

КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ МІКРОРНК-29А У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ВІРУСНИЙ ГЕПАТИТ С

О. П. ШЕВЧЕНКО-МАКАРЕНКО

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро, Україна

Виявлено аберантну гіперекспресію мікроРНК-29а у хворих на хронічний вірусний гепатит С. МікроРНК-29а може диференціювати таких пацієнтів із чутливістю і специфічністю моделі ROC-аналізу $Se = 67,57\%$ і $Sp = 90,91\%$, $DE = 79,24\%$ порівняно зі здоровими особами. Досліджено експресію мікроРНК-29а у пацієнтів із хронічним вірусним гепатитом С з невдалим досвідом противірусної терапії за схемами, що містять інтерферон.

Ключові слова: хронічний вірусний гепатит С, попередній досвід противірусної терапії, мікроРНК-29а, аберантна гіперекспресія.

Хронічний вірусний гепатит С (ХВГС) залишається актуальною проблемою в медицині, насамперед у гепатології. Україна приєдналася до світової стратегії елімінації вірусних гепатитів до 2030 р., але рівень захворюваності ще занадто високий, дотепер існує чимало не вирішених питань щодо моніторингу стану здоров'я хворих, прогнозу відповіді на противірусну терапію, розвитку небажаних наслідків, а саме — цирозу печінки або гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) [1, 2]. На це впливають різні фактори вірусу, хазяїна та зовнішнього середовища, і вчені продовжують виявляти нові ланки патогенезу хвороби. Нещодавно стала стрімко розвиватися нова наука — епігенетика. Відкрито новий клас молекул, які відіграють важливу роль у регуляції генів та міжклітинних взаємодіях, — мікроРНК [3]. Вивчення циркулюючих мікроРНК продовжується, вони щодня реєструються, тому їхня роль у хворих *in vivo* при різній патології ще потребує дослідження. Показано, що мікроРНК більш високоспецифічні порівняно з профілем мРНК та високо стабільні, що свідчить про придатність цих малих молекул як високоінформативних біомаркерів при злоякісних пухлинах та інших захворюваннях. [4]. У літературі описано, що мікроРНК-29а (синоніми: miR-29a, hsa-miRNA-29a) відіграє значну роль при патології печінки, апоптозі та фіброзоутворенні, а також пригнічує канцерогенез та метастазування ГЦК [5]. Антифібротична властивість мікроРНК-29а розглядається для подальшої розробки таргетної терапії хворих для проведення лікування фіброзу печінки прямої дії з високим профілем безпеки [6]. Але для пацієнтів із ХВГС їх активність вивчено ще недостатньо. Попередні дані встановлення рівня експресії мікроРНК-29а, мікроРНК-122а та мікроРНК-196а у хворих на ХВГС нами було опубліковано раніше [7–10]. Наступним кроком є подальше визначення рівня експресії мікроРНК-29а у зазначеної категорії хворих залежно від різних показників.

Мета цього дослідження — вивчити клінічне значення базового рівня експресії мікроРНК-29а

у хворих на ХВГС з першим генотипом HCV залежно від попереднього досвіду противірусної терапії (ПВТ) та інших чинників.

Дослідження проводилося за участю 74 хворих із першим генотипом хронічної HCV-інфекції, з яких жінок було 36 (48,6%), чоловіків — 38 (51,4%), середній вік обстежених — $47,5 \pm 1,4$ року, тривалість захворювання з моменту детекції HCV (Me) — 4,0 року (IQR: 2,0; 8,0). Пацієнти спотерігались у гепатологічному відділенні Дніпропетровської міської клінічної лікарні № 21 імені проф. Є. Г. Попкової та обстежувалися відповідно до клінічних протоколів та біоетичних норм із визначенням генотипу вірусу та вірусного навантаження HCV, рівня фіброзу печінки тощо. За ступенем фіброзу за шкалою METAVIR вони розподілились так: F1 — 25 (33,8%) випадків, F2 — 21 (28,4%), F3 — 11 (14,9%), F4 — 17 (22,9%). Контрольну групу становили 11 здорових осіб, а саме — 6 (54,5%) жінок та 5 (45,5%) чоловіків зі середнім віком $38,5 \pm 5,5$ року. Обстежені групи були статистично спільномірними за статтю ($p = 0,715$ за критерієм χ^2) та віком ($p = 0,142$ *t*). Вірусне навантаження РНК HCV (Me) мало значні коливання: 1 019 700 (IQR: 274 642; 2 090 000) МО/мл; 3 700 000 (IQR: 1 220 000; 6 887 840) коп/мл. У дослідження увійшли 53 наївних пацієнти та 21 хворий, які мали невдалу ПВТ схемами, що містять інтерферон. Серед них не відповідали на лікування 4 (19,0%) хворих, часткову вірусологічну відповідь отримали у 3 (14,3%), рецидив захворювання через 6 міс і більше після закінчення терапії зареєстровано у 14 (66,7%). Пацієнти отримували ПВТ від 1 до 7 років тому, у середньому 2 (2; 3) роки. Обидві групи були статистично порівнянними за статтю ($p = 0,610$ за критерієм FET) та віком пацієнтів ($p = 0,074$ *t*).

Рівень експресії мікроРНК-29а (hsa-miRNA-29a, miR-29a) визначався згідно з протоколом виробника на базі відділу загальної та молекулярної патології Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України (м. Київ) з використанням набору мікроРНК TaqMan® (Applied Biosystems,

США). Як ендogenous контрольний ген використовували snRNA U6. Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) в реальному часі проводили з використанням аналізу мікроРНК TaqMan® (Applied Biosystems, США): hsa-miR-29a та snRNA U6. Термічні цикли ампліфікації ПЛР були ідентичні виявленню pri-miRNA. Рівень miRNA розраховували за формулою $2^{-\Delta Ct}$, де Ct – пороговий цикл ампліфікації, нормалізували до гену «домашнього господарства» U6 snRNA і подавали в умовних одиницях (УО) [9, 10].

Статистична обробка даних проводилась за допомогою програмного продукту Statistica v.6.1® (StatSoft, США) (серійний номер AGAR909E415822FA). MedCalc v.19.0.7 (free trial; режим доступу: <https://medcalc.org>). Кількісні дані подано у вигляді діапазону значень (мінімум – максимум), середнього арифметичного і його стандартної помилки ($M \pm m$) при нормальному розподілі (критерій Шапіро – Уїлка) та як медіану (Me) з інтерквартильним розмахом (IQR: Q25; Q75) – в інших випадках, 95% довірчого інтервалу для середньої (95% ДІ). Для порівняння середніх величин застосовувалися критерії Стюдента (t) і Манна – Уїтні (U), Краскела – Уолліса (H), для відносних величин – двосторонній точний критерій Фішера (FET) для таблиць спряженості 2×2 і критерій χ^2 Пірсона в інших випадках. Взаємозв'язок між ознаками оцінювався за коефіцієнтами рангової кореляції Спірмена (r_s), за достовірне приймалось $p < 0,001$ та $p < 0,05$. Діагностичну цінність рівня експресії мікроРНК-29a для оптимізації прогнозування відповіді на ПЛТ та призначення оптимальної терапії для проблемних хворих із невдалою терапією за лікувальними схемами, що містять інтерферон, визначали за допомогою ROC-кривих (англ. *Receiver Operating Characteristic*) з розрахунком операційних характеристик ROC-аналізу: площа під ROC-кривою – AUC (англ. *Area Under ROC Curve*) з довірчим інтервалом (СІ 95%), індекс Юдена (Youden index – J), чутливість (Se), специфічність (Sp) і діагностична ефективність (ДЕ) моделі. За критичний рівень статистичної значущості приймалося $< 5\%$ ($p < 0,05$).

Нами було визначено аберантну гіперекспресію мікроРНК-29a у хворих на ХВГС, що в 20,6 разу перевищує показник у групі контролю порівняно зі здоровими особами [7]. Медіана рівня експресії miR-29a у всіх хворих становить 44,59 (IQR: 12,50; 188,68) УО й у здорових осіб – 2,16 (IQR: 0,71; 21,54) УО при $p < 0,001$ за критерієм U , що має статистично значущий характер. Медіани десяткових логарифмів показників у хворих на ХВГС та здорових осіб становлять відповідно 1,65 (IQR: 1,10; 2,28) і 0,34 (IQR: –0,15; 1,33) УО. Це дає змогу розглянути мікроРНК-29a як діагностичний молекулярно-генетичний біомаркер при верифікації ХВГС.

Високий або достовірно низький рівень наявності ХВГС прогнозують, якщо рівень експресії

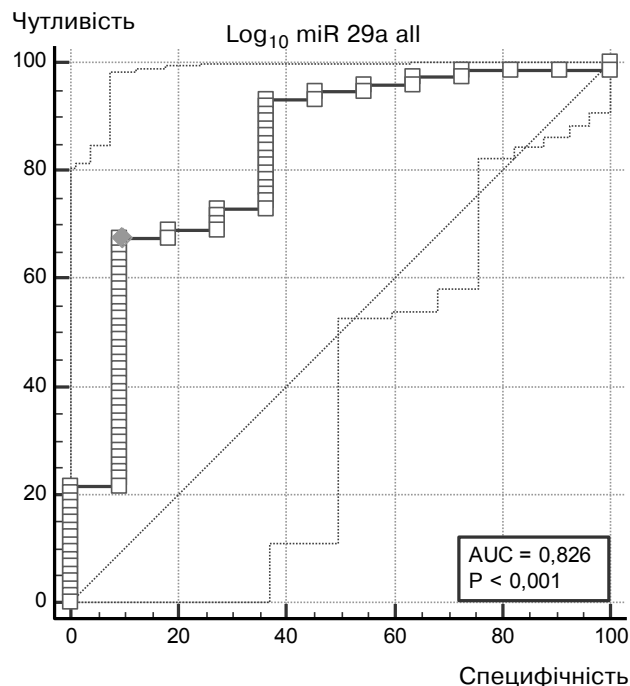


Рис. 1. ROC-крива з СІ 95% оцінки рівня експресії miR-29a у плазмі крові пацієнтів із хронічним вірусним гепатитом С та індекс Юдена (J) залежно від досвіду попереднього лікування схемами протівірусної терапії, що містять інтерферон

для miR-29a становить $\geq 22,96$ чи $< 22,96$ УО або для Log_{10} miR-29a дорівнює $\geq 1,36$ чи $< 1,36$ УО відповідно. На рис. 1 зображено ROC-криву з СІ 95% щодо оцінки рівня експресії мікроРНК-29a (miR-29a) у плазмі крові пацієнтів із ХВГС та індекс Юдена (J), залежний від наявності ХВГС.

Проведений ROC-аналіз показав, що досліджувана мікроРНК-29a може диференціювати пацієнтів із ХВГС із першим генотипом HCV із площею, обмеженою ROC-кривою і віссю частки помилкових позитивних класифікацій, AUC = 0,826 (95% СІ 0,728–0,899; $< 0,0001$), J = 0,58, що показує високу якість цього класифікатора. Критичними точками відсікання пацієнтів із ХВГС є рівень експресії Log_{10} мікро-РНК-29a $\geq 1,36$ або $\geq 22,96$ УО для miR-29a. Чутливість і специфічність моделі для диференціювання наявності ХВГС становили Se = 67,57% і Sp = 90,91%, ДЕ = 79,24%. Результати дослідження дають змогу припустити, що досліджена мікро-РНК-29a має значення оцінюваного біомаркера для хворих на ХВГС із першим генотипом HCV.

Подальше встановлення рівня експресії мікроРНК-29a у різних групах пацієнтів із ХВГС залежно від ступеня фіброзу печінки, вірусного навантаження HCV, терміну хвороби від моменту детекції HCV, демографічних показників, гендерних ознак, ранньої вірусологічної відповіді та попереднього досвіду лікування і схеми призначеної протівірусної терапії показало їх значну варіабельність. Нами не було виявлено достовірної різниці між рівнями експресії мікроРНК-29a

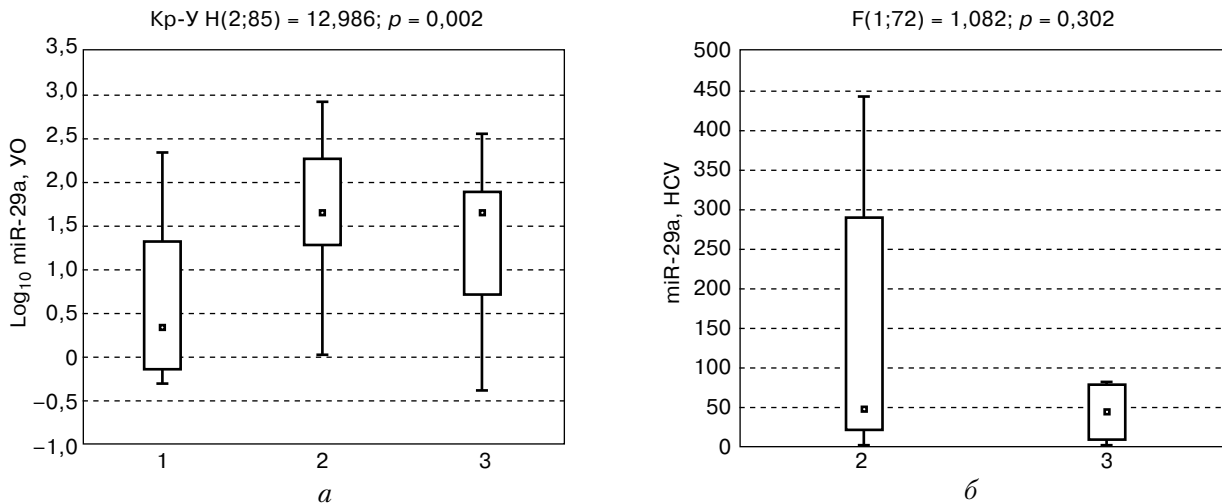


Рис. 2. Середній рівень експресії miR-29a ($\text{Log}_{10} \text{miR-29a, YO}$) у плазмі крові наївних пацієнтів із хронічним вірусним гепатитом С ($n = 53$) та з невдачею противірусної терапії за схемами, що містять інтерферон ($n = 21$); вказано Ме (IQR), відрізки мінімуму – максимуму; 1 – контрольна група, 2 – наївні пацієнти, 3 – хворі на хронічний вірусний гепатит С із невдачею противірусної терапії за схемами, що містять інтерферон; а – ($p = 0,002, H$); б – ($p = 0,302$)

у групі хворих залежно від статі ($p = 0,940$), віку ($p = 0,473$), терміну хвороби від моменту детекції HCV ($p = 0,771$), місцем проживання (міські або сільські мешканці) ($p = 0,222$), вірусного навантаження HCV ($p = 0,505$), схеми призначеної ПВТ із застосуванням препаратів прямої дії ($p = 0,290$) та швидкої вірусологічної відповіді на ці схеми ($p = 0,304$).

Далі вивчався рівень експресії мікроРНК-29а залежно від попереднього досвіду ПВТ у хворих (рис. 2).

Десятьковий алгоритм рівня експресії мікроРНК-29а (Ме (IQR)) у наївних пацієнтів із ХВГС становив 1,65 (1,27; 2,28) УО, мінімум – максимум – від 0,02 до 2,92 УО та у хворих на ХВГС із невдачею ПВТ на схеми, що містять інтерферон, – 1,64 (0,79; 2,20) УО, мінімум – максимум – від -0,39 до 2,56 УО порівняно з контрольною групою ($p = 0,002, H$), що може відображати потенційний механізм персистенції HCV-інфекції. Зниження рівня експресії miR-29а може слугувати додатковим біомаркером при прогнозі наслідків лікування схемами, що містять інтерферон, у хворих на ХВГС. Водночас рівень експресії мікроРНК-29а (Ме (IQR)) у наївних пацієнтів із ХВГС становив 45,16 (19,52; 192,41) УО, мінімум – максимум – від 1,06 до 827,60 УО, у хворих на ХВГС із невдачею ПВТ на схеми, що містять інтерферон, – 44,02 (6,42; 168,56) УО, мінімум – максимум – від 0,41 до 363,83 УО; не було виявлено достовірної різниці між групами, а тільки тенденцію до зв'язку ($p = 0,302$). Це може свідчити про те, що при збільшенні кількості спостережень достовірність різниці між групами більш імовірна. Отримані дані можна зіставити з результатами досліджень інших авторів, де брали участь хворі на ХВГС, що відповіли на лікування, та пацієнти з невда-

чею лікування інтерфероном [1], і припустити, що у групі наївних хворих більшу частку становлять особи зі сприятливим генотипом інтерлейкіну 28- β (проти несприятливого генотипу у пацієнтів, які не відповіли на терапію) та інших факторів, тому і є велика вірогідність відповіді на ПВТ зі схемами, що містять інтерферон.

Все зазначене створює можливість розглядати мікроРНК-29а як новий доступний біомаркер, який може широко застосовуватись у клінічній практиці для раннього визначення та моніторингу хронічної HCV-інфекції, оскільки не потребує додаткового устаткування лабораторії та навчання персоналу. Таким чином, дані, отримані у результаті проведеного дослідження й аналізу рівня експресії мікроРНК-29а, дають змогу зробити такі висновки.

Вперше на українській когорті досліджено рівень експресії мікроРНК-29а у хворих на ХВГС із першим генотипом HCV та виявлено аберантну гіперекспресію мікроРНК-29а у хворих порівняно зі здоровими особами ($p < 0,001$).

МікроРНК-29а може диференціювати пацієнтів із ХВГС із першим генотипом HCV з площею, обмеженою ROC-кривою і віссю частки помилкових позитивних класифікацій, $AUC = 0,826$ (95% СІ 0,728–0,899; $< 0,0001$), $J = 0,58$. Критичними точками відсікання пацієнтів із наявністю ХВГС є рівень експресії $\text{Log}_{10} \text{мікро-РНК-29a} \geq 1,36$ або $\geq 22,96$ УО для miR-29a. Чутливість і специфічність моделі для диференціювання наявності ХВГС становили $Se = 67,57\%$ і $Sp = 90,91\%$, $DE = 79,24\%$.

Проведений аналіз показав, що більшість клініко-лабораторних даних не впливає на рівень експресії мікроРНК-29а у хворих на ХВГС. Він відрізнявся у групах залежно від попереднього

досвіду ПВТ у наївних пацієнтів та у хворих на ХВГС із невдачею її проведення за схемами, що містять інтерферон, порівняно з контролем ($p = 0,002$, H), що може відображати потенційний механізм персистенції HCV-інфекції.

Перспектива подальших розробок полягає у вивченні виявленого взаємозв'язку рівня експресії мікроРНК-29а у хворих на ХВГС із різними стадіями фіброзу печінки та при ГЦК для розробки алгоритмів ефективного менеджменту хворих.

Список літератури

1. WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 2000–2015. January 2017 (2017). Access mode: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalDALYmethods_2000_2015.pdf
2. 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>
3. 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>
4. miR-29a suppresses the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma through IFITM3 / Y. Liang et al. // Oncology Reports. 2018. Vol. 40, № 6. P. 3261–3272. doi: <https://doi.org/10.3892/or.2018.6745>
5. 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>
6. MikroRNS-ek a hepatocarcinogenesisben [MicroRNAs in hepatocarcinogenesis] / G. Lendvai, A. Kiss, I. Kovalszky, Z. Schaff // Orv. Hetil. 2012. Vol. 153, № 25. P. 978–989. doi: 10.1556/ON.2012.29387
7. Шевченко-Макаренко О. П. Уровень експресии мікроРНК-29а у больних хроническим вирусным гепатитом С // Клиническая инфектология и паразитология. 2019. Т. 8, № 2. С. 229–235.
8. Шостакович-Корецька Л. Р., Шевченко-Макаренко О. П., Лапикова-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
9. МікроРНК-122 як біологічний маркер хронічного вірусного гепатиту С / О. П. Шевченко-Макаренко, Л. Р. Шостакович-Корецька, В. Є. Досенко, Т. І. Древицька // Міжнародний медичний журн. 2020. Т. 26, № 1 (101). С. 72–75 doi: <https://doi.org/10.37436/2308-5274-2020-1-16>
10. Shostakovych-Koretskaya L., Shevchenko-Makarenko O., Lapikova-Bryhinska T. The level of expression of miR-196a in patients with chronic viral hepatitis C with the first genotype of HCV according to previous experience of antiviral therapy // Медичні перспективи. 2020. Т. 25, № 2. С. 130–137. doi: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2020.2.206387>

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК-29А У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

О. П. ШЕВЧЕНКО-МАКАРЕНКО

Обнаружена aberrantная гиперэкспрессия miRNA-29a у больных хроническим вирусным гепатитом С. МикроРНК-29а может дифференцировать таких пациентов с чувствительностью и специфичностью модели ROC-анализа $Se = 67,57\%$ и $Sp = 90,91\%$, $DE = 79,24\%$ по сравнению со здоровыми лицами. Исследована экспрессия микроРНК-29а у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С с неудачным опытом противовирусной терапии по схемам, содержащим интерферон.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, предшествующий опыт противовирусной терапии, микроРНК-29а, aberrantная гиперэкспрессия.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF EXPRESSION RATE OF MIRNA-29A IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

O. P. SHEVCHENKO-MAKARENKO

Aberrant hyperexpression of miRNA-29a in the patients with chronic viral hepatitis C was detected. MicroRNA-29a can differentiate such patients with sensitivity and specificity of the ROC analysis model $Se = 67.57\%$ and $Sp = 90.91\%$, $DE = 79.24\%$ compared with healthy people. The expression of miRNA-29a in the patients with chronic viral hepatitis C with a failed experience of antiviral therapy with interferon-containing regimens was studied.

Key words: chronic viral hepatitis C, previous experience of antiviral therapy, miRNA-29a, aberrant hyperexpression.

Надійшла 29.07.2020