Жанин И.С., Гусар В.А., Тимофеева А.Т., Пинелис В.Г., Асанов А.Ю.
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет)» Минздрава России, Москва, Россия
119991, Москва, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4

Профиль экспрессии микроРНК у больных на ранних стадиях ишемического инсульта

Инсульт является одной из ведущих причин смерти и инвалидизации населения, имеет сложную многофакторную природу и развивается при взаимодействии факторов среды и наследственной предрасположенности, структура и механизмы которых недостаточно изучены. Наиболее часто встречается ишемический инсульт (ИИ).
***Цель** исследования – изучение дифференциальной экспрессии микроРНК (мкРНК) в плазме крови у пациентов с острой и подострой стадиями инсульта.*
***Пациенты и методы.** В исследование включены 10 пациентов с ИИ (5 мужчин и 5 женщин, средний возраст 64,5 года) и 10 добровольцев соответствующего пола и возраста (контрольная группа). С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени был проведен анализ экспрессии 45 мкРНК, выделенных из плазмы крови больных в 1-е и на 8-е сутки после развития ИИ и однократно у лиц контрольной группы.*
***Результаты**. Был сформирован список из 45 мкРНК, которые могут быть потенциальными биомаркерами и/или прогностическими факторами инсульта. Нами были получены данные об уменьшении экспрессии let-7i-3p и miR-23a-3p мкРНК у пациентов в 1-е сутки после развития ИИ по сравнению с таковым в контрольной группе. Экспрессия miR-92b-3p увеличивается у пациентов на 8-е сутки после ИИ. Также были определены гендерные различия в экспрессии let-7i-5p и miR-92b-3p как у пациентов с ИИ, так и у лиц контрольной группы.*
***Заключение**. С помощью анализа in-silico были обнаружены специфические кластеры мкРНК, связанные с особенностями клинических проявлений ИИ. Это может свидетельствовать о том, что у пациентов с благоприятным и неблагоприятным течением инсульта его молекулярная основа может быть различной. Кроме того, необходимо учитывать гендерные различия в экспрессии отдельных мкРНК при оценке их значения в патогенезе и прогнозировании ИИ.*

***Ключевые слова:** инсульт; мкРНК; ишемия; let-7i-3p; miR-23a-3p.*
Контакты:** Алий Юрьевич Асанов; **aliy@rambler.ru
***Для ссылки:** Жанин ИС, Гусар ВА, Тимофеева АТ и др. Профиль экспрессии микроРНК у больных на ранних стадиях ишемического инсульта. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2018;10(3):72–78.*

MicroRNA expression profile in patients in the early stages of ischemic stroke

Zhanin I.S., Gusar V.A., Timofeeva A.T., Pinelis V.G., Asanov A.Yu.
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia
2, Bolshaya Pirogovskaya St., Build. 4, Moscow 119991

Stroke is one of the leading causes of death and disability in the population, has a complex multifactorial nature and develops through the interaction of environmental factors and genetic predisposition, the pattern and mechanisms of which have been insufficiently studied. Ischemic stroke (IS) is most commonly encountered.
***Objective:** to investigate the differential expression of microRNAs (miRNAs) in the plasma of patients in the acute and subacute stages of stroke.*
***Patients and methods.** The investigation enrolled 10 patients (5 men and 5 women; mean age, 64.5 years) with IS and 10 gender- and age-matched volunteers (a control group). A real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to analyze the expression of 45 miRNAs isolated from the plasma samples of the patients on days 1 and 8 after onset of IS and isolated once from those of the controls.*
***Results.** A list of 45 miRNAs, that might be potential biomarkers and/or prognostic factors of stroke, was compiled. The investigation showed a decrease in let-7i-3p and miR-23a-3p miRNA expression in patients on the first day after onset of IS compared to the control group. The expression of miR-23a-3p increased in the patients at 8 days after IS. The patients with IS and the controls both showed gender differences in the expression of let-7i-5p and miR-92b-3p.*
***Conclusion.** The in-silico analysis revealed specific miRNA clusters associated with the peculiarities of clinical manifestations of IS. This may suggest that the patients with the favorable and unfavorable course of stroke may have its different molecular basis. In addition, it is necessary to take into account gender differences in the expression of individual miRNAs in assessing their significance in the pathogenesis and prognosis of IS.*

***Keywords:** stroke; microRNA; ischemia; let-7i-3p; miR-23a-3p.*
Contact:** Aliy Yuryevich Asanov; **aliy@rambler.ru
***For reference:** Zhanin IS, Gusar VA, Timofeeva AT, et al. MicroRNA expression profile in patients in the early stages of ischemic stroke. Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics. 2018;10(3):72–78.*
***DOI:** 10.14412/2074-2711-2018-3-72-78*

По данным ВОЗ, инсульт (острое нарушение мозгового кровообращения) является ведущей причиной смерти и инвалидизации взрослого населения в промышленно развитых странах [1]. В настоящее время существует ряд руководств по диагностике инсульта [2, 3], однако нет его общепринятых клинических критериев. Основным методом верификации и дифференциальной диагностики инсульта является компьютерная (КТ) и магнитно-резонансная (МРТ) томография, которая позволяет выявить структурные повреждения головного мозга, начиная с первых часов их возникновения. В последние годы особый интерес вызывают работы, посвященные так называемой нейроваскулярной единице (НВЕ) – структурно-функциональному комплексу, обеспечивающему работу гематоэнцефалического барьера и гарантирующему скоординированную активность нейронов, глии и эндотелия церебральных сосудов. Основные изменения при ишемическом повреждении мозга происходят именно на уровне НВЕ [4]. В связи с этим существенно расширился ряд специализированных лабораторных исследований, направленных на поиск биохимических маркеров повреждения и репарации клеток мозга. Одним из перспективных направлений является выявление биохимических маркеров, которые отражают структурно-функциональное состояние ключевых мишеней повреждения и репарации при ишемии мозга и позволяют оценивать степень поражения головного мозга на начальном этапе, а также анализировать эффективность лечения, прогноз и возможности реабилитации больных. Такими биохимическими маркерами могут быть, например, СРБ, интерлейкин 6 (ИЛ6), матриксная металлопротеиназа 9, молекулы межклеточной адгезии 1, молекулы сосудистой адгезии 1 [5], уровень копептина в плазме [6], нейрон- и астроцит-специфические белки, мозговой нейротрофический фактор. Тем не менее их специфичность и возможность использования для дифференциальной диагностики инсульта и ассоциированных с ним факторов риска остаются под вопросом [7].

С развитием методов молекулярной биологии перспективным направлением в диагностике и прогнозировании исхода различных заболеваний, в том числе инсульта, стало количественное определение внеклеточной циркулирующей РНК [8]. Внеклеточная некодирующая плазматическая РНК – это класс циркулирующих молекул РНК. Они могут непосредственно изменять экспрессию одного или даже множества генов в клетках [8]. Одним из наиболее распространенных типов внеклеточной РНК является микроРНК (мкРНК), состоящая из 18–24 нуклеотидов. Эти молекулы в составе белкового комплекса RISC (RNA-induced silencing complex – комплекс сайленсинга, индуцированный РНК) частично или полностью комплементарно связываются с РНК-мишенью, что приводит к ее деградации или ингибированию трансляции. Одна мкРНК может регулировать экспрессию сотни генов, как и экспрессия одного гена может регулироваться сотней мкРНК [9]. Состав и количество мкРНК в плазме крови значительно варьируются на протяжении всей жизни в зависимости от возраста, пола и состояния организма [10]. Также установлена важная роль мкРНК при многочисленных патологических состояниях [11–13]. В настоящее время появляются единичные исследования, посвященные изучению дифференциальной экспрессии мкРНК в эксперименте на животных с нарушением мозгового кровообращения [14–16] и определению ее прогностического значения у пациентов с инсультом [8, 17]. Однако место мкРНК в патогенезе и прогнозе инсульта окончательно не установлено.

Цель настоящей работы – изучение дифференциальной экспрессии мкРНК (изменение ее количества) в плазме крови больных с острой (1-я неделя после развития инсульта) и подострой (от 1 до 3 нед) стадиями инсульта [18].

Пациенты и методы. *Группы обследованных.* В исследование включены 10 больных ишемическим инсультом (ИИ). У всех пациентов собирали данные семейного анамнеза, проводили клиническую оценку тяжести состояния, КТ или МРТ головного мозга для установления точного диагноза и определения объема поражения. *Критериями исключения* были геморрагический инсульт и острые инфекционные заболевания.

До проведения анализа крови у пациентов определяли тяжесть инсульта по NIHSS (**N**ational **I**nstitutes of **H**ealth **S**troke **S**cale) [19], которая позволяет оценить неврологические расстройства в баллах: от 0 баллов (отсутствие) до 42 баллов (максимально негативный результат).

В контрольную группу вошли 10 волонтеров соответствующего пола и возраста без хронической ишемической болезни сердца и инсульта в анамнезе (табл. 1).

Исследование было одобрено этическим комитетом Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России; все пациенты и волонтеры были ознакомлены с целями исследования и подписали информированное согласие на участие в нем.

Формирование списка мкРНК для исследования. Основываясь на результатах собственных исследований [20], а также на анализе публикаций и баз данных, характеризующих взаимодействие мкРНК с генами, вовлеченными в процессы апоптоза, нейрогенеза, нейропротекции и воспаления (miRWalk v.2.0 [21] и miRBase [22]), был сформирован список из 45 мкРНК, которые могут быть потенциальными биомаркерами и/или прогностическими факторами инсульта.

Получение плазмы крови и выделение мкРНК. Кровь (2–5 мл) брали у пациентов в 1-е (не позднее 16 ч с момента госпитализации и 24 ч с момента появления симптомов) и на 8-е сутки после развития ИИ и однократно у лиц контрольной группы. Образцы крови сразу центрифугировали при +4 °С 300×g в течение 20 мин, отбирали супернатант, который снова центрифугировали при +4 °С 15 000×g в течение 15 мин. После второго центрифугирования супернатант (очищенную плазму) хранили в кельвинаторе при -80 °С до выделения РНК.

МкРНК выделяли из 400 мкл плазмы при помощи набора miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия), согласно рекомендациям производителя. При выделении мкРНК после этапа денатурации добавляли 7 мкл cel-miR-39 (рабочая концентрация $1{,}6\times10^8$ копий/мкл) в качестве экзогенного контроля. Элюция осуществлялась в 10 мкл воды без РНК. В среднем концентрация мкРНК была в пределах 10–15 нг/мкл.

Реверс-транскрипция и ПЦР в реальном времени. Реверс-транскрипция осуществлялась с помощью набора miRNeasy miScript II RT Kit (Qiagen, Германия), согласно рекомендациям производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили с использова-

нием реактивов фирмы Qiagen (Германия). В готовых планшетах для амплификации содержались праймеры к 45 исследуемым мкРНК и экзогенному контролю (cel-miR-39), на планшете также присутствовал контроль прохождения ПЦР. Для ПЦР в реальном времени использовали амплификатор Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США). Контроль качества ПЦР осуществляли по анализу кривых плавления мкРНК, а также по сходимости между запусками значений Ct искусственного контроля ПЦР. Каждый образец выполняли в двух повторах.

Для всех образцов мкРНК была выбрана единая величина порогового уровня, относительно которой вычисляли значения Ct, а затем относительное количество всех мкРНК (RQ) для каждого образца, считая эффективность ПЦР равной 100%.

$$RQ = 2^{Ct_{cel\text{-}miR\text{-}39} - Ct_{miRNA}},$$

где $Ct_{cel\text{-}miR\text{-}39}$ – усредненное значение Ct для cel-miR-39 у каждого образца. Ct_{miRNA} – усредненное значение Ct каждой мкРНК у каждого образца.

Статистический анализ данных. Статистический анализ и визуализацию полученных данных проводили в среде программирования R. Для определения формы распределения данных применяли тест Шапиро–Уилка. Описательная статистика для нормального распределения представлена в виде среднего ± стандартная ошибка среднего, для ненормального – в виде медианы [первый квартиль, третий квартиль], а для категориальных данных – в виде процентов и частот. Для оценки различий между несвязанными выборками с нормальным распределением использовали t-тест Стьюдента, с ненормальным распределением – U-критерий Манна–Уитни, а между связанными выборками – критерий Уилкоксона. Сравнение категориальных данных проводили с помощью точного теста Фишера. Для определения корреляции использовали корреляционный анализ по методу Спирмена. Дифференциацию пациентов с ИИ и лиц контрольной группы осуществляли посредством анализа ROC-кривой (операционная характеристика приемника) и значения площади под кривой (AUC). Для каждого типа мкРНК определяли оптимальное значение точки отсечения по наибольшей сумме чувствительности и специфичности.

Результаты. *Клинический анализ.* Данные обследования 10 больных с острым ИИ (1-е и 8-е сутки) и 10 волонтеров приведены в табл. 1. Не обнаружено статистически значимых различий демографических и сосудистых факторов риска у больных и лиц контрольной группы.

Все больные были разделены на две группы: 1-я группа – пациенты с увеличением (в среднем на 6 баллов) показателя по NIHSS на 8-е сутки (n=4) и 2-я группа – пациенты с уменьшением (в среднем на 4,8 балла) данного параметра (n=6). Соответственно в 1-й группе были пациенты с ухудшением неврологического статуса, а во 2-й – с улучшением (части из них проводился тромболизис).

Согласно рекомендациям, предложенным F. Marabita и соавт. [23], осуществляли поиск стабильных мкРНК для последующего определения нормированного значения относительной экспрессии. Из 45 представленных мкРНК были выбраны такие, у которых значение Ct во всех образцах не превышало 35 циклов. Для этих мкРНК были рассчитаны значения стабильности с использованием алгоритмов geNorm (ScoregeNorm) [24], Normfinder (ScoreNormfinder) [25], а также алгоритма, основанного на коэффициенте вариации (ScoreCV). Для определения наиболее стабильных мкРНК использовали суммарный коэффициент стабильности (SSS), который вычисляли как квадратный корень из суммы квадратов всех вышеуказанных коэффициентов:

$$SSS = \sqrt[2]{ScoregeNorm^2 + ScoreNormfinder^2 + ScoreCV^2}.$$

Чем меньше значение данного коэффициента, тем более стабильной является мкРНК. В нашем исследовании наиболее стабильной оказалась miR-21-5p мкРНК с SSS равным 2,68. Однако по сравнению с данными F. Marabita и соавт. [23] полученный нами показатель SSS значительно больше, что указывает на недостаточную стабильность данной мкРНК. Кроме того, есть сведения, что miR-21-5p может являться одним из биомаркеров ИИ [26], и это ставит под сомнение ее пригодность для внутреннего контроля. Мы предприняли попытки нормирования результатов, используя подход R. Qureshi и A. Sacan [27], но не получили достоверных результатов. Таким образом, было решено отказаться от использования конкретной мкРНК в качестве эндогенного контроля и анализировать экспрессию мкРНК, опираясь на немодифицированные значения RQ, как рекомендует фирма Qiagen.

Были проанализированы значения экспрессии 45 мкРНК, выделенных из плазмы крови пациентов с ИИ, а также лиц контрольной группы. Установлено, что у больных ИИ как в 1-е, так и на 8-е сутки медиана экспрессии исследуемых мкРНК уменьшалась по сравнению с показателями у лиц контрольной группы (коэффициент изменения, КИ=1,72). В 1-е сутки у всех больных по сравнению с контролем достоверно уменьшалась экспрессия let-7i-3p и miR-

Таблица 1. *Клиническая характеристика пациентов с ИИ и лиц контрольной группы*

Показатель	Пациенты с ИИ (n=10)	Контрольная группа (n=10)	p
Пол (мужской/женский), n	5/5	5/5	1
Возраст (±SD), годы	64,5±2,9	62±2,2	0,51
АГ, %	50	30	0,36
Атеросклероз, %	40	–	–
СД, %	40	30	0,64
Объем поражения мозга (Me), мм³	5338,55	–	–
Локализация поражения (левое/правое полушарие), n	4/6	–	–
NIHSS (Me), баллы:			
1-е сутки	11,5	–	–
8-е сутки	9,5	–	–

Примечание. АГ – артериальная гипертензия; СД – сахарный диабет; Me – медиана.

Таблица 2. *Изменения экспрессии мкРНК в плазме крови у пациентов в 1-е и на 8-е сутки после ИИ и у лиц контрольной группы*

мкРНК	Пациенты с ИИ в 1-е сутки/ лица контрольной группы, КИ	p*	Пациенты с ИИ на 8-е сутки/ лица контрольной группы, КИ	p*	Пациенты с ИИ на 8-е/ 1-е сутки, КИ	p**
let-7i-3p	0,010	0,024	0,423	0,209	40,495	0,018
miR-22-3p	0,141	0,064	0,449	0,528	3,180	0,028
miR-22-5p	0,347	1,000	0,108	0,019	0,311	0,655
miR-23a-3p	0,714	0,016	0,387	0,083	0,541	0,674

Примечание. * – тест Манна–Уитни; ** – тест Уилкоксона. Курсивом обозначены полученные значения относительной экспрессии (p<0,05).

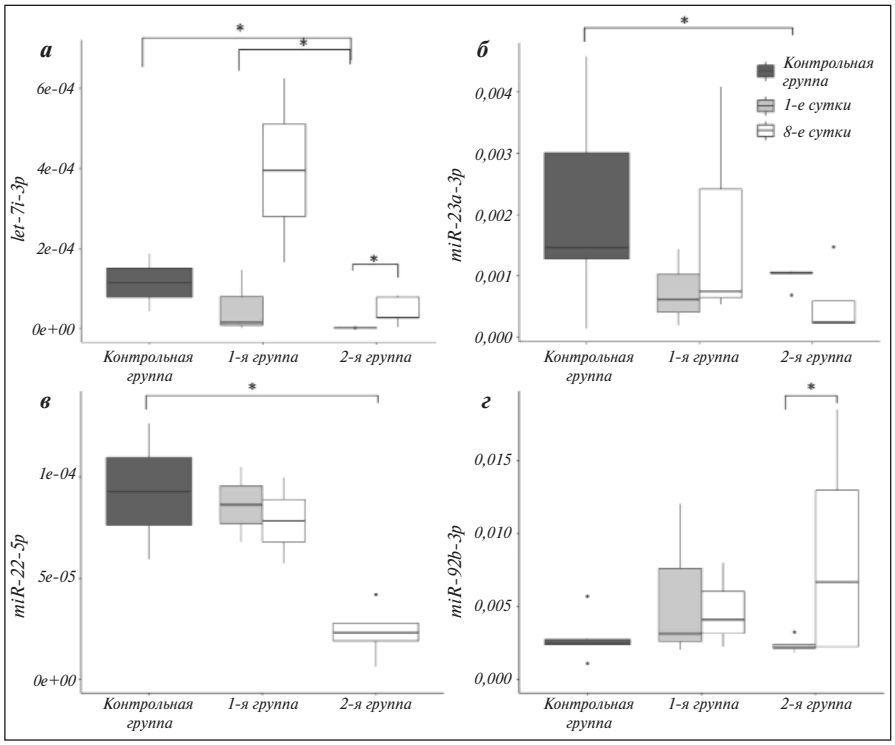

Рис. 1. *Уровни нормированной на cel-miR-39 экспрессии мкРНК let-7i-3p (а), miR-23a-3p (б), miR-22-5p (в) и miR-92b-3p (г) у пациентов 1-й группы (с увеличением показателя по шкале NIHSS на 8-е сутки) и 2-й группы (с уменьшением показателя по шкале NIHSS на 8-е сутки) в 1-й и на 8-й день после ИИ и у лиц контрольной группы. Данные представлены в виде медианы и квартилей. Точкой обозначены выбросы – значения, которые больше 3-го квартиля или меньше 1-го на 1,5×ИКР; ИКР – расстояние между 1-м и 3-м квартилями. * – p<0,05 для связанных выборок – по критерию Уилкоксона, для несвязанных выборок – по U-критерию Манна–Уитни*

23a-3p, а на 8-е сутки – экспрессия miR-22-5p (табл. 2). Экспрессия let-7i-3p и miR-22-3p также была статистически значимо снижена у пациентов на 8-е сутки после ИИ по сравнению с 1-ми сутками.

Далее мы показали, что экспрессия let-7i-3p была достоверно ниже в 1-е сутки у пациентов 2-й группы по сравнению с пациентами 1-й группы и лицами контрольной группы. Ее экспрессия достоверно увеличивалась более чем в 14 раз во 2-й группе на 8-е сутки по сравнению с 1-ми сутками (рис. 1, а). В то же время достоверных различий на 8-е сутки между пациентами 1-й и 2-й групп не обнаружено (p=0,052). Экспрессия miR-23a-3p у пациентов 2-й группы в 1-е сутки после инсульта также была статистически достоверно в 1,4 раза ниже, чем у лиц контрольной группы (рис. 1, б).

МкРНК miR-22-5p не выявлена ни у одного из пациентов 2-й группы в 1-е сутки, поэтому невозможно формально посчитать статистическую значимость различий в экспрессии данной мкРНК между группами. На 8-е сутки у пациентов 2-й группы экспрессия данной мкРНК увеличилась и ее можно было обнаружить, хотя она была в 13 раз ниже, чем у лиц контрольной группы (рис. 1, в). Экспрессия мкРНК miR-92b-3p достоверно увеличилась более чем в 5 раз во 2-й группе на 8-е сутки по сравнению с 1-ми (рис. 1, г).

Для оценки диагностического значения экспрессии let-7i-3p и miR-23a-3p как потенциальных биомаркеров инсульта был проведен анализ ROC-кривых с последующим вычислением площади под кривой (AUC). Кривые для let-7i-3p (рис. 2, *а*) и miR-23a-3p (рис. 2, *б*) отчетливо демонстрируют различие между пациентами с ИИ и лицами контрольной группы, у которых AUC равна 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 $0{,}4\times10^4$ с чувствительностью 66,7% и специфичностью 100%; для miR-23a-3p – $11{,}2\times10^4$ с чувствительностью 81,2% и специфичностью 88,9%.

Было проведено сравнение экспрессии мкРНК в плазме крови больных ИИ и лиц контрольной группы в зависимости от пола. Обнаружено снижение экспрессии let-7i-5p (рис 3, *а*) и miR-92b-3p (рис 3, *б*) в крови у женщин даже в норме по сравнению с мужчинами (в 4 и 3 раза соответственно; p<0,05). Также экспрессия этих мкРНК была ниже (let-7i-5p – в 2,5 раза и miR-92b-3p – в 1,6 раза) у мужчин в 1-е сутки после ИИ по сравнению с лицами контрольной

группы. У женщин с ИИ экспрессия miR-92b-3p была выше на 8-е сутки в 4,7 раза по сравнению с лицами контрольной группы.

Обсуждение. На протяжении многих лет белковые биомаркеры, выявленные в сыворотке или плазме при различных заболеваниях, широко используются для оценки их тяжести и прогнозирования. В настоящее время установлено, что циркулирующие нуклеиновые кислоты в образцах периферической крови, в частности циркулирующие мкРНК, могут быть важными звеньями патогенеза и использоваться для диагностики и прогнозирования исходов инсульта [28]. По данным литературы, мкРНК стабильно экспрессируются и циркулируют в крови длительное время, устойчивы к расщеплению нуклеазами [29]. Учитывая это, в настоящей работе были изучены профили экспрессии мкРНК в плазме крови у больных с острой и подострой стадиями ИИ.

Анализ полученных данных показал, что экспрессия большинства из 45 мкРНК уменьшилась у больных по сравнению с лицами контрольной группы. Экспрессия let-7i-3p была достоверно снижена в 1-е сутки у пациентов с ИИ в целом и, в частности, у больных 2-й группы. Кроме того, экспрессия мкРНК let-7i-3p достоверно увеличивалась у пациентов 2-й группы на 8-е сутки ИИ по сравнению с 1-ми сутками (см. рис. 1, *а*). В экспериментах на животных с фокальной ишемией мозга мы установили, что экспрессия этой мкРНК возрастает в крови и мозге крыс на 2-е сутки после ИИ [20]. Ранее было показано, что повышение экспрессии let-7i-3p мкРНК характерно для болезни Паркинсона [30]. Также установлено, что семейство let-7 (куда входит let-7i-3p) участвует в отрицательной регуляции провоспалительных цитокинов, например фактора некроза опухоли α, ИЛ6, индуцибельной NO-синтазы, каспазы 3 [29]. Вместе с тем антагомир let-7f (искусственный блокатор мкРНК) уменьшает объем инфаркта в коре и стриатуме, увеличивает уровень инсулиноподобного фактора роста [29]. Участие let-7i-3p в развитии инсульта не установлено. Однако, по данным литературы, экспрессия «направляющей» цепи этой мкРНК (let-7i-5p) значимо уменьшается в крови у пациентов после инсульта [31]. Значения экспрессии let-7i-5p и let-7i-3p сонаправлены и коррелируют друг с другом у пациентов в 1-е сутки после инсульта (ρ=0,692, p=0,04). В данном исследовании было показано, что экспрессия let-7i-5p статистически значимо различалась у мужчин и женщин как в группе контроля, так и при ИИ (см. рис. 3, *а*). Статистически достоверных различий в экспрессии данной мкРНК у женщин обнаружить не удалось, тогда как у мужчин она значимо уменьшена в 1-е сутки после ИИ по сравнению с мужчинами контрольной группы. Выявленные половые различия в экспрессии let-7i-5p в целом соответствуют данным литературы, поскольку есть сведения, что уровень мкРНК семейства let-7 коррелирует с возрастом и полом [32], а также влияет на продукцию эстрогена [10], который оказывает нейропротективное действие.

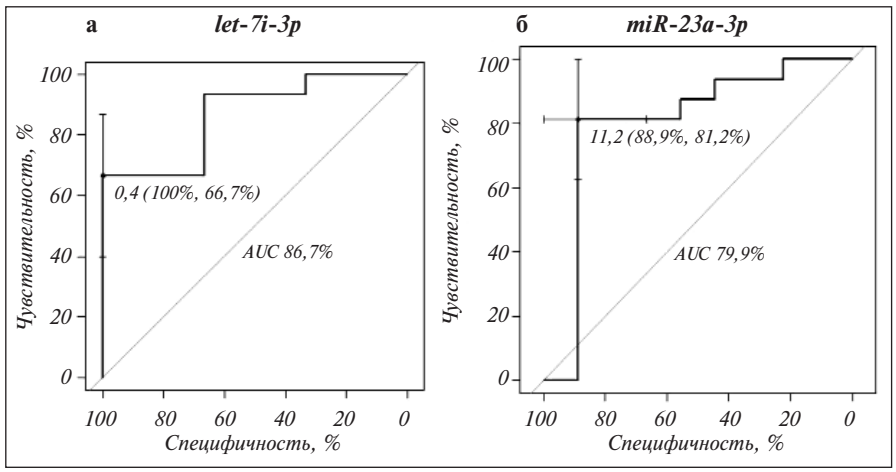

Рис. 2. *ROC-кривая для оценки экспрессии let-7i-3p (а) и miR-23a-3p (б)*

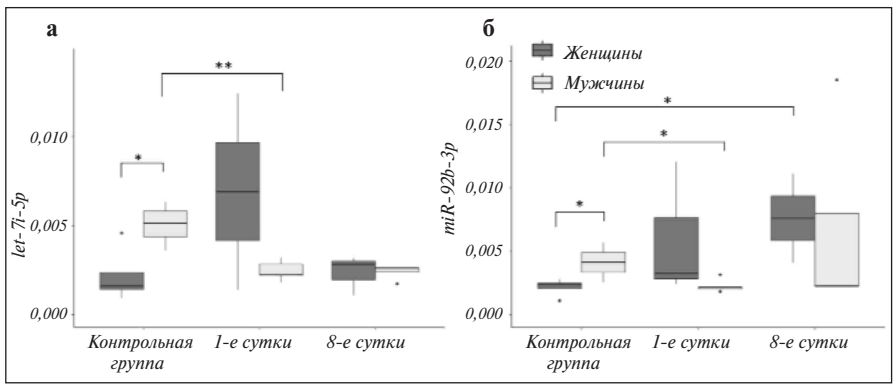

Рис. 3. *Уровни нормированной cel-miR-39 экспрессии мкРНК let-7i-5p (а) и miR-92b-3p (б) у женщин и мужчин в 1-е и на 8-е сутки после ИИ и у лиц контрольной группы. Данные представлены в виде медианы и квартилей. Точками обозначены выбросы – значения, которые больше 3-го квартиля или меньше 1-го на 1,5×ИКР. * – p<0,05, ** – p<0,01 для связанных выборок – по критерию Уилкоксона, для несвязаннаых выборок – по U-критерию Манна–Уитни*

Экспрессия miR-23a-3p также уменьшена в 1-й день после инсульта, что соответствует данным других авторов [5]. Экспрессия этой мкРНК у пациентов 2-й группы статистически значимо отличалась от таковой у лиц контрольной группы, но все же была выше, чем у пациентов 1-й группы, у которых наблюдалось ухудшение состояния на 8-е сутки после ИИ (см. рис. 1, *б*). В экспериментах на животных уровень этой мкРНК повышался как в зоне пенумбры [20], так и в очаге некроза в мозге [33]. Предполагается, что miR-23a-3p может выполнять антиапоптотическую функцию, а также участвовать в антиоксидантной активности и нейропротекции [33].

Полученные в настоящей работе данные о сниженной экспрессии let-7i-3p и miR-23a-3p в плазме крови у всех пациентов демонстрируют диагностическое значение этих мкРНК. При анализе ROC-кривых AUC let-7i-3p и miR-

23a-3p составила соответственно 86,7 и 79,9%, что указывает на возможность использования этого показателя в клинической практике.

Кроме того, по нашим данным, уровень относительной экспрессии miR-22-3p у пациентов 2-й группы в 1-е сутки после ИИ был выше, чем у пациентов 1-й группы; на 8-е сутки у пациентов обеих групп экспрессия этой мкРНК увеличилась в 3 раза по сравнению с 1-ми сутками. Другие авторы не выявили роли miR-22-5p в патогенезе инсульта, однако установили влияние этой мкРНК на развитие инфаркта миокарда: повышение экспрессии miR-22-5p было характерно для больных в острой фазе [34]. Напротив, возрастание экспрессии «ведущей» цепи miR-22-3p проявлялось нейропротекцией в нейродегенеративных моделях *in vitro* [35], а также при ишемии миокарда [36].

На 8-е сутки у наших пациентов также увеличилась экспрессия miR-92b-3p. Во 2-й группе этот показатель статистически значимо повысился в 5,2 раза на 8-е сутки по сравнению с 1-ми (см. рис. 1, *г*). Также обнаружена разница в экспрессии этой мкРНК у женщин и мужчин как в контрольной группе, так и при ИИ. В целом экспрессия miR-92b-3p была выше у женщин, и наблюдалась ее положительная динамика на 8-е сутки после ИИ. В экспериментальных исследованиях нами были показаны такие же изменения экспрессии miR-92b-3p в биоптате мозга и в крови крыс [20]. Один из генов, экспрессию которого регулирует miR-92b-3p – *Gabra3* [37] – расположен на длинном плече X хромосомы и отвечает за синтез одной из субъединиц рецептора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Было показано, что плотность этих рецепторов после инсульта значительно уменьшается [38], а снижение ГАМК-ергического ингибирования коррелирует с восстановлением двигательных функций пациентов [39]. Исходя из этого, можно предположить, что увеличение экспрессии этой мкРНК играет нейропротективную роль.

Заключение. Таким образом, в настоящей работе были описаны изменения экспрессии мкРНК в плазме крови у пациентов с ИИ, паттерны которых способствуют пониманию молекулярных патогенетических механизмов развития инсульта. Основываясь на анализе *in-silico*, мы обнаружили, что специфические кластеры мкРНК связаны с особенностями клинических проявлений инсульта. Это может свидетельствовать о том, что у пациентов с благоприятным и неблагоприятным течением ИИ его молекулярная основа может быть различной. Кроме того, необходимо учитывать гендерные различия экспрессии отдельных мкРНК при оценке их значения для патогенеза и прогнозирования инсульта.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. The top 10 causes of death. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/.
2. ICSI. Diagnosis and Initial Treatment of Ischemic Stroke. https://www.icsi.org/guidelines__more/catalog_guidelines_and_more/catalog_guidelines/catalog_cardiovascular_guidelines/stroke/
3. ISW Party. National clinical guideline for stroke. https://www.strokeaudit.org/SupportFiles/Documents/Guidelines/2016-National-Clinical-Guideline-for-Stroke-5t-(1).aspx
4. VanGilder RL, Rosen CL, Barr TL, et al. Targeting the neurovascular unit for treatment of neurological disorders. *Pharmacol Ther.* 2011 Jun;130(3):239-47. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.12.004. Epub 2010 Dec 21.
5. Sepramaniam S, Tan JR, Tan KS, et al. Circulating microRNAs as biomarkers of acute stroke. *Int J Mol Sci.* 2014 Jan 20;15(1):1418-32. doi: 10.3390/ijms15011418.
6. Choi KS, Kim HJ, Chun HJ, et al. Prognostic role of copeptin after stroke: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Sci Rep.* 2015 Jun 29;5:11665. doi: 10.1038/srep11665.
7. Jickling GC, Sharp FR. Blood biomarkers of ischemic stroke. *Neurotherapeutics.* 2011 Jul;8(3):349-60. doi: 10.1007/s13311-011-0050-4.
8. Mick E, Shah R, Tanriverdi K, et al. Stroke and Circulating Extracellular RNAs. *Stroke.* 2017 Apr;48(4):828-834. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.015140. Epub 2017 Mar 13.
9. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics.* 2014;2014:970607. doi: 10.1155/2014/970607. Epub 2014 Aug 10.
10. 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. eCollection 2014.
11. Pandey AC, Semon JA, Kaushal D, et al. MicroRNA profiling reveals age-dependent differential expression of nuclear factor κB and mitogen-activated protein kinase in adipose and bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2011 Nov 14;2(6):49. doi: 10.1186/scrt90.
12. Ding Y, Yan JL, Fang AN, et al. Circulating miRNAs as novel diagnostic biomarkers in hepatocellular carcinoma detection: a meta-analysis based on 24 articles. *Oncotarget.* 2017 Jul 4;8(39):66402-66413. doi: 10.18632/oncotarget.18949. eCollection 2017 Sep 12.
13. Sempere L, Keto J, Fabbri M. Exosomal MicroRNAs in Breast Cancer towards Diagnostic and Therapeutic Applications. *Cancers (Basel).* 2017 Jun 24;9(7). pii: E71. doi: 10.3390/cancers9070071.
14. Ouyang YB, Lu Y, Yue S, et al. miR-181 regulates GRP78 and influences outcome from cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Neurobiol Dis.* 2012 Jan;45(1):555-63. doi: 10.1016/j.nbd.2011.09.012. Epub 2011 Sep 24.
15. Liu C, Zhao L, Han S, et al. Identification and functional analysis of microRNAs in mice following focal cerebral ischemia injury. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct 14;16(10):24302-18. doi: 10.3390/ijms161024302.
16. Xu LJ, Ouyang YB, Xiong X, et al. Post-stroke treatment with miR-181 antagomir reduces injury and improves long-term behavioral recovery in mice after focal cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 2015 Feb;264:1-7. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.11.007. Epub 2014 Nov 26.
17. Scherrer N, Fays F, Mueller B, et al. MicroRNA 150-5p Improves Risk Classification for Mortality within 90 Days after Acute Ischemic Stroke. *J Stroke.* 2017 Sep;19(3):323-332. doi: 10.5853/jos.2017.00423. Epub 2017 Sep 29.
18. Allen LM, Hasso AN, Handwerker J, et al. Sequence-specific MR Imaging Findings That Are Useful in Dating Ischemic Stroke. *Radiographics.* 2012 Sep-Oct;32(5):1285-97; discussion 1297-9. doi: 10.1148/rg.325115760.
19. NIND. NIH Stroke Scale. https://www.ninds.nih.gov/sites/default/files/NIH_Stroke_Scale.pdf
20. Гусар В, Тимофеева А, Жанин И и др. Оценка временных паттернов экспрессии микроРНК в ткани головного мозга, плазме и лейкоцитах крови крыс. Молекулярная биология. 2017;51(4):683–95. [Gusar V, Timofeeva A, Zhanin I, et al. Evaluation of temporal patterns of MicroRNA expression in brain tissue, plasma and leukocytes of rat blood. *Molekulyarnaya biologiya.* 2017;51(4):683–95. (In Russ.)].
21. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods.* 2015 Aug;12(8):697. doi: 10.1038/nmeth.3485.
22. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D68-73.

doi: 10.1093/nar/gkt1181. Epub 2013 Nov 25.
23. Marabita F, de Candia P, Torri A, et al. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform*. 2016 Mar;17(2): 204-12. doi: 10.1093/bib/bbv056. Epub 2015 Aug 3.
24. Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F, et al. Elimination of Primer–Dimer Artifacts and Genomic Coamplification Using a Two-Step SYBR Green I Real-Time RT-PCR. *Anal Biochem*. 2002 Apr 1;303(1):95-8.
25. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res*. 2004 Aug 1;64(15):5245-50.
26. Zhou J, Zhang J. Identification of miRNA-21 and miRNA-24 in plasma as potential early stage markers of acute cerebral infarction. *Mol Med Rep*. 2014 Aug;10(2):971-6. doi: 10.3892/mmr.2014.2245. Epub 2014 May 16.
27. Qureshi R, Sacan A. A novel method for the normalization of microRNA RT-PCR data. *BMC Med Genomics*. 2013;6 Suppl 1:S14. doi: 10.1186/1755-8794-6-S1-S14. Epub 2013 Jan 23.
28. Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008 Sep 1;79(4):581-8. doi: 10.1093/cvr/cvn156. Epub 2008 Jun 11.
29. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008 Oct;18(10):997-1006. doi: 10.1038/cr.2008.282.
30. Chen Y, Gao C, Sun Q, et al. MicroRNA-4639 Is a Regulator of DJ-1 Expression and a Potential Early Diagnostic Marker for Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2017 Jul 21;9:232. doi: 10.3389/fnagi.2017.00232. eCollection 2017.
31. Jickling GC, Ander BP, Shroff N, et al. Leukocyte response is regulated by microRNA let7i in patients with acute ischemic stroke. *Neurology*. 2016 Nov 22;87(21): 2198-2205. Epub 2016 Oct 26.
32. Rao YS, Mott NN, Wang Y, et al. MicroRNAs in the aging female brain: a putative mechanism for age-specific estrogen effects. *Eur J Neurosci*. 2016 Nov;44(10):2795-2806. doi: 10.1111/ejn.13377. Epub 2016 Sep 14.
33. Zhao H, Tao Z, Wang R, et al. MicroRNA-23a-3p attenuates oxidative stress injury in a mouse model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *Brain Res*. 2014 Dec 10; 1592:65-72. doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.055. Epub 2014 Oct 2.
34. Maciejak A, Kiliszek M, Opolski G, et al. miR-22-5p revealed as a potential biomarker involved in the acute phase of myocardial infarction via profiling of circulating microRNAs. *Mol Med Rep*. 2016 Sep;14(3):2867-75. doi: 10.3892/mmr.2016.5566. Epub 2016 Jul 27.
35. Jovicic A, Zaldivar Jolissaint JF, Moser R, et al. MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific Huntington's disease-related mechanisms. *PLoS One*. 2013;8(1):e54222. doi: 10.1371/journal.pone.0054222. Epub 2013 Jan 17.
36. Chen Z, Qi Y, Gao C. Cardiac myocyte-protective effect of microRNA-22 during ischemia and reperfusion through disrupting the caveolin-3/eNOS signaling. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 May 1;8(5):4614-26. eCollection 2015.
37. Long M, Zhan M, Xu S, et al. miR-92b-3p acts as a tumor suppressor by targeting Gabra3 in pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2017 Oct 27; 16(1):167. doi: 10.1186/s12943-017-0723-7.
38. Paik NJ, Yang E. Role of GABA plasticity in stroke recovery. *Neural Regen Res*. 2014 Dec 1; 9(23):2026-8. doi: 10.4103/1673-5374.147920.
39. Blicher JU, Near J, Næss-Schmidt E, et al. GABA levels are decreased after stroke and GABA changes during rehabilitation correlate with motor improvement. *Neurorehabil Neural Repair*. 2015 Mar-Apr;29(3):278-86. doi: 10.1177/1545968314543652. Epub 2014 Jul 22.

Поступила 20.08.2018

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Исследование не имело спонсорской поддержки. 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.