

Полнотранскриптомный анализ экспрессии микроРНК в мононуклеарных клетках у пациентов с острой декомпенсацией хронической сердечной недостаточности различной этиологии

И.В. Жиров^{1,3}, Н.М. Баулина², С.Н. Насонова¹, Г.Ж. Осьмак², Н.А. Матвеева², Д.Р. Миндзаев¹, О.О. Фаворова², С.Н. Терешенко^{1,3}

¹Научно-исследовательский институт клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

²Институт экспериментальной кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Известно, что микроРНК являются важным регуляторным звеном в патогенезе множества заболеваний, в том числе и сердечно-сосудистых. Разный уровень экспрессии данных молекул при различных патологиях делает микроРНК потенциальным диагностическим и прогностическим биомаркером.

Цель. Анализ уровней экспрессии микроРНК в мононуклеарных клетках крови (МНК) пациентов с острой декомпенсацией хронической сердечной недостаточности (ХСН) различной этиологии и оценка возможности их использования в качестве биологического маркера.

Материалы и методы. Проведено исследование 7 больных мужского пола с острой декомпенсацией ХСН со сниженной фракцией выброса (ФВ), II–IV функционального класса (ФК) по NYHA [среднее значение (М) ФВ 29,2%, стандартное отклонение (SD) 13,27%] в возрасте от 38 до 65 лет [медиана (Ме) 58 лет]. У 3 пациентов сердечная недостаточность развилась вследствие дилатационной кардиомиопатии (ДКМП), у 4 пациентов – на фоне постинфарктного кардиосклероза ишемической природы [группа пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС)]. Группу контроля составили 5 сопоставимых по возрасту (от 41 до 57 лет, Ме 49 лет) здоровых мужчин-добровольцев. Всем пациентам и здоровым-добровольцам проведен полнотранскриптомный анализ экспрессии микроРНК в МНК.

Результаты. Определены дифференциально экспрессирующиеся микроРНК у пациентов с ХСН (вне зависимости от этиологии) по сравнению со здоровыми индивидами: miR-182, miR-144, miR-183, miR-486-5p, miR-143 ($\log_2FC > 1$, FDR p -value $< 0,05$). При сравнении профилей микроРНК в группах ИБС или ДКМП с профилем микроРНК у здоровых индивидов контрольной группы в группе ИБС выявлено значимое повышение экспрессии miR-182, miR-486-5p, miR-183, miR-144, miR-144*, miR-451, miR-143, miR-1180 и понижение экспрессии miR-204, miR-99a ($-1 < \log_2FC > 1$, FDR p -value $< 0,05$), а у больных с ДКМП отмечалось снижение экспрессии miR-143 и miR-10b ($\log_2FC < -1$, FDR p -value $< 0,05$).

Заключение. На основе результатов полнотранскриптомного секвенирования обнаружены микроРНК, связанные с развитием ХСН со сниженной ФВ левого желудочка на фоне имеющегося постинфарктного кардиосклероза.

Ключевые слова: острая декомпенсация хронической сердечной недостаточности, микроРНК, биомаркер, диагностика.

Для цитирования: Жиров И.В., Баулина Н.М., Насонова С.Н. и др. Полнотранскриптомный анализ экспрессии микроРНК в мононуклеарных клетках у пациентов с острой декомпенсацией хронической сердечной недостаточности различной этиологии. Терапевтический архив. 2019; 91 (9): 62–67. DOI: 10.26442/00403660.2019.09.000294

Full-transcriptome analysis of miRNA expression in mononuclear cells in patients with acute decompensation of chronic heart failure of various etiologies

I.V. Zhironov^{1,3}, N.M. Baulina², S.N. Nasonova¹, G.Zh. Osmak², N.A. Matveyeva², D.R. Mindzaev¹, O.O. Favorova², S.N. Tereshchenko^{1,3}

¹Myasnikov Institute of Clinical Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia;

²Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russia

It is known that micro RNAs are an important regulatory element in the pathogenesis of many diseases, including cardiovascular diseases. Different levels of expression of these molecules in various pathologies makes miRNA a potential diagnostic and prognostic biomarker.

Aim. Analysis of miRNA expression levels in mononuclear blood cells (MBC) of patients with acute decompensation of chronic heart failure (CHF) of various etiologies and evaluation of the possibility of their use as a biological marker.

Materials and methods. 7 male patients with acute decompensation of CHF with a reduced ejection fraction (EF), NYHA functional class II–IV (FC) according to NYHA [mean (M) EF 29.2%, standard deviation (SD) 13.27%] in age 38 to 65 years old [median (Me) 58 years]. In 3 patients, heart failure developed as a result of dilated cardiomyopathy (DCMP), in 4 patients – against the background of post-infarction cardiosclerosis of the ischemic nature [group of patients with coronary heart disease (CHD)]. The control group – 5 age-matched (from 41 to 57 years old, Me 49 years old) healthy male volunteers. A complete transcript analysis of miRNA expression in MNCs was performed for all patients and healthy volunteers.

Results. Differentially expressed miRNAs were determined in patients with CHF (regardless of etiology) compared with healthy individuals: miR-182, miR-144, miR-183, miR-486-5p, miR-143 ($\log_2FC > 1$, FDR p -value < 0.05). When comparing miRNA profiles in IHD or DCMP groups with miRNA profile in healthy individuals of the control group in IHD group, a significant increase in miR-182, miR-486-5p, miR-183, miR-144, miR-144*, miR-451 expression was detected, miR-143, miR-1180 and a decrease in the expression of miR-204, miR-99a ($-1 < \log_2FC > 1$, FDR p -value < 0.05), and in patients with DCMP there was a decrease in the expression of miR-143 and miR-10b ($\log_2FC < -1$, FDR p -value < 0.05).

Conclusion. Based on the results of full-transcriptome sequencing, miRNAs associated with the development of CHF with a reduced left ventricular EF on the background of the existing post-infarction cardiosclerosis were detected.

Keywords: acute decompensation of chronic heart failure, miRNA, biomarker, diagnostics.

For citation: Zhiron I.V., Baulina N.M., Nasonova S.N., et al. Full-transcriptome analysis of miRNA expression in mononuclear cells in patients with acute decompensation of chronic heart failure of various etiologies. *Therapeutic Archive*. 2019; 91 (9): 62–67. DOI: 10.26442/00403660.2019.09.000294

АД – артериальное давление
АРМ – антагонист минералокортикоидных рецепторов
БРА II – блокаторы рецепторов ангиотензина II
ДАД – диастолическое артериальное давление
ДКМП – дилатационная кардиомиопатия
ИАПФ – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИМТ – индекс массы тела
МНК – мононуклеарные клетки крови
мРНК – матричная РНК

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения
РНК – рибонуклеиновая кислота
САД – систолическое артериальное давление
СКФ – скорость клубочковой фильтрации
ТБКА – транслюминальная баллонная коронарная ангиопластика
ФВ – фракция выброса
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
ХСН – хроническая сердечная недостаточность
ЧСС – частота сердечных сокращений
miR – микроРНК

Сердечная недостаточность – одно из наиболее серьезных осложнений, возникающих на фоне патологии сердечной мышцы различной этиологии. На сегодняшний день более 30 млн человек во всем мире страдают этим симптомокомплексом, сопряженным с неблагоприятным прогнозом и очень высоким риском госпитализаций, и, к сожалению, число таких больных неуклонно растет.

Полиэтиологичность сердечной недостаточности и зависимость ее течения от множества факторов во многом ограничивают диагностические и терапевтические возможности современной медицины. Выявление маркеров сердечной недостаточности может расширить не только диагностические возможности, но и наши представления о механизмах развития и причинах возникновения этого заболевания. Натрийуретические пептиды доказали свою высокую эффективность в диагностике сердечной недостаточности и уже в течение многих лет рекомендованы для использования в клинической практике Европейским обществом кардиологов [1–4]. Однако на сегодняшний день не существует биологических маркеров, позволяющих од-

новременно как диагностировать сердечную недостаточность, так и определять этиологический фактор, приведший к ней. Не существует также и биологического маркера, способного с высокой чувствительностью и точностью оценивать и прогнозировать дальнейшее течение заболевания.

МикроРНК – семейство малых одноцепочечных некодирующих рибонуклеиновых кислот (РНК), которые негативно регулируют экспрессию белоккодирующих генов на посттранскрипционном уровне за счет связывания со своей мишенью – матричной РНК (мРНК) с ее последующей деградацией или репрессией трансляции. При этом отдельная микроРНК может взаимодействовать с большим количеством мРНК и, наоборот, отдельная мРНК может быть мишенью для многих микроРНК. Установлено, что некоторые микроРНК функционируют не только внутри клеток, но также могут выходить во внеклеточное пространство, участвуя в передаче сигналов между клетками (так называемые циркулирующие микроРНК). Многочисленные исследования позволили обнаружить микроРНК в различных биологических средах организма. Так, известно, что микроРНК содержатся в плазме крови, перитонеальном и плевральном выпоте, моче, цереброспинальной и слезной жидкостях и т.д. [5].

МикроРНК участвуют во множестве как физиологических, так и патогенетических процессов, происходящих в организме человека. В частности, установлено, что микроРНК служат важным звеном в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний [6].

Сходство профилей микроРНК у здоровых лиц, уникальная последовательность нуклеотидов, тканеспецифичность, высокая устойчивость к воздействиям факторов окружающей среды, различия в профилях экспрессии у лиц с различными заболеваниями – все это позволяет рассматривать микроРНК в качестве потенциальных высокоспецифичных диагностических и прогностических биологических маркеров [7]. Целью настоящей работы был анализ уровней экспрессии микроРНК в мононуклеарных клетках крови (МНК) пациентов с острой декомпенсацией хронической сердечной недостаточности (ХСН) различной этиологии и оценка возможности их использования в качестве биологического маркера.

Сведения об авторах:

Батулина Наталья Михайловна – н.с. лаб. функциональной геномики сердечно-сосудистых заболеваний Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0001-8767-2958

Насонова Светлана Николаевна – к.м.н., с.н.с. отд. заболеваний миокарда и сердечной недостаточности НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0002-0920-7417

Осьмак Герман Жакович – м.н.с. лаб. функциональной геномики сердечно-сосудистых заболеваний Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0001-7474-8095

Матвеева Наталья Алексеевна – к.б.н., с.н.с. лаб. функциональной геномики сердечно-сосудистых заболеваний Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0002-4369-2882

Миндзаев Дзамболат Роланович – аспирант отд. заболеваний миокарда и сердечной недостаточности НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0002-2236-3959

Фаворова Ольга Олеговна – д.б.н., проф., г.н.с. лаб. функциональной геномики сердечно-сосудистых заболеваний Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0002-5271-6698

Терещенко Сергей Николаевич – д.м.н., проф., первый зам. ген. дир-ра, зам. ген. дир-ра по научной работе, рук. отд. заболеваний миокарда и сердечной недостаточности ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; ORCID: 0000-0001-9234-6129

Контактная информация:

Жиров Игорь Витальевич – д.м.н., в.н.с. отд. заболеваний миокарда и сердечной недостаточности НИИ клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; e-mail: izhiron@mail.ru; ORCID: 0000-0002-4066-2661

Таблица 1. Клинико-демографическая характеристика пациентов с ХСН [n (%)]

Показатель	ХСН (независимо от этиологии), n=7	ХСН вирусной этиологии (ДКМП), n=3	ХСН на фоне постинфарктного кардиосклероза (ИБС), n=4
Мужской пол	7 (100)	3 (100)	4 (100)
Возраст, годы	58,0 [40,0; 59,0]	40,0 [39,0; 40,0]	59,0 [58,5; 62,0]
ИМТ, кг/м ²	33,8±7,6	33,6±9,7	34,0±7,3
ФВ, %	30,3±12,4	29,5±8,2	31,0±16,2
САД, мм рт. ст.	105,7±16,1	110,0±10,0	102,5±20,6
ДАД, мм рт. ст.	72,8±9,5	70,0±0	70,0±0
ЧСС, уд/мин	88,5±19,7	96,0±25,0	83,0±16,2
Фибрилляция предсердий	3 (42,8)	1 (33,3)	2 (50)
Артериальная гипертония	4 (57,1)	1 (33,3)	3 (75)
Сахарный диабет	5 (71,4)	1 (33,3)	4 (100)
Инфаркт миокарда	4 (57,1)	0 (0)	4 (100)
Курение	5 (71,4)	2 (66,6)	3 (75)
ТБКА	2 (28,5)	0 (0)	2 (50)
Коронарное шунтирование	1 (14,2)	0 (0)	1 (25)
ОНМК	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ХОБЛ	1 (14,2)	0 (0)	1 (25)
ИАПФ/БРА II	7 (100)	3 (100)	4 (100)
Бета-блокаторы	7 (100)	3 (100)	4 (100)
АРМ	7 (100)	3 (100)	4 (100)
Диуретики	7 (100)	3 (100)	4 (100)
Статины	4 (57,1)	0 (0)	4 (100)
Антитромботические препараты	5 (71,4)	2 (66,6)	3 (75)
Креатинин, мкмоль/мл	81,2 [71,5; 156,4]	77,8 [74,6; 81,5]	118,8 [74,6; 179,7]
СКФ (СКД-ЕPI), мл/мин/1,73 м ²	99 [41,0; 108,0]	107,0 [103,0; 109,0]	66,0 [35,5; 99,5]
Калий, ммоль/мл	5,0±0,7	4,6±0,8	5,3±0,5
Натрий, ммоль/мл	139±5,0	138,6±3,7	139,2±6,4
Гемоглобин, г/дл	13,2±3,2	14,3±2,0	12,4±4,0
Мозговой натрийуретический пептид (BNP), пг/мл	500 [238,7; 1262,0]	251,4 [245,0; 721,2]	881,0 [333,6; 2150,0]

Материалы и методы

Для исследования отобрано 7 больных мужского пола с острой декомпенсацией ХСН со сниженной фракцией выброса (ФВ), II–IV функционального класса (ФК) по NYHA [среднее значение (М) ФВ 29,2%, стандартное отклонение (SD) 13,27%] в возрасте от 38 до 65 лет [медиана (Ме) 58 лет]. У 3 пациентов сердечная недостаточность развилась вследствие дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) после перенесенного вирусного заболевания (группа ДКМП), у 4 пациентов – на фоне постинфарктного кардиосклероза ишемической природы [группа пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС)]. Клинико-демографическая характеристика пациентов этих групп представлена в **табл. 1**. Группы пациентов и здоровых добровольцев были сопоставимы по полу и возрасту. Все больные находились на оптимальной медикаментозной терапии, включавшей в себя ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ИАПФ) или, в случае их непереносимости, блокаторы рецепторов ангиотензина II (БРА II), бета-адреноблокаторы, антагонисты минералокортикоидных рецепторов (АРМ) в целевых или максимально переносимых дозах; на момент забора крови все больные находились на активной диуретической терапии. Критериями исключения являлось наличие каких-либо сопутствующих аутоиммунных или онкологических заболеваний, а также активного воспалительного процесса.

В группу контроля включены 5 сопоставимых по возрасту (от 41 до 57 лет, Ме 49 лет) здоровых мужчин-добровольцев. Критериями исключения из данной группы, помимо аутоиммунных или онкологических заболеваний, являлось наличие какой-либо сердечно-сосудистой патологии в анамнезе. От всех пациентов и здоровых добровольцев получено информированное согласие на проведение исследования.

Анализировали экспрессию микроРНК в МНК, которые выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколл-гепака. РНК, содержащую фракцию микроРНК, выделяли из МНК с помощью коммерческих наборов miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя. Оценку качества выделенной РНК, содержащей фракцию микроРНК, проводили с помощью системы капиллярного гель-электрофореза QIAxcel Advanced System (Qiagen, Германия). Для дальнейшего анализа использовали только образцы, индекс целостности РНК (RNA integrity number, RIN) которых был больше 8. Концентрацию микроРНК определяли с помощью высокочувствительного набора для измерения концентрации РНК на флуориметре Quantus (Promega, США).

Образцу РНК от каждого индивида присваивали свой баркод, после чего образцы смешивали в мультиплексные пулы по 4 образца в каждом. Библиотеки для секвенирования приготовлены из 1 мкг РНК, содержащей фракцию микроРНК, с помощью набора для проведения пробоподготовки TruSeq

К статье И.В. Жирова и соавт. «Полнотранскриптомный анализ экспрессии микроРНК в мононуклеарных клетках у пациентов с острой декомпенсацией хронической сердечной недостаточности различной этиологии»

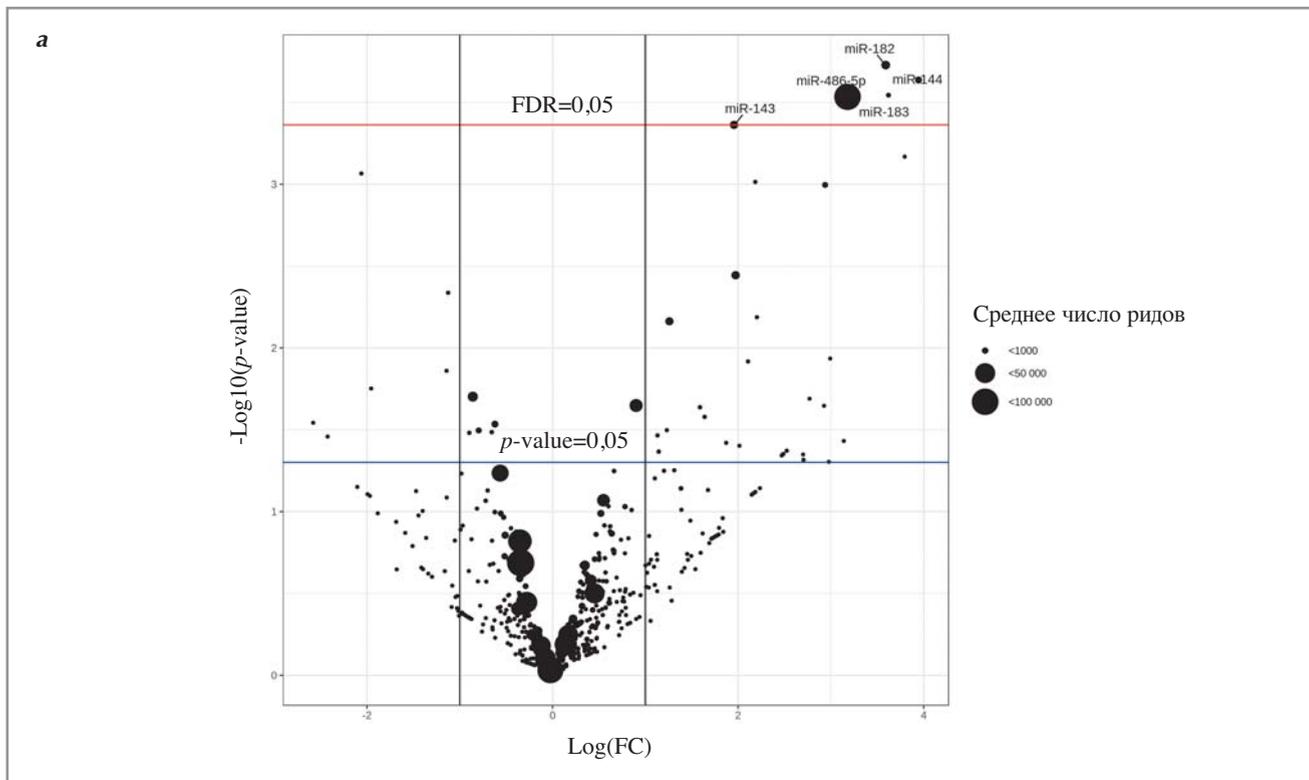


Рис. 1, а. Сравнение полнотранскриптовых профилей экспрессии микроРНК в МНК пациентов с ХСН и в МНК здоровых контролей. Объединенная группа пациентов с ХСН (ИБС и ДКМП).

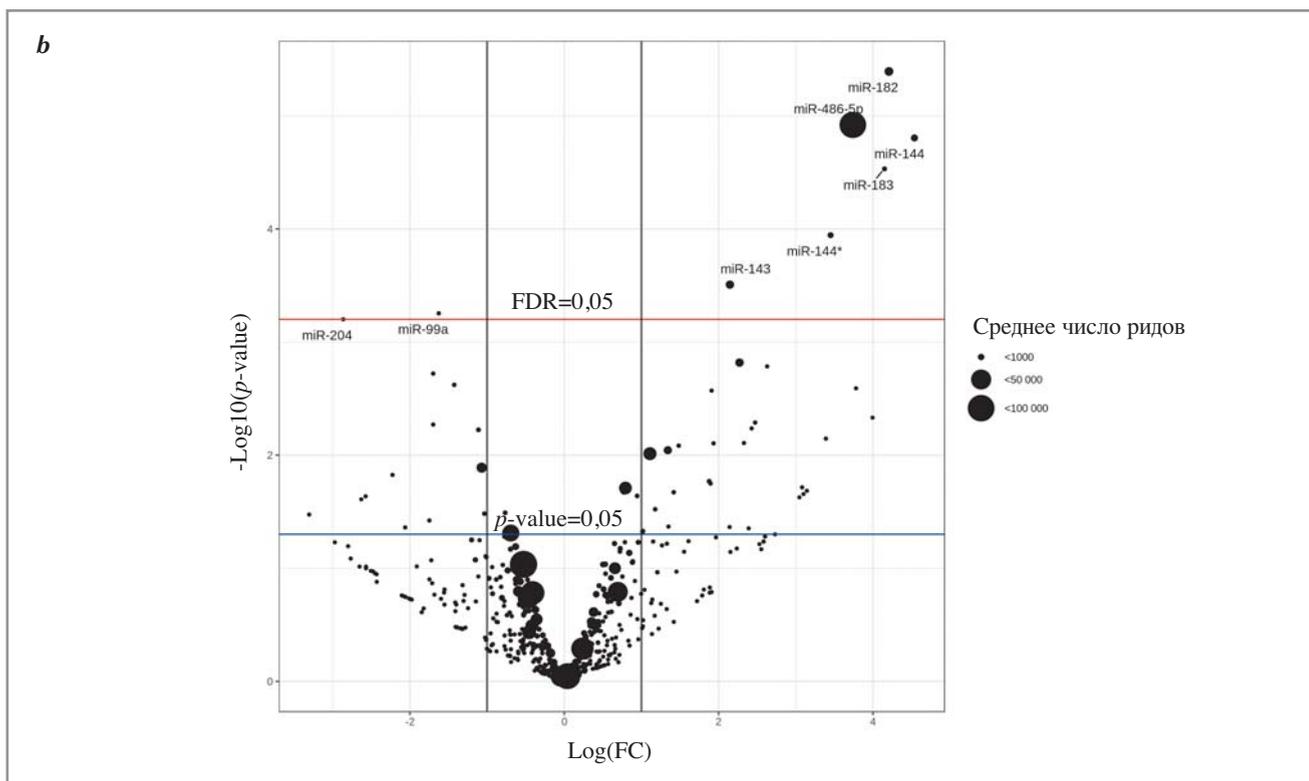


Рис. 1, б. Сравнение полнотранскриптовых профилей экспрессии микроРНК в МНК пациентов с ХСН и в МНК здоровых контролей. Пациенты с ХСН на фоне ИБС.

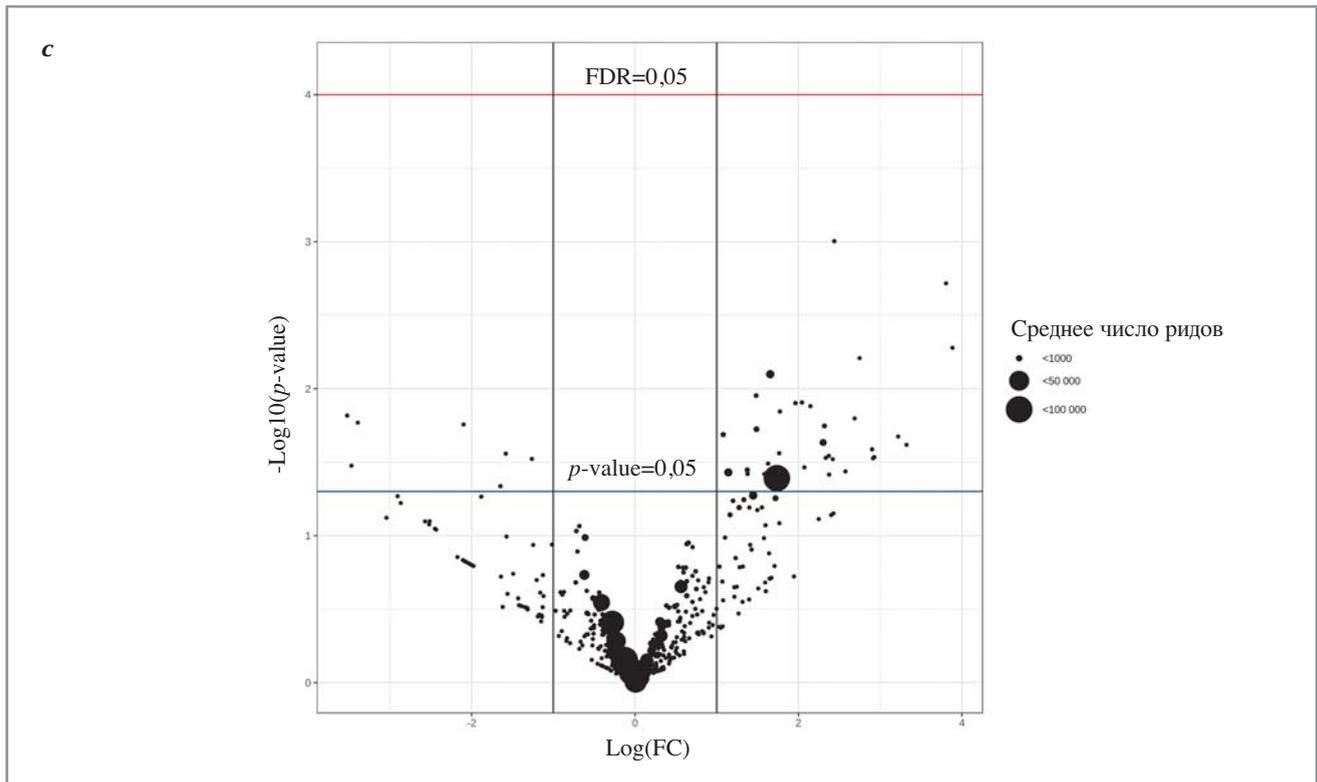


Рис. 1, с. Сравнение полнотранскриптомных профилей экспрессии микроРНК в МНК пациентов с ХСН и в МНК здоровых контролей. Пациенты с ХСН вирусной этиологии.

На графике рассеяния для массива данных (Volcano Plot) представлены попарные сравнения уровней отдельных микроРНК. По оси абсцисс показана кратность изменения уровня экспрессии микроРНК у больных ХСН против контрольной группы (Fold Change, FC) в логарифмической шкале. По оси ординат даны значения p -value (данные представлены как отрицательный десятичный логарифм). Размер точки коррелирует со средним количеством ридов, полученных для данной микроРНК.

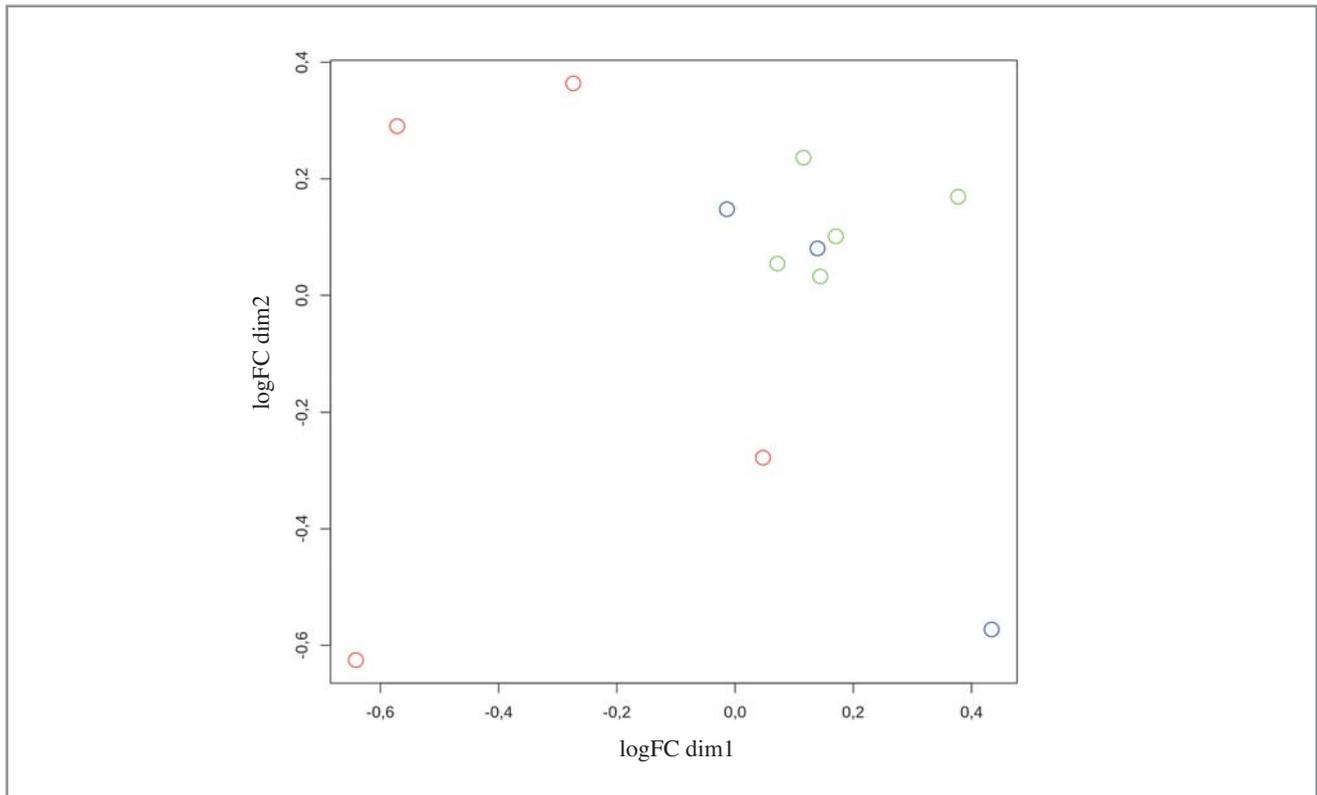


Рис. 2. Двухмерная кластеризация профилей экспрессии всех микроРНК в отдельных образцах больных ХСН и здоровых контролей по методу многомерного шкалирования. Красные кружки – образцы больных ХСН на фоне ИБС; синие кружки – образцы больных ХСН с ДКМП; зеленые кружки – образцы здоровых контролей. По оси абсцисс и ординат даны значения \log_{FC} по двум главным направлениям (dim1 и dim2) рассеяния дисперсий профилей экспрессии микроРНК.

small RNA preparation kit (Illumina, США); секвенирование проводили по протоколу для фрагментов длиной 36 п.о. (36-bp fragment protocol) на секвенаторе MiSeq (Illumina, США).

В результате секвенирования сгенерировано от 2 до 4 млн ридов (прочтений) на один образец. Риды всех образцов разделили в соответствии с баркодами с использованием ПО CASAVA (Illumina, США). Для удаления последовательностей адаптеров использовали ПО Trimmomatic. Все риды выровнены и проаннотированы на базу данных микроРНК miRBase-21 (<http://www.mirbase.org/>).

Анализ дифференциальной экспрессии проводили при помощи статистического пакета edgeR version 3.14.0 из репозитория Bioconductor (<https://bioconductor.org>) по стандартному протоколу, включавшему нормализацию с использованием Relative Log Expression (RLE) метода и оценку дифференциальной экспрессии при помощи обобщенных линейных моделей (GLM). Технические вариации (например, разница в запусках секвенатора) учитывались при моделировании с использованием дизайн-матрицы.

При множественных сравнениях оценки статистической значимости (p -value) корректировали по методу Бенджамини–Хохберга, рассчитывая значение FDR (False Discovery Rate). МикроРНК считали дифференциально экспрессирующейся, если удовлетворялись два критерия: 1) более чем двукратная разница в уровне экспрессии в сравниваемых группах: Fold Change (FC) более 2 (соответственно $-1 < \log_2 FC > 1$); 2) значение FDR $< 0,05$. Для визуализации отношений в профилях экспрессии всех микроРНК у отдельных индивидов использовали функцию plotMDS(), реализованную в пакете edgeR.

Описательная статистика проводилась с помощью пакета программ «SPSS Statistics, версия 23» и представлена в виде среднего \pm стандартное отклонение (при нормальном распределении параметров) и медианы, 25-го и 75-го процентилей (в случае существенного отклонения распределения параметров от нормальных значений). Нормальность распределения определяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова.

Результаты

С помощью высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina) проведен полнотранскриптомный анализ экспрессии микроРНК в МНК 7 пациентов с ХСН (независимо от этиологии) в сравнении с 5 здоровыми индивидами контрольной группы. Полученные результаты в форме графика рассеяния для массива данных (Volcano Plot) при попарных сравнениях уровней отдельных микроРНК у пациентов и здоровых контролей представлены на **рис. 1 (см. на цветной вклейке)**. Выбранным критериям значимости различий в уровнях экспрессии между пациентами с ХСН и индивидами контрольной группы удовлетворяли пять микроРНК: miR-182, miR-144, miR-183, miR-486-5p и miR-143. Как видно из **рис. 1, а (см. на цветной вклейке)**, все они расположены на графике рассеяния в правом верхнем секторе, соответствующем значениям $\log_2 FC > 1$, т.е. уровни их экспрессии выше у больных ХСН по сравнению с контрольной группой. Из данных **табл. 2**, в которой представлены значения $\log_2 FC$, p -value и FDR для этого сравнения, следует, что это превышение довольно значительно: у больных ХСН уровень экспрессии этих микроРНК выше, чем в контрольной группе, примерно от 4 до 10 раз.

Проведена визуализация отношений профилей экспрессии всех микроРНК в отдельных образцах больных ХСН и здоровых контролей (**рис. 2, см. на цветной вклейке**). Видно, что включенные в исследование контрольные образцы компактно кластеризуются вместе с двумя из трех образцов больных ХСН вирусной этиологии (группа ДКМП). В то же время об-

Таблица 2. Дифференциально экспрессирующиеся микроРНК у пациентов с ХСН (независимо от этиологии)

МикроРНК	$\log_2 FC$	p -value*	FDR
miR-182	3,591056	0,000187	0,040208
miR-144	3,943725	0,000231	0,040208
miR-183	3,620737	0,000285	0,040208
miR-486-5p	3,179114	0,000292	0,040208
miR-143	1,955404	0,000434	0,047718

*Здесь и далее данные представлены в порядке возрастания p -value.

Таблица 3. Дифференциально экспрессирующиеся микроРНК у пациентов с ХСН на фоне постинфарктного кардиосклероза (группа ИБС)

МикроРНК	$\log_2 FC$	p -value	FDR
miR-182	4,195471	6,83E-07	0,000282
miR-486-5p	3,722368	1,09E-06	0,000282
miR-183	4,131517	3,86E-06	0,000665
miR-144	4,515446	5,32E-06	0,000687
miR-144*	3,43352	2,46E-05	0,002546
miR-451	2,257259	0,000215	0,01853
miR-143	2,153798	0,000487	0,035947
miR-204	-2,84092	0,000698	0,041545
miR-99a	-1,61028	0,000723	0,041545
miR-1180	2,617273	0,000859	0,044396

Примечание. Здесь и в табл. 4 жирным шрифтом выделены дифференциально экспрессирующиеся микроРНК, выявленные при сравнении всех больных ХСН с группой контроля.

Таблица 4. Дифференциально экспрессирующиеся микроРНК у пациентов с ХСН вирусной этиологии (группа ДКМП)

МикроРНК	$\log_2 FC$	p -value	FDR
miR-143	-1,65093	1,21E-05	0,006307
miR-10b	-2,41568	4,31E-05	0,011233

разцы больных с ХСН ишемической природы (группа ИБС) сильно отличаются по общим профилям экспрессии микроРНК как от образцов контрольной группы, так и между собой. Эти данные свидетельствуют о неоднородности транскрипционных профилей микроРНК у пациентов с ХСН разной этиологии в отличие от профилей здоровых индивидов.

Далее мы сравнили профили микроРНК отдельно в группах ИБС (**рис. 1, б, см. на цветной вклейке**) и ДКМП (**рис. 1, с, см. на цветной вклейке**) с профилем микроРНК у здоровых индивидов контрольной группы. При ХСН на фоне постинфарктного кардиосклероза (группа ИБС) наблюдали повышение экспрессии miR-182, miR-486-5p, miR-183, miR-144, miR-144*, miR-451, miR-143, miR-1180 и понижение экспрессии miR-204, miR-99a (**табл. 3**). Первые 4 микроРНК из этого списка характеризуются весьма высокими уровнями значимости: значения p -value лежат в диапазоне от 6,83E-07 до 5,32E-06, а FDR – от 0,000282 до 0,000687. Сравнение с данными в **табл. 2** показывает, что повышены экспрессирующиеся miR-182, miR-486-5p, miR-183, miR-144 и miR-143 выявлены также при сравнении всех больных ХСН со здоровыми контролями, причем для всех из них, кроме miR-143, уровень экспрессии (значения FC) и уровень значимости (значения p -value и FDR) в общей группе больных ХСН были ниже, чем в группе ИБС. У больных ХСН вирусной этиологии (группа ДКМП) наблюдали только пониженную дифференциальную экспрессию двух микроРНК: miR-143 и miR-10b (**табл. 4**).

Таблица 5. Сводные данные о дифференциально экспрессирующихся микроРНК, выявленных в настоящей работе у пациентов с ХСН различной этиологии

МикроРНК	ХСН (независимо от этиологии) <i>n</i> =7	ХСН на фоне постин- фарктного кардио- склероза (ИБС) <i>n</i> =4	ХСН вирусной этиологии (ДКМП) <i>n</i> =3
miR-182	↑	↑	
miR-486-5p	↑	↑	
miR-183	↑	↑	
miR-144	↑	↑	
miR-144*		↑	
miR-451		↑	
miR-143	↑	↑	↓
miR-204		↓	
miR-99a		↓	
miR-1180		↑	
miR-10b			↓

Примечание. Стрелками показано возрастание ↑ или снижение ↓ экспрессии.

В табл. 5 представлены сводные данные о дифференциально экспрессирующихся микроРНК при ХСН различной этиологии. Как уже отмечалось, в группе ИБС, для которой наблюдали наиболее разнообразный набор дифференциально экспрессирующихся микроРНК, больше половины микроРНК с повышенной экспрессией (miR-182, miR-486-5p, miR-183, miR-144 и miR-143) выявлены также при сравнении всех больных ХСН со здоровыми контролями. По две микроРНК с пониженной экспрессией были идентифицированы в группах ИБС и ДКМП; они не перекрывались и не выявлены в общей группе. Единственной микроРНК, выявляемой при всех типах сравнения, оказалась miR-143. Однако если в общей группе и в группе ИБС ее экспрессия была повышена по сравнению с контролем, то в группе ДКМП – понижена.

Обсуждение

Наблюдаемые различия в профилях экспрессии микроРНК в МНК при ХСН, возникшей вследствие ИБС или вследствие вирусной инфекции, скорее всего, связаны с различными механизмами патогенеза в зависимости от этиологии. В этой работе мы не получили данных в пользу участия микроРНК в формировании ХСН после перенесенной вирусной инфекции. Можно предположить, что они, по меньшей мере, не играют важной роли в этиопатогенезе заболевания. Гораздо больший интерес, как с точки зрения изучения патогенетических механизмов, так и в свете обнаружения потенциальных маркеров ХСН, представляют данные для больных с ХСН на фоне ИБС. У таких больных в настоящем исследовании выявлено 10 дифференциально экспрессирующихся микроРНК, из них miR-182, miR-486-5p, miR-183, miR-144, miR-144*, miR-451, miR-143 и miR-1180 характеризуются повышенной экспрессией, а miR-204 и miR-99a – пониженной экспрессией.

Причастность некоторых из этих микроРНК к сердечно-сосудистым заболеваниям ранее описана в литературе. Здесь следует оговориться, что в большинстве исследований уровни экспрессии микроРНК определяли в сыворотке и плазме крови, тогда как мы для этого использовали МНК. Тем не менее показано, что существует обратная связь между уровнем экспрессии циркулирующей miR-182 и индексом массы

миокарда левого желудочка [8]. В другом исследовании продемонстрировано преимущество miR-182 в прогнозировании смертности у пациентов с сердечной недостаточностью по сравнению с NT-proBNP и С-реактивным белком [9].

Nobuhiro Mukai и соавт. выявили повышенный уровень экспрессии miR-486-5p у пациентов с врожденными пороками сердца со сбросом крови из правых отделов сердца в левые [10].

Особый интерес вызывает miR-144. В литературе описана способность miR-144 индуцировать апоптоз кардиомиоцитов [11]. При использовании мышиных моделей обнаружено, что внутривенное введение miR-144 уменьшает зону некроза при остром инфаркте миокарда [12]. Еще в одном исследовании, проведенном В. Chen и соавт., выявлен повышенный уровень miR-144 в плазме крови у пациентов с ИБС. Также обнаружено, что повышенный уровень этой микроРНК ассоциирован с плохим прогнозом у данной категории больных [13].

Повышенный уровень экспрессии в крови miR-451 также характерен для пациентов с ИБС, вызванной наличием нестабильной бляшки в коронарных артериях [14]. Стоит отметить, что, по данным другого исследования, уровень экспрессии данной микроРНК снижался на фоне терапии статинами у пациентов с нестабильной стенокардией [15].

В целом обнаруженные нами дифференциально экспрессирующиеся микроРНК могут рассматриваться как потенциальные маркеры для диагностики ХСН на фоне постинфарктного кардиосклероза. Однако необходимо отметить, что вопрос об их специфичности требует отдельного изучения, поскольку по результатам многочисленных работ уровень экспрессии некоторых из этих микроРНК изменяется также и при различных онкологических процессах [16, 17].

Заключение

Благодаря своим уникальным свойствам, молекулы микроРНК рассматриваются разными авторами и в качестве перспективных биологических маркеров различных патологических процессов, и в качестве будущего терапевтического «оружия», способного принести победу в битве со множеством неизлечимых на сегодняшний день заболеваний [18]. В то же время способность микроРНК одновременно регулировать экспрессию многих генов остается препятствием для их терапевтического использования. Очевидно, что диагностический и терапевтический потенциал этих молекул будет возрастать по мере расширения наших знаний о регулируемых ими сетях ген-генных взаимодействий [19].

В настоящей работе с использованием подхода без предварительных допущений (hypothesis-free approach), основанного на результатах полнотранскриптомного секвенирования, обнаружены микроРНК, связанные с развитием ХСН со сниженной ФВ левого желудочка на фоне имеющегося постинфарктного кардиосклероза. Однако наблюдаемая высокая гетерогенность по спектру экспрессируемых микроРНК между отдельными пациентами заставляет относиться к полученным результатам с известной осторожностью. Хотя сам факт вовлечения регуляторных молекул микроРНК в формирование ХСН на фоне ИБС представляется убедительно показанным, окончательные выводы об участии отдельных микроРНК могут быть сделаны только после валидации полученных результатов на более крупных группах больных ХСН ишемической природы и здоровых добровольцев.

Работа выполнена в рамках Государственного задания МЗ РФ №01201367594 «Изучение новых диагностических, прогностических маркеров поражения органов-мишеней при декомпенсации сердечной недостаточности».

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016;37:2129-200.
2. Ziaecian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2016 Jun;13(6):368-78.
3. Fuat A, Murphy JJ, Hungin APS, Curry J, Mehrzad AA, Hetherington A, Johnston JI, Smellie WSA, Duffy V, Cawley P. The diagnostic accuracy and utility of a B-type natriuretic peptide test in a community population of patients with suspected heart failure. *Br J Gen Pract*. 2006;56:327-33.
4. Kelder JC, Cowie MR, McDonagh TA, Hardman SM, Grobbee DE, Cost B, Hoes AW. Quantifying the added value of BNP in suspected heart failure in general practice: an individual patient data meta-analysis. *Heart*. 2011;97:959-63.
5. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56:1733-41.
6. Kumar S, Williams D, Sur S, Wang JY, Jo H. Role of flow-sensitive microRNAs and long noncoding RNAs and in vascular dysfunction and atherosclerosis. *Vascular pharmacology*. 2018 Oct 7; pii: S1537-1891(18)30123-X. doi: 10.1016/j.vph.2018.10.001. Epub ahead of print
7. Жиров И.В., Кочетов А.Г., Засеева А.В., Лянг О.В., Скворцов А.А., Абрамов А.А., Гимадиев Р.Р., Масенко В.П., Трещенко С.Н. МикроРНК в диагностике хронической сердечной недостаточности: состояние проблемы и результаты пилотного исследования. *Системные Гипертензии*. 2016;13(1):39-46 [Zhirov IV, Kochetov AG, Zaseeva AV, Lyang OV, Skvortsov AA, Abramov AA, Gimadiev RR, Masenko VP, Tereshchenko SN. MicroRNA in the diagnosis of chronic heart failure: state of the problem and the results of a pilot study. *Systemic Hypertension*. 2016;13(1):39-46 (In Russ.)].
8. Ikitimur B, Cakmak HA, Coskunpinar E, Barman HA, Vural VA. The relationship between circulating microRNAs and left ventricular mass in symptomatic heart failure patients with systolic dysfunction. *Kardiolo Pol*. 2015;73(9):740-6.
9. Cakmak HA, Coskunpinar E, Ikitimur B, Barman HA, Karadag B, Tiryakioglu NO, Kahraman K, Vural VA. The prognostic value of circulating microRNAs in heart failure: preliminary results from a genome-wide expression study. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2015 Jun;16(6):431-7.
10. Mukai N, Nakayama Y, Murakami S, Tanahashi T, Sessler DI, Ishii S, Ogawa S, Tokuhira N, Mizobe T, Sawa T, Nakajima Y. Potential contribution of erythrocyte microRNA to secondary erythrocytosis and thrombocytopenia in congenital heart disease. *Pediatr Res*. 2018 Apr;83(4):866-73.
11. Huang F, Huang XY, Yan DS, Zhou X, Yang DY. MicroRNA-144 over-expression induced myocytes apoptosis. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2011 Apr;39(4):353-7.
12. Li J, Cai SX, He Q, Zhang H, Friedberg D, Wang F, Redington AN. Intravenous miR-144 reduces left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2018 Aug 6;113(5):36.
13. Chen B, Luo L, Wei X, Gong D, Jin L. Altered Plasma miR-144 as a Novel Biomarker for Coronary Artery Disease. *Ann Clin Lab Sci*. 2018 Jul;48(4):440-5.
14. Ren J, Zhang J, Xu N, Han G, Geng Q, Song J, Li S, Zhao J, Chen H. Signature of circulating microRNAs as potential biomarkers in vulnerable coronary artery disease. *PLoS One*. 2013 Dec 5;8(12):e80738.
15. Zhang J, Ren JY, Chen H, Han GP. Statins decreases expression of five inflammation-associated microRNAs in the plasma of patients with unstable angina. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2015 Oct 18;47(5):761-8.
16. Wang S, Yang MH, Wang XY, Lin J, Ding YQ. Increased expression of miRNA-182 in colorectal carcinoma: an independent and tissue-specific prognostic factor. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 May 15;7(6):3498-503.
17. Zhang Y, Guan DH, Bi RX, Xie J, Yang CH, Jiang YH. Prognostic value of microRNAs in gastric cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Jun 21;8(33):55489-510.
18. Ромакина В.В., Жиров И.В., Насонова С.Н., Засеева А.В., Кочетов А.Г., Лянг О.В., Трещенко С.Н. МикроРНК как биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний: большие возможности малых молекул. *Кардиология*. 2018;58(1):66-71 [Romakina VV, Zhirov IV, Nasonova SN, Zaseeva AV, Kochetov AG, Liang OV, Tereshchenko SN. MicroRNA as Biomarkers of Cardiovascular Diseases: Large Opportunities of Small Molecules. *Cardiology*. 2018;58(1):66-71 (In Russ.)]. doi: 10.18087/cardio.2018.1.10083
19. Baulina N, Osmak G, Kiselev I, Matveeva N, Kukava N, Shakhnovich R, Kulakova O, Favorova O. NGS-identified circulating miR-375 as a potential regulating component of myocardial infarction associated network. *J Mol Cell Cardiol*. 2018 Aug;121:173-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.07.129

Поступила 07.03.2019