

УДК 576.32/.36

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ микроРНК И МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОМАРКЕРЫ АРИТМОГЕННОЙ КАРДИОМИОПАТИИ

© 2019 А.А. Худяков^{1*}, Н.А. Смолина¹, К.И. Перепелина^{1,2},
А.Б. Малашичева^{1,2}, А.А. Костарева¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
Минздрава России, 197341 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: khudyakov_aa@almazovcentre.ru

² Санкт-Петербургский государственный университет,
199034 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 16.10.2018

После доработки 03.12.2018

Принята к публикации 03.12.2018

Дифференциальная диагностика аритмогенной кардиомиопатии во время скрытой фазы заболевания – сложная клиническая задача. В связи с этим актуален поиск биомаркеров аритмогенной кардиомиопатии. Известно, что внеклеточные нуклеиновые кислоты благодаря стабильности, специфичности и простоте выявления могут служить надежными биомаркерами различных заболеваний. В настоящем исследовании были определены уровни внеклеточных микроРНК и митохондриальной ДНК в кондиционированной среде, собранной с кардиомиоцитов. Кардиомиоциты были получены путем направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациента с аритмогенной кардиомиопатией и здорового донора. Были выявлены микроРНК, уровень которых в анализируемых образцах значительно различался, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных биомаркеров аритмогенной кардиомиопатии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аритмогенная кардиомиопатия, кардиомиоциты, микроРНК, митохондриальная ДНК, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

DOI: 10.1134/S0320972519030096

Аритмогенная кардиомиопатия (АКМП) является наследственным аутосомно-доминантным заболеванием, которое характеризуется нарушением работы проводящей системы сердца наряду с прогрессирующей дисфункцией миокарда, развивающейся в результате его замещения на жировую и соединительную ткань [1]. Генетические исследования выявили, что с развитием АКМП ассоциированы мутации в генах, кодирующих белки десмосомы [2]. Наиболее часто встречаются мутации в гене *PKP2*, кодирующем плакофиллин-2 [2]. Современные методы дифференциальной диагностики АКМП недостаточно чувствительны и не позволяют поставить диагноз в течение скрытой стадии заболевания, при которой в морфологически здоровом

миокарде уже происходят изменения проводящих систем сердца [3].

Оценка уровня внеклеточных микроРНК представляется перспективным методом ранней диагностики заболеваний. МикроРНК — это малые некодирующие РНК (длиной ~22 нуклеотидов), которые регулируют экспрессию генов через комплементарное связывание с 3'-нетранслируемой областью мРНК, что приводит либо к блокированию трансляции, либо к деградации мРНК [4, 5]. Внеклеточные микроРНК были обнаружены почти во всех биологических жидкостях: сыворотке и плазме крови, спинномозговой жидкости, слюне, моче, грудном молоке и др. Кроме того, сочетания микроРНК, найденных в образцах жидкостей, отражали патофизиологическое состояние организма [6]. Было показано, что микроРНК секретируются клетками в составе микровезикул, экзосом, белковых комплексов, а также липопротеиновых частиц высокой и низкой плотности, что обеспечивает их устойчивость к воздействию внеклеточной среды [6–10].

Принятые сокращения: АКМП – аритмогенная кардиомиопатия; iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; мтДНК – митохондриальная ДНК; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; miR – микроРНК; PBS – фосфатно-солевой буфер.

* Адресат для корреспонденции.

К настоящему времени опубликовано несколько исследований, описывающих изменение уровней микроРНК у пациентов с АКМП. В результате сравнения содержания микроРНК в плазме пациентов с АКМП и здоровых доноров была выявлена микроРНК-302a (miR-302a), уровень которой был понижен у пациентов с АКМП [11]. Анализ экспрессии более тысячи различных микроРНК в ткани миокарда выявил две микроРНК, miR-21 и miR-135b, экспрессия которых была значительно повышена или понижена у пациентов с АКМП по сравнению с контролем [12]. Известно, что miR-21, miR-135b и miR-320a принимают участие в сигнальных путях Wnt/ β -катенин и Hippo и регулируют процессы клеточной пролиферации, апоптоза, адипогенеза и фиброза [13–16], а также, предположительно, могут принимать участие в патогенезе АКМП. В другом исследовании, посвященном изучению циркулирующих микроРНК в плазме пациентов с диагнозом АКМП и пациентов с идиопатической желудочковой тахикардией, было выявлено достоверное повышение уровней miR-144, miR-145, miR-185 и miR-494 в плазме пациентов с АКМП [17], что позволило дифференциально диагностировать раннюю фазу АКМП и идиопатическую желудочковую тахикардию.

Другим типом секретируемых клеткой нуклеиновых кислот является митохондриальная ДНК (мтДНК). Поскольку митохондрии эволюционно произошли от α -протеобактерий и сохранили некоторые бактериальные признаки [18, 19], внеклеточная мтДНК распознается системой врожденного иммунитета как бактериальная [20]. Существенная доля исследований роли мтДНК в развитии и прогрессировании заболеваний сердца посвящена внеклеточной мтДНК, циркулирующей в крови [21, 22]. Повышение уровня циркулирующей мтДНК в свободной форме или в составе внеклеточных везикул разного размера (микровезикул, экзосом) описано при кардиомиопатиях, хронической сердечной недостаточности и инфаркте миокарда [22–25]. Циркулирующая мтДНК может распознаваться и захватываться как иммунокомпетентными клетками (нейтрофилами, макрофагами), так и кардиомиоцитами, что, в свою очередь, может приводить к развитию стерильного воспаления, наблюдаемого в патогенезе кардиомиопатий и других патологий миокарда [22].

Целью настоящего исследования являлось проведение сравнительного анализа уровней ряда микроРНК и мтДНК в кондиционированной среде, собранной с кардиомиоцитов, дифференцированных из контрольных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

(иПСК), а также из иПСК от пациента с АКМП, и последующая оценка возможности использования микроРНК и мтДНК в качестве биомаркеров АКМП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование иПСК. В исследовании были использованы две линии иПСК (FAMRCi001-A и FAMRCi001-B) от пациента с АКМП, являвшегося носителем двух мутаций в гене *PKP2* (c.354delT и p.Lys859Arg), а также две контрольные линии от здорового донора (FAMRCi003-A и FAMRCi003-B). Все линии иПСК были зарегистрированы в базе данных плюрипотентных клеток человека hPSCreg (<https://hpscereg.eu/>). Линии иПСК были ранее охарактеризованы согласно стандартному протоколу [26, 27]. иПСК культивировали на плашках, покрытых 1%-ным раствором Geltrex («Thermo Fisher Scientific», США) в среде Essential 8 («Thermo Fisher Scientific», США), содержащей 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина («Thermo Fisher Scientific», США). Для пересадки иПСК использовали реагент ReleSR («Stemcell», США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Дифференцировка иПСК в кардиомиоциты. иПСК дифференцировали согласно ранее опубликованному протоколу [28] с модификациями. Клетки снимали при помощи реагента для диссоциации StemPro Accutase («Thermo Fisher Scientific», США), отмывали путем центрифугирования при 300 g в течение 5 мин и засевали в плотности 200–1000 тыс. клеток на лунку в 12-луночный культуральный планшет, покрытый 1%-ным раствором Geltrex («Thermo Fisher Scientific», США). При достижении клетками конfluence запускали дифференцировку путем смены ростовой среды на дифференцировочную, содержащую RPMI1640 GlutaMax, с добавлением B27 без инсулина, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина («Thermo Fisher Scientific», США), а также 6 мкМ ингибитора CHIR99021 («Selleckchem», США). Через двое суток среду меняли на дифференцировочную, содержащую 5 мкМ ингибитора IWP2 («Tocris», США). Еще через двое суток и далее раз в два дня среду меняли на дифференцировочную. Начиная с 7-го дня дифференцировки и далее раз в два дня среду меняли на среду для роста кардиомиоцитов, содержащую RPMI1640 GlutaMax, с добавлением B27, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина («Thermo Fisher Scientific», США). Для проведения метаболической селекции дифференцированные кардиомиоциты (14-й день дифференцировки)

культивировали в течение 3–5 дней в селективирующей среде, содержащей среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM) без глюкозы и пирувата («Thermo Fisher Scientific», США), 4 мМ лактата натрия («Sigma Aldrich», США), 2 мМ глутамин, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина («Thermo Fisher Scientific», США). Образцы кондиционированной среды отбирали на 30-й день дифференцировки. Для сбора образцов использовали как минимум три независимые дифференцировки и ПСК.

Иммуноцитохимическое окрашивание клеток.

Для проведения иммуноцитохимического окрашивания кардиомиоциты пересаживали при помощи реагента Tryple Select («Thermo Fisher Scientific», США) на покровные стекла, покрытые 1%-ным раствором Geltrex, фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида на фосфатно-буферном растворе (PBS), обрабатывали 0,05%-ным раствором тритона X-100 на PBS. Клетки инкубировали с первичными антителами, специфичными к сердечной изоформе тропонина Т, затем – с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 488 («Life Technologies», США). Ядра клеток окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) («Invitrogen», США). Микрофотографии получали на микроскопе AxioObserver.D1 («Carl Zeiss», Германия), обработку полученных изображений производили в программе Zen 2012 («Carl Zeiss», Германия). Для оценки эффективности дифференцировки проводили обсчет микрофотографий и вычисляли процентное отношение тропонин-Т-позитивных клеток к общему количеству ядер. Двухядерные кардиомиоциты считали как две отдельные клетки.

Сбор образцов кондиционированной среды.

Среду для роста кардиомиоцитов (400 мкл), кондиционированную в течение 48 ч, отбирали и центрифугировали при 3000 г в течение 10 мин при 4 °С. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и центрифугировали при 16 000 г в течение 15 мин при 4 °С. Полученную надосадочную жидкость использовали для выделения РНК и ДНК (фракция супернатанта). Полученный осадок растворяли в 1 мл PBS встряхиванием, затем снова осаждали центрифугированием при 16 000 г в течение 15 мин при 4 °С. Полученный осадок растворяли в 400 мкл PBS и также использовали для выделения РНК и ДНК (фракция осадка).

Выделение РНК и ДНК. Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью реагента Extract RNA («Евроген», Россия) согласно рекомендациям производителя. Тотальную РНК из образцов среды выделяли с помощью реагента Trizol LS согласно рекомендациям производителя. При

выделении РНК в реагент Trizol LS добавляли синтетическую микроРНК *C. elegans* (cel-miR-39-3p) для контроля качества выделения и тРНК *E. coli* в качестве носителя. Тотальную ДНК выделяли при помощи коммерческого набора FlexiGene DNA kit («Qiagen», США) согласно рекомендациям производителя. При выделении ДНК из образцов кондиционированной среды к ним добавляли плазмиду pLVTHM в количестве 5 нг для контроля качества выделения.

Реакция обратной транскрипции. Реакцию обратной транскрипции тотальной РНК проводили при помощи набора MMLV RT kit («Евроген», Россия) согласно рекомендациям производителя. Реакцию обратной транскрипции микроРНК осуществляли индивидуально для каждой микроРНК с помощью набора TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit («Thermo Fisher Scientific», США) и наборов TaqMan Assay («Thermo Fisher Scientific», США), перечисленных в табл. 1.

ПЦР в режиме реального времени. Измерение уровней РНК в образцах проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Для определения уровня экспрессии генов специфичный фрагмент кДНК амплифицировали с помощью праймеров, подобранных с использованием алгоритма Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), а также смеси qPCRMix-HSSYBR + LowROX («Евроген», Россия). Для амплификации микроРНК использовали TaqMan Universal Master Mix II no UNG и соответствующий TaqMan Assay («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Число копий мтДНК в образцах кондиционированной среды также определяли методом ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию участка мтДНК проводили с помощью ранее опубликованных праймеров [29] и смеси qPCRMix-HSSYBR + LowROX («Евроген», Россия). Для построения стандартной кривой в качестве матрицы реакции использовали серию разведений ПЦР-фрагмента известной длины. Амплификацию WRPE-участка плазмиды pLVTHM осуществляли аналогично мтДНК с помощью соответствующих праймеров. Последовательности использованных праймеров и номера наборов TaqMan приведены в табл. 1.

Анализ и статистическая обработка данных.

Для количественной оценки относительной экспрессии генов использовали метод $\Delta\Delta C_t$, в качестве референсного гена была взята последовательность, кодирующая 18S РНК. Относительные количества микроРНК вычисляли по формуле 2^{Cq} , где Cq – значение порогового цикла. Минимальное значение относительного количества среди экспериментальных групп принимали за единицу. Для измерения количества

копий фрагмента мтДНК строили стандартную кривую и выводили уравнение прямой. Коэффициенты уравнения были использованы для количественной оценки числа копий мтДНК в

экспериментальных образцах. Статистический анализ проводили в программах GraphPad Prism v 5.0 (GraphPad Software, www.graphpad.com) и R-Studio версии 1.0.53 с R версии 3.0.1. Для

Таблица 1. Последовательности праймеров и наборы, использованные в исследовании

Мишень	Последовательности прямого и обратного праймеров (5'–3')	Мишень	Последовательности прямого и обратного праймеров (5'–3')
<i>MMP10</i>	GTGAAACAGTTT TAGAAGAAAGGACA GGCAGAATCAACAGCATCTCT	<i>FABP4</i>	GCCAGGAATTTGACGAAGTC TGGTTGATTTCCATCCCAT
<i>MMP24</i>	GATTGGAGGAGACACCCACTTTGA CATGCACAGCCACCAGGAAGA	<i>PPARG</i>	AGCCTTCCAACTCCCTCATGGCA TCCGGAAGAAACCCTTGATCCT
<i>GREM1</i>	GGACCCGCCGCACTGACA CTTCAGCAGCCGGCAGCAG	<i>18S rDNA</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>HEY1</i>	TGGATCACCTGAAAATGCTG CGAAATCCCAAACCTCCGATA	<i>WRPE</i>	GGCACTGACAATTCCGTGGT AGGGACGTAGCAGAAGGACG
<i>HES1</i>	AGCACAGAAAGTCATCAAAG AGGTGCTTCACTGTCAATTC	мтДНК (Mito_DS1.F, Mito_DS1.R)	ACTACAACCCCTTCGCTGACG GCGGTGATGTAGAGGGTGAT
<i>NOTCH1</i>	GTCAACGCCG TAGATGACC TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG	Наборы TaqMan для ПЦР в режиме реального времени	
<i>NOTCH3</i>	GGAGCCAATAAGGACATGCAGGAT GGCAAAGTGGTCCAACAGCAGC	Мишень	Идентификационный номер
<i>DLL1</i>	CTACTACGGAGAGGGCTGCT CCAGGGTTGCACACTTCTCT	<i>SMAD6</i>	Hs00178579_m1
<i>SNAI1</i>	CTCTTTCCCTCGTCAGGAAGC GGCTGCTGGAAGGTAAACTC	<i>STAT1</i>	Hs01013996_m1
<i>SNAI2</i>	ATGAGGAATCTGGCTGCTGT CAGGAGAAAATGCCTTTGGA	<i>TGFBR2</i>	Hs00234253_m1
<i>NF2</i>	GGGATTTTTGGCCCAAGAGGAATT TGCGTACCAAGCAGTAATCTCT	<i>TIMP1</i>	Hs00171558_m1
<i>ISL1</i>	GCGGAGTGTAATCAGTATTTGGA GCATTTGATCCCGTACAACCT	<i>TIMP3</i>	Hs00165949_m1
<i>GATA4</i>	CGACACCCCAATCTCGATATG GTTGCACAGATAGTGACCCGT	<i>MMP2</i>	Hs01548727_m1
<i>NKX2.5</i>	CCAAGGACCCTAGAGCCGAA ATAGGCGGGGTAGGCGTTAT	Наборы TaqMan для обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени микроРНК	
<i>CCND1</i>	AGACCTTCGTTGCCCTCTGT AGTTGTTGGGGCTCCTCAG	Мишень	Идентификационный номер
<i>ATF2</i>	TCCAGGGGTGCTTTGTAAAC GCTTCCAGGAATACCTTAGCTG	miR-39	cel-miR-39-3p ID 000200
<i>MEF2A</i>	ACTACAGACCTCACAGTGCCA GCSTAAGCTATTTGCACCAGT	miR-1	hsa-miR-1-3p ID 002222
<i>MEF2C</i>	CCAACTTCGAGATGCCAGTCT GTCGATGTGTTACACCAGGAG	miR-21	hsa-miR 21-5p ID 000397
<i>CEBPA</i>	CCTCAGCCTTGTTTGTACTGTATG TTTGAAAGCTTGTCATAACTCCG	miR-29b-2	hsa-miR-29b-2-3p ID 000413
		miR-30c	hsa-miR-30c-5p ID 000419
		miR-133a	hsa-miR-133a-3p ID 002246
		miR-208a	hsa-miR-208a-3p ID 000511
		miR-302b	hsa-miR-302b-3p ID 000531
		miR-378a	hsa-miR-378a-3p ID 001314
		miR-494	hsa-miR-494-3p ID 002365

сравнения экспериментальных групп применяли критерий Манна–Уитни с последующей коррекцией множественных сравнений методом Бенджамини–Хочберга. Использовали уровень альфа, равный 0,05. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика кардиомиоцитов, дифференцированных из iPSC. Для получения пациент-специфичной культуры кардиомиоцитов ис-

пользовали линии iPSC клеток, ранее полученные и охарактеризованные в нашей лаборатории [26, 27]. В ходе проведения кардиодифференцировки iPSC в течение 30 дней методом модулирования сигнального пути Wnt/ β -катенин и последующей метаболической селекции (рис. 1, а) наблюдали появление сокращающихся клеток, которые положительно окрашивались на сердечную изоформу тропонина Т и демонстрировали характерную неупорядоченную структуру саркомера (рис. 1, б). Для последующих экспериментов выбирали лунки с высоким содержанием кардиомиоцитов (88 ± 4)% (рис. 1, в). Ана-

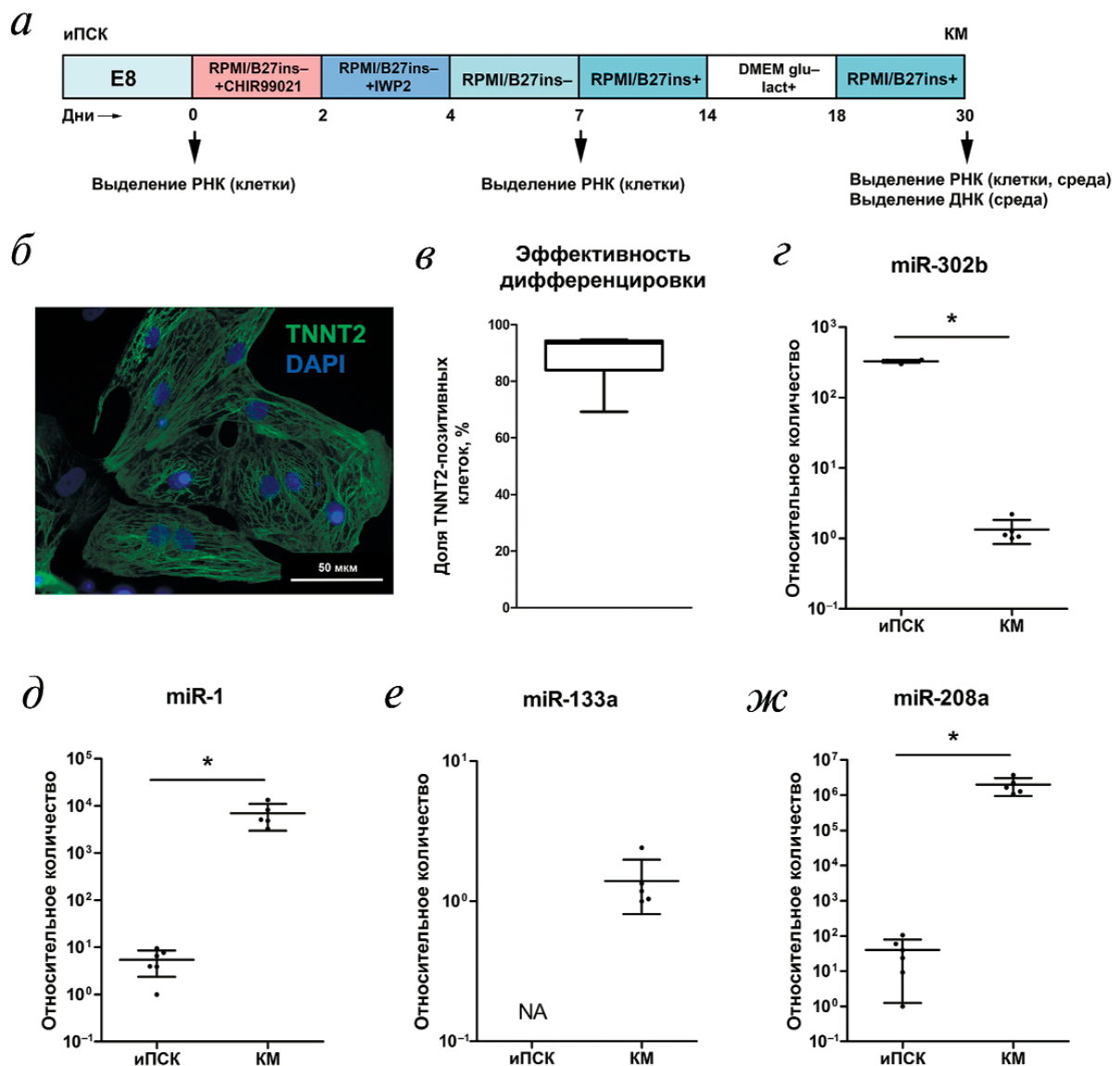


Рис. 1. Характеристика кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. *а* – Схема протокола дифференцировки iPSC. Указаны временные точки забора экспериментальных образцов; *б* – иммунофлуоресцентная окраска дифференцированных кардиомиоцитов на сердечную изоформу тропонина Т (TNNT2), ядра клеток окрашены DAPI; *в* – оценка эффективности дифференцировки iPSC; анализ экспрессии miR-302b (*г*), miR-1 (*д*), miR-133a (*е*) и miR-208a (*ж*) соответственно. Обозначения: КМ – кардиомиоциты, NA – значение не определено. * $p < 0,05$

лиз уровней экспрессии микроРНК, специфичных для определенного типа клеток, выявил преобладание miR-302b, характерной для плюрипотентных клеток, в недифференцированных и ПСК клетках (рис. 1, з) ($326,3 \pm 5,7$ в иПСК против $1,3 \pm 0,2$ в кардиомиоцитах). В то же время дифференцированные из иПСК кардиомиоциты обладали высоким уровнем экспрессии кардиоспецифичных микроРНК (рис. 1, д–ж): miR-1 ($5,5 \pm 1,3$ в иПСК против 6960 ± 1778 в кардиомиоцитах), miR-133a (в иПСК не детектирована, в кардиомиоцитах присутствовала), miR-208a ($40,0 \pm 15,8$ в иПСК против $1,99e6 \pm 4,72e5$ в кардиомиоцитах). Таким образом, было показано, что на 30-й день дифференцировки иПСК кардиомиоциты демонстрировали специфичные для кардиомиоцитов признаки: спонтанные сокращения, формирование поперечно-исчерченного саркомера, экспрессию кардиоспецифичных микроРНК.

Анализ экспрессии генов-регуляторов сигнальных путей на 7-й день дифференцировки иПСК. Ранее нами было продемонстрировано снижение активности сигнального пути Wnt/ β -катенин при кардиодифференцировке линий АКМП-иПСК [26]. Для оценки вклада сниженной активности сигнального пути Wnt/ β -катенин в процесс кардиодифференцировки иПСК была измерена экспрессия 26 генов, кодирующих белки-участники сигнальных путей ранней дифференцировки иПСК (7-й день). Экспрессия генов, регулирующих процессы фиброза (*SMAD1*, *STAT1*, *TGFBR2*, *TIMP1*, *TIMP3*, *MMP2*, *MMP10*, *MMP24*, *GREM1*) и адипогенной дифференцировки (*CEBPA*, *FABP4*, *PPARG*), не различалась на 7-й день дифференцировки АКМП-иПСК и контрольных иПСК (табл. 2). Экспрессия двух генов-мишеней сигнального пути Notch, *HEY1* и *HES1*, была повышена, что свидетельствует о возможной активации этого пути. Таким образом, в ходе дифференцировки АКМП-иПСК активации сигнальных путей, связанных с развитием фиброза и адипогенной дифференцировки, не наблюдалось.

Анализ уровней микроРНК в различных фракциях кондиционированной среды. Для количественной оценки внеклеточной микроРНК методом ПЦР в режиме реального времени были измерены уровни 8 микроРНК в двух фракциях кондиционированной среды от дифференцированных кардиомиоцитов – фракции осадка, полученного центрифугированием при 16 000 g, и фракции супернатанта. Уровни miR-1, miR-21, miR-133a, miR-208a, miR-378a, miR-494 были достоверно выше во фракции супернатанта по сравнению с фракцией осадка (рис. 2, а, б, д–з). Уровни miR-29b-2 и miR-30c во фракциях супер-

натанта и осадка не различались (рис. 2, в, з). Уровни miR-21, miR-29b-2, miR-378a во фракции супернатанта были повышены в образцах среды от АКМП-кардиомиоцитов по сравнению с соответствующей фракцией среды от контрольных кардиомиоцитов (рис. 2, б, з, з) ($76,5 \pm 9,8$ против $9,9 \pm 1,2$ – для miR-21, $19,9 \pm 2,7$ против $6,8 \pm 0,6$ – для miR-29b-2, $203,2 \pm 24,4$ против $87,8 \pm 13,2$ – для miR-378a). Уровни miR-1 и miR-133a были повышены в обеих фракциях образцов среды от АКМП-кардиомиоцитов по сравнению с контрольными кардиомиоцитами (рис. 2, а, д) ($32,4 \pm 5,3$ против $14,8 \pm 3,6$ – для miR-1 в супернатанте, $4,2 \pm 0,6$ против $2,0 \pm 0,2$ – для miR-1 в осадке, $44,6 \pm 8,5$ против $14,5 \pm 1,7$ – для miR-133a в супернатанте, $3,5 \pm 0,3$ против $2,4 \pm 0,1$ – для miR-133a в осадке). Таким образом, было показано, что некоторые микроРНК присутствуют преимущественно во фракции супернатанта. Также были выявлены микроРНК, уровень которых был повышен в образцах среды от АКМП-кардиомиоцитов по сравнению с контрольными образцами.

Анализ внутриклеточных уровней микроРНК в пациент-специфичных кардиомиоцитах, дифференцированных из иПСК. Чтобы определить, является ли повышенный уровень miR-1, miR-21, miR-29b-2, miR-133a и miR-378a во фракциях кондиционированной среды от АКМП-кардиомиоцитов следствием повышенного содержания этих микроРНК внутри клетки, был проведен количественный анализ данных микроРНК в дифференцированных из иПСК кардиомиоцитах. Было показано, что внутриклеточные уровни miR-1, miR-21, miR-29b-2, miR-133a и miR-378a в АКМП-кардиомиоцитах не отличаются от контрольных кардиомиоцитов (рис. 3, а–д). Таким образом, было установлено отсутствие различий экспрессии исследуемых микроРНК в клетках.

Количественный анализ мтДНК в различных фракциях кондиционированной среды. Для количественной оценки внеклеточной мтДНК во фракциях кондиционированной среды методом ПЦР в режиме реального времени было определено абсолютное количество копий амплифицированного участка мтДНК (рис. 4). Различий в содержании мтДНК между фракциями среды обнаружено не было. Однако уровень мтДНК во фракции супернатанта от АКМП-кардиомиоцитов был достоверно понижен по сравнению с образцами контрольных кардиомиоцитов ($2,6e9 \pm 5,6e8$ копий против $5,8e9 \pm 6,4e8$ копий). Таким образом, было показано, что количество мтДНК во фракции супернатанта образцов среды от АКМП-кардиомиоцитов понижено по сравнению с контролем.

Таблица 2. Анализ экспрессии генов-регуляторов сигнальных путей на 7-й день кардиодифференцировки иПСК

Ген	Транскрипт (RefSeqID)	Кратность различий экспрессии относительно контроля	Значение <i>p</i>
<i>SMAD6</i>	NM_005585.4	1,2	1,00
<i>STAT1</i>	NM_007315.3, NM_139266.2	0,9	0,69
<i>TGFBR2</i>	NM_001024847.2, NM_003242.5	0,7	0,42
<i>TIMP1</i>	NM_003254.2	0,4	0,15
<i>TIMP3</i>	NM_000362.4	2,2	0,55
<i>MMP2</i>	NM_001127891.2, NM_001302508.1, NM_001302509.1, NM_001302510.1, NM_004530.5	2,3	0,42
<i>MMP10</i>	NM_002425.2	1,1	1,00
<i>MMP24</i>	NM_006690.3	0,9	0,66
<i>GREM1</i>	NM_001191323.1, NM_013372.6	1,2	0,61
<i>HEY1</i>	NM_012258.3, NM_001040708.1	1,3	0,02*
<i>HES1</i>	NM_005524.3	1,8	0,03*
<i>NOTCH1</i>	NM_017617.4	1,4	0,43
<i>NOTCH3</i>	NM_000435.2	1,0	0,69
<i>DLL1</i>	NM_005618.3	1,5	0,22
<i>SNAI1(SNAIL)</i>	NM_005985.3	0,9	0,55
<i>SNAI2(SLUG)</i>	NM_003068.4	1,0	0,84
<i>NF2</i>	NM_000268.3, NM_016418.5, NM_181828.2, NM_181829.2, NM_181830.2, NM_181832.2, NM_181825.2, NM_181831.2	1,7	0,06
<i>ISL1</i>	NM_002202.2	0,5	0,06
<i>GATA4</i>	NM_002052.4	0,8	0,42
<i>NKX2.5</i>	NM_004387.3, NM_001166175.1, NM_001166176.1	2,8	0,69
<i>CCND1</i>	NM_053056.2	0,7	0,06
<i>ATF2</i>	NM_001880.3, NM_001256090.1, NM_001256091.1, NM_001256092.1, NM_001256093.1, NM_001256094.1	1,3	0,69
<i>MEF2A</i>	NM_005587.3, NM_001130926.2, NM_001130927.2, NM_001130928.2, NM_001171894.2, NM_001319206.1, NM_001352614.1, NM_001352615.1, NM_001352616.1, NM_001352617.1, NM_001352618.1	1,2	0,55
<i>MEF2C</i>	NM_002397.4, NM_001131005.2, NM_001193347.1, NM_001193348.1, NM_001193349.1, NM_001193350.1, NM_001308002.1	0,6	0,10
<i>CEBPA</i>	NM_004364.4	0,8	0,22
<i>FABP4</i>	NM_001442.2	5,8	0,69
<i>PPARG</i>	NM_138712.3, NM_015869.4, NM_138711.3, NM_005037.5, NM_001330615.1, NM_001354666.1, NM_001354667.1, NM_001354668.1, NM_001354669.1, M_001354670.1	8,2	0,25

* $p < 0,05$.

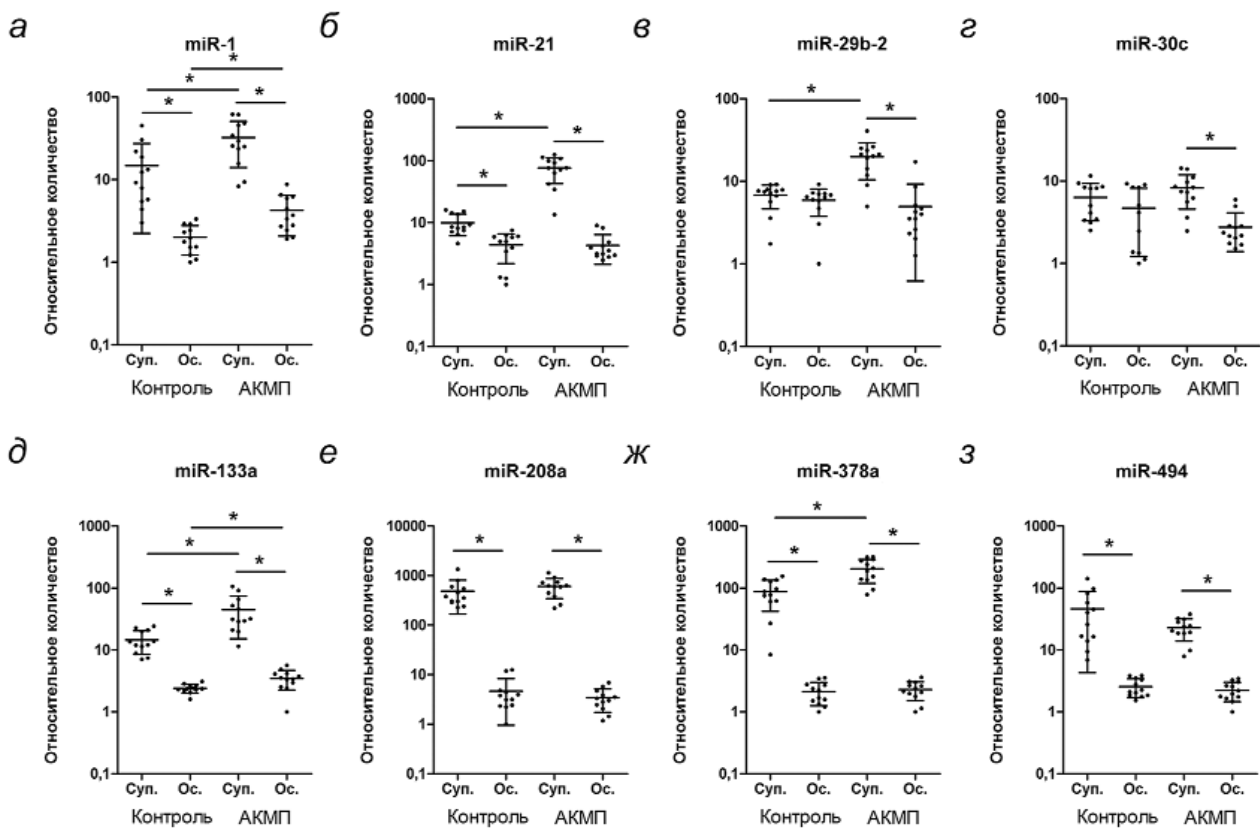


Рис. 2. Анализ уровней микроРНК в различных фракциях кондиционированной среды от пациент-специфичных кардиомиоцитов. Анализ экспрессии miR-1 (а), miR-21 (б), miR-29b-2 (в), miR-30c (г), miR-133a (д), miR-208a (е), miR-378a (ж) и miR-494 (з). Обозначения: Суп. – фракция супернатанта, Ос. – фракция осадка. * $p < 0,05$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последнее время большое внимание уделяется использованию циркулирующих микроРНК в качестве биомаркеров заболеваний [30]. Анализ микроРНК, содержащихся в плазме крови, доказал существование определенных циркулирующих микроРНК, качественные и количественные изменения которых могут свидетельствовать о развитии патологических процессов [30–32].

В настоящем исследовании в качестве клеточной модели была использована культура пациент-специфичных кардиомиоцитов, дифференцированных из iPSC. Несмотря на то, что полученные таким образом кардиомиоциты имеют фенотип эмбриональных и отличаются по многим параметрам от зрелых кардиомиоцитов человека, они обладают пациент-специфичным генотипом и схожим со зрелыми кардиомиоцитами паттерном экспрессии генов, что делает их ценной моделью для исследований патологий сердечно-сосудистой системы [33].

Полученные пациент-специфичные кардиомиоциты демонстрировали высокий уровень

экспрессии кардиоспецифичных miR-1, miR-133a, miR-208a и обладали низким уровнем экспрессии miR-302a, специфичной для плюрипотентных клеток. Это согласуется с ранее опубликованными данными по экспрессии генов в процессе кардиодифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека [34].

Ранее на различных клеточных моделях АКМП было показано, что в клетках, несущих ассоциированные с АКМП мутации, происходит активация сигнальных путей, регулирующих процессы фиброза и адипогенной дифференцировки [35–37]. В результате анализа экспрессии генов-регуляторов сигнальных путей в процессе кардиодифференцировки АКМП-иPSC нами не было обнаружено различий в экспрессии профибротических и проадипогенных генов между АКМП-кардиомиоцитами и контрольными кардиомиоцитами на раннем этапе дифференцировки. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что соответствующие сигнальные пути в используемой модели не были активированы. Полученные результаты согласуются с данными о важной роли внешней стимуляции в регуляции сигнальных

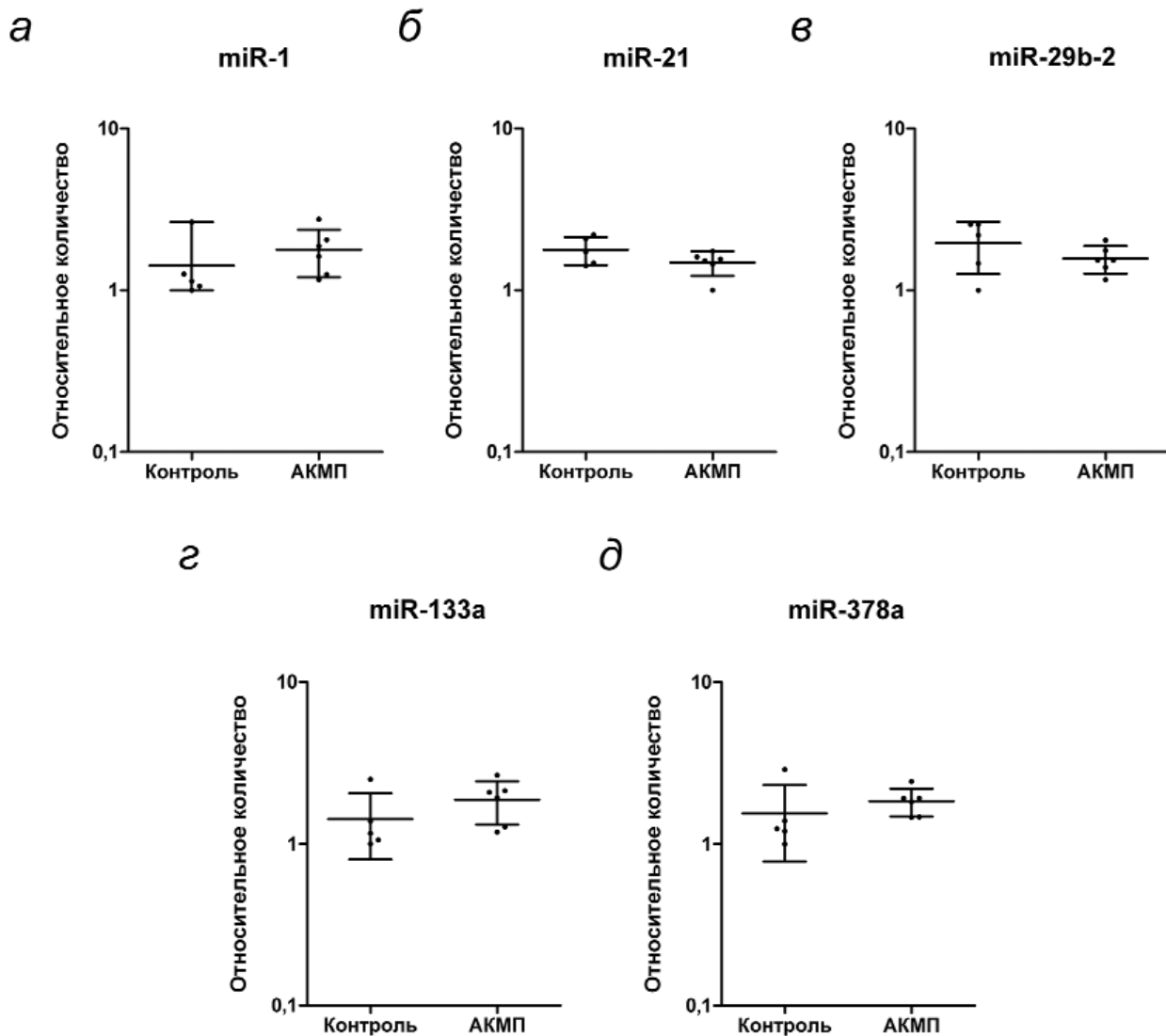


Рис. 3. Анализ экспрессии микроРНК в пациент-специфичных кардиомиоцитах. Анализ экспрессии miR-1 (а), miR-21 (б), miR-29b-2 (в), miR-133a (г) и miR-378a (д)

путей [37], а также участия других типов клеток миокарда, например, мезенхимных клеток, в развитии фенотипа АКМП [38].

При анализе уровней микроРНК во фракциях кондиционированной среды от кардиомиоцитов было обнаружено, что содержание микроРНК различается между фракциями. Уровни большинства исследованных микроРНК были в разы выше во фракции супернатанта. Эти данные согласуются с ранее опубликованными исследованиями, в которых было показано, что внеклеточные микроРНК часто находятся в составе белковых комплексов и микровезикул малого размера, не осаждаемых при использованном нами режиме центрифугирования [6–8].

В результате количественной оценки внеклеточных микроРНК было обнаружено повы-

шение уровней кардиоспецифичных miR-1 и miR-133a в кондиционированной среде от АКМП-кардиомиоцитов. Ранее было показано, что появление этих микроРНК в плазме является индикатором повреждения миокарда [39]. Также было установлено повышение внеклеточных уровней miR-21 и miR-29b-2, вовлеченных в регуляцию процессов фиброза. Известно, что miR-21 способствует развитию фиброза [40, 41], в то время как miR-29b-2 наряду с miR-133a, наоборот, осуществляют негативную регуляцию про-фибротических генов [42, 43]. В образцах кондиционированной среды от АКМП-кардиомиоцитов был повышен уровень miR-378a. Известно, что miR-378a экспрессируется в адипоцитах, играет важную роль в метаболизме жирных кислот и может являться индикатором по-

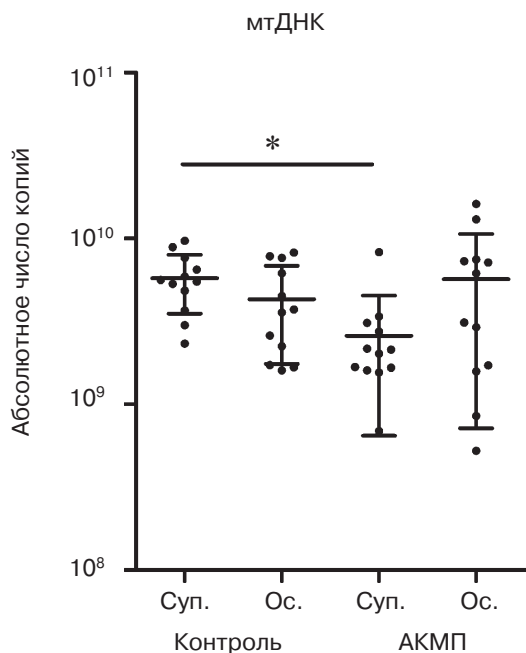


Рис. 4. Оценка уровня мтДНК в различных фракциях кондиционированной среды от пациент-специфичных кардиомиоцитов. Представлено абсолютное количество копий фрагмента мтДНК. Обозначения: Суп. – фракция супернатанта, Ос. – фракция осадка. * $p < 0,05$

явления жировых клеток или изменения метаболизма мышечных клеток, в т.ч. кардиомиоцитов [44].

С целью определения, являются ли обнаруженные изменения уровней микроРНК следствием усиления их секреции клеткой или результатом повышения количества этих микроРНК в клетках, была проведена оценка внутриклеточного содержания этих микроРНК. Уровни внутриклеточных микроРНК между АКМП-кардиомиоцитами и контролем не различались. Таким образом, можно предположить, что причиной наблюдаемых изменений в уровнях микроРНК в кондиционированной среде являются различия в регуляции секреции этих микроРНК.

Для проверки гипотезы о роли внеклеточной мтДНК в индукции воспаления в миокарде была проведена количественная оценка содержания внеклеточной мтДНК в кондиционированной среде от дифференцированных кардиомио-

цитов. Было показано снижение уровня мтДНК в образцах среды от АКМП-кардиомиоцитов. Полученные данные позволяют предположить, что развитие воспаления, наблюдаемое в патогенезе АКМП, не связано с секретируемой мтДНК.

Полученные результаты носят характер предварительного скрининга *in vitro*, в дальнейшем планируется их проверка и подтверждение на биологическом материале, полученном от пациентов с АКМП. Перспективным подходом является использование перикардиальной жидкости, омывающей миокард [45]. Использование перикардиальной жидкости позволит детектировать внеклеточные микроРНК и мтДНК, секретируемые непосредственно миокардом, что повысит специфичность их количественного измерения.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18-315-00177\18 мол_a).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Антону Федорову и Кириллу Кондратову за ценные рекомендации по планированию и постановке экспериментов с микроРНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thiene, G., Nava, A., Corrado, D., Rossi, L., and Pennelli, N. (1988) Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people, *N. Engl. J. Med.*, **318**, 129–133, doi: 10.1056/NEJM198801213180301.
2. Lazzarini, E., Jongbloed, J.D.H., Pilichou, K., Thiene, G., Basso, C., Bikker, H., Charbon, B., Swertz, M., van Tintelen, J.P., and van der Zwaag, P.A. (2015) The ARVD/C genetic variants database: 2014 update, *Hum. Mutat.*, **36**, 403–410, doi: 10.1002/humu.22765.
3. Corrado, D., Basso, C., and Thiene, G. (2009) Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: an update, *Heart*, **95**, 766–773, doi: 10.1136/hrt.2008.149823.

4. Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, **116**, 281–297, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
5. He, L., and Hannon, G.J. (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation, *Nat. Rev. Genet.*, **5**, 522–531, doi: 10.1038/nrg1379.
6. Sohel, M.H. (2016) Extracellular/circulating microRNAs: release mechanisms, functions and challenges, *Achiev. Life Sci.*, **10**, 175–186, doi: 10.1016/j.als.2016.11.007.
7. Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F., and Tewari, M. (2011) Argonaute 2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5003–5008, doi: 10.1073/pnas.1019055108.
8. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7223–7233, doi: 10.1093/nar/gkr254.
9. Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins, *Nat. Cell Biol.*, **13**, 423–433, doi: 10.1038/ncb2210.
10. Wagner, J., Riwanto, M., Besler, C., Knau, A., Fichtlscherer, S., Roxe, T., Zeiher, A.M., Landmesser, U., and Dimmeler, S. (2013) Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **33**, 1392–1400, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300741.
11. Sommariva, E., D'Alessandra, Y., Farina, F.M., Casella, M., Cattaneo, F., Catto, V., Chiesa, M., Stadiotti, I., Brambilla, S., Dello Russo, A., Carbucicchio, C., Vettor, G., Riggio, D., Sandri, M.T., Barbuti, A., Vernillo, G., Muratori, M., Dal Ferro, M., Sinagra, G., Moimas, S., Giacca, M., Colombo, G.I., Pompilio, G., and Tondo, C. (2017) MiR-320a as a potential novel circulating biomarker of arrhythmogenic cardiomyopathy, *Sci. Rep.*, **7**, 4802, doi: 10.1038/s41598-017-05001-z.
12. Zhang, H., Liu, S., Dong, T., Yang, J., Xie, Y., Wu, Y., Kang, K., Hu, S., Gou, D., and Wei, Y. (2016) Profiling of differentially expressed microRNAs in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, *Sci. Rep.*, **6**, 28101, doi: 10.1038/srep28101.
13. Sun, J.-Y., Huang, Y., Li, J.-P., Zhang, X., Wang, L., Meng, Y.-L., Yan, B., Bian, Y.-Q., Zhao, J., Wang, W.-Z., Yang, A.-G., and Zhang, R. (2012) MicroRNA-320a suppresses human colon cancer cell proliferation by directly targeting beta-catenin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **420**, 787–792, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.075.
14. Huang, K., Zhang, J.-X., Han, L., You, Y.-P., Jiang, T., Pu, P.-Y., and Kang, C.-S. (2010) MicroRNA roles in beta-catenin pathway, *Mol. Cancer*, **9**, 252, doi: 10.1186/1476-4598-9-252.
15. Hashimi, S.T., Fulcher, J.A., Chang, M.H., Gov, L., Wang, S., and Lee, B. (2009) MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation, *Blood*, **114**, 404–414, doi: 10.1182/blood-2008-09-179150.
16. Lin, C.-W., Chang, Y.-L., Chang, Y.-C., Lin, J.-C., Chen, C.-C., Pan, S.-H., Wu, C.-T., Chen, H.-Y., Yang, S.-C., Hong, T.-M., and Yang, P.-C. (2013) MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1, *Nat. Commun.*, **4**, 1877, doi: 10.1038/ncomms2876.
17. Yamada, S., Hsiao, Y.-W., Chang, S.-L., Lin, Y.-J., Lo, L.-W., Chung, F.-P., Chiang, S.-J., Hu, Y.-F., Tuan, T.-C., Chao, T.-F., Liao, J.-N., Lin, C.-Y., Chang, Y.-T., Te, A.L.D., Tsai, Y.-N., and Chen, S.-A. (2018) Circulating microRNAs in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with ventricular arrhythmia, *Europace*, **20**, f37–f45, doi: 10.1093/europace/eux289.
18. Sagan, L. (1967) On the origin of mitosing cells, *J. Theor. Biol.*, **14**, 255–274, doi: 10.1016/0022-5193(67)90079-3.
19. Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. (2001) The origin and early evolution of mitochondria, *Genome Biol.*, **2**, doi: 10.1186/gb-2001-2-6-reviews1018.
20. Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury, *Nature*, **464**, 104–107, doi: 10.1038/nature08780.
21. Chiu, R.W., Chan, L.Y., Lam, N.Y., Tsui, N.B., Ng, E.K., Rainer, T.H., and Lo, Y.M. (2003) Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma, *Clin. Chem.*, **49**, 719–726, doi: 10.1373/49.5.719.
22. Bliksoen, M., Mariero, L.H., Ohm, I.K., Haugen, F., Yndestad, A., Solheim, S., Seljeflot, I., Ranheim, T., Andersen, G.O., Aukrust, P., Valen, G., and Vinge, L.E. (2012) Increased circulating mitochondrial DNA after myocardial infarction, *Int. J. Cardiol.*, **158**, 132–134, doi: 10.1016/j.ijcard.2012.04.047.
23. Sudakov, N.P., Apartsin, K.A., Lepekhova, S.A., Nikiforov, S.B., Katyshev, A.I., Lifshits, G.I., Vybivantseva, A.V., and Konstantinov, Y.M. (2017) The level of free circulating mitochondrial DNA in blood as predictor of death in case of acute coronary syndrome, *Eur. J. Med. Res.*, **22**, 1, doi: 10.1186/s40001-016-0241-x.
24. Oka, T., Hikoso, S., Yamaguchi, O., Taneike, M., Takeda, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., Nakayama, H., Nishida, K., Akira, S., Yamamoto, A., Komuro, I., and Otsu, K. (2012) Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure, *Nature*, **485**, 251–255, doi: 10.1038/nature10992.
25. Ye, W., Tang, X., Yang, Z., Liu, C., Zhang, X., Jin, J., and Lyu, J. (2017) Plasma-derived exosomes contribute to inflammation via the TLR9-NF-kappaB pathway in chronic heart failure patients, *Mol. Immunol.*, **87**, 114–121, doi: 10.1016/j.molimm.2017.03.011.
26. Худяков А.А., Костина Д.А., Костарева А.А., Томили А.Н., Малашичева А.Б. (2015). Влияние мутаций в гене плакофиллина-2 на активность канонического сигнального пути Wnt, *Цитология*, **57**, 868–875.
27. Khudiyakov, A., Kostina, D., Zlotina, A., Yany, N., Sergushichev, A., Pervunina, T., Tomilin, A., Kostareva, A., and Malashicheva, A. (2017) Generation of iPSC line from patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy carrying mutations in PKP2 gene, *Stem Cell Res.*, **24**, 85–88, doi: 10.1016/j.scr.2017.08.014.
28. Burridge, P.W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N.M., Plevs, J.R., Abilez, O.J., Cui, B., Gold, J.D., and Wu, J.C. (2014) Chemically defined generation of human cardiomyocytes, *Nat. Methods*, **11**, 855–860, doi: 10.1038/nmeth.2999.
29. Rothfuss, O., Gasser, T., and Patenge, N. (2010) Analysis of differential DNA damage in the mitochondrial genome employing a semi-long run real-time PCR approach, *Nucleic Acids Res.*, **38**, e24, doi: 10.1093/nar/gkp1082.
30. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., and Zhang, C.-Y. (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases, *Cell Res.*, **18**, 997–1006, doi: 10.1038/cr.2008.282.

31. Gupta, S.K., Bang, C., and Thum, T. (2010) Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **3**, 484–488, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.958363.
32. Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B., Troisch, P., Brightman, A., Hu, Z., Hood, L.E., and Galas, D.J. (2009) Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4402–4407, doi: 10.1073/pnas.0813371106.
33. Casini, S., Verkerk, A.O., and Remme, C.A. (2017) Human iPSC-derived cardiomyocytes for investigation of disease mechanisms and therapeutic strategies in inherited arrhythmia syndromes: strengths and limitations, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **31**, 325–344, doi: 10.1007/s10557-017-6735-0.
34. Fu, J.-D., Rushing, S.N., Lieu, D.K., Chan, C.W., Kong, C.-W., Geng, L., Wilson, K.D., Chiamvimonvat, N., Boheler, K.R., Wu, J.C., Keller, G., Hajjar, R.J., and Li, R.A. (2011) Distinct roles of microRNA-1 and -499 in ventricular specification and functional maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, *PLoS One*, **6**, e27417, doi: 10.1371/journal.pone.0027417.
35. Dubash, A.D., Kam, C.Y., Aguado, B.A., Patel, D.M., Delmar, M., Shea, L.D., and Green, K.J. (2016) Plakophilin-2 loss promotes TGF- β 1/p38 MAPK-dependent fibrotic gene expression in cardiomyocytes, *J. Cell Biol.*, **212**, 425–438, doi: 10.1083/jcb.201507018.
36. Chen, S.N., Gurha, P., Lombardi, R., Ruggiero, A., Willerson, J.T., and Marian, A.J. (2014) The Hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy, *Circ. Res.*, **114**, 454–468, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302810.
37. Kim, C., Wong, J., Wen, J., Wang, S., Wang, C., Spiering, S., Kan, N.G., Forcales, S., Puri, P.L., Leone, T.C., Marine, J.E., Calkins, H., Kelly, D.P., Judge, D.P., and Chen, H.-S.V. (2013) Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs, *Nature*, **494**, 105–110, doi: 10.1038/nature11799.
38. Sommariva, E., Brambilla, S., Carbuicchio, C., Gambini, E., Meraviglia, V., Dello Russo, A., Farina, F.M., Casella, M., Catto, V., Pontone, G., Chiesa, M., Stadiotti, I., Cogliati, E., Paolin, A., Ouali Alami, N., Preziuso, C., D'Amati, G., Colombo, G.I., Rossini, A., Capogrossi, M.C., Tondo, C., and Pompilio, G. (2016) Cardiac mesenchymal stromal cells are a source of adipocytes in arrhythmogenic cardiomyopathy, *Eur. Heart J.*, **37**, 1835–1846, doi: 10.1093/eurheartj/ehv579.
39. Kuwabara, Y., Ono, K., Horie, T., Nishi, H., Nagao, K., Kinoshita, M., Watanabe, S., Baba, O., Kojima, Y., Shizuta, S., Imai, M., Tamura, T., Kita, T., and Kimura, T. (2011) Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **4**, 446–454, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.958975.
40. Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M.A., Licht, J.D., Pena, J.T.R., Rouhanifard, S.H., Muckenthaler, M.U., Tuschl, T., Martin, G.R., Bauersachs, J., and Engelhardt, S. (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts, *Nature*, **456**, 980–984, doi: 10.1038/nature07511.
41. Roy, S., Khanna, S., Hussain, S.-R.A., Biswas, S., Azad, A., Rink, C., Gnyawali, S., Shilo, S., Nuovo, G.J., and Sen, C.K. (2009) MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue, *Cardiovasc. Res.*, **82**, 21–29, doi: 10.1093/cvr/cvp015.
42. Van Rooij, E., Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13027–13032, doi: 10.1073/pnas.0608791103.
43. Matkovich, S.J., Wang, W., Tu, Y., Eschenbacher, W.H., Dorn, L.E., Condorelli, G., Diwan, A., Nerbonne, J.M., and Dorn, G.W. (2010) MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts, *Circ. Res.*, **106**, 166–175, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.202176.
44. Gerin, I., Bommer, G.T., McCoin, C.S., Sousa, K.M., Krishnan, V., and MacDougald, O.A. (2010) Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **299**, E198–206, doi: 10.1152/ajpendo.00179.2010.
45. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A.I.U., Rajakaruna, C., Laftah, A., Sessa, F., Spinetti, G., Petretto, E., Angelini, G.D., and Emanueli, C. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679–693, doi: 10.1016/j.ymthe.2016.12.022.

EXTRACELLULAR microRNA AND MITOCHONDRIAL DNA AS POTENTIAL BIOMARKERS OF ARRHYTHMOGENIC CARDIOMYOPATHY

A. A. Khudiakov^{1*}, N. A. Smolina¹, K. I. Perepelina^{1,2}, A. B. Malashicheva^{1,2}, and A. A. Kostareva¹

¹ Almazov National Medical Research Centre, 197341 St. Petersburg, Russia; E-mail: khudyakov_aa@almazovcentre.ru
² St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia

Received October 16, 2018

Revised December 3, 2018

Accepted December 3, 2018

Nowadays, differential diagnosis of arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM) during the latent phase of the disease is challenging. Thus, a search for early biomarkers of arrhythmogenic cardiomyopathy is of particular interest. Extracellular nucleic acids serve as reliable biomarkers of various diseases, since they are highly specific and stable, and they could be easily detected. In the present study, extracellular levels of miRNAs and mitochondrial DNA in conditioned medium from cardiomyocytes were evaluated. The ACM patient-specific iPSC-derived cardiomyocytes and matched healthy-control iPSC-derived cardiomyocytes were used. Differentially expressed microRNAs were revealed, suggesting their use as potential biomarkers of arrhythmogenic cardiomyopathy.

Keywords: arrhythmogenic cardiomyopathy, cardiomyocytes, microRNA, mitochondrial DNA, induced pluripotent stem cells