

ISSN 1607-419X
ISSN 2411-8524 (Online)
УДК 616.8-00

Возможности использования микроРНК в качестве биомаркера при диагностике инсульта

**М. П. Топузова, Т. М. Алексеева,
Е. Б. Панина, Т. В. Вавилова**

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Топузова Мария Петровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: topuzova_mp@almazovcentre.ru

*Статья поступила в редакцию
12.07.18 и принята к печати 21.10.18.*

Резюме

Острое инсульт-индуцированное повреждение эндотелиальных клеток приводит к нарушению мозговой микроциркуляции и значительному повреждению ткани головного мозга. Несмотря на недавний прогресс терапии, способствующий повышению выживаемости после инсульта, диагностические подходы, направленные на раннюю точную идентификацию патогенетического подтипа, остаются ограниченными. МикроРНК являются перспективными кандидатами на роль новых биомаркеров инсульта. Настоящая статья посвящена обзору данных о связи инсульта с изменением уровней определенных циркулирующих микроРНК и перспективах их диагностического использования.

Ключевые слова: инсульт, ишемический инсульт, биомаркеры инсульта, циркулирующие микроРНК, методы анализа микроРНК

Для цитирования: Топузова М. П., Алексеева Т. М., Панина Е. Б., Вавилова Т. В. Возможности использования микроРНК в качестве биомаркера при диагностике инсульта. Артериальная гипертензия. 2018;24(5):521–530. doi:10.18705/1607-419X-2018-24-5-521-530

MicroRNA as a diagnostic biomarker in stroke

M. P. Topuzova, T. M. Alekseeva,
E. B. Panina, T. V. Vavilova
Almazov National Medical Research Centre, St Petersburg,
Russia

Corresponding author:
Mariya P. Topuzova,
Almazov National Medical
Research Centre,
2 Akkuratov street, St Petersburg,
197341 Russia.
E-mail: topuzova_mp@almazovcentre.ru

Received 12 July 18;
accepted 21 October 2018.

Abstract

Acute stroke-induced damage of endothelial cells leads to impaired cerebral microcirculation and significant damage of the brain tissue. Despite recent advances in treatment approaches that improve survival after a stroke, diagnostic approaches aimed at early identification of the pathogenetic stroke subtype remain limited. MicroRNAs are promising biomarkers in stroke. The article reviews data on the relationship of stroke with changes in the levels of certain circulating microRNAs and the opportunities for their diagnostic use.

Key words: stroke, ischemic stroke, stroke biomarkers, circulating microRNA, microRNA analysis

For citation: Topuzova MP, Alekseeva TM, Panina EB, Vavilova TV. MicroRNA as a diagnostic biomarker in stroke. *Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension*. 2018;24(5):521–530. doi:10.18705/1607-419X-2018-24-5-521-530

Введение

Инсульт является огромной медицинской, социальной и экономической проблемой. Ишемические инсульты составляют до 71 % всех случаев инсульта и 51 % всех смертей, связанных с инсультом, во всем мире, и в настоящее время они относятся к числу ведущих причин тяжелой и долгосрочной инвалидности [1].

Связанный с инсультом ишемический каскад включает эксайтотоксичность, окислительный стресс, дисфункцию гематоэнцефалического барьера, микрососудистое повреждение и, в конечном счете, гибель нейронов, глии и эндотелиальных клеток. Повреждение эндотелиальных клеток приводит к значительным микрососудистым повреждениям, которые непосредственно влияют на повреждение мозговой ткани через повышенную проницаемость эндотелиальных клеток, деградацию матрикса и потерю мозговой сосудистой ауторегуляции [2]. Молекулярные механизмы этого сложного патогенетического процесса широко изучаются в поисках новых диагностических и терапевтических возможностей.

Несмотря на недавний прогресс терапии, способствующий повышению выживаемости после инсульта, диагностические подходы, направленные на раннюю точную идентификацию патогенетического подтипа, остаются ограниченными. В настоящее время нет известных биомаркеров, которые могли бы использоваться в целях диагностики инсульта, дифференцирования или предсказания риска со 100-процентной чувствительностью и специфичностью. Трудности открытия биомаркеров связаны с медленным проникновением глиальных и нейрональных белков через гематоэнцефалический барьер после инсульта. К тому же идеальные биомаркеры должны иметь характеристики, включающие диагностическую специфичность и чувствительность к инсульту, способность дифференцировать геморрагический и ишемический инсульт, способность к раннему и стабильному высвобождению сразу после инсульта, иметь предсказательную способность, потенциал для оценки риска и руководства терапией, а также способность быть качественно и быстро измеренными с применением технологий оценки медико-экономической эффективности [3].

Биомаркеры, применяемые для диагностики инсульта

В настоящее время ведутся многочисленные исследования по поиску новых биомаркеров инсульта. В качестве биомаркеров рассматриваются: матриксная металлопротеиназа 9 (MMP-9) [4–8], белок S 100 β [9–12], антитела к рецепторам N-метил-D-аспарагиновой кислоты (АТ к рецепторам NMDA (NR2A и NR2B)) [13], глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) [14], белок PARK 7 [15], нуклеозиддифосфаткиназа А (NDKA) [17], С-реактивный белок (СРБ) [16–17], адгезивная молекула клеток сосудов (VCAM-1) [18], монокитарный хемотаксический протеин (MCP-1) [19], аполипопротеин (apoC1 и apoC3) [20], мозговой натрийуретический пептид (BNP) [21–22], белок, связывающий жирные кислоты (FABP) [23–24], мозговой нейротрофический фактор (BDNF) [19], основной белок миелина (MBP) [25–26], нейрон-специфическая енолаза [27–28], D-димер [29], фактор Виллебранда [30] и другие. Однако все эти биомаркеры не являются специфичными для инсульта.

В целях улучшения диагностической чувствительности и специфичности индивидуальных биомаркеров были разработаны панели мультимаркеров.

Так, панель из 50 биомаркеров, которая включала S 100 β , β -тип нейротрофического фактора роста, фактор Виллебранда, MMP-9 и MCP-1, была использована М. Reynolds и соавторами (2003) при проведении скрининга в группе 223 больных инсультом [19]. Комбинация 5 маркеров давала результаты с высокой диагностической чувствительностью (91 %) и специфичностью (97 %) при диагностике ишемического инсульта в пробах, полученных из сыворотки крови в течение 12 ч после появления симптомов по сравнению с применением отдельно каждого маркера. В другом исследовании применялась панель из 26 маркеров в группе из 65 пациентов с ишемическим инсультом [18]. Была получена диагностическая чувствительность и специфичность 90 % для предсказания инсульта при комбинировании S 100 β , MMP-9, VCAM-1 и фактора Виллебранда.

D. Laskowitz и соавторы (2005) исследовали панель маркеров, в которую были включены D-димер, СРБ, BNP, MMP-9 и S 100 β . Группа из 130 больных инсультом была обследована в течение 6 часов после появления симптомов. Наблюдались более низкая диагностическая чувствительность (81 %) и специфичность (70 %) в отношении диагноза ишемического инсульта по сравнению с предыдущими исследованиями [31].

Следовательно, необходим дальнейший поиск кандидатов на роль биомаркеров инсульта, которые можно будет применять в клинической практике.

Свойства микроРНК

МикроРНК представляют собой класс молекул малой РНК, которые функционируют как регуляторы экспрессии генов и способны в значительной степени влиять на развитие клеток, их дифференцировку, пролиферацию и апоптоз [32].

МикроРНК присутствуют в стабильной форме в легкодоступных физиологических жидкостях, в частности, в плазме крови, моче и ликворе. В ответ на изменение состояния клеток организма уровни определенных микроРНК могут претерпевать значительные изменения. Эти характеристики делают микроРНК отличными кандидатами на роль биомаркеров различных патологических состояний [33, 34].

Методы выделения микроРНК

По данным ряда авторов, микроРНК в физиологических жидкостях циркулируют в составе имеющих мембрану микровезикул (экзосом, микрочастиц) [35–36], комплексов с белковыми молекулами [37] или липопротеинами [38], и для выделения микроРНК все микроРНКсодержащие комплексы должны быть разрушены.

Выделение микроРНК из биологических жидкостей наиболее часто проводят с помощью фенолгуанидинового метода с различными модификациями. С этой целью доступны коммерческие наборы для выделения микроРНК: TRIzol (Invitrogen, Великобритания), mirVANA (Ambion, Austin, TX, США), miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen, Германия), TaqMan ABC miRNA Purification Kit (Applied Biosystem, США) [39]. После фенолгуанидиновой экстракции для очистки и получения обогащенной короткими РНК препаратов микроРНК используются колонки с твердофазными сорбентами (Qiagen, Hilden, Германия) [40].

Более быстрым методом выделения микроРНК является денатурация и осаждение белков и липопротеинов с последующей очисткой на колонках. Этот метод используется в наборе miRCURY (Exiqon, Дания) [41].

Определение профилей экспрессии микроРНК

В настоящее время существуют три основных подхода: количественная полимеразноцепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией (qRT-PCR), методы гибридизации на микрочипах и высокопроизводительное секвенирование (RNA-seq).

Количественная ПЦР в реальном времени после обратной транскрипции

Привлекательным аспектом этого подхода является легкость включения в рабочий процесс для лабораторий, которые знакомы с ПЦР в режиме реального времени [42]. Достоинством метода является его высокая чувствительность, что позволяет работать с малыми количествами микроРНК. К недостаткам метода можно отнести ограниченность числа одновременно анализируемых микроРНК. Эта проблема была решена созданием ПЦР-микрочипов. По сути это количественный ПЦР-анализ множества микроРНК. Используются ПЦР-микрочипы TaqMan Array (Applied Biosystems, США) и количественный ПЦР-анализ, предлагаемый фирмой Exiqon LNA qPCR Panels (Exiqon, Дания) [43].

Методы, основанные на гибридизации

Микрочипы были среди первых методов, которые используются для параллельного анализа большого числа микроРНК. Достоинством метода является высокая пропускная способность, но при этом обычно более низкая специфичность, чем qRT-ПЦР и трудность использования этого метода для абсолютной количественной оценки.

В практике чаще используются: панель Geniom Biochip miRNA на платформе CBC (febit), панель GeneChip miRNA array на платформе Affymetrix, панель MicroRNA microarray на платформе Agilent, панель miRCURY LNA miRNA array на платформе Exiqon, панель Sentrix array matrix and BeadChips на платформе Illumina [43].

Секвенирование нового поколения

Методы этой группы позволяют исследовать полный набор микроРНК в образце, включая незрелые формы и предшественники микроРНК, а также с высокой точностью различать микроРНК, которые очень похожи по последовательности, в том числе осуществлять поиск новых (ранее не индексированных) микроРНК. Среди недостатков метода можно отметить большое начальное количество суммарной РНК, трудоемкость и длительность самой процедуры, а также сложный анализ полученных данных [42].

Как правило, qRT-PCR имеет самый широкий динамический диапазон, самую высокую точность и является единственным методом, который может легко обеспечить абсолютную количественную оценку микроРНК (например, путем генерирования стандартных кривых из разведений синтетических олигонуклеотидов микроРНК с известной концентрацией).

Микрочипы лучше всего использовать в качестве инструментов скрининга, а не как количественные аналитические платформы.

Изменение уровней микроРНК при инсульте

Значительные изменения уровней микроРНК в ткани мозга и в крови были обнаружены на основе экспериментальной ишемии головного мозга у грызунов [44–50]. Результаты проведенных исследований описывают вовлечение микроРНК в патогенетические механизмы при инсульте, а также рассматривают микроРНК как возможные прогностические и терапевтические мишени.

Изменения уровней микроРНК при инсульте, описанные в литературе, представлены в таблице.

В 2009 году исследователями из Малайзии были выявлены 157 микроРНК, уровни которых в крови менялись при инсульте. В частности, let-7e, miR-25, -181a, -513a-5p, -550, -602, -665, -891a, -923, -933, -939, -1184, -1246, -1261, -1275, -1285, -1290 были повышены, а уровни let-7f, miR-15b, -126, -142-3p, -186, -519e, -768-5p, -1259 — понижены. Исследователи пришли к выводу о том, что эти микроРНК могут быть использованы для дифференциального диагноза инсульта на фоне макроангиопатии, микроангиопатии и эмболического инсульта. Так, было показано, что при поражении малых артерий, по сравнению с поражением крупных, уровень экспрессии микроРНК miR-130b, -29b, -301a, -339-5p, -532-5p, -634, 886-5p был выше более чем в 2 раза. Тогда как уровень miR-768-3p был выше при макроангиопатии [51].

В Шанхае (Китай) обнаружили, что miR-210 крови снижена у пациентов при остром ишемическом инсульте по сравнению с контрольной группой и постепенно снижается в течение 3, 7 и 14 дней. Кроме того, уровень miR-210 коррелирует с исходом инсульта: чем ниже уровень miR-210, тем хуже исход. Полученные данные свидетельствуют о том, что miR-210 крови можно считать новым биомаркером для диагностики и прогноза ишемического инсульта [52].

В 2011 году группа ученых из Куала-Лумпура (Малайзия) выявила повышенную экспрессию микроРНК-145 у пациентов в остром периоде ишемического инсульта по сравнению с группой здоровых добровольцев. Повторный анализ экспрессии микроРНК-145 через месяц после перенесенного инсульта выявил незначительное снижение по сравнению с острым периодом. Стремительное снижение уровня экспрессии микроРНК-145 может свидетельствовать о завершении регенерации сосудов, достижении гомеостатического равновесия [53].

Таблица

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЕЙ микроРНК ПРИ ИНСУЛЬТЕ

МикроРНК	Патология	Изменение уровней	Физиологическая жидкость	Источник
let-7e, miR-25, miR-181a, miR-513a-5p, miR-550, miR-602, miR-665, miR-891a, miR-923, miR-933, miR-939, miR-1184, miR-1246, miR-1261, miR-1275, miR-1285, miR-1290	Инсульт (от 6 до 18 месяцев)	Повышен	Плазма	KS Tan et al., 2009
let-7f, miR-15b, miR-126, miR-142-3p, miR-186, miR-519e, miR-768-5p, miR-1259	Инсульт (от 6 до 18 месяцев)	Понижен	Плазма	KS Tan et al., 2009
miR-130b, miR-29b, miR-301a, miR-339-5p, miR-532-5p, miR-634, miR-886-5p	Инсульт на фоне микроангиопатии (от 6 до 18 месяцев)	Повышен	Плазма	KS Tan et al., 2009
miR-768-3p	Инсульт на фоне макроангиопатии (от 6 до 18 месяцев)	Повышен	Плазма	KS Tan et al., 2009
miR-210	Инсульт (острый период)	Понижен	Плазма	L Zeng et al., 2011
miR-145	Инсульт (острый период)	Повышен	Плазма	CS Gan et al., 2012
miR-30a, miR-126	Инсульт (первые 24 недели)	Понижен	Плазма	G Long et al., 2013
miR-1258, miR-125a-5p, miR-1260, miR-1273, miR-149, miR-220b, miR-23a, miR-26b, miR-29b-1, miR-302e, miR-488, miR-490-3p, miR-506, miR-659, miR-890, miR-920, miR-934	Инсульт (от 2 до 24 месяцев)	Повышен	Плазма	JR Tan et al., 2013
miR-25, miR-34b, miR-483-5p, miR-498	Инсульт (от 2 до 24 месяцев)	Понижен	Плазма	JR Tan et al., 2013
hsa-miR-208a, miR-519d, miR-605, miR-634, miR-99b, miR-377, miR-767-5p, miR-875-3p	Инсульт на фоне макроангиопатии	Повышен	Плазма	JR Tan et al., 2013
miR-377, miR-767-5p, miR-875-3p	Инсульт (кардиоэмболический)	Понижен	Плазма	JR Tan et al., 2013
miR-1274a, miR-1280, miR-200c, miR-375, miR-494, miR-520d-5p, miR-551a, miR-629, miR-656, miR-657, miR-664, miR-766	Инсульт на фоне микроангиопатии	Понижен	Плазма	JR Tan et al., 2013
let-7b	Инсульт (первые 24 недели)	Повышен	Плазма	G Long et al., 2013
miR-21	Инсульт (первые 7 дней)	Повышен	Сыворотка	PC Tsai et al., 2013
miR-221	Инсульт (первые 7 дней)	Понижен	Сыворотка	PC Tsai et al., 2013

МикроРНК	Патология	Изменение уровней	Физиологическая жидкость	Источник
let-7d*, miR-125b-2, miR-1261, miR-1299, miR-130a, miR-1321, miR-208a, miR-22, miR-23a, miR-27a, miR-320b, miR-320d, miR-30c, miR-340, miR-422a, miR-423-3p, miR-488, miR-502-5p, miR-549a, miR-574-3p, miR-574-5p, miR-617, miR-627, miR-886-5p, miR-92a, miR-93	Инсульт (острый период)	Повышен	Плазма	S Sepra-maniam et al., 2014
let-7a, let-7g, miR-129-5p, miR-192-5p, miR-196a, miR-26b, miR-30b, miR-96, miR-30e, miR-370, miR-381, miR-493, miR-525-5p, miR-652, miR-920, miR-933,	Инсульт (острый период)	Повышен	Плазма	S Sepra-maniam et al., 2014
let-7i, miR-122, miR-148a, miR-19a, miR-320d, miR-4429	Инсульт (острый период)	Понижен	Плазма	GC Jickling et al., 2014
miR-363, miR-487b	Инсульт (острый период)	Повышен	Плазма	GC Jickling et al., 2014
miR-106b-5P, miR-4306	Инсульт (острый период)	Повышен	Плазма	W Wang et al., 2014
miR-320e, miR-320d	Инсульт (острый период)	Понижен	Плазма	W Wang et al., 2014
miR-15a, miR-16, miR-17-5p	Инсульт (острый период)	Повышен	Сыворотка	J Wu et al., 2015
miR-17	Инсульт (острый период)	Повышен	Плазма	JM Kim et al., 2015
miR-9, miR-124	Инсульт (острый период, первые 24 часа)	Повышен	Сыворотка	Q Ji et al., 2016
miR-223	Инсульт (острый период, первые 72 часа)	Повышен	Сыворотка	Y Chen et al., 2017
miR-221-3p, miR-382-5p	Инсульт (острый период, первые 6 часов)	Понижен	Сыворотка	Y Wang et al., 2017
miR-146b	Инсульт (острый период, первые 4 часа)	Повышен	Сыворотка	Z Chen et al., 2018

В 2013 году исследовательская группа из Сингапура, Малайзии и Австралии характеризовала профили микроРНК в крови у молодых пациентов с ишемическим инсультом (18–49 лет) на фоне низкого сосудистого риска или его отсутствия. Они обнаружили 21 микроРНК, уровни которых у пациентов с ишемическим инсультом отличались от уровней у пациентов с высоким сосудистым риском. Среди 21 микроРНК уровни 17 (miR-1258, -125a-5p, -1260, -1273, -149, -220b, -23a*, -26b*, -29b-1*, -302e, -488, -490-3p, -506, -659, -890, -920, -934) повышались, а уровни 4 понижались

(miR-25, -34b, -483-5p, -498). Ученые сделали вывод, что микроРНК отражают патогенетические механизмы инсульта. Кроме того, были обнаружены микроРНК (hsa-miR-208a, -519d, -605, -634, -99b), уровни которых повышались при инсульте только у пациентов с макроангиопатией. Также уровни микроРНК miR-377, -767-5p и -875-3p повышались при макроангиопатии, но при этом понижались при кардиоэмболическом инсульте. Было выявлено понижение 12 микроРНК (miR-1274a, -1280, -200c, -375, -494, -520d-5p, -551a, -629, -656, -657, -664, -766) при лакунарном инсульте

в отличие от макроангиопатии и кардиоэмболического подтипа [54].

Учеными из Китая в 2013 году было выявлено снижение уровня циркулирующих в плазме крови miR-30a и miR-126 у пациентов с ишемическим инсультом в течение первых 24 недель, тогда как уровень циркулирующих let-7b был повышенным [55].

Исследователями из Гаосюннского университета и Тайчжунского госпиталя ветеранов (Тайвань) описали у пациентов в остром периоде инсульта (первые 7 дней) и пациентов с атеросклеротическим поражением сонных артерий (не менее 50% без инсульта в анамнезе) значительно более высокие уровни miR-21 и низкие miR-221 в сыворотке крови, чем у здоровых лиц. В результате проведенной работы был сделан вывод о том, что miR-21 и miR-221 можно считать дополнительным фактором риска развития инсульта [56].

В 2014 году малазийскими исследователями было выявлено, что 26 микроРНК являются уникальными для острого периода инсульта (let-7d, miR-125b-2, -1261, -1299, -130a, -1321, -208a, -22, -23a, -27a, -320b, -320d, -30c, -340, -422a, -423-3p, -488, -502-5p, -549a, -574-3p, -574-5p, -617, -627, -886-5p, -92a and -93), а 16 — для восстановительного (let-7a, let-7g, miR-129-5p, -192-5p, -196a, -26b, -30b, -30e, -370, -381, -493, -525-5p, -652, -920, -933 and -96). При этом уровни 5 микроРНК (miR-125b-2, -27a, -422a, -488 и -627) повышались в крови в остром периоде инсульта (от одного до семи дней) независимо от возраста, тяжести инсульта и метаболических осложнений, и предложили использовать уровень экспрессии этих микроРНК в качестве возможных биомаркеров [57].

Исследователи из университета Калифорнии в Дэвисе (США) в 2014 году сравнили уровни микроРНК в крови у пациентов в остром периоде ишемического инсульта и контрольной группы без инсульта, но имеющих факторы риска для его развития. Были обнаружены пониженные уровни 6 микроРНК (miR-122, miR-148a, let-7i, miR-19a, miR-320d и miR-4429) и повышенные уровни 2 микроРНК (miR-363 и miR-487b) у пациентов с ишемическим инсультом [58].

В университете Цзянсу (Китай) в 2015 году обнаружили, что miR-106b-5P и miR-4306 присутствовали в плазме у пациентов с острым инсультом в большом количестве, тогда как содержание miR-320e и miR-320d было низким. Основываясь на полученных результатах, авторы сделали вывод о том, что микроРНК могут быть перспективными биомаркерами для раннего выявления острого инсульта [59].

Другая группа исследователей из того же университета обнаружила, что уровни экспрессии miR-15a, miR-16 и miR-17-5p в сыворотке были значимо повышены у пациентов в остром периоде ишемического инсульта по сравнению со здоровой группой контроля. Был сделан вывод о том, что повышенная сывороточная экспрессия miR-15a, miR-16 и miR-17-5p ассоциирована с острым периодом ишемического инсульта и что комбинация этих трех микроРНК может быть многообещающим сывороточным биомаркером острого периода ишемического инсульта [60].

Ученые из Сеула (Южная Корея) в 2015 году описали значительно повышенные уровни miR-17 в плазме крови у пациентов с острым инсультом, а также обнаружили ассоциацию этой микро-РНК с повторным инсультом. Кроме того, было определено, что уровни miR-126 положительно коррелировали с церебральным атеросклерозом [61].

Совместная работа исследователей из Китая и США в 2016 году показала данные о значительно повышенном уровне в экзосомах из сыворотки miR-9 и miR-124 у пациентов первые 24 часа ишемического инсульта, предположив, что они являются перспективными биомаркерами для диагностики острого ишемического инсульта и оценки степени повреждения мозговой ткани вследствие ишемии. Тем не менее ученые считают необходимым продолжение исследования для подтверждения специфичности и чувствительности этих циркулирующих микроРНК [62].

Другая исследовательская группа из Шанхайского университета (Китай) и Тель-Авивского университета (Израиль) обнаружила значительное повышение уровня экзосомальных miR-223 из сыворотки у пациентов с острым ишемическим инсультом (первые 72 часа) по сравнению с контрольной группой. Уровень экзосомальных miR-223 положительно коррелировал с оценкой по NIHSS. Также уровень экзосомальной miR-223 у пациентов с плохим исходом инсульта был выше, чем у пациентов с хорошими результатами. Таким образом, увеличенный уровень экзосомальной miR-223 ассоциирован с острым ишемическим инсультом, его тяжестью и краткосрочным исходом [63].

В качестве потенциального неинвазивного биомаркера для диагностики ишемического инсульта ученые из Тяньцзиньского медицинского университета (Китай) в 2017 году предложили использовать циркулирующие сывороточные miR-221-3p и miRNA-382-5p, обнаружив значительное снижение уровня этих микроРНК в сыворотке крови у пациентов в первые 6 часов ишемического ин-

сульты по сравнению со здоровыми субъектами контроля [64].

Группа авторов из Гуансиского университета (Китай) в 2018 году выявила, что экспрессия miR-146b в сыворотке крови значимо возрастала в течение 4 часов после начала инсульта по сравнению с контрольной группой. При этом различий в экспрессии miR-146b в зависимости от подтипа инсульта получено не было [65].

Заключение

МикроРНК могут стать дополнительным инструментом для точной диагностики инсульта. Определение профилей микроРНК крови и плазмы пациентов дает возможность не только подтверждать факт случившегося события, но и определять период инсульта, различать его подтипы и даже судить о прогнозе. Рутинное использование микроРНК с этой целью требует уточнения набора специфичных для инсульта микроРНК, а также совершенствования методов для быстрого количественного определения их уровней.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Feigin VL, Norrving B, George MG, Foltz JL, Roth GA, Mensah GA. Prevention of stroke: a strategic global imperative. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(9):501–512. doi:10.1038/nrneurol.2016.107
- Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111(6):483–495. doi:10.1016/j.clineuro.2009.04.001
- Saengen AK, Christenson RN. Stroke biomarkers: progress and challenges for diagnosis, prognosis, differentiation and treatment. *Clin. Chem*. 2010;56(1):21–33. doi:10.1373/clinchem.2009.133801
- Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res*. 2002;69(1):1–9.
- Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J et al. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke*. 2001;32(8):1759–1766.
- Alvarez-Sabin J, Delgado P, Abilleira S, Molina CA, Arenillas J, Ribó M et al. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome. *Stroke*. 2004;35(6):1316–1322. doi:10.1161/01.STR.0000126827.69286.90
- Vukasovic I, Tesija-Kuna A, Topic E, Supanc V, Demarin V, Petrovic M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in different acute stroke subtypes. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(4):428–434. doi:10.1515/CCLM.2006.079
- Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke*. 2001;32(12):2762–2767.
- Persson L, Hardemarc HG, Gustafsson J, Rundström G, Mendel-Hartvig I, Esscher T et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke*. 1987;18(5):911–918.
- Abraham HD, Butterworth RJ, Bath PM, Wassif WS, Garthwaite J, Sherwood RA. Serum S-100 protein, relationship to clinical outcome in acute stroke. *Ann Clin Biochem*. 1997;34(4):366–370.
- Elting JW, de Jager AE, Teelken AW, Schaaf MJ, Maurits NM, van der Naalt J et al. Comparison of serum S-100 protein levels following stroke and traumatic brain injury. *J Neurol Sci*. 2000;181(1–2):104–110.
- Foerch C, de Jager AE, Teelken AW, Schaaf MJ, Maurits NM, van der Naalt J et al. S100B as a surrogate marker for successful dot fysis in hyperacute middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74(3):322–325.
- Dambinova SA, Khounteev GA, Izykenova GA, Zavolokov IG, Ilyukhina AY, Skoromets AA. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. *Clin Chem*. 2003;49(10):1752–1762.
- Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, Lamers KJ. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke*. 2000;31(11):2670–2677.
- Allard L, Burkhard PR, Lescuyer P et al. PARK7 and nucleoside diphosphate kinase A as plasma markers for the early diagnosis of stroke. *Clin Chem*. 2005;51(11):2043–2051. doi:10.1373/clinchem.2005.053942
- Andersson J, Johansson L, Ladvall P, Wiklund PG, Stegmayr B, Jern C et al. C-reactive protein is a determinant of first-ever stroke: prospective nested case-referent study. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27(6):544–551. doi:10.1159/000214217
- Kaplan RC, McGinn AP, Baird AE, Hendrix SL, Kooperberg C, Lynch J et al. Inflammation and hemostasis biomarkers for predicting stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Observational Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2008;17(6):344–355. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.04.006
- Lynch JR., Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke*. 2004;35(1): 57–63. doi:10.1161/01.STR.0000105927.62344.4C
- Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, Anderberg JM, McPherson PH, Nakamura KK et al. Early biomarkers of stroke. *Clin Chem*. 2003;49(10):1733–1739.
- Allard L, Lescuyer P, Burgess J, Leung KY, Ward M, Walter N et al. ApoC-I and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and haemorrhagic stroke. *Proteomics*. 2004;4(8):2242–2251. doi:10.1002/pmic.200300809
- Makikallio AM, Makikallio TH, Korpelainen JT et al. Natriuretic peptides and mortality after stroke. *Stroke*. 2005;36(5):1016–1120. doi:10.1161/01.STR.0000162751.54349
- Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, Ribó M, Chacón P, Rosell A et al. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke*. 2008;39(8):2280–2287. doi:10.1161/STROKEAHA.107.505354
- Wunderlich MT, Hanhoff T, Goertler M, Spener F, Glatz JF, Wallesch CW et al. Release of brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in serum after acute ischaemic stroke. *J. Neurol*. 2005;252(6):718–724. doi:10.1007/s00415-005-0725-z
- Pelsers MMAL, Hanhoff T, Van der Voort D, Arts B, Peters M, Ponds R et al. Brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in the brain; tissue distribution and clinical utility. *Clin Chem*. 2004;50(9):1568–1575.

25. Jauch EC, Lindsell C, Broderick J, Fagan SC, Tilley BC, Levine SR et al. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. *Stroke*. 2006; 37(10): 2508–2513. doi:10.1161/01.STR.0000242290.01174.9e
26. Hill MD, Jackowski G, Bayer N, Lawrence M, Jaeschke R et al. Biochemical markers in acute ischemic stroke. *CMAJ* 2000;162(8):1139–1140.
27. Uden J, Strandberg K, Malm J, Campbell E, Rosengren L, Stenflo J et al. Explorative investigation of biomarkers of brain damage and coagulation system activation in clinical stroke differentiation. *J Neurol*. 2009;256(1): 72–77. doi:10.1007/s00415–009–0054–8.
28. Anand N, Stead LG. Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis*. 2005;20(4): 213–219. doi:10.1159/000087701
29. Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, Rimmel KS, Jauch EC; BRAIN Study Group. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the biomarker rapid assessment in ischemic injury (BRAIN) study. *Stroke*. 2009;40(1):77–85. doi:10.1161/STROKEAHA.108.516377
30. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, Cooper LS, Aleksic N, Nieto FJ et al. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. *Circulation*. 1999;100(7):736–742.
31. Laskowitz DT, Blessing R, Floyd J, White WD, Lynch JR. Panel of biomarkers predicts stroke. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1053: 30. doi:10.1196/annals.1344.051
32. Kato M, Slack FJ. MicroRNAs: small molecules with big roles — C. elegans to human cancer. *Biol Cell*. 2008; 100(2):71–81. doi:10.1042/BC20070078
33. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. 2010; 50(4):298–301. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.032
34. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(30):10513–10518. doi:10.1073/pnas.0804549105
35. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS ONE*. 2012;7:e30679. doi:10.1371/journal.pone.0030679
36. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*. 2008;3(11): e3694. doi:10.1371/journal.pone.0003694
37. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(12):5003–5008. doi:10.1073/pnas.1019055108
38. Wagner J, Riwanto M, Besler C, Knau A, Fichtlscherer S, Röxe T. et al. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoproteinbound microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(6):1392–1400. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300741
39. Eldh M, Lotvall J, Malmhall C, Ekstrom K. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: evaluation of different methods. *Mol Immunol*. 2012;50(4):278–286. doi:10.1016/j.molimm.2012.02.001
40. McAlexander MA, Phillips MJ, Witwer KW. Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. *Front Genet*. 2013 May 16;4:83. doi:10.3389/fgene.2013.00083
41. Eldh M, Lotvall J, Malmhall C, Ekstrom K. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: evaluation of different methods. *Mol Immunol*. 2012;50(4):278–286. doi:10.1016/j.molimm.2012.02.001
42. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat. Rev. Genet*. 2012;13(5):358–369. doi:10.1038/nrg3198
43. Власов В. В., Рыкова Е. Ю., Пономарева А. А., Запорожченко И. А., Морозкин Е. С., Чердынцева Н. В. и др. Циркулирующие микроРНК крови при раке легкого: перспективы использования для диагностики, прогноза и оценки эффективности терапии. *Молекулярная биология*. 2015;49(1):55–66. doi:10.7868/S0026898415010164 [Vlasov VV, Rykova E.Yu., Ponomareva AA, Zaporozhchenko IA, Morozkin ES, Cherdynitseva NV et al. Circulating blood microRNAs in lung cancer: use perspectives for diagnosis, prognosis and evaluation of the effectiveness of therapy. *Molekulyarnaya Biologiya = Molecular biology*. 2015; 49(1):55–66. doi:10.7868/S0026898415010164 In Russian].
44. Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 2008;39(3):959–966. doi:10.1161/STROKEAHA.107.500736
45. Liu DZ, Tian Y, Ander BP, Xu H, Stamova BS, Zhan X et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(1):92–101. doi:10.1038/jcbfm.2009.186
46. Liu FJ, Lim KY, Kaur P, Sepramaniam S, Armugam A, Wong PT et al. MicroRNAs involved in regulating spontaneous recovery in embolic stroke model. *PLoS One*. 2013;8(6):66393. doi:10.1371/journal.pone.0066393
47. Dharap A, Bowen K, Place R, Li LC, Vemuganti R. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(4):675–687. doi:10.1038/jcbfm.2008.157
48. Selvamani A, Sathyan P, Miranda RC, Sohrabji F. An antagomir to microRNA Let7f promotes neuroprotection in an ischemic stroke model. *PLoS One*. 2012;7(2):e32662. doi:10.1371/journal.pone.0032662
49. Zeng L, He X, Wang Y, Tang Y, Zheng C, Cai H. et al. MicroRNA-210 overexpression induces angiogenesis and neurogenesis in the normal adult mouse brain. *Gene Ther*. 2014;21(1):37–43. doi:10.1038/gt.2013.55
50. Dhiraj DK, Chrysanthou E, Mallucci GR, Bushell M. MiRNAs-19b, -29b-2 and -339-5p show an early and sustained up-regulation in ischemic models of stroke. *PLoS One*. 2013;8(12): e83717. doi:10.1371/journal.pone.0083717
51. Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, Lim KY, Lim KY, Setyowati et al. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients. *PLoS One*. 2009;4(11): e7689. doi:10.1371/journal.pone.0007689
52. Zeng L, Liu J, Wang Y, Wang L, Weng S, Tang Y et al. MicroRNA-210 as a novel blood biomarker in acute cerebral ischemia. *Front Biosci* 2011;3:1265–1272.
53. Gan CS, Wang CW, Tan KS. Circulatory microRNA-145 expression is increased in cerebral ischemia. *Genet Mol Res*. 2012;11(1):147–152. doi:10.4238/2012.January.27.1
54. Tan JR, Tan KS, Koo YX, Yong FL, Wang CW, Armugam A et al. Blood microRNAs in low or no risk ischemic stroke patients. *Int J Mol Sci*. 2013;14(1):2072–2084. doi:10.3390/ijms14012072
55. Long G, Wang F, Li H, Yin Z, Sandip C, Lou Y et al. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. *BMC Neurol*. 2013;13(1):178. doi:10.1186/1471-2377-13-178
56. Tsai PC, Liao YC, Wang YS, Lin HF, Lin RT, Juo SH. Serum microRNA-21 and microRNA-221 as potential biomarkers

for cerebrovascular disease. *J Vasc Res* 2013;50(4):346–354. doi:10.1159/000351767

57. Sepramaniam S, Tan JR, Tan KS, DeSilva DA, Tavintharan S, Woon FP et al. Circulating microRNAs as biomarkers of acute stroke. *Int J Mol Sci*. 2014;15(1):1418–1432. doi:10.3390/ijms15011418

58. Jickling GC, Ander BP, Zhan XD, Noblett B, Stamova B, Liu D. MicroRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets. *PLoS One*. 2014;9(6): 99283. doi:10.1371/journal.pone.0099283

59. Wang W, Sun G, Zhang L, Shi L, Zeng Y. Circulating microRNAs as novel potential biomarkers for early diagnosis of acute stroke in humans. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(10):2607–2613. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.06.002

60. Wu J, Du K, Lu X. Elevated expressions of serum miR-15a, miR-16, and miR-17–5p are associated with acute ischemic stroke. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(11):21071–21079.

61. Kim JM, Jung KH, Chu K, Lee ST, Ban J, Moon J. et al. Atherosclerosis-related circulating MicroRNAs as a predictor of stroke recurrence. *Transl Stroke Res*. 2015;6(3):191–197. doi.org/10.1007/s12975-015-0390-1.

62. Ji Q, Ji Y, Peng J, Zhou X, Chen X, Zhao H et al. Increased brain-specific miR-9 and miR-124 in the serum exosomes of acute ischemic stroke patients. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163645. doi:10.1371/journal.pone.0163645

63. Chen Y, Song Y, Huang J, Qu M, Zhang Y, Geng J et al. Increased circulating exosomal miRNA-223 is associated with acute ischemic stroke. *Front Neurol*. 2017;8:57. doi:10.3389/fneur.2017.00057

64. Wang Y, Ma Z, Kan P, Zhang B. The diagnostic value of serum miRNA-221–3p, miRNA-382–5p and miRNA-4271 in ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26(5):1055–1060. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.12.019

65. Chen Z, Wang K, Huang J, Zheng G, Lv Y, Luo N. et al. Upregulated serum MiR-146b serves as a biomarker for acute ischemic stroke. *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(1):397–405. doi:10.1159/000486916

Информация об авторах

Топузова Мария Петровна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры неврологии и психиатрии, старший научный сотрудник НИЛ цереброваскулярной патологии НИО неврологии и нейрореабилитации ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Алексеева Татьяна Михайловна — доктор медицинских наук, заведующая кафедрой неврологии и психиатрии, заведующая НИЛ цереброваскулярной патологии НИО неврологии и нейрореабилитации ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Панина Елена Борисовна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры неврологии и психиатрии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Вавилова Татьяна Владимировна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information

Mariya P. Topuzova, MD, PhD, Senior Scientist, Associate Professor, Department of Neurology and Psychiatry, Senior Researcher, Research Laboratory of Cerebrovascular Pathology, Research Department of Neurology and Neurorehabilitation, Almazov National Medical Research Centre;

Tat'yana M. Alekseeva, MD, PhD, DSc, Professor, Head, Department of Neurology and Psychiatry, Head, Research Laboratory of Cerebrovascular Pathology, Research Department

of Neurology and Neurorehabilitation, Almazov National Medical Research Centre;

Elena B. Panina, MD, PhD, Associate Professor, Department of Neurology and Psychiatry, Almazov National Medical Research Centre;

Tat'yana V. Vavilova, MD, PhD, DSc, Professor, Head, Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre.