

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-4-20-26

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МИКРОРНК-101 И МИКРОРНК-27 ПРИ ОСТРОМ ОТТОРЖЕНИИ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕРДЦА

Д.А. Великий¹, О.Е. Гичкун^{1, 2}, С.О. Шарапченко¹, Н.П. Можейко¹, Р.М. Курабекова¹, О.П. Шевченко^{1, 2}

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

Цель: определить диагностическое значение уровня экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 в отношении острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца. **Материалы и методы.** В исследование включены 46 реципиентов сердца, среди них мужчин – 36 (78,3%); средний возраст реципиентов составил $47,7 \pm 10,8$ (от 16 до 67) года. Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови определялся методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Верификацию отторжения трансплантата проводили на основании морфологического исследования образцов эндомикардиальных биоптатов. **Результаты.** Уровни экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов с острым отторжением трансплантата достоверно ниже по сравнению с реципиентами без отторжения ($p = 0,04$ и $p = 0,03$ соответственно). При уровне экспрессии микроРНК-101 ниже найденного порогового значения вероятность риска развития острого отторжения трансплантата возрастает в 1,8 раза ($RR = 1,8$ [95% ДИ 1,13–3,01]). При уровне экспрессии микроРНК-27 ниже найденного порогового значения вероятность риска развития острого отторжения трансплантата возрастает в 1,9 раза ($RR = 1,9$ [95% ДИ 1,12–3,37]). Одновременное снижение показателей экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 ниже найденных пороговых значений повышает вероятность риска развития острого отторжения трансплантата в 2,0 раза ($RR = 2,0$ [95% ДИ 1,16–3,36]). **Заключение.** Уровни экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 обладают диагностической значимостью в отношении острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца.

Ключевые слова: трансплантация сердца, микроРНК-101, микроРНК-27, острое отторжение, биомаркеры.

DIAGNOSTIC VALUE OF MIRNA-101 AND MIRNA-27 IN ACUTE HEART TRANSPLANT REJECTION

Д.А. Velikiy¹, О.Е. Gichkun^{1, 2}, С.О. Sharapchenko¹, Н.П. Mozheiko¹, Р.М. Kurabekova¹, О.П. Shevchenko^{1, 2}

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Objective: to determine the diagnostic value of miRNA-101 and miRNA-27 expression levels for acute heart transplant rejection. **Materials and methods.** The study enrolled 46 heart recipients, among whom were 36 men (78.3%); the average age of recipients was $47.7 = 10.8$ (16 to 67) years. Serum microRNA expression levels were measured via quantitative polymerase chain reaction (PCR). Graft rejection was verified through morphological analysis of endomyocardial biopsy specimens. **Results.** The expression levels of miRNA-101 and miRNA-27 in recipients with acute graft rejection are significantly lower than in recipients without rejection ($p = 0.04$ and $p = 0.03$, respectively). When the miRNA-101 expression level is below the determined threshold value, the risk

Для корреспонденции: Великий Дмитрий Алексеевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 193-87-62. E-mail: dim_vel@mail.ru

Corresponding author: Dmitriy Velikiy. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 193-87-62. E-mail: dim_vel@mail.ru

of developing acute graft rejection increases 1.8 times (RR = 1.8 [95% CI 1.13–3.01]). When the miRNA-27 expression level is below the determined threshold value, the risk of developing acute graft rejection increases 1.9 times (RR = 1.9 [95% CI 1.12–3.37]). Simultaneous decrease in the expression levels of miRNA-101 and miRNA-27 below the determined threshold values increases the likelihood of acute graft rejection by 2.0 times (RR = 2.0 [95% CI 1.16–3.36]). **Conclusion.** The serum miRNA-101 and miRNA-27 expression levels are of diagnostic value for acute graft rejection in heart recipients.

Keywords: heart transplantation, miRNA-101, miRNA-27, acute rejection, biomarkers.

Острое отторжение трансплантата является одним из основных факторов, ограничивающих выживаемость реципиентов сердца. Риск развития острого отторжения трансплантированного сердца более высок в раннем послеоперационном периоде, хотя кризы острого отторжения могут возникать в любые сроки после трансплантации. Поздние кризы отторжения чаще возникают при назначении недостаточных доз иммуносупрессивной терапии и несоблюдении реципиентами предписанного врачом режима приема лекарственных средств, а также возникшими вирусными инфекциями, приводящими к активации иммунной системы пациента [1, 2].

Эндомиокардиальная биопсия, которая используется для верификации и контроля лечения острого отторжения, является инвазивным вмешательством, достаточно трудоемким и сопряженным с риском для пациентов. На результаты биопсии могут оказывать влияние ошибки в выборе образцов и вариабельность при оценке получаемых препаратов [3]. С целью улучшения доклинической диагностики и необходимостью сокращения количества многократно повторяемых инвазивных диагностических вмешательств последние годы ведется активная разработка малоинвазивных методов диагностики посттрансплантационных осложнений, которые могут не только выявить наличие острого отторжения трансплантата, но и контролировать эффективность лечения реципиента [4].

Для решения этой задачи во всем мире активно изучается связь различных биомаркеров, среди которых факторы и медиаторы воспаления, неоангиогенеза, деструкции тканей, тромбообразования и др., с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний и посттрансплантационных осложнений [5–9]. Отдельным предметом исследований, направленных на понимание патогенеза патологических процессов в миокарде, поиск и валидацию новых биомаркеров для их диагностики, является изучение микроРНК – малых некодирующих РНК, регулирующих экспрессию генов. Благодаря разнообразию регуляторных функций микроРНК являются перспективной группой биомаркеров, потенциально значимой как для диагностики, так и мониторинга прогрессирования посттрансплантационных осложнений [10–12]. При сравнительном анализе экспрессии микроРНК у реципиентов сердца, выполненном в нашей преды-

дущей работе, было установлено, что уровень экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 достоверно различается у реципиентов с острым отторжением трансплантата и без отторжения [13].

Целью настоящей работы явилось определение диагностической эффективности микроРНК-101 и микроРНК-27 в отношении острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 46 пациентов, которым в период с 2013-го по 2016 год в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России была выполнена трансплантация сердца (ТС), среди них мужчин – 36 (78,3%); средний возраст реципиентов составил $47,7 \pm 10,8$ (от 16 до 67) года. У 29 (63%) реципиентов до ТС была диагностирована дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), у 12 (26%) – ишемическая болезнь сердца (ИБС) и у 5 (11%) – прочие патологии. Максимальная длительность наблюдения реципиентов после ТС составила 2215 суток (медиана 264,5 [32; 785,3]).

Все пациенты, имевшие показания к ТС, проходили плановое обследование согласно Национальным клиническим рекомендациям «Трансплантация сердца и механическая поддержка кровообращения» и протоколу ведения пациентов в НМИЦ ТИО. После трансплантации плановые обследования реципиента включали: клиническую оценку состояния, общий и биохимический анализы крови с определением концентрации такролимуса, суточное мониторирование артериального давления (для коррекции антигипертензивной терапии), эхокардиографическое исследование, повторные биопсии миокарда, ежегодное коронароангиографическое исследование. Все реципиенты получали трехкомпонентную иммуносупрессивную терапию, включающую комбинацию ингибиторов кальциневрина (такролимус) и цитостатиков (микофенолата мофетил или микофенолоновая кислота), а также варьирующие дозы преднизолона перорально в зависимости от сроков после операции и частоты эпизодов отторжения трансплантата и адьювантную медикаментозную терапию по показаниям [1].

Материалом для исследования экспрессии микроРНК служила плазма венозной крови (от 1 до 3 образцов от каждого пациента, в среднем 1,22). Об-

разцы периферической крови пациентов собирали в одноразовые пробирки с антикоагулянтом этилендиаминуксусной кислотой (ЭДТА), центрифугировали в течение 10 минут при 3000 оборотах в минуту, после чего плазма крови отделялась от клеточного осадка и незамедлительно замораживалась при -20°C . Из 100 мкл плазмы крови с использованием наборов Serum Plasma (Qiagen, США) выделяли суммарную РНК с предварительным добавлением $1,6 \times 10^8$ копий синтетической микроРНК cel-miR-39 (Qiagen) после инкубации плазмы с фенольной смесью Qiazol. В качестве внутреннего контроля эффективности выделения РНК, синтеза комплементарной ДНК (кДНК) и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени использовали Cel-miR-39. Интенсивность экспрессии микроРНК рассчитывалась по $2^{-\Delta\text{Ct}}$ методу [14] и выражалась в относительных единицах, эквивалентных $\log_2(2^{-\Delta\text{Ct}})$, где ΔCt – рабочие значения изменения цикла получения продукта относительно внутреннего контроля экспрессии микроРНК cel-miR-39.

Верификацию острого клеточного и гуморального отторжения трансплантата производили на основании исследования образцов эндомикардиальных биоптатов. Для гистологического исследования кусочки эндомикарда фиксировали в 10% формалине, затем промывали водой, обезвоживали и заливали в парафин. На микротоме приготавливали срезы толщиной 3–4 мкм. Для диагностики острого клеточного отторжения (ОКО) срезы окрашивали гематоксилином и эозином, для диагностики гуморального отторжения (AMR) использовали иммуногистохимический метод исследования. Степень острого клеточного и гуморального отторжения трансплантата оценивали по рекомендованным классификациям, принятым Международным обществом трансплантации сердца и легких (ISHLT-2004 и ISHLT-2013).

Статистическая обработка данных

Определение чувствительности и специфичности проводили при помощи ROC-анализа. Для оценки диагностической значимости микроРНК-101 и микроРНК-27 использовали показатель относительного риска. Для определения порогового уровня экспрессии микроРНК рассчитывался индекс Юдена. Чувствительность теста (Se) представлена долей истинно положительных случаев, а специфичность (Sp) – долей истинно отрицательных случаев. Диагностическая эффективность теста (De) выражена процентным соотношением суммы всех истинных случаев к общему числу полученных результатов. Статистический анализ полученных результатов проведен при помощи программного обеспечения и стандартных методов статистической обработки пакета прикладных программ «Statistica» v.13.0,

StatSoftInc. (США). Статистическую обработку полученных данных проводили непараметрическими методами: при сравнении зависимых выборок рассчитывали парный критерий Уилкоксона, для сравнения независимых переменных применяли U-критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости принимался равным 5%, т. е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов сердца представлены в виде медианы концентраций [интерквартильного размаха] с указанием достоверности различий, что обусловлено распределением значений, отличным от нормального.

В течение всего периода наблюдения после трансплантации признаки острого отторжения были верифицированы у 27 реципиентов в 31 образце эндомикардиальных биоптатов. Среди них: острое клеточное отторжение (R1G–R3G степеней по классификации ISHLT-2004) наблюдалось у 23 реципиентов в 24 образцах, гуморальное – у 6 реципиентов в 6 образцах и смешанное – в 1 образце.

На рис. 1 представлена морфологическая картина образцов эндомикардиальных биоптатов трансплантационного сердца, в которых были обнаружены признаки острого клеточного и гуморального отторжения.

Реципиенты с острым отторжением трансплантата и без такового значимо не различались по возрасту ($p = 0,84$), полу ($p = 0,07$) и диагнозу до трансплантации ($p = 0,51$). При анализе концентрации такролимуса в крови реципиентов сердца не было выявлено достоверных различий в группе пациентов с острым отторжением и без такового, концентрация составила 8,1 [6,7; 10,7] и 9,9 [6,1; 12] нг/мл соответственно ($p = 0,75$).

Установлено, что уровень экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов с острым отторжением трансплантата достоверно ниже по сравнению с реципиентами без отторжения ($p = 0,04$ и $p = 0,03$ соответственно, рис. 2). Полученные результаты согласуются с имеющимися данными об ингибирующем влиянии микроРНК-101 [15–17] и микроРНК-27 [18, 19] на развитие процессов фиброобразования в сердце и других органах.

При определении диагностической значимости микроРНК-101 и микроРНК-27 в качестве маркера острого отторжения трансплантационного сердца использовали анализ ROC-кривой (рис. 3).

Расчеты показали, что площадь под ROC-кривой микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата составляет 0,676 и 0,719 ($p = 0,02$ и $p = 0,002$ соответственно).

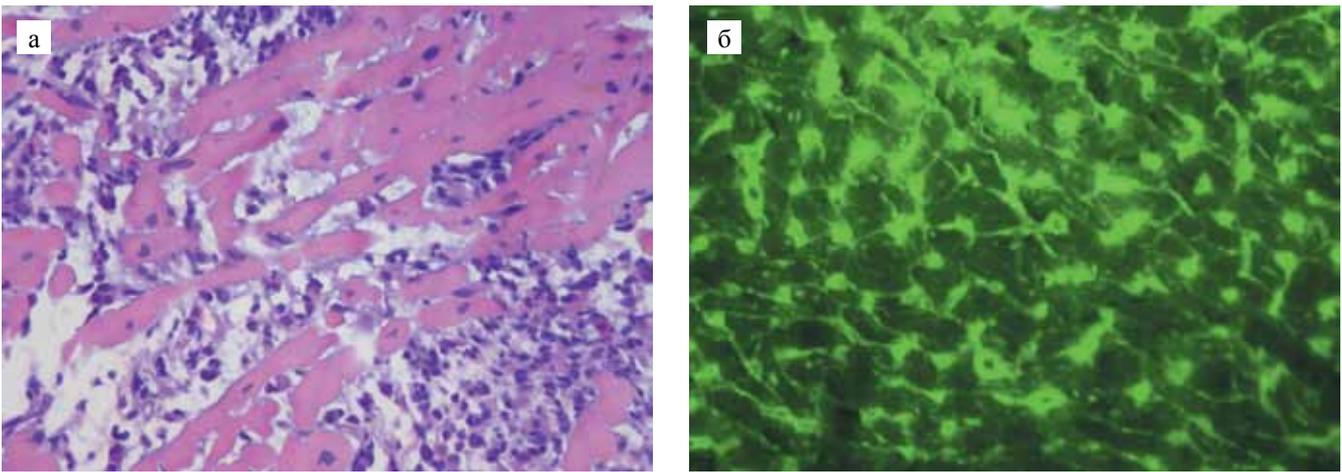


Рис. 1. Исследование образцов эндомикардиальных биоптатов: а – многоочаговое умеренное острое клеточное отторжение трансплантата сердца (R2G степень по классификации ISHLT-2004). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$; б – фиксация C4d фрагмента комплемента в стенке капилляров миокарда при остром гуморальном отторжении. Иммуногистохимическое исследование

Fig. 1. Study of endomyocardial biopsy specimens: a – multifocal moderate acute cellular rejection of a heart transplant (R2G grade according to ISHLT-2004 classification). H&E stain. $\times 400$; б – fixation of the C4d fragment of the complement in the myocardial capillary wall in acute humoral rejection. Immunohistochemistry analysis

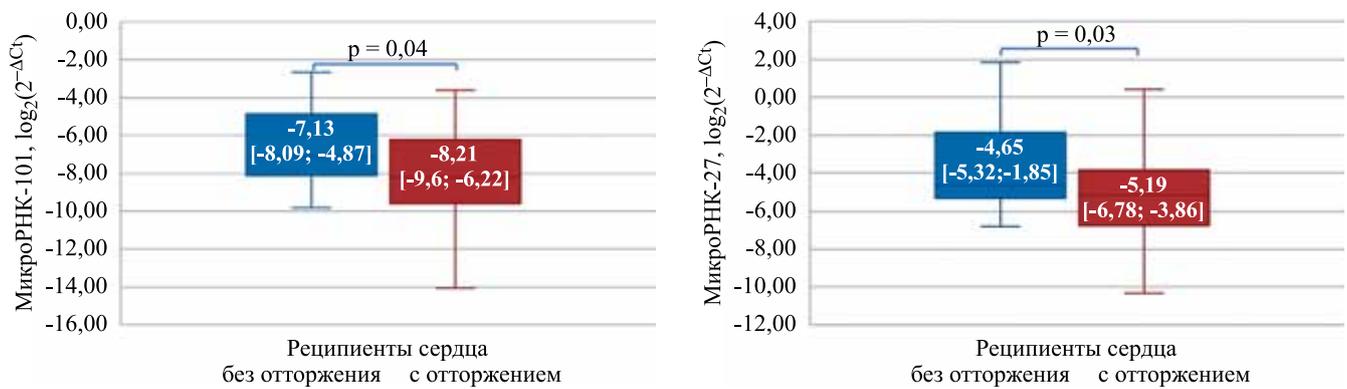


Рис. 2. Уровень экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов сердца с отторжением трансплантата и без отторжения, $\log_2(2^{-\Delta Ct})$

Fig. 2. Expression levels of miRNA-101 and miRNA-27 in heart recipients with and without graft rejection, $\log_2(2^{-\Delta Ct})$

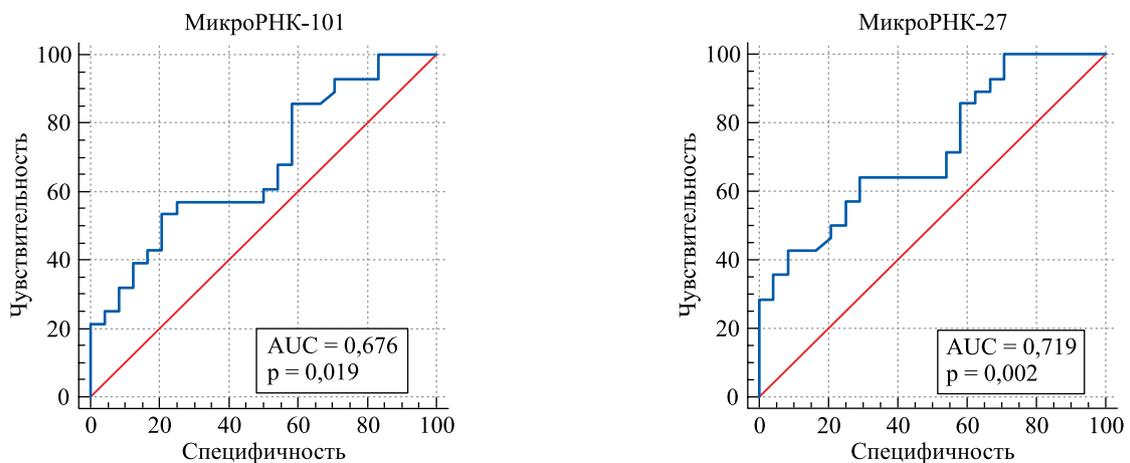


Рис. 3. ROC-кривая микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата

Fig. 3. ROC curves of miRNA-101 and miRNA-27 in heart recipients with acute transplant rejection

Пороговые уровни экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27, значимые для диагностики острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца, определяли по оптимальному сочетанию значений чувствительности и специфичности, соответствующему наибольшему показателю индекса Юдена [20].

На рис. 4 изображен график зависимости чувствительности и специфичности от уровня экспрес-

сии микроРНК-101 и микроРНК-27 в плазме крови в отношении острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца.

Пороговое значение экспрессии микроРНК-101, значимое для диагностики острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца, составило -8,36. При уровне экспрессии микроРНК-101 ниже найденного порогового значения вероятность риска развития ост-

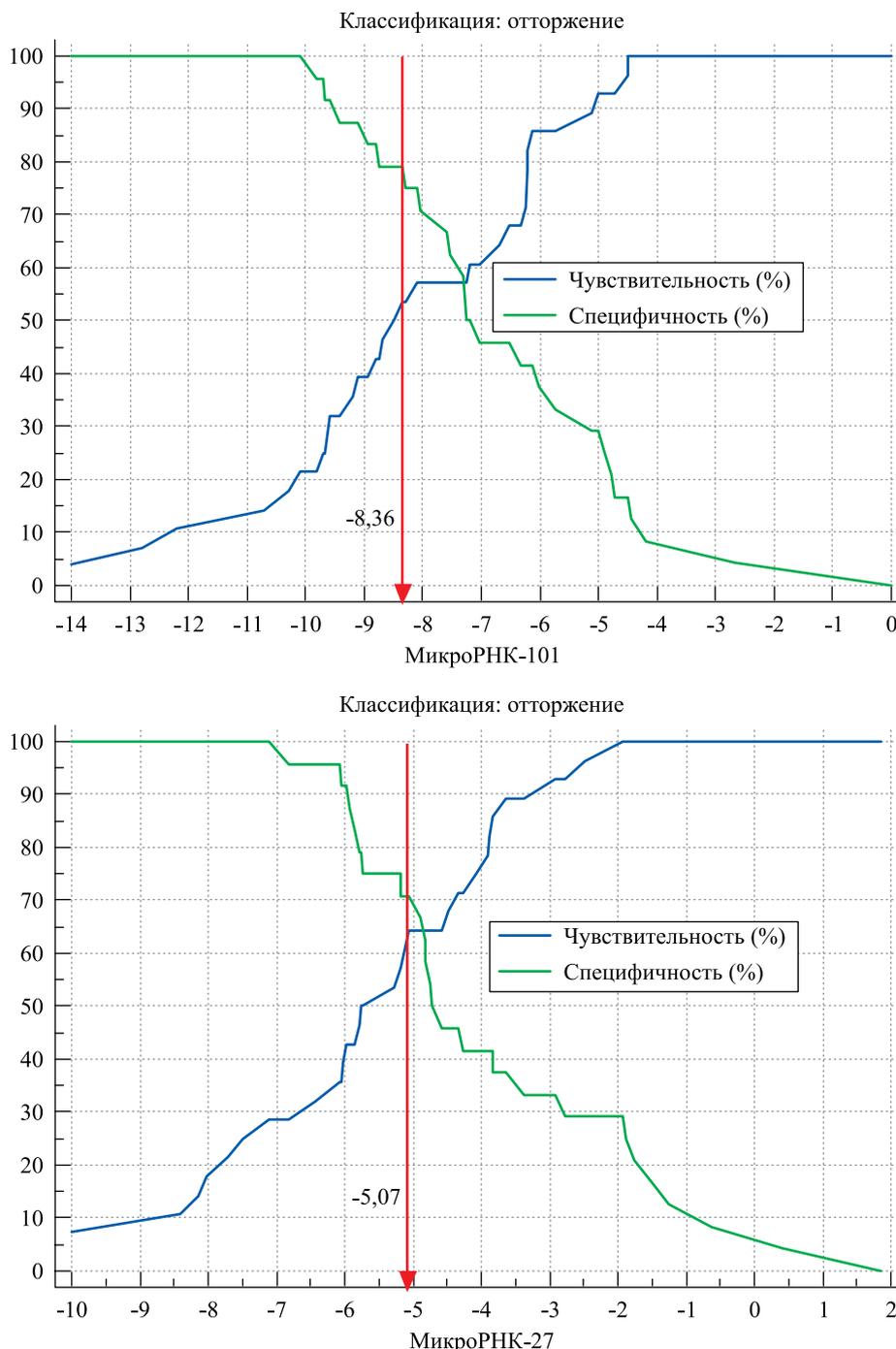


Рис. 4. Диагностически значимые пороговые значения уровня экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата

Fig. 4. Diagnostically significant threshold values of the expression levels of miRNA-101 and miRNA-27 in heart recipients with acute transplant rejection

Диагностическая значимость уровня экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 ниже пороговых значений у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата

The diagnostic significance of the expression levels of miRNA-101 and miRNA-27 is below the threshold values in heart recipients with acute transplant rejection

МикроРНК	RR	Границы 95% ДИ	Se	Sp	De
МикроРНК-101	1,8	[1,132–3,012]	53,6%	79,2%	65,4%
МикроРНК-27	1,9	[1,122–3,367]	64,3%	70,8%	67,3%
МикроРНК-101 + МикроРНК-27	2,0	[1,158–3,364]	60,0%	78,9%	68,2%

рого отторжения трансплантата в 1,8 раза выше, чем у реципиентов с уровнем экспрессии микроРНК-101 выше этого порогового значения (чувствительность – 53,6%, специфичность – 79,2%). Диагностическая эффективность теста составляет 65,4%. Пороговое значение экспрессии микроРНК-27, значимое для диагностики острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца, составило –5,07. При уровне экспрессии микроРНК-27 ниже найденного порогового значения вероятность риска развития острого отторжения трансплантата в 1,9 раза выше, чем у реципиентов с уровнем экспрессии микроРНК-27 выше этого порогового значения (чувствительность – 64,3%, специфичность – 70,8%). Диагностическая эффективность теста составляет 67,3% (табл.).

При оценке диагностической значимости совместного определения микроРНК-101 и микроРНК-27 в отношении острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца было установлено, что при уровне экспрессии указанных микроРНК ниже найденных пороговых значений вероятность риска развития острого отторжения трансплантата в 2 раза выше (чувствительность – 60,0%, специфичность – 78,9%). Диагностическая эффективность теста составляет 68,2%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У реципиентов сердца уровни экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 обладают диагностической значимостью в отношении острого отторжения трансплантата. При уровне экспрессии микроРНК-101 $\leq -8,63$ отн. ед. ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$) риск развития острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца выше в 1,8 раза, чем у реципиентов с уровнем экспрессии микроРНК-101 выше порогового значения. При уровне экспрессии микроРНК-27 $\leq -5,07$ отн. ед. ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$) риск развития острого отторжения трансплантата у реципиентов сердца выше в 1,9 раза, чем у реципиентов с уровнем экспрессии микроРНК-27 выше порогового значения. При одновременном уровне экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 ниже пороговых значений риск раз-

вития острого отторжения трансплантата возрастает в 2 раза.

Исследование профинансировано грантом Президента Российской Федерации НШ-2598.2020.7 для государственной поддержки ведущих научных школ РФ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Готье СВ, Шевченко АО, Попцов ВН. Пациент с трансплантированным сердцем: руководство для врачей по ведению пациентов, перенесших трансплантацию сердца. М.: Триада, 2014. 144. *Gautier SV, Shevchenko AO, Popcov VN. Patient s transplantirovanym serdsem: rukovodstvo dlya vrachej po vedeniyu pacientov, perenessih transplantaciyu serdca. M.: Triada, 2014. 144.*
2. Шевченко АО, Никитина ЕА, Колоскова НН, Шевченко ОП, Готье СВ. Контролируемая артериальная гипертензия и выживаемость без нежелательных событий у реципиентов сердца. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2018; 17 (4): 4–11. Shevchenko AO, Nikitina EA, Koloskova NN, Shevchenko OP, Gautier SV. Kontroliruemaja arterial'naja gipertenzija i vyzhivaemost' bez nezhelatel'nyh sobytij u recipien-tov serdca. Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika. 2018; 17 (4): 4–11. [In Russ, English abstract].*
3. Stehlik J, Starling RC, Movsesian MA, Fang JC, Brown RN, Hess ML et al. Cardiac Transplant Research Database Group. Utility of long-term surveillance endomyocardial biopsy: a multi-institutional analysis. *J Heart Lung Transplant. 2006; 25 (12): 1402–1409.*
4. Crespo-Leiro MG, Barge-Caballero G, Couto-Mallon D. Noninvasive monitoring of acute and chronic rejection in heart transplantation. *Curr Opin Cardiol. 2017; 32 (3): 308–315.*
5. Шумаков ВИ, Шевченко ОП, Хубутия МИ, Орлова ОВ, Казаков ЭН, Кормер АЯ, Олефиренко ГА. Васкулопатия трансплантированного сердца: синергизм провоспалительных, проатерогенных факторов и вирусной инфекции. *Вестник Российской академии медицинских наук. 2006; 11: 8–14. Shumakov VI, Shev-*

- chenko OP, Hubutiya MSh, Orlova OV, Kazakov EN, Kormer AYa, Olefirenko GA. Vaskulopatiya transplantirovannogo serdca: sinergizm provospalitel'nyh, proaterogennyh faktorov i virusnoj infekcii. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk*. 2006; 11: 8–14.
6. Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M et al. Novel biomarkers of heart failure. *Advances In Clinical Chemistry*. 2017; 79: 93–152.
 7. Kransdorf EP, Kobashigawa JA. Novel molecular approaches to the detection of heart transplant rejection. *Per Med*. 2017 Jul; 14 (4): 293–297.
 8. van Gelder T. Biomarkers in solid organ transplantation. *Br J Clin Pharmacol*. 2017 Dec; 83 (12): 2602–2604.
 9. Starling RC, Stehlik J, Baran DA et al. Multicenter analysis of immune biomarkers and heart transplant outcomes: results of the clinical trials in organ transplantation-05 study. *American Journal of Transplantation*. 2016; 16: 121–136.
 10. Di Francesco A, Fedrigo M, Santovito D, Ntarelli L, Castellani C, De Pascale F et al. MicroRNA signatures in cardiac biopsies and detection of allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2018 Nov; 37 (11): 1329–1340.
 11. Shah P, Bristow MR, Port JD. MicroRNAs in Heart Failure, Cardiac Transplantation, and Myocardial Recovery: Biomarkers with Therapeutic Potential. *Curr Heart Fail Rep*. 2017 Dec; 14 (6): 454–464.
 12. Khush K, Zarafshar S. Molecular Diagnostic Testing in Cardiac Transplantation. *Curr Cardiol Rep*. 2017 Oct 13; 19 (11): 118.
 13. Великий ДА, Гичкун ОЕ, Шараченко СО, Шевченко ОП, Шевченко АО. Уровень экспрессии микроРНК в ранние и отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов сердца. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020; 22 (1): 26–34. Velikiy DA, Gichkun OE, Sharapchenko SO, Shevchenko OP, Shevchenko AO. Uroven' ekspressii mikroRNK v rannie i otдалennye sroki posle transplantacii u recipientov serdca. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2020; 22 (1): 26–34.
 14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec; 25 (4): 402–408.
 15. Li X, Zhang S, Wa M, Liu Z, Hu S. microRNA-101 Protects Against Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction via Downregulation of Runt-Related Transcription Factor 1. *J Am Heart Assoc*. 2019 Dec 3; 8 (23): e013112.
 16. 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.
 17. Meroni M, Longo M, Erconi V, Valenti L, Gatti S, Francanzani AL, Dongiovanni P. Mir-101-3p Downregulation Promotes Fibrogenesis by Facilitating Hepatic Stellate Cell Transdifferentiation During Insulin Resistance. *Nutrients*. 2019 Oct 29; 11 (11): 2597.
 18. Zhang XL, An BF, Zhang GC. MiR-27 alleviates myocardial cell damage induced by hypoxia/reoxygenation via targeting TGFBR1 and inhibiting NF-κB pathway. *Kaohsiung J Med Sci*. 2019 Oct; 35 (10): 607–614.
 19. Wang Y, Cai H, Li H, Gao Z, Song K. Atrial overexpression of microRNA-27b attenuates angiotensin II-induced atrial fibrosis and fibrillation by targeting ALK5. *Hum Cell*. 2018 Jul; 31 (3): 251–260.
 20. Hughes G. Youden's Index and the Weight of Evidence Revisited. *Methods Inf Med*. 2015; 54 (6): 576–577.
- Статья поступила в редакцию 9.10.2020 г.
The article was submitted to the journal on 9.10.2020*