

ФЕДОРОВ А. В.¹, МИНАСЯН С. М.^{1,2},
КОСТАРЕВА А. А.^{1,2}, КАБАНОВ В. О.¹,
ГАЛАГУДЗА М. М.^{1,2}, КУРАПЕЕВ Д. И.¹

Повышение уровня микроРНК-208а в цельной крови после ишемии-реперфузии миокарда у крыс

¹ Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. акад. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
e-mail: galagoudza@mail.ru

Реферат

МикроРНК представляют собой разновидность нетранслируемых регуляторных РНК, участвующих в модуляции многих клеточных процессов посредством подавления трансляции и/или направленной деградации специфических матричных РНК. Тканеспецифический профиль экспрессии микроРНК, а также существование механизмов выхода этих молекул из клеток в физиологические жидкости позволяют рассматривать микроРНК в качестве перспективных биомаркеров различных патологических процессов, в частности, ишемического повреждения миокарда. Известно, что микроРНК-208а экспрессируется только в кардиомиоцитах и, следовательно, может служить потенциальным маркером повреждения миокарда. В настоящей работе с помощью ПЦР в реальном времени измеряли уровни микроРНК-208а в цельной крови после 30-минутной ишемии и 90-минутной реперфузии миокарда у крыс. Установлено, что содержание микроРНК-208а в цельной крови животных с ишемией-реперфузией миокарда в среднем в 20 раз выше такового в крови ложнооперированных животных. Эти данные свидетельствуют о том, что циркулирующая микроРНК-208а может служить высокоспецифичным биомаркером ишемического повреждения миокарда.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия миокарда, микроРНК-208а, биомаркер, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

Fedorov A. V.¹, Minasyan S. M.^{1,2},
Kostareva A. A.^{1,2}, Galagudza M. M.^{1,2},
Kurapeev D. I.¹

Circulating microRNA-208a level is elevated after myocardial ischemia-reperfusion in the rat

¹ V. A. Almazov Federal Center of Heart, Blood and Endocrinology, Saint-Petersburg

² I. P. Pavlov State Medical University
e-mail: galagoudza@mail.ru

Abstract

MicroRNA is usually defined as a class of small untranslated RNAs involved in the modulation of different processes within the cell by means of specific repression of mRNA translation and/or acceleration of its degradation. Tissue-specific profile of microRNA expression as well as existence of mechanisms of microRNA transport from the cells into the biological fluids might be considered as important prerequisites for the use of microRNA as a disease biomarker, including cardiac ischemia-reperfusion injury. It is known that microRNA-208a is expressed uniquely in cardiac myocytes and, thus, might serve as a promising biomarker of cardiac injury. In the present study, the levels of circulating microRNA-208a were determined with real-time PCR after 30-min regional myocardial ischemia followed by 90-min reperfusion in the rat. It was shown that microRNA-208a level was approximately 20-fold higher in the animals subjected to myocardial ischemia-reperfusion as compared to sham-treated animals. These data lend support for the idea that circulating microRNA-208a may play a role of highly specific biomarker for cardiac ischemic injury.

Keywords: myocardial ischemia-reperfusion, microRNA-208a, biomarker, real-time polymerase chain reaction.

Введение

Численное значение индекса жизнеспособного миокарда при экстренной реваскуляризации по поводу острого коронарного синдрома (ОКС) обратно пропорционально времени, проходящему от момента возникновения симптомов до выполнения чрескожного коронарного вмешательства. Одним из факторов, лимитирующих дальнейшее улучшение результативности лечения пациентов с ОКС, является недостаточная чувствительность и специфичность биомаркеров, используемых для лабораторной диагностики ишемического повреждения миокарда. В настоящее время в клинической практике в качестве основных маркеров повреждения миокарда (МПМ) используются сердечные тропонины I и T [25]. Согласно полученным нами данным, наиболее сильная корреляционная связь наблюдается между размером экспериментального инфаркта миокарда и уровнем тропонина I [1]. В то же время одним из недостатков тропонинов в качестве МПМ является низкая чувствительность в первые 6 часов после наступления ОКС [24]. Это связано с тем, что массивное высвобождение тропонинов из структурного, т. е. входящего в состав миофибрилл, пула в кровоток происходит только после наступления необратимого повреждения кардиомиоцитов, сопровождающегося лизисом миофибрилл и разрывом сарколеммы. Ранние стадии ишемического повреждения миокарда также могут сопровождаться умеренным повышением уровня тропонинов в сыворотке крови за счет их высвобождения из цитозольного пула, однако детекция столь низких концентраций тропонинов с помощью высокочувствительного тропонинового теста не является рутинной лабораторной технологией [24] и, кроме того, может приводить к ложноположительному результату [5]. Таким образом, усовершенствование методов лабораторной диагностики ишемического повреждения миокарда требует выявления новых специфичных биомаркеров, обладающих высокой чувствительностью, в том числе и к незначительным повреждениям, возникающим уже в первые часы после начала ишемии.

Потенциальными биомаркерами функционального состояния различных клеток могут являться микроРНК — короткие нетранслируемые РНК, участвующие в регуляции экспрессии генов [6]. МикроРНК обладают несколькими свойствами, позволяющими рассматривать их в качестве перспективных биомаркеров: тканеспецифичный паттерн экспрессии, быстрое изменение уровня экспрессии в ответ на незначительное изменение состояния клеток, малая вариабельность в популяции, относительно высокая устойчивость внеклеточных циркулирующих микроРНК к деградации [10, 19]. Повреждение клетки может сопровождаться быстрым попаданием специфичных микроРНК в кровоток как за счет их пассивного выхода из погибших клеток, так и за счет активации секреции микроРНК в составе мембранных микрочастиц поврежденными, но еще сохранившими жизнеспособность клетками [10].

Исследования последних лет подтверждают возможность использования микроРНК в качестве МПМ,

в том числе при ишемии-реперфузии. Известно, что в плазме крови пациентов с инфарктом миокарда отмечается повышение уровней микроРНК-1, 133a и 499 [12, 16]. Следует отметить, что эти микроРНК экспрессируются как в миокарде, так и в скелетной мышце [9], что ограничивает перспективы их применения для диагностики степени выраженности интраоперационной ишемии миокарда в кардиохирургии. В связи с этим особое внимание привлекает микроРНК-208a, которая кодируется в интроне гена α -миозина и экспрессируется исключительно в кардиомиоцитах [9]. Уровень циркулирующей микроРНК-208a повышается в короткие сроки после повреждения миокарда крыс изопреналином [15], а также на модели повреждения миокарда, вызванного постоянной окклюзией коронарной артерии у крыс и мышей [12, 26]. Детальное изучение динамики уровня микроРНК-208a в плазме крови при использовании других моделей повреждения миокарда позволит приблизиться к созданию диагностических тест-систем на основе анализа микроРНК для высокочувствительной диагностики ишемического повреждения миокарда.

В настоящей работе мы исследовали уровни микроРНК-208a в цельной крови крыс на модели регионарной ишемии-реперфузии миокарда *in vivo*. Данный протокол в большей степени, чем ранее описанные в литературе, соответствует клиническим ситуациям, связанным с экстренной реваскуляризацией миокарда у пациентов с ОКС и с выполнением операций на сердце в условиях экстракорпорального кровообращения.

Материал и методы исследования

Моделирование ишемии-реперфузии миокарда in vivo

Опыты проведены на крысах линии Wistar массой 250–350 г, наркотизированных хлоралгидратом в дозе 460 мг/кг, при искусственной вентиляции легких через трахеостому (частота дыхания — 60/мин, дыхательный объем — 3 мл/100 г массы тела).

Доступ к сердцу производили путем торакотомии в четвертом межреберье слева. Тупо вскрывали перикард, определяли левую коронарную артерию (ЛКА), под которую с помощью атравматической иглы (6-0) подводили тонкую полипропиленовую лигатуру. Протокол эксперимента включал две группы:

1) ложноперитонизированные животные (n=3) — под ЛКА подводили лигатуру, но не индуцировали ишемию с последующей реперфузией;

2) ишемия-реперфузия (n=3) — выполняли 30-минутную ишемию с последующей 90-минутной реперфузией. Через 1,5 часа после подведения лигатуры в группе ложноперитонизированных животных или после завершения периода реперфузии у животных брали кровь из сонной артерии для анализа уровня микроРНК-208a.

В группе с ишемией-реперфузией миокарда после взятия крови проводили оценку размера зоны ишемии с помощью окрашивания сердца синим Эванса. После завершения реперфузии вокруг ЛКА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

вновь затягивалась лигатура и внутривенно вводилось 0,5 мл 5 %-го раствора синего Эванса. После визуализации границы между кровоснабжаемыми и ишемизированными отделами сердца быстро удаляли и изготавливали четыре поперечных среза одинаковой толщины (2,5 мм). Изображения базальных поверхностей четырех срезов фотографировали цифровой камерой Olympus 2020 для последующего определения площади анатомической зоны риска (эванс-негативные участки) и неишемизированного миокарда (эванс-позитивные участки). Расчет площадей осуществляли с помощью программы Adobe Photoshop CS3. Общий объем зоны риска для данного сердца вычисляли путем умножения площади эванс-негативного участка каждого среза на его толщину и суммирования полученных по четырем срезам значений.

Сбор и хранение образцов цельной крови

Препараты цельной крови из сонной артерии собирали в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой, немедленно смешивали с равным объемом реагента тризол (инвитроген), замораживали в жидком азоте и отправляли на хранение при температуре не выше – 80 °С.

Выделение и проверка качества РНК

Общую РНК выделяли с помощью реагента тризол, согласно рекомендациям производителя. ДНКазу свободную от РНКаз (ферментас) использовали для удаления из препаратов следов геномной ДНК. Перед выделением одинаковые количества синтетической микроРНК-39 *C.elegans* (синтол) добавляли к равным объемам образцов цельной крови, смешанным с реагентом тризол. Интактность РНК проверяли с помощью электрофореза в 1 %-м агарозном геле, который проводили по стандартной методике [17], а также с использованием системы капиллярного электрофореза «Биоанализер» (Агилент Технолоджис). Спектрофотометр «Нанодроп ND-1000» (Термо Фишер Сайнтифик) применяли для измерения концентрации РНК и проверки отсутствия примесей. Водный раствор РНК хранили в аликвотах при температуре не выше – 80 °С.

Определение относительных уровней микроРНК-208а с помощью ПЦР в реальном времени

Для количественного определения уровней микроРНК использовали метод ПЦР в реальном времени. Применяли методику двухстадийной амплификации, модифицированную для выявления зрелых микроРНК длиной 22 нуклеотида [8]. Амплификацию проводили в системе 7500 (Аплайд Биосистемс) с использованием реакционной смеси TaqMan® Universal Master Mix II и реагентов для детекции микроРНК-208а и микроРНК-39 *C.elegans* (Аплайд Биосистемс).

Все образцы амплифицировали в технических дубликатах. Данные по экспрессии микроРНК-208а нормализовали на исходный объем цельной крови. Для этого использовали методику с добавлением

экзогенной микроРНК-39 *C.elegans* [18]. В экспериментальных образцах с помощью ПЦР в реальном времени дополнительно детектировали синтетическую микроРНК-39 *C.elegans*. Для каждого образца нормализованные значения $Ct_{\text{микроРНК-208а}}$ ($Ct_{\text{miR208a_norm}}$) рассчитывали следующим образом: $Ct_{\text{miR208a_norm}} = Ct_{\text{miR208a}} - (Ct_{\text{miR39}} - Ct_{\text{miR39_median}})$, где Ct_{miR208a} – $Ct_{\text{микроРНК-208а}}$ этого образца; Ct_{miR39} – $Ct_{\text{микроРНК-39}}$ этого образца; $Ct_{\text{miR39_median}}$ – медиана $Ct_{\text{микроРНК-39}}$ всех образцов. Уровень циркулирующей микроРНК-208а в группе с ишемией-реперфузией миокарда по отношению к уровню циркулирующей микроРНК-208а в группе ложнооперированных крыс определяли как 2^{-dCt} , где $dCt = Ct_{\text{ир}} - Ct_{\text{к}}$, $Ct_{\text{ир}}$ и $Ct_{\text{к}}$ — средние значения нормализованных $Ct_{\text{микроРНК-208а}}$ в группе с ишемией-реперфузией миокарда и в группе ложнооперированных крыс соответственно. Результаты измерения уровня микроРНК-208а представлены как «среднее ± стандартная ошибка среднего». Для статистического анализа результатов ПЦР в реальном времени использовали *t* критерий Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Выделение и проверка качества РНК

Важным этапом исследования, определяющим корректность последующего анализа уровней циркулирующих микроРНК, является процедура сбора и хранения образцов цельной крови, которая должна обеспечивать сохранность молекул РНК. Поэтому особое внимание было уделено разработке протокола архивирования биоматериала и проверки качества препаратов РНК после выделения. Манипуляции с образцами крови проводились при 4 °С. Для дополнительной защиты от РНКаз перед заморозкой образцы разделялись на аликвоты и смешивались с раствором тризол. Учитывая данные об отсутствии экспрессии микроРНК-208а в клетках крови, было принято решение использовать для анализа уровней циркулирующей микроРНК-208а цельную кровь. Это позволило уменьшить потери при выделении малых количеств микроРНК, а также использовать рибосомальную РНК лейкоцитов для анализа степени деградации препаратов РНК.

На рис. 1, а показана характерная картина разделения РНК из цельной крови в 1 %-м агарозном геле. О целостности РНК свидетельствует присутствие фрагментов 28S и 18S рибосомальной РНК. Также следует отметить отсутствие загрязнения препаратов геномной ДНК. Система капиллярного электрофореза «Биоанализер» позволяет использовать для анализа качества существенно меньшие количества РНК, а также автоматически рассчитывает параметры, характеризующие степень деградации РНК. На рис. 1, б представлена характерная электрофореграмма препарата РНК из цельной крови. Концентрацию РНК и присутствие примесей, определяемое по отношению поглощения при 260 нм к поглощению при 280 нм (A_{260}/A_{280}), измеряли с помощью спектрофотометра «Нанодроп». Для дальнейшего анализа использовали только препараты РНК высокого качества ($28S/18S > 1$, $A_{260}/A_{280} > 1,8$).

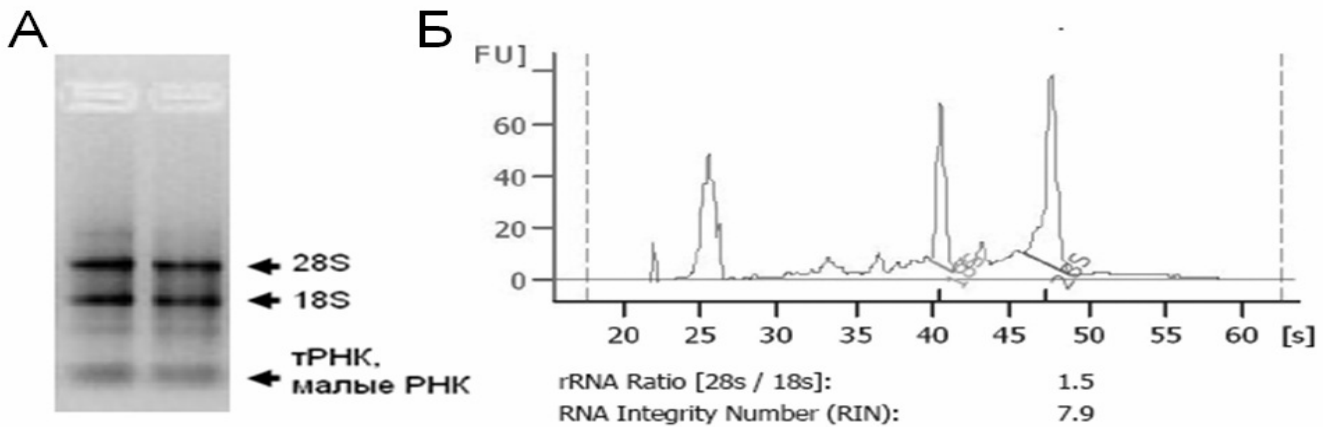


Рис. 1. *а* — электрофоретическое разделение препаратов РНК из цельной крови в 1 %-м агарозном геле. Окрашивание бромистым этидием. Стрелки указывают положения 28S и 18S рибосомальных РНК и малых РНК, включая тРНК и микроРНК; *б* — электрофореграмма препарата РНК из цельной крови, полученная с помощью «Биоанализера». Показано положение пиков, соответствующих 28S- и 18S-рибосомальным РНК, а также результат автоматического расчета отношения 28S/18S и индекса целостности РНК (RIN)

Уровень микроРНК-208а в цельной крови

Результаты количественной ПЦР в реальном времени свидетельствуют о том, что повреждение миокарда, вызванное 30-минутной ишемией и следующей за ней 90-минутной реперфузией, приводит к существенному повышению уровня циркулирующей микроРНК-208а относительно уровня этой микроРНК в крови ложнооперированных крыс (соотношение уровня микроРНК-208а в группе с ложной операцией и с ишемией-реперфузией 1:20, рис. 2). Наличие воспроизводимой зоны ишемии миокарда в основной экспериментальной группе было подтверждено с помощью окраски сердца синим Эванса. Размер зоны ишемии составил $42,3 \pm 4,8$ % от общего объема сердца, что согласуется с ранее полученными данными [2].

Количественное определение микроРНК в цельной крови, использовавшееся в данной работе, требовало на первом этапе разработки, стандартизации и экспериментальной апробации ряда специфических лабораторных методик. Так, для определения уровней микроРНК в настоящей работе был выбран метод ПЦР в реальном времени с пробами, специфичными к конкретным микроРНК. Это связано с тем, что данный метод удовлетворяет всем необходимым техническим требованиям: количественному определению микроРНК, высокой чувствительности и специфичности, наличию большого динамического диапазона, малому количеству анализируемого материала, стандартизации исследования. Для детекции зрелых форм микроРНК, состоящих в среднем из 22 нуклеотидов и составляющих значительную часть циркулирующей внеклеточной РНК, применяли модификацию метода ПЦР в реальном времени, в которой для синтеза кДНК использовали содержащий «шпильку» праймер, позволяющий надстроить короткие последовательности зрелых микроРНК, обеспечив тем самым их амплификацию на следующем этапе. В ходе амплификации использована проба, непосредственно конъюгированная с флуоресцентной меткой и гасителем, обеспечивающая более высокую точность и чувствительность.

Необходимо отметить, что для компенсации технических вариаций, связанных с выделением РНК и качеством образцов, применяют различные способы нормализации. Первый способ — это нормализация на некодирующий белок РНК, которая присутствует в исследуемом образце и не меняет свою экспрессию в ходе экспериментального воздействия; примерами таких РНК, используемых в других работах по определению уровней микроРНК, являются U6 РНК, 18S РНК и микроРНК-16. Для нашего исследования представлялось целесообразным использовать только циркулирующую в крови РНК, например, микроРНК-16, однако данные о постоянстве ее уровня в крови в ответ на повреждение миокарда отсутствуют. Второй способ — это нормализация на общее количество РНК, измеренное в достаточной степени точности. В серии пилотных экспериментов мы установили, что такой способ нормализации в случае манипуляций с малыми объемами цельной крови работает недостаточно удовлетворительно. Третий способ — это нормализация на синтетическую микроРНК, не гомологичную микроРНК человека, известное количество которой добавляется к образцу перед выделением РНК. В тестовых экспериментах данный способ нормализации показал наилучшие результаты и поэтому был использован в настоящей работе. Применение этого способа позволяет учесть вариации, связанные с деградацией РНК, потерями при выделении, неспецифической адсорбцией малых количеств РНК на стенках пробирок, а также присутствием в реакционной смеси следовых количеств компонентов крови, способных ингибировать ферментативные реакции.

Согласно современным представлениям, микроРНК представляют собой новый уровень координированной регуляции экспрессии генов, дополняющий действие белков — транскрипционных факторов. Следует отметить, что, в отличие от регуляторных путей с участием транскрипционных факторов белковой природы, процесс регуляции экспрессии генов посредством микроРНК отличается быстротой и обратимостью. Показано участие

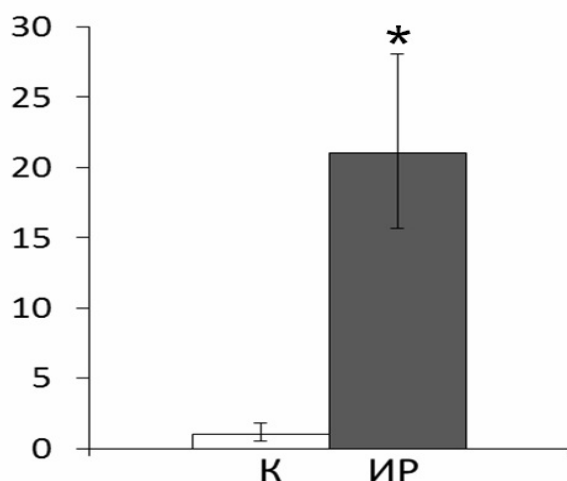


Рис. 2. Относительный уровень микроРНК-208а в цельной крови после повреждения миокарда. Уровень циркулирующей микроРНК-208а в группе крыс с повреждением миокарда в результате ишемии-реперфузии (ИР) по отношению к уровню этой микроРНК в контрольной группе ложнооперированных крыс (К). Данные представлены как «среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего». Различие между группами статистически значимо ($P < 0,05$, t-критерий Стьюдента)

микроРНК в регуляции таких важных клеточных процессов, как дифференцировка, пролиферация, апоптоз и реакция на стресс. Поскольку микроРНК контролируют множественные сигнальные пути, введение в клетку специфических ингибиторов конкретной микроРНК [20] или, напротив, повышение в клетке репрессированной микроРНК до нормального уровня [4] могут приводить к ощутимому терапевтическому эффекту.

В последнее время в литературе активно обсуждается возможность использования микроРНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров ряда заболеваний, в частности, различных типов рака [13], неврологических [22] и сердечно-сосудистых заболеваний [26]. МикроРНК участвуют в регуляции многих физиологических и патологических процессов, протекающих в сердечно-сосудистой системе. В частности, специфичная для эндотелиальных клеток микроРНК-126 регулирует процесс ангиогенеза после инфаркта миокарда [27]. МикроРНК-208а и микроРНК-208b участвуют в развитии реакции кардиомиоцитов на повреждение и связаны с развитием гипертрофии и фиброза [7, 21]. МикроРНК-21 влияет на гипертрофию кардиомиоцитов и пролиферацию фибробластов крысы после инфаркта миокарда. Уровень этой микроРНК пони-

жается в области инфаркта и повышается в пограничной зоне в первые часы после инфаркта [23]. Следует отметить, что повышение уровней микроРНК в ответ на ишемию является органоспецифичным, так как инфаркт почки приводит к повышению в плазме крови специфичной для почки микроРНК-10а, но некардиоспецифичной микроРНК-208а [19]. Специфичная для мышцы микроРНК-1 является одной из самых распространенных микроРНК в клетках сердца. На модели ИМ у крыс уровень микроРНК-1 в сыворотке повышается в 200 раз через 6 часов после ИМ и возвращается к первоначальному уровню через 3 дня. Более того, уровень микроРНК-1 положительно коррелирует с размером инфаркта [11]. Ишемическое preconditioning миокарда существенно уменьшает как уровень микроРНК-1, так и размер инфаркта. Установлено, что в результате ишемического preconditioning у мышей повышается экспрессия микроРНК-1, микроРНК-21 и микроРНК-24 [28]. Эти микроРНК могут способствовать кардиопротекции посредством повышения экспрессии БТШ70, эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы; более того, экзогенное введение этих микроРНК приводит к уменьшению размера инфаркта [28]. Определенные типы микроРНК могут принимать участие в антиапоптотическом эффекте postconditioning миокарда. Так, показано, что postconditioning вызывает повышение уровня микроРНК-1 и микроРНК-133а в миокарде крыс, коррелирующее с антиапоптотическим эффектом postconditioning, причем микроРНК-133а *in vitro* подавляет экспрессию каспазы-9 [14].

Полученные в настоящей работе результаты показали, что ишемия-реперфузия миокарда вызывает существенное повышение уровня микроРНК-208а в цельной крови. Эти результаты хорошо согласуются с данными о повышении уровня микроРНК-208а, полученными на других моделях повреждения миокарда у грызунов [12, 26]. МикроРНК-208а представляет собой кардиоспецифичный маркер ишемического повреждения, поскольку повреждение скелетных мышц, неизбежно возникающее при выполнении хирургического доступа к сердцу в эксперименте, не сопровождалось значимым повышением уровня микроРНК-208а в группе ложнооперированных животных. Значительный интерес представляет исследование динамики уровней микроРНК-208а в плазме крови у пациентов с инфарктом миокарда, а также у кардиохирургических пациентов, оперированных в условиях искусственного кровообращения.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.512.11.2043).

Литература

1. Морозова, Л. Ю. Оценка инфаркт-лимитирующего эффекта пре- и посткондиционирования с помощью определения уровня миокардиальных маркеров / Л. Ю. Морозова, М. М. Галагудза // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2007. — Т. 5. — № 4. — С. 90–94.
2. Шляхто, Е. В. Кардиопротективные эффекты феномена ишемического посткондиционирования миокарда / Е. В. Шляхто [и др.] // Кардиология. — 2005. — Т. 45. — № 7. — С. 44–48.
3. Ai, J. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction / J. Ai [et al] // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2010. — Vol. 391. — № 1. — P. 73–77.
4. Bader, A. G. The promise of microRNA replacement therapy / A. G. Bader [et al] // Cancer Res. — 2010. — Vol. 70. — № 18. — P. 7027–7030.
5. Baker, J. O. Troponins: redefining their limits / J. O. Baker [et al] // Heart. — 2011. — Vol. 97. — № 6. — P. 447–452.
6. Bayne, E. H. RNA-directed transcriptional gene silencing in mammals / E. H. Bayne, R. C. Allshire // Trends Genet. — 2005. — Vol. 21. — № 7. — P. 370–373.
7. Callis, T. E. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice / T. E. Callis [et al] // J. Clin. Invest. — 2009. — Vol. 119. — № 9. — P. 2772–2786.
8. Chen, C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR / C. Chen [et al] // Nucleic Acids Res. — 2005. — Vol. 33. — № 20. — P. e179.
9. Chen, J. MicroRNAs and muscle disorders / J. Chen [et al] // J. Cell Sci. — 2009. — Vol. 122. — P. 13–20.
10. Chen, X. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication / X. Chen [et al] // Trends Cell Biol. — 2012. — Vol. 22. — № 3. — P. 125–132.
11. Cheng, Y. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction / Y. Cheng [et al] // Clin. Sci. (Lond). — 2010. — Vol. 119. — № 2. — P. 87–95.
12. D'Alessandra, Y. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction / Y. D'Alessandra [et al] // Eur. Heart J. — 2010. — Vol. 31. — № 22. — P. 2765–2773.
13. Grady, W. M. The next thing in prognostic molecular markers: microRNA signatures of cancer / W. M. Grady, M. Tewari // Gut. — 2010. — Vol. 59. — № 6. — P. 706–708.
14. He, B. Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning / B. He [et al] // J. Biomed. Sci. — 2011. — Vol. 18. — P. 22.
15. Ji, X. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury / X. Ji [et al] // Clin. Chem. — 2009. — Vol. 55. — № 11. — P. 1944–1949.
16. Kuwabara, Y. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage / Y. Kuwabara [et al] // Circ. Cardiovasc. Genet. — 2011. — Vol. 4. — № 4. — P. 446–454.
17. Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual / T. Maniatis [et al]. — N.-Y.: Cold Spring Harbor, 1982.
18. Mitchell, P. S. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection / P. S. Mitchell [et al] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105. — № 30. — P. 10513–10518.
19. Reid, G. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers / G. Reid [et al] // Crit. Rev. Oncol. Hematol. — 2011. — Vol. 80. — № 2. — P. 193–208.
20. Ren, J. Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of laryngeal squamous cell carcinoma / J. Ren [et al] // Eur. J. Cancer. — 2010. — Vol. 46. — № 18. — P. 3409–3416.
21. Rooij, E. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis / E. Rooij [et al] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105. — № 35. — P. 13027–13032.
22. Shafi, G. MicroRNA signatures in neurological disorders / G. Shafi [et al] // Can. J. Neurol. Sci. — 2010. — Vol. 37. — № 2. — P. 177–185.
23. Thum, T. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts / T. Thum [et al] // Nature. — 2008. — Vol. 456. — № 7224. — P. 980–984.
24. Twerenbold, R. High-sensitive troponin T measurements: what do we gain and what are the challenges? / R. Twerenbold [et al] // Eur. Heart J. — 2012. — Vol. 33. — № 5. — P. 579–586.
25. Waks, J. W. Established and novel biomarkers in ST-elevation myocardial infarction / J. W. Waks, B. M. Scirica // Future Cardiol. — 2011. — Vol. 7. — № 4. — P. 523–546.
26. Wang, G. K. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans / G. K. Wang [et al] // Eur. Heart J. — 2010. — Vol. 31. — № 6. — P. 659–666.
27. Wang, S. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis / S. Wang [et al] // Dev. Cell. — 2008. — Vol. 15. — № 2. — P. 261–271.
28. Yin, C. A novel role of microRNA in late preconditioning: upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70 / C. Yin [et al] // Circ. Res. — 2009. — Vol. 104. — № 5. — P. 572–575.