

Н.Е. Щеглова, М.Н. Калинин

## АНАЛИЗ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ MIR-126, MIR-155, MIR-221, MIR-222 У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ

*Кафедра патологической физиологии  
 ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинской университет Минздрова России*

Было обследовано 30 мужчин, страдающих гипертонической болезнью (ГБ) I-II стадии без систолической дисфункции миокарда левого желудочка и 15 здоровых мужчин. При изучении проангиогенных miR-126 и miR-155 уровень экспрессии miR-126 оказался в 256 раз выше у больных ГБ, при этом уровень экспрессии miR-155 оставался неизменным. Исследование антиангиогенных miR-221 и miR-222 показало, что уровень экспрессии miR-221 оказался в 195 раз выше в группе ГБ в сравнении с группой здоровых мужчин, а уровень экспрессии miR-222 в данной группе в 213 раз превышал аналогичный показатель контрольной группы. Проведенное исследование подтверждает участие miR-126, miR-221 и miR-222 в патогенезе ГБ.

*Ключевые слова:* микроРНК, гипертоническая болезнь, уровень экспрессии.

## ANALYSIS OF EXPRESSION LEVEL MIR-126, MIR-155, MIR-221, MIR-222 IN PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION

N.E. Shcheglova, M.N. Kalinkin

*Tver State Medical University*

30 men with essential hypertension (EH) of stage I-II without systolic dysfunction of left ventricular myocardium and 15 healthy men were examined. When studying the expression level of pro-angiogenic miR-126 and miR-155, it turned out that miR-126 expression level was 256 times higher in patients with EH, the level of expression of miR-155 appeared unchanged. The study of anti-angiogenic miR-221 and miR-222 showed that the level of miR-221 expression was 195 times higher in the EH group than in healthy men, and the level of miR-222 expression in this group was 213 times higher than that of the control group. The study confirms the participation of miR-126, miR-221 and miR-222 in the pathogenesis of EH.

*Key words:* essential hypertension, miRNA, the expression level.

### Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) лидируют в структуре причин смертности населения экономически развитых стран. Процессы атеросклероза, тромбоза и артериальной гипертензии составляют патоморфологическую основу заболеваний сердечно-сосудистой системы, а нарушение мозгового кровообращения и ишемическая болезнь сердца (ИБС) – наиболее частые причины летальных исходов [1, 2].

В последнее время в литературе стали появляться данные о различных биологических эффектах микрорибонуклеиновых кислот (микроРНК) на структуры сердечно-сосудистой системы.

МикроРНК – малые некодирующие молекулы рибонуклеиновых кислот (РНК), обычно длиной 19–24 нуклеотида, образуемые из более длинных РНК-предшественников и имеющие специфическую шпильчатую структуру [3]. Было показано, что микроРНК могут вызывать индукцию или, наоборот, подавлять гипертрофию миокарда, регулировать ангиогенез в миокарде, индуцировать и редуцировать фиброз [4].

По механизму действия микроРНК могут быть разделены на проангиогенные (например, miR-126, miR-155), запускающие ангиогенез, и антиангиогенные (например, miR-221, miR-222), подавляющие его [5]. МикроРНК не только важны для развития

сердца и сосудов, но и играют особую роль в развитии патологии сердечно-сосудистой системы, такой как гипертрофия и ишемия миокарда, аритмии [6, 7]. Еще более значима их потенциальная роль как биомаркеров в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний [8].

Вместе с тем следует указать, что данные об участии микроРНК в патогенезе гипертонической болезни малочисленны, поэтому проведение подобного исследования представляется, безусловно, актуальным.

**Цель исследования** – анализ уровня экспрессии miR-126, miR-155, miR-221 и miR-222 у больных с гипертонической болезнью (ГБ).

### Материалы и методы

Было обследовано 30 мужчин, находившихся на стационарном лечении в кардиологическом отделении Областной клинической больницы Твери, и 15 здоровых мужчин.

Сформированы выборки: в I группу (контрольная группа) включили 15 здоровых мужчин от 29 до 47 лет (средний возраст  $33,93 \pm 1,14$  года); II группа состояла из 30 пациентов, страдающих ГБ, в возрасте от 29 до 65 лет (средний возраст  $47,73 \pm 1,97$  года). Критерии принадлежности к исследуе-

мой группе: мужской пол и наличие ГБ I–II стадии с артериальной гипертензией 2-й степени (максимальные цифры артериального давления 179/109 мм рт. ст.) без систолической дисфункции миокарда левого желудочка [9] и отсутствие на момент обследования диагноза ИБС. Критерии исключения: лица, страдающие сахарным диабетом, сопутствующими заболеваниями почек, легких, желудочно-кишечного тракта, печени, заболеваниями крови и нарушениями обмена веществ, аллергическими заболеваниями и профессиональными вредностями, отягощенным аллергологическим анамнезом.

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) [10]. 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 °С, 30 минут при 42 °С, 5 минут при 85 °С, и далее нагревание при 4 °С.

Экспрессию miR-126, miR-155, miR-221 и miR-222 оценивали с помощью показателя  $\Delta C_t$  [11], который определяли трижды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на приборе «ABI Prism 7500» с помощью набора TaqMan Small RNA Assays («Applied Biosystems», США) с применением полученной кДНК и праймеров miR-126, miR-155, miR-221, miR-222 по стандартному протоколу, предложенному производителем. В качестве эндогенного контроля использовали праймер RNU6B, который показывает относительно стабильную экспрессию, независимо от того, в каких тканях и клеточных культурах определяется [12].

Для расчета количественного изменения микроРНК использовали метод  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , предложенный K.J. Livak и T.D. Schmittgen [13] ( $C_t$  – пороговое значение цикла, где флуоресценция впервые фиксируется достоверно выше порогового уровня).

Попарное сравнение показателей  $\Delta C_t$  контрольной группы с группой ГБ проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни для оценки различий между двумя малыми выборками по уровню количественно измеряемого признака. Биометрический анализ осуществлялся с использованием пакета WINPEPI (PEPI-for-Windows).

За уровень статистической значимости принимали  $P < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Как правило, при патологии меняется экспрессия не одной, а множества микроРНК, а для ряда

патологий спектр этих микроРНК перекрывается. На неслучайный характер выявленных ассоциаций различных микроРНК с развитием патологических процессов указывают многие авторы [14].

Полученные результаты изучения уровня экспрессии микроРНК у больных ГБ представлены в таблицах 1–2.

В табл. 1 показано, что уровень экспрессии miR-126 оказался почти в 256 раз выше у больных ГБ по сравнению с контрольной группой, а уровень экспрессии miR-155 у данной группы больных остается неизменным.

**Таблица 1**

#### Показатели уровня экспрессии проангиогенных miR-126 и miR-155 у больных ГБ

Исследуемая микроРНК	$\Delta C_t (M \pm m)$	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
miR-126	$-9,71 \pm 0,74$	-8,00	256,00
miR-155	$-4,23 \pm 0,61$	-1,20	2,29

*Примечание.*  $\Delta C_t$  – разность между значениями  $C_t$  исследуемой микроРНК и эндогенного контроля,  $M$  – среднее значение уровня экспрессии микроРНК,  $m$  – стандартная ошибка среднего,  $\Delta\Delta C_t$  – разность между значениями  $\Delta C_t$  исследуемого образца и контрольного,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  – формула для подсчета уровня экспрессии исследуемой микроРНК.

Прямых доказательств участия miR-126 в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний в литературе не приведено, хотя ряд авторов предполагает ее важную роль в развитии сосудистой патологии и процессах внутрисосудистого ремоделирования [15]. Есть также данные о существовании обратной корреляции между увеличением уровня miR-126 и улучшением ряда физиологических параметров у пациентов с сердечной недостаточностью [16].

Как показано в табл. 2, уровень miR-221 оказался в 195 раз выше, а уровень miR-222 – в 213 раз выше у больных ГБ по сравнению со здоровыми людьми.

**Таблица 2**

#### Показатели уровня экспрессии антиангиогенных miR-221 и miR-222 у больных ГБ

Исследуемая микроРНК	$\Delta C_t (M \pm m)$	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
miR-221	$-8,54 \pm 0,98$	-7,61	195,36
miR-222	$-7,81 \pm 0,59$	-7,74	213,78

*Примечание.*  $\Delta C_t$  – разность между значениями  $C_t$  исследуемой микроРНК и эндогенного контроля,  $M$  – среднее значение уровня экспрессии микроРНК,  $m$  – стандартная ошибка среднего,  $\Delta\Delta C_t$  – разность между значениями  $\Delta C_t$  исследуемого образца и контрольного,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  – формула для подсчета уровня экспрессии исследуемой микроРНК.

Существуют сведения, что miR-221 наряду с miR-222 блокирует пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез [3]. По данным некоторых авто-

ров, miR-221 участвует в подавлении пролиферации эндотелиальных клеток и процессах ангиогенеза, а уровень данной микроРНК в интиме повышается после повреждения стенки сосуда [17]. В то же время следует отметить, что роль miR-222 в патологии сердечно-сосудистой системы в литературе до сих пор достаточно четко не описана.

Корректность сделанных выводов была подтверждена проведением попарного сравнения показателей ΔCt контрольной группы с группой ГБ. При этом были получены сходные результаты. В частности, было показано, что группа больных ГБ достоверно отличается от контрольной группы по уровню плазменной miR-126 ( $p < 0,001$ ), для miR-155 достоверных различий получено не было (табл. 3).

**Таблица 3**

**Сравнение показателей ΔCt в контрольной группе и у больных ГБ (M ± m)**

Показатели	Группа контроля (n = 15)	Больные ГБ (n = 30)
ΔCt miR-126	-1,71 ± 0,90	-9,71 ± 4,03*
ΔCt miR-155	-3,12 ± 0,36	-4,23 ± 3,36
ΔCt miR-221	-0,93 ± 0,66	-8,54 ± 5,36*
ΔCt miR-222	-0,07 ± 0,73	-7,81 ± 3,24*

*Примечание.* \* – статистическая значимость различий ( $P < 0,05$ ) между группой больных ГБ и контрольной (использован U-критерий Манна–Уитни).

**Заключение**

Таким образом, согласно результатам проведенного исследования обнаружено, что уровни экспрессии miR-126, miR-221, miR-222 у больных ГБ достоверно превышают аналогичные показатели здоровых людей. В то же время изменение уровня экспрессии miR-155 с исследуемым заболеванием ассоциировать не удалось, что, возможно, указывает на менее значимую или иную роль miR-155 в патогенезе гипертонической болезни.

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследование miR-126, miR-221, miR-222, несомненно, может использоваться для изучения патогенеза молекулярно-генетических основ и патогенетической терапии гипертонической болезни.

**Литература/References**

1. *Корягина Н.А.* Возможность применения антисклеротической терапии в условиях клинической практики / Н.А. Корягина, А.В. Петрищев // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2012. – № 4. – С. 31–35.
2. *Корягина Н.А.* *Vozmozhnost' primeneniya antiskleroticheskoj terapii v uslovijah klinicheskoj praktiki / N.A. Korjagina, A.V. Petrishhev // Kardiologija i serdechno-sosudistaja hirurgija.* – 2012. – № 4. – С. 31–35.
3. *Торшин И.Ю.* Сосудистые заболевания сердца, мозга и молекулярные гены. Ассоциативные исследования и патофизиология сосудистых заболеваний / И.Ю. Торшин, О.А. Громова // Трудный пациент. – 2008. – № 2–3. – С. 15–19.
4. *Торшин И.Ю.* *Sosudistye zabolevanija serdca, mozga i molekularnye geny. Associativnye issledovanija i pato-*

5. *физиologija sosudistyh zabolevanij / I.Ju. Torshin, O.A. Gro-mova // Trudnyj pacient.* – 2008. – № 2–3. – С. 15–19.
6. *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. – V. 51 (4). – P. 501–507.
7. *MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction / B. Med-er [et al.] // Basic Res. Cardiol.* – 2010. – doi: 10.1007/s00395-010-0123-2.
8. *Meola N.* MicroRNAs and genetic diseases / N. Meola, V.A. Gennarino, S. Banfi // PathoGenetics. – 2009. – V. 2 (7). – doi: 10.1186/1755-8417-2-7.
9. *Щеглова Н.Е.* Особенности экспрессии проангиогенных miR-126 и miR-155 у больных гипертонической болезнью и постинфарктным кардиосклерозом / Н.Е. Щеглова, М.Н. Калинин // Врач-аспирант. – 2015. – № 2. – С. 104–108.
10. *Shheglava N.E.* *Osobennosti jekspressii proangiogennyh miR-126 i miR-155 u bol'nyh gipertonicheskoj bolezni'ju i postinfarktnym kardiosklerozom / N.E. Shheglava, M.N. Kalinkin // Vrach-aspirant.* – 2015. – № 2. – S. 104–108.
11. *Щеглова Н.Е.* Особенности экспрессии антиангиогенных miR-221 и miR-222 у больных гипертонической болезнью и постинфарктным кардиосклерозом / Н.Е. Щеглова, М.Н. Калинин // ЭНИ Забайкальский медицинский вестник. – 2015. – №2. – С. 32–35.
12. *Shheglava N.E.* *Osobennosti jekspressii antiangiogennyh miR-221 i miR-222 u bol'nyh gipertonicheskoj bolezni'ju i postinfarktnym kardiosklerozom / N.E. Shheglava, M.N. Kalinkin // JeNI Zabajkal'skij medicinskij vestnik.* – 2015. – №2. – S. 32–35.
13. *MicroRNAs: New Players in Cardiac Injury and Protection / C. Rakesh [et al.] // Molecular Pharmacology.* – 2011. – V. 80. – P. 558–564.
14. *Чазова И.Е.* Диагностика и лечение артериальной гипертензии (Рекомендации Российского медицинского общества по артериальной гипертонии и Всероссийского научного общества кардиологов) / И.Е. Чазова, Л.Г. Ратова, С.А. Бойцов // Системные гипертензии. – 2010. – № 3. – С. 5–27.
15. *Chazova I.E.* *Diagnostika i lechenie arterial'noj gipertenzii (Rekomendacii Rossijskogo medicinskogo obshhestva po arterial'noj gipertonii i Vserossijskogo nauchnogo obshhestva kardiologov) / I.E. Chazova, L.G. Ratova, S.A. Bojcov // Sistemnye gipertenzii.* – 2010. – № 3. – S. 5–27.
16. *MiRNA in lung cancer – Studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments / A. Keller [et al.] // BMC Cancer* – 2009. – V. 9 (353). – doi: 10.1186/1471-2407-9-3.
17. *Dorak M.T.* Real-time PCR / M.T. Dorak. – Taylor & Francis Group, an informa business. – 2006. – 333 p.
18. *Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation / V. Lamba [et al.] // BMC Research Notes.* – 2014. – V. 7 (129). – doi: 10.1186/1756-0500-7-129.
19. *Livak K.J.* Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // METHODS 25. – 2001. – P. 402–408.
20. *Кучер А.Н., Бабушкина Н.П.* Роль микро-РНК, генов их биогенеза и функционирования в развитии патологических состояний у человека / А.Н. Кучер, Н.П. Бабушкина // Медицинская генетика. – 2011. – № 1. – С. 3–13.
21. *Kucher A.N., Babushkina N.P.* *Rol' mikro-RNK, genov ih biogeneza i funkcionirovanija v razvitii patologicheskikh sostojanij u cheloveka / A.N. Kucher, N.P. Babushkina // Medicinskaja genetika.* – 2011. – № 1. – S. 3–13.
22. *Urbich C.* Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis / C. Urbich, A. Kueh-

bacher, S. Dimmeler // Cardiovascular Research. – 2008. – V. 79. – P. 581–588.

16. Перспективы применения микроРНК в диагностике и терапии сердечной недостаточности / А.Г. Кочетов [и др.] // Кардиологический вестник. – 2014. – № 2. – С. 62–67.

Perspektivy primeneniya mikroRNK v diagnostike i terapii serdechnoj nedostatochnosti / A.G. Kochetov [i dr.] // Kardiologicheskij vestnik. – 2014. – № 2. – S. 62–67.

17. Ишемическая болезнь сердца: регулирование с помощью микроРНК / Г.А. Коробов [и др.] // Кардиологический вестник. – 2011. – Т. VI (XVIII). – № 2. – С. 5–9.

Ishemicheskaja bolezn' serdca: regulirovanie s pomoshh'ju mikroRNK / G.A. Korobov [i dr.] // Kardiologicheskij vestnik. – 2011. – Т. VI (XVIII). – № 2. – С. 5–9.

*Щеглова Наталья Евгеньевна (контактное лицо) – к. м. н., доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинской университет Минздрава России. 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4. Тел. 8-965-722-30-57; e-mail: natali.sh45@mail.ru.*

УДК 616.12-008.331.1+616.12-005.4]-036.1:355.422

Т.П. Тананакина<sup>1</sup>, Л.Н. Иванова<sup>1</sup>, И.И. Макарова<sup>2</sup>, С.П. Задорожный<sup>1</sup>, Ю.В. Сидоренко<sup>1</sup>

## ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА У МИРНЫХ ЖИТЕЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ЛОКАЛЬНЫХ БОЕВЫХ ДЕЙСТВИЙ

<sup>1</sup>Кафедра физиологии ГУ «Луганский государственный медицинский университет»,  
<sup>2</sup>Кафедра физиологии с курсом теории и практики сестринского дела  
ФГБОУ ВО Тверской государственной медицинской университет Минздрава России

Оценивались последствия длительного воздействия локальной войны на клиническое течение артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца у жителей г. Луганска молодого и среднего возраста. У пациентов, которые постоянно находились в состоянии эмоционального стресса, связанного с локальными боевыми действиями на территории их проживания, установлена активация симпатической нервной системы и гуморальной регуляции вегетативных функций организма с одновременным снижением активности парасимпатической нервной системы. В клинической картине ИБС наблюдалось статистически значимое увеличение количества эпизодов ишемии и снижение эффективности антиангинальной терапии, течение АГ характеризовалось повышением уровня как систолического, так и диастолического артериального давления.

*Ключевые слова:* посттравматическое стрессовое состояние, длительные боевые действия, гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца.

## PECULIARITIES OF ARTERIAL HYPERTENSION AND ISCHEMIC HEART DISEASE IN CIVILIANS IN THE SITUATION OF LOCAL HOSTILITIES

T.P. Tananakina<sup>1</sup>, L.N. Ivanova<sup>1</sup>, I.I. Makarova<sup>2</sup>, S.P. Zadorozhny<sup>1</sup>, Y.V. Sydorenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lugansk State Medical University,  
<sup>2</sup>Tver State Medical University

The consequences of the prolonged impact of local war on the clinical course of hypertension and coronary heart disease among residents of Lugansk young and middle-aged were estimated. Patients who were constantly in a state of emotional stress associated with local hostilities on the territory of their residence established activation of the sympathetic nervous system and humoral regulation of the autonomic functions of the body with a simultaneous decrease in the activity of the parasympathetic nervous system. The clinical picture of CHD revealed a statistically significant increase in the number of episodes of ischemia and a decrease in the antianginal therapy effectiveness, the course of hypertension was characterized by an increase in the level of both systolic and diastolic blood pressure.

*Key words:* post-traumatic stress state, prolonged military actions, hypertensive disease, coronary heart disease.

### Введение

Локальные войны приводят к неуклонному снижению качества жизни больших социальных групп людей, создают условия для длительного психо-

травмирующего влияния на гражданское население. У мирных жителей, подвергающихся длительному воздействию негативных факторов войны, развивается посттравматическое стрессовое состояние