

Микрорибонуклеинова киселина 208a – биомаркер за диагноза при сърдечно-съдови заболявания

Д-р Явор Кашлов, г-р Иван Щерев, г-р Николай Цонев, проф. Жанета Георгиева, доц. Светослав Георгиев

Клиника по Вътрешни Болести, УМБАЛ „Св. Марина“, Медицински университет, Варна

Въведение

Микрорибонуклеионовите киселини (miRNA) са малки РНК-молекули, изградени от около 21–25 нуклеотида (средно 22), които не кодират протеини, но имат важна функция за регулиране на генната експресия. Според класическия модел, за да се изяви гаден ген, информацията, кодирана в ДНК, се презаписва в инфомационна РНК, след това се превежда в рибозомите и се синтезира съответният протеин. Скоростта на образуване на нови белтъци подлежи на регулация и обичайно регулирано звено е презаписването на ДНК в РНК. Микрорибонуклеионовите киселини функционират на по-късен етап като посттранскрипционни регулатори на генната експресия. miRNAs не кодират протеин, но при свързване с тяхната таргетна иРНК в специфична последователност негативно регулират експресията на свързаната с иРНК цел или инхибират трансляцията на иРНК. Въпреки че най-често намаляват генната експресия, те също така могат да доведат до повишена генна експресия чрез потискане на изявата на инхибиторните гени.

Алтернативно, супресията на miRNA може да доведе до повишена експресия на гени, които са били преди това потиснати.

Характеристики

Целевата специфика на гадена miRNA е до голяма степен ръководена от добре запазена последователност (нуклеотиди 2 до 8) на miRNA¹⁵. Индивидуални mRNAs могат да бъдат прицел на няколко miRNA и една miRNA може да регулира няколко целеви mRNAs. Затова miRNA-медицираната инхибиция може да регулира по много сложен начин генната експресия¹⁶. Идентифицирането на целите на специфичните miRNAs е необходимо условие, както и

предизвикателство за разбиране на точните молекулни механизми, които са в основата на тяхната функция. Повечето животински miRNAs частично се свързват с регионите на техните цели, което затруднява хомоложната идентификация на целевата последователност¹⁷. Идентифицирането на специфични циркулиращи miRNA при определени заболявания е предпоставка за използването им като биомаркери. Първата демонстрация на връзката между циркулиращи miRNAs и определени заболявания бе публикувана в няколко проучвания в началото на 2008 г. При тези проучвания бяха открити няколко miRNAs в серума на пациенти с различни типове туморни клетки. В последващи проучвания са изолирани циркулиращи miRNAs при пациенти със сърдечно-съдови заболявания, като няколко от тях (по-специфични) са използвани за отгиференциране на здрави от болни индивиди. Това дава надежда, че циркулиращите miRNAs могат да служат като нови биомаркери за сърдечно-съдова патология¹⁸.

miRNA 208a

Глобалната роля на miRNA в сърцето се доказва от инхибиране на съзряването на miRNA в миши сърца и разкрива, че miRNA изгряят съществена роля по време на сърдечното развитие^{4, 5}. Проучвания показват промени в нивата на специфични miRNA при болни човешки сърца, сочейки участието на miRNA в кардиомиопатиите⁶⁻⁸. Освен това проучвания за специфични miRNA в животински модели са идентифицирали различни роли за miRNA както по време на развитието на сърцето, така и при патологични състояния, включително регулиране на ключовите фактори, които са важни за кардиогенезата, хипертрофичния растеж и сърдечната проводимост^{5, 9-13}.

MiR-208 е част от семейството на miRNA, открита както при животни, така и при хора²⁸. За-

бележителното е, че miR-208a е установена само в сърцето, но не и в скелетните мускули². За тази miRNA, кодираща се от интрон на бързата миозин-тежка верига ген Myn6, е доказано, че е необходима за стрес-индуцирания сърдечен растеж¹⁹. Свързаната miRNA-miR-208b, която се различава от miR-208a само по три нуклеотида в 3' края, е също кодирана в интрон на миозинов ген, в този случай – от бавния миозин Myn7¹³. В миши сърца myosin-7 е специфичен за фетуса, като промяната към възрастни изоформа – myosin-6, се появява скоро след раждането. Подобна промяна от miR-208b в miR-208a беше доказана, което предполага, че тези miRNA се транскрипират заедно с кодиращите ги гени и по този начин представляват protein-gene/miRNA-gene единици.

Лечението на неонатални кардиомиоцити на плъхове с хормони на щитовидната жлеза потиска експресията на Myn7/miR-208b единица и активира Myn6/miR-208a единица. В допълнение, трансгенна прекомерна експресия на miR-208a в мише сърце може да бъде достатъчна за развитие на сърдечна хипертрофия. За сърдечната експресия на miR-208b е установено, че може да бъде предизвикана както в miR-208a трансгенни мишки, така и при миши сърца, подложени на повишен насрежен товар. Откритието е в съгласие с ролята на експресирания myosin-7 за хипертрофията. Въпреки това, в miR-208a трансгенни мишки реекспресията на myosin-7 е установена само в области на сърцето, свързани с интерстициална фиброза³. Така свърхекспресията на miR-208a предизвиква хипертрофия, независимо от повторното активиране на Myn7. Свързаният с щитовидните хормони протеин 1 и миостатинът – два негативни регулатора на мускулния растеж и хипертрофия, са също така повишени. Освен това е открито, че miR-208a е необходима за правилната сърдечна проводимост. Подобно на Myn6 и Myn7, трети миозинов ген – Myn7b, също съдържа интрон за miRNA, идентифицирана като miR-499¹⁹. Тези три protein-gene/miRNA-gene единици (т.е. Myn6/miR-208a, Myn7/miR-208b и Myn7b/miR-499) са доказани участници в мрежата, регулираща мускулната функция. Myn6 е бърз миозин, който представлява по-голямата част от миозиновите протеини, експресирани се в сърцата на възрастните мишки. Установено е, че miR-208a (съвместно експресирана с Myn6) точно контролира нивата на експресия на бавните миозини – Myn7, Myn7b, и следователно на miR-208b и miR-499. Открита е ролята на последните miRNA в спецификацията на мускулните влакна чрез активиране на бавните и потискане на бързите миозинови гени. Няколко репресора на транскрипцията, известни с участието си в ми-

озиновата генна експресия, са идентифицирани и валидирани като таргети на miR-208 и miR-499²⁰.

Наблюденията показват, че повишената експресия на miR-208a сама по себе си е достатъчна за индуциране на миокардна хипертрофия, дори когато не се наблюдава реактивация на експресията на Myn7³.

Идеалният сърдечен биомаркер

Въпреки че няколко биомаркера удовлетворяват един или повече от тези критерии, няма отделен биомаркер, който да удовлетворява всички критерии. Сърдечните тропонини I и T най-много се приближават до идеалния биомаркер, тъй като имат висока тъканна специфичност – сърдечните тропонини не са открити в други тъкани, освен в сърцето, експресират се във висока концентрация в миокарда и липсват в кръвта на здрави хора. Сърдечните тропонини T и I са повишени в продължение на няколко дни след настъпването на остър миокарден инфаркт. От друга страна, сърдечните тропонини са структурни протеини и се освобождават относително бавно, повишени нива с висока диагностична чувствителност се установяват 4–6 часа след острия инцидент. Освен това предиктивната точност на освобождаването на сърдечните тропонини варира между отделните пациенти. Въпреки че повечето експерти са съгласни, че сърдечните тропонини се освобождават само при некроза на миокарда, но не и при обратима исхемия, повишение на нивата им се установява и при други състояния освен инфаркт на миокарда. Методите за измерване на сърдечните тропонини показват хетерогенни резултати. Въпреки тези недостатъци, сърдечните тропонини са от ключово значение за диагнозата на миокардна некроза при пациенти със симптоми на сърдечна исхемия¹.

miRNA 208a – биомаркер за сърдечно-съдови заболявания

Острият миокарден инфаркт (ОМИ) е водеща причина в света на заболяемост и смъртност. Една ранна и точна диагноза може да стане причина за незабавно започване на реперфузионна терапия с потенциална редуция на смъртността²¹. Биомаркерите, които се използват за установяване и диагностициране на пациенти с ОМИ, стават все по-важни за диагностиката^{22, 23}. Текущи биомаркери като креатинкиназа-MB, изоензими, сърдечният миоглобин и тропонините са широко прилагани в клиничната диагностика²⁴. Сред тях сърдечните тропонини в момента се считат за „златен стандарт“ за диагноза на ОМИ²⁵. Въпреки това, не спират проучванията на

нови биомаркери с висока чувствителност и специфичност в ранното диагностициране на ОМИ².

Проучвания са показали наличието на множество зрели miRNA в човешката плазма^{26, 27}. В плазмата на четири здрави индивида чрез miRNA microarray и real-time PCR за детекция на mRNA са изолирани около 170 miRNA². Около 100 miRNAs, присъстващи в човешката плазма, са с променливи нива в съответствие с последните доклади. Най-високи нива в четирите плазми чрез microarray се отчитат за miR-451 и miR-16. Докато плазмените нива на miR-133а са ниски, то тези на miR-1, miR-499 и miR-208а са неоткриваеми. Стойностите, установени чрез real-time PCR, също така разкриват, че miR-451 и miR-16 са с високи нива, докато miR-133а е с ниски. В допълнение, miR-1 и miR-499, които са неоткриваеми от microarray, могат да бъдат засечени чрез PCR в реално време. Въпреки това, miR-208а не може да бъде открит с нито един от двата метода. Резултатите показват, че miR-1, miR-133а и miR-499 са с ниски нива, а miR-208а отсъства от плазмата на здрави хора².

Въз основа на клониране и microarray експерименти с miRNA от човешки сърца от няколко проучвания са изолирани четири miRNA, които се експресират единствено или във високи нива в сърдечната тъкан. Посредством анализ на множество тъкани от плъхове чрез northern-blot се доказва, че miR-499 и miR-208а се откриват само в сърцето, докато miR-1 и miR-133а са силно изразени както в скелетните мускули, така и в сърцето. След това чрез чувствителния метод за детекция – PCR в реално време, се доказва, че нивата на miR-1 и miR-133а са три до четири пъти по-високи в скелетната мускулатура, отколкото в сърцето. В допълнение, miR-499 се експресира главно в сърцето, но може да бъде открит и в скелетните мускули, въпреки че нивата са по-ниски от тези в сърцето. Важното е, че miR-208а е установена само в сърцето и липсва в скелетните мускули. Всичките четири miRNA имат единствено следи в останалите тъкани. Нивата на тези четири miRNA в различни степен показват подобен модел на експресия при хора.

За да се проучи дали сърдечни miRNA могат да бъдат открити с нарастващи нива в циркулираща кръв след инфаркт на миокарда, е създаден миши модел с ОМИ чрез лигиране на коронарна артерия и последваща оценка на нивата на циркулиращите miRNA. Кръвните проби са събрани от мишите модели в различни времеви интервали (0, 1, 3, 6, 12, 24 часа след лигиране на коронарна артерия). PCR-анализ в реално време показва, че нивата на miR-1, miR-133а и miR-499 в плазмата са се увеличили в 1-вия до 3-тия час, достигнали са своя пик в 3-тия до 12-ия час и намаляват 12–24 часа след лигирането на коронарна-

та артерия. Трябва да се отбележи, че miR-208а е неоткриваема в началото, но значително се увеличава до отчитащи се нива най-рано в 1-вия час, достига максимума си през 3-тия час, след което нивата ѝ спадат 6–12 часа до неоткриваеми на 24 часа след оклузия на коронарна артерия. Нивата на miR-16 също се увеличават, макар и в по-малка степен, след оклузия на коронарна артерия. Въпреки това, нивата на специфичната за черния дроб miR-122 не се променят значително по време на цялата процедура².

Сравнени са експерименти със следните три групи: мишки с извършена торакотомия с последващо лигиране на коронарна артерия (лигирана група); мишки с извършена торакотомия без лигиране на коронарна артерия (оперативна група) и трета група от само упоени мишки (неоперативна група). Кръвните проби са били взети три часа след лигиране на коронарните артерии. Както се е очаквало, нивата на miR-1, miR-133а, miR-499, miR-208а и miR-16 са по-високи в плазмата в лигираната група в сравнение с тези в третата група. Същевременно нивата на miR-1, miR-133а, miR-499 и miR-16 в плазмата от оперативната група са били значително по-високи в сравнение с тези от неоперативната група. Нивата на мускулно специфичната miR-206 в плазмата са отчетени по-високи както в лигираната, така и в оперативната група, докато в неоперативната група не се е наблюдавала промяна. Не е отчетена съществена промяна на специфичната за черния дроб miR-122 сред трите групи. Тези наблюдения показват, че скелетната мускулна контузия по време на операция е причина за повишените нива на мускулните miRNA в кръвта. Трябва да се отбележи, че miR-208а е неоткриваема в плазмата на оперативната и неоперативната група и се повишава само в групата с предизвикан миокарден инфаркт. Този опит показва, че miR-208а е по-специфичен маркер за сърдечно увреждане сред тези miRNA.

Проведени са допълнителни изследвания на miRNA нива в плазмата на пациенти с ОМИ, за да се определи нивото на сърдечните miRNA в циркулиращата кръв. За тази цел са взети проби от 66 пациенти плюс здрави контроли, разделени в четири групи. От тези групи 33 пациенти са с ОМИ в рамките на 12 часа от началото на симптоматиката. Групата пациенти без миокарден инфаркт с болка в гърдите са разделени според резултатите от коронарна ангиография, включително 16 пациенти с коронарна болест на сърцето (ИБС) и 17 пациенти с други сърдечно-съдови заболявания. Пациентите са били изключвани, ако са получили интравенозна тромболитична или антикоагулантна терапия преди първите кръвни проби да бъдат взети. В допълнение, като контроли в проучването са включе-

ни 30 здрави възрастни доброволци (нормална ЕКГ находка без боледуване от сърдечно-съдови заболявания, 20 мъже, 10 жени; 60.7±7.3 години).

Не е наблюдавана значителна разлика в експресията според пола и възрастта между трите групи пациенти. Чрез PCR в реално време са установени по-високи нива на miR-1, miR-133a и miR-499 в плазмата при пациентите в групата с ОМИ в сравнение с тези от здравата контрола. Въпреки това, не са наблюдавани статистически значими разлики в нивата на тези три miRNA сред здрави, не-исхемично и исхемично болни. Сигнификантно miR-208a не е бил открит в плазмените проби от здравата контрола, исхемична и неисхемична група, но е засечен в плазмата на по-голямата част от пациентите с остър миокарден инфаркт (90.9%, 30/33). Трябва да се отбележи също, че не са наблюдавани съществени разлики в нивата на miR-16 и miR-451 между всичките четири групи.

За да се определи дали повишените стойности на miRNA в плазмата от пациентите с ОМИ търпят някакви промени след лечение, е извършено проследяване в 5 от 33 пациенти с ОМИ. Пет пациенти са лекувани с PCI и конвенционално фармакологично лечение. След 2 месеца всички те са показали явно клинично подобрение, включително възстановяване на симптомите, свързани с ОМИ. След изследване на плазмените нива на сърдечните miRNA е установен значителен спад на miR-1, miR-133a и miR-499, отколкото техните плазмени нива по време на ОМИ, а miR-208a е бил неоткриваем по време на проследяването².

Освен това плазмените нива на miR-208a са били открити при лицата с ОМИ с чувствителност 100% и специфичност 90.9%, въпреки че нивата на miR-499, miR-1 и miR-133a в плазмата са по-малко чувствителни (36.4, 33.3 и 15.2%, съответно) за диагностика на ОМИ. Резултати показват, че сред четирите сърдечни miRNA miR-208a показва най-висока чувствителност и специфичност за диагностика на ОМИ. В допълнение, в 20 от 33 (60.6%) от приетите пациенти с ОМИ кръвните проби са събрани в рамките на 4 часа от появата на симптомите. При всички тях (20/20) се устано-

вяват повишени концентрации на miR-208a, докато паралел с TnI е бил открит в 85% (17/20) от пациентите, което предполага, че плазмената miR-208a като потенциален биомаркер може да има по-висока чувствителност в детекцията на ранния ОМИ, особено в рамките на първите 4 часа от началото на симптомите. За да се оцени специфичната експресия на miR-208a, последната е изследвана чрез PCR в реално време в плазмата на пациенти без сърдечно-съдови заболявания, включително остра бъбречна недостатъчност, хронична бъбречна недостатъчност, инсулт и травма. Изследванията показват, че miR-208a остава неоткриваем в плазмата от всички тези пациенти. За разлика от това, miR-208a може да бъде значително повишен в плазмата на 90% ОМИ пациенти.

Нивата на cTnI в кръвта започват да се покачват след 4–8 часа от началото на миокардния инфаркт. Данните от експериментите с животни показват, че miRNA се позитивира в рамките на 1-вия час от коронарното лигиране. При трима от пациентите с ОМИ, включени в проучването, нивата на miR-208a стават откриваеми в 1-вия–4-ия час от началото на гръдната болка, когато нивата на cTnI са били все още под праговата стойност. В клетките cTnI е представен предимно в миофибрилите; само 2.8–4.1% от cTnI е цитозолен¹⁴. miRNAs са свързани с протеинов комплекс, който е предимно цитозолен. Това може да повлияе тяхното освобождаване, когато клетките са увредени. Резултатите показват, че mRNA се засича по време на ранната фаза на инфаркт на миокарда².

Заклучение

miRNAs могат да бъдат чувствителни и специфични биомаркери за ранно проследяване на сърдечно-съдови заболявания, включително остър миокарден инфаркт, сърдечна недостатъчност и миокардит.

Необходимо е натрупване на допълнителни доказателства в използването на miRNAs като практически биомаркери. Загълбочаването на познанието за тях може да обособи нови подходи за бърза и лесна детекция в кръвта.

Книгопис

1. Доц. Жанета Георгиева. Сърдечно-съдови биомаркери. *Монография*. 2012.
2. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. (February 2010). „Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans“. *Eur Heart J*. 2010 Mar;31(6):659-66.
3. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH, Wang DZ. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*. 2009;119:2772-86.

Пълната библиографска справка е на разположение в издателството и може да бъде представена при поискване.