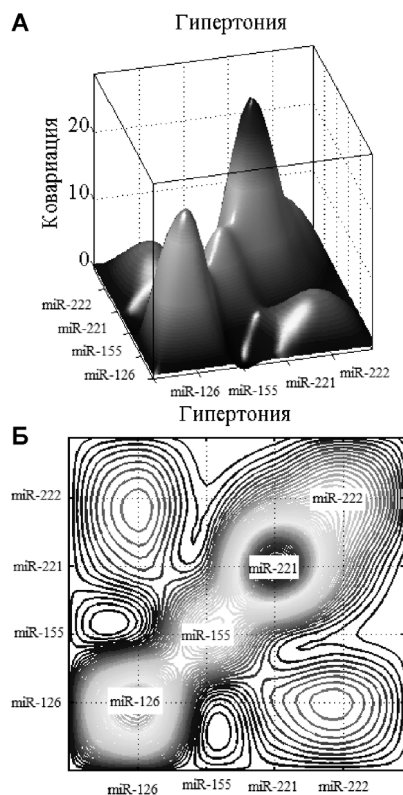


Рис. 2. Портрет группы больных ГБ: А — объёмная визуализация ковариационной матрицы микроРНК; Б — линии одинакового уровня.

ИБС ПИКС, можно заключить, что в этой группе в спектре изучаемых микроРНК, доминирует антиангиогенная miR-221.

Таким образом, сравнение интегральных портретов исследуемых групп (рис. 1—3), отражающих взаимосвязи микроРНК, позволяет сделать вывод о доминировании в контроле проангиогенной miR-126, а в группах больных ГБ и ИБС ПИКС — антиангиогенной miR-221. Для подтверждения характера изменчивости спектра микроРНК, входящих в состав выборки группы пациентов, была рассчитана дисперсия. На рис. 4 в обобщенном виде показано распределение дисперсии микроРНК по группам пациентов.

Можно предположить, что преобладание экспрессии miR-126 в группе здоровых людей связано с ее постоянным и стабильным влиянием в физиологических условиях на процесс пролиферации эндотелиоцитов [15, 16]. Доминирование антиангиогенной miR-221 у больных ГБ и ИБС ПИКС, по-видимому, может рассматриваться как ответная реакция в ответ на атероматозную альтерацию интимы артерий при ГБ и ИБС ПИКС. На данный факт указывают и другие авторы [16, 17]. В то же время антиангиогенная miR-222 занимает последнее место в спектре доминирования исследуемых микроРНК у больных ГБ и ИБС ПИКС, что вступает в определенное противоречие с проведенными нами рассуждениями патофизиологического характера. Тем не менее, выявление в настоящем исследовании различий в экспрессионной иерархии различных микроРНК в норме и в условиях атерогенеза имеет, безусловно, патофизиологическую перспективу в изучении молекулярных основ развития атеросклероза и его осложнений.

Таким образом, в условиях прогрессирующего атеросклероза у человека существенно изменяются количественные и качественные параметры соотношения микроРНК в плазме крови. При изучении проангиогенных микроРНК в плазме крови при ГБ и ИБС ПИКС повышается уровень miR-126. При этом значительно возрастает содержание и антиангиогенных плазменных микроРНК — miR-221 и miR-222, что свидетельствует о проявлении одного из компенсаторно-приспособительных механизмов при атеросклерозе у человека. В группе здоровых людей установлено преобладание среди плазменных микроРНК проангиогенной miR-126. В то же время в условиях атерогенеза у человека выявлено доминирование антиангиогенной miR-221, что подтверждает долговременное включение защитных сосудистых реакций при атеросклерозе. При изучении полиморфизмов генов, регулирующих биогенез микроРНК, выявлено существование статистически значимых ассоциаций между частотой гомозиготного носительства

мажорного аллеля А гена *GEMIN4* и частотой встречаемости ГБ, ведущего фактора развития атеросклероза. Статистически значимой корреляции между полиморфизмами других генов биогенеза микроРНК, а именно *AGO1*, *DGCR8*, *GEMIN3*, *DROSHA* и частотой ГБ и ИБС ПИКС не установлено.

Полученные результаты обосновывают представление о патофизиологической роли ряда компонентов молекулярно-генетического аппарата человека, а, именно, miR-126, miR-221, miR-222 и полиморфизма гена их биогенеза *GEMIN4* в стадии выраженного атеросклероза.

References

1. Koryagina N.A., Petrishchev A.V. The possibility of using anti-sclerotic therapy in clinical practice. *Kardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya*. 2012; 4: 31-5. (in Russian)
2. Torshin I.Yu., Gromova O.A. Cardiovascular disease, vascular brain disorders and molecular genes. Association studies and the pathophysiology of cardiovascular disease. *Trudnyy patsient*. 2008; 2-3: 15-9. (in Russian)
3. Fasarano P., Greco S., Ivan M. et al. MicroRNA: Emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010; 125: 92-104.
4. Stather P.W., Sylvius N., Wild J.B. et al. Differential MicroRNA Expression Profiles in Peripheral Arterial Disease. 2013; 6(5): 490-7.
5. Stefano V.D., Zaccagnini G., Capogrossi M.C., Martelli F. MicroRNAs as peripheral blood biomarkers of cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*. 2011; 55: 111-8.
6. Chazova I.E., Ratova L.G., Boytsov S.A. Diagnosis and treatment of hypertension (Recommendations of the Russian Medical Society for Arterial Hypertension and the Russian Society of Cardiology). *Sistemnye gipertenzii*. 2010; 3: 5-27. (in Russian)
7. Keller A., Leidinger P., Gislefoss R. et al. Stable serum miRNA profiles as potential tool for non-invasive lung cancer diagnosis. *RNA Biology*. 2011; 8(3): 506-16.
8. Shah A.A., Leidinger P., Keller A. MiRNA expression patterns in *Tff2* knock-out mice correlate with cellular pathways of neoplastic development and caloric metabolism. *Int. J. Mol. Med*. 2012; 29(4): 637-43.
9. Lamba V., Ghodke-Puranik Y., Guan W., Lamba J.K. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC Research Notes*. 2014; 7:129.
10. Song J., Bai Z. Identification of Suitable Reference Genes for qPCR Analysis of Serum microRNA in Gastric Cancer Patients. 2012; 57(4): 897-904.
11. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.
12. Navidshad B., Liang J.B., Jahromi M.F. Correlation Coefficients Between Different Methods of Expressing Bacterial Quantification Using Real Time PCR. *Int. J. Mol. Sci*. 2012; 13: 2119-132.
13. Hu J., Zeng L., Huang J. et al. MiR-126 promotes angiogenesis and attenuates inflammation after contusion

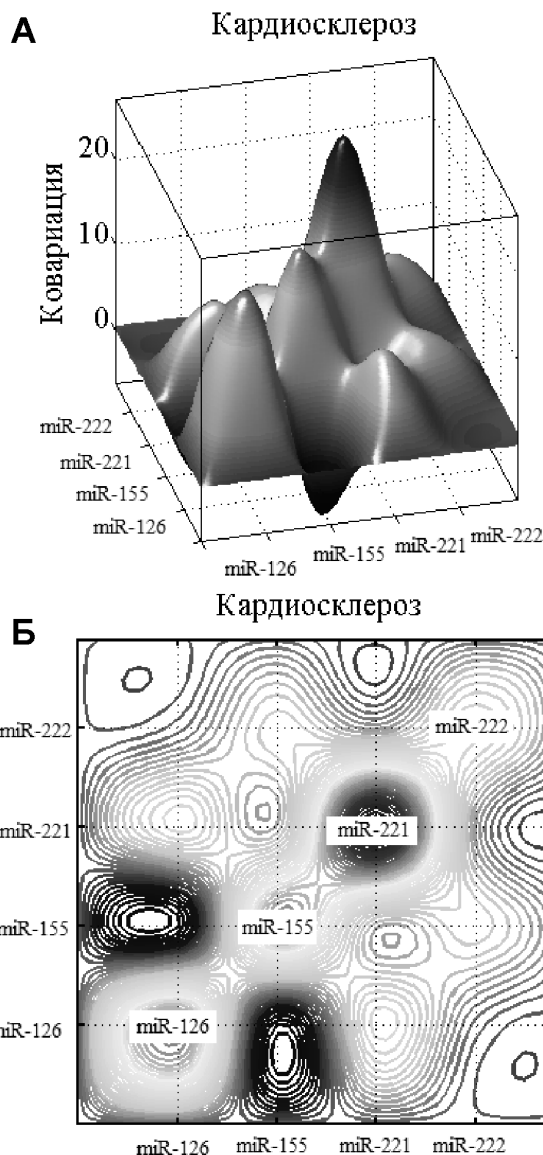


Рис. 3. Портрет группы больных ИБС ПИКС: А – объемная визуализация ковариационной матрицы микроРНК; Б – линии одинакового уровня.

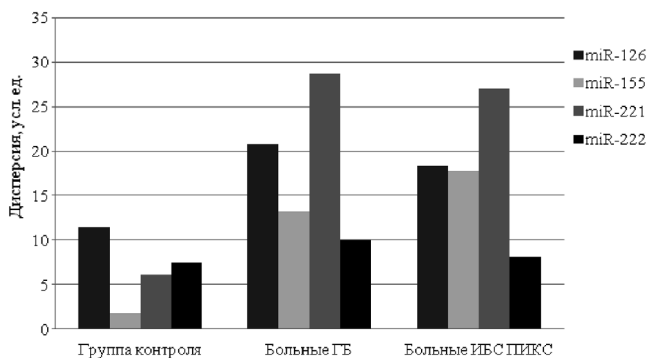


Рис. 4. Распределение дисперсии микроРНК в группах контроля и больных ГБ и ИБС ПИКС.

spinal cord injury in rats. *Brain Research*. 2015; 1608: 191-202.

14. Hulsmans M., Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovascular Research*. 2013; 100: 7-18.

15. Jiang Y., Wang H., Cao H. et al. Peripheral blood miRNAs as a biomarker for chronic cardiovascular diseases. *Sci. Rep.* 2014; 4: 5026.

16. Leung A., Trac C., Jin W. et al. Novel Long Non-Coding RNAs Are Regulated by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 2013; 113(3): 266-78.

17. Staszal T., Zapała B., Polus A. et al. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2011; 121(10): 361-7.

18. Soshnikova L.A., Tomashevich V.N. Multivariate statistical analysis. [*Mnogomernyy statisticheskiy analiz*]. Moscow: YuNTI-DANA; 1999. (in Russian)

Сведения об авторах:

Калинкин Михаил Николаевич, доктор мед. наук, проф., зав. кафедрой патологической физиологии