

РГП на ПХВ Западно-Казахстанский Государственный Медицинский
Университет
им. М.Оспанова

Биомаркеры ишемического инсульта.

Выполнила: резидент-Макамбетова Р.С.

Проверила: доктор PhD-Кошмаганбетова Г.К.

Актобе -2018г.

Актуальность темы:

Существует множество факторов риска, таких как АГ, атеросклероз, СД 2 типа, курение, которые предрасполагают людей к большому риску развития ишемического инсульта. Тем не менее, ишемический инсульт также распространен среди молодых людей, у которых нет известных факторов риска.

*В настоящее время диагноз инсульта основан на результатах клинического обследования, визуализации. Эти диагностические процедуры неадекватны, чтобы понять этиологию инсульта у молодых людей, у которых нет факторов риска. В последние годы было **показано микроРНК (миРНК)**, которые будут участвовать в патофизиологии различных типов заболеваний, включая ишемического инсульта*

Гипотеза

Нулевая: Наличие микроРНК у пациентов с отсутствием факторов риска, не может доказать, что является абсолютной причиной ИИ, так как, не было контрольных групп (1. контрольная группа-пациенты с ИИ и наличием факторов риска, 2. контрольная группа – здоровые люди)

Гипотеза:

Альтернативная: изменения циркулирующей экспрессии miRNA у пациентов молодого инсульта с низкими / отсутствующими факторами риска. Эти профили miRNA, вероятно, будут специфичны для патогенеза инсульта и могут улучшить понимание молекулярных механизмов, участвующих в ишемическом инсульте и его прогнозе. Основываясь на *силиконовом* анализе, было обнаружено, что специфические кластеры miRNAs коррелируют с сообщенной патологией инсульта. Это говорит о том, что молекулярная основа патологии инсульта может быть различной у пациентов с низким или отсутствием риска по сравнению с пациентами с ранее существовавшими факторами риска. Тем не менее, это исследование также подтверждает наши предыдущие результаты, что модель экспрессии miRNA может быть использована для определения подтипов инсульта.

Цель исследования:

- *основная цель этого исследования - охарактеризовать профили miRNA у пациентов с ишемическим инсультом низкого / без риска и сопоставить их с цереброваскулярным поражением, вызванным церебральной ишемией.*

Задачи исследования:

- Произвести литературный обзор.
- набрать группу пациентов в инсультных центрах г. Актобе молодого возраста либо с низким фактором риска
- Проанализировать результаты анализов ПЦР на микроРНК

Дизайн исследования:

- Исследование «серий случаев», так мы подбираем пациентов молодого возраста, или пациентов без факторов риска ИИ, у которых диагностирован ИИ.

Выборка:

- Акцидентная выборка(удобная, произвольная)
- В исследования были взяты пациенты , находившиеся на базах инсультного центра г. Актобе (БСМП, АМЦ), также пациенты проходившие I, II этап реабилитации в неврологических отделениях (БСМП, АМЦ, клиники «Дару»)

Критерии включения:

- Пациенты от 18 лет до 42 лет .
- Наличие ишемического инсульта.

Критерии исключения:

- Пациенты, с артериальной гипертензией.
- Пациенты, с сахарным диабетом II типа
- Пациенты, с повышенным липидным спектром крови.
- Пациенты, с нарушением ритма сердца (мерцательная аритмия)
- Пациенты, с заменой клапанного аппарата
- Пациенты, перенесшие сифилис, положительной реакцией Вассермана.
- Пациенты с заболеванием крови (Геморрагический васкулит)

Этические аспекты:

- ❖ *Одобрено КЭ*
- ❖ *Информированное согласие с полным раскрытием всей необходимой информацией на понятном языке (на 2-х языках), крупный шрифт в 2-х экземплярах*
- ❖ *Имеют право отказаться на любой стадии исследования*
- ❖ *Действие в интересах пациента*
- ❖ *Полезность для пациента и общества.*

Исследовательский вопрос:

Вопрос: Имеются ли специфические гены микроРНК, в анализах крови, методом ПЦР у пациентов с ИИ молодого возраста, или у пациентов с отсутствием факторов риска ИИ г. Актобе ?

- **P**-пациенты, с ишемическим инсультом, молодого возраста, или с отсутствием факторов риска в г. Актобе
- **I**-исследование крови, методом ПЦР на гены микроРНК ишемического инсульта.
- **C**- нет группы сравнения
- **O**-выявление специфических микроРНК.

Blood microRNAs in Low or No Risk Ischemic Stroke Patients

1. Introduction

Ischemic stroke is a multi-factorial disease with multiple causes, and it constitutes one of the leading causes of adult disability worldwide [1]. The underlying cause of ischemic stroke is the occlusion of a cerebral artery leading to a lack of perfusion to the affected part of the brain [2,3]. There are multiple risk factors such as hypertension, atherosclerosis, type 2 diabetes, and smoking and alcohol consumption, which predispose individuals to greater risk of developing ischemic stroke [4]. Nevertheless, ischemic stroke is also becoming prevalent among young adults who do not exhibit any of the known risk factors.

Currently, the diagnosis for stroke is based on results from clinical examination, imaging and blood (protein) analyses. These diagnostic procedures are inadequate to understand the etiology of stroke in young adults who present themselves with no risk factors. In recent years, microRNAs (miRNAs) have been shown to be involved in the pathophysiology of various types of diseases including ischemic stroke [5-9]. MiRNAs are small, endogenous, non-coding RNAs that regulate gene expression in diverse biological processes [10,11]. Recently, circulating mRNA [12-14] and blood miRNA profiles [15-19] have been shown to provide vital clues as to the progression of cerebral ischemia. Most of these studies are carried out in *in vivo* animal models and *in vitro* conditions. Notably, most of the animal models for stroke present little or no pre-existing risk factors for stroke. Hence, the information about low risk ischemic stroke patients is thought to bridge the gap in the knowledge between experimental data and clinical data and to provide some insight into molecular mechanisms underlying ischemic stroke in young adults.

Previously, we had demonstrated that blood miRNAs display differential expression in young stroke patients of different stroke subtypes and functional outcomes [15]. These patients also presented with one or more risk factors. Increasing reports are being published to show the involvement of miRNAs in the pathology of type 2 diabetes, hypertension, the progression of atherosclerosis and detection of these as circulating miRNAs [20-23]. The differences in miRNA profiles in stroke patients presented with pre-existing risk factors are likely to be the result of the different co-morbidities as well. Therefore, the main aim of this study is to characterize the miRNA profiles from low/no risk young ischemic stroke patients and correlate them to cerebrovascular lesion caused by cerebral ischemia

2. Results and Discussion

The results presented here were obtained from selected young ischemic stroke patients without pre-existing risk factors and represent unique miRNA profiles following ischemic stroke ([Supplementary Data Table 1](#)). A total of 293 miRNAs ($p < 0.05$) were detected in all the blood samples ([Figure 1](#)).

Twenty-one (21) miRNAs (hsa-miR-1258, -125a-5p, -1260, -1273, -149, -220b, -23a*, -25*, -26b*, -29b-1*, -302e, -34b, -483-5p, -488, -490-3p, -498, -506, -659, -890, -920, -934) were observed to have similar expression level in all ischemic stroke samples (BB, DB, E, LB, LC, LX, BE, LM; [Table 1](#)). Among them, miR-25*, -34b, -483-5p and miR-498 were found to be down-regulated in all cases. In our previous study on the young stroke patients with existing risk factors [15], we found only miR-25* to be expressed but it remained up-regulated. Thus, suggesting that these miRNAs could prove to be specific for stroke pathogenesis in low risk stroke patients, possibly presenting a different molecular mechanism for their stroke pathogenesis as compared to stroke in patients with pre-existing risk factors [15]. In order to relate these miRNA expression to their respective function in stroke pathogenesis, we analyzed the miRNA:mRNA target pair using the miRNA target prediction software.

3. Experimental Section

This study was approved by the Medical Ethics Committee of the University Malaya Medical Centre (UMMC), Kuala Lumpur, Malaysia and the Institutional Review Board (NUS-IRB Ref Code: o8-38; Approval: NUS-676) of the National University of Singapore (NUS). The original cohort of patients was derived from the UMMC Ischemic Stroke in Young Adults database kept since 2008 where over 200 patients have been collected. These patients were between the ages of 18 to 49 and were admitted via the Neurology service. The study protocol included a standard neurological evaluation with subsequent review and follow up as outpatients. Ischemic stroke was confirmed with either MRI or CT scan of brain. The patients' functional outcome were reflected in the modified Rankin scale (mRS) where poor outcome is denoted by $mRS > 2$ and good outcome is denoted as $mRS \leq 2$. Functional outcome was determined during admission and during blood collection. Demographic data, medical history and conventional vascular risk factors were abstracted from the medical records and entered into a standard computerized database.

In our database, risk factors were defined in the following manner [48]. Hypertension was defined as having blood pressure above 140/90 mmHg [48]. Dyslipidemic patients have a total cholesterol level ≥ 5.2 mmol/L, triglyceride level ≥ 1.8 mmol/L and HDL ≤ 1 mmol/L [48]. Diabetes mellitus was diagnosed as having a fasting blood glucose > 6.1 mmol/L or HbA_{1c} $\geq 7\%$ [48]. Smokers were defined as subjects who smoked 10 cigarettes per day for more than one year. Significant alcohol consumption was defined as taking 30 g of ethanol per day.

The ischemic patients were classified according to Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification for their stroke subtypes, which are as follows: large-artery atherosclerosis, cardioembolic, small-vessel occlusion (lacunar) and undetermined etiology depending on presentation [49].

4. Conclusions

In summary, we have described unique changes of circulating miRNA expression in young stroke patients with low/no risk factors. These miRNA profiles are likely to be specific to stroke pathogenesis and could improve the understanding of molecular mechanisms implicated in ischemic stroke and its prognosis. Based on *in silico* analysis, we found that specific clusters of miRNAs do correlate to the reported stroke pathology and these clusters differ from our previous report [15]. This suggests that the molecular basis of stroke pathology may be different in low/no risk patients as compared with patients with pre-existing risk factors [15]. Nevertheless, this study also supports our earlier findings that miRNA expression pattern could be used to identify stroke subtypes and functional outcomes. Although the sample size is rather low, the findings could be used as a proof of concept to highlight the importance further studies with larger cohort of stroke patients with low/no risk factors.

Исследовательский вопрос по статье:

- **Вопрос:** Различаются ли молекулярная основа патологии инсульта у пациентов с низким или отсутствием риска по сравнению с здоровыми людьми?
- **R**-пациенты, с ишемическим инсультом, молодого возраста, или с отсутствием факторов риска.
- **I**-исследование крови, методом ПЦР на гены РНК, у пациентов с низким/без риска ИИ
- **C**- здоровые люди
- **O**-выявление специфических микроРНК.

Дизайн исследования по статье:

- *Когортное исследование.*

Способ формирования выборки:

- *Выборка –удобная выборка, пациенты находящие на лечении в стационаре, и проходящие раннюю реабилитацию*
- *В исследовании участвовало 12 человек:*
- *Кровь от пациентов с инсультом без какого-либо фактора риска или минимального фактора риска (n= 8) была собрана (один раз от каждого пациента) от 2 до 24 месяцев после начала инсульта. Образцы свежей крови (5 мл), которые были собраны (с использованием шприца без каких-либо добавок) у пациентов с инсультом (n = 8) и людей без инсульта (n = 4), немедленно добавляли в виде 0,5 мл на стерильные микроцентрифужные пробирки, содержащие 1,3 мл RNALater (Ambion , Остин, Техас, США).*

Критерии включения по статье:

- Пациенты от 18 лет до 42 лет с ИИ.
 - Пациенты от 42 лет с ИИ и отсутствием факторов риска.
В нашей базе данных факторы риска были определены следующим образом:
- *Гипертензия определялась как артериальное давление выше 140/90 мм рт.ст.*
 - *Дислипидемические пациенты имеют общий уровень холестерина $\geq 5,2$ ммоль / л, уровень триглицеридов $\geq 1,8$ ммоль / л и HDL ≤ 1 ммоль / л С*
 - *Сахарный диабет был диагностирован как наличие глюкозы в крови натощак $> 6,1$ ммоль / л или HbA1C $\geq 7\%$.*
 - *Курильщиков определяли как субъектов, которые курили 10 сигарет в день в течение более одного года.*
 - *Значительное потребление алкоголя определяли как взятие 30 г этанола в день.*

Критерии исключения:

Пациенты, у которых имеются факторы риска:

В нашей базе данных факторы риска были определены следующим образом:

- Гипертензия определялась как артериальное давление выше 140/90 мм рт.ст.*
- Дислипидемические пациенты имеют общий уровень холестерина $\geq 5,2$ ммоль / л, уровень триглицеридов $\geq 1,8$ ммоль / л и HDL ≤ 1 ммоль / л С*
- Сахарный диабет был диагностирован как наличие глюкозы в крови натощак $> 6,1$ ммоль / л или HbA1C $\geq 7\%$.*
- Курильщиков определяли как субъектов, которые курили 10 сигарет в день в течение более одного года.*
- Значительное потребление алкоголя определяли как взятие 30 г этанола в день.*

Литература:

- Вестник КазНМУ-2013/ А.Ш.ОРАДОВА Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы. Научная лаборатория «Центр коллективного пользования» «МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ РАЗВИТИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА»
- Amarenco P., Bogousslavsky J., Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG Классификация подтипов инсульта. Cerebrovasc. Дис. 2008; 27 : 493-501. [[PubMed](#)]
- Хатано С. Опыт многоцентрового инсульта: предварительный отчет. Bull. Всемирный орган здравоохранения. 1976; 54 : 541-553. [[PubMed](#)]
- Райхле М.Е. Патофизиология ишемии головного мозга. Энн. Neurol. 1983; 13 : 2-10. [[PubMed](#)]
- Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, Dyken M., Easton JD, Feinberg WM, Goldstein LB, Gorelick PB, Howard G., Kittner SJ, et al. Инсульт. Том 28. Американская кардиологическая ассоциация; 1997. Конференция по профилактике. Внутривенно Профилактика и реабилитация инсульта. Факторы риска; С. 1507-1517. [[PubMed](#)]