

Роль длинных некодирующих РНК в ишемическом инсульте

Л.Б. Новикова¹, И.Ф. Гареев¹, А.А. Раскуражев², О.А. Бейлерли³, Г.М. Минибаева¹

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия;

²ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия;

³ГБУЗ РБ «Больница скорой медицинской помощи», Уфа, Россия

Ишемический инсульт (ИИ) является одной из ведущих причин смерти и инвалидности. Последствия ИИ проявляются глубокой и стойкой неврологической симптоматикой. Используемые в настоящее время методы лечения ИИ оказались недостаточными, отчасти из-за неполного понимания молекулярных механизмов при ИИ. Длинные некодирующие РНК (длРНК) имеют длину более 200 нуклеотидов и контролируют транскрипцию, трансляцию, регуляцию экспрессии генов, регуляцию клеточного цикла, апоптоз, пролиферацию и дифференцировку клеток. длРНК играют непосредственную роль в патогенезе многих заболеваний человека, включая ИИ. длРНК обнаруживаются в биологических жидкостях человека: крови, моче, спинномозговой жидкости и слюне. Профиль экспрессии таких циркулирующих длРНК представляет собой определенную часть клеток, в которых они модифицируются и секретируются в соответствии с физиологическими или патологическими состояниями этих клеток. Благодаря своим различным формам транспорта из клеток в биологические жидкости человека в составе экзосом или липосом длРНК защищены от воздействия РНКаз и остаются в стабильной форме. В связи с этим циркулирующие длРНК рассматриваются как новые биомаркеры, представляющие интерес при многих заболеваниях, включая ИИ. Вероятно, длРНК имеет потенциал для использования в терапии, диагностике и прогнозировании ИИ.

Ключевые слова: длинные некодирующие РНК; ишемический инсульт; патогенез; терапия; биомаркеры.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

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

Адрес для корреспонденции: 450008, Уфа, ул. Ленина, д. 3. ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет». E-mail: novicova@inbox.ru. Новикова Л.Б.

Для цитирования: Новикова Л.Б., Гареев И.Ф., Раскуражев А.А., Бейлерли О.А., Минибаева Г.М. Роль длинных некодирующих РНК в ишемическом инсульте. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2020; 14(1): 70–77.

DOI: 10.25692/ACEN.2020.1.8

Поступила 10.06.2019 / Принята в печать 16.12.2019

The role of long noncoding RNA in ischaemic stroke

Lilia B. Novikova¹, Ilgiz F. Gareev¹, Anton A. Raskurazhev², Ozal A. Beylerli³, Guzel M. Minibaeva¹

¹Bashkir State Medical University, Ufa, Russia;

²Research Center of Neurology, Moscow, Russia;

³Emergency Medical Care Hospital, Ufa, Russia

Ischaemic stroke (IS) is one of the leading causes of death and disability in the world. The consequences of IS manifest as severe and persistent neurological symptoms. The currently used methods for the management of IS are insufficient, partly because of incomplete understanding of the molecular mechanisms that occur in IS. Long noncoding RNA (lncRNAs) are noncoding RNAs that are longer than 200 nucleotides. It has been shown that lncRNAs control many processes: transcription, translation, regulation of gene expression, cell cycle regulation, apoptosis, cell proliferation, and differentiation. There is plenty of evidence that lncRNAs play a direct role in the pathogenesis of many human diseases, including IS. lncRNAs are found in the human bodily fluids, such as blood, urine, cerebrospinal fluid, and saliva. The expression profile of these circulating lncRNAs consists of a certain part of the cells, where they are modified and secreted in accordance with the physiological and pathological status of those cells. Due to their various ways of transport from cells into bodily fluids within exosomes or liposomes, lncRNAs are protected from the effect of RNases and remain in a stable form. Because of this, circulating lncRNAs are considered as novel biomarkers, which are of interest in many diseases, including IS. It likely appears that lncRNAs have the potential to be used in the diagnosis, management, and prevention of IS.

Keywords: long noncoding RNA; ischaemic stroke; pathogenesis; management; biomarkers.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

For correspondence: 125367, Russia, Ufa, Lenina str., 3. Bashkir State Medical University. E-mail: novicova@inbox.ru. Novikova L.B.

For citation: Novikova L.B., Gareev I.F., Raskurazhev A.A., Beylerli O.A., Minibaeva G.M. [The role of long noncoding RNA in ischaemic stroke]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2020; 14(1): 70–77. (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2020.1.8

Received 10.06.2019 / Accepted 16.12.2019

Введение

Ишемический инсульт (ИИ) является одной из основных причин инвалидности и смертности [1]. Основной причиной ИИ (вне зависимости от патогенетического подтипа) служит нарушение кровоснабжения головного мозга, вызывающее дефицит кислорода и питательных веществ и приводящее к повреждению головного мозга. Стойкий неврологический дефицит после ИИ в значительной степени ложится социально-экономическим бременем как на пациента, так и на общество [2]. Используемые в настоящее время методы лечения и профилактики ИИ, несмотря на значительные достижения в этой области за прошедшие несколько десятилетий, оказались недостаточно эффективными, отчасти из-за неполного понимания патологических молекулярных механизмов, вовлеченных в этот процесс.

Ведется поиск новых, эффективных диагностических и прогностических модальностей, отражающих течение ишемических цереброваскулярных заболеваний. К одним из наиболее интенсивно изучаемых в последнее время биомаркеров относятся длинные некодирующие РНК (длРНК) — класс некодирующих РНК длиной более 200 нуклеотидов. длРНК играют регуляторную роль в различных биологических процессах, таких как апоптоз, клеточный цикл, пролиферация, дифференцировка клеток и др. [3]. Все большее число исследований продемонстрировало непосредственную роль длРНК в патогенезе различных заболеваний человека, включая опухоли, воспалительные, сердечно-сосудистые заболевания и заболевания иммунной системы [4, 5]. Серьезный интерес представляют исследования, описывающие роль длРНК в патогенезе ИИ — комплексной, многофакторной патологии со значимой гетерогенностью этиологического характера [6]. Патогенез ИИ включает (в числе прочего) эндотелиальную дисфункцию и изменения стенки церебральных сосудов под влиянием артериальной гипертензии и атеросклероза, которые являются известными факторами риска развития ИИ [7, 8]. При атеросклерозе и артериальной гипертензии происходит aberrantная экспрессия длРНК путем передачи сигналов определенным микроРНК или белкам, где длРНК участвуют в таких процессах, как фенотипическое изменение сосудистых гладкомышечных клеток, воспаление, повреждение внеклеточного матрикса клеток, эндотелиальная дисфункция, некроз клеток и производство активных форм кислорода (табл. 1) [9–15].

Развитие ИИ включает в себя многочисленные молекулярные процессы, которые включают воспаление, нарушение функции гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), отек головного мозга и гибель нейронов, где длРНК могут играть непосредственную роль [1, 2]. В данной работе будут рассмотрены исследования, касающиеся длРНК и ИИ, сделана попытка объяснить сложную связь между ними. Также будет обсужден клинический потенциал длРНК для разработки новых диагностических и терапевтических стратегий по отношению к ИИ.

длРНК и ишемический инсульт

Согни aberrantly экспрессируемых длРНК были идентифицированы с использованием таких методов, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени, микрочипирование или секвенирование нового поколения (NGS), у пациентов с ИИ *in vitro* и *in vivo* [3, 16]. В табл. 2 представлены длРНК, влияющие на такие фундаментальные процессы патогенеза ИИ, как гибель клеток, нарушение функции ГЭБ, воспаление и активация микроглии [17–23].

длРНК и ангиогенез

Ангиогенез — процесс формирования новых сосудов из существующих, играет важную роль в ремоделировании сосудов и функциональном восстановлении после ИИ. Ангиогенез контролируется многими ключевыми ангиогенными факторами, такими как сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), в головном мозге. Церебральная неоваскуляризация может вызывать усиление мозгового кровотока, что в итоге увеличивает количество кислорода и питательных веществ, доставляемых в зону ишемизированной ткани [24]. Индуцирование ангиогенеза с помощью различных методов лечения, направленных на ангиогенные факторы, представляется полезным подходом в терапии пациентов с ИИ [25]. Данные последних исследований продемонстрировали, что длРНК являются важными регуляторами ангиогенеза [26, 27].

VEGF является одним из наиболее изученных проангиогенных факторов, который играет важную роль в ангиогенезе, и экспрессия которого увеличивается в тканях головного мозга после ИИ [25]. Изучение механизмов, участвующих в регуляции VEGF после ИИ, имеет важное значение для разработки новых методов лечения. L. Li и соавт. [26] в работе с моделью ИИ *in vivo*, а именно проводя окклюзию средней мозговой артерии (ОСМА) у крыс, показали, что уровень экспрессии miR-153-3p снижается, тогда как индуцируемый гипоксией фактор-1a (HIF-1a) и его нижестоящие мишени (VEGF-A и Notch1) активируются в зоне ишемии. Также было замечено, что гипоксия индуцирует экспрессию длРНК HIF1A. Показано, что HIF1A-AS2 способствует ангиогенезу при гипоксии посредством активации сигнального пути HIF-1a–VEGFA–Notch1 путем ингибирования miR-153-3p в эндотелиальных клетках пупочной вены человека [26].

R. Zhan и соавт. [27] обнаружили, что экспрессия длРНК Maternally expressed gene 3 (*MEG3*) и NADPH-оксидазы 4 (NOX4) в эндотелиальных клетках головного мозга крысы повышается после кислородно-глюкозной депривации/реперфузии. Уменьшение экспрессии *MEG3* защищает эндотелиальные клетки микрососудистой сети головного мозга от индуцированного кислородно-глюкозной депривацией/реперфузией апоптоза за счет снижения экспрессии NOX4 и p53 и снижения уровня внутриклеточных активных форм кислорода. Уменьшение экспрессии *MEG3* также усиливает

Таблица 1. длРНК, вовлеченные в развитие атеросклероза и гипертонической болезни, и их регуляторные механизмы
Table 1. lncRNAs involved in the development of atherosclerosis and hypertensive disease, and their regulatory mechanisms

| длРНК / lncRNA | Мишень / Target | Фактор риска / Risk factor | Экспрессия / Expression | Биологическая функция / Biological function | Источник литературы / Reference source |
|-------------------|---|-----------------------------------|----------------------------|--|--|
| LEF1-AS1 | miR-544a/PTEN axis | Атеросклероз / Atherosclerosis | Повышена / Elevated | Пролиферация и миграция СГМК / Proliferation and migration of vascular smooth muscle cells | 9 |
| 430945 | ROR2/RhoA | Атеросклероз / Atherosclerosis | Повышена / Elevated | Пролиферация и миграция СГМК / Proliferation and migration of vascular smooth muscle cells | 10 |
| ATB | TGF-β1, caspase-3 | Атеросклероз / Atherosclerosis | Повышена / Elevated | Апоптоз и ингибирование пролиферации ЭК / Apoptosis and inhibition of EC proliferation | 11 |
| AF131217.1 | miR-128-3p/KLF4 axis | Атеросклероз / Atherosclerosis | Снижена / Reduced | Уменьшение воспаления на поверхности эндотелия / Reduced inflammation on the endothelial surface | 12 |
| AK094457 | PPARγ | Гипертония / Hypertension | Повышена / Elevated | Способствует ангиотензин-II-индуцированной гипертонии и эндотелиальной дисфункции / Enhances angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction | 13 |
| MALAT1 | Notch-1 | Гипертония / Hypertension | Снижена / Reduced | Снижение относительной экспрессии факторов, связанных с воспалением, эндотелиальной дисфункцией и окислительным стрессом; подавление апоптоза ЭК / Reduction of inflammation-related relative factor expression, endothelial dysfunction and oxidative stress; suppression of EC apoptosis | 14 |
| MRAK048635_P1 | Cyclin D1/E, CDK2/4, p-Rb, caspase3, PARP, α-SMA, calponin | Гипертония / Hypertension | Снижена / Reduced | Индукцирует фенотипическое изменение СГМК с сократительного на секреторный фенотип. Способствует пролиферации, миграции и подавляет апоптоз СГМК / Induces phenotypic changes of VSMC from the contractile to the secretory phenotype. Enhances proliferation and migration, suppresses VSMC apoptosis | 15 |

Примечание. TGF-β1 — трансформирующий фактор роста-β1; PPARγ, — рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами; PTEN — гомолог фосфатазы и тензина; ROR2 — нейротрофический тирозинкиназы, связанный с рецептором 2; RhoA — член семейства Ras homolog A; KLF4 — Круппель-подобный фактор 4; Cyclin D1/E — циклин D1/E; CDK2/4 — циклинзависимая киназа 2/4; p-Rb — белок ретинобластомы; PARP — поли (ADP-рибоза) полимеразы; α-SMA — α-гладкомышечный актин; Notch-1 — Notch гомолог 1, связанный с транслокацией; СГМК — сосудистые гладкомышечные клетки; ЭК — эндотелиальные клетки; miR — микроРНК.

Note. TGF-β1 — transforming growth factor β1; PPARγ — peroxisome proliferator-activated receptors; PTEN — phosphatase and tensin homolog; ROR2 — receptor 2-related neurotrophic tyrosine kinase; RhoA — Ras homolog family member A; KLF4 — Kruppel-like factor 4; CDK2/4 — cyclin-dependent kinase 2/4; p-Rb — retinoblastoma protein; PARP — poly (ADP-ribose) polymerase; α-SMA — α-smooth muscle actin; Notch-1 — Notch homolog 1, translocation-associated; VSMC — vascular smooth muscle cells; EC — endothelial cells; miR — microRNA.

Таблица 2. длРНК, вовлеченные в патогенез ИИ

Table 2. lncRNAs involved in ischaemic stroke pathogenesis

| длРНК / lncRNA | Процесс / Process | Мишень / Target | Экспрессия / Expression | Функция / Function | Модель исследования / Study model | Источник литературы / Reference source |
|----------------|--|---|-------------------------|---|---|--|
| MEG3 | Апоптоз, некроз и воспаление / Apoptosis, necrosis and inflammation | miR-485, AIM2 | Повышена / Elevated | Способствует гибели нейронов клеток, апоптозу и инфаркту. Стимуляция воспалительного процесса / Assists with neuronal cell death, apoptosis and infarction. Stimulation of the inflammatory process | ОСМА/реперфузия (<i>in vivo</i>), КГД (<i>in vitro</i>) / MCAO model/ Reperfusion (<i>in vivo</i>), OGD (<i>in vitro</i>) | 17 |
| H19 | Апоптоз и некроз / Apoptosis and necrosis | miR-19a, Id2 | Повышена / Elevated | Способствует апоптозу нейронов и инфаркту / Enhances neuronal apoptosis and infarction | ОСМА/реперфузия (<i>in vivo</i>), КГД (<i>in vitro</i>) / MCAO model/ Reperfusion (<i>in vivo</i>), OGD (<i>in vitro</i>) | 18 |
| NEAT1 | Воспаление / Inflammation | Wnt/ β -catenin сигнальный путь | Повышена / Elevated | Активация микроглии и стимуляция воспалительного процесса / Microglial activation and stimulation of the inflammatory process | КГД/реперфузия (<i>in vitro</i>) / OGD/reperfusion (<i>in vitro</i>) | 19 |
| SNHG1 | Нарушение функции ГЭБ, отек головного мозга, апоптоз / Impaired BBB function, cerebral oedema, apoptosis | miR-338, HIF-1 α | Повышена / Elevated | Увеличивает жизнеспособность и ингибирование апоптоза ЭК. Способствует уменьшению проницаемости ГЭБ и отека головного мозга / Increases survivability and inhibits EC apoptosis. Helps to reduce BBB permeability and cerebral oedema | КГД (<i>in vitro</i>) / OGD (<i>in vitro</i>) | 20 |
| HOTTIP | Апоптоз и углеводный обмен / Apoptosis and carbohydrate metabolism | miR-143/hexokinase 2 сигнальный путь | Повышена / Elevated | Увеличивает жизнеспособность и ингибирование апоптоза нейронов. Способствует пролиферации нейронов. Стимулирует гликолитические процессы / Increases survivability and inhibits neuronal apoptosis. Assists neuronal proliferation. Stimulates glycolytic processes | ОСМА (<i>in vivo</i>), КГД (<i>in vitro</i>) / MCAO (<i>in vivo</i>), OGD (<i>in vitro</i>) | 21 |
| LOC102640519 | Нарушение функции ГЭБ и отек головного мозга / Impaired BBB function and cerebral oedema | HOXC13, ZO-1, VEGF | Повышена / Elevated | Способствует увеличению проницаемости ГЭБ и отеку головного мозга / Helps to increase BBB permeability and cerebral oedema | ОСМА (<i>in vivo</i>), КГД/реперфузия (<i>in vitro</i>) / MCAO (<i>in vivo</i>), OGD/reperfusion (<i>in vitro</i>) | 22 |
| Gm4419 | Воспаление / Inflammation | NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6 | Повышена / Elevated | Активация микроглии и стимуляция воспалительного процесса / Microglial activation and stimulation of the inflammatory process | КГД/реперфузия / OGD/reperfusion | 23 |

Примечание: MEG3 — матерински выраженный ген 3; NEAT1 — обильно обогащенный ядерный транскрипт 1; SNHG1 — малая ядрышковая РНК множества гена 1; HOTTIP — HOXA-дистальная транскрипция антисмысловой РНК; miR — микроРНК; AIM2 — отсутствующий при меланоме 2; Id2 — ДНК-связанный белок ингибитор ID-2; HIF-1 α — гипоксия-индуцируемый фактор 1-альфа; ГЭБ — гематоэнцефалический барьер; ОСМА — окклюзия средней мозговой артерии; КГД — кислородно-глюкозная депривация; HOXC13 — Homeobox белок Hox-C13; ZO-1 — белок плотных контактов 1; VEGF — сосудистый эндотелиальный фактор роста; NF- κ B — ядерный фактор каппа-B; TNF- α — фактор некроза опухоли- α ; IL-1 β — интерлейкин-1 β ; IL-6 — интерлейкин-6.

Note: MEG3 — maternally expressed gene 3; NEAT1 — nuclear enriched abundant transcript 1; SNHG1 — small nucleolar RNA host gene 1; HOTTIP — HOXA transcript at the distal tip of antisense RNA; miR — microRNA; AIM2 — absent in melanoma 2; Id2 — DNA-binding protein inhibitor ID-2; HIF-1 α — hypoxia-inducible factor 1-alpha; BBB — blood-brain barrier; MCAO — middle cerebral artery occlusion; OGD — oxygen glucose deprivation; HOXC13 — Homeobox protein Hox-C13; ZO-1 — tight junction protein 1; VEGF — vascular endothelial growth factor; NF- κ B — nuclear factor kappa B; TNF- α — tumour necrosis factor- α ; IL-1 β — interleukin-1 β ; IL-6 — interleukin-6.

ет экспрессию HIF-1a и VEGF. Кроме того, p53 стимулирует экспрессию NOX4 путем непосредственного связывания с промоторами NOX4. Этот результат указывает на то, что *MEG3* опосредует ангиогенез после ИИ через регуляцию сигнального пути p53–NOX4 [27].

длРНК и нейрогенез

ИИ может стимулировать нейрогенез у взрослых в качестве защитной реакции на повреждение [7]. После ИИ клетки-предшественники нейронов могут пролиферировать и мигрировать в очаг поражения. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что индуцированный ИИ нейрогенез способствует функциональному выздоровлению пациентов [28]. Субвентрикулярная зона в латеральном желудочке, субгранулярная зона в зубчатой извилине и задняя перивентрикулярная зона — три установленных нейрогенных участка в мозге взрослого человека [29, 30]. Используя модель ИИ ОСМА у мышей, J. Wang и соавт. с помощью иммунофлуоресценции обнаружили, что снижение экспрессии длРНК H19 может уменьшить площадь пораженной ткани и помочь в восстановлении неврологических нарушений (подтвержденных тестом Rotarod и тестом балансира) после ИИ. Сообщалось, что сигнальный путь Notch1 играет важную роль в регуляции нейрогенеза. К тому же, экспрессия Notch1 регулируется транскрипционным фактором p53. Для того чтобы определить, предотвращает ли H19 нейрогенез посредством инактивирующего сигнального пути p53–Notch1, авторы сначала попытались выяснить влияние H19 на активность p53 в условиях ИИ. Используя ПЦР в реальном времени, они доказали, что ингибирование экспрессии H19 может активировать гены *Wax* и внутриклеточный белок-ингибитор циклин-зависимой киназы 1A (*CDKN1A*), т.е. транскрипционную активность p53. Другими словами, сверхэкспрессия H19 ингибирует p53 во время ИИ. Кроме того, результаты вестерн-блоттинга показали, что ингибирование H19 может повысить уровень экспрессии p53. Экспрессия Notch1 также была повышена за счет ингибирования H19 и ослаблена ингибированием p53 на основе снижения активности H19 [31].

Циркулирующие длРНК как биомаркеры

Инструментальная диагностика ИИ в настоящее время основана на методах визуализации, таких как компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ). Принимая во внимание, что эти методы обследования могут быть недоступны, точный и надежный анализ биомаркеров в крови может помочь в ранней диагностике и прогнозировании пациентов с ИИ. В отличие от острого коронарного синдрома, для которого имеется много специфических и неспецифических плазменных или сывороточных маркеров, используемых как для диагностики, так и для оценки тяжести инфаркта миокарда, для пациентов с ИИ установленных биомаркеров не существует [32]. Большинство биомаркеров, связанных с ИИ и предложенных в качестве диагностики и прогнозирования, представляют собой белки, такие как С-реактивный белок, матричная металлопептидаза 9, D-димер и белок S100 β [33]. Во многих биологических жидкостях организма человека (кровь, моча, слюна и спинномозговая жидкость) обнаружены многочисленные длРНК, названные циркулирующими длРНК [34]. Циркулирующие длРНК могут быть секретированы из клеток в биологические жидкости человека в составе внеклеточных везикул как апоптотические тельца

и микровезикулы (экзосомы и липосомы). Такие длРНК устойчивы к воздействию РНКаз, что делает их привлекательными в качестве новых диагностических и прогностических биомаркеров [34].

Циркулирующие длРНК неоднократно исследованы в качестве диагностических и прогностических биомаркеров при различных заболеваниях человека, включая цереброваскулярные заболевания (табл. 3). Показано, что циркулирующие длРНК могут быть новыми потенциальными биомаркерами при ИИ по нескольким причинам [35]:

- 1) неинвазивный метод обнаружения;
- 2) высокая стабильность в биологических жидкостях человека — таких, как кровь;
- 3) измеряются во многих других жидкостях организма;
- 4) обладают высокой чувствительностью по отношению к патологии;
- 5) могут быть обнаружены на ранних стадиях заболевания, тогда как белковые маркеры обнаруживаются в кровотоке только тогда, когда значительная часть повреждения тканей уже произошла;
- 6) играют роль практически во всех клеточных функциях;
- 7) перспективны для быстрой и точной диагностики подтипов ИИ;
- 8) являются менее сложными молекулами, чем большинство биологических молекул в крови, что упрощает анализ.

ДлРНК и терапия ИИ

Развитие и прогрессирование различных заболеваний, включая ИИ, могут быть связаны как с активацией, так и со снижением экспрессии длРНК в клетках. Поэтому в настоящее время активно развиваются подходы к генной терапии, направленные на активацию или подавление экспрессии специфических длРНК для ИИ [44]. Способы активации экспрессии длРНК включают доставку длРНК вирусными векторами (лентивирусы) или невирусными векторами (неорганические или органические наночастицы) [45]. Для подавления экспрессии длРНК можно использовать применение миРНК, антисмысловых олигонуклеотидов, репрессию транскрипции и редактирование генов [46].

Несмотря на интенсивные исследования роли длРНК при цереброваскулярных заболеваниях, в настоящее время в этой области нет основанных на длРНК терапевтических средств, применимых в клинических испытаниях.

Существуют несколько ограничений для развития терапии с использованием длРНК при ИИ:

- 1) низкая эффективность доставки в сосудистую сеть и головного мозга, а также вероятная необходимость повторной доставки [47];
- 2) функции и механизмы, через которые длРНК влияют на патогенез ИИ, намного сложнее и разнообразнее, чем у других некодирующих РНК [4]. Несмотря на недавние исследования, длРНК все еще в значительной степени «неизвестны» в отношении их клеточных и молекулярных механизмов влияния на патогенез ИИ;
- 3) большинство длРНК, которые локализуются в ядре клетки, действуют как эпигенетические регуляторы [4]. Эта особенность затрудняет нацеливание на длРНК с использованием микроРНК, что является одной из потенциальных терапевтических стратегий;
- 4) существуют проблемы с доставкой длРНК, которые могут быть преодолены с помощью химической функционализации поверхности наночастиц, нацеленной на спе-

Таблица 3. Исследование циркулирующих длРНК в качестве биомаркеров для диагностики и прогнозирования ИИ в остром периоде

Table 3. The value of circulating lncRNAs as biomarkers for IS diagnosis and prognosis in the acute period (AUC ≥ 0.70 is considered diagnostically significant for a biomarker)

| длРНК / lncRNA | Тип образца / Sample type | Экспрессия / Expression | Диагностика / Diagnosis | Прогнозирование / Prognosis | Специфичность, % / Specificity, % | Чувствительность, % / Sensitivity, % | AUC* | Источник литературы / Reference source |
|-------------------------|--|---|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--|
| NEAT1 | Плазма / Plasma | Повышена / Elevated | Да / Yes | Да / Yes | 82,9 | 64,3 | 0,804 | 36 |
| linc-DHFRL1-4 SNHG15 | МКПК / PBMC | Повышена (перед терапией) и снижена (после терапии) / Elevated (before therapy) and reduced (after therapy) | Да / Yes | Нет / No | Комбинированная / Combined, 91,5 | Комбинированная / Combined, 80,9 | Комбинированная / Combined, 0,815 | 37 |
| linc-FAM98A-3).3 | | | Да / Yes | Нет / No | | | | |
| ENST00000568297 | Периферическая цельная кровь / Peripheral whole blood | Повышена / Elevated | Да / Yes | Нет / No | Комбинированная / Combined, 80,0 | Комбинированная / Combined, 82,8 | Комбинированная / Combined, 0,843 | 38 |
| ENST00000568243 | | Повышена / Elevated | | | | | | |
| NR_046084 | | Повышена / Elevated | | | | | | |
| ANRIL | Плазма / Plasma | Снижена / Reduced | Да / Yes | Нет / No | 71, 2 | 72, 2 | 0,759 | 39 |
| H19 | Плазма, лимфоциты и нейтрофилы / Plasma, lymphocytes and neutrophils | Повышена / Elevated | Да / Yes | Да / Yes | 92,0; 92,0; 72,0 | 80,6; 55,6; 75,0 | 0,91; 0,776; 78,7 | 40 |
| ZFAS1 | Лейкоциты / WBC | Снижена / Reduced | Да / Yes | Нет / No | 48,6 | 89,3 | 0,727 | 41 |
| MIAT | Лейкоциты / WBC | Повышена / Elevated | Да / Yes | Да / Yes | 80,4 | 74,1 | 0,84 | 42 |
| H19 | Плазма / Plasma | Повышена / Elevated | Нет / No | Да / Yes | – | – | – | 31 |
| ANRIL | Сыворотка / Serum | Повышена / Elevated | Да / Yes | Нет / No | 83,7 | 70,1 | 0,85 | 43 |

Примечание. NEAT1 — обильно обогащенный ядерный транскрипт 1; SNHG15 — малая ядрышковая РНК — множества гена 1; ZFAS1 — ZNFX1 антисмысловая РНК 1; MIAT — транскрипт, ассоциированный с инфарктом миокарда; МКПК — мононуклеарные клетки периферической крови; ANRIL — антисмысловая РНК в INK4 локусе. *AUC ≥ 0,70 считается диагностически значимой для биомаркера. Прочерк — не упоминается в работе.

Note. NEAT1 — nuclear enriched abundant transcript 1; SNHG15 — small nucleolar RNA host gene 15; ZFAS1 — ZNFX1 antisense RNA 1; MIAT — myocardial infarction associated transcript; PBMC — peripheral blood mononuclear cell; ANRIL — antisense non-coding RNA in the INK4 locus. Dash — not mentioned in the work.

цифические лиганды, сверхэкспрессируемые клетками в стенке сосуда или в клетках головного мозга в ответ на соответствующие патологические стимулы [48].

Кроме того, у большинства длРНК отсутствует сохранение между видами, что ограничивает полезность доклинических исследований на животных. Одна из возможных стратегий для преодоления этих проблем состоит в том, чтобы идентифицировать прямые гены-мишени, связанные с патогенезом ИИ (например, с помощью NGS), и использовать доклинические исследования *in vivo* и *in vitro* для оценки потенциальной роли данных генов в патогенезе ИИ [16].

С учетом более интенсивных исследований с последующими клиническими испытаниями на пациентах применение длРНК в терапии ИИ в современной клинической практике может стать реальностью.

ДлРНК и гематоэнцефалический барьер

Одним из основных препятствий в разработке биомаркеров и новых терапевтических агентов при заболеваниях центральной нервной системы является ГЭБ — сложная структура, которая контролирует прохождение питательных веществ и кислорода из кровотока в мозг и предот-

вращает накопление нейротоксинов в ЦНС [49]. ГЭБ позволяет проходить катионным или небольшим жирорастворимым молекулам с молекулярной массой до 400 Д [49]. Такие транспортеры несут глюкозу и аминокислоты, в то время как молекулы с более высокой молекулярной массой (инсулин и трансферрин) проникают через ГЭБ через рецептор-опосредованный эндоцитоз [50]. Тем не менее ГЭБ считается ответственным за предотвращение высвобождения специфичных для заболеваний ЦНС (например, опухолей) молекул в кровотоки.

Современные данные свидетельствуют о том, что ГЭБ не является препятствием для прохождения длРНК из ЦНС в кровотоки. Известно, что при патологических состояниях циркулирующие длРНК могут проходить из ткани головного мозга в кровотоки через ГЭБ, делая их потенциальными индикаторами для заболеваний ЦНС, включая ИИ [51]. С другой стороны, существует очень мало данных относительно прохождения циркулирующих длРНК из крови в ткань мозга. Известно, что циркулирующие малые интерферирующие РНК, которые имеют молекулярную массу 14 кД, как и длРНК, не могут диффундировать через ГЭБ [52, 53].

Список литературы / References

1. Chaudhary D., Abedi V., Li J. et al. Clinical risk score for predicting recurrence following a cerebral ischemic event. *Front Neurol* 2019; 10: 1106. DOI: 10.3389/fneur.2019.01106. PMID: 31781015.
2. Liamis G., Barkas F., Megapanou E. et al. Hyponatremia in acute stroke patients: pathophysiology, clinical significance, and management options. *Eur Neurol* 2019; 1-9. DOI: 10.1159/000504475. PMID: 31722353.
3. Jathar S., Kumar V., Srivastava J., Tripathi V. Technological developments in lncRNA biology. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1008: 283–323. DOI: 10.1007/978-981-10-5203-3_10. PMID: 28815544.
4. Zhang X., Hong R., Chen W. et al. The role of long noncoding RNA in major human disease. *Bioorg Chem* 2019; 92: 103214. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103214. PMID: 31499258.
5. Henshall D.C. Epigenetics and noncoding RNA: Recent developments and future therapeutic opportunities. *Eur J Paediatr Neurol* 2019; 24: 30–34. DOI: 10.1016/j.ejpn.2019.06.002. PMID: 31235424.
6. Gutiérrez-Vargas J.A., Cardona-Gómez G.P. Considering risk factors for the effectiveness of translational therapies in brain stroke. *J Neurol Sci* 2019; 408: 116547. DOI: 10.1016/j.jns.2019.116547. PMID: 31683050.
7. Cipolla M.J., Liebeskind D.S., Chan S.L. The importance of comorbidities in ischemic stroke: Impact of hypertension on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2018; 38: 2129–2149. DOI: 10.1177/0271678X18800589. PMID: 30198826.
8. Al Kasab S., Derdeyn C.P., Guerrero W.R. et al. Intracranial large and medium artery atherosclerotic disease and stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2018; 27: 1723–1732. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.02.050. PMID: 29602616.
9. Zhang L., Zhou C., Qin Q. et al. LncRNA LEF1-AS1 regulates the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells by targeting miR-544a/PTEN axis. *J Cell Biochem* 2019; 120: 14670–14678. DOI: 10.1002/jcb.28728. PMID: 31016789.
10. Cui C., Wang X., Shang X.M. et al. LncRNA 430945 promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via the ROR2/RhoA signaling pathway in atherosclerosis. *Mol Med Rep* 2019; 19: 4663–4672. DOI: 10.3892/mmr.2019.10137. PMID: 30957191.
11. Yu H., Ma S., Sun L. et al. TGF- β 1 upregulates the expression of lncRNA-ATB to promote atherosclerosis. *Mol Med Rep* 2019; 19: 4222–4228. DOI: 10.3892/mmr.2019.10109. PMID: 30942415.
12. Lu Q., Meng Q., Qi M. et al. Shear-sensitive lncRNA AF131217.1 inhibits inflammation in HUVECs via regulation of KLF4. *Hypertension* 2019; 73: e25–e34. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12476. PMID: 30905197.
13. Zhuo X., Wu Y., Yang Y. et al. LncRNA AK094457 promotes AngII-mediated hypertension and endothelial dysfunction through suppressing activation of PPAR γ . *Life Sci* 2019; 233: 116745. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116745. PMID: 31404524.
14. Xue Y.Z., Li Z.J., Liu W.T. et al. Down-regulation of lncRNA MALAT1 alleviates vascular lesion and vascular remodeling of rats with hypertension. *Aging (Albany NY)* 2019; 11: 5192–5205. DOI: 10.18632/aging.102113. PMID: 31343412.

Выводы

В последние годы достигнут прогресс в раскрытии потенциальной роли длРНК в патогенезе ИИ. длРНК могут способствовать прогрессированию ИИ, регулируя активацию определенных генов-мишеней или сигнальных путей, приводя к активации микроглии, усилению воспалительного процесса, гибели клеток и нарушению функции ГЭБ. Напротив, существуют такие длРНК, которые способствуют функциональному восстановлению за счет усиления ангиогенеза, нейрогенеза и нейропротекции. По сравнению с исследованиями по изучению роли микроРНК в патогенезе ИИ, роль длРНК в развитии ИИ остается в значительной степени неизвестной. Дальнейшие исследования, вероятно, обнаружат новые длРНК и их мишени, что позволит лучше понять патофизиологические механизмы, лежащие в основе ИИ. Исследования на животных в моделях с ОСМА и кислородно-глюкозной депривацией/реперфузией *in vitro* будут по-прежнему полезны для определения роли длРНК в патогенезе ИИ. Поиск новых длРНК и выяснение их функций и механизмов при ИИ поможет в разработке диагностических и прогностических биомаркеров, а также терапевтических агентов при ИИ.

15. Fang G., Qi J., Huang L., Zhao X. LncRNA MRAK048635_P1 is critical for vascular smooth muscle cell function and phenotypic switching in essential hypertension. *Biosci Rep* 2019; 39: pii: BSR20182229. DOI: 10.1042/BSR20182229. PMID: 3083363.
16. Akella A., Bhattarai S., Dharar A. Long noncoding RNAs in the pathophysiology of ischemic stroke. *Neuromolecular Med* 2019; 21: 474–483. DOI: 10.1007/s12017-019-08542-w. PMID: 31119646.
17. Liang J., Wang Q., Li J.Q., et al. Long non-coding RNA MEG3 promotes cerebral ischemia-reperfusion injury through increasing pyroptosis by targeting miR-485/AIM2 axis. *Exp Neurol* 2019; 113139. DOI: 10.1016/j.expneurol.2019.113139. PMID: 31794744.
18. Xiao Z., Qiu Y., Lin Y. et al. Blocking lncRNA H19-miR-19a-Id2 axis attenuates hypoxia/ischemia induced neuronal injury. *Aging (Albany NY)* 2019; 11: 3585–3600. DOI: 10.18632/aging.101999. PMID: 31170091.
19. Han D., Zhou Y.Y. YY1-induced upregulation of lncRNA NEAT1 contributes to OGD/R injury-induced inflammatory response in cerebral microglial cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2019; 55: 501–511. DOI: 10.1007/s11626-019-00375-y. PMID: 31586366.
20. Yang X., Zi X.H. LncRNA SNHG1 alleviates OGD induced injury in BMEC via miR-338/HIF-1 α axis. *Brain Res* 2019; 1714: 174–181. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.11.003. PMID: 30414401.
21. Wang Y., Li G., Zhao L., Lv J. Long noncoding RNA HOTTIP alleviates oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury via modulating miR-143/hexokinase 2 pathway. *J Cell Biochem* 2018; 119: 10107–10117. DOI: 10.1002/jcb.27348. PMID: 30129112.
22. Wu L., Ye Z., Pan Y. et al. Vascular endothelial growth factor aggravates cerebral ischemia and reperfusion-induced blood-brain-barrier disruption through regulating LOC102640519/HOXC13/ZO-1 signaling. *Exp Cell Res* 2018; 369: 275–283. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.05.029. PMID: 29842876.
23. Wen Y., Yu Y., Fu X. LncRNA Gm4419 contributes to OGD/R injury of cerebral microglial cells via I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 487: 923–929. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.005. PMID: 28476620.
24. Nowak-Sliwinska P., Alitalo K., Allen E. et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis* 2018; 21: 425–532. DOI: 10.1007/s10456-018-9613-x. PMID: 29766399.
25. Ruan L., Wang B., ZhuGe Q., Jin K. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. *Brain Res* 2015; 1623: 166–173. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.02.042. PMID: 25736182.
26. Li L., Wang M., Mei Z. et al. LncRNAs HIF1A-AS2 facilitates the up-regulation of HIF-1 α by sponging to miR-153-3p, whereby promoting angiogenesis in HUVECs in hypoxia. *Biomed Pharmacother* 2017; 96: 165–172. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.113. PMID: 28985553.
27. Zhan R., Xu K., Pan J. et al. Long noncoding RNA MEG3 mediated angiogenesis after cerebral infarction through regulating p53/NOX4 axis. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 490: 700–706. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.06.104. PMID: 28634073.

28. Ghosh H.S. Adult neurogenesis and the promise of adult neural stem cells. *J Exp Neurosci* 2019; 13: 1179069519856876. DOI: 10.1177/1179069519856876. PMID: 31285654.
29. Christian K.M., Ming G.L., Song H. Adult neurogenesis and the dentate gyrus: Predicting function from form. *Behav Brain Res* 2020; 379: 112346. DOI: 10.1016/j.bbr.2019.112346. PMID: 31722241.
30. Kumar A., Pareek V., Faiq M.A., et al. Adult neurogenesis in humans: a review of basic concepts, history, current research, and clinical implications. *Innov Clin Neurosci* 2019; 16: 30–37. PMID: 31440399.
31. Wang J., Cao B., Zhao H. et al. Long noncoding RNA H19 prevents neurogenesis in ischemic stroke through p53/Notch1 pathway. *Brain Res Bull* 2019; 150: 111–117. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.05.009. PMID: 31102753.
32. Makris K., Haliassos A., Chondrogianni M., Tsvigoulis G. Blood biomarkers in ischemic stroke: potential role and challenges in clinical practice and research. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2018; 55: 294–328. DOI: 10.1080/10408363.2018.1461190. PMID: 29668333.
33. Bonaventura A., Liberale L., Vecchié A. et al. Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke. *Int J Mol Sci* 2016; 17: pii: E1967. DOI: 10.3390/ijms17121967. PMID: 27898011.
34. Pardini B., Sabo A.A., Birolo G., Calin G.A. Noncoding RNAs in extracellular fluids as cancer biomarkers: the new frontier of liquid biopsies. *Cancers (Basel)* 2019; 11: pii: E1170. DOI: 10.3390/cancers11081170. PMID: 31416190.
35. Viereck J., Thum T. Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury. *Circ Res* 2017; 120: 381–399. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308434. PMID: 28104771.
36. Li P., Duan S., Fu A. Long noncoding RNA NEAT1 correlates with higher disease risk, worse disease condition, decreased miR-124 and miR-125a and predicts poor recurrence free survival of acute ischemic stroke. *J Clin Lab Anal* 2019; 34: e23056. DOI: 10.1002/jcla.23056. PMID: 31721299.
37. Deng Q.W., Li S., Wang H. et al. Differential long noncoding RNA expressions in peripheral blood mononuclear cells for detection of acute ischemic stroke. *Clin Sci (Lond)* 2018; 132: 1597–1614. DOI: 10.1042/CS20180411. PMID: 29997237.
38. Guo X., Yang J., Liang B. et al. Identification of novel LncRNA biomarkers and construction of LncRNA-related Networks in han chinese patients with ischemic stroke. *Cell Physiol Biochem* 2018; 50: 2157–2175. DOI: 10.1159/000495058. PMID: 30415252.
39. Feng L., Guo J., Ai F. Circulating long noncoding RNA ANRIL downregulation correlates with increased risk, higher disease severity and elevated pro-inflammatory cytokines in patients with acute ischemic stroke. *J Clin Lab Anal* 2019; 33: e22629. DOI: 10.1002/jcla.22629. PMID: 30069916.
40. Wang J., Zhao H., Fan Z. et al. Long noncoding RNA H19 promotes neuroinflammation in ischemic stroke by driving histone deacetylase 1–dependent M1 microglial polarization. *Stroke* 2017; 48: 2211–2221. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.017387. PMID: 28630232.
41. Wang J., Ruan J., Zhu M. et al. Predictive value of long noncoding RNA ZFAS1 in patients with ischemic stroke. *Clin Exp Hypertens* 2019; 41: 615–621. DOI: 10.1080/10641963.2018.1529774. PMID: 30307773.
42. Zhu M., Li N., Luo P. et al. Peripheral blood leukocyte expression of lncRNA MIAT and its diagnostic and prognostic value in ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2018; 27: 326–337. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.009. PMID: 29030044.
43. Zhang K., Qi M., Yang Y. et al. Circulating lncRNA ANRIL in the serum of patients with ischemic stroke. *Clin Lab* 2019; 65. DOI: 10.7754/Clin. Lab.2019.190143. PMID: 31414760.
44. Archer K., Broskova Z., Bayoumi A.S. et al. Long non-coding RNAs as master regulators in cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 23651–23667. DOI: 10.3390/ijms161023651. PMID: 26445043.
45. Kumar M.M., Goyal R. LncRNA as a therapeutic target for angiogenesis. *Curr Top Med Chem* 2017; 17: 1750–1757. DOI: 10.2174/156802661766616116144744. PMID: 27848894.
46. Zampetaki A., Albrecht A., Steinhofel K. Long non-coding RNA structure and function: is there a link? *Front Physiol* 2018; 9: 1201. DOI: 10.3389/fphys.2018.01201. PMID: 30197605.
47. Jo J.I., Gao J.Q., Tabata Y. Biomaterial-based delivery systems of nucleic acid for regenerative research and regenerative therapy. *Regen Ther* 2019; 11: 123–130. DOI: 10.1016/j.reth.2019.06.007. PMID: 31338391.
48. Malissovas N., Ninou E., Michail A., Politis P.K. Targeting long non-coding RNAs in nervous system cancers: new insights in prognosis, diagnosis and therapy. *Curr Med Chem* 2019; 26: 5649–5663. DOI: 10.2174/0929867325666180831170227. PMID: 30182849.
49. Obermeier B., Verma A., Ransohoff R.M. The blood-brain barrier. *Handb Clin Neurol* 2016; 133: 39–59. DOI: 10.1016/B978-0-444-63432-0.00003-7. PMID: 27112670.
50. Fu B.M. Transport across the blood-brain barrier. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1097: 235–259. DOI: 10.1007/978-3-319-96445-4_13. PMID: 30315549.
51. Lopez-Ramirez M.A., Reijerkerk A., de Vries H.E., Romero I.A. Regulation of brain endothelial barrier function by microRNAs in health and neuroinflammation. *FASEB J* 2016; 30: 2662–2672. DOI: 10.1096/fj.201600435RR. PMID: 27118674.
52. Mohanty C., Kundu P., Sahoo S.K. Brain targeting of siRNA via intranasal pathway. *Curr Pharm Des* 2015; 21: 4606–4613. DOI: 10.2174/138161282131151013191737. PMID: 26486146.
53. 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. (In Russ.) DOI:10.25692/ACEN.2019.3.6

Информация об авторах

Новикова Лилия Бареевна, д.м.н., проф., зав. каф. неврологии Института дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия. ORCID ID: 0000-0001-8469-1635

Гареев Ильгиз Фанилевич, аспирант каф. медицинской реабилитации с курсами нейрохирургии и рефлексотерапии Института дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия. ORCID ID: 0000-0002-4965-0835

Раскуражеев Антон Алексеевич, к.м.н., н.с. 1-го неврологического отделения ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0522-767X

Бейлерли Озал Арзуманоглы — врач-нейрохирург отделения нейрохирургии ГБУЗ РБ «Больница скорой медицинской помощи», Уфа, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6149-5460

Минибеева Гузель Мударисовна, аспирант каф. неврологии ИДПО ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2078-6931>

Information about the authors

Lilia B. Novikova, D. Sci. (Med.), Prof., Head, Department of neurology, Institute of Continuing Professional Education, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia. ORCID ID: 0000-0001-8469-1635

Ilgiz F. Gareev, postgraduate student, Department of medical rehabilitation with the courses in neurosurgery and reflexology, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia. ORCID ID: 0000-0002-4965-0835

Anton A. Raskurazhev, PhD (Med.), researcher, 1st Neurological department, Research Center of Neurology, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0522-767X

Ozal A. Beylerli, neurosurgeon, Neurosurgical department, Emergency Medical Care Hospital, Ufa, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6149-5460

Guzel M. Minibaeva, postgraduate student, Department of neurology, Institute of Continuing Professional Education, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2078-6931>