

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-3-33-38

ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РЕЦИПИЕНТОВ ЛЕГКИХ

О.П. Шевченко^{1, 2}, О.М. Цирульникова^{1, 2}, О.Е. Гичкун^{1, 2}, И.В. Паиков¹,
С.О. Шарапченко¹, Д.А. Великий¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

МикроРНК – это широкий спектр стабильных в сыворотке (плазме) крови малых молекул РНК, уровень экспрессии которых связан с выраженностью и характером физиологических и патологических процессов в организме. **Цель** настоящего исследования – оценить уровень экспрессии микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) у потенциальных реципиентов легких, страдающих хроническими заболеваниями легких различной этиологии в терминальной стадии. **Материалы и методы.** В исследование включены 16 пациентов с терминальной стадией хронических заболеваний легких (потенциальных реципиентов легких) в возрасте от 4 до 74 лет (в среднем 36 ± 18), среди которых двое детей (12,5%) – девочки 4 и 14 лет, а также 14 взрослых пациентов от 21 до 74 (40 ± 16) лет, 6 (42,9%) мужчин и 8 женщин. Группу сравнения составили 12 здоровых лиц. Основными заболеваниями, послужившими причиной развития тяжелой дыхательной недостаточности, являлись: муковисцидоз ($n = 5$), первичная легочная артериальная гипертензия (ПЛАГ; $n = 4$), легочный фиброз различной этиологии (идиопатический легочный фиброз – 1; легочный фиброз в исходе экзогенного аллергического альвеолита – 1; постлучевой легочный фиброз – 1), лимфангиолейомиоматоз ($n = 2$), гистиоцитоз ($n = 1$) и эмфизема легких ($n = 1$). Методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) оценен уровень экспрессии микроРНК в плазме крови в соответствии с инструкцией к наборам реагентов (Qiagen, США). **Результаты.** У пациентов, ожидающих трансплантации легких, уровни экспрессии miR-27, miR-101 и miR-339 достоверно выше, чем у здоровых лиц. Экспрессия отдельных видов микроРНК отличалась в зависимости от этиологии заболевания: при муковисцидозе наблюдались более высокие уровни miR-27, miR-101, miR-142 и miR-339; у пациентов, страдающих прочими патологиями легких, – только miR-101. Уровень экспрессии miR-424 не отличался от такового у здоровых лиц и в подгруппах пациентов с различной этиологией заболевания. **Заключение.** Полученные результаты позволяют выделить особенности экспрессии ряда микроРНК miR-27, miR-101, miR-142 и miR-339 при определенных патологических состояниях легких и сделать предположение о возможном диагностическом значении измерения профилей экспрессии данных молекул у пациентов с хронической дыхательной недостаточностью на этапе дотрансплантационного обследования.

Ключевые слова: микроРНК, биомаркер, miR-27, miR-101, miR-142, miR-339, miR-424, муковисцидоз, хроническая дыхательная недостаточность.

Для корреспонденции: Шарапченко Софья Олеговна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (495) 190-35-62. E-mail: transplant2009@mail.ru

For correspondence: Sharapchenko Sofya Olegovna. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel. (495) 190-35-62. E-mail: transplant2009@mail.ru

PROFILING MICRORNA IN THE POTENTIAL LUNG RECIPIENTS

O.P. Shevchenko^{1, 2}, O.M. Tsurulnikova^{1, 2}, O.E. Gichkun^{1, 2}, I.V. Pashkov¹, S.O. Sharapchenko¹, D.A. Velikiy¹

¹ V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovsky University), Moscow, Russian Federation

MicroRNA – are small molecules stable in blood serum (plasma) samples. Their expression is associated with the severity and nature of physiological and pathological processes in the body. **Aim:** to assess the expression levels of five microRNAs (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 and miR-424) in plasma in patients with chronic lung diseases of different etiology in the terminal stage. **Materials and methods.** The study included 16 patients with end-stage lung diseases aged 4 to 74 (36 ± 18): two children (12.5%) – girls 4 and 14 years, and 14 adults aged 21 to 74 (40 ± 16) years, 6 (42.9%) men and 8 women. The control group consisted of 12 healthy individuals. The main diseases that caused the development of severe respiratory failure were: cystic fibrosis ($n = 5$), pulmonary arterial hypertension (PAH; $n = 4$), pulmonary fibrosis of various etiologies (idiopathic pulmonary fibrosis – 1; pulmonary fibrosis in the outcome of exogenous allergic alveolitis – 1; post-radiation pulmonary fibrosis – 1), lymphangiomyomatosis ($n = 2$), histiocytosis ($n = 1$) and pulmonary emphysema ($n = 1$). The microRNA expression was detected by real-time PCR in accordance with the instructions (Qiagen, USA). **Results.** The levels of miR-27, miR-101 and miR-339 in potential lung recipients were significantly higher than in healthy individuals. The levels differed depending on the etiology of diseases: in patients with cystic fibrosis the levels of miR-27, miR-101, miR-142 and miR-339 were higher than in healthy individuals; in patients with other lung pathologies – only miR-101. The level of miR-424 in healthy individuals did not differ from that in potential lung recipients or in subgroups. **Conclusion.** The obtained results show the features of the miR-27, miR-101, miR-142 and miR-339 levels in certain lung pathological conditions and suggest a possibility of diagnostic value in patients with chronic respiratory failure at the stage of pretransplant examination.

Key words: miRNA, biomarker, miR-27, miR-101, miR-142, miR-339, miR-424, cystic fibrosis, chronic respiratory failure.

МикроРНК – это широкий спектр стабильных в сыворотке (плазме) крови малых некодирующих молекул РНК, выполняющих регуляторные функции, уровень экспрессии которых связан с выраженностью и характером физиологических и патологических процессов в организме [1–3]. В этом контексте предполагается, что данные об изменении экспрессии отдельных видов микроРНК у реципиентов солидных органов могут быть полезны для ранней, доклинической диагностики посттрансплантационных осложнений [4, 5]. Установлено, что имеет место изменение экспрессии отдельных видов микроРНК при отторжении трансплантированных солидных органов [6, 7].

Трансплантация легких (ТЛ) является эффективным методом лечения хронических заболеваний легких в терминальной стадии, таких как первичная легочная артериальная гипертензия (ПЛАГ), муковисцидоз, хроническая обструктивная болезнь легких и другие.

Несмотря на значительные достижения в области хирургической техники и совершенствование иммуносупрессивной терапии, позволившие увеличить выживаемость и улучшить качество жизни реципиентов солидных органов, актуальной задачей является поиск и валидизация биомаркеров, потенциально

пригодных для неинвазивной или малоинвазивной диагностики посттрансплантационных осложнений и прогнозирования отдаленных клинических результатов [8–9].

Цель исследования – оценить уровень экспрессии микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) у пациентов, страдающих хроническими заболеваниями легких различной этиологии в терминальной стадии, – потенциальных реципиентов легких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 16 пациентов с терминальной стадией хронических заболеваний легких в возрасте от 4 до 74 лет (в среднем 36 ± 18), среди которых двое детей (12,5%) – девочки 4 и 14 лет, а также 14 взрослых пациентов от 21 до 74 (40 ± 16) лет, 6 (42,9%) мужчин и 8 женщин. Основными заболеваниями, послужившими причиной развития тяжелой дыхательной недостаточности, являлись: муковисцидоз ($n = 5$), ПЛАГ ($n = 4$), легочный фиброз различной этиологии (идиопатический легочный фиброз – 1; легочный фиброз в исходе экзогенного аллергического альвеолита – 1; постлучевой легочный фиброз – 1), лимфангиолейомиоматоз ($n = 2$), гистиоцитоз ($n = 1$) и эмфизема легких ($n = 1$). Группу

сравнения составили 12 здоровых лиц. Средний возраст и соотношение мужчин и женщин в группе сравнения не отличались от таковых в основной группе.

Выделение микроРНК из плазмы периферической крови

Образцы периферической крови пациентов собирали в одноразовые пробирки с антикоагулянтом этилендиаминуксусной кислотой (ЭДТА), центрифугировали в течение 10 минут при 3000 оборотов в минуту. Плазму крови отделяли от клеточного осадка и незамедлительно замораживали при -20°C . РНК выделяли из 100 мкл плазмы крови с использованием наборов SerumPlasma (Qiagen, США) с предварительным добавлением $1,6 \times 10^8$ копий синтетической микроРНК cel-miR-39 (Qiagen) после инкубации плазмы с фенольной смесью Qiazol. Cel-miR-39 использовали в качестве внутреннего контроля эффективности выделения РНК, синтеза комплементарной ДНК (кДНК) и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Обратная транскрипция и количественная ПЦР в режиме реального времени

МикроРНК из каждого образца конвертировали в кДНК в реакционной смеси (20 мкл), содержащей буфер 1xmiScriptHiSpecBuffer, нуклеотидную смесь 1xmiScriptNucleicsMix, при $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 60 минут с последующей инкубацией при 95°C в течение 5 минут, охлаждением на льду и доведением объема образца деионизированной водой до 200 мкл. Синтезированная кДНК (2 мкл) служила в качестве матрицы в ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, специфичных для исследуемых микроРНК: miR-27, miR-101, miR-142, miR-339, miR-424, cel-miR-39 (miScriptPrimerassay, Ce_miR-39_1, Qiagen) и набора miScriptSYBRGreenPCRKit (Qiagen). Условия реакции ПЦР: 15 минут при $t = 95^{\circ}\text{C}$ с последующим проведением 40 циклов по 15 секунд при $t = 94^{\circ}\text{C}$, 30 секунд при $t = 55^{\circ}\text{C}$ и 30 секунд при $t = 70^{\circ}\text{C}$ в амплификаторе CFX 96 (BioRad). Интенсивность экспрессии микроРНК выражалась в относительных единицах, эквивалентных $2^{-\Delta\text{Ct}}$, где ΔCt – рабочие значения изменения цикла получения продукта относительно внутреннего контроля экспрессии микроРНК cel-miR-39.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных результатов был проведен при помощи пакета прикладных программ Statistica v.13.0, StatSoftInc. (США). Применялись корреляции Спирмена и U-критерий Манна–Уитни для сравнения независимых переменных. Критический уровень значимости принят рав-

ным 5%, и нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$. Проведена проверка полученных показателей экспрессии на нормальность распределения значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов с тяжелой дыхательной недостаточностью, развившейся в исходе хронических заболеваний легких, показатели экспрессии микроРНК варьировали в широком диапазоне. Распределение значений отличалось от нормального, поэтому в настоящей работе результаты представлены значениями медианы и интерквартильного размаха, выраженными в относительных единицах (отн. ед.). В табл. 1 представлены результаты сравнительного анализа уровней экспрессии пяти исследованных видов микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) у лиц мужского и женского пола, страдающих заболеваниями легких, и указан уровень достоверности различий между ними (p).

Таблица 1

Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК в плазме крови пациентов мужского и женского пола

Comparative analysis of microRNA levels in male and female patients

МикроРНК	Пол		Достоверность различий (p)
	Мужской (n = 6)	Женский (n = 10)	
miR-27	0,071 [0,059; 0,33]	0,030 [0,016; 0,067]	0,09
miR-101	0,057 [0,031; 0,083]	0,046 [0,022; 0,057]	0,63
miR-142	0,011 [0,007; 0,072]	0,006 [0,003; 0,011]	0,31
miR-339	0,023 [0,001; 0,130]	0,004 [0,001; 0,076]	0,43
miR-424	0,007 [0,005; 0,014]	0,002 [0,001; 0,008]	0,12

Примечание. Данные представлены в виде: медиана [интерквартильный размах].

Анализ уровней экспрессии исследуемых микроРНК у потенциальных реципиентов легких показал отсутствие гендерных различий.

В табл. 2 указаны результаты анализа связи уровня экспрессии микроРНК с возрастом пациентов, ожидающих трансплантации легких.

Установлена значимая обратная корреляция уровня экспрессии miR-27 с возрастом больных ($r = -0,50$, $p = 0,04$); для остальных видов микроРНК корреляции с возрастом не выявлено.

На рис. 1 представлены результаты сравнительного анализа экспрессии исследуемых микроРНК у здоровых лиц и пациентов, страдающих дыхательной

Таблица 2
Анализ связи уровня экспрессии микроРНК с возрастом пациентов
Correlation analysis of age and microRNA levels in patients

МикроРНК	Коэффициент корреляции (r)	Уровень значимости (p)
miR-27	-0,50	0,04
miR-101	-0,48	0,06
miR-142	-0,41	0,12
miR-339	-0,33	0,22
miR-424	-0,06	0,83

недостаточностью, – потенциальных реципиентов легких.

У пациентов, ожидающих трансплантации легких, уровни экспрессии трех из пяти исследованных видов микроРНК достоверно выше, чем у здоровых лиц: miR-27 (p = 0,037), miR-101 (p = 0,006) и miR-339 (p = 0,01).

Установлено, что различия в экспрессии микроРНК связаны с этиологией заболевания, послужившего причиной развития дыхательной недостаточности. У пяти пациентов причиной развития дыхательной недостаточности явилось инфекционно-опосредованное заболевание – муковисцидоз (31,3% от общего числа пациентов). Остальные 11 пациентов страдали заболеваниями, в патогенезе которых ведущую роль играют обструктивные, рестриктивные процессы, сосудистые нарушения (ПЛАГ, легочный фиброз различной этиологии, эмфизема и др.).

Анализ показал, что экспрессия miR-101 значительно выше у пациентов с муковисцидозом (p = 0,01) и страдающих прочими заболеваниями легких (p = 0,03, рис. 2, а) по сравнению с группой здоровых лиц.

Уровень экспрессии miR-27 у пациентов с муковисцидозом был выше в сравнении как со здоровыми лицами (p = 0,001, рис. 2, б), так и с остальными пациентами (p = 0,01). Следует отметить, что различия не были обусловлены более молодым возрастом пациентов с муковисцидозом (p = 0,07).

Более высокий уровень экспрессии miR-142 и miR-339 в сравнении со здоровыми лицами был выявлен только у пациентов с муковисцидозом (p = 0,004, рис. 2, в; p = 0,01, рис. 2, г).

Уровень экспрессии miR-424 не отличался от такового у здоровых лиц ни в группе потенциальных реципиентов, ни в подгруппах пациентов с различной этиологией заболевания (рис. 2, д).

Важная регуляторная роль микроРНК в развитии патологических процессов описана во многих исследованиях последних лет, что стимулирует активное изучение малых молекул с позиции их потенциальной значимости как биомаркеров осложнений трансплантации и использования в качестве потенциальной таргетной терапии при отторжении у реципиентов солидных органов [10–12].

К настоящему времени идентифицировано и охарактеризовано достаточно большое число различных видов микроРНК. Для настоящего исследования были отобраны пять из них, предположительно играющих роль в развитии заболеваний легких и сердечно-сосудистой системы, потенциально значимых для

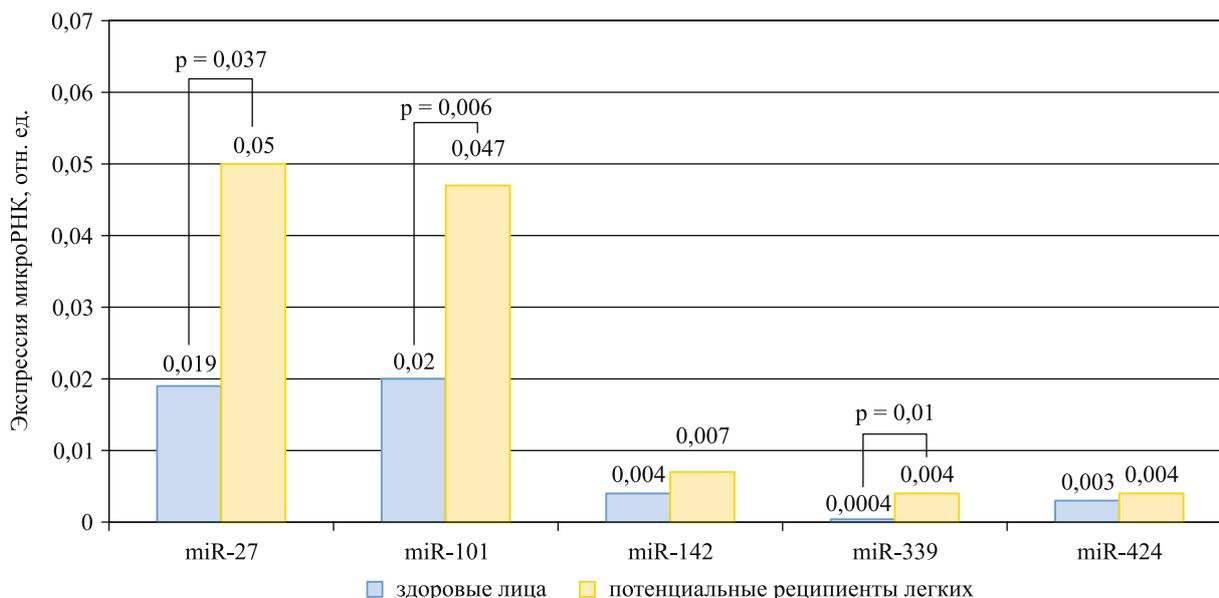


Рис. 1. Сравнительный анализ уровней экспрессии микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) у здоровых лиц и пациентов, страдающих дыхательной недостаточностью, – потенциальных реципиентов легких

Fig. 1. Comparative analysis of microRNA levels (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 and miR-424) in healthy individuals and potential lung recipients

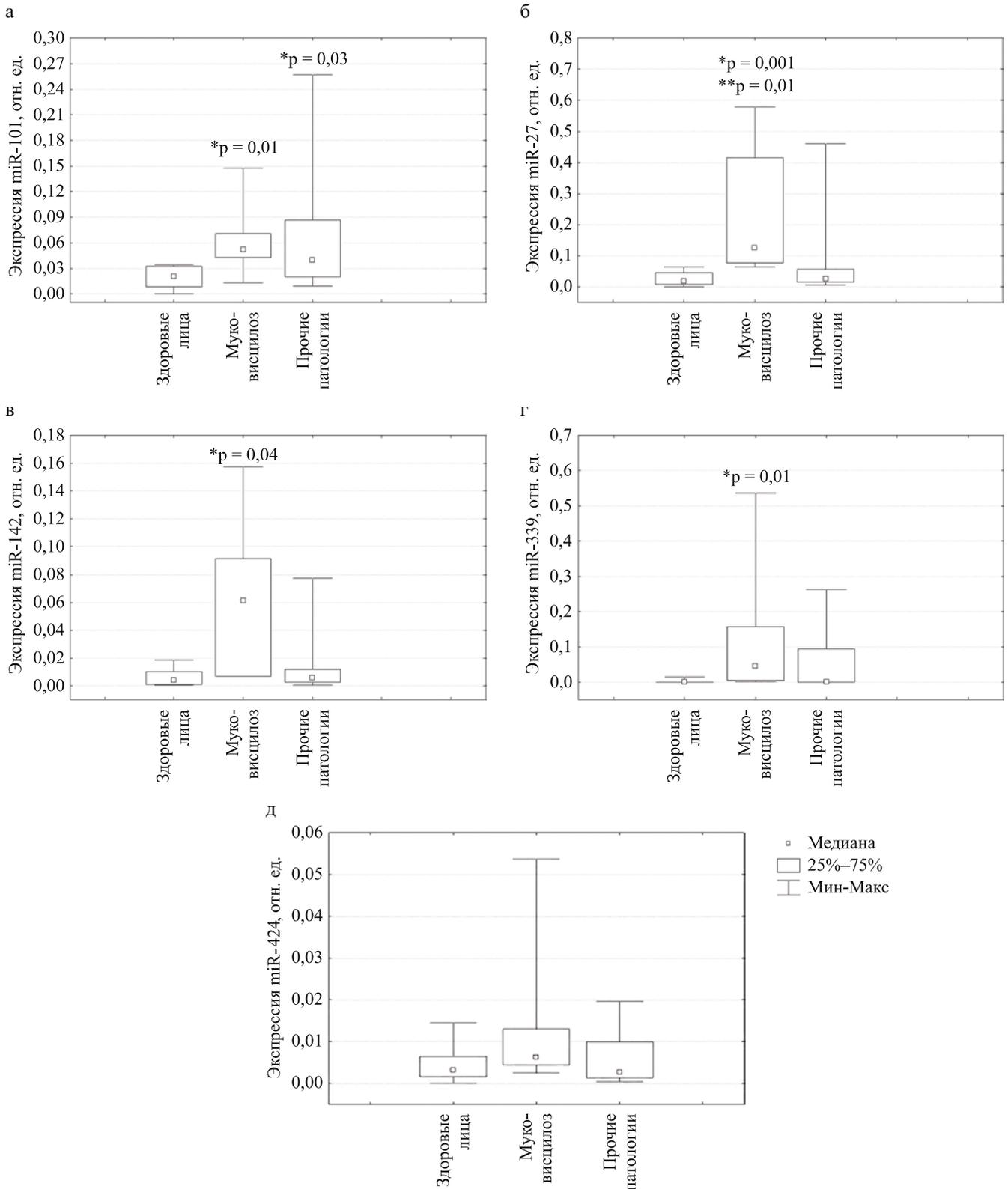


Рис. 2. Сравнительный анализ уровней экспрессии miR-101 (а), miR-27 (б), miR-142 (в), miR-339 (г) и miR-424 (д) у здоровых лиц, пациентов с муковисцидозом и прочими патологиями. * – в сравнении со здоровыми лицами; ** – в сравнении с пациентами с прочими патологиями

Fig. 2. Comparative analysis of miR-101 (a), miR-27 (б), miR-142 (в), miR-339 (г) and miR-424 (д) levels in healthy individuals, patients with cystic fibrosis and other lung pathologies. * – compared to healthy individuals; ** – compared to patients with other lung pathologies

диагностики посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца, легких [10, 14].

Достоверные различия в экспрессии miR-101, miR-142 были описаны у пациентов с заболеваниями сердца и легких [13, 14]. Было показано, что у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом miR-101 ингибирует пролиферацию и активацию фибробластов, являясь потенциальной терапевтической мишенью при фиброзе легких [15]. Опубликованы данные о возможном участии miR-142 в регуляции гемопоеза, при этом этот вид микроРНК экспрессируется во многих тканях и выполняет важные функции в воспалительных, иммунных, инфекционных, онкологических и фиброзных процессах после пересадки донорских органов [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования показали, что профиль экспрессии различных видов микроРНК у пациентов с хронической дыхательной недостаточностью, ожидающих трансплантации легких, отличается от такового у здоровых лиц. Более того, экспрессия отдельных видов микроРНК связана с этиологией заболевания легких: у пациентов с муковисцидозом показатели экспрессии miR-27, miR-101, miR-142 и miR-339 существенно выше не только в сравнении со здоровыми лицами, но и с пациентами, у которых инфекционно-опосредованные нарушения играют не столь выраженную роль.

Данные литературы, как и результаты настоящего исследования, указывают на актуальность изучения уровней экспрессии микроРНК у пациентов с тяжелой легочной патологией, а также реципиентов легких. С целью выяснения возможной клинической значимости применения уровней экспрессии указанных молекул требуется дальнейшее изучение их биологических функций и диагностической эффективности у данной группы пациентов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Sood P, Krek A, Zavolan M, Macino G, Rajewsky N. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103 (8): 2746–2751.
2. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136 (2): 215–233.
3. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev*. 2011; 91 (3): 827–887.
4. Atarod S, Dickinson AM. MicroRNAs: The missing link in the biology of graft-versus-host disease? *Front Immunol*. 2013; 4: 420. doi: 10.3389/fimmu.2013.00420.
5. Zampetaki A, Mayr M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circ Res*. 2012; 110 (3): 508–522. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247445.
6. De Vlaminck I, Martin L, Kertesz M, Patel K, Kowarsky M, Strehl C et al. Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112 (43): 13336–13341. doi: 10.1073/pnas.1517494112.
7. Gharib SA, Edelman JD, Ge L, Chen P. Acute cellular rejection elicits distinct microRNA signatures in airway epithelium of lung transplant patients. *Transplant Direct*. 2015; 1 (10). pii: e44.
8. Amrouche L, Rabant M, Anglicheau D. MicroRNAs as biomarkers of graft outcome. *Transplant Rev (Orlando)*. 2014; 28 (3): 111–118. doi: 10.1016/j.trre.2014.03.003.
9. Shan J, Feng L, Luo L, Wu W, Li C, Li Set al. MicroRNAs: potential biomarker in organ transplantation. *Transpl Immunol*. 2011; 24 (4): 210–215. doi: 10.1016/j.trim.2011.03.004.
10. Великий ДА, Гичкун ОЕ, Шевченко АО. МикроРНК: роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, перспективы клинического применения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (7): 403–409. Velikij DA, Gichkun OE, Shevchenko AO. MikroRNK: rol' v razvitii serdechno-sosudistyh zaboolevanij, perspektivy klinicheskogo primeneniya. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (7): 403–409.
11. Zhang W, Zhou T, Ma SF, Machado RF, Borhade SM, Garcia JG. MicroRNAs implicated in dysregulation of gene expression following human lung transplantation. *Transl Respir Med*. 2013; 1 (1). doi: 10.1186/2213-0802-1-12.
12. Sigdel TK, Vitalone MJ, Tran TQ, Dai H, Hsieh S-C, Salvatierra O et al. A rapid noninvasive assay for the detection of renal transplant injury. *Transplantation*. 2013; 96 (1): 97–101. doi: 10.1097/TP.0b013e318295ee5a.
13. Sukma Dewi I, Hollander Z, Lam KK, McManus JW, Tebbutt SJ, Ng RT et al. Association of Serum MiR-142-3p and MiR-101-3p Levels with Acute Cellular Rejection after Heart Transplantation. *PLoS One*. 2017 Jan 26; 12 (1): e0170842. doi: 10.1371/journal.pone.0170842.
14. Yuchuan H, Ya D, Jie Z, Jingqiu C, Yanrong L, Dongliang L et al. Circulating miRNAs might be promising biomarkers to reflect the dynamic pathological changes in smoking-related interstitial fibrosis. *Toxicol Ind Health*. 2014 Mar; 30 (2): 182–191. doi: 10.1177/0748233712452606.
15. Huang C, Xiao X, Yang Y, Mishra A, Liang Y, Zeng X et al. MicroRNA-101 attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and activation. *J Biol Chem*. 2017 Oct 6; 292 (40): 16420–16439. doi: 10.1074/jbc.M117.805747.
16. Shrestha A, Mukhametshina RT, Taghizadeh S, Vásquez-Pacheco E, Cabrera-Fuentes H, Rizvanov A et al. MicroRNA-142 is a multifaceted regulator in organogenesis, homeostasis, and disease. *DevDyn*. 2017 Apr; 246 (4): 285–290. doi: 10.1002/dvdy.24477.

*Статья поступила в редакцию 13.06.2019 г.
The article was submitted to the journal on 13.06.2019*