

Н.Д. Ющук¹, С.И. Малов^{2,3}, И.В. Малов², В.В. Дворниченко², Р.И. Расулов³, П.Н. Марш⁴,
Т. Декан^{4,5}, З. Мацек-Жилкова^{4,5}, Л.А. Степаненко², О.Б. Огарков⁶, Л.С. Орлова²

¹ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова,
Москва, Российская Федерация

² Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Российская Федерация

³ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования — филиал ФГБОУ ДПО
«Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ,
Иркутск, Российская Федерация

⁴ Институт передовых биологических наук (ИАН), Университет Гренобль Альпы, Ля Тронш, Франция

⁵ Университетский больничный центр Гренобль Альпы, отделение гепатогastroэнтерологии, Ля Тронш, Франция

⁶ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Российская Федерация

Исследование сывороточной микроРНК-122 при гепатите С и ассоциированной с ним гепатоцеллюлярной карциноме

Обоснование. Открытие кластера коротких некодирующих РНК, получивших название микроРНК (miRNAs), стало важным событием в молекулярной биологии. Один из его представителей — miR-122 — играет большую роль в регуляции экспрессии генов, задействованных в углеводном, липидном обмене и метаболизме железа в организме. В экспериментальных исследованиях показано, что помимо регуляторных функций miR-122 участвует в патогенезе гепатита С, обеспечивая жизненный цикл вируса в клетке. Смещение акцентов в изучении miR-122 с фундаментальных исследований в русло клинической медицины представляется перспективным направлением персонализированной медицины. **Цель исследования** — определить клиническое значение miR-122 при остром и хроническом течении гепатита С и ассоциированной с ним гепатоцеллюлярной карциноме. **Методы.** Всего было обследовано 407 человек, в том числе 17 больных острым гепатитом С, 158 — хроническим гепатитом С и 62 — гепатоцеллюлярной карциномой, ассоциированной с гепатитом С. Группы сравнения составили 84 практически здоровых человека и 62 больных с клинически выраженным циррозом печени неинфекционной этиологии. В каждой когорте в крови больных было проведено определение относительного уровня miR-122. Анализ осуществляли методом полимеразной цепной реакции с использованием набора реактивов Qubit microRNA Assay Kit-100 для количественного определения микроРНК (Thermo Fisher Scientific, США). Относительные значения экспрессии miR-122 были рассчитаны по формуле $2^{-\Delta\Delta CT}$ с использованием U6 snRNA в качестве референсной РНК. **Результаты.** Наиболее высокий уровень miR-122 в плазме крови был обнаружен у больных острым гепатитом С в разгар желтушного периода. Уровень miR-122 в крови коррелировал с активностью печеночных трансаминаз у больных острым ($r = 0,72$) и хроническим ($r = 0,44$) гепатитом С. Анализ уровня miR-122 относительно степени фиброза печени у больных хроническим гепатитом С показал, что по мере прогрессирования фиброза печени снижается уровень экспрессии miR-122. Снижение экспрессии miR-122 у больных с выраженным фиброзом — циррозом печени — носило универсальный характер и не зависело от этиологии заболевания. Развитие гепатоцеллюлярной карциномы сопровождалось падением уровня miR-122 в среднем в 10 раз по сравнению с группой больных хроническим гепатитом С. **Заключение.** Определение уровня экспрессии miR-122 в крови может использоваться в лабораторном мониторинге ведения больных гепатитом С как показатель тяжести поражения печени при остром течении и скорости прогрессирования фиброза печени при хронических формах. Оценка возможности использования miR-122 в качестве предиктора развития гепатоцеллюлярной карциномы в исходе гепатита С требует проведения дополнительных исследований специфичности и чувствительности теста и сопоставления полученных данных с известными онкомаркерами протеиновой природы.

Ключевые слова: гепатит С, гепатоцеллюлярная карцинома, цирроз печени, микроРНК, сывороточная miR-122.

(Для цитирования: Ющук Н.Д., Малов С.И., Малов И.В., Дворниченко В.В., Расулов Р.И., Марш П.Н., Декан Т., Мацек-Жилкова З., Степаненко Л.А., Огарков О.Б., Орлова Л.С. Исследование сывороточной микроРНК-122 при гепатите С и ассоциированной с ним гепатоцеллюлярной карциноме. Вестник РАМН. 2019;74(6):388–395. doi: 10.15690/vramn1255)

Обоснование

Успехи в лечении гепатита С препаратами прямого противовирусного действия позволили Всемирной организации здравоохранения сформулировать концепцию элиминации этого заболевания к 2030 г. [1]. По экспертным оценкам, обеспечение нуждающихся в лечении пациентов препаратами прямого противовирусного действия в Европе, США и некоторых странах Азии позволило снизить общее количество больных со 150 до 71 млн человек [2]. Однако необходимо учитывать, что мутации вирусного генома приводят к формированию резистентных к лечению препаратами прямого противовирусного действия штаммов [3]. Кроме этого,

серьезную проблему для здравоохранения всех стран представляет рост числа больных с неблагоприятными исходами хронического гепатита С (ХГС), такими как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) [4]. По мере прогрессирования фиброза печени риск развития гепатоцеллюлярной карциномы увеличивается с 2,1 до 7,8 % [5]. В определенном смысле неожиданностью было установление факта сохранения риска развития гепатоцеллюлярной карциномы у больных хроническим гепатитом С даже после достижения стойкого вирусологического ответа на противовирусную терапию [6].

Исходя из вышеперечисленного, поиск новых маркеров прогноза характера течения, скорости развития фи-

броза печени, риска развития ГЦК при гепатите С приобретает особую значимость. В этом направлении большие перспективы открываются в области геномики. Среди общего массива работ существенную долю занимают исследования однонуклеотидных полиморфизмов, свободно циркулирующих ДНК, эндосомальных РНК и их значения в патогенезе различных заболеваний [7]. Открытие в 2002 г. микроРНК-122 (miR-122) стало событием в гепатологии благодаря функциональным особенностям этого кластера РНК [8]. Участие miR-122 в жизненном цикле вируса гепатита С (hepatitis C virus, HCV) не оставляет сомнений в перспективности использования ее количественного определения в крови для диагностических целей [9]. В подавляющем большинстве работ представлены исследования miR-122 в отдельных когортах больных с разнообразной патологией печени: хронический гепатит В и С, гепатоцеллюлярная карцинома, неалкогольная жировая болезнь печени [9–12]. К сожалению, эти данные трудно сопоставимы, так как в указанных исследованиях использованы различные референтные РНК, а результаты определения miR-122 нормализованы по отношению к различным контрольным группам (здоровые люди, больные хроническим гепатитом, больные с уровнем фиброза F0 по шкале METAVIR и т.д.). Вместе с тем представляется важным сравнительный анализ уровня miR-122 при

гепатите С на различных этапах развития инфекционного процесса — от острого инфицирования через стадии хронического течения к развитию цирроза печени и ГЦК.

Цель исследования — определить клиническое значение miR-122 при остром и хроническом течении гепатита С и ассоциированной с ним гепатоцеллюлярной карциноме.

Методы

Дизайн исследования

Проведено одномоментное многоцентровое выборочное неконтролируемое сравнительное исследование типа «случай-контроль» в параллельных группах пациентов с острым гепатитом С (ОГС), хроническим гепатитом С с различной степенью фиброза печени, циррозом печени неинфекционной этиологии, гепатоцеллюлярной карциномой и здоровых добровольцев.

Критерии соответствия

Для анализа среднего относительного уровня miR-122 в плазме крови были сформированы 3 группы больных гепатитом С и 2 контрольные группы. Группы больных включали 17 пациентов с острым, 158 — с хроническим

N.D. Yushchuk¹, S.I. Malov^{2,3}, I.V. Malov², V.V. Dvornichenko², R.I. Rasulov³, P.N. Marche⁴, T. Decaens^{4,5}, Z. Macek-Jilkova^{4,5}, L.A. Stepanenko², O.B. Ogarkov⁶, L.S. Orlova²

¹ A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation

³ Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk, Russian Federation

⁴ Institute for Advanced Biosciences, Research Center, University of Grenoble-Alpes, La Tronche, France

⁵ Hospital Center of University of Grenoble-Alpes, department of hepatogastroenterology, La Tronche, France

⁶ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction, Irkutsk, Russian Federation

A Study of Serum miRNA-122 in Hepatitis C and Associated Hepatocellular Carcinoma

BACKGROUND: The discovery of a cluster of short non-coding RNAs called microRNAs (miRNAs) has become an important event in molecular biology. One of its representatives, miR-122 plays a large role in regulating the expression of genes involved in carbohydrate, lipid metabolism, and iron metabolism in the body. In experimental studies it was shown that in addition to regulatory functions, miR-122 is involved in the pathogenesis of hepatitis C, providing the life cycle of the virus in the cell. The shift of emphasis in the study of miR-122 from basic research into clinical medicine seems to be a promising area of personalized medicine. **AIMS:** to determine the clinical significance of miR-122 in acute and chronic hepatitis C and associated hepatocellular carcinoma. **MATERIALS AND METHODS:** A total of 407 people were examined, including 17 patients with acute hepatitis C (AHC), 158 patients with chronic hepatitis C (CHC) and 62 patients with HCC associated with hepatitis C. Comparison groups consisted of 84 healthy individuals and 62 patients with clinically pronounced cirrhosis of a non-infectious etiology. In each cohort, the relative miR-122 level was determined in the blood of patients. The analysis was performed in PCR using the Qubit microRNA Assay Kit -100 for the quantitative determination of microRNAs (Thermo Fisher Scientific, USA). Relative miR-122 expression values were calculated by the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ using U6 snRNA as a reference RNA. **RESULTS:** The highest miR-122 level in serum was found in patients with AHC at the height of the icteric period. The level of miR-122 showed a direct correlation with the activity of hepatic transaminases in patients with AHC ($r = 0.72$) and CHC ($r = 0.44$). An analysis of miR-122 level relative to the degree of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C showed that, as liver fibrosis progresses, the level of miR-122 expression decreases. The decrease in miR-122 expression in patients with severe fibrosis was universal and did not depend on the etiology of the disease. The development of HCC in the presence of chronic hepatitis C was accompanied by a decrease in the level of miR-122 by 10 times on average compared to patients with chronic hepatitis C. **CONCLUSIONS:** The determination of the expression level of miR-122 in serum can be used in laboratory monitoring of the management of patients with HC as an indicator of the severity of liver damage in AHC and the rate of formation of liver fibrosis in CHC. Evaluation of possibility of using miR-122 as a predictor of the development of HCC in the outcome of HC requires additional studies of the specificity and sensitivity of the test and comparison of the obtained data with the results of using generally accepted protein tumor markers.

Keywords: hepatitis C, hepatocellular carcinoma, cirrhosis, microRNA, miR-122.

(For citation): Yushchuk ND, Malov SI, Malov IV, Dvornichenko VV, Rasulov RI, Marche PN, Decaens T, Macek-Jilkova Z, Stepanenko LA, Ogarkov OB, Orlova LS. A study of serum miRNA-122 in hepatitis C and associated hepatocellular carcinoma. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2019;74(6):388–395. doi: 10.15690/vramn1255)

гепатитом С и 86 больных гепатоцеллюлярным раком, развившимся на фоне хронического гепатита С. Контрольные группы состояли из 84 практически здоровых лиц и 62 больных циррозом печени неинфекционной этиологии.

Критерии включения: взрослые лица, больные острым и хроническим гепатитом С, а также ГЦК, ассоциированной с HCV.

Больные хроническим гепатитом С по степени фиброза были разделены на группы больных с минимальным фиброзом печени (F0–F1 по шкале METAVIR) и с выраженным фиброзом печени (F4 по шкале METAVIR). Для включения в исследование у всех больных, а также у здоровых лиц проводились анализы на наличие антител к HCV (анти-HCV) и HBsAg. При наличии анти-HCV проводили определение РНК HCV в крови методом полимеразной цепной реакции. Амплификацию осуществляли на амплификаторе Rotor Gene Q (Qiagen, Германия) с использованием праймеров и реактивов производства ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Определение генотипа HCV осуществляли с помощью набора реагентов «АмплиСенс HCV-Генотип-FL» или «АмплиСенс HCV-1/2/3-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия).

390
 Диагнозы устанавливали в соответствии с российскими рекомендациями по диагностике и лечению взрослых больных гепатитами В и С [13]. Диагноз хронического гепатита С устанавливали на основании данных анамнеза, клинического обследования, определения активности печеночных трансаминаз, анти-HCV IgG и РНК HCV. Острый гепатит С характеризовался желтушностью кожных покровов, иктеричностью склер, наличием преджелтушного периода, протекающего по диспепсическому или астеновегетативному варианту, а также субфебрилитетом, увеличением печени и селезенки. Наибольшее значение в диагностике ОГС имели лабораторные данные: повышение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ более 10 норм) и общего билирубина. У всех больных были выявлены суммарные anti-HCV, антитела к NS-антигенам HCV и РНК HCV в крови. Цирроз печени был диагностирован на основании клинико-лабораторных данных, эластометрии печени, результатов ультразвукового исследования. При необходимости выполнялась компьютерная или магнитно-резонансная томография печени. Диагноз гепатоцеллюлярной карциномы устанавливался с учетом критериев Европейской ассоциации по изучению болезней печени (European Association for the Study of the Liver, EASL) [14]. У всех больных диагноз был верифицирован морфологически. Степень фиброза печени у больных ХГС определяли с помощью аппарата FibroScan-502 (Франция). Степень фиброза F0–F1 по шкале METAVIR соответствовала диапазону эластичности печеночной ткани 1,5–7,2 кПа, F4 — 12,6–75,0 кПа.

Критерии исключения: наличие сопутствующей патологии печени другой этиологии (гепатит В, болезнь Вильсона–Коновалова, аутоиммунный гепатит, наследственный гемохроматоз, алкогольная болезнь печени, токсический гепатит), ВИЧ-инфекция, гепатоцеллюлярная карцинома в терминальной стадии (IV по классификации TNM), отказ от подписания информированного согласия.

Условия проведения

Работа проводилась на базе Иркутской областной инфекционной клинической больницы, Иркутского об-

ластного клинического консультативно-диагностического центра и областного онкологического диспансера (Иркутск). Лабораторные исследования по определению miR-122 в 2018 г. выполнялись в Институте передовых биологических наук Университета Гренобль Альпы (Франция), в 2019 г. — в Научно-исследовательском институте биомедицинских исследований Иркутского государственного медицинского университета (Российская Федерация). При выполнении работы авторы руководствовались этическими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской организации [15].

Продолжительность исследования

Исследование проводили с апреля 2018 по сентябрь 2019 г.

Описание медицинского вмешательства и анализ в подгруппах

Для получения плазмы кровь собиралась натощак из локтевой вены одноразовой иглой в вакуумную пробирку типа Vacuett. Образцы плазмы пациентов с ОГС были собраны во время госпитализации в острый желтушный период болезни, у больных ХГС и гепатоцеллюлярной карциномой — во время диспансерного наблюдения. Кровь центрифугировали, затем отбирали плазму в количестве не менее 500 мкл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 1,5 мл и замораживали при -74...-76 °С.

Исходы исследования

Определение относительного уровня экспрессии miR-122 в крови больных острым, хроническим гепатитом С, циррозом печени и ГЦК.

Методы регистрации исходов

Выделение общей РНК из плазмы крови, содержащей фракцию зрелых микроРНК, проводили с использованием набора «Рибо-преп-100» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Количественное определение выделенной РНК осуществляли на флуориметре Qubit-4™ (Invitrogen, США) с использованием набора реактивов Qubit microRNA Assay Kit-100 для количественного определения микроРНК (5–100 нг) (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Расчет концентрации РНК в пробе производился автоматически с помощью калибровочной кривой. Выход «чистой» РНК составлял от 0,5 до 30 мкг/мл. Реакция обратной транскрипции осуществлялась с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) для синтеза кДНК на РНК-матрице и «stem-loop»-праймеров (20 мкМ) к определенным микроРНК-hsa-miR-122, U6snRNA (TaqMan microRNA Assays, Thermo Fisher Scientific, США). Среднее значение относительного уровня miR-122 определяли после проведения полимеразной цепной реакции в двух экземплярах для каждого образца в режиме реального времени на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия). Относительные значения экспрессии miR-122 были рассчитаны по формуле $2^{-\Delta\Delta CT}$ с использованием U6 snRNA в качестве референсной РНК [16]. Результаты $\Delta CT = miR122 Ct - U6 Ct$ были нормализованы по отношению к группе здоровых лиц. Результаты определения miR-122 в группах представляли в относительных единицах как среднюю арифметическую величину и ошибку средней арифметической.

Этическая экспертиза

Информированное согласие было получено от каждого участника исследования, а план проведения и дизайн настоящей работы были одобрены комитетом по этике Иркутского государственного медицинского университета (протокол № 4 от 06.04.2018).

Статистический анализ

Размер выборки предварительно не рассчитывался. Для анализа различий между группами были использованы критерии Манна–Уитни (U) и хи-квадрат (χ^2). Коэффициент корреляции (r) использовали для оценки корреляции между уровнем экспрессии miRNA-122 и активностью печеночных трансаминаз. Все данные были статистически обработаны с использованием программы Epidemiology/Biostatistics Tools для Windows (Wayne W. LaMorte, MD, PhD, MPH Copyright 2006; США). Уровень статистической значимости был принят при $p \leq 0,05$ в двустороннем t-тесте.

Результаты**Объекты (участники) исследования**

Всего было обследовано 407 человек в возрасте от 18 лет до 81 года. В общей выборке доля мужчин составила 228 (56,0 %), женщин — 179 (44,0 %). Клинико-лабораторная характеристика лиц, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

Основные результаты исследования

Средний уровень miR-122 существенно отличался в исследуемых когортах (табл. 2).

Наиболее высокий уровень miR-122 в плазме крови был обнаружен у больных ОГС в разгар желтушно-го периода. Уровень miR-122 показал прямую корреляцию с активностью печеночных трансаминаз у больных острым и хроническим гепатитом С с более высоким коэффициентом корреляции при остром течении гепатита (рис. 1, 2). При формировании хронического течения

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика обследованных лиц

| Показатель | ОГС | ХГС (F0–F1) | ХГС (F4) | ГЦК | ЦПНЭ | Здоровые лица |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Число наблюдений | 17 | 100 | 58 | 86 | 62 | 84 |
| Возраст, лет | 38,1 ± 6,0 | 43,3 ± 3,0 | 57,7 ± 10,5 | 61,7 ± 12,1 | 59,9 ± 4,5 | 41,7 ± 3,2 |
| Пол, муж., % | 9 (52,9 ± 12,1) | 44 (44,0 ± 5,0) | 37 (63,8 ± 6,3) | 53 (61,6 ± 5,2) | 42 (67,7 ± 5,9) | 43 (51,2 ± 5,5) |
| ИМТ | 24,7 ± 2,2 | 26,5 ± 1,4 | 25,1 ± 1,1 | 26,5 ± 1,3 | 25,5 ± 1,1 | 24,4 ± 1,3 |
| Билирубин при первом обращении, мкмоль/л | 153,5+15,7 | 15,0 ± 0,55 | 27,2 ± 8,6 | 47,9 ± 18,7 | 118,6 ± 20,8 | - |
| АЛТ при первом обращении, Ед/л | 1535,3 ± 110,8 | 78,7 ± 4,3 | 65,5 ± 10,9 | 76,6 ± 33,8 | 39,9 ± 22,6 | - |
| АСТ при первом обращении, Ед/л | 1009,6 ± 107,9 | 59,0 ± 2,9 | 88,0 ± 9,8 | 98,5 ± 40,1 | 44,5 ± 36,4 | - |
| Анти-НСV «+», абс. (%) | 17 (100) | 100 (100) | 58 (100) | 86 (100) | 0 (0) | 0 (0) |
| ПЦР гепатит С «+», абс. (%) | 17 (100) | 100 | 58 | 67 (77,9) | - | - |
| Генотип НCV 1/2/3, % | 52,9 / 5,9 / 41,2 | 53,0 / 7,0 / 40,0 | 53,4 / 6,9 / 39,7 | 62,7 / 7,5 / 29,8 | - | - |
| Альбумин, г/л | 39,1 ± 3,2 | 42,1 ± 1,2 | 32,0 ± 4,0 | 28,9 ± 1,3 | 26,9 ± 0,79 | - |
| АФР, нг/мл | - | 5,0 ± 0,2 | 6,7 ± 1,7 | 458,3 ± 271,2 | 4,7 ± 0,2 | - |
| TNM, стадия I, n (%) | - | - | - | 45 (52,3 ± 5,4) | - | - |
| TNM, стадия II, n (%) | - | - | - | 28 (32,6 ± 5,1) | - | - |
| TNM, стадия IIIA, n (%) | - | - | - | 13 (15,1 ± 3,9) | - | - |

Примечание. ОГС — острый гепатит С, ХГС — хронический гепатит С, ГЦК — гепатоцеллюлярная карцинома, ЦПНЭ — цирроз печени неинфекционной этиологии, ИМТ — индекс массы тела, АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатаминотрансфераза, НCV (от hepatitis C virus) — вирус гепатита С, ПЦР — метод полимеразной цепной реакции, АФР (от alpha-fetoprotein) — альфа-фетопроtein, TNM (от tumor, nodus and metastasis) — международная классификация стадий злокачественных новообразований.

Таблица 2. Значимость различий (p) среднего относительного уровня (Mcp ± m) miR-122 (OE) в крови больных в исследуемых когортах

| Группа | ОГС | ХГС (F0–F1) | ХГС (F4) | Цирроз печени | ГЦК | Здоровые люди (контроль) |
|---------------|-----|-------------|------------|---------------|------------|--------------------------|
| | | 34,6 ± 3,59 | 3,4 ± 0,39 | 2,1 ± 0,42 | 1,9 ± 0,35 | 0,36 ± 0,06 |
| ОГС | - | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| ХГС (F0–F1) | - | - | < 0,05 | < 0,01 | < 0,001 | < 0,001 |
| ХГС (F4) | - | - | - | >0,05 | < 0,001 | < 0,05 |
| Цирроз печени | - | - | - | - | < 0,001 | < 0,05 |
| ГЦК | - | - | - | - | - | < 0,001 |

Примечание. ОГС — острый гепатит С, ХГС — хронический гепатит С, ГЦК — гепатоцеллюлярная карцинома.

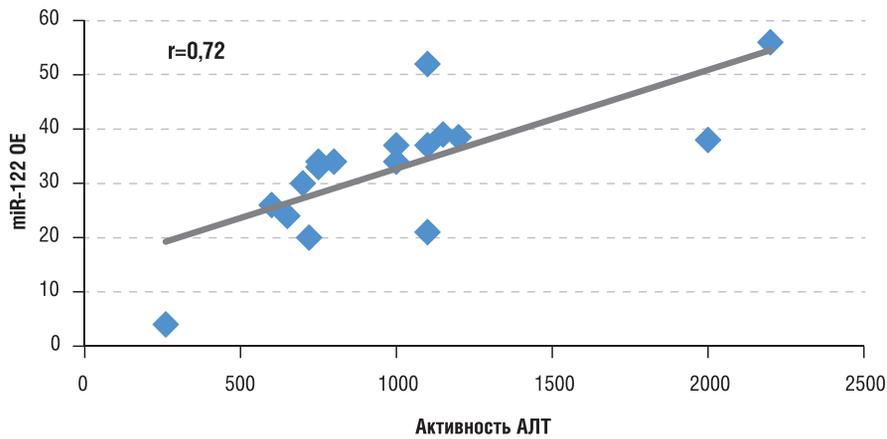


Рис. 1. Корреляция активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) с уровнем miR-122 крови при остром гепатите С ($n = 17$)

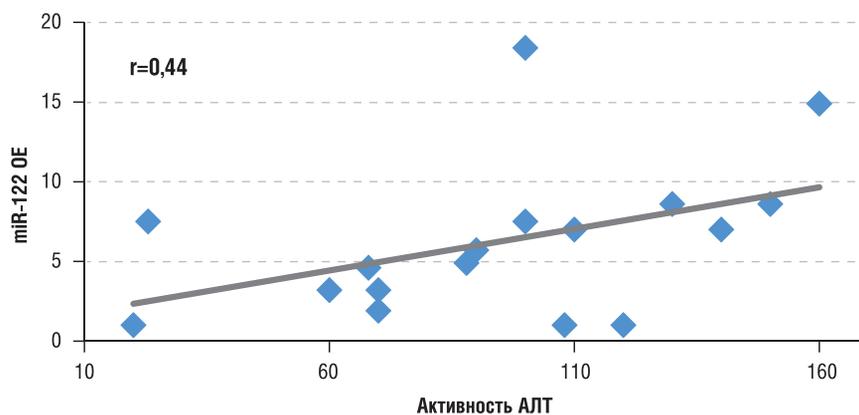


Рис. 2. Корреляция активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) с уровнем miR-122 крови при хроническом гепатите С ($n = 17$)

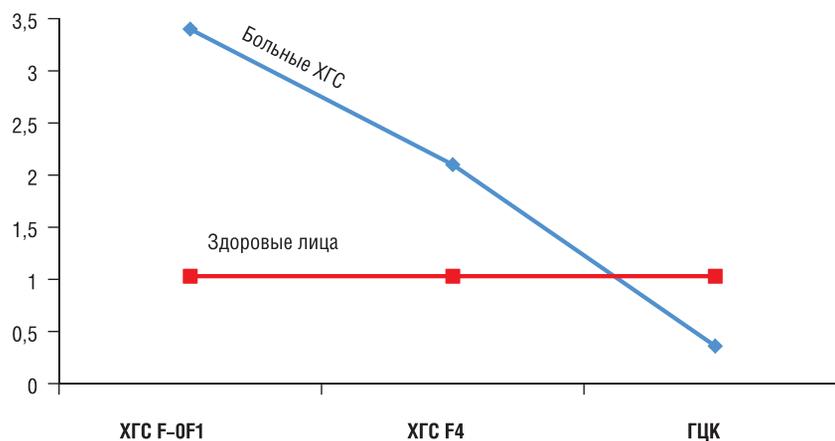


Рис. 3. Изменение уровня miR-122 в процессе прогрессирования фиброза и трансформации хронического гепатита С (ХГС) в гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК)

экспрессия miR-122 значительно снижалась, но оставалась значимо выше, чем у здоровых лиц. Развитие ГЦК на фоне хронического гепатита С сопровождалось падением уровня miR-122 в 100 раз по сравнению с больными ОГС и в 10 раз по сравнению с больными ХГС (рис. 3). Не было обнаружено отличий между уровнем miR-122 у больных с ранней (I по классификации TNM) и продвинутой (II–III по классификации TNM) стадией ГЦК: $0,39 \pm 0,06$ и $0,33 \pm 0,06$ OE соответственно, $p > 0,05$. Анализ уровня miR-122 относительно данных эластометрии у больных ХГС показал, что по мере прогрессирования фиброза печени снижается уровень экспрессии miR-122

(рис. 4). Однако даже в продвинутой стадии фиброза печени и у больных с клиническими проявлениями цирроза печени уровень miR-122 оставался более высоким, чем у здоровых лиц. Снижение экспрессии miR-122 у больных циррозом печени носило универсальный характер и не зависело от его этиологии.

Обсуждение

Как известно, основные биологические функции микроРНК — транскрипционная и посттранскрипционная

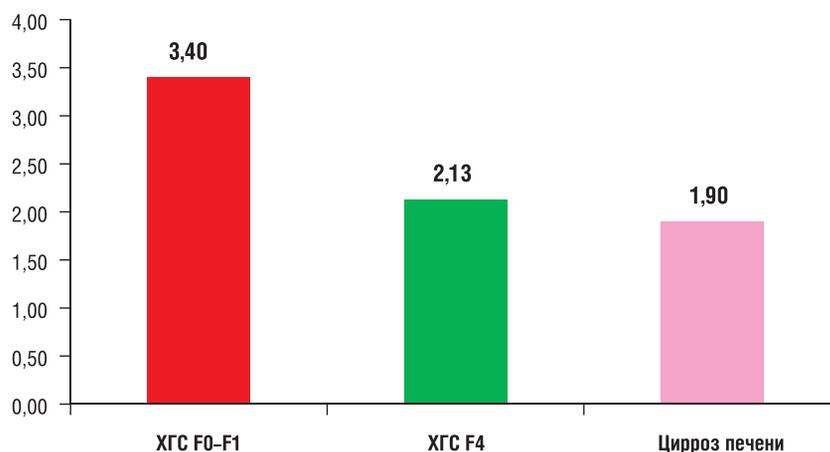


Рис. 4. Уровень miR-122 в зависимости от степени фиброза печени у больных хроническим гепатитом С (ХГС) и циррозом печени неинфекционной этиологии

регуляция экспрессии генов, в том числе блокада трансляции мРНК [9]. В отличие от других кластеров, miR-122, помимо участия в регуляции липидного и углеводного обмена, играет большую роль в обеспечении жизненного цикла HCV [17]. Комплементарная связь двух молекул miR-122 с 5'-нетранслируемой зоной РНК HCV обеспечивает экранирование последней, предупреждает ее распознавание внутриклеточными паттернраспознающими рецепторами и помогает избежать деградации под влиянием внутриклеточных эндонуклеаз [18]. Снижение уровня miR-122 путем ее связывания антисмысловой РНК приводит к ответному снижению уровня вирусной РНК, вплоть до полной авиремии [19].

MiR-122 обладает выраженной органоспецифичностью и сосредоточена преимущественно в клетках печени [18]. Обнаруженное в настоящей работе в острый желтушный период болезни существенное повышение уровня miR-122 в крови, по-видимому, отражает цитолиз гепатоцитов. Ранее было предложено использовать miR-122 как неинвазивный показатель поражения печени любой этиологии [20–22]. По нашим данным, в сравнении со здоровыми лицами уровень miR-122 при развитии острого гепатита повышается в среднем в 35 раз. Степень повышения печеночных трансаминаз также отражает интенсивность цитолиза, что широко используется в практической медицине. Именно поэтому наличие корреляции между miR-122 и АЛТ вполне ожидаемо. Однако коэффициент корреляции оказался выше при остром гепатите С. Таким образом, уровень miR-122 наряду с биохимическими маркерами может быть индикатором цитолитического синдрома, особенно при остром поражении печени.

Зависимость между уровнем miR-122 и степенью фиброза печени была отмечена ранее [23, 24]. В настоящей работе такая закономерность была подтверждена для категории больных гепатитом С, что, очевидно, обусловлено замещением массы функционирующих гепатоцитов соединительной тканью, не содержащей miR-122. Не обнаружено отличий между относительными показателями miR-122 у больных ХГС с F4-фиброзом и у больных с клинически выраженным циррозом печени неинфекционной этиологии. Снижение уровня miR-122 описано также при выраженном фиброзе печени на фоне хронического гепатита В, неалкогольного стеатогепатита и аутоиммунного гепатита [9, 25]. На основании этого можно утверждать, что по уровню miR-122, исследованному в динамике, можно судить о скорости прогрессирования фиброза печени. Это особенно актуально для больных

с ожирением, наличием асцита и острого воспаления, когда инструментальная эластометрия неинформативна.

В последние годы особое значение придается miR-122 как диагностическому маркеру гепатоцеллюлярной карциномы [26]. В этом направлении выполнено большое число работ, которые касаются оценки miR-122 как в качестве самостоятельного онкомаркера, так и в сочетании с микроРНК других кластеров или белковыми молекулами [12, 26, 27]. Однако на этом пути существует ряд трудностей.

Как было показано выше, на определенном этапе канцерогенеза происходит снижение уровня miR-122 в крови больных. Сначала уровень miR-122 у больных ГЦК достигает среднего значения такового у здоровых лиц. В последующем на фоне прогрессирования рака печени происходит дальнейшее снижение уровня miR-122 в крови, характеризующееся в средних показателях как 1/3 его уровня у здоровых лиц. Таким образом, использование в качестве контроля уровня miR-122 у здоровых лиц может оказаться неинформативным на ранних стадиях развития опухоли. К сожалению, в условиях одномоментного ретроспективного исследования не удалось установить зависимость между стадией развития опухоли и уровнем снижения miR-122 в крови. Соответственно, не был определен диагностически значимый уровень снижения miR-122 как по отношению к показателям здоровых лиц, так и больных ХГС. Для этого необходимо проведение проспективного наблюдения за больными ХГС в процессе развития ГЦК с оценкой уровня miR-122 в динамике канцерогенеза и сопоставления значимости этого показателя с известными онкомаркерами.

Еще одним серьезным препятствием применения miR-122 в диагностических целях является высокая вариабельность сывороточного уровня этого маркера у здоровых людей. J. Vogt и соавт. (2019) [28] показаны существенные отличия в уровне miR-122 у здоровых лиц в зависимости от пола, возраста, этнической принадлежности. Кроме этого, необходимо учитывать недавно полученные данные о зависимости уровня miR-122 от генетической вариабельности сайтов гена *MIR-122* [29]. Установлено, что у носителей СС-генотипа rs1135519 однонуклеотидного полиморфизма в зоне около гена *MIR-122* экспрессия miR-122 в гепатоцитах существенно выше, чем у носителей ТТ-генотипа [29], что создает трудности в определении общего диагностического порога. Таким образом, по результатам проведенных исследований можно утверждать, что miR-122 может применяться в лабораторном мониторинге ведения больных гепатитом С как показатель

тяжести поражения печени при остром гепатите С и скорости формирования фиброза печени при хроническом. Оценка возможности использования miR-122 в качестве предиктора развития гепатоцеллюлярной карциномы в исходе гепатита С требует проведения дополнительных исследований специфичности и чувствительности и сопоставления полученных данных с известными онкомаркерами протеиновой природы.

Заключение

Определение относительного количества miR-122 в крови отражает активность воспалительного процесса в печени, поэтому может служить критерием тяжести течения гепатита. Уровень miR-122 снижается в крови по мере прогрессирования фиброза печени и достигает минимальных значений при развитии цирроза печени. Снижение уровня miR-122 носит неспецифический характер и наблюдается как при вирусном, так и неинфекционном генезе цирроза. Развитие гепатоцеллюлярной карциномы сопровождается еще более выраженным, чем при циррозе печени, угнетением экспрессии miR-122, что делает эту молекулу перспективной в качестве прогностического онкомаркера. Но вместе с тем в настоящее время существует ряд серьезных трудностей, препятствующих использованию miR-122 как диагностического инструмента. Необходимы дополнительные проспективные исследования специфичности и чувствительности определения miR-122 для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы с учетом факторов, влияющих на экспрессию и транспорт miR-122 в клетке.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Федеральной целевой программы проведения исследований по приоритетным направлениям с участием научно-исследовательских организаций и университетов в рамках российско-французской Партнерской программы Юбера Кюрьена «Колмогоров» (контракт № 14.616.21.0098; уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI61618X0098).

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. Н.Д. Юшук — разработка общей концепции и дизайна исследования; С.И. Малов — анализ клинико-лабораторных данных, подготовка графического материала, написание текста; И.В. Малов — обзор литературы, написание и редактирование текста; В.В. Дворниченко, Р.И. Расулов — сбор биоматериала от больных гепатоцеллюлярной карциномой, анализ первичной медицинской документации; П.Н. Марш — разработка дизайна исследования; Т. Декан, З. Мацек-Жилкова — выполнение лабораторных исследований на территории Франции; Л.А. Степаненко — освоение методики, выполнение лабораторных исследований на территории России; О.Б. Огарков — статистический анализ результатов лабораторных исследований; Л.С. Орлова — сбор биоматериала от здоровых лиц, от больных гепатитом С, анализ первичной медицинской документации. Все авторы приняли активное участие в выполнении работы, прочли, внесли правки и одобрили окончательную версию статьи.

ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organization. *Media centre. Sixty-ninth World Health Assembly closes* [Internet]. WHO; 2019 [cited 2016 May]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/events/2016/wha69/en>.
- World Health Organization. *Hepatitis. Global hepatitis report 2017* [Internet]. WHO; 2019 [cited 2017 April]. Available from: <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>.
- Sharafi H, Alavian SM. Hepatitis C resistance to NS5A inhibitors: is it going to be a problem? *World J Hepatol.* 2018;10(9):543–548. doi: 10.4254/wjh.v10.i9.543.
- Пименов Н.Н., Комарова С.В., Карандашова И.В., и др. Гепатит С и его исходы в России: анализ заболеваемости распространенности и смертности до начала программы элиминации инфекции // *Инфекционные болезни.* — 2018. — Т.16. — №3. — С. 37–45. [Pimenov NN, Komarova SV, Karandashova IV, et al. Hepatitis C and its outcomes in Russia: analysis of incidence, prevalence and mortality rates before the start of the programme of infection elimination. *Infectious diseases.* 2018;16(3):37–45. (In Russ).] doi: 10.20953/1729-9225-2018-3-37-45.
- Calvaruso V, Cabibbo G, Cacciola I, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated cirrhosis treated with direct-acting antiviral agents. *Gastroenterology.* 2018;155(2):411–421. doi: 10.1053/j.gastro.2018.04.008.
- Liu X, Gao Y, Niu J. Hepatitis C virus — related hepatocellular carcinoma in the era of direct — acting antiviral agents. *Hepat Mon.* 2018;18(6):e66007. doi: 10.5812/hepatmon.66007.
- Sohn W, Kim J, Kang SH, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med.* 2015;47:e184. doi: 10.1038/emm.2015.68.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002;12(9):735–739. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00809-6.
- Thakral S, Ghoshal K. MiR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Curr Gene Ther.* 2015;15(2):142–150. doi: 10.2174/15665232146666141224095610.
- Gholamia M, Ravanshada M, Alavian SM, et al. Evaluation of miR-122 level in the plasma of chronically HCV infected patients. *Mol Biol.* 2016;50(2):242–245. doi: 10.7868/S0026898416020075.
- Mahmoudian-Sani MR, Asgharzade S, Alghasi A, et al. MicroRNA-122 in patients with hepatitis B and hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *J Gastrointest Oncol.* 2019;10(4):789–796. doi: 10.21037/jgo.2019.02.14.
- Zhang Y, Li Y, Jiang W, et al. The clinical significance of microRNA-122 in predicting the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Medicine.* 2019;98(13):e14810. doi: 10.1097/MD.0000000000014810.
- Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитами В и С. / Под ред. В.Т. Ивашкина, Н.Д. Юшук. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. — 144 с. [Rekomendatsii po diagnostike i lecheniiu vzroslykh bol'nykh gepatitami В i С: Klinicheskie rekomendatsii. Ed by VT Ivashkin, ND Yushchuk. Moscow: GEOTAR-Media; 2015. 144 p. (In Russ).]
- EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018;69(1):182–236. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.019.
- World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subject. *JAMA.* 2013;310(20):2191–2194. doi: 10.1001/jama.2013.281053.
- 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;25 (4):402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

17. Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in vero cells derived from monkey kidney. *Mbio*. 2016;7(3). pii: e00273-16. doi: 10.1128/mBio.00273-16.
18. Sedano CD, Sarnow P. Interaction of host cell microRNAs with the HCV RNA genome during infection of liver cells. *Semin Liver Dis*. 2015;35(1):75–80. doi: 10.1055/s-0034-1397351.
19. Van der Ree MH, de Vree JM, Stelma F, et al. Safety, tolerability, and antiviral effect of RG-101 in patients with chronic hepatitis C: a phase 1B, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2017;389(10070):709–717. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31715-9.
20. Kumar S, Chawla YK, Ghosh S, Chakraborti A. Severity of hepatitis C virus (genotype-3) infection positively correlates with circulating MicroRNA-122 in patients sera. *Dis Markers*. 2014;2014:435476. doi: 10.1155/2014/435476.
21. Xu P, Guo A, Xu J, et al. Evaluation of a combinational use of serum microRNAs as biomarkers for liver diseases. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2017;41(3):254–261. doi: 10.1016/j.clinre.2016.10.013.
22. Musaddaq G, Shahzad N, Ashraf MA, Arshad M.I. Circulating liver-specific micrornas as a noninvasive diagnostic biomarkers of hepatic diseases in human. *Biomarkers*. 2019;24(2):103–109. doi: 10.1080/1354750X.2018.1528631.
23. Halász T, Horváth G, Pár G, et al. miR-122 negatively correlates with liver fibrosis as detected by histology and FibroScan. *World J Gastroenterol*. 2015;21(25):7814–7823. doi: 10.3748/wjg.v21.i25.7814.
24. Trebicka J, Anadol E, Elfimova N, et al. Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis. *J Hepatol*. 2013;58(2):234–239. doi: 10.1016/j.jhep.2012.10.015.
25. Zhou X, Fang S, Wang M, et al. Diagnostic value of circulating miRNA-122 for hepatitis B virus and/or hepatitis C virus-associated chronic viral hepatitis. *Biosci Rep*. 2019;39(9). pii: BSR20190900. doi: 10.1042/BSR20190900.
26. Bharali D, Banerjee BD, Bharadwaj M, et al. Expression analysis of microRNA-21 and microRNA-122 in hepatocellular carcinoma. *J Clin Exp Hepatol*. 2019;9(3):294–301. doi: 10.1016/j.jceh.2018.07.005.
27. Sartorius K, Sartorius B. Circulating microRNA's as a diagnostic tool for hepatocellular carcinoma in a hyper endemic HIV setting, KwaZulu-Natal, South Africa: a case control study protocol focusing on viral etiology. *BMC Cancer*. 2017;17(1):894. doi: 10.1186/s12885-017-3915-z.
28. Vogt J, Sheinson D, Katavolos P, et al. Variance component analysis of circulating miR-122 in serum from healthy human volunteers. *PLoS One*. 2019;14(7):e0220406. doi: 10.1371/journal.pone.0220406.
29. Bei C, Liu S, Yu X, et al. Single nucleotide polymorphisms in miR-122 are associated with the risk of hepatocellular carcinoma in a southern chinese population. *Biomed Res Int*. 2018;2018:1540201. doi: 10.1155/2018/1540201.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Малов Сергей Игоревич, к.м.н. [*Sergey I. Malov*, MD]; адрес: 664003, Иркутск, ул. Красного Восстания, д. 1 [address: 1 Krasnogo vosstaniya street, 664003 Irkutsk, Russia]; e-mail: LYNX2000@mail.ru, SPIN-код: 5050-3112, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3135-4616>

Юшук Николай Дмитриевич, д.м.н., профессор, академик РАН [*Nikolay D. Yushchuk*, MD, PhD]; e-mail: prof.uyshuk@gmail.com, SPIN-код: 8547-6651, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1928-4747>

Малов Игорь Владимирович, д.м.н., профессор [*Igor V. Malov*, MD, PhD]; e-mail: igmumalov@gmail.com, SPIN-код: 8302-3057, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0122-4618>

Дворниченко Виктория Владимировна, д.м.н., профессор [*Viktoriya V. Dvornichenko*, MD, PhD]; e-mail: vv.dvornichenko@gmail.com, SPIN-код: 9628-8656, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1777-5449>

Расулов Родион Исмаилович, д.м.н., профессор [*Rodion I. Rasulov*, MD, PhD]; e-mail: gava2010@yandex.ru, SPIN-код: 3520-6049, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3671-1459>

Мару Патрис Н, PhD, профессор [*Patrice N. Marche*, PhD]; e-mail: patrice.marche@inserm.fr, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8930-9340>

Декаан Тома, PhD, профессор [*Thomas Decaens*, PhD]; e-mail: tdecaens@chu-grenoble.fr, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0928-0048>

Масек-Жилкова Зюзана, PhD, [*Zuzana Mascek-Jilkova*, PhD]; e-mail: zuzana.mjilkova@gmail.com, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2553-5971>

Степаненко Лилия Александровна, к.м.н. [*Liliya A. Stepanenko*, MD]; e-mail: steplia@mail.ru, SPIN-код: 1148-6958, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5792-7283>

Огарков Олег Борисович, д.м.н. [*Oleg B. Ogarkov*, MD, PhD]; e-mail: obogarkov@mail.ru, SPIN-код: 1956-2888, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3168-1983>

Орлова Лариса Сергеевна, к.м.н. [*Larisa S. Orlova*, MD]; e-mail: orlovalarisas@gmail.com, SPIN-код: 7538-0290, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2248-6940>