

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

Перспективы использования микроРНК в качестве биомаркера ишемического повреждения миокарда

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

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

Реферат

В последние годы важная роль микроРНК в регуляции функции сердечно-сосудистой системы становится общепризнанной. Усовершенствование методов выделения и анализа экспрессии микроРНК позволило выявить эти молекулы не только в клетках, но и в различных биологических жидкостях. Несмотря на то, что механизмы выхода микроРНК в биологические жидкости, а также функции внеклеточной микроРНК во многом остаются не известными, появляется все больше работ об использовании циркулирующих микроРНК в качестве биомаркеров различных патологических процессов. В настоящем обзоре обсуждаются методы количественного определения циркулирующих микроРНК и приводятся данные о повышении уровней определенных микроРНК в крови в ответ на ишемическое повреждение миокарда.

Ключевые слова: биомаркеры, ишемия миокарда, микроРНК.

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

MicroRNA as biomarkers of myocardial ischemic injury: a perspective

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

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

Abstract

Over the past few years, it has become evident that microRNA is involved in the regulation of cardiovascular function. The continuous refinement of the techniques of microRNA purification and analysis has allowed the identification of these molecules not only in the cells, but also in the different biological fluids. Despite the fact that the mechanisms of microRNA release into the biological fluids as well as the functions of extracellular microRNA remain largely unexplored, the number of publications on the use of circulating microRNAs as biomarkers of various pathological processes is increasing. In this review, we discuss the methods of quantitative determination of circulating microRNA and summarize recent data on increased levels of certain microRNAs in the blood in response to myocardial ischemia.

Keywords: biomarkers, myocardial ischemia, microRNA.

Биогенез, регуляторные функции и тканеспецифичная экспрессия микроРНК

МикроРНК — это класс эволюционно консервативных генов, которые кодируют один из типов нетранслируемых регуляторных РНК. Транскрипты микроРНК формируют шпильчатые структуры, которые подвергаются процессингу с образованием малых РНК, длиной 22 нуклеотида. Такие малые РНК, в свою очередь, могут участвовать в сайленсинге матричной РНК (мРНК), главным образом посредством подавления трансляции гомологичных транскриптов. Конкретная микроРНК может регулировать экспрессию нескольких сотен мРНК; с другой стороны, транскрипт определенного гена

может регулироваться несколькими микроРНК [7, 36]. Таким образом, микроРНК представляют новый уровень координированной регуляции экспрессии генов, дополняющий действие белков — транскрипционных факторов. Установлено участие микроРНК в регуляции таких важных клеточных процессов, как дифференцировка, пролиферация, апоптоз и реакция на стресс. Как правило, под контролем определенной микроРНК могут находиться сразу несколько звеньев сигнальной цепи, отвечающей за изменение функции клетки, поэтому нарушение экспрессии микроРНК приводит к расстройству регуляции целой сигналь-

ной сети и серьезным нарушениям состояния клетки. В частности, показано, что нарушение правильного функционирования определенных микроРНК может приводить к онкологической трансформации клеток [24], развитию сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, атеросклероза, ишемической болезни сердца, фиброза сердца, постинфарктного ремоделирования миокарда, хронической сердечной недостаточности и сократительной дисфункции сердца [13, 25, 28, 31, 38].

Важным свойством генов, кодирующих микроРНК, является специфичный паттерн экспрессии, который определяется типом клеток и их состоянием, а также меняется при развитии патологических процессов. Таким образом, уровень экспрессии конкретных микроРНК может служить высокочувствительным маркером состояния клеток.

Высокая стабильность внеклеточной микроРНК в биологических жидкостях

Во многих биологических жидкостях, например, в крови, моче и слюне, обнаружены внеклеточные микроРНК [21, 35]. Уровни циркулирующих в биологических жидкостях микроРНК стабильны у здоровых доноров, что предполагает возможность детекции небольших колебаний концентрации этих микроРНК в случае развития патологии [35]. Повидимому, у здоровых доноров основным источником внеклеточной микроРНК в крови являются клетки крови, так как профили микроРНК цельной крови и клеток крови весьма близки.

Напротив, у лиц с определенными заболеваниями в профиле циркулирующих микроРНК появляется специфическая составляющая, отсутствующая в клетках крови, источником которой могут являться клетки патологически измененной ткани [35]. Уровень циркулирующих микроРНК может быстро и значительно изменяться в ходе развития и прогрессирования заболевания [30]. Установлено, что молекулы микроРНК из образцов плазмы крови чрезвычайно устойчивы к деградации. Так, уровни микроРНК не меняются в ходе инкубации плазмы при комнатной температуре в течение 48 часов, а также после 6 циклов замораживания и оттаивания [22, 30].

Получены данные о том, что внеклеточные микроРНК циркулируют в кровотоке в составе мембранных пузырьков (микровезикул), а также в комплексе с белками, которые защищают микроРНК от деградации [15]. Известно также, что некоторые микроРНК могут связываться в плазме крови с липопротеинами высокой плотности, которые избирательно доставляют микроРНК к клеткам-мишеням (гепатоцитам) [33].

Таким образом, тканеспецифичность и высокая скорость изменения экспрессии микроРНК в сочетании с возможностью выхода этих молекул из клеток в кровоток в стабильной форме делает их перспективными мишенями для поиска диагностических и прогностических маркеров ряда серьезных заболеваний человека.

Методы количественного определения уровней микроРНК

Для подтверждения гипотезы о возможности использования микроРНК в качестве чувствительных и высокоспецифичных биомаркеров необходимо внедрение в лабораторную практику комплекса методов по выделению и количественному определению уровней микроРНК в образцах тканей и биологических жидкостях.

При выборе методики фракционирования биологических жидкостей и выделения РНК для поиска биомаркеров следует учитывать, что искомые микроРНК могут присутствовать как в форменных элементах крови, так и в циркулирующих микрочастицах или в белковых комплексах [15]. В большинстве работ по анализу циркулирующих в крови микроРНК в качестве биоматериала используется плазма крови [30]. Однако, наряду с плазмой крови, также обсуждается возможность использования цельной крови [19], сыворотки [9] и выделенных циркулирующих микрочастиц [20].

Во фракциях внеклеточных РНК из биологических жидкостей отсутствуют рибосомальные РНК, степень деградации которых часто используется как маркер качества всего образца РНК. Поэтому для оценки качества РНК из образцов плазмы выполняется проверка постоянства уровней конкретных микроРНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. В качестве такой контрольной микроРНК может выступать микроРНК человека, экспрессия которой не изменяется в изучаемых группах, а также добавленная перед выделением экзогенная микроРНК, отсутствующая у человека, например, микроРНК нематоды *Caenorhabditis elegans*. Кроме того, амплификация экзогенной микроРНК *C. elegans* позволяет выявить и исключить из дальнейшего анализа образцы, в которых данные по количественному определению уровней микроРНК могут быть искажены вследствие других причин, в частности, из-за потерь при выделении, неспецифической адсорбции малых количеств РНК на пластике, а также из-за присутствия ингибиторов ПЦР. Для уменьшения неспецифической адсорбции рекомендуется добавлять к растворам РНК низкой концентрации неспецифичный носитель, роль которого может выполнять РНК фагов или бактериальная транспортная РНК.

В настоящее время обсуждается использование трех альтернативных методик по определению уровней микроРНК. К ним относятся секвенирование второго поколения, микрочиповый анализ и количественная ПЦР в реальном времени. Сравнение этих методик для анализа экспрессии микроРНК показывает, что в целом они дают похожие результаты, однако следует учитывать особенности каждого метода [18]. Так, секвенирование второго поколения и микрочиповый анализ требуют большого количества биологического материала, их результаты менее точны и чувствительны; с другой стороны, эти методики позволяют одновременно анализировать большое

количество разных микроРНК и поэтому чаще используются для первичного скрининга кандидатных микроРНК. Кроме того, секвенирование второго поколения является единственным методом, позволяющим изучать экспрессию микроРНК, последовательности которых неизвестны. Однако в тех случаях, когда круг кандидатных молекул на роль биомаркеров уже определен и стоит задача точного определения малых концентраций конкретных микроРНК, которые могут иметь большой диапазон уровня экспрессии, методом выбора является количественная ПЦР в реальном времени [29]. Для выявления зрелых микроРНК, имеющих длину всего 22 нуклеотида, требуется применение модифицированных методик амплификации. Наиболее распространены два протокола. В одном из них на этапе обратной транскрипции используется праймер, содержащий шпильку, который специфичен к конкретной микроРНК. Шпилька позволяет удлинить продукт ревертирования. Далее амплификация производится по стандартной схеме с применением пары праймеров и пробы, содержащей флуоресцентную метку и гаситель [8]. Другой метод предполагает достраивание зрелых микроРНК универсальными адаптерами и их ревертирование с использованием универсальных праймеров. Далее амплификация производится по стандартной схеме с применением пары специфичных праймеров и интеркалирующего красителя SYBR Green. Для выравнивания и повышения температур отжига праймеров в них также могут быть введены модифицированные нуклеотиды [6].

Основными параметрами работы системы количественного определения уровней микроРНК на базе ПЦР в реальном времени являются эффективность системы ревертирования, эффективность этапа амплификации, наличие линейной зависимости между логарифмом концентрации матрицы и номером цикла, на котором репортерная флуоресценция совпадает с пороговым значением, а также минимальный предел чувствительности системы детекции. Все эти характеристики могут быть определены с помощью анализа стандартной кривой, построенной по результатам амплификации серийных разведений матрицы РНК. Несоответствие любого из этих параметров требуемым значениям оказывает существенное влияние на корректность измерения уровней микроРНК, поэтому перед началом использования новой системы детекции рекомендуется определять ее основные параметры.

Методы нормализации результатов амплификации внеклеточной микроРНК

При анализе экспрессии микроРНК методом ПЦР в реальном времени необходимо выбрать корректный способ нормализации данных. В литературе описывают несколько подходов. Нормализация на общую РНК [9] может быть применена в случае образцов цельной крови, в которых значительная часть РНК представлена клеточными рибосомальными РНК, уровни которых обычно устойчивы к внешним воздействиям. С другой стороны, может быть использована нормализация на микроРНК человека,

экспрессия которой не изменяется в изучаемых группах [19]. Кроме того, описан способ нормализации на экзогенные микроРНК *C. elegans*, одинаковое количество которых добавляется к равным объемам образцов плазмы, смешанных с денатурирующим буфером [27].

Определение относительных и абсолютных количеств микроРНК

Метод ПЦР в реальном времени позволяет определять как относительные, так и абсолютные количества РНК. Для определения относительных количеств необходимо проводить амплификацию микроРНК в образцах исследуемой группы по отношению к группе сравнения [30]. Следует с осторожностью использовать метод определения относительных уровней в случае оценки внеклеточных микроРНК в плазме крови, так как концентрации многих из них у здоровых лиц ниже пределов чувствительности систем детекции [5]. В этих случаях рекомендуется определять абсолютные уровни микроРНК. Для этого не нужна группа сравнения, но необходимо построение стандартной кривой по результатам амплификации серийных разведений известного количества синтетических микроРНК [30].

МикроРНК кардиомиоцитов как биомаркеры повреждения миокарда

Инфаркт миокарда (ИМ) требует быстрой и точной диагностики. Оценка степени повреждения производится с помощью количественного определения в физиологических жидкостях уровней биомолекул, которые максимально точно и специфично отражают состояние клеток. В настоящее время в клинической практике в качестве таких биомаркеров повреждения кардиомиоцитов используются сердечные тропонины. Недостатком тропонинов является низкая чувствительность в первые 6 часов после повреждения. 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. Кроме того, тропонин обладает низкой чувствительностью при обратимом ишемическом повреждении миокарда, не сопровождающемся массивной гибелью клеток. Таким образом, для усовершенствования методов диагностики ишемического повреждения миокарда необходимо выявление новых специфичных биомаркеров, которые обладают высокой чувствительностью, в том числе и к незначительным повреждениям, уже в первые часы после начала ишемии. МикроРНК, экспрессирующиеся в кардиомиоцитах, являются перспективными кандидатами на роль таких биомаркеров.

Исследования последних лет подтверждают возможность использования микроРНК, в частности, микроРНК-1, -133a, -208a, -208b и -499, в качестве биомаркеров повреждения миокарда. МикроРНК-1 и микроРНК-133a экспрессируются в составе одной транскрипционной единицы, но имеют отчасти

противоположные функции и, таким образом, участвуют в тонкой согласованной регуляции пролиферации и дифференцировки мышечных клеток [25]. МикроРНК-208а, микроРНК-208b и микроРНК-499 кодируются интронами генов миозинов MYH6, MYH7 и MYH7b соответственно. Эти микроРНК транскрибируются в составе генов миозинов и регулируют соотношение MYH6 и MYH7, MYH7b, что, в свою очередь, определяет эффективность сокращения сердечной мышцы [25].

Интраоперационная ишемия миокарда, неизбежно возникающая при проведении операций на сердце в условиях экстракорпорального кровообращения, является одним из частных случаев ишемического повреждения миокарда. Для разработки наиболее эффективных алгоритмов проведения операции и методик защиты миокарда от повреждения требуется мониторинг состояния кардиомиоцитов. Поэтому особое внимание привлекают микроРНК, способные служить специфичными маркерами повреждения кардиомиоцитов на фоне повреждения скелетных мышц. На роль такого биомаркера претендует микроРНК-208а, которая экспрессируется только в кардиомиоцитах [32], в отличие от микроРНК-1, -133а, -208b и -499, которые экспрессируются как в кардиомиоцитах, так и в скелетных мышцах [10]. Эти данные хорошо согласуются с наблюдениями в том, что содержание микроРНК-208а в крови животных с постоянной окклюзией или ишемией-реперфузией миокарда достоверно выше такового в крови ложноперированных животных [1, 34]. В свою очередь, у пациентов с ишемическим повреждением миокарда по сравнению со здоровыми лицами наблюдается значительное повышение уровней циркулирующих микроРНК-1, -133а, -208b и -499. Имеющиеся в настоящее время в литературе экспериментальные и клинические данные по экспрессии циркулирующих микроРНК-1, -133а, -208а, -208b и -499 приведены в табл. 1.

Следует отметить, что в группах с повреждением миокарда повышенные уровни микроРНК, в частности, микроРНК-208а, -208b и -499, коррелируют с уровнями тропонина [14, 16, 17], а уровень микроРНК-1 коррелирует с размером ИМ и уровнем креатинфосфокиназы [12]. Более того, в ряде исследований обнаружено, что уровни микроРНК, в частности, микроРНК-1, -133а и -208а, повышаются раньше, чем уровень тропонина [23, 34]. При этом уровень микроРНК-499 достигает максимума к 12 часам после повреждения миокарда, т. е. после максимума тропонина [4]. Таким образом, динамика концентрации разных микроРНК в плазме крови после ишемического повреждения миокарда может отличаться. Дальнейшее изучение динамики уровней микроРНК будет способствовать выявлению

маркеров, специфичных для разных фаз ответа на повреждение.

В экспериментах на животных было установлено, что повышение уровней микроРНК-1, -133а, -208а и -499 в плазме крови сопровождается уменьшением их экспрессии в сердце в области инфаркта и перинфарктной зоне [4, 23]. Эти данные косвенно подтверждают, что источником маркерных микроРНК являются клетки сердца. При этом остается нерешенным вопрос о механизмах выхода микроРНК из клеток. Поскольку после повреждения миокарда в крови не повышаются некоторые другие микроРНК сердца, в частности, микроРНК-24, -26а, -126 и -30с, то пассивный выход микроРНК из поврежденных клеток, по всей видимости, является не единственным механизмом повышения уровня циркулирующих микроРНК после повреждения миокарда [4]. Известно также, что у пациентов с ИМ по сравнению со здоровыми лицами отмечается незначительное снижение в плазме крови уровня некоторых микроРНК, в частности, микроРНК-122 и -375 [4].

Не исключено, что определенный вклад в повышение уровня циркулирующих микроРНК после повреждения миокарда вносит усиление экспрессии и/или секреции микроРНК поврежденными, но еще жизнеспособными клетками [11]. В работе С. Widera et al. [37] показано, что уровни микроРНК-1, -133а, -133b, -208а, -208b и -499 были достаточно близки у пациентов с ИМ и нестабильной стенокардией. На основании этих данных авторы пришли к выводу о том, что мионекроз является далеко не единственным фактором, способствующим повышению уровня кардиоспецифичных микроРНК в плазме крови после ишемии миокарда. Этот факт может снижать диагностическую ценность микроРНК при разграничении пациентов с ИМ и другими формами ишемической болезни сердца. Не исключено, что перспективы использования микроРНК для диагностики ИМ в большей степени связаны не с оценкой отдельных типов микроРНК, а с анализом изменения профиля экспрессии сразу нескольких микроРНК [26].

Несмотря на очевидные предпосылки к использованию микроРНК в качестве специфичных маркеров различных заболеваний, требуются дальнейшие исследования на больших выборках пациентов для детального сравнения характеристик конкретных циркулирующих микроРНК и существующих биомаркеров повреждения миокарда, а также для установления связи между изменениями уровней микроРНК и внутриклеточными процессами, определяющими эти изменения.

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

Повышение уровней различных типов микроРНК в плазме крови после повреждения миокарда

Таблица 1

Вид	Тип повреждения	Контрольная группа	Время после начала ишемии, часы	Источник
МикроРНК-1				
Мышь	Постоянная окклюзия	Ложная операция	6–24	[4]
Крыса	Постоянная окклюзия	Норма	1–3	[34]
Крыса	Постоянная окклюзия	Норма	1–24	[12]
Свинья	Ишемия-реперфузия	Норма	2	[17]
Человек	ИМ с элевацией ST и без	Норма	2	[23]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	1–12	[34]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	3–13	[4]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	12	[17]
Человек	ИМ	Норма	<12	[14]
Человек	ИМ	Норма	<24	[12]
Человек	ИМ	Норма	Не указано	[2]
Человек	ИМ с элевацией ST и без	Нестабильная стенокардия	1,5–8,5	[37]
МикроРНК-133a				
Мышь	Постоянная окклюзия	Ложная операция	6–24	[4]
Крыса	Постоянная окклюзия	Норма	1–3	[34]
Свинья	Ишемия-реперфузия	Норма	2	[17]
Человек	Нестабильная стенокардия, ИМ с элевацией ST и без	Норма	2	[23]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	1–12	[34]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	3–13	[4]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	12	[17]
Человек	ИМ	Норма	<12	[14]
Человек	ИМ	Норма	4–20	[34]
Человек	ИМ с элевацией ST и без	Нестабильная стенокардия	1,5–8,5	[37]
МикроРНК-208a				
Мышь	Постоянная окклюзия	Ложная операция	0.5-3	[4]
Крыса	Постоянная окклюзия	Ложная операция	1–3	[34]
Крыса	Ишемия-реперфузия	Ложная операция	2	[1]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	1–12	[34]
МикроРНК-208b				
Свинья	Ишемия-реперфузия	Норма	2 часа	[17]
Человек	ИМ с элевацией ST и без	Норма	<12	[16]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	12	[17]
Человек	ИМ	Норма	<12	[14]
Человек	ИМ с элевацией ST и без	Нестабильная стенокардия	1,5–8,5	[37]

Вид	Тип повреждения	Контрольная группа	Время после начала ишемии, часы	Источник
МикроРНК-499				
Мышь	Постоянная окклюзия	Ложная операция	6–24	[4]
Крыса	Постоянная окклюзия	Ложная операция	1–3	[34]
Свинья	Ишемия-реперфузия	Норма	2	[17]
Человек	ИМ с элевацией ST и без	Норма	<12	[16]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	1–12	[34]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	3–13	[4]
Человек	ИМ с элевацией ST	Норма	12	[17]
Человек	ИМ	Норма	<12	[14]
Человек	ИМ	Норма	6–12	[3]

Литература

1. Федоров, А. В. Повышение уровня микроРНК-208a в цельной крови после ишемии-реперфузии миокарда у крыс / А. В. Федоров [и др.] // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2012. — Т. 11. — № 2. — С. 66–71.
2. 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.
3. Adachi, T. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction / T. Adachi [et al] // Clin. Chem. — 2010. — Vol. 56. — № 7. — P. 1183–1185.
4. Alessandra, Y. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction / Y. Alessandra [et al] // Eur. Heart J. — 2010. — Vol. 31. — № 22. — P. 2765–2773.
5. Alessandra, Y. Letter by D'Alessandra et al regarding article, «Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease» / Y. Alessandra [et al] // Circ. Cardiovasc. Genet. — 2011. — Vol. 4. — № 1. — P. e7.
6. Andreasen, D. Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples / D. Andreasen [et al] // Methods. — 2010. — Vol. 50. — № 4. — P. S6–9.
7. 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.
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, X. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases / X. Chen [et al] // Cell Res. — 2008. — Vol. 18. — № 10. — P. 997–1006.
10. Chen, J. MicroRNAs and muscle disorders / J. Chen [et al] // J. Cell Sci. — 2009. — Vol. 122. — Pt. 1. — P. 13–20.
11. Chen, X. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication / X. Chen [et al] // Trends Cell Biol. — 2012. — Vol. 22. — № 3. — P. 125–132.
12. 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.
13. Cordes, K. R. MicroRNA regulation of cardiovascular development / K. R. Cordes, D. Srivastava // Circ. Res. — 2009. — Vol. 104. — № 6. — P. 724–732.
14. Corsten, M. F. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease / M. F. Corsten [et al] // Circ. Cardiovasc. Genet. — 2010. — Vol. 3. — № 6. — P. 499–506.
15. Creemers, E. E. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? / E. E. Creemers [et al] // Circ. Res. — 2012. — Vol. 110. — № 3. — P. 483–495.
16. Devaux, Y. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction / Y. Devaux [et al] // Clin. Chem. — 2012. — Vol. 58. — № 3. — P. 559–567.
17. Gidlof, O. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples / O. Gidlof [et al] // Cardiology. — 2011. — Vol. 118. — № 4. — P. 217–226.
18. Git, A. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression / A. Git [et al] // RNA. — 2010. — Vol. 16. — № 5. — P. 991–1006.
19. Heneghan, H. M. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer / H. M. Heneghan [et al] // Ann. Surg. — 2010. — Vol. 251. — № 3. — P. 499–505.
20. Hunter, M. P. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles / M. P. Hunter [et al] // PLoS One. — 2008. — Vol. 3. — № 11. — P. e3694.
21. Iguchi, H. Secretory microRNAs as a versatile communication tool / H. Iguchi [et al] // Commun. Integr. Biol. — 2010. — Vol. 3. — № 5. — P. 478–481.
22. Jung, M. Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples / M. Jung [et al] // Clin. Chem. — 2010. — Vol. 56. — № 6. — P. 998–1006.
23. 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.

24. Kwak, P. B. The microRNA pathway and cancer / P. B. Kwak [et al] // *Cancer Sci.* — 2010. — Vol. 101. — № 11. — P. 2309–2315.
25. Liu, N. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development / N. Liu, E. N. Olson // *Dev. Cell.* — 2010. — Vol. 18. — № 4 — P. 510–525.
26. Meder, B. MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction / B. Meder [et al] // *Basic Res. Cardiol.* — 2011. — Vol. 106. — № 1. — P. 13–23.
27. 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.
28. Montgomery, R. L. MicroRNA regulation as a therapeutic strategy for cardiovascular disease / R. L. Montgomery, E. van Rooij // *Curr. Drug Targets.* — 2010. — Vol. 11. — № 8. — P. 936–942.
29. Pritchard, C. C. MicroRNA profiling: approaches and considerations / C. C. Pritchard [et al] // *Nat. Rev. Genet.* — 2012. — Vol. 13. — № 5. — P. 358–369.
30. 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.
31. Rink, C. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology / C. Rink, S. Khanna // *Physiol. Genomics.* — 2011. — Vol. 43. — № 10. — P. 521–528.
32. Rooij, E. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA / E. Rooij [et al] // *Science.* — 2007. — Vol. 316. — P. 575–579.
33. Vickers, K. C. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins / K. C. Vickers [et al] // *Nat. Cell. Biol.* — 2011. — Vol. 13. — № 4. — P. 423–433.
34. 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.
35. Weber, J. A. The microRNA spectrum in 12 body fluids / J. A. Weber [et al] // *Clin. Chem.* — 2010. — Vol. 56. — № 11. — P. 1733–1741.
36. Weinberg, M. S. The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells / M. S. Weinberg [et al] // *RNA.* — 2006. — Vol. 12. — № 2. — P. 256–262.
37. Widera, C. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome / C. Widera [et al] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2011. — Vol. 51. — № 5. — P. 872–875.
38. Williams, A. H. MicroRNA control of muscle development and disease / A. H. Williams [et al] // *Curr. Opin. Cell. Biol.* — 2009. — Vol. 21. — № 3. — P. 461–469.