

# МикроРНК как значимые биомаркеры атеросклеротической цереброваскулярной патологии

А.А. Раскуражев, А.А. Шабалина, П.И. Кузнецова, М.М. Танашян

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

## Аннотация

**Введение.** Каротидный атеросклероз (КА) является одной из главных причин ишемических нарушений мозгового кровообращения. МикроРНК — относительно новая группа биомаркеров, часть из которых ассоциирована с процессами атерогенеза.

**Цель исследования** — оценка экспрессии ряда микроРНК у пациентов с цереброваскулярной патологией (ЦВП) в зависимости от выраженности КА.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 50 человек (медиана возраста 66 [61; 71] лет, 58% из них — мужчины) с ЦВП на фоне КА. Пациенты были разделены на две группы: у 16 пациентов (32%) стеноз внутренней сонной артерии (ВСА) составил 70% и более (основная группа), остальные 34 пациента со стенозом <70% вошли в группу сравнения. Определяли экспрессию следующих микроРНК: miR-126-5p, miR-126-3p, miR-29-5p, miR-29-3p, miR-33a-5p, miR-33a-3p, miR-21-5p, miR-21-3p.

**Результаты.** У пациентов с КА высоких градаций по сравнению с группой сравнения была снижена экспрессия miR-126-5p/-3p (4,8 и 5,9 vs. 8,5 и 7,6 соответственно;  $p < 0,001$ ), miR-29-3p (7,6 vs. 10,3;  $p < 0,001$ ) и повышена — miR-33a-5p (46,3 vs. 40,0;  $p < 0,05$ ). Кластерный анализ подтвердил характерные паттерны экспрессии указанных микроРНК у пациентов с разной степенью поражения ВСА. Также определены значимые отрицательные корреляции между степенью стеноза и экспрессией miR-126-5p ( $\rho = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ), miR-126-3p ( $\rho = -0,64$ ;  $p < 0,05$ ) и miR-29-3p ( $\rho = -0,62$ ;  $p < 0,05$ ).

**Заключение.** На основании анализа пациентов с атеросклеротической ЦВП представляется возможным разделить исследованные микроРНК на условно проатерогенные (miR-33a-5p/-3p) и атеропротективные (miR-126-5p/-3p, miR-29-3p, miR-21-5p/-3p). Указанные биомаркеры могут представлять диагностическую значимость в отношении предикции риска как прогрессирования КА, так и развития острых нарушений мозгового кровообращения, однако необходимы проспективные исследования.

**Ключевые слова:** каротидный атеросклероз, цереброваскулярная патология, микроРНК, биомаркеры

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Адрес для корреспонденции:** 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80. ФГБНУ «Научный центр неврологии».  
E-mail: rasckey@live.com. Раскуражев А.А.

**Для цитирования:** Раскуражев А.А., Шабалина А.А., Кузнецова П.И., Танашян М.М. МикроРНК как значимые биомаркеры атеросклеротической цереброваскулярной патологии. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2022; 16(1): 5–13.

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.1.1>

Поступила 18.01.2022 / Принята в печать 10.02.2022 / Опубликована 21.03.2022

## MicroRNA as significant biomarkers of cerebrovascular atherosclerosis

Anton A. Raskurazhev, Alla A. Shabalina, Polina I. Kuznetsova, Marine M. Tanashyan

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

## Abstract

**Introduction.** Carotid atherosclerosis (CA) is one of the main causes of ischaemic stroke. MicroRNA is a relatively new group of biomarkers, some of which are associated with atherogenesis.

The **aim** of the study was to evaluate the expression of several microRNAs in patients with cerebrovascular disease, depending on the severity of CA.

**Materials and methods.** The study included 50 people (median age 66 [61; 71] years, 58% men) with cerebrovascular disease secondary to CA. The patients were divided into two groups: 16 patients (32%) had  $\geq 70\%$  internal carotid artery (ICA) stenosis (main group), while the remaining 34 patients had  $< 70\%$  stenosis and formed the comparison group. Expression of the following microRNAs was measured: miR-126-5p, miR-126-3p, miR-29-5p, miR-29-3p, miR-33a-5p, miR-33a-3p, miR-21-5p and miR-21-3p.

**Results.** Compared to the comparison group, patients with a high degree of CA had reduced expression of miR-126-5p/-3p (4.8 and 5.9 vs. 8.5 and 7.6, respectively;  $p < 0.001$ ) and miR-29-3p (7.6 vs. 10.3;  $p < 0.001$ ), while miR-33a-5p expression was elevated (46.3 vs. 40.0;  $p < 0.05$ ). Cluster analysis confirmed typical expression patterns of these microRNAs in patients with varying degrees of ICA stenosis. Significant negative correlations were also found between the degree of stenosis and expression of miR-126-5p ( $\rho = -0.83$ ;  $p < 0.05$ ), miR-126-3p ( $\rho = -0.64$ ;  $p < 0.05$ ) and miR-29-3p ( $\rho = -0.62$ ;  $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** Based on an analysis of patients with cerebral atherosclerosis, the studied microRNAs can be divided into proatherogenic (miR-33a-5p/-3p) and atheroprotective (miR-126-5p/-3p, miR-29-3p, and miR-21-5p/-3p). These biomarkers can be diagnostically useful in predicting the risk of both CA progression and acute cerebrovascular accidents, yet prospective studies are required.

**Keywords:** carotid atherosclerosis, cerebrovascular disease, microRNA, biomarkers

**Source of funding.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For correspondence:** 125367, Russia, Moscow, Volokolamskoye shosse, 80. Research Center of Neurology. E-mail: rasckey@live.com. Raskurazhev A.A.

**For citation:** Raskurazhev A.A., Shabalina A.A., Kuznetsova P.I., Tanashyan M.M. [MicroRNA as significant biomarkers of cerebrovascular atherosclerosis]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2022; 16(1): 5–13. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.1.1>

Received 18.01.2022 / Accepted 10.02.2022 / Published 21.03.2022

## Введение

Атеросклероз сосудов головного мозга и, преимущественно, каротидный атеросклероз (КА) является одной из основных причин развития ишемического инсульта и цереброваскулярной патологии (ЦВП). Эпидемиологические данные о распространённости КА в возрастной группе 30–79 лет указывают на рост заболеваемости в 2020 г. по сравнению с 2000 г.: так, расчётная частота увеличения толщины комплекса интима–медиа — 27,6%, выявления атеросклеротической бляшки в сонных артериях — 21,1%, каротидного стеноза (сужения просвета более 50%) — 1,5% [1]. С учётом хронического характера КА, его полиэтиологической природы (включающей, помимо прочего, роль воспаления, дисфункции эндотелия, нарушения метаболизма холестерина) [2] и ассоциации с множеством факторов риска поиск возможных биомаркеров развития и прогрессирования этого состояния представляется одним из перспективных направлений профилактики ЦВП.

Ранее нами был проведён цикл работ по определению гемореологического и гемостазиологического профилей у пациентов с различными проявлениями КА, описана информативность ряда биомаркеров этого спектра, разработана и внедрена в клиническую практику панель проатерогенной направленности [3, 4].

Важными новыми биомаркерами различных патологий являются микроРНК — небольшие (около 22 нуклеотидов), состоящие из одной цепочки некодирующие последовательности РНК, которые, по всей видимости, влияют на большинство биологических процессов [5].

Обычно микроРНК подавляют экспрессию генов путём взаимодействия с 3'-нетранслируемым участком таргетной матричной РНК, вызывая её деградацию и/или блокируя трансляцию продукта гена. Важным свойством микроРНК является плейотропность их действия, т.е. одна молекула может модулировать множество матричных РНК, вовлечённых в различные биологические процессы. Верно и обратное — одна мРНК может являться «целью» несколько микроРНК [6].

В проведённом нами пилотном исследовании на небольшой когорте пациентов с проявлениями хронической ЦВП были продемонстрированы различия в экспрессии miR-126-5p, miR-126-3p, miR-29-5p, miR-29-3p, miR-33a-5p, miR-33a-3p, miR-21-5p, miR-21-3p в зависимости от наличия у них каротидного атеросклероза [7].

**Цель** настоящей работы — анализ паттерна экспрессии указанных микроРНК у пациентов с выраженными каротидными стенозами (70% и более) — группой, представляющей наибольший интерес в качестве «модельного» варианта КА.

## Материалы и методы

В исследование были включены 50 человек (медиана возраста 66 [61; 71] лет; 58% мужчины) с ЦВП на фоне КА разной степени выраженности, подтверждённого данными ультразвукового исследования. Спектр ЦВП включал как последствия перенесённых более 6 мес назад ишемических нарушений мозгового кровообращения, так и хроническое течение сосудистой патологии головного мозга без чётких указаний на инсульт в анамнезе. Диагноз ЦВП устанавливали на основании жалоб, клинической картины и в соответствии с рутинными ангионейровизуализационными обследованиями, входящими в текущие стандарты оказания медицинской помощи.

У 16 (32%) пациентов стеноз внутренней сонной артерии (ВСА) составил 70% и более — эта когорта стала основной группой исследования. Остальные 34 пациента со стенозом ВСА <70% вошли в группу сравнения. Доля симптомных пациентов (т.е. перенёвших ипсилатеральное нарушение мозгового кровообращения) была сопоставима между группами: 5 (31%) и 8 (23,5%);  $p > 0,05$ .

К критериям исключения относились наличие декомпенсированных хронических заболеваний, опухолевых и паранеопластических процессов, патология крови.

Всем пациентам были проведены детальное клинико-неврологическое обследование, рутинные анализы крови (общий, биохимический, коагулограмма).

Основным объектом исследования стало определение экспрессии ряда микроРНК: miR-126-5p, miR-126-3p, miR-29-5p, miR-29-3p, miR-33a-5p, miR-33a-3p, miR-21-5p, miR-21-3p.

## Методика выделения и определения экспрессии микроРНК

Кровь для анализа забирали при кубитальной венопункции натощак в пробирку–вакутейнер с ЭДТА К3.

Использовали следующие реагенты и оборудование: смесь валидированных 20X праймеров и зондов для мишеней hsa-miR («Thermo Fisher Scientific»), набор для выделения

микроРНК из лейкоцитов «Leukocyte RNA Purification Plus Kit» («NORGEN Biotec Corp.»), набор для синтеза кДНК с матрицы микроРНК с использованием универсальных праймеров «TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit» («Applied Biosystems™ Thermo Fisher Scientific»), амплификатор «Real-time CFX96 Touch» («BioRaD»).

Исследование микроРНК включало две стадии:

- I. Выделение микроРНК из лейкоцитов в следующей последовательности: лизис эритроцитов, приготовление клеточного лизата, гомогенизация лизата, связывание с колонкой для гомогенизации, два этапа промывки колонок и обработка DNase I, элюирование РНК.
- II. Определение количества копий микроРНК на амплификаторе с проведением обратной транскрипции.

### Этическая экспертиза

Всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании. Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 11-4/19 от 20.11.2019).

### Статистические методы

Статистическая обработка данных проводилась с использованием языка программирования R (версия 4.1.0) в программной оболочке «RStudio v.1.4.1717» и загружаемых модулей «tidyverse», «reshape2», «heatmaply», «ggstatsplot», «ggcorrplot». Непрерывные случайные величины представ-

лены в виде: медиана [нижний квартиль; верхний квартиль], категориальные — как частота (%). Две независимые группы сравнивали с использованием критерия Вилкоксона—Манна—Уитни, пропорции в двух выборках — с помощью z-статистики Пирсона. С целью визуального представления относительного уровня экспрессии исследованных микроРНК использована «тепловая карта», где каждая строка соответствует одному наблюдению. Трансформация данных проведена с помощью функции «percentize», заключавшейся в применении эмпирической (выборочной) функции распределения к каждому значению переменных: таким образом, цвет ячейки указывает на значение перцентиля (то есть долю пациентов со значением экспрессии таким же или меньше). В использованной цветовой палитре «viridis» значения, близкие к 1, принимали жёлтый цвет, а близкие к 0 — тёмно-синий. Иерархическая кластеризация проведена с использованием алгоритма «optimal leaf ordering», визуализирована с помощью дендрограмм. Столбец «Стеноз» отражает оригинальное деление на группы, более тёмный цвет соответствует наличию у пациента стеноза ВСА 70% и более. Корреляционный анализ проводился непараметрическим методом с вычислением коэффициента Спирмена ( $\rho$ ). Пороговый уровень двусторонней статистической значимости был выбран равным 0,05.

### Результаты

Группы исследования и сравнения были сопоставимы по таким важным параметрам, как возраст, коморбидные состояния и приём основных групп препаратов (табл. 1).

Таблица 1. Основные демографические и общеклинические параметры обследованных

Table 1. The main demographic and clinical characteristics of the study subjects

Параметр Parameter	Стеноз $\geq 70\%$ Stenosis $\geq 70\%$ (n = 16)	Стеноз $< 70\%$ Stenosis $< 70\%$ (n = 34)	p
Возраст, лет Age, years	64,5 [60,3; 75,3]	66 [62; 70]	0,9335
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup> Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	27,0 [26,2; 28,4]	27,4 [25,0; 29,7]	0,876
Мужчины, n (%) Men, n (%)	11 (69%)	18 (53%)	0,4536
Сахарный диабет 2-го типа, n (%) Type 2 diabetes mellitus, n (%)	7 (44%)	12 (35%)	0,7931
Инсульт в анамнезе, n (%) History of stroke, n (%)	6 (37,5%)	9 (26,5%)	0,6433
Ипсилатеральное нарушение мозгового кровообращения, n (%) Ipsilateral cerebrovascular accident, n (%)	5 (31%)	8 (23,5%)	0,8142
Ишемическая болезнь сердца, n (%) Ischaemic heart disease, n (%)	8 (50%)	9 (26,5%)	0,1874
Инфаркт миокарда в анамнезе, n (%) History of myocardial infarction, n (%)	4 (25%)	6 (17,6%)	0,8201
Фибрилляция предсердий, n (%) Atrial fibrillation, n (%)	0 (0%)	4 (11,7%)	0,3834
Приём ацетилсалициловой кислоты, n (%) Aspirin use, n (%)	16 (100%)	29 (85%)	0,2663
Приём статинов, n (%) Statin use, n (%)	15 (94%)	28 (82%)	0,6952
Атеросклероз других локализаций, n (%) Atherosclerosis in other locations, n (%)	15 (94%)	14 (41%)	0,001

Таблица 2. Отдельные результаты липидограммы и коагулограммы

Table 2. Selected results from the lipid profile and coagulation profile

Параметр Parameter	Стеноз $\geq 70\%$ Stenosis $\geq 70\%$ (n = 16)	Стеноз $< 70\%$ Stenosis $< 70\%$ (n = 34)	p
Общий холестерин, ммоль/л Total cholesterol, mmol/liter	4,7 [4,3; 5,6]	5,2 [4,4; 6,9]	0,323
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/liter	1,3 [0,9; 2,1]	1,8 [1,2; 2,0]	0,625
Лipoproteины высокой плотности, ммоль/л High density lipoproteins, mmol/liter	1,8 [1,5; 2,2]	1,7 [1,4; 2,1]	0,5394
Лipoproteины низкой плотности, ммоль/л Low density lipoproteins, mmol/liter	2,2 [1,7; 2,8]	2,2 [1,3; 2,7]	0,5886
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/liter	3,5 [3,0; 4,1]	3,6 [3,1; 4,2]	0,7472
Активированное частичное тромбопластиновое время, с Activated partial thromboplastin time, sec	28,9 [27,3; 33,0]	28,2 [25,3; 29,5]	0,1162

Таблица 3. Уровень лейкоцитарной экспрессии микроРНК ( $\times 10^6$  копий) у обследованныхTable 3. Leukocyte microRNA expression level ( $\times 10^6$  copies) in the study subjects

МикроРНК MicroRNA	Стеноз $\geq 70\%$ Stenosis $\geq 70\%$ (n = 16)	Стеноз $< 70\%$ Stenosis $< 70\%$ (n = 34)	p
miR-126-5p	4,8 [4,6; 5,4]	8,5 [6,7; 10,4]	<0,001
miR-126-3p	5,9 [5,2; 6,6]	7,6 [6,9; 10,5]	<0,001
miR-29-5p	26,4 [24,5; 30,1]	28,6 [24,6; 32,6]	0,3383
miR-29-3p	7,6 [6,6; 8,9]	10,3 [8,7; 13,3]	<0,001
miR-33a-5p	46,3 [41,3; 48,4]	40,0 [36,8; 45,4]	0,01078
miR-33a-3p	42,0 [41,3; 45,9]	42,0 [36,7; 43,4]	0,08045
miR-21-5p	9,1 [7,5; 9,8]	9,7 [7,6; 12,1]	0,3439
miR-21-3p	9,2 [8,3; 10,5]	11,1 [8,4; 12,1]	0,08235

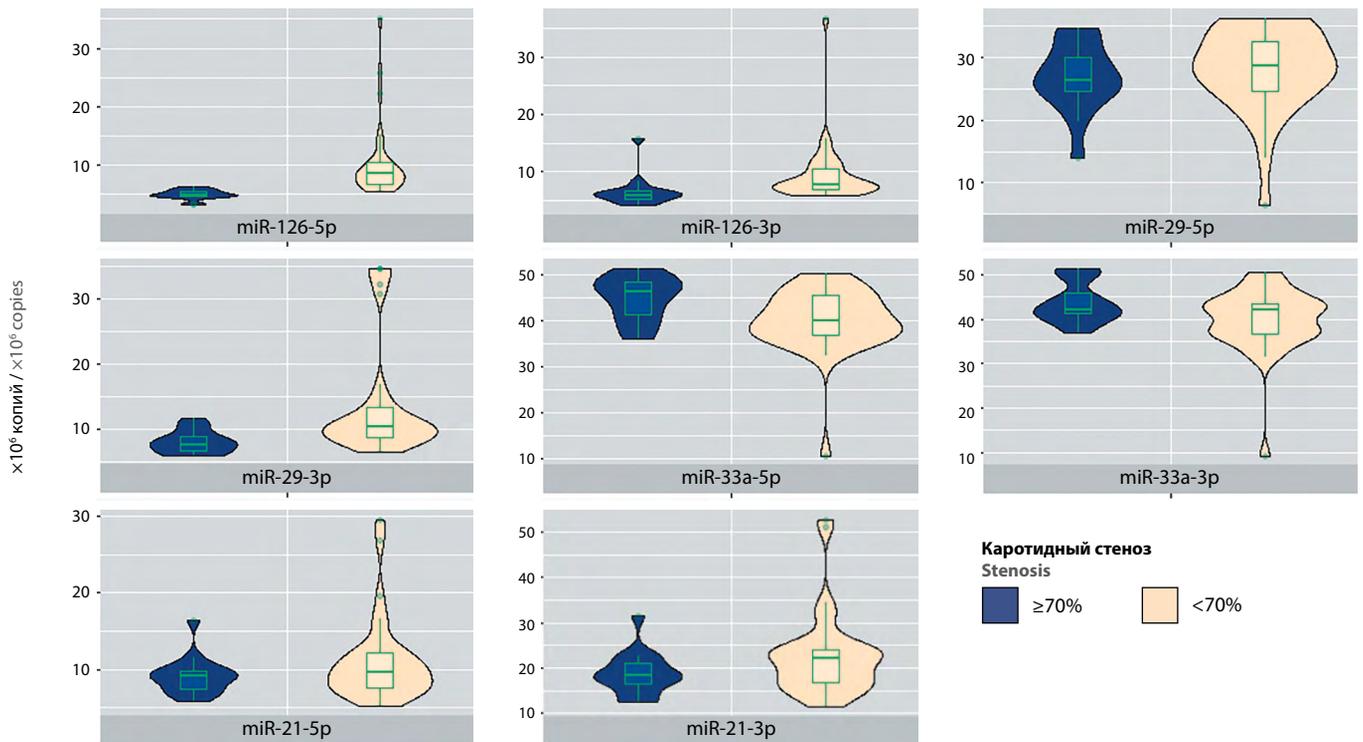
Не было различий и между частотой перенесённых ишемических нарушений мозгового кровообращения, включая ипсилатеральные (37,5% vs 26,5%;  $p = 0,6433$ ). Распространённость нарушений углеводного обмена достоверно не различалась между группами (44% и 35%;  $p = 0,7931$ ); также не было значимых отличий в степени компенсации сахарного диабета 2-го типа. Гендерное соотношение в группе пациентов с выраженным каротидным стенозом было более сдвинуто в сторону мужчин, что, однако, объясняется в целом преобладанием их в нашей когорте. Помимо этого необходимо отметить достаточно хорошую приверженность к назначенной терапии в обеих группах пациентов: так, антиагрегантную терапию (препараты ацетилсалициловой кислоты) принимали все пациенты со стенозами ВСА 70% и более и 85% пациентов из группы сравнения.

Единственным статистически значимым различием между группами стало более выраженное распространение атеросклеротического процесса у пациентов с каротидными стенозами высоких градаций — так, почти у всех пациентов основной группы выявлялся атеросклероз других локализаций, в то время как в группе сравнения таких пациентов было менее половины (41%;  $p = 0,001$ ).

Исследуемые группы были сопоставимы по основным показателям липидного профиля и гемостаза (табл. 2). Нескольку более благоприятная картина по уровню общего холестерина и липопротеинов высокой плотности у пациентов с выраженными стенозами ВСА может быть связана с более высокой частотой приёма липид-снижающей терапии (94% vs. 82%;  $p > 0,05$ ).

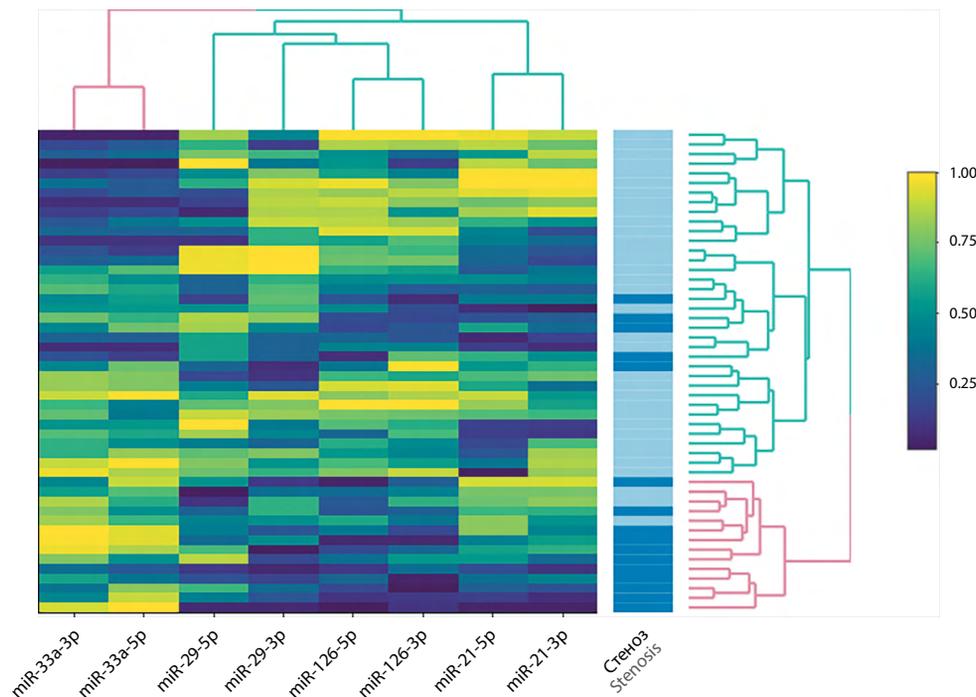
Уровень лейкоцитарной экспрессии исследованных микроРНК наглядно представлен на рис. 1, а детали приведены в табл. 3.

Основные статистически значимые различия продемонстрировали miR-126-5p/-3p, miR-29-3p (снижение их экспрессии у пациентов с выраженным стенозом) и miR-33a-5p (гиперэкспрессия в группе со стенозом 70% и более). Примечательно, что уровень экспрессии основной части исследованных микроРНК, образующихся с противоположных концов одной пре-микроРНК и обозначаемых -5p и -3p, был сопоставим между собой, за исключением miR-29, у которой экспрессия -5p варианта была практически в 3 раза выше, чем у парной микроРНК.



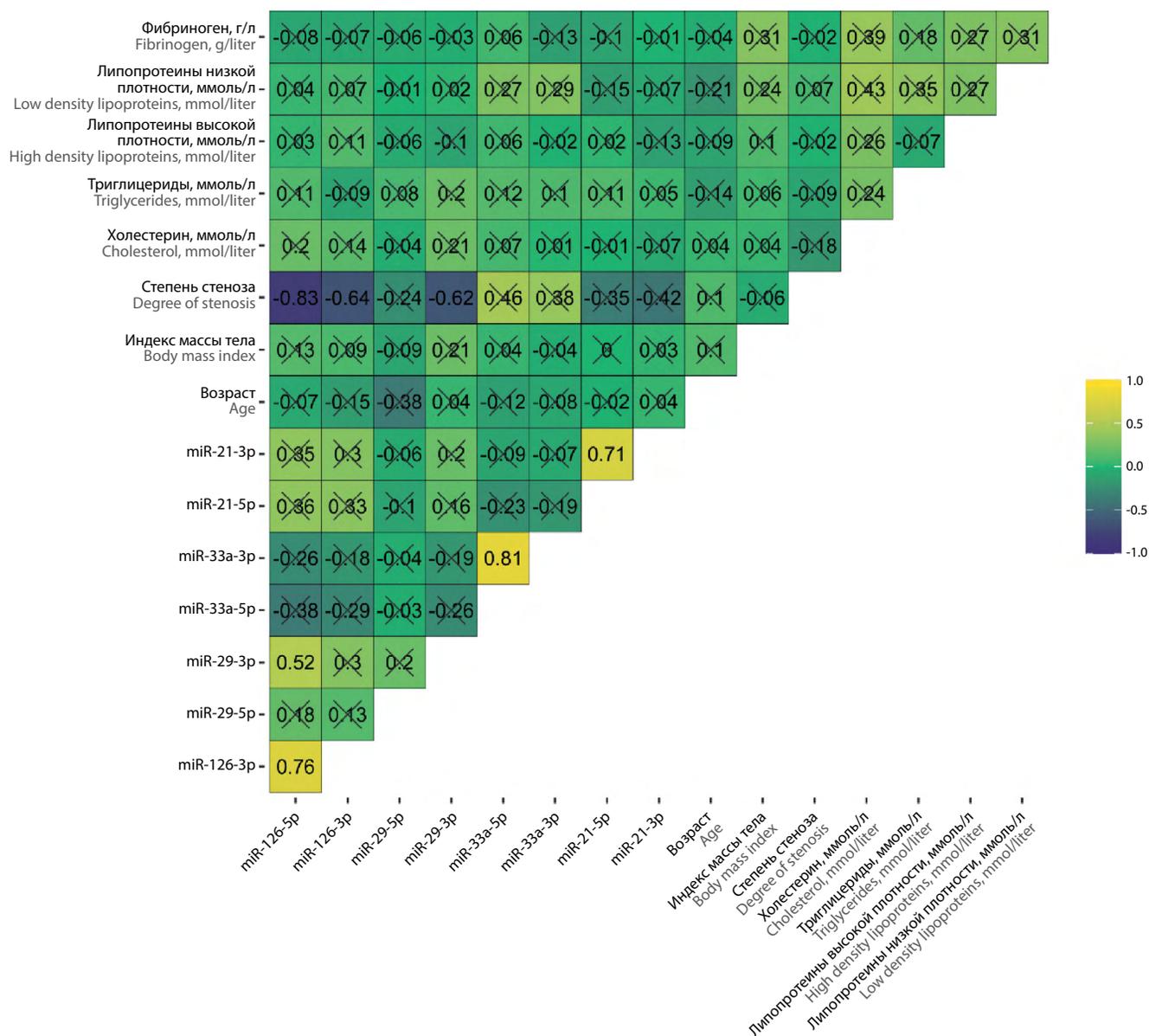
**Рис. 1.** Уровень лейкоцитарной экспрессии микроРНК у пациентов в зависимости от степени каротидного стеноза (представлен в виде совмещенного violin plot [распределение данных и плотность вероятности] и box-plot [прямоугольник — межквартильный интервал, горизонтальная линия — медиана, вертикальные линии — разброс]).

**Fig. 1.** Leukocyte microRNA expression level in patients, depending on the degree of carotid stenosis (shown as a combined violin plot [data distribution and probability density] and box plot [rectangle — interquartile interval, horizontal line — median, vertical lines — spread]).



**Рис. 2.** Тепловая карта относительной экспрессии микроРНК. Синяя гамма отражает более низкие уровни экспрессии, жёлтая — более высокие, столбец «Стеноз» — распределение пациентов по степени каротидного стеноза (более тёмный цвет — стеноз 70% и более). Представленные дендрограммы отражают процесс иерархической кластеризации.

**Fig. 2.** Heat map of the relative microRNA expression. The blue indicates lower levels of expression and the yellow indicates higher levels. The “Stenosis” column is the patient distribution according to the degree of carotid stenosis (the darker colour corresponds to  $\geq 70\%$  stenosis). The provided dendrograms reflect the process of hierarchical clustering.



ные корреляции между степенью стеноза и экспрессией miR-126-5p ( $\rho = -0,83$ ;  $p < 0,05$ ), miR-126-3p ( $\rho = -0,64$ ;  $p < 0,05$ ) и miR-29-3p ( $\rho = -0,62$ ;  $p < 0,05$ ).

## Обсуждение

Атеросклеротическая ЦВП является одной из наиболее важных подгрупп сосудистых заболеваний нервной системы. Разработаны и внедрены широкие возможности её профилактики — как медикаментозной, так и хирургической/ангиорекоструктивной. Высокую социально-экономическую значимость этой патологии придаёт большое число потенциально корригируемых факторов риска, в числе которых курение, сахарный диабет, артериальная гипертония, диета, образ жизни, загрязнение окружающей среды и др. [1]. В многочисленных исследованиях идентифицированы различные звенья атерогенеза, однако основные молекулярные механизмы и возможности прецизионной биомаркерной диагностики до сих пор не реализованы на практике в полной мере.

В нашем исследовании на относительно небольшой когорте пациентов с ЦВП на фоне КА показан дифференцированный паттерн экспрессии ряда микроРНК, ассоциированных с КА в зависимости от степени стеноза. В качестве основного разделения на группы нами был выбран уровень 70% стеноза ВСА, поскольку когорта пациентов с выраженным каротидным стенозом является более угрожаемой по развитию инсульта, чем, например, пациенты со стенозом ВСА в диапазоне 50–69% — по данным метаанализа [8], отношение рисков составило 2,1 (95% ДИ 1,7–2,5). Применённые в работе методики статистической обработки и визуализации данных позволили условно выделить две группы микроРНК: экспрессия одних повышается в группе выраженного стеноза (miR-33a-3p/-5p, «проатерогенные»), экспрессия других — снижается (miR-126-5p/-3p, miR-29-3p и miR-21-5p/-3p, «атеропротективные»).

MiR-33a активно вовлечена в метаболизм липидов (в том числе путём замедления выведения холестерина из макрофагов вследствие подавления экспрессии ABCA1 [9]), а использование антагонистов к ней (так называемых антагомиров) в экспериментальных животных моделях приводило к повышению уровня ЛПВП сыворотки и снижению содержания холестерина в периферических тканях [10]. Дефицит miR-33a приводил к замедлению и регрессу атеросклеротического поражения у apoE<sup>-</sup>/apoE<sup>-</sup>-мышей [11]. Интересными представляются также данные о снижении эндогенного амилоида  $\beta$  в головном мозге на фоне дефицита miR-33a [12]. В представленной нами когорте miR-33a была одной из наиболее экспрессируемых микроРНК — в особенности, у пациентов с выраженными каротидными стенозами, что позволяет рассматривать её в качестве значимого биомаркера КА.

Семейство микроРНК miR-29 играет важную роль в ремоделировании и повреждении сосудистой стенки путём регуляции синтеза коллагена, воспалительной реакции и иных генов внеклеточного матрикса [13]. Экспрессия miR-29 также ассоциирована с эндотелиальной дисфункцией на фоне гипергликемии [14]. В некоторых исследованиях, однако, получены противоположные результаты — так, в работе Y. Huang и соавт. уровни циркулирующей miR-29 были выше в группе пациентов с асимптомным КА [15]. Помимо этого, в экспериментальной модели атероскле-

роза введение антагонистов miR-29 вело к стабилизации и регрессу атеросклеротической бляшки [16]. При этом в других работах (в частности, [17]) определена протективная роль miR-29a-3p, снижавшей уровень эндотелиальной дисфункции (концентрации VCAM-1, ICAM-1 и E-селектина), индуцированной фактором некроза опухоли- $\alpha$ . Подобные противоречия в целом подтверждаются нашими данными, поскольку -3p и -5p варианты miR-29 экспрессировались неоднородно (в отличие от других пар микроРНК); более того, это была единственная микроРНК, у которой отсутствовала корреляция между уровнями экспрессии её вариантов. Это подчёркивает необходимость определения обоих вариантов miR-29 в дальнейших исследованиях.

MiR-126 была одной из первых открытых микроРНК, которые специфичны для сосудистой системы и играют критическую роль в её развитии (ангиогенезе). Уровень miR-126 снижается при достаточно большом числе сосудистых заболеваний и опухолей, а повышение её экспрессии благоприятно для таких патологий, как ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, диабетическая ангиопатия и др. [18]. Экспрессия miR-126-3p/-5p оказалась наиболее значимо сниженной в группе пациентов с выраженными каротидными стенозами, что подтверждает тезис об атеропротективной роли указанной микроРНК. Одним из потенциальных механизмов такого эффекта может служить подавление miR-126 молекулы клеточной адгезии VCAM-1, необходимой для инициации процесса лейкоцитарной инфильтрации сосудистой стенки [19]. Также в нашем исследовании именно уровни экспрессии miR-126-5p/-3p продемонстрировали наибольшую отрицательную корреляцию со степенью каротидного стеноза ( $\rho = -0,83$  и  $\rho = -0,64$  соответственно;  $p < 0,05$ ).

MiR-21 описывается как «механо-микроРНК», подразумевающая её роль в модуляции реакции сосудистой стенки на изменения напряжения сдвига тока крови. Дефицит miR-21 ведёт к нарушению пролиферации гладкомышечных клеток сосудов (что выражается в нарушении их ремоделирования), а также раннему развитию атеросклероза, некроза ядра атеросклеротической бляшки и поддержанию воспалительной реакции [20]. Экспрессия miR-21 резко снижена в области фиброзной покрышки разорвавшихся атеросклеротических бляшек, а ультразвук-направленная доставка аналогов miR-21 вела к стабилизации бляшки [21]. С другой стороны, у пациентов с артериальной гипертензией гиперэкспрессия miR-21 была сопряжена с эндотелиальной дисфункцией, снижением концентрации оксида азота и его метаболитов [22]. В нашей работе получены в целом нейтральные результаты в отношении разницы уровней miR-21 между группами, однако на тепловой карте показан кластер пациентов без выраженного каротидного стеноза с относительной гиперэкспрессией этой микроРНК.

К ограничениям настоящего исследования следует отнести малый объем выборки, потенциально недостаточная её репрезентативность, возможное влияние неучтённых нами факторов на уровень экспрессии микроРНК.

## Заключение

Результатом проведённого исследования пациентов с различной степенью КА (разделение групп — по стенозу ВСА 70%) стало описание паттерна экспрессии ряда микроРНК,

ассоциированных с различными патогенетическими этапами атерогенеза. На основании полученных данных представляется возможным разделить исследованные микроРНК на условно проатерогенные (miR-33a-5p/-3p) и атеропротективные (miR-126-5p/-3p, miR-29-3p, miR-21-5p/-3p). Продемонстрированные закономерности

определяют необходимость дальнейшего изучения роли микроРНК при атеросклеротической ЦВП, расширения когорты пациентов за счёт клинической разнородности изучаемой патологии, а также проспективного наблюдения с целью оценки риска прогрессирования КА и развития острых нарушений мозгового кровообращения.

## Список источников

1. Song P, Fang Z, Wang H. et al. Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Lancet Glob Health*. 2020;8(5):e721–e729. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30117-0. PMID: 32353319.
2. Wu M.Y., Li C.J., Hou M.F., Chu P.Y. New insights into the role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2034. DOI: 10.3390/ijms18102034. PMID: 28937652.
3. Танашян М.М., Раскуражев А.А., Шабалина А.А. и др. Биомаркеры церебрального атеросклероза: возможности ранней диагностики и прогнозирования индивидуального риска. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2015;9(3):20–25.
4. Танашян М.М., Раскуражев А.А., Шабалина А.А., Лагода О.В. Патент № 2592237 от 2016 г. Способ диагностики течения «асимптомного» каротидного атеросклероза.
5. Раскуражев А.А., Танашян М.М. Роль микроРНК в цереброваскулярной патологии. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2019;13(3):41–46. DOI: 10.25692/ACEN.2019.3.6.
6. Tajbakhsh A., Bianconi V., Pirro M. et al. Efferocytosis and atherosclerosis: regulation of phagocyte function by MicroRNAs. *Trends Endocrinol. Metab*. 2019;30(9):672–683. DOI: 10.1016/j.tem.2019.07.006. PMID: 31383556.
7. Raskurazhev A.A., Tanashyan M.M., Shabalina A.A. et al. Micro-RNA in patients with carotid atherosclerosis. *Hum Physiol*. 2020;46:880–885. DOI: 10.1134/S0362119720080113.
8. Howard D.P.J., Gaziano L., Rothwell P.M., Oxford Vascular Study. Risk of stroke in relation to degree of asymptomatic carotid stenosis: a population-based cohort study, systematic review, and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2021;20(3):193–202. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30484-1. PMID: 33609477.
9. Kim S.H., Kim G.J., Umemura T. et al. Aberrant expression of plasma microRNA-33a in an atherosclerosis-risk group. *Mol Biol Rep*. 2017;44(1):79–88. DOI: 10.1007/s11033-016-4082-z. PMID: 27664032.
10. Marquart T.J., Allen R.M., Ory D.S., Baldán A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(27):12228–32. DOI: 10.1073/pnas.1005191107. PMID: 20566875.
11. Horie T., Baba O., Kuwabara Y. et al. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(6):e003376. DOI: 10.1161/JAHA.112.003376. PMID: 23316322.
12. Kim J., Yoon H., Horie T. et al. microRNA-33 Regulates ApoE lipidation and amyloid-β metabolism in the brain. *J Neurosci*. 2015;35(44):14717–26. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2053-15.2015. PMID: 26538644.
13. Bretschneider M., Busch B., Mueller D. et al. Activated mineralocorticoid receptor regulates micro-RNA-29b in vascular smooth muscle cells. *FASEB J*. 2016;30(4):1610–1622. DOI: 10.1096/fj.15-271254. PMID: 26728178.
14. Silambarasan M., Tan J.R., Karolina D.S. et al. MicroRNAs in hyperglycemia induced endothelial cell dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4):518. DOI: 10.3390/ijms17040518. PMID: 27070575.
15. Huang Y., Li J., Chen J. et al. The association of circulating miR-29b and interleukin-6 with subclinical atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44:1537–1544. DOI: 10.1159/000485649. PMID: 29197872.
16. Ulrich V., Rotllan N., Araldi E. et al. Chronic miR-29 antagonism promotes favorable plaque remodeling in atherosclerotic mice. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):643–653. DOI: 10.15252/emmm.201506031. PMID: 27137489.
17. Deng X., Chu X., Wang P. et al. MicroRNA-29a-3p reduces TNFα-induced endothelial dysfunction by targeting tumor necrosis factor receptor 1. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;18:903–915. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.10.014. PMID: 31760375.
18. Yu B., Jiang Y., Wang X., Wang S. An integrated hypothesis for miR-126 in vascular disease. *Med Res Arch*. 2020;8(5):2133. DOI: 10.18103/mra.v8i5.2133. PMID: 34222652.
19. Harris T.A., Yamakuchi M., Ferlito M. et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1516–1521. DOI: 10.1073/pnas.0707493105. PMID: 18227515.
20. Canfrán-Duque A., Rotllan N., Zhang X. et al. Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherogenesis. *EMBO Mol Med*. 2017;9(9):1244–1262. DOI: 10.15252/emmm.201607492. PMID: 28674080.
21. Jin H., Li D.Y., Chernogubova E. et al. Local Delivery of miR-21 Stabilizes Fibrous caps in vulnerable atherosclerotic lesions. *Mol Ther*. 2018;26(4):1040–1055. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.01.011. PMID: 29503197.

## References

1. Song P, Fang Z, Wang H. et al. Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Lancet Glob Health*. 2020;8(5):e721–e729. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30117-0. PMID: 32353319.
2. Wu M.Y., Li C.J., Hou M.F., Chu P.Y. New insights into the role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2034. DOI: 10.3390/ijms18102034. PMID: 28937652.
3. Tanashyan M.M., Raskurazhev A.A., Shabalina A.A. et al. [Biomarkers of cerebral atherosclerosis: the capabilities of early diagnosis and prognosis of individual risk]. *Annals of clinical and experimental neurology*. 2015;9(3):20–25. (In Russ.)
4. Tanashyan M.M., Raskurazhev A.A., Shabalina A.A., Lagoda O.V. Sposob diagnostiki techenija "asimptomnogo" karotidnogo ateroskleroza. Patent RF, no. 2592237, 2016. (In Russ.)
5. Raskurazhev A.A., Tanashyan M.M. [The role of micro-RNA in cerebrovascular disease]. *Annals of clinical and experimental neurology*. 2019;13(3):41–46. DOI: 10.25692/ACEN.2019.3.6. (In Russ.)
6. Tajbakhsh A., Bianconi V., Pirro M. et al. Efferocytosis and atherosclerosis: regulation of phagocyte function by MicroRNAs. *Trends Endocrinol. Metab*. 2019;30(9):672–683. DOI: 10.1016/j.tem.2019.07.006. PMID: 31383556.
7. Raskurazhev A.A., Tanashyan M.M., Shabalina A.A. et al. Micro-RNA in patients with carotid atherosclerosis. *Hum Physiol*. 2020;46:880–885. DOI: 10.1134/S0362119720080113.
8. Howard D.P.J., Gaziano L., Rothwell P.M., Oxford Vascular Study. Risk of stroke in relation to degree of asymptomatic carotid stenosis: a population-based cohort study, systematic review, and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2021;20(3):193–202. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30484-1. PMID: 33609477.
9. Kim S.H., Kim G.J., Umemura T. et al. Aberrant expression of plasma microRNA-33a in an atherosclerosis-risk group. *Mol Biol Rep*. 2017;44(1):79–88. DOI: 10.1007/s11033-016-4082-z. PMID: 27664032.
10. Marquart T.J., Allen R.M., Ory D.S., Baldán A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(27):12228–32. DOI: 10.1073/pnas.1005191107. PMID: 20566875.
11. Horie T., Baba O., Kuwabara Y. et al. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(6):e003376. DOI: 10.1161/JAHA.112.003376. PMID: 23316322.
12. Kim J., Yoon H., Horie T. et al. microRNA-33 Regulates ApoE lipidation and amyloid-β metabolism in the brain. *J Neurosci*. 2015;35(44):14717–26. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2053-15.2015. PMID: 26538644.
13. Bretschneider M., Busch B., Mueller D. et al. Activated mineralocorticoid receptor regulates micro-RNA-29b in vascular smooth muscle cells. *FASEB J*. 2016;30(4):1610–1622. DOI: 10.1096/fj.15-271254. PMID: 26728178.
14. Silambarasan M., Tan J.R., Karolina D.S. et al. MicroRNAs in hyperglycemia induced endothelial cell dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4):518. DOI: 10.3390/ijms17040518. PMID: 27070575.
15. Huang Y., Li J., Chen J. et al. The association of circulating miR-29b and interleukin-6 with subclinical atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44:1537–1544. DOI: 10.1159/000485649. PMID: 29197872.
16. Ulrich V., Rotllan N., Araldi E. et al. Chronic miR-29 antagonism promotes favorable plaque remodeling in atherosclerotic mice. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):643–653. DOI: 10.15252/emmm.201506031. PMID: 27137489.
17. Deng X., Chu X., Wang P. et al. MicroRNA-29a-3p reduces TNFα-induced endothelial dysfunction by targeting tumor necrosis factor receptor 1. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;18:903–915. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.10.014. PMID: 31760375.
18. Yu B., Jiang Y., Wang X., Wang S. An integrated hypothesis for miR-126 in vascular disease. *Med Res Arch*. 2020;8(5):2133. DOI: 10.18103/mra.v8i5.2133. PMID: 34222652.
19. Harris T.A., Yamakuchi M., Ferlito M. et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1516–1521. DOI: 10.1073/pnas.0707493105. PMID: 18227515.
20. Canfrán-Duque A., Rotllan N., Zhang X. et al. Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherogenesis. *EMBO Mol Med*. 2017;9(9):1244–1262. DOI: 10.15252/emmm.201607492. PMID: 28674080.
21. Jin H., Li D.Y., Chernogubova E. et al. Local Delivery of miR-21 Stabilizes Fibrous caps in vulnerable atherosclerotic lesions. *Mol Ther*. 2018;26(4):1040–1055. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.01.011. PMID: 29503197.

22. Cengiz M., Yavuzer S., Kılıçkiran Avcı B. et al. Circulating miR-21 and eNOS in subclinical atherosclerosis in patients with hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2015;37(8):643–649. DOI: 10.3109/10641963.2015.1036064. PMID: 26114349.

22. Cengiz M., Yavuzer S., Kılıçkiran Avcı B. et al. Circulating miR-21 and eNOS in subclinical atherosclerosis in patients with hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2015;37(8):643–649. DOI: 10.3109/10641963.2015.1036064. PMID: 26114349.

### Информация об авторах

*Раскуражев Антон Алексеевич* — к.м.н., врач-невролог, с.н.с. 1-го неврологического отделения ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, orcid.org/0000-0003-0522-767X

*Шабалина Алла Анатольевна* — д.м.н., в.н.с., рук. лаб. гемореологии, гемостаза и фармакокинетики (с клинической лабораторной диагностикой) ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, orcid.org/0000-0001-9604-7775

*Кузнецова Полина Игоревна* — к.м.н., врач-невролог, н.с. 1-го неврологического отделения ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, orcid.org/0000-0002-4626-6520

*Танашян Маринэ Мовсесовна* — д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зам. директора по научной работе, рук. 1-го неврологического отделения ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, orcid.org/0000-0002-5883-8119

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

### Information about the authors

*Anton A. Raskurazhev* — Cand. Sci. (Med.), neurologist, researcher, 1st Neurology department, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, orcid.org/0000-0003-0522-767X.

*Alla A. Shabalina* — D. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Laboratory of hemorheology, hemostasis and pharmacokinetics (with clinical laboratory diagnostics), Research Center of Neurology, Moscow, Russia, orcid.org/0000-0001-9604-7775

*Polina I. Kuznetsova* — Cand. Sci. (Med.), neurologist, researcher, 1<sup>st</sup> Neurology department, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, orcid.org/0000-0002-4626-6520

*Marine M. Tanashyan* — D. Sci. (Med.), Prof., Corresponding member of RAS, Deputy Director for science, Head, 1<sup>st</sup> Neurological department, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, orcid.org/0000-0002-5883-8119

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.