

КАЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ miR-126, miR-155, miR – 221, miR – 222 У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТЕНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ И ПОСТИНФАРКТНЫМ КАРДИОСКЛЕРОЗОМ

Щеглова Н.Е.¹, Калинин М.Н.¹

¹ГБОУ ВПО «Тверской ГМУ Минздрава России», Тверь, Россия (170100, г. Тверь, ул. Советская, д. 4), e-mail: natali.sh45@mail.ru

Было обследовано 30 мужчин, страдающих гипертонической болезнью (ГБ), 20 мужчин, имеющих верифицированный диагноз ИБС постинфарктный кардиосклероз (ИБС ПИКС) и 15 здоровых мужчин. С помощью коэффициента корреляции рассчитывали качественные характеристики взаимосвязей микроРНК – miR-126, miR-155, miR-221, miR-222. Сравнение интегральных портретов ковариационных матриц, отражающих взаимосвязи микроРНК, позволило сделать вывод, о том, что в контрольной группе здоровых людей доминирующая вариационная роль отводится miR-126, а в группах больных ГБ и ИБС ПИКС – miR-221. При изучении дисперсий микроРНК, получили аналогичные данные о превалировании miR-126 в группе здоровых людей и miR-221 в группах ГБ и ИБС ПИКС. Таким образом, качественная оценка взаимосвязей miR-126, miR-155, miR-221, miR-222 в группах больных ГБ и ИБС ПИКС подтверждает корреляцию изучаемых микроРНК с исследуемыми заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: гипертоническая болезнь, постинфарктный кардиосклероз, микроРНК, корреляционный анализ, ковариация, дисперсия.

QUALITATIVE FEATURES OF MIR-126, miR-155, miR – 221, miR – 222 IN PATIENTS WITH THE HYPERTENTION AND THE POSTINFARKTNY CARDIOSCLEROSIS

Shcheglova N.E.¹, Kalinkin M.N.¹

¹Tver State Medical University, Tver, Russia (170100, Tver, st. Sovetskay, 4), e-mail: natali.sh45@mail.ru

The study included 30 men suffering from essential hypertension, 20 men who have the diagnosis of cardiosclerosis and 15 healthy men. With coefficient of correlation was calculated quality characteristics relationships of miRNAs - miR- 126, miR- 155 , miR- 221 , miR- 222. Comparison of integral portraits of covariance matrices which reflect the relationship microRNAs leads to the conclusion that in the control group of healthy people variational dominant role for miR-126, and in groups of patients with essential hypertension and cardiosclerosis - miR-221. In the study of microRNAs dispersions, obtained similar data on the prevalence of miR-126 in healthy people and miR-221 in groups with essential hypertension and cardiosclerosis. Thus, a qualitative assessment of the relationship miR-126, miR-155, miR-221, miR-222 in groups of patients with essential hypertension and cardiosclerosis confirms correlations studied microRNAs with the studied diseases of the cardiovascular system.

Keywords: essential hypertension, cardiosclerosis, miRNAs, correlation analysis, covariance, dispersion

За исключением достаточно редко встречающихся моногенных болезней, патофизиологические основы заболеваний сердечно-сосудистой системы, достаточно сложны. В последнее время становится очевидной важная роль микроРНК – малых некодирующих молекул РНК, обычно имеющих длину 19-24 нуклеотида, образуемых из более длинных РНК-предшественников и имеющих специфическую шпилечную структуру [8]. Согласно данным литературы, нарушение функционирования определенных микроРНК может способствовать развитию сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, ишемической болезни сердца (ИБС), атеросклероза, постинфарктного ремоделирования миокарда, хронической сердечной

недостаточности и сократительной дисфункции сердца [1]. В последнее время в литературе стали появляться данные о различных биологических эффектах микроРНК на компоненты сердечно-сосудистой системы. Было показано, что микроРНК могут вызывать индукцию, или, наоборот, подавлять гипертрофию миокарда, регулировать ангиогенез в миокарде, индуцировать и редуцировать фиброз. Тем не менее, их потенциальная роль как биомаркеров в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний еще более значима [6].

Цель исследования – изучить качественные характеристики изучаемых miR-126, miR-155, miR-221 и miR-222 у больных с гипертонической болезнью (ГБ) и ИБС постинфарктным кардиосклерозом (ИБС ПИКС).

Материалы и методы исследования

Было обследовано 50 мужчин, находившихся на стационарном лечении в кардиологическом отделении Областной клинической больницы города Твери, и 15 здоровых мужчин.

Сформированы выборки из трех групп сравнения. В I группу включили 15 здоровых мужчин от 29 до 47 лет (средний возраст $33,93 \pm 1,14$ лет), данная группа рассматривалась как контрольная. II группа состояла из 30 пациентов, страдающих ГБ в возрасте от 29 до 65 лет (средний возраст $47,73 \pm 1,97$ лет). Критерии групповой принадлежности: мужской пол и наличие ГБ I-II стадии без систолической дисфункции миокарда левого желудочка [3] и отсутствие на момент обследования диагноза ИБС. В III группу были включены 20 мужчин, имеющих в анамнезе подтвержденный клинически и лабораторно инфаркт миокарда в возрасте от 46 до 84 лет (средний возраст $60,4 \pm 1,9$ лет). Критерии включения в данную группу больных: наличие верифицированного диагноза ИБС ПИКС. Критерии исключения: лица, страдающие сахарным диабетом, сопутствующими заболеваниями почек, легких, желудочно-кишечного тракта, печени, заболеваниями крови и нарушениями обмена веществ, отягощенным аллергологическим анамнезом, аллергическими заболеваниями и профессиональными вредностями.

Общая РНК, включая микроРНК, была получена комбинированным методом из плазмы крови с помощью набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) и лизирующего реагента TRIzol® LS Reagent (Invitrogen, США), описанным в литературе [4]. Для образцов микроРНК с концентрациями от 25 нг/мкл проводили обратную транскрипцию на четырехканальном амплификаторе «Veriti» («Applied Biosystems», США) для получения комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) с использованием набора TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit по стандартной схеме, представленной производителем. Реакционную смесь, содержащую тотальную микроРНК и смесь для проведения обратной транскрипции, подвергали нагреванию в несколько циклов:

- 30 минут при 16°C,
- 30 минут при 42°C,
- 5 минут при 85 °C,
- и далее нагревание при 4°C.

Экспрессию miR-126, 155, 221, 222 оценивали с помощью показателя ΔC_t [7], который определяли трижды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе «ABI Prism 7500» с помощью набора Taq Man Small RNA Assays («Applied Biosystems», США) с применением полученной кДНК и праймеров miR-126, miR-155 с использованием стандартного протокола, предложенного производителем. В качестве эндогенного контроля использовали праймер RNU6B, показывающий относительно стабильную экспрессию, независимо от того в каких тканях и клеточных культурах определяется [5].

Методы статистической обработки данных.

Качественные характеристики взаимосвязей микроРНК рассчитывали с помощью коэффициента корреляции, используя значения miR – 126, 155, 221, 222 в номинальной шкале: 11 – miR – 126, 12 – miR – 155, 13 – miR – 221, 14 – miR – 222.

Коэффициент корреляции рассчитывали как коэффициент ковариации степени выраженности (вариации) микроРНК, деленный на произведение среднеквадратических отклонений степени вариации микроРНК, где коэффициент ковариации представляет собой среднее произведение отклонений степени вариации двух (любых) микроРНК от их средних значений степени вариации [2].

В качестве специфического интегрального портрета группы пациентов использовали уникальные свойства ковариационной матрицы, которую рассчитывали с помощью программы *MATLAB*, описанной выше.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе проведенного исследования miR – 126, miR – 155, miR – 221 и miR – 222 были получены следующие результаты ΔC_t , представленные в таблице 1.

Таблица 1

Показатели ΔC_t для miR – 126, miR – 155, miR – 221 и miR – 222 в контрольной группе, группах больных ГБ и ИБС ПИКС

Исследуемая группа	Контрольная группа (n = 15)	Больные ГБ (n = 30)	Больные ИБС ПИКС (n = 20)
miR-126 ΔC_t (M±m)	-1,71±0,87	-9,71±0,74	-9,77±0,92

miR-155 $\Delta Ct (M\pm m)$	-3,12 \pm 0,34	-4,23 \pm 0,61	-5,02 \pm 0,94
miR-221 $\Delta Ct (M\pm m)$	-0,93 \pm 0,64	-8,54 \pm 0,98	-8,96 \pm 1,13
miR-222 $\Delta Ct (M\pm m)$	-0,07 \pm 0,71	-7,81 \pm 0,59	-7,69 \pm 0,81

Примечание: ΔCt – разность между значениями Ct исследуемой микроРНК и эндогенного контроля (RNU6B), M – среднее значение уровня экспрессии микроРНК, m – стандартная ошибка среднего.

Для каждой патологии меняется экспрессия не одной, а сразу нескольких микроРНК. Поэтому для определения взаимосвязей между изучаемыми микроРНК в исследуемых группах был проведен корреляционный анализ, который показывает степень статистической зависимости между двумя числовыми переменными.

При сведении в одну таблицу коэффициентов ковариации была получена ковариационная матрица, отражающая взаимосвязи микроРНК. Далее ковариационная матрица использовалась в качестве специфического интегрального портрета исследуемых групп.

Ниже приведены портреты ковариационные матрицы исследуемых групп: I группа (группа здоровья), II группа (больные ГБ), III группа (больные ИБС ПИКС) (рисунки 1 – 3). Для более удобного произведения расчетов и изображения портретов исследуемых групп были использовали следующие кодировки параметров: 11 – miR – 126, 12 – miR – 155, 13 – miR – 221, 14 – miR – 222.

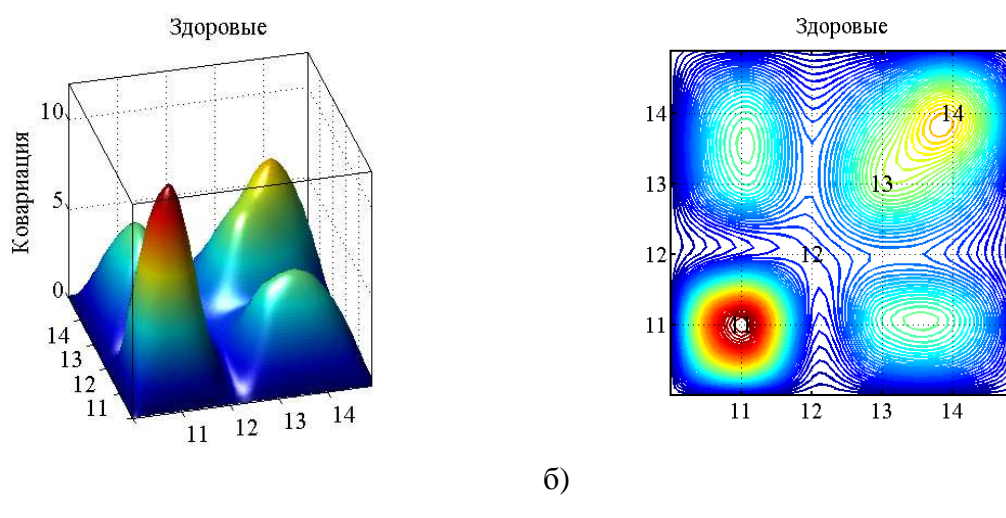


Рис. 1. Портрет группы контроля: а) объёмная визуализация ковариационной матрицы микроРНК; б) линии одинакового уровня

Проводя анализ рисунка 1, отражающего взаимосвязи исследуемых микроРНК в контрольной группе здоровых людей, можно заключить, что доминирующая роль в этой группе отводится miR-126.

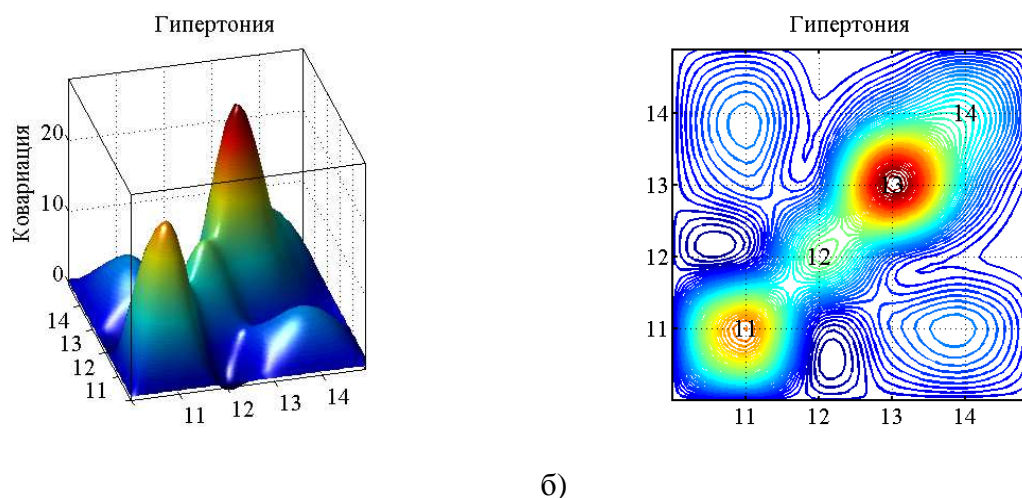


Рис. 2. Портрет группы гипертонической болезни: а) объёмная визуализация ковариационной матрицы микроРНК; б) линии одинакового уровня

При изучении интегрального портрета, отраженного на рисунке 2 группы больных ГБ, можно сделать вывод, что доминирующая роль в изучаемой группе отводится miR – 221.

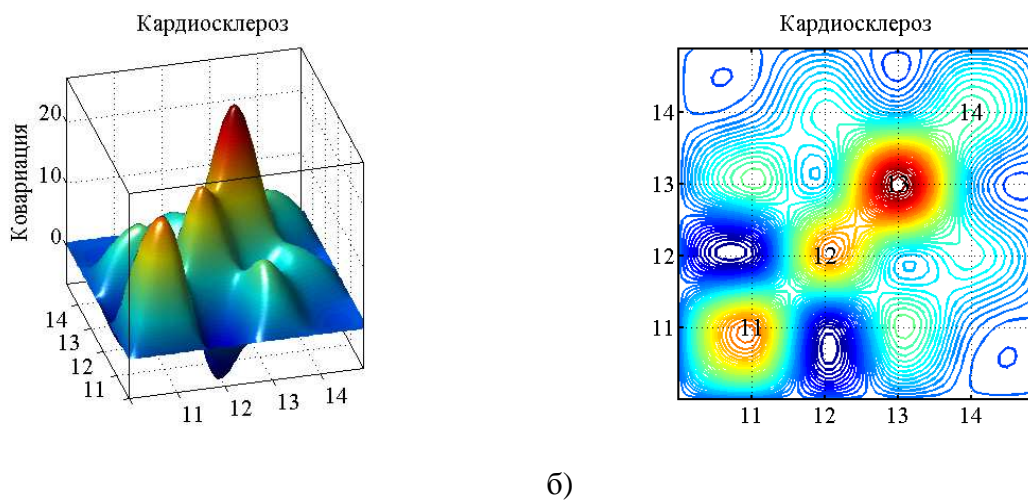


Рис. 3. Портрет группы постинфарктного кардиосклероза: а) объёмная визуализация ковариационной матрицы микроРНК; б) линии одинакового уровня

При анализе интегрального портрета группы ИБС ПИКС, изображенного на рисунке 3, можно заключить, что доминирующая роль в этой группе отводится miR – 221.

Таким образом, сравнение рисунков 1, 2 и 3, отражающих взаимосвязи микроРНК, позволяет сделать следующий вывод, что в контрольной группе здоровых людей

доминирующая вариационная роль отводится miR – 126, а в группах больных ГБ и ИБС ПИКС – miR – 221.

Ковариация весьма чувствительна к дисперсии микроРНК. Дисперсия является одной из мер вариации микроРНК, т.е. изменчивости микроРНК, входящих в состав выборки группы пациентов. Это свойство ковариационных матриц может быть использовано при решении задач классификации заболеваний в качестве критерия медико-физиологической вариабельности.

При сведении в одну таблицу дисперсий микроРНК, в порядке их убывания, расположенные на главных диагоналях ковариационных матриц групп пациентов, получили аналогичные данные о превалировании miR – 126 в группе здоровых людей и miR – 221 в группах ГБ и ИБС ПИКС (таблица 2).

Таблица 2

Дисперсии микроРНК главных диагоналей ковариационных матриц исследуемых групп пациентов

Группа	МикроРНК (дисперсия)			
Группа контроля	miR -126 (11,38)	miR -222 (7,46)	miR -221 (6,13)	miR -155 (1,78)
Больные ГБ	miR -221 (28,7)	miR -126 (20,79)	miR -155 (13,26)	miR -222 (9,97)
Больные ИБС ПИКС	miR -221 (27,02)	miR -126 (18,36)	miR -155 (17,82)	miR -222 (8,09)

В представленной таблице показано, что в группе контроля доминирующая вариационная роль отводится miR – 126 (11,38), далее miR – 222 (7,46), miR – 221 (6,13), miR – 155 (1,78). В группах больных ГБ и ИБС ПИКС последовательность иная с доминированием miR – 221 (28,7 и 27,02), далее miR – 126 (20,79 и 18,36), miR – 155 (13,26 и 17,82), miR – 222 (9,97 и 8,09). Кроме того, в группах больных ГБ и ИБС ПИКС дисперсии одноименных микроРНК отличаются: miR – 221 на 5,85%; miR – 126 на 11,69%; miR – 155 на 25,59%; miR – 222 на 18,86%. Как было описано выше, доминирование miR – 221 в группах ГБ и ИБС ПИКС можно объяснить ангиогенными свойствами данной микроРНК.

На рисунке 4 показано распределение дисперсии микроРНК по группам пациентов.

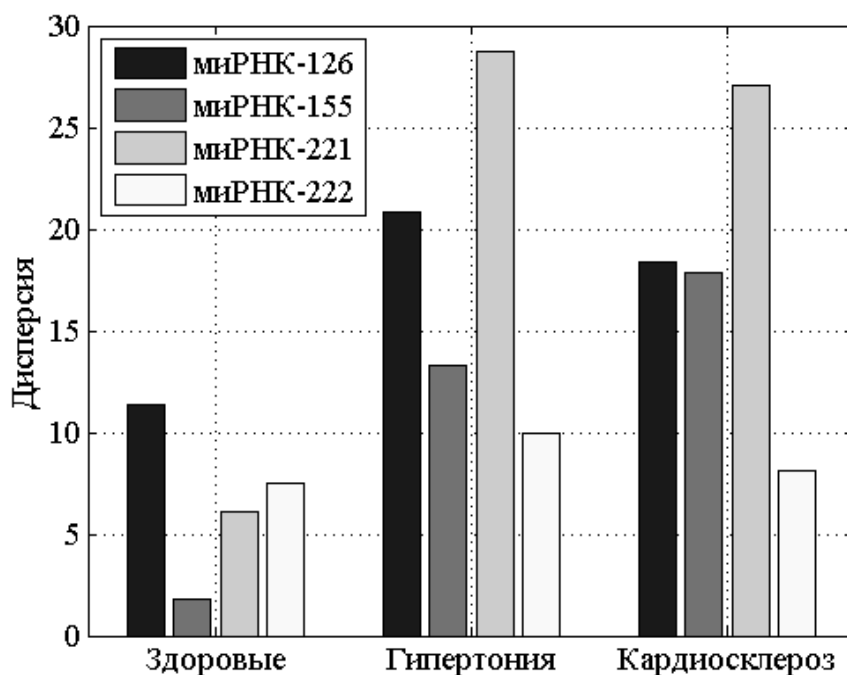


Рис.4. Распределение дисперсии микроРНК по группам пациентов

При этом можно сделать вывод, что наличие у больных сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ГБ и ИБС ПИКС резко повышают дисперсию всех изученных нами микроРНК по сравнению с группой здоровых людей.

Заключение

Таким образом, в группе здоровых людей установлено преобладание среди микроРНК экспрессии miR-126. В тоже время у больных ГБ и ИБС ПИКС выявлено доминирование miR-221. Выявление различий в экспрессионной иерархии различных микроРНК в норме и у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями позволяет сделать вывод о корреляции изучаемых микроРНК с исследуемыми заболеваниями, что, безусловно, имеет патофизиологическую перспективу для изучения диагностической и прогностической значимости микроРНК в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний.

Список литературы

1. Перспективы применения микроРНК в диагностике и терапии сердечной недостаточности / Кочетов А.Г. [и др.] // Кардиологический вестник. – 2014. - №2. – С. 62 – 67.
2. Сошникова, Л.А. Многомерный статистический анализ / Л.А. Сошникова, В.Н. Томашевич. – М.: ЮНТИ-ДАНА, 1999. – 598с.
3. Чазова И.Е. Диагностика и лечение артериальной гипертензии (Рекомендации Российского медицинского общества по артериальной гипертензии и Всероссийского научного общества кардиологов) // Системные гипертензии. – 2010. - № 3. – С. 5–27.

4. Keller A., Leidinger P., Borries A., Wendschlag A., Wuncherpfenning F., Scheffler M., Huwer H., Lonhof H-P., Meese E. miRNA in lung cancer – Studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments // BMC Cancer 2009, 9:353 doi:10.1186/1471-2407-9-353.
5. Lambal V., Ghodke-Puranik1 Y., Guan W., Lamba1J. K. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation // BMC Research Notes 2014, 7:129 doi:10.1186/1756-0500-7-129.
6. Meder B., Keller A., Vogel B., Haas J., Sedaghat-Hamedani F., Kayvanpour E., Juas S., Borries A., Rudloff J., Leidinger P., Meese E., Katus H.A., Rottbauer W. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction // Basic Res. Cardiol. 2010. DOI 10.1007/s00395-010-0123-2.
7. M. Tefvik Dorak Real-time PCR. - Taylor & Francis Group, an informa business. – 2006. – 333 p.
8. Shah A. A. Profiling of regulatory microRNA transcriptomes in various biological processes: a review / A. A. Shah, E. Meese, N. Blin // J. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 51(4). – P. 501-507.

Рецензенты:

Егорова Е. Н., д.м.н., заведующая кафедрой биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики ФПДО ГБОУ ВПО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь;

Коричкина Л.Н., д.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии и профессиональных болезней ГБОУ ВПО Тверской ГМУ Минздрава России, г. Тверь.