

МІКРОРНК-122 ЯК БІОЛОГІЧНИЙ МАРКЕР ХРОНІЧНОГО ВІРУСНОГО ГЕПАТИТУ С

Доц. О. П. ШЕВЧЕНКО-МАКАРЕНКО¹, проф. Л. Р. ШОСТАКОВИЧ-КОРЕЦЬКА¹,
проф. В. Є. ДОСЕНКО², канд. біол. наук Т. І. ДРЕВИЦЬКА²

¹ ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро,
² Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

Визначено рівень експресії мікроРНК-122 у хворих на хронічний вірусний гепатит С з першим генотипом HCV. Отримані дані вказують на те, що цей показник у хворих у 29 разів вищий, ніж у здорових осіб. Підкреслено перспективність використання показника експресії мікроРНК-122, що дасть змогу персоналізувати діагностику та лікувальну тактику у пацієнтів із хронічним вірусним гепатитом С.

Ключові слова: хронічний вірусний гепатит С, мікроРНК-122, елімінація вірусних гепатитів, біологічний маркер.

Захворюваність на хронічний вірусний гепатит С (ХВГС) у світі в цілому і зокрема в Україні залишається високою. Її рівень у Дніпропетровському регіоні підвищується щороку [1, 2]. У різних країнах світу докладається чимало зусиль щодо елімінації вірусних гепатитів. В Україні втілюється глобальна стратегія ВООЗ з елімінації вірусних гепатитів, основними напрямками якої є вплив на епідемічні процеси, діагностика та лікування ХВГС. Отже, всебічне вивчення патогенезу HCV-інфекції, імовірний вплив на фактори вірусу та/або його господаря, прогноз перебігу захворювання залишаються й нині актуальними. Досліджуються фіброз печінки, вміст вітаміну D тощо. [3, 4].

Наразі епігенетика вивчає спадкові зміни експресії генів чи фенотипу, не пов'язані зі змінами послідовності ДНК. Одним із напрямків епігенетики є експресія РНК, яка не кодує білок, а саме мікроРНК, що являє собою молекули довжиною 18–22 нуклеотиди, які відіграють вирішальну роль у регуляції експресії генів [5]. Циркуючі мікроРНК – це новий генетичний матеріал, який можна виділити з крові пацієнта. Позаклітинні мікроРНК у рідинах організму стабільні в жорстких умовах, включаючи кипіння, низький/високий рН, тривале зберігання і кілька циклів заморожування – відтавання [6]. MiRBase є основним публічним репозитарієм і онлайн-ресурсом для послідовностей та анотацій мікроРНК. На сьогоднішній день сімейство мікроРНК розширилося до понад 1900 анотованих попередників мікроРНК та 2654 зрілих послідовностей мікроРНК людини [7].

Рівень експресії певної мікроРНК має різні біологічний вплив та клінічний ефект. За допомогою його визначення у різноманітних мікроРНК можна спрогнозувати розвиток хвороб. Науковці наголошують на близько 100 печінкоспецифічних мікроРНК, деякі з них є потенційними індикаторами ушкодження гепатоцитів. Ряд мікроРНК

є життєво важливим компонентом вродженої противірусної імунної відповіді. Визначено, що мікроРНК-122 сприяє реплікації HCV в інфікованих клітинах, а підвищений рівень експресії мікроРНК-448, мікроРНК-196, Let-7b, навпаки, пригнічує реплікацію вірусу шляхом прямої дії на геном HCV в експерименті та шляхом прямого націлювання на кодуючі ділянки CORE і NS5A геному HCV, що може бути перспективним напрямком у лікуванні хворих [8]. Так, відмінні рівні експресії мікроРНК-122, мікроРНК-130, мікроРНК-183, мікроРНК-196, мікроРНК-209 і мікроРНК-96 є потенційними індикаторами ушкодження тканини печінки (через апоптоз, некроз і некроптоз) під час гострого/фульмінантного або хронічного гепатиту, фіброзу/цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми [9]. Подальший розвиток науки базується на епігенетичній терапії як новому напрямку в лікуванні хвороб, передусім в онкології та інфектології [10]. Проте функції багатьох мікроРНК при ХВГС ще до кінця не вивчено, особливо на українській когорті пацієнтів [11, 12].

Мета цього дослідження – встановити базовий рівень експресії мікроРНК-122 у хворих на хронічний вірусний гепатит С з першим генотипом HCV.

До дослідження було залучено 74 хворих на ХВГС із першим генотипом HCV у віковому діапазоні від 18 до 70 років; їх середній вік становив $47,5 \pm 1,4$ (M \pm m) року. Чоловіків було 38 (51,4%), жінок – 36 (48,6%). Середня тривалість захворювання від моменту вперше встановленого діагнозу ХВГС (Me, Q25; Q75) – 4 роки (2,0; 8,5), а в деяких випадках – 27 років. Середній індекс маси тіла (ІМТ), Me (Q25; Q75) обстежених становив 26,56 (23,30; 31,11). За соціодемографічними показниками пацієнти розподілились таким чином: мешканці обласного центру – 50 (67,57%), інших міст області – 20 (27,03%), сільських районів –

4 (5,41%). Ці 74 пацієнти увійшли до основної групи дослідження. Хворі перебували на лікуванні у КЗ «МКЛ № 21 імені проф. Є. Г. Попкової ДМР» (м. Дніпро, інфекційна лікарня). Встановлення діагнозу та моніторинг стану хворих проводилися згідно з наказом МОЗ України № 729 «Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при вірусному гепатиті С», локальними протоколами та біоетичними нормами. Рівень фіброзу визначали за результатами неінвазивних методів, що відповідають оцінці ступеня фіброзу за шкалою METAVIR, а саме: за лабораторними показниками FibroTest® (BioPredictive, Франція) (таблиця) та/або за оцінкою жорсткості (еластичності) тканини печінки інструментальним методом, за різними методиками ультразвукової компресійної еластографії печінки. За стадією фіброзу пацієнти розподілились таким чином: F1 – 25 (33,78%) осіб, F2 – 21 (28,38%), F3 – 11 (14,86%) та F4 – 17 (22,97%).

Рівень експресії мікроРНК-122 (синоніми: miR-122, hsa-miRNA-122), як і в наших попередніх роботах [11, 12], визначали відповідно до протоколу виробника за двоетапним дослідженням на базі відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України (м Київ). Спочатку тотальну РНК виділяли з плазми крові методом фенол-хлороформної екстракції, потім виконували зворотну транскрипцію з використанням набору TaqMan® (Applied Biosystems, США). Рівень miRNA розраховували за формулою $2^{-\Delta Ct}$, нормалізували до U6 snRNA і подавали в умовних одиницях.

Контрольну групу дослідження становили 11 здорових осіб, середній вік яких $38,5 \pm 5,5$ року, з них було 5 (45,5%) чоловіків і 6 (54,5%) жінок. Обидві групи обстежених були статистично порівнянними за статтю ($p = 0,715$ за критерієм χ^2) та віком ($p = 0,142$ t). Статистичну обробку даних проводили методом варіаційної статистики продуктами Microsoft Excel та пакета програм Statistica v. 6.1® (StatSoft, США, серійний номер AGAR909E415822FA). Кількісні дані було подано у вигляді діапазону значень (мінімум – максимум), середнього арифметичного і його стандартної похибки ($M \pm m$) при нормальному розподілі (критерій Шапіро – Уїлка), як медіану (Me) та інтерквартильний розмах (IQR: Q25; Q75) – в інших випадках. Для порівняння середніх величин застосовувалися критерії Стьюдента (t) і Манна – Уїтні (U), для відносних величин – двосторонній точний критерій Фішера (FET) для таблиць спряженості 2×2 і критерій χ^2 Пірсона – в інших випадках [3]. Критичний рівень статистичної значущості приймався $< 5\%$ ($p < 0,05$).

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи кафедри інфекційних хвороб ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» «Епігенетичні фактори виникнення хвороб, що асоціюються з персистуючими інфекціями

Основні лабораторні показники у пацієнтів із хронічним вірусним гепатитом С, Me (IQR: Q25; Q75)

Лабораторні показники	Хворі на ХВГС, $n = 74$
Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	4,61 (4,4; 5,06)
Гемоглобін, г/л	145,50 (135,00; 155,00)
Лейкоцити, $\times 10^9/л$	6,31 (5,0; 7,2)
Тромбоцити, $\times 10^9/л$	200,5 (166,5; 256)
Лімфоцити, абс./л	2,13 (1,65; 2,75)
Лімфоцити, %	35,1 (30,0; 43,35)
Нейтрофіли, абс./л	3,54 (2,72; 4,17)
АЛТ, Од/мл	58,28 (36,39; 106,62)
АСТ, Од/мл	48,72 (30,15; 78,56)
ГГТ, Од	54,00 (28,86; 121,00)
Лужна фосфатаза, Од	164,66 (87,60; 275,70)
Білірубін, мкмоль/л	14,95 (11,0; 18,32)
МНВ (міжнародне нормалізоване відношення), Од	1,07 (0,96; 1,12)
Загальний білок, г/л	75,00 (69,40; 79,13)
Альбумін, г/л	45,40 (41,80; 46,90)
Сироваткове залізо, ммоль/л	22,71 (15,48; 30,65)
Феритин, нг/мл	179,1 (90,99; 335,00)
Загальний холестерин, ммоль/л	4,33 (3,80; 5,11)
Креатинін, ммоль/л	82,2 (72,0; 93,45)
РНК HCV, log ₁₀ коп/мл	6,58 (6,03; 6,90)
РНК HCV, log ₁₀ МЕ/мл	6,01 (5,44; 6,32)

у дітей та дорослих» (номер державної реєстрації 0117u004785).

Після виділення тотальної РНК установлювали рівень експресії контрольного гена U6 в групах дослідження. У хворих на ХВГС його рівень варіював від 16,94 до 34,05 і в середньому становив $27,31 \pm 0,51$ ум. од. У контрольній групі показник змінювався в діапазоні від 23,91 до 29,26, у середньому ($M \pm m$) становив $26,95 \pm 0,47$. Достовірних відмінностей в обох групах не відзначено ($p = 0,609$ за критерієм t), що підтверджує незалежність рівня експресії U6 від патологічних станів (рис. 1).

Таким чином, отримані дані дають змогу застосовувати рівень експресії гена U6 як контрольний, з його допомогою можна встановити рівень експресії мікроРНК-122 як у здорових осіб, так і у пацієнтів із ХВГС.

Згідно з нашими даними, визначення рівнів експресії мікроРНК-122 у хворих на ХВГС і здорових осіб показало їх значну варіабельність. Медіана (Me (Q25; Q75)) рівня експресії miR-122 у хворих – 8,771 (1,110; 121,652), у здорових – 0,299 (0,006; 0,788) при $p = 0,0001$ (U ; Z) (рис. 2, а).

Десяткові логарифми показників базового рівня експресії miR-122 (Log₁₀) у хворих

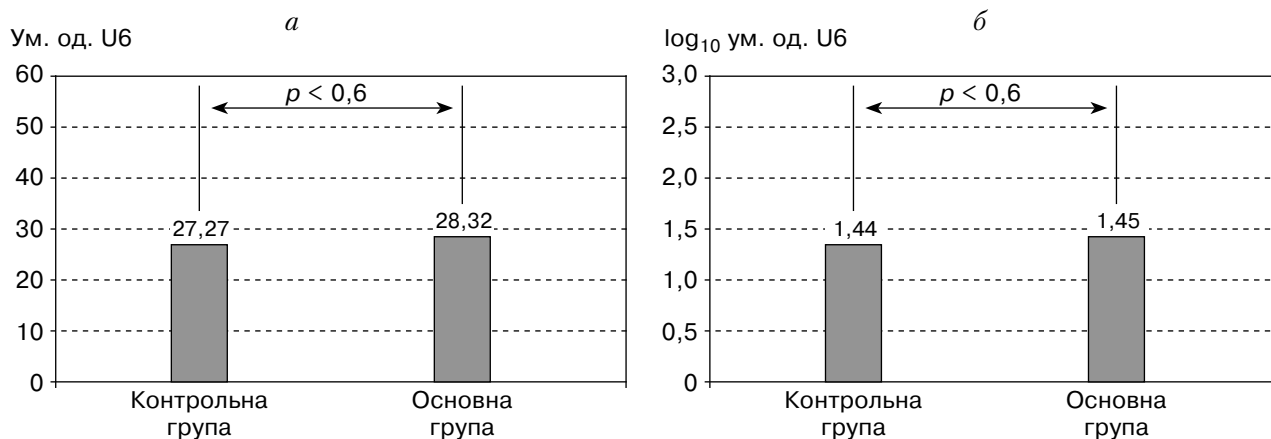


Рис. 1. Рівень експресії гена U6 у групах дослідження ($p = 0,609$); *a* – в ум. од., *б* – в \log_{10} U6 ум. од.; (Me; IQR)

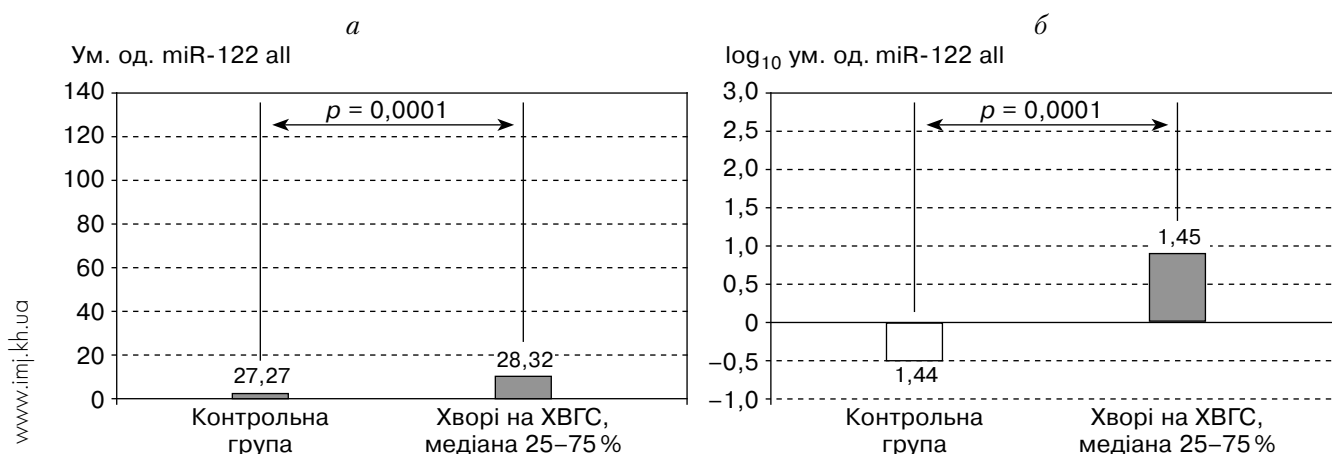


Рис. 2. Рівень експресії мікроРНК-122 у групах дослідження: *a* – в ум. од., *б* – в \log_{10} ум. од.; (Me; IQR)

становили – 0,939 (0,045; 2,085), у здорових осіб – –0,525 (–2,194; –0,104) при $p = 0,0001$ (U; Z) (рис. 2, б).

Отримані дані свідчать про те, що рівень експресії мікроРНК-122 у хворих у 29 разів вище, ніж у здорових осіб, що додає нових знань до розуміння патогенезу ХВГС. У цілому, наші дані підтверджують інші літературні джерела про наявність взаємозв'язку між HCV-інфекцією та профілем експресії мікроРНК-122 із діагностичним та прогностичним потенціалом. Поряд з іншими критеріями діагностики ХВГС мають враховуватись епігенетичні маркери, а саме – miR-122, що дає змогу персоніфікувати діагностику та лікувальну тактику у хворих.

Таким чином, ідентифікований нами профіль рівня експресії мікроРНК-122, зокрема його підвищення, в обстеженій когорті пацієнтів із першим генотипом HCV може стати в нагоді у діагностичній тактиці у хворих на ХВГС як в Україні, так і у світі. Потребує подальшої розробки тактика ведення хворих для модуляції продукції miR-122 та зменшення патологічних

проявів захворювання, які регулюються цим епігенетичним маркером.

Рівень експресії мікроРНК-122 у хворих у 29 разів перевищував показники здорових осіб, що може бути додатковим біомаркером як індикатор наявності ХВГС для подальшого застосування на практиці. Отримані дані свідчать, що високий рівень експресії мікроРНК-122 в обстежених осіб може бути підґрунтям для подальшого обстеження пацієнтів із HCV-інфекцією, що, у свою чергу, сприятиме втіленню глобальної стратегії ВООЗ щодо елімінації вірусних гепатитів та дасть змогу персоніфікувати лікувальну тактику для хворих на ХВГС.

Установлено, що при діагностиці та лікуванні пацієнтів із ХВГС поряд з основними клініко-лабораторними показниками та відомими критеріями діагнозу мають враховуватись епігенетичні маркери.

Перспективою подальших досліджень є вивчення прогностичного значення мікроРНК-122 у прогресуванні фіброзу печінки й формуванні проти-вірусної відповіді на терапію у хворих на ХВГС.

Список літератури

1. Захворюваність на хронічний гепатит С у структурі інших хронічних вірусних гепатитів у Дніпропетровському регіоні та Україні / О. П. Шевченко-Макаренко та ін. // Вісн. наукових досліджень. 2018. № 1. С. 156–160. doi: <https://doi.org/10.11603/2415-8798.2018.1.8791>
2. Шевченко-Макаренко О. П. Прогноз розвитку епідемічного процесу гепатиту С на 2018–2020 роки в Дніпропетровському регіоні та Україні // Інфекційні хвороби. 2018. № 2. С. 28–35. doi: <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2018.2.9031>
3. Малоинвазивная диагностика тяжести фибротических изменений печени у больных хроническим гепатитом С / В. Н. Козько и др. // Міжнародний медичний журн. 2019. Т. 25, № 1. С. 80–85. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Mmzh_2019_25_1_19
4. Порівняльний аналіз вмісту вітаміну D у хворих на хронічний вірусний гепатит С та здорових / Л. Р. Шостакович-Корецька та ін. // Медичні перспективи. 2019. Т. 24, № 4. С. 94–101. doi: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2019.4.189360>
5. Bollati V., Baccarelli A. Environmental epigenetics // Heredity. 2010. Vol. 105 (1). P. 105. doi: <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.2>
6. Circulating liver-specific microRNAs as noninvasive diagnostic biomarkers of hepatic diseases in human / G. Musaddaq, N. Shahzad, M. A. Ashraf, M. I. Arshad // Biomarkers. 2019. Vol. 24 (2). P. 103–109. doi: <https://doi.org/10.1080/1354750X.2018.1528631>. Epub 2018 Oct 23. PMID: 30252499
7. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function // Nucleic Acids Research. 2019. № 47. P. D155–D162. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
8. Chiraz Atri, Fatma Z. Guerfali, Dhafer Laouini. MicroRNAs in diagnosis and therapeutics // AGO-Driven Non-Coding RNAs. Chapter 6. 2019. P. 137–177. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815669-8.00006-3>
9. Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma / M. H. Ree et al. // Aliment. Pharmacol. Ther. 2016. Vol. 43. P. 102–113. doi: <https://doi.org/10.1111/apt.13432>
10. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases / X. Chen et al. // Cell Res. 2008. № 18. P. 997–1006. doi: <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
11. Шевченко-Макаренко О. П. Уровень експресії мікроРНК-29а у больных хроническим вирусным гепатитом С // Клиническая инфектология и паразитология. 2019. Т. 8, № 2. С. 229–235.
12. Шостакович-Корецька Л. Р., Шевченко-Макаренко О. П., Латикова-Бригинська Т. Ю. Базовий рівень експресії мікроРНК-196а у хворих на хронічний вірусний гепатит С з першим генотипом HCV // Гепатологія. 2019. №2 (44). С. 35–44. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/gepat_2019_2_7

МИКРОРНК-122 КАК БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАРКЕР ХРОНИЧЕСКОГО ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА С

О. П. ШЕВЧЕНКО-МАКАРЕНКО, Л. Р. ШОСТАКОВИЧ-КОРЕЦКАЯ,
В. Е. ДОСЕНКО, Т. И. ДРЕВИЦКАЯ

Определен уровень экспрессии микроРНК-122 у больных хроническим вирусным гепатитом С с первым генотипом HCV. Полученные данные указывают на то, что этот показатель у больных в 29 раз выше, чем у здоровых лиц. Подчеркнута перспективность использования показателя экспрессии микроРНК-122, что позволит персонафицировать диагностику и лечебную тактику у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, микроРНК-122, элиминация вирусных гепатитов, биологический маркер.

MICRORNA-122 AS A BIOLOGICAL MARKER OF CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

O. P. SHEVCHENKO-MAKARENKO, L. R. SHOSTAKOVYCH-KORETSKA,
V. E. DOSENKO, T. I. DREVIYTSKA

The expression level of miRNA-122 in the patients with chronic viral hepatitis C of the first HCV genotype has been determined. The data obtained demonstrate that in the patients this index was 29 times higher than in healthy individuals. The prospect of using the expression level of miRNA-122 was emphasized, which would allow the personalized diagnostics and therapeutic tactics in the patients with chronic viral hepatitis C.

Key words: chronic viral hepatitis C, miRNA-122, elimination of viral hepatitis, biological marker.

Надійшла 26.11.2019