УДК 575.113

CC BY

Кластер микроРНК miR-144/451 в микровезикулах плазмы крови и эритроцитах у пациентов с тромбоэмболией лёгочной артерии в анамнезе

© Сироткина О. В.[1,2,3], Улитина А. С.[1,2], Жиленкова Ю. И.[1], Золотова Е. А.[1], Симакова М. А.[1], Моисеева О. М.[1], Вавилова Т. В.[1]

[1] — ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

[2] — ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

[3] — ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Российская Федерация

Аннотация. ***Введение.*** У пациентов, перенёсших тромбоэмболию лёгочной артерии (ТЭЛА), серьёзной проблемой являются осложнения: хроническая тромбоэмболическая болезнь (ХТЭБ) или хроническая тромбоэмболическая лёгочная гипертензия (ХТЭЛГ). Эритроциты, внеклеточные микровезикулы (ВМВ) и микроРНК играют существенную роль при развитии прокоагулянтных состояний. ***Цель.*** Проанализировать уровни miR-144-3p, miR-451a, miR-451b в ВМВ плазмы крови и эритроцитах у пациентов с ТЭЛА в анамнезе и у лиц контрольной группы. ***Материалы и методы.*** Обследованы 18 пациентов с ТЭЛА в анамнезе (13 ХТЭЛГ, 5 ХТЭБ) и 8 лиц контрольной группы. Всем участникам выполнены клинический и биохимический анализы крови, коагулограмма. Методом проточной цитометрии детектировано количество ВМВ в плазме (CD9, CD41, CD45, CD235a, CD105). Методом ПЦР в режиме реального времени оценена экспрессия miR-144-3p, miR-451a, miR-451b с использованием эндогенного контроля (miR-152-3p) и пяти экзогенных контролей качества. ***Результаты.*** Уровни miR-144-3p и miR-451a в группе ТЭЛА были ниже, чем в контроле, как в ВМВ ($p = 0{,}030$; $p = 0{,}065$), так и в эритроцитах ($p = 0{,}023$; $p = 0{,}086$). У женщин с ХТЭЛГ уровни miR-144-3p и miR-451a были ниже, чем у женщин с ХТЭБ ($p = 0{,}087$; $p = 0{,}031$). MiR-451b в ВМВ не детектировалась, а в эритроцитах её уровень не различался между группами. В группе ТЭЛА уровни miR-144-3p и miR-451a прямо коррелировали друг с другом как в ВМВ ($p = 0{,}004$), так и в эритроцитах ($p = 0{,}042$). Среди всех обследованных лиц уровни miR-144-3p и miR-451a в ВМВ прямо коррелировали с таковыми в эритроцитах ($p = 0{,}002$; $p = 0{,}078$). Количество эритроцитарных ВМВ коррелировало с уровнем miR-451a в ВМВ ($R = 0{,}472$; $p = 0{,}065$) и в эритроцитах ($R = –0{,}829$; $p = 0{,}011$). Уровень miR-451a в ВМВ коррелировал с концентрациями в плазме крови фактора VIII и фибриногена ($R = 0{,}584$; $p = 0{,}022$ и $R = –0{,}489$; $p = 0{,}047$), с международным нормализованным отношением ($R = 0{,}894$; $p = 0{,}041$). ***Заключение.*** Кластер miR-144/451 может влиять на систему свертывания крови и риск развития посттромбоэмболических осложнений. В данном исследовании miR-144-3p и miR-451a проявили себя как протективные факторы в отношении развития ТЭЛА и степени тяжести посттромбоэмболических осложнений.

Ключевые слова: микроРНК; miR-144; miR-451; микровезикулы; ТЭЛА; посттромбоэмболический синдром

Для цитирования:
Сироткина О. В., Улитина А. С., Жиленкова Ю. И., Золотова Е. А., Симакова М. А., Моисеева О. М., Вавилова Т. В. Кластер микроРНК miR-144/451 в микровезикулах плазмы крови и эритроцитах у пациентов с тромбоэмболией лёгочной артерии в анамнезе. *Фармакогенетика и фармакогеномика.* 2023;(1):20–32. https://doi.org/10.37489/2588-0527-2023-1-20-32
Поступила: 30 мая 2023 г. **Принята:** 06 июня 2023 г. **Опубликована:** 30 июня 2023 г.

The microRNA-144/451 cluster in plasma-derived microvesicles and erythrocytes in patients with history of pulmonary embolism

© Olga V. Sirotkina[1,2,3], Anna S. Ulitina[1,2], Yulia I. Zhilenkova[1], Ekaterina A. Zolotova[1], Maria A. Simakova[1], Olga M. Moiseeva[1], Tatyana V. Vavilova[1]

[1] — Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

[2] — "Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University", St. Petersburg, Russian Federation

[3] — Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Russian Federation

Abstract. ***Introduction.*** Chronic thromboembolic disease (CTED) and chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) are the complications that comprise a serious problem for patients with history of pulmonary embolism (PE). Erythrocytes, extracellular microvesicles (EMVs) and miRNAs play a substantial role in the procoagulant states. ***The aim.*** To analyze the levels of miR-144-3p, miR-451a, and miR-451b in blood plasma-derived EMVs and erythrocytes in patients with history of PE and in the control group. ***Materials and Methods.*** 18 patients with history of PE (13 CTEPH, 5 CTED) and 8 controls were enrolled into the study. All the participants had undergone clinical and biochemical blood tests as well as the coagulogram. We used flow cytometry to assess plasma-derived EMVs (CD9, CD41, CD45, CD235a, CD105). We measured the expression of miR-144-3p, miR-451a, miR-451b by real-time PCR with endogenous control (miR-152-3p) and five exogenous quality controls. ***Results.*** The levels of miR-144-3p and miR-451a in patients were lower than in controls, both in EMVs ($p = 0.030$; $p = 0.065$) and in erythrocytes ($p = 0.023$;

p = 0.086). In female patients, the levels of miR-144-3p and miR-451a in CTEPH were lower than in CTED (p = 0.087; p = 0.031). Mir-451b in EMVs has not been detected, while in erythrocytes its levels have not differed between the groups. In patients, the levels of miR-144-3p and miR-451a directly correlated with each other both in EMVs (p = 0.004) and in erythrocytes (p = 0.042). In all the participants, the levels of miR-144-3p and miR-451a in EMVs directly correlated with those in erythrocytes (p = 0.002; p = 0.078). The number of erythrocyte-derived EMVs correlated with miR-451a levels both in EMVs (R = 0.472; p = 0.065) and in erythrocytes (R = –0.829; p = 0.011). The level of miR-451a in EMVs correlated with blood plasma levels of factor VIII and fibrinogen (R = 0.584; p = 0.022 and R= –0.489; p = 0.047), and with the International Normalized Ratio (R = 0.894; p = 0.041). ***Conclusion.*** The microRNA-144/451 cluster may influence both the hemostasis system and the risk of post-thromboembolic complications development. In the present study, miR-144-3p and miR-451a showed themselves as protective factors in relation to both the development of PE and severity of post-thromboembolic complications.

Keywords: microRNA; miR-144; miR-451; microvesicles; pulmonary embolism; post-thromboembolic syndrome

For citations:
Sirotkina OV, Ulitina AS, Zhilenkova YuI, Zolotova EA, Simakova MA, Moiseeva OM, Vavilova TV. The microRNA-144/451 cluster in plasma-derived microvesicles and erythrocytes in patients with history of pulmonary embolism. *Farmakogenetika i farmakogenomika = Pharmacogenetics and pharmacogenomics*. 2023;(1):20–32. (In Russ). https://doi.org/10.37489/2588-0527-2023-1-20-32
Received: May 30, 2023. **Accepted:** June 06, 2023. **Published:** June 30, 2023.

Введение / Introduction

Венозные тромбозы и эмболии (ВТЭ), включая тромбоэмболию лёгочной артерии (ТЭЛА), занимают значительное место среди сердечно-сосудистой патологии: по мировым данным 2023 года, ВТЭ — третья по частоте причина смерти [1]. Важной медико-социальной проблемой являются не только тромбоэмболии как таковые, но и **посттромбоэмболические осложнения**: хроническая тромбоэмболическая болезнь (ХТЭБ) или более тяжёлое состояние — хроническая тромбоэмболическая лёгочная гипертензия (ХТЭЛГ) [2].

В исследовании ВТЭ и их осложнений за последние годы достигнут значительный прогресс, однако механизм тромбообразования и относительный вклад в этот процесс различных факторов риска до сих пор описаны не полностью, поэтому актуальной задачей является углубленное изучение патогенеза осложнений ВТЭ не только на клеточном, но и на молекулярно-генетическом уровне. Вклад клеточного компонента в реализацию процесса гемостаза показан в первую очередь для тромбоцитов и эндотелиоцитов. Однако в последние годы было выяснено, что эритроциты и **внеклеточные микровезикулы (ВМВ)** различного происхождения также играют существенную роль как в физиологических реакциях свертывания крови, так и при развитии прокоагулянтных состояний [3]. В настоящее время активно изучается вклад ВМВ эритроцитарного происхождения и их содержимого — регуляторных молекул, в том числе микроРНК, и нарушений эритроцитарного гемопоэза в развитие ВТЭ [4–7].

При реализации проекта «Геном человека» было выяснено, что только 1,5–2 % генома кодирует структуру белков, а подавляющее большинство молекул РНК выполняют регуляторные функции [8, 9]. **МикроРНК** представляют собой обширный класс коротких некодирующих РНК с длиной молекул 18–25 нуклеотидов. На сегодняшний день описаны более двух тысяч человеческих микроРНК, сведения о которых аккумулируются в международных базах данных (miRBase и др.) [10]. Биогенез микроРНК (процессинг, формирование зрелой молекулы из структуры-предшественника) совершается в несколько этапов, в которых задействованы различные белки, начинается в клеточном ядре и завершается в цитоплазме. Зрелая микроРНК в составе белкового комплекса связывается с комплементарным участком мРНК, что приводит к подавлению трансляции с данного участка мРНК, а сама мРНК-мишень может быть расщеплена за счёт РНКаз, входящих в указанный комплекс. Иными словами, микроРНК подавляют активность генов путём угнетения трансляции и таким образом модулируют физиологические и патологические процессы на постранскрипционном уровне [11, 12].

Примерно 50 % микроРНК в организме человека входят в состав того или иного **кластера** — группы микроРНК, гены которых физически расположены рядом друг с другом, и транскрипция всего кластера происходит в одном направлении, не прерываясь противоположно направленной транскрипцией какой-либо другой РНК (полицистронный первичный транскрипт). Большинство кластеров состоят из двух или трёх микроРНК, хотя известны и более крупные кластеры. Как правило, микроРНК, входящие в кластер, выполняют свои регуляторные функции совместно [13].

Кластер miR-144/451 включает в себя три микроРНК: miR-144-3p, miR-451a и miR-451b, гены которых экспрессируются преимущественно в эритроидном ростке. *Rasmussen KD и соавт.* в экспериментах *in vivo* показали важную роль указанного локуса для процесса эритропоэза: у мышей, нокаутных по кластеру miR-144/451, наблюдались нарушение созревания эритробластов, эритроидная гиперплазия, спленомегалия и анемия [14].

В более поздних исследованиях была выявлена **связь кластера miR-144/451 не только с эритропоэзом, но и с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями**, причём получены данные о протективной роли

указанных микроРНК. В частности, была показана протективная роль кластера miR-144/451 при внутричерепном кровоизлиянии [15], атеросклерозе [16], ишемии миокарда [17], а также снижение уровней miR-144-3p и miR-451a при дилатационной кардиомиопатии [18]. *Turczyńska KM и соавт.* выявили локальное изменение экспрессии кластера miR-144/451 в венозной стенке при механическом воздействии на неё [19]. Учитывая высокую частоту встречаемости ВТЭ и накопленный объём литературных сведений о кластере miR-144/451, актуальной научно-практической задачей является выяснение роли данных микроРНК в патогенезе ТЭЛА и её осложнений, и это послужило основанием для выполнения нашего исследования.

Цель работы. Проанализировать уровни микроРНК miR-144-3p, miR-451a, miR-451b во внеклеточных микровезикулах плазмы крови и эритроцитах у пациентов с ТЭЛА в анамнезе и у лиц контрольной группы.

Материалы и методы / Materials and methods

Группы обследованных лиц / Groups of examined persons

В исследование дизайна «случай-контроль» были включены 18 пациентов (средний возраст 53,5±15,1 лет, 8 мужчин и 10 женщин) с ТЭЛА в анамнезе, получающие антикоагулянтную терапию варфарином или ривароксабаном, из которых 8 мужчин и 5 женщин на момент обследования имели ХТЭЛГ, а 5 женщин имели ХТЭБ. Группу контроля составили 8 добровольцев без тромбоэмболических эпизодов в анамнезе (средний возраст 50,0±7,5 лет, 5 мужчин и 3 женщины). Все лица, включённые в исследование, были европеоидами, не связанными узами родства, и дали информированное согласие на участие (разрешение локального этического комитета ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России №0603-21 от 15.03.2021 г.).

Лабораторные методы исследования / Laboratory research methods

Всем участникам исследования был выполнен клинический анализ крови на гематологическим анализаторе DxH 800 (BeckmanCoulter, США), а также были оценены концентрации в крови фактора VIII, фактора Виллебранда, фибриногена, D-димера на коагулометре STA Compact (Stago, Франция) и С-реактивного белка (СРБ) на биохимическом анализаторе AU-480 (BeckmanCoulter, США).

У всех участников исследования было проанализировано количество ВМВ — экзосом (CD9+) на проточном цитометреCytomics FC-500 (BeckmanCoulter, США) с помощью набора реагентов Exo-FACS (HansaBioMed, Эстония) и флуоресцентно меченых антител (BioLegend, США) к поверхностным белковым маркерам клеток крови: CD41+ (тромбоциты), CD45+ (лейкоциты), CD235a+ (эритроциты), CD105+ (эндотелиоциты). ВМВ для проточной цитометрии выделяли из образцов венозной крови по протоколу, описанному ранее [20].

Молекулярно-генетические методы исследования / Molecular genetic research methods

У каждого участника исследования был получен образец крови из локтевой вены, который был подвергнут центрифугированию для разделения на фракции по протоколу, описанному *Kabanova S и соавт.* [21], после чего были раздельно выделены два образца микроРНК: из общего пула ВМВ плазмы и из эритроцитов.

МикроРНК из ВМВ выделяли набором реагентов exoRNeasyMaxi Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Выделение производили из 4,0 мл фильтрованной плазмы. В соответствии с рекомендациями QIAGEN, фильтрацию плазмы осуществляли с помощью шприца объёмом 10 мл с насадкой Minisart с порами диаметром 0,8 мкм (Sartorius, Германия, кат. номер 16592). МикроРНК из эритроцитов выделяли набором реагентов miRNeasy Kit (QIAGEN, Германия), пригодность которого для данной цели была подтверждена ранее [22]. Выделение производили из 300 мкл свежеполученного осадка эритроцитов. В результате каждого процесса выделения получали 12 мкл водного раствора общей РНК, включающего фракцию микроРНК. Раствор РНК немедленно перемещали в холодильник с температурой +4 °С и в тот же рабочий день использовали для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ).

Для мониторинга качества работы использовали пять технических контролей — синтетических аналогов микроРНК (QIAGEN, Германия). Для этого в образец вносили: на этапе выделения микроРНК — 1 мкл смеси UniSp2, UniSp4 и UniSp5 из набора реагентов RNA Spike-in Kit; на этапе ОТ — 1 мкл смеси UniSp6 (из вышеуказанного набора) и cel-miR-39-3p (из набора реагентов для ОТ).

ОТ выполняли с помощью набора реагентов miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Принцип метода заключается в одновременном проведении реакций полиаденилирования и ОТ: к зрелым молекулам микроРНК присоединяются поли(А)-хвосты, и кДНК синтезируется с помощью одного универсального олигонуклеотидного поли(Т)-праймера. Синтез кДНК на матрицах микроРНК проводили в объёме 20 мкл в термоциклере T100 ThermalCycler (Bio-Rad, США) по следующему температурному протоколу: 42 °С — 60 мин, 95 °С — 5 мин. Полученный раствор кДНК немедленно перемещали в холодильник с температурой +4 °С и в тот же рабочий день использовали для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).

ПЦР в режиме реального времени выполняли с помощью набора реагентов miRCURY LNA Probe PCR Kit и специфичных смесей miRCURY LNA miRNAProbe PCR Assay: hsa-miR-144-3p (339350_

ZP00000269), hsa-miR-451a (339350_ZP00001151), hsa-miR-451b (339350_ZP00001152), hsa-miR-152-3p (339350_ZP00000295), UniSp2 (339350_ZP00004671), UniSp4 (339350_ZP00004673), UniSp5 (339350_ZP00004687), UniSp6 (339350_ZP00004674), cel-miR-39-3p (339350_ZP0000672). ПЦР проводили в объёме 10 мкл в термоциклере C1000 Touch ThermalCycler с оптическим блоком CFX96 Real-time System (Bio-Rad, США). Реакционная смесь состояла из 5 мкл 2х мастер-микса QuantiNovaProbe Master Mix, 1 мкл универсального обратного праймера 10х miRCURYProbe Universal Primer, 1 мкл смеси специфичного прямого праймера и специфичного TaqMan-зонда miRCURY LNA miRNAProbe PCR Assay, 2 мкл раствора кДНК и 1 мклдеионизированной воды. После этапа первичной денатурации в течение 2 мин при 95 °С выполняли 41 цикл амплификации (95 °С, 5 сек; 56 °С, 30 сек); в конце каждого цикла детектировали флуоресценцию по каналу FAM. Все реакции проводили в трипликатах (рис. 1).

Относительную нормализованную экспрессию рассчитывали общепринятым методом ΔΔCq с помощью программы CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, США). В качестве референсного гена (эндогенного контроля) использовали микроРНК miR-152-3p, учитывая многочисленные сообщения о стабильности её экспрессии у разных индивидуумов и в разных тканях организма, а также тот факт, что экспрессия miR-152-3p остаётся неизменной в процессе эритроидной дифференцировки [23–25].

Статистические методы исследования / Statistical research methods

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 10 for Windows (StatSoft, США). Количественные переменные, имеющие нормальное распределение по критерию Шапиро-Уилка, представляли в виде «M±σ», где M — среднее арифметическое, σ — стандартное отклонение; прочие количественные переменные представляли в виде «Me [Q1; Q3]», где Me — медиана, Q1 и Q3 — нижний и верхний квартили. Использовали непараметрические методы: критерий Манна-Уитни для сравнения двух независимых переменных, коэф-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		**144** 7-PMV	**144** 7-PMV	**144** 7-PMV	**Cel** 7-PMV			**144** 7-ER	**144** 7-ER	**144** 7-ER	**Cel** 7-ER	
B		**451a** 7-PMV	**451a** 7-PMV	**451a** 7-PMV	**Cel** 7-PMV			**451a** 7-ER	**451a** 7-ER	**451a** 7-ER	**Cel** 7-ER	
C		**451b** 7-PMV	**451b** 7-PMV	**451b** 7-PMV	**Cel** 7-PMV			**451b** 7-ER	**451b** 7-ER	**451b** 7-ER	**Cel** 7-ER	
D		**152** 7-PMV	**152** 7-PMV	**152** 7-PMV				**152** 7-ER	**152** 7-ER	**152** 7-ER		
E		**Sp2** 7-PMV	**Sp2** 7-PMV	**Sp2** 7-PMV				**Sp2** 7-ER	**Sp2** 7-ER	**Sp2** 7-ER		
F		**Sp4** 7-PMV	**Sp4** 7-PMV	**Sp4** 7-PMV				**Sp4** 7-ER	**Sp4** 7-ER	**Sp4** 7-ER		
G		**Sp5** 7-PMV	**Sp5** 7-PMV	**Sp5** 7-PMV				**Sp5** 7-ER	**Sp5** 7-ER	**Sp5** 7-ER		
H		**Sp6** 7-PMV	**Sp6** 7-PMV	**Sp6** 7-PMV				**Sp6** 7-ER	**Sp6** 7-ER	**Sp6** 7-ER		

Рис. 1. Схема размещения реакционных смесей при проведении ПЦР в режиме реального времени в термоциклере Bio-Rad CFX96 для каждого из участников исследования (на примере пациента № 7)

Fig. 1. The reaction mixes layout for the real-time PCR in the Bio-Rad CFX96 thermocycler for each study participant (in the example of patient 7)

Условные обозначения: 144, 451a, 451b — целевые микроРНК; 152 — эндогенная референсная микроРНК; Sp2, Sp4, Sp5, Sp6, Cel — экзогенные малые РНК (технические контроли качества); PMV — внеклеточные микровезикулы плазмы крови; ER — эритроциты.

Notation keys: 144, 451a, 451b — target miRNAs; 152 — endogenous reference miRNA; Sp2, Sp4, Sp5, Sp6, Cel — exogenous small miRNAs (technical quality controls); PMV — plasma-derived extracellular microvesicles; ER — erythrocytes.

фициент корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты / Results

По данным проточной цитометрии, у пациентов с ТЭЛА в анамнезе основной вклад в формирование пула ВМВ вносили тромбоциты и эритроциты; общее количество ВМВ, а также количество тромбоцитарных и эритроцитарных ВМВ (CD9+, CD41+ и CD235a+ события, соответственно) у пациентов было больше, чем в контрольной группе ($p = 0,003$; $p < 0,001$ и $p < 0,001$, соответственно). В то же время, количество ВМВ лейкоцитарного и эндотелиоцитарного происхождения (CD45+ и CD105+ события, соответственно) у пациентов с ТЭЛА в анамнезе было меньше, чем у лиц контрольной группы ($p < 0,001$) (табл. 1).

Таблица 1

Количество микровезикул различного клеточного происхождения в плазме крови у пациентов с ТЭЛА в анамнезе и у лиц контрольной группы

Table 1

The number of plasma-derived microvesicles of different cellular origin in patients with history of pulmonary embolism and in control group

Клеточный маркер	% событий		*p*
	ТЭЛА, ($n = 18$)	Контроль ($n = 8$)	
CD9+	82,9 [69,9; 93,7]	52,8 [42,7; 72,7]	0,003
CD41+	44,8 [28,9; 64,1]	10,1 [7,8; 20,9]	<0,001
CD45+	0,4 [0,3; 0,5]	1,4 [1,1; 2,9]	<0,001
CD235a+	1,3 [0,6; 1,5]	0,3 [0,2; 0,5]	<0,001
CD105+	0,2 [0,1; 0,2]	0,4 [0,3; 1,1]	<0,001

Мы не выявили связей количества ВМВ с полом и возрастом обследованных лиц ($p > 0,050$).

Параметры клинического анализа крови пациентов из группы ТЭЛА не отличались от таковых в группе контроля за исключением более низкого процентного содержания лимфоцитов; у всех участников исследования параметры клинического анализа крови не выходили за пределы референтных интервалов, за исключением содержания базофилов в группе контроля на верхней границе нормы (табл. 2).

При анализе результатов ПЦР в режиме реального времени и построении для них гистограмм мы выявили, что уровни всех исследованных микроРНК имеют логнормальное распределение; поэтому мы выполнили логарифмическое преобразование полученных данных для их приведения к нормальному виду (десятичный логарифм величины имеет нормальное распределение) и последующего применения параметрических методов статистики (t-тест Стьюдента). Значения уровней miR-144-3p, miR-451a, miR-451b и их логарифмов у пациентов с ТЭЛА и в группе контроля приведены в табл. 3.

Уровень **miR-144-3p** у всех обследованных лиц был на несколько порядков выше в эритроцитах, чем в ВМВ, при этом уровень miR-144-3p в группе ТЭЛА был ниже, чем в контроле, как в ВМВ, так и в эритроцитах ($p = 0,030$ и $p = 0,023$, соответственно). Аналогичные результаты были получены для **miR-451a**: её уровень у всех обследованных лиц также был на несколько порядков выше в эритроцитах, чем в ВМВ; мы выявили тенденцию к более низкому уровню miR-451a в группе ТЭЛА по сравнению с контролем, как в ВМВ, так и в эритроцитах ($p = 0,065$ и $p = 0,086$, соответственно).

При этом в подгруппе пациенток с тяжёлыми посттромбоэмболическими осложнениями — развитием ХТЭЛГ наблюдался более низкий уровень miR-144-3p и miR-451a в ВМВ по сравнению с пациентками, у которых после эпизода ТЭЛА развилась ХТЭБ ($p = 0,087$ и $p = 0,031$, соответственно) (рис. 2).

МикроРНК **miR-451b** в ВМВ не детектировалась ни в группе ТЭЛА, ни в группе контроля, а в эритроцитах её уровни оказались крайне низкими, и не различались между исследованными группами ($p > 0,050$).

Не было выявлено различий в уровнях всех проанализированных микроРНК в зависимости от возраста и пола участников исследования ($p > 0,050$).

У пациентов с ТЭЛА в анамнезе уровни miR-144-3p и miR-451a прямо коррелировали друг с другом как в ВМВ, так и в эритроцитах: $R = 0,647$ ($p = 0,004$) и $R = 0,683$ ($p = 0,042$), соответственно.

В общей группе обследованных нами лиц уровни miR-451a и miR-144-3p в ВМВ коррелировали с таковыми в эритроцитах: статистически значимо ($p = 0,002$) и на границе статистической значимости ($p = 0,078$), соответственно (рис. 3).

Уровень miR-451a в ВМВ имел тенденцию к положительной корреляции с количеством эритроцитарных ВМВ (CD235+): $R = 0,472$ ($p = 0,065$), а уровень miR-451a в эритроцитах, напротив, обратно коррелировал с количеством эритроцитарных ВМВ: $R = –0,829$ ($p = 0,011$).

Мы обнаружили прямые корреляции между содержанием miR-144-3p в эритроцитах и концентрацией СРБ в плазме крови, а также между содержанием miR-451a в эритроцитах и средней концентрацией гемоглобина в эритроците (рис. 4).

Мы выявили корреляции между содержанием miR-451a в ВМВ и концентрациями в плазме крови фактора VIII и фибриногена ($R = 0,584$; $p = 0,022$ и $R = –0,489$; $p = 0,047$), величиной международного нормализованного отношения (МНО) ($R = 0,894$; $p = 0,041$).

Таблица 2

Показатели клинического анализа крови у пациентов с ТЭЛА и у лиц контрольной группы

Table 2

Parameters of complete blood count in patients with history of pulmonary embolism and in control group

Показатель	ТЭЛА (n = 18)	Контроль (n = 8)	p	Референтный интервал
Лейкоциты, $\times 10^9$/л	6,2 [5,7; 7,1]	5,6 [5,4; 6,6]	0,209	4,0–9,0
Нейтрофилы, %	60,6 [55,7; 73,7]	52,4 [44,9; 60,4]	0,114	45,0–75,0
Лимфоциты, %	24,1 [16,1; 32,1]	36,4 [30,2; 42,2]	0,040	19,0–37,0
Моноциты, %	7,5 [5,7; 9,2]	8,0 [6,5; 9,1]	0,710	3,0–11,0
Эозинофилы, %	1,6 [0,8; 2,5]	2,2 [1,6; 2,6]	0,318	0,0–5,0
Базофилы, %	0,7 [0,4; 0,9]	1,1 [0,9; 1,2]	0,099	0,0–1,0
Нейтрофилы, $\times 10^9$/л	3,8 [3,2; 6,3]	2,9 [2,8; 3,6]	0,103	2,0–5,8
Лимфоциты, $\times 10^9$/л	1,7 [1,3; 2,5]	2,3 [2,0; 2,8]	0,130	1,2–3,2
Моноциты, $\times 10^9$/л	0,5 [0,4; 0,7]	0,4 [0,4; 0,6]	0,951	0,1–0,7
Эозинофилы, $\times 10^9$/л	0,1 [0,1; 0,1]	0,1 [0,1; 0,2]	0,288	0,0–0,3
Базофилы, $\times 10^9$/л	0,05 [0,02; 0,06]	0,07 [0,05; 0,08]	0,260	0,0–0,1
Эритроциты, $\times 10^{12}$/л	4,9 [4,7; 5,4]	5,1 [4,8; 5,4]	0,619	3,7–5,1
Гемоглобин, г/л	142 [130; 156]	145 [136; 149]	0,901	120–150
Средний объём эритроцита, фл	87,4 [83,2; 90,3]	88,7 [87,4; 89,9]	0,418	80,0–100,0
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	29,1 [25,4; 30,2]	29,2 [28,3; 30,5]	0,534	27,0–34,0
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л	330 [322; 336]	327 [319; 338]	1,000	300–380
Тромбоциты, $\times 10^9$/л	206 [188; 240]	236 [188; 276]	0,383	150–450

Таблица 3

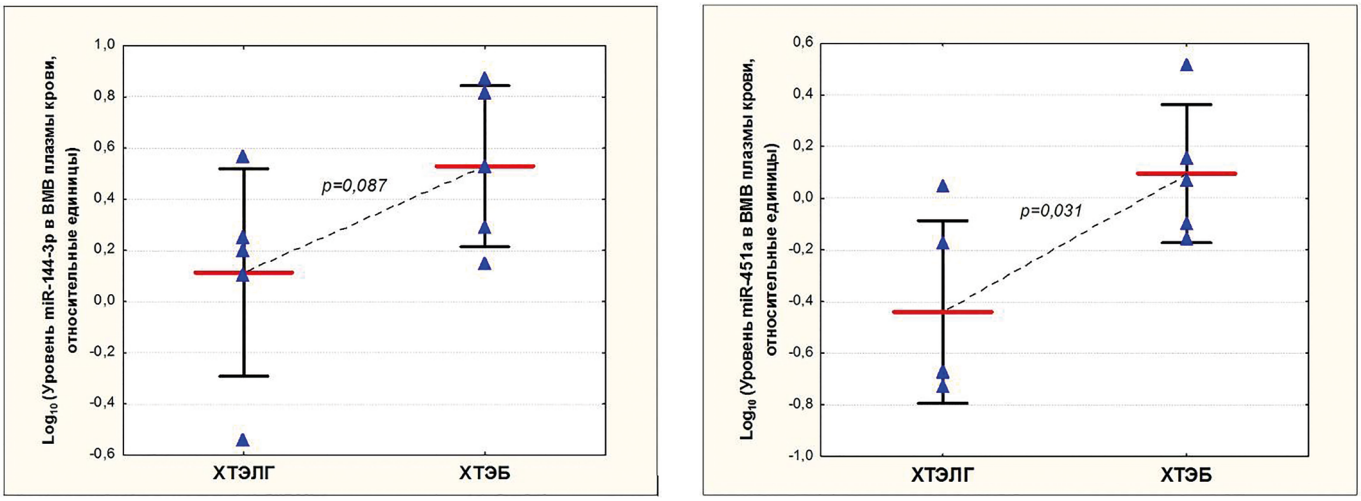
Уровни микроРНК miR-144-3p, miR-451a, miR-451b во внеклеточных микровезикулах плазмы крови и в эритроцитах у пациентов с ТЭЛА в анамнезе и у лиц контрольной группы

Table 3

The levels of miRNAs miR-144-3p, miR-451a, miR-451b in plasma-derived microvesicles and erythrocytes in patients with history of pulmonary embolism and in control group

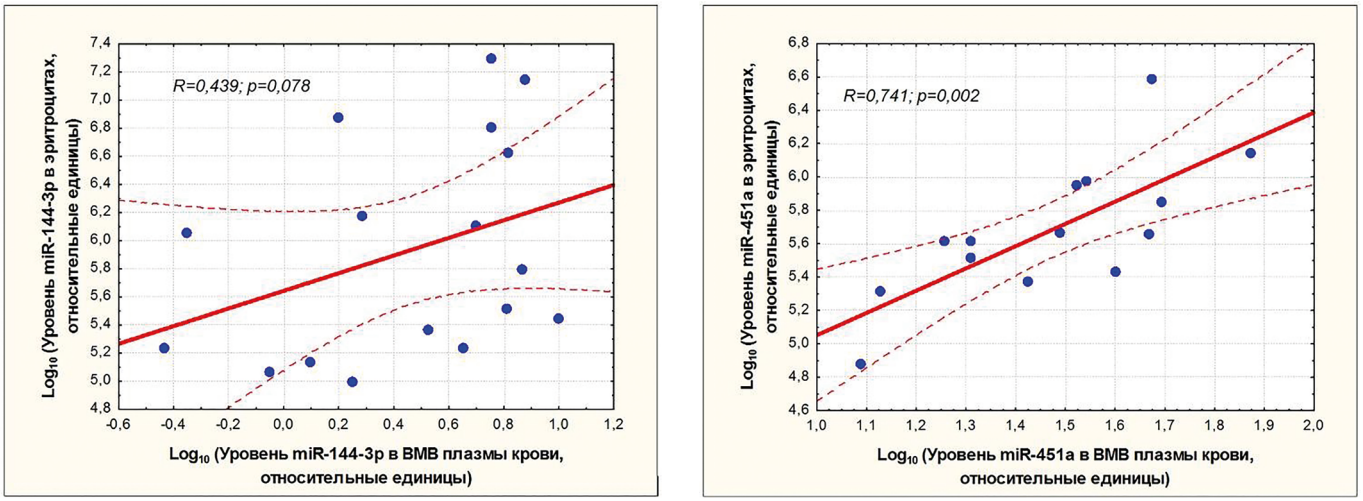
Исследованные микроРНК	Уровень микроРНК, относительные единицы		p
	ТЭЛА	Контроль	
МИКРОЧАСТИЦЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ			
miR-144-3p	0,13 [0,06; 0,32] n = 18	0,47 [0,27; 0,55] n = 8	0,030
Log_{10}(miR-144-3p)	–0,86 ± 0,46 n = 18	–0,45 ± 0,33 n = 8	0,031
miR-451a	937 [421; 1 956] n = 16	1 875 [1 687; 2 406] n = 7	0,065
Log_{10}(miR-451a)	3,03 ± 0,49 n = 16	3,29 ± 0,07 n = 7	0,172
miR-451b	НД	НД	–
Log_{10}(miR-451b)	НД	НД	–
ЭРИТРОЦИТЫ			
miR-144-3p	15 207 [13 594; 116 707] n = 9	218 315 [89 613; 308 311] n = 7	0,055
Log_{10}(miR-144-3p)	4,52 ± 0,71 n = 9	5,31 ± 0,45 n = 7	0,023
miR-451a	413 079 [271 925; 483 032] n = 9	632 432 [317 289; 1 808 998] n = 7	0,142
Log_{10}(miR-451a)	5,57 ± 0,19 n = 9	5,84 ± 0,38 n = 7	0,086
miR-451b	0,0012 [0,0006; 0,0023] n = 6	0,0016 [0,0010; 0,0023] n = 6	0,937
Log_{10}(miR-451b)	–2,78 ± 0,91 n = 6	–2,90 ± 0,67 n = 6	0,804

Примечание: НД — экспрессия микроРНК не детектируется.
Note: НД expression of microRNAs is not detected.



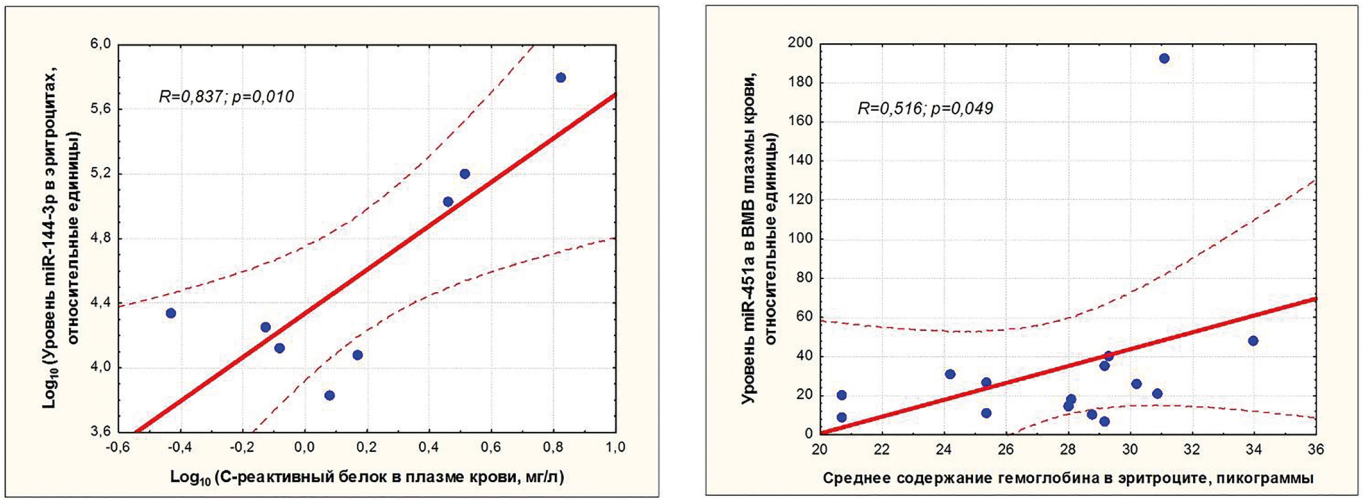
а *б*

Рис. 2. Уровни микроРНК miR-144-3p (*а*) и miR-451a (*б*) во внеклеточных микровезикулах (BMB) плазмы крови у пациенток с различными посттромбоэмболическими осложнениями: хроническая тромбоэмболическая лёгочная гипертензия (ХТЭЛГ) и хроническая тромбоэмболическая болезнь (ХТЭБ)
Fig. 2. The levels of miRNAs miR-144-3p (*a*) and miR-451a (*б*) in plasma-derived microvesicles in females with different post-thromboembolic complications: chronic thromboembolic disease and chronic thromboembolic pulmonary hypertension



а *б*

Рис. 3. Корреляции уровней микроРНК miR-144-3p и miR-451a во внеклеточных микровезикулах плазмы крови (*а*) и эритроцитах (*б*) у пациентов с ТЭЛА в анамнезе
Fig. 3. Correlations between the levels of miRNAs miR-144-3p (*a*) and miR-451a (*б*) in plasma-derived microvesicles and in erythrocytes in patients with history of pulmonary embolism



а *б*

Рис. 4. Корреляции уровней исследованных микроРНК у пациентов с ТЭЛА в анамнезе: *а* — miR-144-3p в эритроцитах и концентрация С-реактивного белка (СРБ) в плазме крови; *б* — miR-451a во внеклеточных микровезикулах плазмы крови и средней концентрацией гемоглобина в эритроците

Fig. 4. Correlations between the levels of investigated miRNAs in patients with history of pulmonary embolism: *a* — miR-144-3p in erythrocytes and C-reactive protein; *б* — miR-451a in plasma-derived microvesicles and mean corpuscular hemoglobin concentration

Обсуждение / Discussion

В данном исследовании впервые были проанализированы уровни трёх микроРНК, входящих в кластер, регулирующий эритроцитарный гемопоэз (miR-144-3p, miR-451a, miR-451b), у пациентов с отягощенным тромбоэмболическим анамнезом (все пациенты перенесли ТЭЛА), раздельно в двух фракциях периферической крови: клеточные элементы (эритроциты) и бесклеточный субстрат (ВМВ плазмы).

С помощью проточной цитометрии мы выявили, что в группе ТЭЛА количество ВМВ было больше, чем в контроле, несмотря на адекватно подобранные дозы антикоагулянтов, что говорит об активации клеток крови у данных пациентов и может объяснить развитие у них посттромбоэмболических осложнений даже на фоне терапии. При этом интересно отметить увеличение содержания ВМВ, отделившихся от эритроцитов, у пациентов по сравнению с лицами контрольной группы.

Эритроцитарные ВМВ активно исследуются у пациентов с гемоглобинопатиями различного генеза [26], обсуждаются их про- и антикоагулянтные свойства [27, 28]. Полученные нами результаты цитометрии подтверждают гипотезу о вкладе эритроцитарных ВМВ и нарушений эритроцитарного гемопоэза в развитие посттромбоэмболических осложнений. Следовательно, наш выбор в качестве объектов исследования микроРНК, входящих в кластер, регулирующий эритроцитарный гемопоэз, а именно miR-144, miR-451a и miR-451b, целесообразен. Выявленные нами корреляции уровней miR-144-3p и miR-451a в ВМВ и эритроцитах подтверждают эритроцитарное происхождение пула данных микроРНК в ВМВ. Кроме того, обнаруженные нами связи количества эритроцитарных ВМВ с уровнями miR-451a в ВМВ (тенденция к прямой корреляции) и в эритроцитах (обратная корреляция) также согласуются с гипотезой, что miR-451a циркулирует в плазме крови в составе ВМВ, отделившихся от эритроцитов.

Детектированная нами корреляция между уровнями miR-144-3p и miR-451a логична, так как обе микроРНК принадлежат к одному кластеру и являются производными одного полицистронного первичного транскрипта. *Papapetrou EP и соавт.* в своём исследовании впервые продемонстрировали функциональную кооперацию кластеризованных микроРНК в кроветворной системе за счёт их координированной экспрессии [29].

В данной работе мы оценили концентрации в плазме крови компонентов системы гемостаза (фактор VIII, фактор Виллебранда, фибриноген) и провоспалительного маркера (СРБ), а также вычислили МНО. Выявленные нами прямые корреляции уровня miR-451a в ВМВ с величиной МНО, а также с концентрациями фактора VIII и фибриногена подтверждают гипотезу о том, что данная микроРНК не только участвует в регуляции эритропоэза, но и влияет на систему свёртывания крови.

Показано, что кластер miR-144/451 защищает эритроциты в период негативных воздействий, например, во время окислительного стресса или развития

анемических состояний [30, 31]. Соответственно, выявленные нами корреляции между содержанием miR-144-3p в эритроцитах и уровнем СРБ, а также между содержанием miR-451a в эритроцитах и средней концентрацией гемоглобина в эритроците логичны.

У обследованных нами пациентов с ТЭЛА все показатели клинического анализа крови не выходили за границы референтных интервалов, за исключением содержания базофилов в группе контроля на верхней границе нормы. Следует отметить, что все пациенты помимо антикоагулянтной терапии (варфарин или ривароксабан) также получали необходимое медикаментозное лечение сопутствующих заболеваний; таким образом, возможные нарушения обмена железа и анемии в данной выборке были купированы.

МикроРНК miR-451a может регулировать IL-6R и далее сигнальный путь JAK/STAT/TF, влияя на ангиогенез, воспалительный ответ и гиперкоагуляцию [32]. Уменьшение уровня miR-451a рассматривается как предиктор развития ТЭЛА после оперативных вмешательств у онкологических пациентов [33]. Учитывая, что проанализированные нами пациенты в анамнезе имели эпизод ТЭЛА, уменьшение уровня микроРНК miR-451a у этой категории больных согласуется с литературными данными.

В последние годы малые некодирующие РНК, прежде всего микроРНК, привлекают к себе повышенное внимание мирового научного сообщества и являются предметом активного изучения вследствие важности регуляторной роли этих молекул во всех физиологических и патологических процессах в организме человека, в том числе в патогенезе нарушений работы свёртывающей системы крови. Однако, несмотря на неуклонно возрастающее с каждым годом количество исследований на тему регуляции гемостаза с помощью микроРНК, до сих пор сохраняется существенный пробел в знаниях о вкладе отдельных микроРНК в патогенез ВТЭ [34]. Эта ситуация обусловлена наличием целого ряда методологических и технологических трудностей, с которыми сопряжены исследования коротких некодирующих молекул РНК. Перечислим важнейшие из них.

Во-первых, структурная особенность микроРНК, а именно их малая длина (которая, как правило, не превышает 25 нуклеотидов), затрудняет применение к ним классического метода анализа экспрессии с помощью флуоресцентных TaqMan-зондов; вместо него используются более сложные модификации данного метода, включающие в себя этап обратной транскрипции с элонгацией исследуемых молекул за счёт петлевых (англ. *stem-loop*) праймеров или полиаденилирования (синтеза полиА-хвостов) для создания площадки с размером, достаточным для присоединения TaqMan-зонда [35].

Во-вторых, вследствие относительно небольшого количества нуклеотидов в составе молекул микроРНК многие малые РНК отличаются друг от друга всего одним или двумя нуклеотидами, что затрудняет детекцию индивидуальных микроРНК и предъявляет высокие требования к специфичности реакций [36].

В-третьих, необходимо учитывать многоэтапность биогенеза микроРНК и проектировать тест-системы таким образом, чтобы с их помощью можно было детектировать раздельно зрелые молекулы (miR) их предшественники (pre-miR); следует отметить, что в большинстве случаев наиболее информативным оказывается анализ зрелых форм микроРНК [37].

В-четвёртых, для выделения микроРНК из биологического материала непригодны стандартные наборы реагентов для выделения общей РНК методом твёрдофазной эстракции; необходимы специальные наборы с колонками, способными сорбировать фракцию малых РНК [38].

В-пятых, важным дискуссионным вопросом является выбор референсного гена для расчёта относительной нормализованной экспрессии. Использование одновременно нескольких референсных генов помогает повысить точность исследования, однако существенно увеличивает стоимость и трудоёмкость работы [39].

В-шестых, вследствие того, что каждая микроРНК способна регулировать активность не одной, а многих РНК, трудность представляет выявление генов-мишеней для микроРНК; в ряде случаев эту задачу можно выполнить только с помощью биоинформатического подхода [40].

В данном исследовании мы использовали все имеющиеся в нашем распоряжении методологические и технологические возможности для преодоления вышеперечисленных трудностей и минимизации погрешностей анализа. В частности, мы уделили повышенное внимание эффективному разделению эритроцитов и плазмы на этапе пробоподготовки. Для обеспечения чистоты образца эритроцитов была использована модификация протокола центрифугирования крови, позволяющая получать образец эритроцитов из нижней части их фракции. Для обеспечения чистоты образца плазмы была выполнена её фильтрация через шприцевую насадку с порами диаметром 0,8 мкм, которая удаляет из плазмы примеси клеток и клеточных фрагментов (дебриса) при минимальном влиянии на другие компоненты плазмы, включая ВМВ. Для мониторинга качества различных этапов работы (выделение РНК, ОТ, ПЦР в режиме реального времени) были использованы технические контроли — синтетические аналоги микроРНК.

С учётом полученных нами результатов, представляется целесообразным проведение дальнейших исследований ВМВ и микроРНК у лиц с ВТЭ и посттромбоэмболическими осложнениями. Ограничениями нашей работы являются относительно небольшой размер проанализированных выборок, небольшое количество исследованных микроРНК и использование единственного референсного гена для расчёта

относительной нормализованной экспрессии. Мы полагаем, что оценка уровней микроРНК в выборках увеличенного размера со стратификацией по полу и возрасту, использование одновременно нескольких референсных генов, а также оценка уровней ряда других микроРНК, функционально связанных с кластером miR-144/451, позволит получить более полную и точную картину связей между анализируемыми переменными и выявить дополнительные закономерности патогенеза. Увеличить информативность анализа также можно за счёт применения современных высокотехнологичных методов молекулярной генетики, в частности, секвенирования нового поколения (англ. Next generation sequencing, NGS) [41]. Анализ современных литературных данных позволяет предположить, что будущие исследования в этой области будут развиваться в двух стратегических направлениях: выявление микроРНК, способных служить диагностическими и прогностическими биомаркерами определённых патологий системы гемостаза, и разработка таргетной фармакотерапии тромбозов, эмболий и их осложнений с использованием определённых микроРНК в качестве специфичных мишеней для лекарственных средств [42].

В целом, результаты нашего исследования дополняют ранее полученные другими авторами сведения о вкладе регуляторных функций микроРНК miR-144-3p, miR-451a и miR-451b в поддержание гомеостаза свёртывающей системы крови.

Заключение / Conclusion

1. Полученные в нашем исследовании результаты согласуются с гипотезой о том, что кластер микро РНКmiR-144/451 не только участвует в регуляции эритропоэза, но и влияет на систему свёртывания крови и риск развития тромбоэмболий и их осложнений.

2. В обследованных нами выборках микроРНК miR-144-3p и miR-451a проявили себя как протективные факторы в отношении развития ТЭЛА и степени тяжести посттромбоэмболических осложнений.

3. Целесообразны дальнейшие исследования уровней микроРНК miR-144-3p и miR-451a во внеклеточных микровезикулах плазмы крови и в эритроцитах на увеличенных выборках пациентов с применением высокотехнологичных аналитических методов молекулярной генетики для уточнения вопроса о степени информативности указанных микроРНК как биомаркеров или/и их перспективности как мишеней для таргетной терапии тромбоэмболий.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONALINFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors state that there is no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке ГЗ №121031100305-9 «Разработка системы поддержки принятия решений прогноза развития отдаленных исходов венозных тромбоэмболических осложнений».

Financing. The study was supported by state assignment No. 121031100305-9 «Development of a decision support system for predicting the development of long-term outcomes of venous thromboembolic complications».

Участие авторов. *Сироткина О. В.* — разработка концепции и дизайна исследования, написание текста, статистическая обработка результатов; *Улитина А. С.* — выполнение лабораторных исследований, интерпретация результатов, написание текста; *Жиленкова Ю. И.* — сбор образцов, выполнение лабораторных исследований; *Золотова Е. А.* — сбор образцов, преаналитическая обработка образцов, сбор клинических данных; *Симакова М. А.* — анализ данных литературы, написание текста; *Моисеева О. М.* — отбор пациентов, сбор анамнеза и клинических данных; *Вавилова Т. В.* — финальное редактирование рукописи, перевод аннотации на английский язык.

Participation of authors. *Sirotkina OV* — study conception and design, writing the manuscript, statistical processing of results; *Ulitina AS* — laboratory testing, results interpretation, writing the manuscript; *Zhilenkova YuI* — sample collection, laboratory testing; *Zolotova EA* — sample collection, preanalytical processing of samples, clinical data collection; *Simakova MA* — literature data analysis, writing the manuscript; *Moiseeva OM* — selection of patients, anamnesis and clinical data collection; *Vavilova TV* — final approval of the manuscript, abstract's translation into English.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Сироткина Ольга Васильевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: olga_sirotkina@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0003-3594-1647
SPIN-код: 1780-5490
д. б. н., профессор кафедры лабораторной медицины и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация; с. н. с. отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация; в. н. с. лаборатории молекулярной генетики человека, НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ, Гатчина, Российская Федерация

Olga V. Sirotkina
Corresponding author
e-mail: olga_sirotkina@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0003-3594-1647
SPIN code: 1780-5490
Dr. Sci. (Med.), Professor of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher of the Department of Molecular, Genetic, and Nanobiological Technologies, FSBEI HE I.P. Pavlov SPbSMU MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation; Leading Researcher of the Laboratory of Human Molecular Genetics, NRC “Kurchatov Institute” — PNPI, Gatchina, Russian Federation

Улитина Анна Сергеевна
e-mail: anna.s.ulitina@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0003-3011-1812
SPIN-код: 3895-7799
к. м. н., заведующая учебно-научной лабораторией кафедры лабораторной медицины и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация; с. н. с отдела молекулярно-генетических и нанобиологических технологий, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Anna S. Ulitina
e-mail: anna.s.ulitina@yandex.ru
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0003-3011-1812
SPIN code: 3895-7799
PhD, Cand. Sci. (Med), Head of the Educational and Scientific Laboratory of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher of the Department of Molecular, Genetic, and Nanobiological Technologies FSBEI HE I.P. Pavlov SPbSMU MOH Russia, St. Petersburg, Russian Federation

Жиленкова Юлия Исмаиловна
e-mail: yuliaismailovna@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0003-2756-0334
SPIN-код: 4602-5081
к. м. н., доцент кафедры лабораторной медицины и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Yulia I. Zhilenkova
e-mail: yuliaismailovna@mail.ru
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0003-2756-0334
SPIN code: 4602-5081
PhD, Cand. Sci. (Med), Assistant Professor of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Золотова Екатерина Алексеевна
e-mail: katerinazolotova1@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org// 0000-0001-7399-2811
SPIN-код: 5606-0750
аспирант кафедры лабораторной медицины и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Ekaterina A. Zolotova
e-mail: katerinazolotova1@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org// 0000-0001-7399-2811
SPIN code: 5606-0750
Postgraduate Student of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Симакова Мария Александровна
e-mail: maria.simakova@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org//000-0001-9478-1941
SPIN-код: 3841-6593
к. м. н., с. н. с. НИЛ кардиомиопатий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Maria A. Simakova
e-mail: maria.simakova@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0001-9478-1941
SPIN code: 3841-6593
PhD, Cand. Sci. (Med), Senior Researcher of Laboratory of Cardiomyopathies, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Моисеева Ольга Михайловна
e-mail: moiseeva.cardio@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0002-7817-3847
SPIN-код: 1492-3900
д. м. н., заведующая НИО некоронарогенных заболеваний сердца, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Olga M. Moiseeva
e-mail: moiseeva.cardio@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0002-7817-3847
SPIN code: 1492-3900
Dr. Sci. (Med.), Head of Department of Non-coronarogenic Heart Disease, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Вавилова Татьяна Владимировна
e-mail: vtv.lab.spb@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0001-8537-3639
SPIN-код: 9003-6455
д. м. н., профессор, заведующий кафедрой лабораторной медицины и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Tatyana V. Vavilova
e-mail: vtv.lab.spb@gmail.com
ORCID ID: https://orcid.org//0000-0001-8537-3639
SPIN code: 9003-6455
Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Список литературы / References

1. Pastori D, Cormaci VM, Marucci S, et al. A Comprehensive Review of Risk Factors for Venous Thromboembolism: From Epidemiology to Pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 5;24(4):3169. DOI: 10.3390/ijms24043169.

2. Валиева З.С., Мартынюк Т.В. Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия: от патогенеза к выбору тактики лечения. *Терапевтический архив.* 2022;94(7):791–796. [Valieva ZS, Martynyuk TV. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from pathogenesis to the choice of treatment tactics. *Terapevticheskii Arkhiv (Ter. Arkh.).* 2022;94(7):791–796. (In Russ.)]. DOI: 10.26442/00403660.2022.07.201741.

3. Антонова О.А., Якушкин В.В., Мазуров А.В. Коагуляционная активность мембранных микрочастиц. *Биологические мембраны.* 2019;36(3):155–175. [Antonova OA, Yakushkin VV, Mazurov AV. Coagulation activity of membrane microparticles. *Biologicheskiye membrany = Biological membranes.* 2019;36(3):155–175. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S0233475519030034.

4. Золотова Е.А., Симакова М.А., Жиленкова Ю.И. и др. Роль микро-РНК в патогенезе венозных тромбоэмболических осложнений. *Российский журнал персонализированной медицины.* 2022;2(1):43–50. [Zolotova EA, Simakova MA, Zhilenkova YuI et al. The role of miRNAs in the pathogenesis of venous thromboembolic complications. *Russian Journal for Personalized Medicine.* 2022;2(1):43–50. (In Russ.)]. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-1-43-50.

5. Alberro A, Iparraguirre L, Fernandes A, Otaegui D. Extracellular vesicles in blood: sources, effects, and applications. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8163. DOI: 10.3390/ijms22158163.

6. He Y, Wucorresponding Q. The effect of extracellular vesicles on thrombosis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2022 Nov 28:1–16. DOI: 10.1007/s12265-022-10342-w.

7. Thangaraju K, Neerukonda SN, Katneni U, Buehler PW. Extracellular vesicles from red blood cells and their evolving roles in health, coagulopathy and therapy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(1):153. DOI: 10.3390/ijms22010153.

8. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860–921. DOI: 10.1038/35057062.

9. Xue Y, Chen R, Qu L, Cao X. Noncoding RNA: from dark matter to bright star. *Sci China Life Sci.* 2020;63(4):463–468. DOI: 10.1007/s11427-020-1676-5.

10. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(7):3353–3364. DOI: 10.1093/nar/gkz097.

11. Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):132. DOI: 10.3390/ijms21010132.

12. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5451–5465. DOI: 10.1002/jcp.27486.

13. Zhang X, Wang X, Zhu H, et al. Synergistic effects of the GATA-4-mediated miR-144/451 cluster in protection against simulated ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(5):841–50. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.08.007.

14. Rasmussen KD, Simmini S, Abreu-Goodger C, et al. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J Exp Med.* 2010 Jul 5;207(7):1351–8. DOI: 10.1084/jem.20100458.

15. Wang X, Hong Y, Wu L et al. Deletion of microRNA-144/451 cluster aggravated brain injury in intracerebral hemorrhage mice by targeting 14-3-3ζ. *Front Neurol.* 2021;11:551411. DOI: 10.3389/fneur.2020.551411.

16. He Q, Wang F, Honda T, et al. Ablation of miR-144 increases vimentin expression and atherosclerotic plaque formation. *Sci Rep.* 2020;10(1):6127. DOI: 10.1038/s41598-020-63335-7.

17. Wang X, Zhu H, Zhang X, et al. Loss of the miR-144/451 cluster impairs ischaemic preconditioning-mediated cardioprotection by targeting Rac-1. *Cardiovasc Res.* 2012;94(2):379–390. DOI: 10.1093/cvr/cvs096.

18. Tao L, Yang L, Huang X, et al. Reconstruction and aof the lncRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA reveal functional lncRNAs in dilated cardiomyopathy. *Front Genet.* 2019;10:1149. DOI: 10.3389/fgene.2019.01149.

19. Turczyńska KM, Bhattachariya A, Säll J, et al. Stretch-sensitive down-regulation of the miR-144/451 cluster in vascular smooth muscle and its role in AMP-activated protein kinase signaling. *PLoS One.* 2013;8(5):e65135. DOI: 10.1371/journal.pone.0065135.

20. Сироткина О.В., Ермаков А.И., Гайковая Л.Б. и др. Микрочастицы клеток крови у больных COVID-19 как маркер активации системы гемостаза. *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2020;(4):35–40. [Sirotkina OV, Ermakov AI, Gaykovaya LB, et al. Microparticles of blood cells in patients with COVID-19 as a marker of hemostasis activation. *Tromboz, gemostazireologija = Thrombosis, hemostasis and rheology.* 2020;(4):35–40. (In Russ.)]. DOI: 10.25555/THR.2020.4.0943.

21. Kabanova S, Kleinbongard P, Volkmer J, et al. Gene expression analysis of human red blood cells. *Int J Med Sci.* 2009;6(4):156–159. DOI: 10.7150/ijms.6.156.

22. Groen K, Maltby VE, Lea RA, et al. Erythrocyte microRNA sequencing reveals differential expression in relapsing-remitting multiple sclerosis. *BMC Med Genomics.* 2018;11(1):48. DOI: 10.1186/s12920-018-0365-7.

23. Chen SY, Wang Y, Telen MJ, Chi JT. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One.* 2008;3(6):e2360. DOI: 10.1371/journal.pone.0002360.

24. Lamba V, Ghodke-Puranik Y, Guan W, Lamba JK. Identification of suitable reference genes for hepatic microRNA quantitation. *BMC Res Notes.* 2014;7:129. DOI: 10.1186/1756-0500-7-129.

25. Shen J, Wang Q, Gurvich I, et al. Evaluating normalization approaches for the better identification of aberrant microRNAs associated with hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Res.* 2016;2:305–315. DOI: 10.20517/2394-5079.2016.28.

26. Wagner GM, Chiu DT, Yee MC, Lubin BH. Red cell vesiculation – a common membrane physiologic event. *J Lab Clin Med.* 1986;108(4):315–24.

27. Van Der Meijden PE, Van Schilfgaarde M, Van Oerle R, et al. Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost*. 2012;10(7):1355–62. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04758.x.

28. Koshiar RL, Somajo S, Norström E, Dahlbäck B. Erythrocyte-derived microparticles supporting activated protein C-mediated regulation of blood coagulation. *PLoS One*. 2014;9(8):e104200. DOI: 10.1371/journal.pone.0104200.

29. Papapetrou EP, Korkola JE, Sadelain M. A genetic strategy for single and combinatorial analysis of miRNA function in mammalian hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(2):287–96. DOI: 10.1002/stem.257.

30. Fang X, Shen F, Lechauve C, et al. miR-144/451 represses the LKB1/AMPK/mTOR pathway to promote red cell precursor survival during recovery from acute anemia. *Haematologica*. 2018 Mar;103(3):406–416. DOI: 10.3324/haematol.2017.177394.

31. Yu D, dos Santos CO, Zhao G, et al. miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3zeta. *Genes Dev*. 2010;24(15):1620–1633. DOI: 10.1101/gad.1942110.

32. Feng L, Yang X, Liang S, et al. Silica nanoparticles trigger the vascular endothelial dysfunction and prethrombotic state via miR-451 directly regulating the IL6R signaling pathway. *Part Fibre Toxicol*. 2019;16(1):16. DOI: 10.1186/s12989-019-0300-x.

33. Oto J, Plana E, Solmoirago MJ, et al. microRNAs and markers of neutrophil activation as predictors of early incidental post-surgical pulmonary embolism in patients with intracranial tumors. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1536. DOI: 10.3390/cancers12061536.

34. Morelli VM, Brækkan SK, Hansen JB. Role of microRNAs in venous thromboembolism. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2602. DOI: 10.3390/ijms21072602.

35. He F, Ni N, Wang H et al. OUHP: an optimized universal hairpin primer system for cost-effective and high-throughput RT-qPCR-based quantification of microRNA (miRNA) expression. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(4):e22. DOI: 10.1093/nar/gkab1153.

36. Forero DA, González-Giraldo Y, Castro-Vega LJ, Barreto GE. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *Biotechniques*. 2019;67(4):192–199. DOI: 10.2144/btn-2019-0065.

37. Busk PK. A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:29. DOI: 10.1186/1471-2105-15-29.

38. D'Agata R, Spoto G. Advanced methods for microRNA biosensing: a problem-solving perspective. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411(19):4425–4444. DOI: 10.1007/s00216-019-01621-8.

39. Zárybnický T, Matoušková P, Ambrož M, et al. The selection and validation of reference genes for mRNA and microRNA expression studies in human liver slices using RT-qPCR. *Genes (Basel)*. 2019;10(10):763. DOI: 10.3390/genes10100763.

40. Tafrihi M, Hasheminasab E. MiRNAs: biology, biogenesis, their web-based tools, and databases. *Microrna*. 2019;8(1):4–27. DOI: 10.2174/2211536607666180827111633.

41. Felekkis K, Papaneophytou C. Challenges in using circulating micro-RNAs as biomarkers for cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):561. DOI: 10.3390/ijms21020561.

42. Rogula S, Pomirski B, Czyżak N, et al. Biomarker-based approach to determine etiology and severity of pulmonary hypertension: Focus on microRNA. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:980718. DOI: 10.3389/fcvm.2022.980718.