

Циркулирующие микроРНК-21-5р, микроРНК146а-5р, микроРНК320а-3р у пациентов с фибрилляцией предсердий в сочетании с гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца

Васильев С. В.¹, Аксельрод А. С.¹, Желанкин А. В.², Щекочихин Д. Ю.¹, Генерозов Э. В.², Шарова Е. И.², Стоногина Д. А.¹

¹ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). Москва; ²ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России. Москва, Россия

Цель. Изучение профилей циркулирующих внеклеточных микроРНК плазмы крови, потенциально связанных с патогенезом сердечно-сосудистых заболеваний, у пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП) на фоне гипертонической болезни (ГБ) или ишемической болезни сердца (ИБС).

Материал и методы. В исследование были включены пациенты с ФП на фоне ГБ (n=21) или на фоне ИБС (n=10), а также контрольные группы: пациенты с неосложнённой ГБ без ФП (n=28), пациенты со стабильной ИБС без ФП (n=10) и условно здоровые лица (n=30). Образцы микроРНК были выделены из плазмы крови участников исследования. Детекцию микроРНК проводили с помощью количественной полимеразной цепной реакции с использованием специфических зондов TaqMan. Относительные уровни пяти кандидатных микроРНК в плазме были рассчитаны по отношению к референсной микроРНК miR-16-5р.

Результаты. Среди проанализированных циркулирующих микроРНК плазмы более высокий уровень miR-320a-3р был ассоциирован с наличием ФП, а повышенные уровни miR-146a-5р и miR-21-5р потенциально ассоциированы как с наличием ФП, так и с наличием ИБС.

Заключение. Обнаружены различия в профилях микроРНК плазмы (miR-21-5р, miR-320a-3р, miR-146a-5р) между пациентами с ФП,

независимо от сопутствующего заболевания (ИБС или ГБ) и условно-здоровыми лицами контрольной группы.

Ключевые слова: циркулирующие микроРНК, фибрилляция предсердий, гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, полимеразная цепная реакция.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено при поддержке грантов: РФФИ № 18-54-53036 ГФЕН_а и 18-00-01661 КОМФИ.

Поступила 17/02-2021

Рецензия получена 29/03-2021

Принята к публикации 25/05-2021



Для цитирования: Васильев С. В., Аксельрод А. С., Желанкин А. В., Щекочихин Д. Ю., Генерозов Э. В., Шарова Е. И., Стоногина Д. А. Циркулирующие микроРНК-21-5р, микроРНК146а-5р, микроРНК320а-3р у пациентов с фибрилляцией предсердий в сочетании с гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022;21(1):2814. doi:10.15829/1728-8800-2022-2814

Circulating miR-21-5p, miR-146a-5p, miR-320a-3p in patients with atrial fibrillation in combination with hypertension and coronary artery disease

Vasiliev S. V.¹, Akselrod A. S.¹, Zhelankin A. V.², Schekochikhin D. Yu.¹, Generezov E. V.², Sharova E. I.², Stonogina D. A.¹

¹I. M. Sechenov First Moscow State Medical University. Moscow; ²Federal Research and Clinical Center for Physical and Chemical Medicine of the FMBA of Russia. Moscow, Russia

Aim. To study the plasma profiles of circulating extracellular microRNA (miRNAs), potentially including in pathogenesis of cardiovascular diseases, in patients with atrial fibrillation (AF) in combination with hypertension (HTN) or coronary artery disease (CAD).

Material and methods. The study included patients with AF in combination with HTN (n=21) or CAD (n=10), as well as following control groups: patients with uncomplicated HTN without AF (n=28),

patients with stable CAD without AF (n=10) and healthy individuals (n=30). MiRNA samples were isolated from blood plasma of the study participants. MiRNAs were detected by TaqMan quantitative polymerase chain reaction assay. The relative plasma levels of five candidate miRNAs were estimated relative to the reference miR-16-5p.

Results. Among the analyzed circulating plasma miRNAs, a higher level of miR-320a-3p was associated with AF, while increased levels of miR-

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

e-mail: Lod-kain@yandex.ru

Тел.: +7 (915) 181-25-60

[Васильев С. В.* — аспирант кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики, ORCID: 0000-0003-4845-5402, Аксельрод А. С. — д.м.н., профессор, кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики, ORCID: 0000-0003-3417-794X, Желанкин А. В. — к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики человека, ORCID: 0000-0002-3014-2005, Щекочихин Д. Ю. — к.м.н., доцент кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики, ORCID: 0000-0002-8209-2791, Генерозов Э. В. — к.б.н., зав. лабораторией молекулярной генетики человека, ORCID: 0000-0002-6314-4883, Шарова Е. И. — м.н.с. лаборатории молекулярной генетики человека, ORCID: 0000-0003-3208-9719, Стоногина Д. А. — соискатель кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики, ORCID: 0000-0002-1508-4257].

146a-5p and miR-21-5p are potentially associated with presence of both AF and CAD.

Conclusion. Differences were found in the plasma miRNA profiles (miR-21-5p, miR-320a-3p, miR-146a-5p) between patients with AF, regardless of concomitant disease (CAD or HTN), and healthy individuals in the control group.

Keywords: circulating miRNAs, atrial fibrillation, hypertension, coronary artery disease, polymerase chain reaction.

Relationships and Activities. The study was supported by grants from the Russian Foundation for Basic Research № 18-54-53036 and 18-00-01661.

Vasiliev S. V.* ORCID: 0000-0003-4845-5402, Akselrod A. S. ORCID: 0000-0003-3417-794X, Zhelankin A. V. ORCID: 0000-0002-3014-2005, Schekochikhin D. Yu. ORCID: 0000-0002-8209-2791, Generozov E. V.

ORCID: 0000-0002-6314-4883, Sharova E. I. ORCID: 0000-0003-3208-9719, Stonogina D. A. ORCID: 0000-0002-1508-4257.

*Corresponding author:
Lod-kain@yandex.ru

Received: 17/02-2021

Revision Received: 29/03-2021

Accepted: 25/05-2021

For citation: Vasiliev S. V., Akselrod A. S., Zhelankin A. V., Schekochikhin D. Yu., Generozov E. V., Sharova E. I., Stonogina D. A. Circulating miR-21-5p, miR-146a-5p, miR-320a-3p in patients with atrial fibrillation in combination with hypertension and coronary artery disease. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2022;21(1):2814. (In Russ.) doi:10.15829/1728-8800-2022-2814

ГБ — гипертоническая болезнь, ИБС — ишемическая болезнь сердца, кДНК — комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота, микроРНК — небольшие (микро) некодирующие рибонуклеиновые кислоты, РНК — рибонуклеиновая кислота, ПЦР — полимеразная цепная реакция, СД — сахарный диабет, ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания, ФП — фибрилляция предсердий, ЭКГ — электрокардиограмма, ЭхоКГ — эхокардиограмма, Ct — пороговый цикл ПЦР, HS — hemolysis score (степень гемолиза), группа CONTR — условно здоровые лица, группа НТ — пациенты с ГБ без ФП, группа AF_НТ — пациенты с ФП на фоне ГБ, группа AF_CAD — пациенты с ФП на фоне ИБС, группа CAD — пациенты с ИБС без ФП.

Введение

Фибрилляция предсердий (ФП) является одной из наиболее распространенных клинически значимых аритмий. Для этого варианта аритмии характерна высокая заболеваемость, смертность и инвалидизация населения: по различным прогнозам, число вновь выявленных пациентов составляет, в среднем, 5 млн человек ежегодно. При этом реальную распространенность заболевания оценить невозможно, поскольку в большом проценте случаев ФП возникает бессимптомно [1]. По различным данным распространенность ФП в общей популяции достигает 2% и неуклонно растёт как в популяции в целом, так и среди пациентов старческого возраста.

В основе патогенеза ФП лежат два основных механизма: наличие одного или нескольких фокусов с частой импульсацией, преимущественно в области устьев лёгочных вен, а также наличие одной или множества мелких петель возбуждения по типу re-entry, способствующих поддержанию аритмии. Длительная ФП приводит к электрическому ремоделированию предсердий, что, в свою очередь, постепенно укорачивает эффективный рефрактерный период и способствует поддержанию аритмии и, следовательно, ее неизбежному переходу в постоянную форму.

В последние несколько лет большое внимание уделяется оценке роли воспаления в патогенезе ФП: предполагается, что воспаление не только является маркером этой аритмии, но и механистически связано с ее индукцией [2, 3]. Эти исследования являются чрезвычайно значимыми: воздействие на все звенья патогенеза, включая коррекцию на уровне окислительного стресса и перекисного

окисления липидов, могло бы сделать профилактическую терапию пароксизмальной формы ФП наиболее эффективной.

Именно с точки зрения возможного влияния на воспаление при ФП представляются интересными множественные исследования новых потенциальных биомаркеров. Наиболее перспективными являются небольшие некодирующие рибонуклеиновые кислоты (РНК), которые получили название микроРНК. Эти варианты “нуклеотидных ключей” используются в животных и растительных клетках в качестве регуляторов экспрессии белков на трансляционном уровне.

МикроРНК представляют собой группу малых одноцепочечных молекул РНК длиной 22-25 нуклеотидов, которые обычно связываются с 3'-нетранслируемой областью их мРНК-мишени, что приводит к ингибированию трансляции и/или деградации мРНК. Внутриклеточные профили экспрессии микроРНК отражают различные физиологические и патологические состояния, в частности связанные с патогенезом сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [4-6]. В тканях экспрессируются >2200 видов микроРНК, при этом часть из них (~200-300 видов) стабильно обнаруживается во внеклеточных фракциях различных биологических жидкостей — крови, мочи, слюны и спинномозговой жидкости [7]. Циркулирующие внеклеточные микроРНК обладают высокой стабильностью в плазме крови, т.к. либо находятся внутри экзосом и микровезикул, либо связаны с циркулирующими белками и, таким образом, защищены от рибонуклеазной активности [8]. Профили внеклеточных циркулирующих микроРНК в плазме и сыворотке являются биомаркерами ряда патологий человека, включая онколо-

гические заболевания, сахарный диабет (СД) и ССЗ [9–11]. К настоящему моменту ряд микроРНК рассматривается в качестве потенциальных циркулирующих биомаркеров ФП [12], однако для некоторых видов микроРНК имеющиеся данные противоречивы [13]. Эти противоречия, вероятно, являются следствием различий в преаналитических процедурах при оценке профилей циркулирующих микроРНК в разных исследованиях и обусловлены влиянием таких факторов, как выбор биоматериала, гемолиз образцов плазмы или сыворотки и отсутствием стандартизации при определении уровней микроРНК [14].

Основной задачей данного исследования было выявление особенностей профиля циркулирующих микроРНК у пациентов с ФП по сравнению с условно здоровыми лицами, а также пациентами с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы — гипертонической болезнью (ГБ), ишемической болезнью сердца (ИБС), без ФП.

Материал и методы

Исследование было проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), протокол № 05-17 от 14.06.2017.

В исследование были включены амбулаторные пациенты, разделенные на пять групп: пациенты с ФП на фоне ГБ (AF_HT), пациенты с ФП на фоне стабильной ИБС (AF_CAD), пациенты с ГБ без нарушений ритма (HT), пациенты с ИБС без нарушений ритма (CAD), и условно здоровые лица без ССЗ (CONTR).

Критериями включения в группу лиц с ФП были: возраст 40–90 лет; наличие документированной пароксизмальной или постоянной формы ФП; письменное согласие пациента на участие в исследовании. Верификация ИБС проводилась при имеющейся медицинской документации о проведении коронароангиографии или перенесенном в прошлом инфаркте миокарда. ИБС считалась стабильной при отсутствии изменения характера приступов и первого возникновения приступов в течение 1 года перед включением в исследование.

Критериями включения в группу условно здоровых лиц были: возраст 40–90 лет; письменное согласие пациента на участие в исследовании; отсутствие значимой сердечно-сосудистой патологии по результатам стандартного обследования. Критериями не включения были: возраст пациента <40 лет или >90 лет; тяжелая сопутствующая патология (легочная, почечная, печеночная недостаточность; любая значимая патология головного мозга; заболевания крови; декомпенсированный СД и др. острые и хронические заболевания, способные повлиять на электрическую нестабильность миокарда предсердий); неоперированные злокачественные новообразования или новообразования в стадии рецидива; алкоголизм, наркомания, токсикомания и любые психические заболевания; невозможность или нежелание дать письменное

информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения являлись: отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании; развитие тяжелой сопутствующей патологии или декомпенсация ранее известного хронического заболевания.

У всех участников исследования фиксировались антропометрические и клинические данные, данные стандартной электрокардиографии (ЭКГ) и эхокардиографии (ЭхоКГ). Показатели регистрировались путём сбора анамнеза, физикального осмотра пациента. Регистрация ЭКГ выполнялась стандартным неавтоматизированным 12-канальным электрокардиографом Shiller. Трансторакальная ЭхоКГ проводилась штатными специалистами клиники на ультразвуковых аппаратах экспертного уровня производства General Electric, по стандартным протоколам с измерением всех основных показателей. Лабораторный контроль показателей общего и биохимического анализов крови выполнен межклинической лабораторией.

После подписания информированного согласия на участие в исследовании у обследованных были взяты образцы венозной крови в стандартную вакуумную пробирку с раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты. Образцы плазмы были получены с помощью двухэтапного центрифугирования пробирок с кровью при ускорении 2130 g в течение 10 мин при комнатной температуре с отбором верхних двух третей плазмы после каждого этапа центрифугирования. Образцы плазмы были заморожены и хранились при -20°C до выделения микроРНК. Перед выделением микроРНК образцы плазмы были разморожены и центрифугировались при 16000 g в течение 15 мин. МикроРНК была выделена из 300 мкл плазмы с помощью набора NucleoSpinmiRNAPlasma (Macherey-Nagel, Германия) и хранилась при -80°C до синтеза комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК). Образцы плазмы с присутствием визуально детектируемого гемолиза были исключены из исследования. Анализ степени гемолиза (HS, hemolysis score) проводился путём наноспектрофотометрии с определением пика оксигемоглобина на длине волны 414 нм и референсного пика на длине волны 385 нм. HS определялась в соответствии с Appierto V, et al. [15], т.к. избыточный гемолиз может влиять на профиль циркулирующих микроРНК; в исследование включались только те образцы плазмы, в которых значение HS было не $>0,25$.

Синтез кДНК был проведен с помощью набора реагентов TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. МикроРНК детектировали с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с флуоресцентными зондами типа TaqMan с использованием реагентов TaqMan Advanced miRNA Assays (ThermoFisher Scientific, США) для всех участников исследования в однократной повторности для каждого образца. Критериями для выбора кандидатных микроРНК были следующие параметры: 1) микроРНК является специфичной для мРНК генов, вовлеченных в метаболические пути патогенеза ССЗ и ФП; 2) уровень экспрессии микроРНК в плазме ассоциирован с ССЗ и, в частности, с ФП по данным литературы; 3) микроРНК детектируется в плазме с помощью выбранной ПЦР-методики со средними величинами порогового цикла ПЦР (Ct) не >35 циклов.

Таблица 1

Характеристика выборки участников исследования

Группа	Условно здоровые лица (CONTR)	Лица с ГБ 1-2 степени без ФП (НТ)	Лица с ФП на фоне ГБ (AF_НТ)	Лица с ФП на фоне ИБС (AF_CAD)	Лица со стабильной ИБС без ФП (CAD)
Количество участников	30	28	21	10	10
Средний возраст, лет (Mean±SD)	47,3±5,6	57,8±9,5	66,4±10,5	68,0±8,2	71,0±7,0
Мужчины, %	50	57	43	80	50
СД 2 типа, %	0	0	10	50	20
Ct (miR-16-5p)	15,70±1,06	15,28±1,21	16,08±1,21	15,60±1,18	15,69±0,97
miR_Ratio	11,1±0,98	11,64±1,05	11,23±1,28	11,31±0,79	10,99±0,55
HS	0,12±0,04	0,15±0,05	0,14±0,05	0,12±0,05	0,09±0,02

Для исследования были выбраны следующие кандидатные микроРНК: hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-150-5p, has-miR-320a-3p, hsa-miR-375. В качестве референсной эндогенной микроРНК для нормировки экспрессии использовалась hsa-miR-16-5p. В качестве микроРНК для оценки гемолиза образца использовались hsa-miR-23a-3p и hsa-miR-451a. Расчет относительной экспрессии каждой кандидатной микроРНК на основании абсолютных значений Ct проводился по формуле: $EXP(target_miRNA) = 2^{(Ct(target_miRNA) - Ct(hsa-miR-16-5p))}$, где target_miRNA — любая из кандидатных микроРНК. Оценка степени гемолиза на основании экспрессии микроРНК производилась по соотношению гемолиз-зависимой микроРНК hsa-miR-451a и гемолиз-независимой микроРНК hsa-miR-23a-3p: $miR_Ratio = Ct(hsa-miR-23a-3p) - Ct(hsa-miR-451a)$ [16]. Для стандартизации данных ПЦР и во избежание возможного сдвига в экспрессии при ингибировании ПЦР или у образцов с малым общим количеством микроРНК, в исследование были включены только те образцы, у которых значение Ct для референсной эндогенной микроРНК miR-16-5p было не >18. Был проведен анализ распределения параметра miR_Ratio в выборке и исключены 2 образца со значением miR_Ratio >14, т.к. в них гемолиз мог повлиять на профили экспрессии микроРНК.

Были проведены сравнения относительных уровней микроРНК между группами участников исследования с использованием U-теста Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение Бонферрони-Холма; различия считались значимыми при $p < 0,05$. Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи программы SPSS Statistics версии 26.0 (IBM, США) и пакета tidyverse программной среды R.

Результаты

С учетом критериев включения пациентов и критериев отбора образцов плазмы, в исследование вошло 99 участников. В группу с пароксизмальной или постоянной ФП на фоне ГБ (AF_НТ) был включен 21 пациент. В группу с ФП на фоне ИБС (AF_CAD) и группу с ИБС без нарушений ритма (CAD) было включено по 10 пациентов. В контрольную группу с наличием ГБ 1-2 стадии без ФП (НТ) и группу условно здоровых лиц (CONTR) было включено 28 и 30 пациентов, соответственно. Характеристика групп представлена в таблице 1.

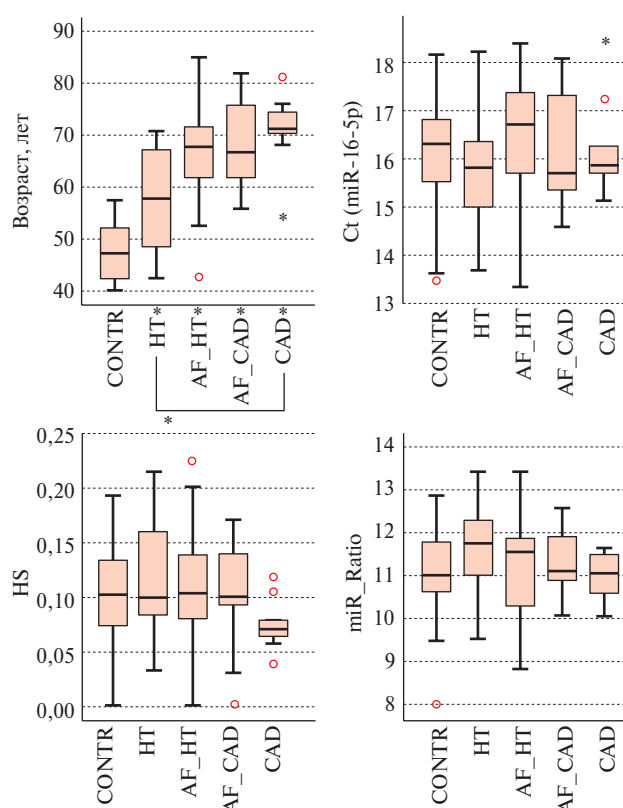


Рис. 1 Графики распределения выборки по следующим характеристикам: возраст, Ct для референсной эндогенной микроРНК miR-16-5p, спектрофотометрический индекс гемолиза HS, соотношение связанных с гемолизом микроРНК miR-451a и miR-23a-3p (miR_Ratio).

Примечание: столбцы распределения (“ящики” и “усы”) представляют собой медиану и границы квартилей. Точки представляют выбивающиеся из распределения образцы. Звездочками (*) после обозначений групп обозначено наличие статистически значимых различий по сравнению с группой CONTR ($p < 0,05$ в парных сравнениях по критерию Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение). Наличие значимых различий между парами групп также обозначено звездочками (*).

Графики распределения показателей, характеризующих выборку, в группах участников исследования представлены на рисунке 1.

Все исследованные микроРНК обнаруживались в плазме участников исследования со сред-

Таблица 2

Соотношение средних значений относительного уровня микроРНК
в плазме при парных сравнениях групп участников исследования

Сравниваемая пара групп участников исследования	микроРНК				
	miR-146a-5p	miR-150-5p	miR-21-5p	miR-320a-3p	miR-375-3p
AF_HT vs CONTR	1,95*	1,19	2,02	3,52*	0,86
AF_HT vs HT	1,61	1,52	1,82	3,01*	1,55
HT vs CONTR	1,21	0,79	1,11	1,17	0,55
AF_CAD vs CAD	1,02	1,09	1,10	1,22	0,87
AF_CAD+CAD vs AF_HT	0,81	0,70	0,77	0,49	0,87
AF_CAD+CAD vs HT	1,30	1,06	1,39*	1,48	1,34
AF_CAD+CAD vs CONTR	1,57*	0,83	1,55*	1,73*	0,74

Примечание: * — наличие статистически значимых различий при парных сравнениях (тест Манна-Уитни с поправкой на множественное тестирование, $p < 0,05$).

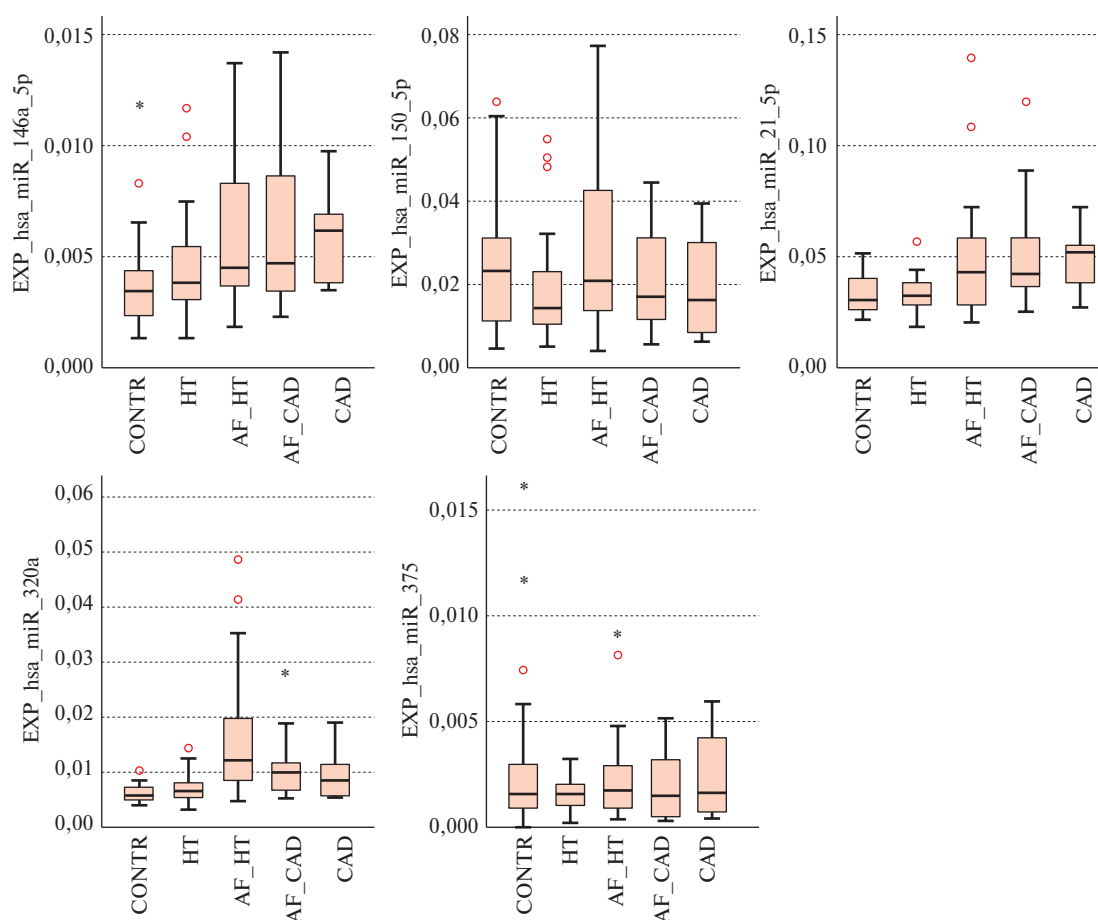


Рис. 2 Графики распределения выборок по величинам относительной экспрессии кандидатных микроРНК.

Примечание: EXP_hsa_miR_... — относительный уровень экспрессии, циркулирующей микроРНК в плазме крови. Столбцы распределения (“ящики” и “усы”) представляют собой медиану и границы квартилей. Точки представляют выбивающиеся из распределения образцы.

ними значениями Ct от $13,6 \pm 1,3$ для miR-451a и до $25,2 \pm 2,1$ для miR-150-5p.

Было обнаружено, что спектрофотометрический индекс HS коррелирует с зависимым от гемолита соотношением miR-23a-3p/miR-451a — коэффициент корреляции по Спирману 0,515 ($p < 0,05$).

Если основными группами исследования по количеству включенных участников являлись груп-

пы AF_HT, HT и CONTR, то первым этапом анализа было сравнение уровней экспрессии между данными группами. Величины кратности изменения относительных уровней, проанализированных микроРНК при попарных сравнениях групп с обозначением статистически значимых различий представлены в таблице 2. Относительные уровни циркулирующих miR-146a-5p, miR-21-5p были повышены

примерно вдвое, а miR-320a-3p — более чем втрое у лиц из группы AF_НТ по сравнению с условно здоровыми лицами (для miR-146a-5p и miR-320a-3p: $p < 0,05$, тест Манна-Уитни). Средний уровень miR-320a-3p был повышен в 3 раза у пациентов из группы AF_НТ по сравнению с пациентами из группы НТ ($p < 0,05$, тест Манна-Уитни). Для остальных проанализированных микроРНК статистически значимых различий между сравниваемыми группами выявлено не было. На рисунке 2 представлены графики распределения относительных уровней микроРНК в плазме для групп участников исследования.

Далее было проведено сравнение относительных уровней, циркулирующих микроРНК между группами AF_CAD и CAD, т.к. они характеризовались одинаковым итоговым количеством участников и были сопоставимы по среднему возрасту участников. Между данными группами не было обнаружено значимых различий в уровнях микроРНК плазмы (таблица 2, рисунок 2). В объединенной группе AF_CAD+CAD (20 участников, средний возраст $69,5 \pm 7,6$ лет) средние уровни микроРНК miR-146a-5p, miR-21-5p и miR-320a-3p имели сходные значения с группой AF_НТ. Однако для всех данных микроРНК были статистически значимо выше в группе AF_CAD+CAD по сравнению с CONTR (таблица 1), а для miR-21-5p — также по сравнению с пациентами с НТ.

Относительные уровни микроРНК miR-146a-5p, miR-21-5p и miR-320a-3p коррелировали с возрастом участников исследования — коэффициенты корреляции по Спирману: 0,40, 0,36 и 0,43, соответственно ($p < 0,05$).

Обсуждение

В последние годы достигнут значительный прогресс в идентификации и количественном определении микроРНК, что позволило получить более полное представление о механизмах их действия в норме и при патологии, в т.ч. при ССЗ. Имеющиеся результаты исследовательских работ позволяют утверждать, что микроРНК играют важную роль в гипертрофии и ишемии миокарда [17], а также вносят несомненный вклад в патогенез и особенности течения аритмий. Предполагается, что микроРНК играют ключевую роль в регулировании экспрессии целого ряда генов, которые задействованы в патогенезе ФП [18]. Они также участвуют в формировании воспалительного ответа и в процессах, связанных с повреждениями сосудистого эндотелия и с фиброзом. В настоящее время для ряда микроРНК обнаружена ассоциация их повышенной экспрессии в циркулирующей крови с наличием ФП. “Золотым стандартом” количественного определения микроРНК признана ПЦР в режиме реального времени, которая, благодаря высокой чувствительности, позволяет выявить

микроРНК в малом количестве материала, в частности, в микроРНК, выделенной из плазмы крови.

В представленном исследовании впервые выполнен анализ микроРНК плазмы у пациентов с наличием ФП с подробной оценкой основных преаналитических параметров, необходимых для правильного измерения циркулирующих внеклеточных микроРНК. Полученные с помощью спектрофотометрии и с помощью ПЦР параметры гемолиза использовались как факторы анализа качества образцов плазмы для исключения влияния внутриклеточных микроРНК. Были установлены критерии включения образцов плазмы: HS $< 0,25$ и dCq (miR-23a-3p — miR-451a) < 14 . Соблюдение стандартизованного протокола подготовки плазмы с удалением любых клеточных компонентов — ядерных клеток, тромбоцитов, эритроцитов и клеточного дебриса — имеет решающее значение в исследованиях циркулирующих внеклеточных микроРНК. В данном исследовании использовалось двухступенчатое центрифугирование, что сводит к минимуму уровень контаминации клеточной РНК в образце плазмы, сохраняя профиль циркулирующих внеклеточных микроРНК.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что среди проанализированных циркулирующих микроРНК плазмы повышенный уровень miR-320a-3p независимо ассоциирован с наличием ФП, а повышенные уровни miR-146a-5p и miR-21-5p потенциально ассоциированы как с наличием ФП, так и ИБС.

Как miR-146a-5p, так и miR-21-5p являются одними из наиболее часто упоминаемых микроРНК, уровень которых в плазме или сыворотке повышен у пациентов с ССЗ, в частности, при сердечной недостаточности и ИБС [19]. МикроРНК miR-146a-5p связана с цитокиновым ответом при воспалении и регулирует компоненты NF- κ B сигнального пути, а также вовлечена в патогенез атеросклероза за счет контроля активации и дисфункции эндотелиальных клеток [20]. МикроРНК miR-21-5p также рассматривается как один из ключевых модуляторов патологического процесса (контроль активации и дисфункции эндотелиальных клеток при атеросклерозе), и ее повышенная экспрессия способствует стабилизации атеросклеротических бляшек [21]. Кроме того, miR-320a-3p также вовлечена в регуляцию атерогенеза и ее уровень в плазме может быть повышен при ИБС [22–25].

Понятно, что причины повышения уровней ряда циркулирующих микроРНК у пациентов с ФП не могут быть однозначно установлены в рамках данного исследования. Тем не менее, с учетом результатов имеющихся ранее публикаций [19, 22, 26], нельзя исключить, что для miR-21-5p, miR-320a-3p, miR-146a-5p потенциальную роль в изменении их содержания в плазме играют процессы,

связанные с эндотелиальной дисфункцией и воспалением. О независимой специфичной ассоциации с ФП можно говорить только для miR-320a-3p.

Следует учитывать некоторые особенности исследования. Прежде всего, стоит обратить внимание на возрастные различия между пациентами представленных групп. Пациенты с ФП были на ~10 лет старше пациентов с ГБ и на 20 лет старше условно здоровых лиц. Это было обусловлено особенностями дизайна исследования: выборки формировались естественным образом на основе случайного распределения пациентов кардиологических клиник в соответствии с критериями включения и исключения. Данные эпидемиологических исследований показывают, что заболеваемость ФП увеличивается, начиная с 60 лет, достигая пика к ~80 годам [27]. В данном исследовании было показано, что уровни ассоциированных с ФП и ИБС микроРНК miR-146a-5p, miR-21-5p и miR-320a-3p в плазме также ассоциированы с возрастом.

Группа пациентов с ФП на фоне ИБС характеризовалась преобладанием лиц мужского пола и лиц с наличием СД 2 типа, а также достоверно

сниженным значением коэффициента гемолиза HS, что могло быть косвенными причинами различий в уровнях экспрессии микроРНК.

Заключение

В представленном исследовании выявлены ассоциации ряда циркулирующих внеклеточных микроРНК при ФП по сравнению со здоровыми добровольцами и пациентами с такими частыми ССЗ как АГ и ИБС.

Обнаружены различия в содержании исследуемых микроРНК плазмы (miR-21-5p, miR-320a-3p, miR-146a-5p) у пациентов с ФП, независимо от сопутствующего заболевания (ИБС или ГБ) по сравнению с условно-здоровыми лицами. При этом специфично ассоциированным с ФП среди проанализированных циркулирующих микроРНК плазмы можно считать повышенный уровень miR-320a-3p.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено при поддержке грантов: РФФИ № 18-54-53036 ГФЕН_а и 18-00-01661 КОМФИ.

Литература/References

1. Filatov AG, Tarashvili EG. Epidemiology and social significance of atrial fibrillation. *Annaly Arrhythmologii*. 2012;9:2:5-13. (In Russ.) Филатов А. Г., Тарашвили Э. Г. Эпидемиология и социальная значимость фибрилляции предсердий. *Анналы аритмологии*. 2012;9:2:5-13.
2. Rubanenko OA, Fatenkov OV, Hohlunov SM. Role of inflammatory factors in atrial fibrillation. *Cardiologiya: Novosti. Mneniya. Obucheniye*. 2015;2(5):43-7. (In Russ.) Рубаненко О. А., Фатенков О. В., Хохлунов С. М. Роль факторов воспаления в развитии фибрилляции предсердий. *Кардиология: Новости. Мнения. Обучение*. 2015;2(5):43-7.
3. Marcelle DS, Alexander HM, et al. Role of inflammation in early atrial fibrillation recurrence. *EP Europace*. 2012;14:810-17. doi:10.1093/europace/eur402.
4. Gareev IF, Beyerli OA. Circulating microRNAs as biomarkers: what are perspectives? *Profilacticheskaya medicina*. 2018;21(6):142-50. (In Russ.) Гареев И. Ф., Бейлерли О. А. Циркулирующие микроРНК как биомаркеры: какие перспективы? *Профилактическая медицина*. 2018;21(6):142-50. doi:10.17116/profmed201821061142.
5. Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA regulation of atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):703-20. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306300.
6. Li Y, Tan W, Ye F, et al. Identification of microRNAs and genes as biomarkers of atrial fibrillation using a bioinformatics approach. *J Intern Med Res*. 2019;47(8):3580-9. doi:10.1177/0300060519852235.
7. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, et al. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(8):467. doi:10.1038/nrclinonc.2011.76.
8. Bronze-da-Rocha E. MicroRNAs Expression Profiles in Cardiovascular Diseases. *Biomed Res Int*. 2014;2014:985408. doi:10.1155/2014/985408.
9. Romaine SP, Tomaszewski M, Condorelli G, et al. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart*. 2015;101(12):921-8. doi:10.1136/heartjnl-2013-305402.
10. Navickas R, Gal D, Laucevičius A, et al. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovasc Res*. 2016;111(4):322-37. doi:10.1093/cvr/cvw174.
11. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, et al. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets, and challenges. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(7):1073-84. doi:10.1038/aps.2018.30.
12. Wei Z, Bing Z, Shaohuan Q, et al. Expression of miRNAs in plasma exosomes derived from patients with atrial fibrillation. *Clin Cardiol*. 2020; 43(12):1450-9. doi:10.1002/clc.23461.
13. Silva AM, Araújo JN, Freitas RC, et al. Circulating MicroRNAs as potential biomarkers of atrial fibrillation. *BioMed Res Int*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/7804763.
14. Felekis K, Papanephytou C. Challenges in using circulating micro-RNAs as biomarkers for cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):561. doi:10.3390/ijms21020561.
15. Appierto V, Callari M, Cavadini E, et al. A lipemia-independent NanoDrop®-based score to identify hemolysis in plasma and serum samples. *Bioanalysis*. 2014;6(9):1215-26. doi:10.4155/bio.13.344.
16. Blondal T, Nielsen SJ, Baker A, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*. 2013;59(1):S1-6. doi:10.1016/j.ymeth.2012.09.015.
17. Romakina VV, Zhironov IV, Nasonova SN, et al. MicroRNAs as Biomarkers of Cardiovascular Diseases. *Kardiologiya*. 2018;58(1):66-71. (In Russ.) Ромакина В. В., Жиров И. В., Насонова С. Н. и др. МикроРНК как биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний. *Кардиология*. 2018;58(1):66-71. doi:10.18087/cardio.2018.110083.
18. Kim GH. MicroRNA regulation of cardiac conduction and arrhythmias. *Transl Res*. 2013;161(5):381-92. doi:10.1016/j.trsl.2012.12.004.

19. Kaur A, Mackin ST, Schlosser K, et al. Systematic review of microRNA biomarkers in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 2020;116(6):1113-24. doi:10.1093/cvr/cvz302.
20. Sun X, Belkin N, Feinberg MW. Endothelial microRNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(12):372. doi:10.1007/s11883-013-0372-2.
21. Jin H, Li DY, Chernogubova E, et al. Local delivery of miR-21 stabilizes fibrous caps in vulnerable atherosclerotic lesions. *Mol Ther.* 2018;26(4):1040-55. doi:10.1016/j.ymthe.2018.01.011.
22. Chen C, Wang Y, Yang S, et al. MiR-320a contributes to atherogenesis by augmenting multiple risk factors and down-regulating SRF. *J Cell Mol Med.* 2015;19(5):970-85. doi:10.1111/jcmm.12483.
23. Neth P, Nazari-Jahantigh M, Schober A, et al. MicroRNAs in flow-dependent vascular remodelling. *Cardiovasc Res* 2013;99(2):294-303. doi:10.1093/cvr/cvt096.
24. Stather PW, Sylvius N, Wild JB, et al. Differential MicroRNA Expression Profiles in Peripheral Arterial Disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6(5):490-7. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.000053.
25. Jiang Y, Wang HY, Li Y, et al. Peripheral blood miRNAs as a biomarker for chronic cardiovascular diseases. *Sci Rep.* 2014;4:5026. doi:10.1038/srep05026.
26. Ibragimova AG, Shakhmaeva KR, Stanishevskaya IE, et al. The potential role of miRNAs in calcification of cardiovascular diseases. *Russian Journal of Cardiology.* 2019;(10):118-25. (In Russ.) Ибрагимова А.Г., Шахмаева Е.Р., Станишевская И.Е. и др. Потенциальная роль микроРНК при кальцинозе сосудов. *Российский кардиологический журнал.* 2019;(10):118-25. doi:10.15829/1560-4071-2019-10-118-125.
27. Boriani G, Diemberger I, Martignani C, et al. The epidemiological burden of atrial fibrillation: a challenge for clinicians and health care systems. *Eur Heart J.* 2006;27(8):893-4. doi:10.1093/eurheartj/ehi651.