

Изменение экспрессии микроРНК из локуса *DLK1-DIO3* характерно для ремиттирующего рассеянного склероза вне зависимости от стадии его течения

Баулина Н.М., Кабаева А.Р., Бойко А.Н., Фаворова О.О.
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва
Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Роль микроРНК — малых регуляторных некодирующих РНК — в развитии рассеянного склероза (РС) интенсивно исследуется. Ранее мы с помощью РНК-секвенирования впервые обнаружили значимое повышение экспрессии 26 генов микроРНК, локализованных в локусе *DLK1-DIO3*, у мужчин, больных ремиттирующим РС (РРС), в мононуклеарных клетках (МНК) крови.

Цель исследования — оценить возможное участие микроРНК в регуляции активности патологического процесса при РРС путем сравнения уровней экспрессии генов микроРНК из этого локуса у больных в стадии ремиссии и обострения, а также у здоровых индивидов, раздельно для мужчин и женщин.

Пациенты и методы. Анализ экспрессии микроРНК *miR-431-5p*, *miR-127-3p*, *miR-379*, *miR-376c*, *miR-381*, *miR-410* и *miR-656-3p* проводили в МНК 16 больных в стадии обострения и 20 пациентов в стадии ремиссии, не принимавших иммуномодулирующие препараты, а также 20 здоровых индивидов методом обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты и обсуждение. Уровни экспрессии всех исследованных микроРНК не различались у больных в стадии ремиссии и обострения, у мужчин и женщин. В то же время у мужчин (в стадии ремиссии и обострения) выявлено значительное повышение уровней всех микроРНК при сравнении со здоровыми мужчинами; у женщин изменений в экспрессии не наблюдали. Показан высокий уровень корреляции экспрессии микроРНК из локуса *DLK1-DIO3* как у больных, так и у здоровых лиц из контрольной группы вне зависимости от пола. Коэкспрессия наблюдалась не только для генов микроРНК из одного одного кластера (*14q32.2* или *14q32.31*), но и для генов из разных кластеров.

Заключение. Гены микроРНК из локуса *DLK1-DIO3* вовлечены в формирование патогенетических механизмов возникновения РРС, но не в процессы, связанные с переходом от ремиссии к обострению. Высокая согласованность экспрессии микроРНК вне зависимости от локализации их генов внутри этого региона предполагает существование общего механизма, регулирующего их транскрипцию.

Ключевые слова: рассеянный склероз; ремиссия; обострение; микроРНК; импринтированный локус *DLK1-DIO3*.

Контакты: Наталья Михайловна Баулина; tasha.baulina@gmail.com

Для ссылки: Баулина НМ, Кабаева АР, Бойко АН, Фаворова ОО. Изменение экспрессии микроРНК из локуса *DLK1-DIO3* характерно для ремиттирующего рассеянного склероза вне зависимости от стадии его течения. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2022;14(2):64–70. DOI: 10.14412/2074-2711-2022-2-64-70

Changes in expression of miRNAs from the *DLK1-DIO3* locus are characteristic of relapsing-remitting multiple sclerosis regardless of the disease activity

Baulina N.M., Kabaeva A.R., Boyko A.N., Favorova O.O.

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow
1, Ostrovityanov St., Moscow 117997, Russia

The role of miRNAs — small, regulatory, noncoding RNAs — in the multiple sclerosis (MS) development is being intensively investigated. Previously, we the first who observed a significant increase in the expression of 26 microRNA genes localized in the *DLK1-DIO3* locus in men with relapsing-remitting MS (RRMS) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), using RNA sequencing.

Objective: to evaluate the possible involvement of miRNAs in the regulation of the activity of the pathological process in RRMS by comparing the miRNA genes expression levels from this locus in patients in remission, relapse, and healthy individuals, separately for men and women.

Patients and methods. Analysis of *miR-431-5p*, *miR-127-3p*, *miR-379*, *miR-376c*, *miR-381*, *miR-410* and *miR-656-3p* microRNA expression was performed by reverse transcription and subsequent real-time polymerase chain reaction in PBMCs of 16 patients in the relapse stage, 20 patients in remission who did not receive immunomodulatory drugs, and 20 healthy individuals.

Results and discussion. The expression levels of all studied miRNAs did not differ in patients in remission and relapse stages, in men and women. At the same time, men (in remission and relapse) showed a significant increase in the levels of all miRNAs compared with healthy men; in women, no changes in expression were observed. A high level of correlation of miRNA expression from the *DLK1-DIO3* locus was shown in both patients and healthy individuals from the control group, regardless of gender. Coexpression was observed not only for miRNA genes from the same cluster (*14q32.2* or *14q32.31*), but also for genes from different clusters.

Conclusion. *The miRNAs genes from the DLK1-DIO3 locus are involved in the pathophysiology of RMS onset, but not in the processes associated with the transition from remission to relapses. The high consistency of miRNA expression, regardless of the localization of their genes within this region, suggests the presence of a common mechanism that regulates their transcription.*

Keywords: *multiple sclerosis; remission; relapse; miRNA; imprinted locus DLK1-DIO3.*

Contact: *Natalia Mikhailovna Baulina; tasha.baulina@gmail.com*

For reference: *Baulina NM, Kabaeva AR, Boyko AN, Favorova OO. Changes in expression of miRNAs from the DLK1-DIO3 locus are characteristic of relapsing-remitting multiple sclerosis regardless of the disease activity. Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics. 2022;14(2):64–70. DOI: 10.14412/2074-2711-2022-2-64-70*

Рассеянный склероз (РС) представляет собой одну из наиболее социально и экономически значимых проблем современной неврологии. Это заболевание чаще всего поражает молодых людей в трудоспособном возрасте (15–40 лет), причем количество пациентов такого возраста увеличивается в мире на 10% каждые 5 лет и сейчас составляет свыше 3 млн человек [1]. РС характеризуется гетерогенностью клинических форм; наиболее распространен ремиттирующий РС (РРС), течение которого определяется чередованием периодов обострения (с резким ухудшением симптоматики) и ремиссии (с полным или неполным восстановлением функций). Хотя механизмы, лежащие в основе такого волнообразного течения, остаются не до конца выясненными, установлена роль иммунной системы в инициировании обострений при РРС, когда иммунные клетки, будучи активированными, проникают в центральную нервную систему и провоцируют там нейровоспалительные процессы [2].

В настоящее время интенсивно исследуется роль микроРНК — малых некодирующих РНК, участвующих в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов, в молекулярных механизмах развития и активного течения РС. МикроРНК участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов посредством полного или неполного комплементарного связывания затравочной области микроРНК (6–8 нуклеотидов) в основном с 3'-нетранслируемой областью мРНК-мишени [3]. Ранее проведенное нами исследование впервые обнаружило с помощью РНК-секвенирования значимое повышение экспрессии 26 генов микроРНК из 54, ко-локализованных на хромосоме 14 в области импринтированного локуса *DLK1-DIO3*, в мононуклеарных клетках (МНК) крови больных РРС [4]. Ассоциация этого локуса с РС наблюдалась только у мужчин. Известно, что экспрессия генов микроРНК в этом локусе осуществляется с материнской хромосомы (рис. 1). Повышенная экспрессия у мужчин с РРС семи генов микроРНК этого локуса, а именно: miR-431-5p, miR-127-3p, miR-379, miR-376c, miR-381, miR-410 и miR-656-3p, была подтверждена на независимых группах.

Цель настоящего исследования — исходя из представлений о возможном участии микроРНК в регуляции активности иммунопатологического процесса при РРС, выяснить, зависят ли изменения в уровнях экспрессии генов микроРНК, расположенных в локусе *DLK1-DIO3*, от стадии клинического течения РРС. Для этого проведен анализ экспрессии ряда генов микроРНК из локуса *DLK1-DIO3* в МНК больных РРС в стадиях ремиссии и обострения, а также здоровых индивидов, отдельно для мужчин и женщин.

Пациенты и методы. В исследование было включено 36 неродственных пациентов с РРС (средний возраст — 31,0±7,5 года), из них 56% женщин. Диагноз РС был поставлен согласно критериям Макдональда 2017 г. [5]. Подбор участников исследования проведен в Федеральном центре мозга и нейротехнологий. Больные, включенные в это исследование, никогда не принимали иммуномодулирующих препаратов и не имели каких-либо других воспалительных заболеваний. Двадцать больных РРС (10 мужчин и 10 женщин) находились в стадии стабильной клинической ремиссии; забор крови у них проводили спустя по меньшей мере 6 мес с момента последнего обострения. Шестнадцать больных РРС (6 мужчин и 10 женщин) были в стадии обострения; кровь у них забирали спустя 24–36 ч после проявления клинических признаков обострения и до первого введения глюкокортикоидов. Пациенты были разделены на две группы в зависимости от пола (табл. 1). Больные РРС мужчины в ремиссии и в стадии обострения значительно различаются в отношении тяжести течения РС по шкале инвалидизации EDSS ($p=0,018$ при сравнении показателей EDSS с помощью теста Манна–Уитни), тогда как у женщин эти показатели в ремиссии и при обострении значительно не различались. По возрасту больные РРС в ремиссии и в стадии обострения значительно не различались как среди женщин, так и среди мужчин. Контрольную группу составили 20 здоровых индивидов (10 мужчин и 10 женщин) без острых и хронических неврологических заболеваний. Средний возраст здоровых мужчин и женщин был равен 31,7±7,7 и 40,8±12,9 года соответственно. От всех участников исследования получено письменное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с разрешением этического комитета РНИМУ им. Н.И. Пирогова (протокол №139 от 10.11.2014).

МНК выделяли из периферической крови методом центрифугирования на градиенте фиколл-гистобака (Sigma-Aldrich, США) спустя не более 3 ч с момента забора крови. Затем клетки лизировали при помощи QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Германия) и хранили при температуре -80 °C до дальнейших манипуляций. Для выделения из клеточных лизатов тотальной РНК, содержащей фракцию микроРНК, применяли набор miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Анализ уровней экспрессии генов микроРНК miR-431-5p, miR-127-3p, miR-379, miR-376c, miR-381, miR-410 и miR-656-3p в МНК проводили методом обратной транскрипции с последующей количественной полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) с использованием метода дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta Ct$) [5]. Для проведения обратной транскрипции ис-

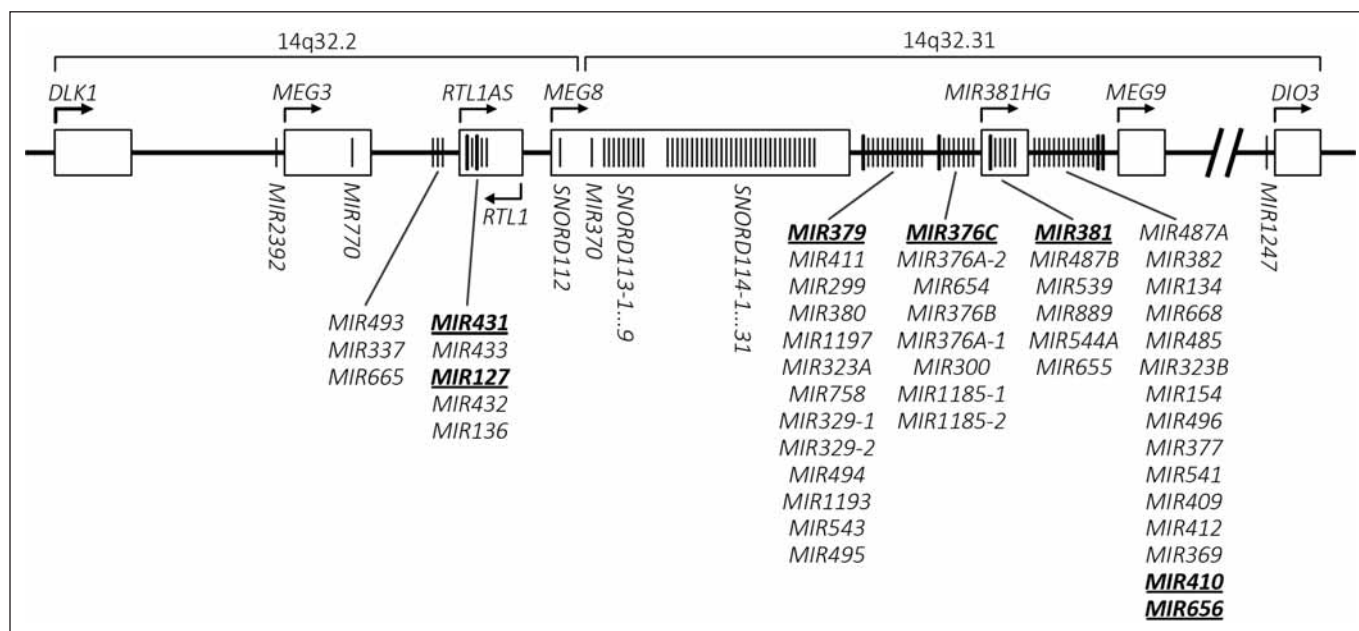


Рис. 1. Схематическое представление импринтированного локуса *DLK1-DIO3* на хромосоме 14. Локус содержит три экспрессирующихся с отцовской хромосомы белок-кодирующих гена: *DLK1* (Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1), *DIO3* (Type III iodothyronine deiodinase) и *RTL1* (Retrotransposon Gag Like 1). Полностью комплементарный антисмысловый транскрипт *antiRTL1* экспрессируется с материнской хромосомы и действует как репрессор транскрипции *RTL1*. Локус также содержит гены длинных некодирующих РНК (*MEG3*, *MEG8*, *MIR381HG*, *MEG9*), экспрессирующихся, напротив, с материнской хромосомы. *MEG8* содержит гены малых ядерных РНК семейства *snoRNA C/D-box*, а именно: *SNORD112*, *SNORD113*, *SNORD114*, состоящие из одного, девяти и 31 паралогического гена соответственно. Локус содержит два больших кластера генов микроРНК (10 генов микроРНК в 14q32.2 и 44 гена микроРНК в 14q32.31), также экспрессирующихся с материнского аллеля. Группы генов микроРНК, расположенных в непосредственной близости друг от друга или относящихся к одной структурной единице генома, объединены в списки. Прямоугольники представляют собой гены, кодирующие белки, и длинные некодирующие РНК. Черными штрихами отмечены гены микроРНК и малых ядерных РНК. Жирным шрифтом выделены микроРНК, для которых повышение экспрессии генов при РС у мужчин было обнаружено с помощью РНК-секвенирования и подтверждено на независимой расширенной выборке ранее [4]

Fig. 1. Schematic representation of the imprinted *DLK1-DIO3* locus on chromosome 14. The locus contains three protein-coding genes expressed from the paternal chromosome: *DLK1* (Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1), *DIO3* (Type III iodothyronine deiodinase), and *RTL1* (Retrotransposon Gag Like 1). The fully complementary antisense *antiRTL1* transcript is expressed from the maternal chromosome and acts as a repressor of *RTL1* transcription. The locus also contains genes for long noncoding RNAs (*MEG3*, *MEG8*, *MIR381HG*, *MEG9*), which, on the contrary, are expressed from the maternal chromosome. *MEG8* contains small nucleolar RNA genes of the *snoRNA C/D-box* family, specifically: *SNORD112*, *SNORD113*, *SNORD114*, consisting of one, nine, and 31 paralogous genes, respectively. The locus contains two large clusters of miRNA genes (10 miRNA genes at 14q32.2 and 44 miRNA genes at 14q32.31), which are also expressed from the maternal allele. Groups of miRNA genes located in close proximity to each other or related to the same structural unit of the genome are combined into lists. The boxes represent protein-coding genes and long non-coding RNAs. Black dashes indicate genes for miRNAs and small nucleolar RNAs. microRNAs for which an increase in gene expression in MS in men was detected using RNA sequencing and confirmed earlier on an independent extended sample are in bold [4]

пользовали набор TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Оценку уровня экспрессии методом ПЦР в реальном времени проводили с помощью наборов TaqMan miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, США). Уровень экспрессии нормализовали на эндогенные контролы (*RNU6B* и *RNU48*). Значимость различий уровней экспрессии микроРНК между исследуемыми группами оценивали с помощью теста Манна–Уитни. МикроРНК считали дифференци-

Таблица 1. Демографические и клинические характеристики больных PPC, включенных в исследование

Table 1. Demographic and clinical characteristics of RRMS patients included in the study

Характеристика	PPC, мужчины		PPC, женщины	
	ремиссия	обострение	ремиссия	обострение
Число больных	10	6	10	10
Возраст, годы	31,7±7,3	34,3±10,1	31,0±6,6	29,1±8,1
EDSS на момент обследования, баллы	2,1±0,8*	3,5±0,8*	2,1±0,8	2,6±0,7

Примечание. *p=0,018 по данным теста Манна–Уитни.

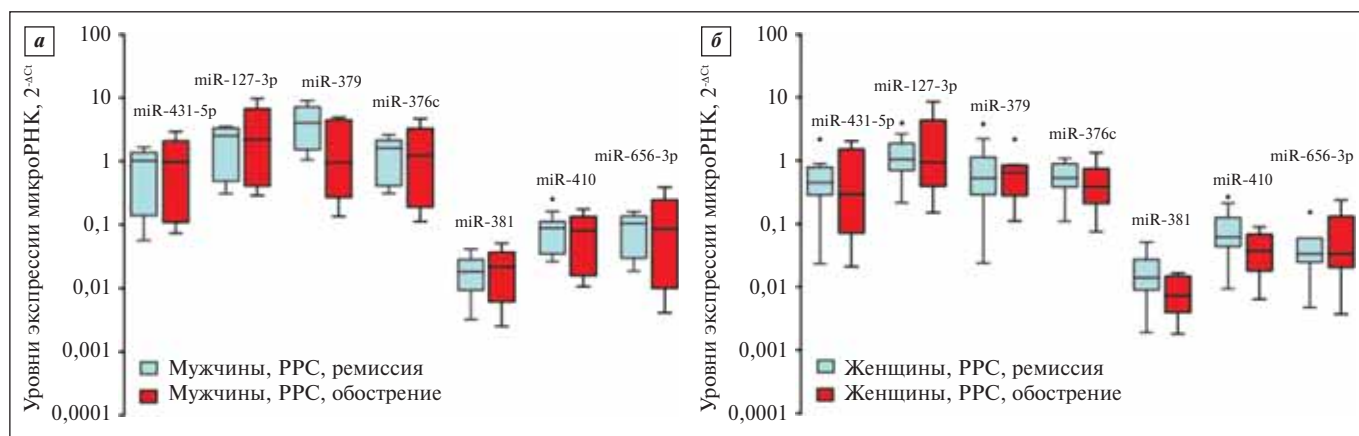


Рис. 2. Уровни экспрессии *miR-431-5p*, *miR-127-3p*, *miR-379*, *miR-376c*, *miR-381*, *miR-410* и *miR-656-3p* в МНК больных РРС в стадии ремиссии и обострения по результатам RT-qPCR-анализа у мужчин (а) и женщин (б). Результаты представлены в виде диаграммы размаха, где обозначены медиана [25-й; 75-й перцентили], минимальное и максимальное значения выборки (в логарифмической шкале). Экспрессия микроРНК рассчитана относительно среднего значения экспрессии малых ядерных РНК RNU6B и RNU48 с использованием метода $\Delta\Delta C_t$

Fig. 2. Expression levels of *miR-431-5p*, *miR-127-3p*, *miR-379*, *miR-376c*, *miR-381*, *miR-410*, and *miR-656-3p* in PBMCs of RRMS patients in remission and relapse according to the results of RT-qPCR analysis in men (a) and women (b). The results are presented as a range diagram, where the median [25th; 75th percentile], the minimum and maximum values of the sample (on a logarithmic scale) are highlighted. MiRNA expression was calculated relative to the mean value of the small nucleolar RNAs RNU6B and RNU48 expression using the $\Delta\Delta C_t$ method

ально экспрессирующей при кратности изменений (fold change, FC) в уровнях экспрессии между сравниваемыми группами более чем в 2 раза; порогом статистической значимости считали $p < 0,05$. Для исследования согласованности экспрессии микроРНК проводили корреляционный анализ. Для построения корреляционной матрицы ис-

пользовали значения $2^{-\Delta C_t}$ различных пар микроРНК и рассчитывали коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (r) с помощью программы Graph Pad Prism; порогом статистической значимости считали $p < 0,05$.

Результаты. При сравнении больных РРС мужчин в стадии ремиссии с больными мужчинами в стадии обострения уровни экспрессии всех исследованных микроРНК из импринтированного локуса *DLK1-DIO3*, а именно: *miR-431-5p*, *miR-127-3p*, *miR-379*, *miR-376c*, *miR-381*, *miR-410* и *miR-656-3p*, не различались (рис. 2, а). У женщин наблюдали аналогичную картину (рис. 2, б).

В табл. 2 (левая панель) представлены данные количественного анализа с использованием теста Манна–Уитни, подтверждающие, что уровни экспрессии микроРНК из локуса *DLK1-DIO3* значимо не меняются в зависимости от стадии клинического течения РРС как у мужчин, так и у женщин.

При сравнении между собой больных РРС мужчин и женщин (см. табл. 2, правая панель), уровни большинства из изучаемых микроРНК, а именно: *miR-431-5p*, *miR-127-3p*, *miR-376c*, *miR-381*, *miR-410* и *miR-656-3p*, в стадии ремиссии значимо не отличались. Исключение составила *miR-379*, уровни которой были значимо выше у мужчин ($p = 0,0006$). В обострении значимых

Таблица 2. Количественный анализ экспрессии микроРНК у больных РРС в стадии ремиссии и в стадии обострения, отдельно для мужчин и женщин, с использованием теста Манна–Уитни

Table 2. Quantitative analysis of miRNA expression in RRMS patients in remission and in the relapse stage, separately for men and women, using the Mann–Whitney test

МикроРНК	Ремиссия по сравнению с обострением				Мужчины по сравнению с женщинами			
	мужчины	женщины	мужчины	женщины	ремиссия	обострение	ремиссия	обострение
	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
miR-431-5p	0,77	>0,999	0,91	0,67	1,31	0,53	1,55	0,59
miR-127-3p	0,61	0,85	0,63	0,95	1,44	0,58	1,48	0,77
miR-379	2,19	0,11	1,39	0,95	4,87	0,0006	3,1	0,31
miR-376c	0,86	0,48	1,22	0,35	2,34	0,089	3,33	0,31
miR-381	0,90	0,98	2,13	0,19	1,03	0,68	2,43	0,19
miR-410	1,24	0,48	2,15	0,11	1,04	0,68	1,8	0,52
miR-656-3p	0,74	0,48	0,69	0,78	1,89	0,19	1,75	0,88

Примечания. FC (fold change) — кратность изменений уровней экспрессии микроРНК между двумя сравниваемыми группами; p-value — величина p . Жирным шрифтом выделены значимые различия экспрессии микроРНК ($-2 < FC < 2$; $p < 0,05$).

различий уровней всех микроРНК между мужчинами и женщинами не наблюдалось.

В то же время при сравнении с мужчинами контрольной группы у больных РРС мужчин и в ремиссии, и в стадии обострения было выявлено значительное повышение уровней изучаемых микроРНК (табл. 3, левая панель). При этом в стадии ремиссии значения FC варьировали в пределах от 5,53 (для miR-656-3p) до 11,08 (для miR-379); повышение экспрессии всех микроРНК характеризовалось уровнем значимости в диапазоне от 0,000011 до 0,015. У мужчин в стадии обострения уровни всех изучаемых микроРНК в сравнении со здоровыми мужчинами также были повышены ($5,06 < FC < 9,56$), для трех из них эти изменения были значимыми ($p=0,019$). У женщин аналогичный анализ показал отсутствие изменений в уровнях экспрессии семи микроРНК вне зависимости от активности патологического процесса (стадии течения РРС) при сравнении с контролем (см. табл. 3, правая панель).

Таким образом, значимое повышение экспрессии всех исследованных микроРНК локуса *DLK1-DIO3* у больных РРС мужчин наблюдается в сравнении с контролем в стадии ремиссии, а трех из них (miR-431-5p, miR-127-3p и miR-381) — также и в стадии обострения. У женщин отсутствие изменений в экспрессии этих микроРНК не было связано с активностью патологического процесса при РРС.

Поскольку дифференциально экспрессирующиеся при РРС гены микроРНК из импринтированного локуса *DLK1-DIO3* имеют кластерную организацию, можно предположить, что по меньшей мере каждый кластер имеет общий/сходный механизм регуляции экспрессии. Для проверки этой гипотезы проведен корреляционный анализ по методу Спирмена, позволивший оценить согласованность уровней экспрессии микроРНК miR-431-5p, miR-127-3p (кластер 14q32.2) и miR-379, miR-376c, miR-381, miR-410 и miR-656-3p (кластер 14q32.31), расположенных в локусе *DLK1-DIO3*, у мужчин и у женщин в группах здоровых контролей и больных РРС. На рис. 3 для здоровых контролей (рис. 3, а) и больных РРС в ремиссии (рис. 3, б) изображены матрицы полученных корреляций, на которых отражены их значимость и рассчитанный коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Все значимые корреляции ($p < 0,05$) были положительными и характеризовались $r \geq 0,66$. У здоровых женщин выявлено семь скоррелированных по экспрессии пар микроРНК, шесть из них были значимо скоррелированы и у женщин, больных РРС (miR-431-5p/miR-127, miR-431-5p/miR-656-3p, miR-127/miR-379, miR-127/miR-376c, miR-127/miR-381 и miR-376c/miR-381); при этом в последней группе обнаружено еще 10 пар микроРНК, характеризующихся значением

$r \geq 0,67$. Среди мужчин выявлено 11 значимо скоррелированных пар у здоровых лиц контрольной группы и 14 — у больных РРС; из них семь пар (miR-431-5p/miR-127, miR-431-5p/miR-376c, miR-127/miR-376c, miR-379/miR-376c, miR-379/miR-656-3p, miR-376c/miR-656-3p и miR-410/miR-656-3p) оказались общими для здоровых контролей и больных РРС. В состав перечисленных пар входят микроРНК как из одного, так и из разных кластеров.

У больных РРС мужчин и женщин наблюдали 10 идентичных пар, что составляет соответственно 71 и 63% от числа всех значимо скоррелированных пар. Среди здоровых индивидов число общих пар между мужчинами и женщинами составляет 36 и 57% от числа значимо скоррелированных пар. Таким образом, в отличие от женщин, у мужчин число общих скоррелированных пар заметно увеличивается при РРС по сравнению с контролем.

В целом, корреляционный анализ Спирмена продемонстрировал высокий уровень попарной корреляции экспрессии микроРНК как у больных РРС, так и у здоровых лиц контрольной группы вне зависимости от пола, тем самым указывая на общую тенденцию этих микроРНК к коэкспрессии. Важно отметить, что коэкспрессия наблюдалась как для генов микроРНК, расположенных внутри одного кластера (14q32.2 или 14q32.31), так и для генов микроРНК, локализованных в разных кластерах. Это может свидетельствовать о существовании общего регуляторного механизма, контролирующего экспрессию микроРНК из локуса *DLK1-DIO3*. В то же время наблюдаются вариabельность скоррелированных пар микроРНК у мужчин и женщин и различия в их числе; наибольшее число пар (16 из 21) наблюдали у женщин с РРС.

Таблица 3.

Количественный анализ экспрессии микроРНК у больных РРС в ремиссии и в стадии обострения по сравнению с индивидами контрольной группы, отдельно для мужчин и женщин, с использованием теста Манна—Уитни

Table 3.

Quantitative analysis of miRNA expression in RRMS patients in remission or exacerbation compared with individuals in the control group, separately for men and women, using the Mann—Whitney test

МикроРНК	Мужчины				Женщины			
	ремиссия по сравнению с контролем		обострение по сравнению с контролем		ремиссия по сравнению с контролем		обострение по сравнению с контролем	
	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
miR-431-5p	6,16	0,0015	7,98	0,019	1,18	0,39	1,29	0,95
miR-127-3p	5,87	0,0011	9,56	0,019	1,13	0,62	1,79	0,67
miR-379	11,08	0,00073	5,06	0,13	0,62	0,31	0,45	0,16
miR-376c	4,71	0,00023	5,49	0,13	1,26	0,43	1,03	0,72
miR-381	5,88	0,00026	6,53	0,019	1,41	0,62	0,66	0,31
miR-410	6,38	0,000011	5,16	0,055	1,89	0,24	0,88	0,56
miR-656-3p	5,53	0,00013	7,45	0,10	1,12	0,52	1,63	0,43

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые различия экспрессии микроРНК ($-2 < FC < 2$; $p < 0,05$).

Обсуждение. Наше исследование показало отсутствие в МНК зависимости уровней экспрессии микроРНК miR-431-5p, miR-127-3p, miR-379, miR-376c, miR-381, miR-410 и miR-656-3p, кодируемых в импринтированном локусе *DLK1-DIO3*, от активности патологического процесса при РРС как у мужчин, так и у женщин. При этом при отдельном сравнении с мужчинами контрольной группы мы наблюдали у больных РРС мужчин в ремиссии картину, сходную с ранее наблюдаемой нами у больных РРС без учета активности патологического процесса [4] — специфическое повышение экспрессии всех исследуемых микроРНК. При обострении РРС значимое повышение экспрессии по сравнению с контролем наблюдали у мужчин для трех микроРНК из семи исследуемых. У женщин при сравнении с контролем различий не наблюдали ни в ремиссии, ни при обострении. Эти данные могут говорить о том, что изменения в экспрессии микроРНК из локуса *DLK1-DIO3* при РС, вероятнее всего, связаны с формированием универсальных механизмов, определяющих фенотип патологического состояния вне зависимости от активности его течения. И в ремиссии, и в стадии обострения значимых различий уровней отдельных микроРНК между мужчинами и женщинами не наблюдалось, за исключением miR-379, которая характеризуется более высокой экспрессией в ремиссии у мужчин по сравнению с женщинами.

Ранее в ряде работ были обнаружены изменения в экспрессии отдельных микроРНК из этого локуса при РРС. Однако эти исследования проводились в смешанных по полу группах и без учета стадий течения заболевания. Уровни miR-433-3p, miR-485-3p и miR-432-5p различались у больных РРС по сравнению с больными первично- и вторично-прогрессирующим РС [6]. Обнаружена пониженная экспрессия miR-494 в Т-клетках больных РС по сравнению с контрольной группой [7].

Интересно отметить, что снижение уровня экспрессии miR-411* из *DLK1-DIO3* импринтированного локуса наблюдали в периферической крови больных РРС, принимавших натализумаб, при сравнении с больными РРС, не принимавшими иммуномодулирующих препаратов [8]. В контексте наших результатов, свидетельствующих о повышенной экспрессии этой микроРНК в МНК больных РРС, эти данные могут стать отправной точкой для изучения экспрессии микроРНК из этого локуса в поисках перспективных биомаркеров эффективности лечения РРС.

Высокая согласованность экспрессии генов микроРНК вне зависимости от их расположения в том или ином кластере локуса *DLK1-DIO3* указывает на существование общего механизма регуляции генов микроРНК. Тот факт, что мы наблюдали коэкспрессию выбранных генов микроРНК, расположенных в обоих кластерах при РРС, позволяет нам предположить, что не

только исследуемые гены микроРНК, но и весь пул микроРНК, кодируемых в этом локусе, ассоциирован с РС. В этом случае выявленные изменения уровня микроРНК при РС являются следствием изменения общего механизма регуляции экспрессии микроРНК из этого локуса при заболевании. В то же время не обязательно все микроРНК из локуса, а только некоторые из них могут принимать непосредственное участие в патогенезе РС.

Существование общего регуляторного механизма для генов микроРНК, вовлеченных в развитие РС, может быть связано с рядом факторов, которые регулируют транскрипцию на эпигенетическом (например, метилирование ДНК или модификации гистонов) и/или геномном уровне (например, факторы транскрипции, которые могут быть универсальными для генов микроРНК, расположенных в локусе).

Таким образом, вопрос о механизмах, ответственных за изменение экспрессии микроРНК при РС, остается открытым. Учитывая, что наблюдаемые при РС изменения экспрессии микроРНК характерны для мужчин, но не для женщин, изучение зависимости от половых гормонов регуляции этого локуса при патологическом состоянии является одним из привлекательных направлений дальнейших исследований.

Здоровый контроль Мужчины								РРС, ремиссия Мужчины							
miR-431	0,98	0,45	0,78	0,35	0,65	0,77		miR-431	0,92	0,68	0,83	0,70	0,56	0,55	
	0,73	miR-127	0,47	0,83	0,25	0,58	0,80		0,96	miR-127	0,73	0,92	0,67	0,56	0,61
	0,60	0,88	miR-379	0,80	0,30	0,80	0,85		0,77	0,77	miR-379	0,88	0,58	0,53	0,78
	0,30	0,68	0,68	miR-376c	0,25	0,73	0,98		0,86	0,76	0,55	miR-376c	0,66	0,58	0,73
	0,43	0,80	0,65	0,87	miR-381	0,43	0,22		0,79	0,72	0,59	0,93	miR-381	0,94	0,69
	0,58	0,57	0,52	0,47	0,48	miR-410	0,82		0,69	0,67	0,67	0,84	0,90	miR-410	0,79
	0,90	0,62	0,58	0,33	0,27	0,42	miR-656		0,88	0,92	0,76	0,60	0,49	0,49	miR-656
Женщины								Женщины							

Рис. 3. Корреляционные матрицы уровней экспрессии микроРНК у здоровых лиц контрольной группы (а) и больных РРС в стадии ремиссии (б). В ячейках представлены значения рассчитанных коэффициентов корреляции при попарном сравнении экспрессии микроРНК, в верхней половине матрицы (относительно диагонали с перечисленными микроРНК) — у мужчин, в нижней — у женщин. miR-431-5p и miR-127-3p экспрессируются из кластера 14q32.2, остальные микроРНК — из кластера 14q32.31. Ячейки, соответствующие значимым корреляциям ($p < 0,05$), выделены серым цветом

Fig. 3. Correlation matrices of miRNA expression levels in healthy controls (a) and RRMS patients in remission (b). The cells show the values of the calculated correlation coefficients for pairwise comparison of miRNA expression, in the upper half of the matrix (relative to the diagonal with the listed miRNAs) in men, in the lower half in women. miR-431-5p and miR-127-3p are expressed from the 14q32.2 cluster, the remaining miRNAs are expressed from the 14q32.31 cluster. Cells corresponding to significant correlations ($p < 0.05$) are highlighted in gray

Половые различия в экспрессии некоторых микроРНК при РС наблюдали также в работе [9], однако сопоставление полученных нами и этими авторами результатов затруднительно, поскольку включенные в их исследование больные РС принимали различные иммуномодулирующие препараты, а это, как известно, может влиять на экспрессию микроРНК. В ряде работ, посвященных анализу данных о половом диморфизме экспрессии микроРНК [10–12], отмечается важный вклад X-хромосомы и половых гормонов в это явление, однако характер гендер-зависимой экспрессии микроРНК недостаточно изучен. Мало что известно об экспрессии микроРНК из *DLK1-DIO3* локуса в контексте гендер-специфичности. Обнаружено, что транскрипция генов *MIR433* и *MIR127*, кодируемых в локусе *DLK1-DIO3*, регулируется эстроген-связанным рецептором ERRγ [13]. Показано, что однонуклеотидный полимор-

физм (SNP) rs4905998 в локусе количественных признаков cis-miR-eQTL на хромосоме 14 ассоциирован с аллель-специфической экспрессией 16 микроРНК из *DLK1-DIO3* импринтированного локуса; по данным полногеномных исследований, SNP rs6575793, который находится в высоком неравновесном сцеплении с SNP rs4905998 (так называемый прокси-SNP), ассоциирован с возрастом менархе [14].

Заключение. В целом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о вовлеченности генов микроРНК из локуса *DLK1-DIO3* в формирование патогенетических механизмов, приводящих к возникновению РРС, но не в процессах, связанных с переходом от ремиссии к обострению. Высокая согласованность экспрессии ряда микроРНК вне зависимости от локализации их генов внутри данного региона предполагает существование общего механизма, регулирующего транскрипцию этих генов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Walton C, King R, Rechtman L, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*. 2020 Dec;26(14):1816–21. doi: 10.1177/1352458520970841. Epub 2020 Nov 11.
- Mills EA, Mirza A, Mao-Draayer Y. Emerging Approaches for Validating and Managing Multiple Sclerosis Relapse. *Front Neurol*. 2017 Mar 29;8:116. doi: 10.3389/fneur.2017.00116
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Aug 3;9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402
- Baulina N, Osmak G, Kiselev I, et al. MiRNAs from DLK1-DIO3 Imprinted Locus at 14q32 are Associated with Multiple Sclerosis: Gender-Specific Expression and Regulation of Receptor Tyrosine Kinases Signaling. *Cells*. 2019 Feb 8;8(2):133. doi: 10.3390/cells8020133
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018 Feb;17(2):162–73. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2. Epub 2017 Dec 21.
- Ebrahimkhani S, Vafaei F, Young PE, et al. Exosomal microRNA signatures in multiple sclerosis reflect disease status. *Sci Rep*. 2017 Oct 30;7(1):14293. doi: 10.1038/s41598-017-14301-3
- Jernas M, Malmeström C, Axelsson M, et al. MicroRNA regulate immune pathways in T-cells in multiple sclerosis (MS). *BMC Immunol*. 2013 Jul 29;14:32. doi: 10.1186/1471-2172-14-32
- Ingwersen J, Menge T, Wingerath B, et al. Natalizumab restores aberrant miRNA expression profile in multiple sclerosis and reveals a critical role for miR-20b. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015 Jan;2(1):43–55. doi: 10.1002/acn3.152. Epub 2014 Dec 5.
- Munoz-Culla M, Irizar H, Saenz-Cuesta M, et al. SncRNA (microRNA & snoRNA) opposite expression pattern found in multiple sclerosis relapse and remission is sex dependent. *Sci Rep*. 2016 Feb 1;6:20126. doi: 10.1038/srep20126
- Cui C, Yang W, Shi J, et al. Identification and Analysis of Human Sex-biased MicroRNAs. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2018 Jun;16(3):200–11. doi: 10.1016/j.gpb.2018.03.004. Epub 2018 Jul 11.
- Dai R, Ahmed SA. Sexual dimorphism of miRNA expression: a new perspective in understanding the sex bias of autoimmune diseases. *Ther Clin Risk Manag*. 2014 Mar 3;10:151–63. doi: 10.2147/TCRM.S33517
- Sharma S, Eghbali M. Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. *Biol Sex Differ*. 2014 Feb 1;5(1):3. doi: 10.1186/2042-6410-5-3
- Song G, Wang L. Transcriptional mechanism for the paired miR-433 and miR-127 genes by nuclear receptors SHP and ERRgamma. *Nucleic Acids Res*. 2008 Oct;36(18):5727–35. doi: 10.1093/nar/gkn567. Epub 2008 Sep 6.
- Huan T, Rong J, Liu C, et al. Genome-wide identification of microRNA expression quantitative trait loci. *Nat Commun*. 2015 Mar 20;6:6601. doi: 10.1038/ncomms7601

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

10.02.2022/17.03.2022/18.03.2022

Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement

Работа поддержана грантом РНФ № 20-75-00046. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The study was supported by the RSF grant No. 20-75-00046. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Баулина Н.М. <https://orcid.org/0000-0001-8767-2958>

Кабаева А.Р. <https://orcid.org/0000-0002-0982-8520>

Бойко А.Н. <https://orcid.org/0000-0002-2975-4151>

Фаворова О.О. <https://orcid.org/0000-0002-5271-6698>