

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-2-86-96

ЭКСПРЕССИЯ МИКРОРНК У РЕЦИПИЕНТОВ ЛЕГКИХ: КОРРЕЛЯЦИИ С КЛИНИЧЕСКИМИ И ЛАБОРАТОРНЫМИ ДАННЫМИ

О.П. Шевченко^{1, 2}, С.О. Шарапченко¹, О.М. Цирульникова^{1, 2}, И.В. Паиков¹,
О.Е. Гичкун^{1, 2}, Д.А. Великий¹, Е.Ф. Шигаев¹, Д.О. Олешкевич¹, М.Т. Беков¹

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: оценить уровень экспрессии микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) и ее связь с клиническими и лабораторными параметрами у реципиентов трансплантированных легких. **Материалы и методы.** В исследование включены 57 реципиентов легких в возрасте от 10 до 74 лет (в среднем 35 ± 15), среди которых шестеро детей (9%) – четыре мальчика 10, 12, 13 и 17 лет и девочки 13 и 14 лет – и 51 взрослый реципиент, в том числе 30 мужчин (62,5%). Группу сравнения составили 14 здоровых лиц, значимо не отличающихся по полу и возрасту. Уровни экспрессии исследуемых в плазме крови микроРНК определялись методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Осуществлялся анализ корреляционных связей уровней экспрессии микроРНК с основными показателями общего и биохимического анализов крови. **Результаты.** Установлены достоверно более высокие показатели экспрессии miR-27, miR-101 и miR-339 в плазме крови у пациентов с терминальной стадией хронической дыхательной недостаточности (потенциальных реципиентов легких) по сравнению со здоровыми лицами ($p = 0,02$, $p = 0,03$ и $p = 0,01$ соответственно). Экспрессия четырех из пяти не зависела от возраста. Уровень экспрессии miR-339 коррелировал с возрастом потенциальных реципиентов легких ($p = 0,04$), и связь носила обратный характер, $r = -0,46$. Средняя величина уровня экспрессии miR-424 у реципиентов легких в отдаленном периоде после ТЛ оказалась выше, чем у пациентов, ожидающих трансплантацию ($p = 0,03$). При изучении связи уровней экспрессии микроРНК с показателями функции внешнего дыхания в отдаленном посттрансплантационном периоде установлена достоверная прямая связь уровня экспрессии miR-142 ($r = 0,61$; $p = 0,04$) с индексом Тиффно, величина которого более 85% свидетельствует о рестриктивных нарушениях дыхательных путей. Через год и более после трансплантации у реципиентов выявлены тесные прямые корреляции уровней экспрессии miR-27, miR-142 и miR-424 с концентрацией лейкоцитов в крови, а также уровня экспрессии miR-142 с концентрацией sCD40L в этот период. **Заключение.** Сравнительное исследование уровня экспрессии микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) в плазме крови пациентов, страдающих хроническими заболеваниями легких различной этиологии в терминальной стадии, и у реципиентов легких позволяет сделать заключение о целесообразности дальнейших исследований панели микроРНК для оценки их эффективности в качестве потенциальных молекулярно-генетических маркеров посттрансплантационных осложнений.

Ключевые слова: трансплантация легких, биомаркер, микроРНК, miR-27, miR-101, miR-142, miR-339, miR-424, sCD40L, 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

Corresponding author: Sofya Sharapchenko. Address: 1, Shchukinskaya Str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel. (495) 190-35-62. E-mail: transplant2009@mail.ru

MICRORNA EXPRESSION LEVELS IN LUNG RECIPIENTS: CORRELATIONS WITH CLINICAL AND LABORATORY DATA

O.P. Shevchenko^{1, 2}, S.O. Sharapchenko¹, O.M. Tsirulnikova^{1, 2}, I.V. Pashkov¹,
O.E. Gichkun^{1, 2}, D.A. Velikiy¹, E.F. Shigaev¹, D.O. Oleshkevich¹, M.T. Bekov¹

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Objective: to evaluate the expression levels of miRNA (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 and miR-424) and its relationship with clinical and laboratory parameters in lung transplant recipients. **Materials and methods.** The study included 57 lung recipients aged 10 to 74 years (35 ± 15), including six children (9%) – four boys 10, 12, 13 and 17 years and girls 13 and 14 years old – and 51 adult recipients, including 30 men (62.5%). The control group was made up of 14 healthy individuals that were not significantly different by gender and age. Expression levels of the microRNAs studied in blood plasma were determined via quantitative polymerase chain reaction (PCR). Correlations of miRNA expression levels with complete blood count and biochemical blood test indicators were analyzed. **Results.** Patients with end-stage chronic respiratory failure (potential lung recipients) were found to have significantly higher expression levels of miR-27, miR-101 and miR-339 in plasma than the healthy individuals ($p = 0.02$, $p = 0.03$ and $p = 0.01$, respectively). The expression level of miR-339 correlated with the age of potential lung recipients ($p = 0.04$). It was a negative correlation ($r = -0.46$). The expression levels of the other four miRNAs were age independent. The average expression level of miR-424 in lung recipients in the long-term period after lung transplant was higher than in waitlisted patients ($p = 0.03$). Analysis of the relationship between miRNA expression levels and external respiration function in the long-term post-transplant period showed that miR-142 expression level ($r = 0.61$; $p = 0.04$) positively correlates with the Tiffeneau-Pinelli index. This strong correlation, which exceeds 85%, indicates the presence of restrictive lung diseases. A year and more after transplantation, it was found that in the recipients, there were close positive correlations between miR-27, miR-142, miR-424 expression levels and blood leukocyte concentration, as well as between the miR-142 expression level and the sCD40L concentration during this period. **Conclusion.** A comparative study of the expression level of miRNAs (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 and miR-424) in the blood plasma of patients suffering from end-stage chronic lung diseases of various origin and in lung recipients enables us to conclude that further studies of the miRNA panels are needed in order to assess their effectiveness as potential molecular and genetic markers of post-transplant complications.

Keywords: lung transplantation, biomarker, miRNA, miR-27, miR-101, miR-142, miR-339, miR-424, sCD40L, chronic respiratory failure.

Достигнутое в последние годы значительное улучшение выживаемости пациентов, перенесших трансплантацию солидных органов, ставит задачу осуществления длительного наблюдения реципиентов с целью ранней диагностики посттрансплантационных осложнений, оценки состояния трансплантата, контроля иммуносупрессии. В настоящее время значительное количество исследований направлено на поиск малоинвазивных лабораторных технологий для ранней доклинической диагностики осложнений у реципиентов солидных органов. Изменения концентрации в крови ряда специфических молекул-биомаркеров, вовлеченных в патофизиологические процессы и являющихся индикаторами риска нежелательных событий, связанных с их развитием, является объективным отражением системности процессов, происходящих в организме реципиентов [1].

Трансплантация донорских легких является радикальным и эффективным способом лечения

больных тяжелой дыхательной недостаточностью. Выполнение биопсии трансплантированных легких с последующим гистологическим исследованием биопсийного материала позволяет верифицировать патологию трансплантата, однако сопряжено с рисками и ограничениями, характерными для инвазивных вмешательств. В качестве потенциальных биомаркеров посттрансплантационных осложнений в последние годы активно изучаются микроРНК. МикроРНК представляют собой семейство небольших некодирующих РНК длиной приблизительно 22 нуклеотида (18–25), которые действуют как регуляторные элементы посттранскрипционных генов. МикроРНК ингибируют синтез белка путем блокирования трансляции посредством спаривания оснований с комплементарной РНК, способствуя тем самым деградациии специфической мишени [2]. Считается, что микроРНК регулируют экспрессию более чем 30% генов, кодирующих структуру белков. При этом микроРНК

играют ключевую роль в регулировании функций как здоровых, так и поврежденных клеток. Они тесно связаны с различными биологическими процессами, включая развитие и дифференцировку кровяных клеток, апоптоз и пролиферацию. Показано, что экспрессия некоторых микроРНК связана с рядом патологических процессов, таких как аутоиммунные заболевания, злокачественные новообразования и отторжение трансплантированных органов [3–5].

Изучение малых сигнальных молекул производится с позиции их потенциальной значимости в патогенезе осложнений у реципиентов после трансплантации и использования в качестве потенциальных мишеней таргетной терапии при отторжении солидных органов [2, 6, 7]. Исследования последних лет показали, что данные об изменении уровня экспрессии отдельных видов микроРНК у реципиентов солидных органов могут быть полезны для ранней диагностики и контроля развития посттрансплантационных осложнений, в том числе отторжения и фиброза трансплантата сердца, почек, печени, легкого [8–11].

Целью настоящего исследования была оценка уровня экспрессии микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) и ее связи с клиническими и лабораторными параметрами у реципиентов трансплантированных легких.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 57 реципиентов в возрасте от 10 до 74 лет (в среднем 35 ± 15), которым в период с 2014-го по 2019 г. выполнена трансплантация донорских легких в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России. Среди них шестеро детей (9%) – четыре мальчика 10, 12, 13 и 17 лет и девочки 13 и 14 лет; а также 51 пациент от 18 до 74 (37 ± 14) лет, в том числе 30 (62,5%) мужчин. Заболеваниями, послужившими причиной развития дыхательной недостаточности и определившими показания к трансплантации, были муковисцидоз ($n = 22$), ХОБЛ ($n = 15$), первичная легочная артериальная гипертензия ($n = 9$), легочный фиброз ($n = 6$), лимфангиолейомиоматоз ($n = 3$) и бронхоэктатическая болезнь легких ($n = 2$). Максимальная длительность наблюдения реципиентов после ТЛ составила 1808 суток (медиана 294 [85; 545]). Группу сравнения составили 14 здоровых лиц.

Плановое обследование пациентов проводилось в соответствии с клиническими рекомендациями Российского трансплантологического общества и включало полное физикальное обследование, общий и биохимический анализы крови, а также вирусологическое и бактериологическое исследование. При исследовании функции внешнего дыхания

посредством спирометрии производили измерение объемов форсированного выдоха в одну секунду ОФВ1 и форсированной жизненной емкости легких ФЖЕЛ, расчет индекса Тиффно ($\text{ОФВ1} / \text{ФЖЕЛ} \times 100\%$). Все пациенты получали индукцию базиликсимабом, иммуносупрессивная терапия включала такролимус, препараты микофеноловой кислоты и метилпреднизолон, при необходимости назначали эверолимус [12].

Материалом для исследования экспрессии микроРНК служила плазма венозной крови (от 1 до 3 образцов от каждого пациента, в среднем 1,22). Образцы периферической крови пациентов собирались в одноразовые пробирки с антикоагулянтом этилендиаминуксусной кислотой (ЭДТА), центрифугировались в течение 10 минут при 3000 оборотов в минуту, после чего плазма крови отделялась от клеточного осадка и незамедлительно замораживалась при -20°C . Из 100 мкл плазмы крови с использованием наборов SerumPlasma (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 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. Статистический анализ полученных данных производили с помощью стандартных методов статистической обработки с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и пакета прикладных программ «Statistica» v.13.0, StatSoftInc (США). Данные представлены значениями медианы и интерквартильного размаха для непараметрических переменных. Полученные значения экспрессии проверялись на нормальность распределения с дальнейшим применением корреляции Спирмена и U-критерия Манна–Уитни для сравнения независимых переменных. Критический уровень значимости принимался равным 5%, т. е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ показал, что уровень экспрессии трех из пяти исследуемых микроРНК (miR-27, miR-101 и miR-339) у пациентов, ожидающих ТЛ, достоверно выше, чем у здоровых лиц ($p = 0,02$, $p = 0,03$ и $p = 0,01$ соответственно, рис. 1).

Результаты измерения уровней экспрессии микроРНК представлены в виде значений медианы и интер-

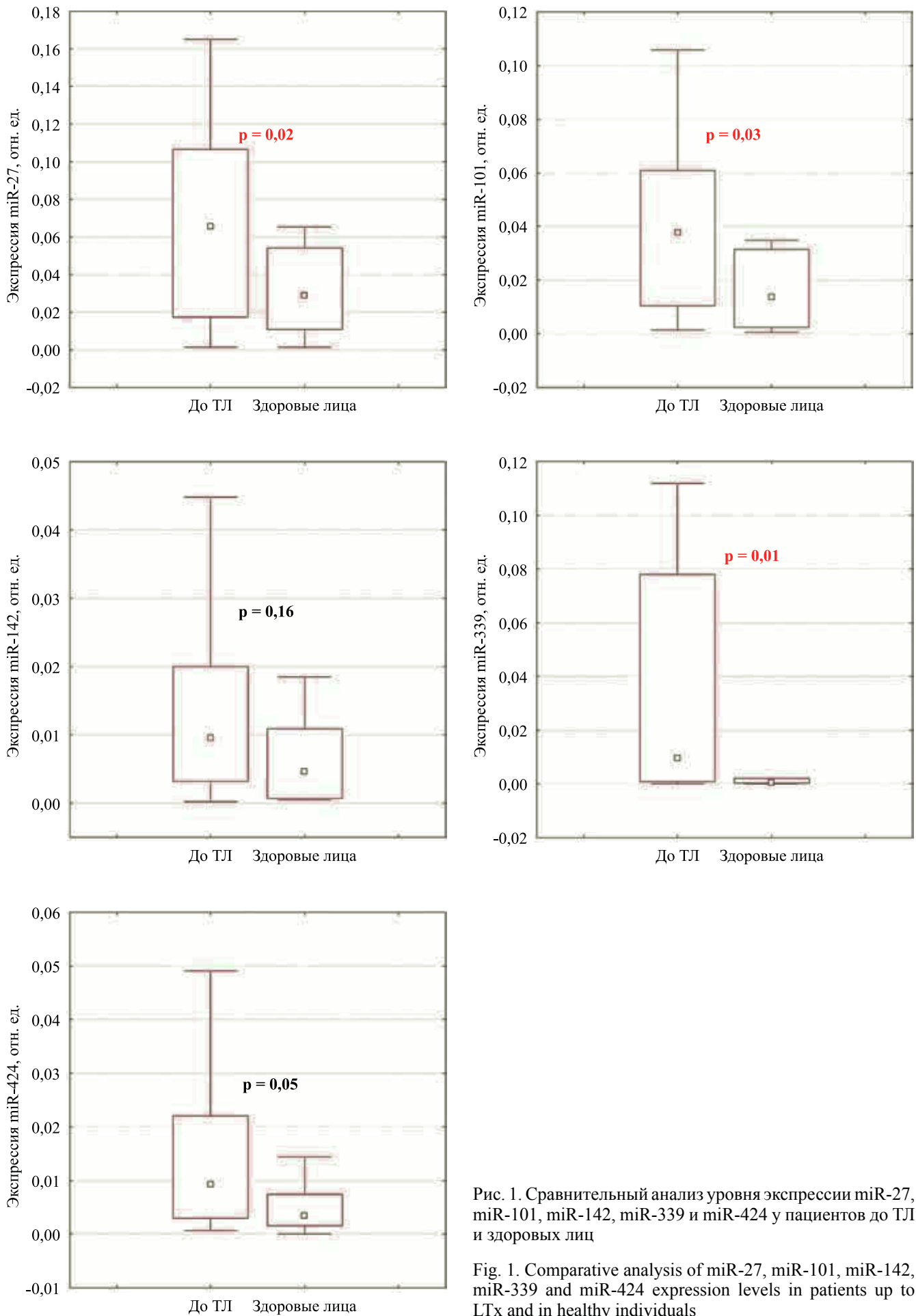


Рис. 1. Сравнительный анализ уровня экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 у пациентов до ТЛ и здоровых лиц

Fig. 1. Comparative analysis of miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 and miR-424 expression levels in patients up to LTx and in healthy individuals

квартильного размаха, что обусловлено распределением значений, отличным от нормального. Данные приведены в относительных единицах (отн. ед.). Достоверных различий в величине экспрессии miR-142 и miR-424 у потенциальных реципиентов легких и здоровых лиц не выявлено ($p = 0,16$ и $p = 0,06$ соответственно).

Не выявлено достоверных различий в величине экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 у мужчин и женщин ($p = 0,37$, $p = 0,85$, $p = 0,98$, $p = 0,27$ и $p = 0,34$ соответственно). Экспрессия четырех из пяти исследованных микроРНК не зависела от возраста; уровень экспрессии miR-339 коррелировал с возрастом потенциальных реципиентов легких ($p = 0,04$), и связь носила обратный характер ($r = -0,46$).

На рис. 2 представлены сравнительные данные об изменении величины экспрессии каждой из исследуемых микроРНК у реципиентов в раннем ($n = 27$) и отдаленном ($n = 44$) периоде после трансплантации. Срок после трансплантации в группе реципиентов раннего периода составил: медиана 33 [23; 68] дня. В группу отдаленного периода вошли реципиенты, обследованные спустя 511 [388; 930] дней после ТЛ.

Средняя величина уровня экспрессии miR-424 у реципиентов легких в отдаленном периоде после ТЛ оказалась достоверно выше, чем у пациентов, ожидающих трансплантацию ($p = 0,03$). Во всех остальных случаях достоверных различий в уровне экспрессии исследуемых микроРНК у реципиентов в раннем и отдаленном периоде после трансплантации, как и у пациентов, ожидающих ТЛ, не обнаружено.

Сравнительный анализ величины экспрессии отдельных микроРНК у реципиентов с диагностированными осложнениями, связанными с обструктивными процессами дыхательных путей ($n = 14$), инфекционными осложнениями ($n = 6$), а также у реципиентов, у которых не было диагностировано указанных осложнений, представлен в таблице. Ве-

личина среднего уровня экспрессии каждой из пяти исследуемых микроРНК в отдаленные сроки после трансплантации, представленная значениями медианы [интерквартильный размах], достоверно не различалась у реципиентов с осложнениями и без таковых (табл.).

Нельзя исключить, что при увеличении числа наблюдений могут быть выявлены достоверные различия экспрессии отдельных микроРНК, связанные с развитием посттрансплантационных осложнений.

В то же время при изучении связи уровня экспрессии каждой из пяти исследуемых микроРНК с данными, полученными при обследовании реципиентов в период наблюдения, установлено, что уровень экспрессии miR-27 находится в обратной зависимости от величины индекса массы тела (ИМТ) пациентов. Указанная зависимость имеет место как у реципиентов легких в отдаленном периоде после трансплантации, так и у пациентов с дыхательной недостаточностью, находящихся в листе ожидания (рис. 3).

Уровень экспрессии miR-27 выше у пациентов с дефицитом массы тела; связи величины экспрессии miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 с ИМТ не обнаружено.

При изучении параметров функции внешнего дыхания у реципиентов донорских легких значимой связи экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 с ОФВ1 в отдаленные сроки после трансплантации не выявлено ($p = 0,25$, $p = 0,64$, $p = 0,59$, $p = 0,14$ и $p = 0,48$ соответственно). Однако в отдаленном посттрансплантационном периоде установлена достоверная прямая связь уровня экспрессии miR-142 ($r = 0,61$; $p = 0,04$) с индексом Тиффно, величина которого более 85% свидетельствует о рестриктивных нарушениях дыхательных путей (рис. 4).

Установлена прямая корреляция содержания лейкоцитов в крови и уровня экспрессии miR-27 ($r = 0,63$;

Таблица

Сравнительный анализ экспрессии микроРНК у реципиентов легких с осложнениями и без таковых в отдаленном послеоперационном периоде

Comparative analysis of microRNAs expression in lung recipients with postoperative complications and without ones

МикроРНК	Без осложнений	Осложнения			
		инфекционные	*p	обструктивные	*p
miR-27	0,07 [0,03; 0,25]	0,06 [0,03; 0,11]	0,64	0,07 [0,03; 0,28]	0,98
miR-101	0,04 [0,01; 0,08]	0,05 [0,03; 0,13]	0,81	0,04 [0,02; 0,14]	0,58
miR-142	0,01 [0,01; 0,02]	0,01 [0,004; 0,01]	0,44	0,01 [0,01; 0,02]	0,94
miR-339	0,02 [0,01; 0,07]	0,02 [0,004; 0,06]	0,83	0,03 [0,004; 0,15]	0,98
miR-424	0,02 [0,01; 0,05]	0,07 [0,04; 0,07]	0,50	0,03 [0,03; 0,07]	0,86

Примечание. * – в сравнении с группой без осложнений.

Note. * – in comparison with the group without complications.

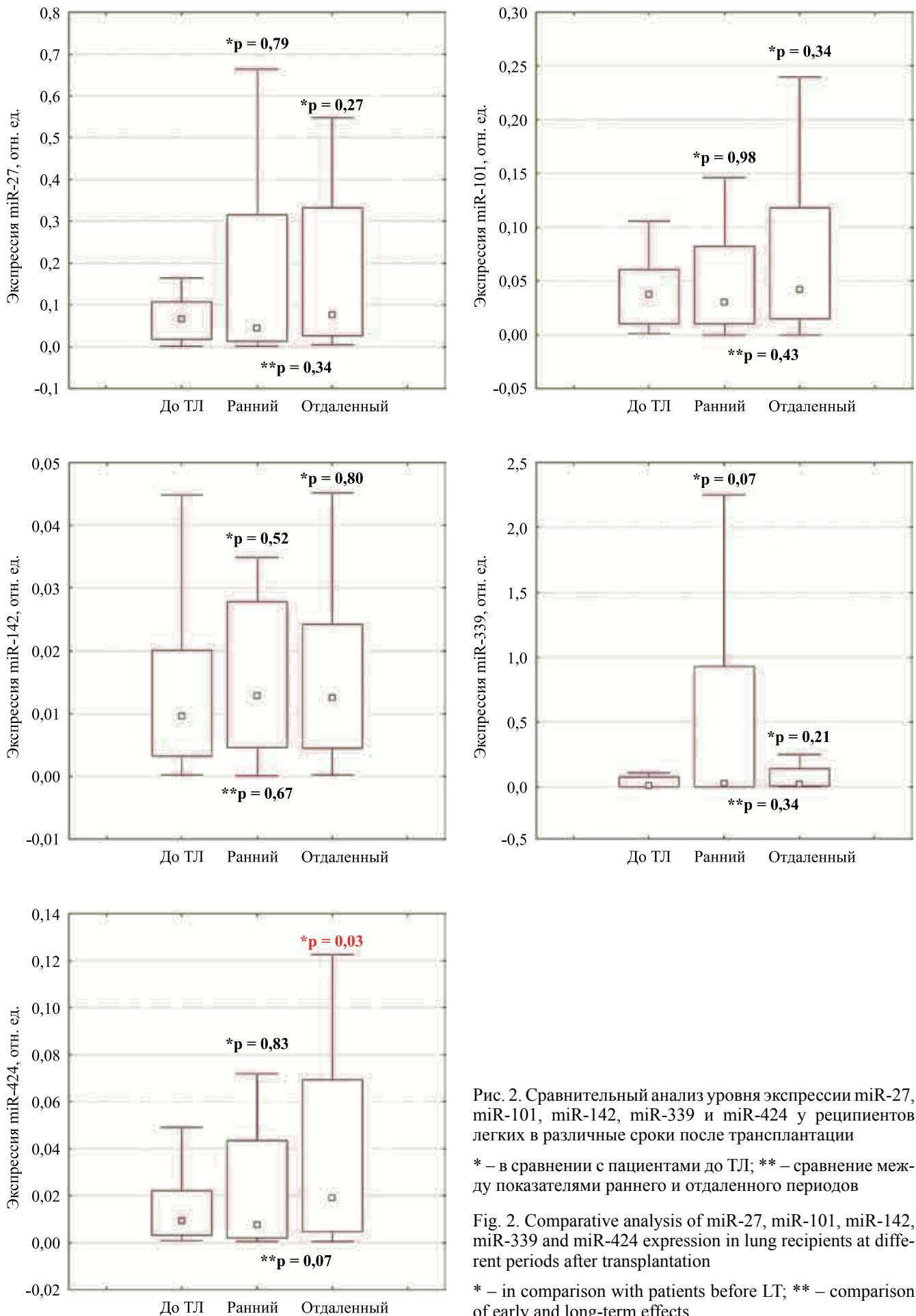


Рис. 2. Сравнительный анализ уровня экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 у реципиентов легких в различные сроки после трансплантации

* – в сравнении с пациентами до ТЛ; ** – сравнение между показателями раннего и отдаленного периодов

Fig. 2. Comparative analysis of miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 and miR-424 expression in lung recipients at different periods after transplantation

* – in comparison with patients before LT; ** – comparison of early and long-term effects

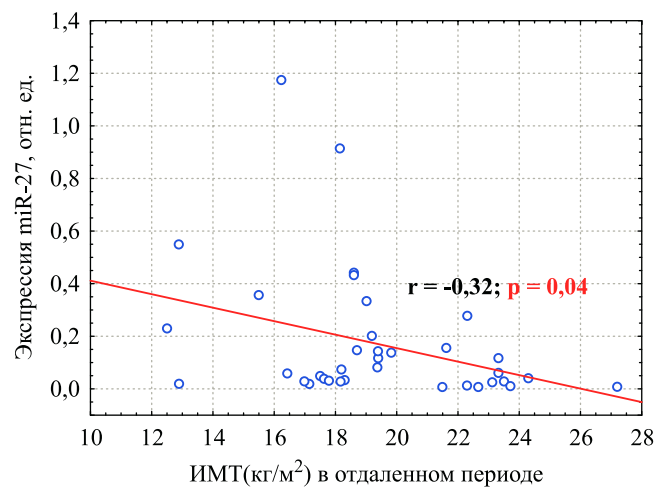
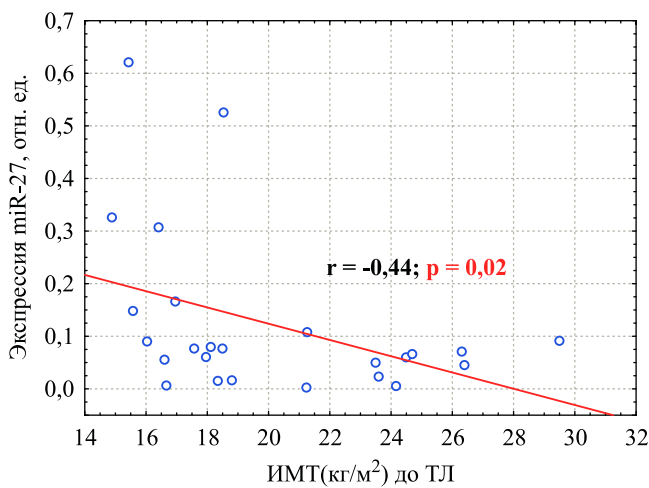


Рис. 3. Корреляция уровня экспрессии miR-27 с индексом массы тела (ИМТ) у реципиентов легких в отдаленном периоде и у пациентов, ожидающих трансплантацию легких

Fig. 3. Correlation of miR-27 expression with body mass index (BMI) in long-term lung recipients and in potential lung recipients

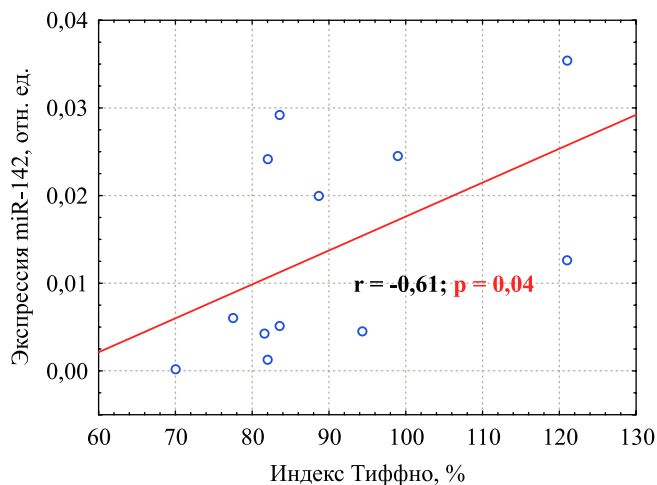


Рис. 4. Корреляция индекса Тиффно (%) и уровня экспрессии miR-142 в крови реципиентов легких в отдаленном периоде

Fig. 4. Correlation of Tiffeneau index (%) and miR-142 expression in lung recipients in the long-term period

$p = 0,0002$), miR-142 ($r = 0,44$; $p = 0,04$) и miR-424 ($r = 0,56$; $p = 0,001$) у реципиентов в отдаленные сроки после трансплантации (рис. 5).

Анализ показал отсутствие значимых корреляций содержания общего белка, альбумина, креатинина, активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и гаммаглутамилтрансферазы (ГГТ) с величиной экспрессии микроРНК. В отдаленные сроки после ТЛ отмечается умеренная обратная корреляция активности АЛТ с miR-27 ($r = -0,44$; $p = 0,01$), а также АСТ с miR-27 ($r = -0,41$; $p = 0,02$) и miR-142 ($r = -0,43$; $p = 0,04$).

У реципиентов легких выраженность экспрессии каждой из пяти исследованных микроРНК в отда-

ленные сроки после трансплантации не зависела от концентрации такролимуса и эверолимуса в крови. В то же время величина концентрации растворимой формы костимулирующего фактора лимфоцитов лиганда CD40 (sCD40L) коррелировала со значениями экспрессии miR-27 ($r = 0,52$; $p = 0,02$) и miR-142 ($r = 0,53$; $p = 0,02$) в плазме крови реципиентов в отдаленном посттрансплантационном периоде (рис. 6).

Значимой зависимости концентрации sCD40L от уровней экспрессии других микроРНК не установлено.

Ряд исследований последних лет позволил идентифицировать микроРНК в качестве потенциальных биомаркеров посттрансплантационных осложнений [13]. Так, достоверные различия уровня экспрессии отдельных микроРНК (miR-10a, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-142-3p, miR-155 и др.) были описаны у реципиентов сердца с острым клеточным отторжением и пациентов без отторжения [8]. Исследования диагностического потенциала измерения экспрессии микроРНК в плазме реципиентов почки позволили выявить ряд молекул (miR-150, miR-192, miR-200b и miR-423-3p), связанных с развитием отторжения и дисфункции почечного трансплантата [5]. Обнаружены специфичные микроРНК (miR-122, miR-148a и miR-194), уровни экспрессии которых значительно возрастают в сыворотке крови при отторжении трансплантата печени [9].

В экспериментальных исследованиях была установлена регуляторная роль и диагностическая значимость микроРНК при развитии осложнений после трансплантации легких. Показано, что miR-124 через регуляцию экспрессии хемотаксического белка моноцитов-1 влияет на пролиферацию и активацию

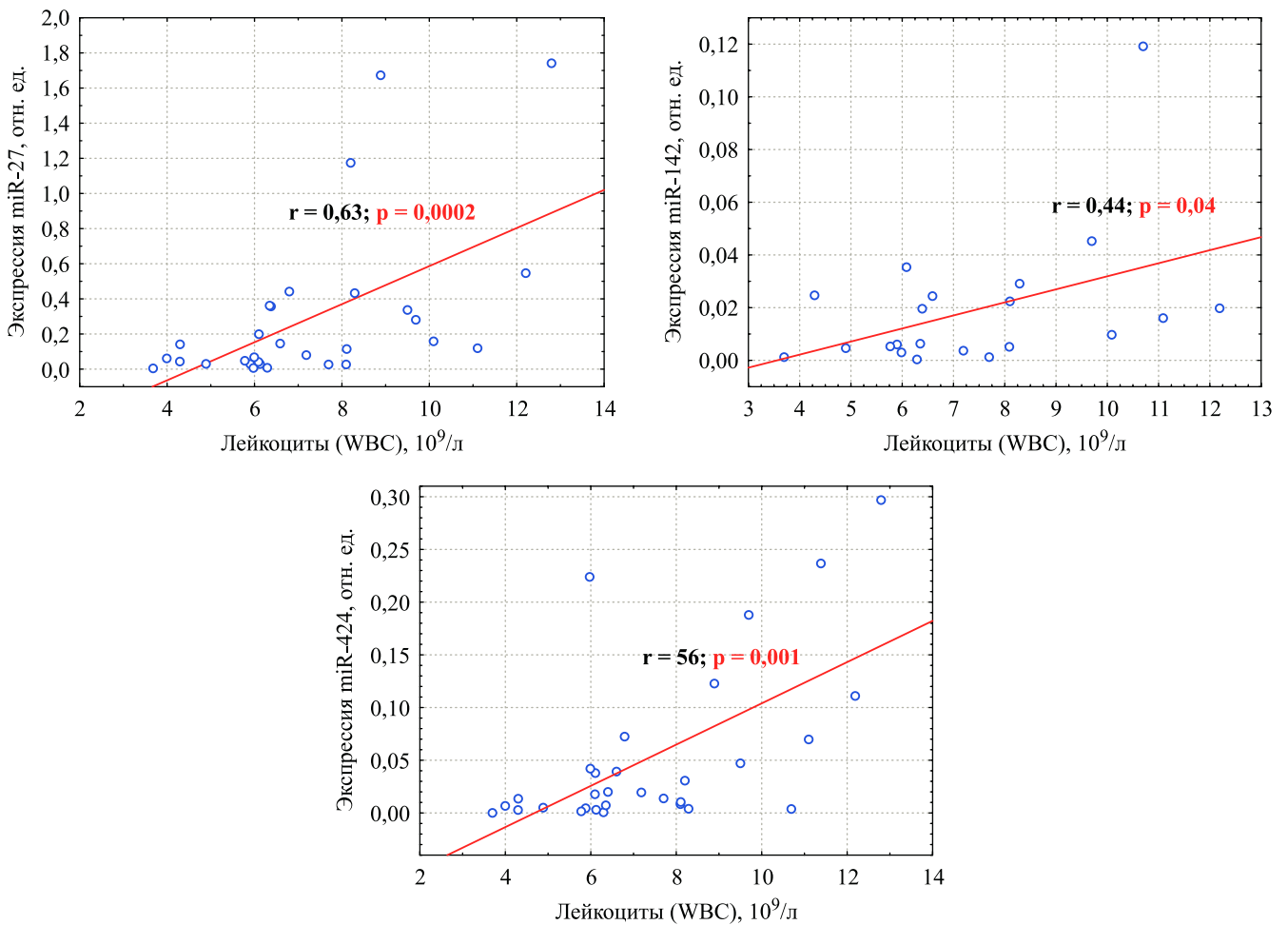


Рис. 5. Корреляция уровня экспрессии miR-27, miR-142 и miR-424 с содержанием лейкоцитов в крови реципиентов легких

Fig. 5. Correlation of miR-27, miR-142 and miR-424 expression with leukocyte levels in lung recipients

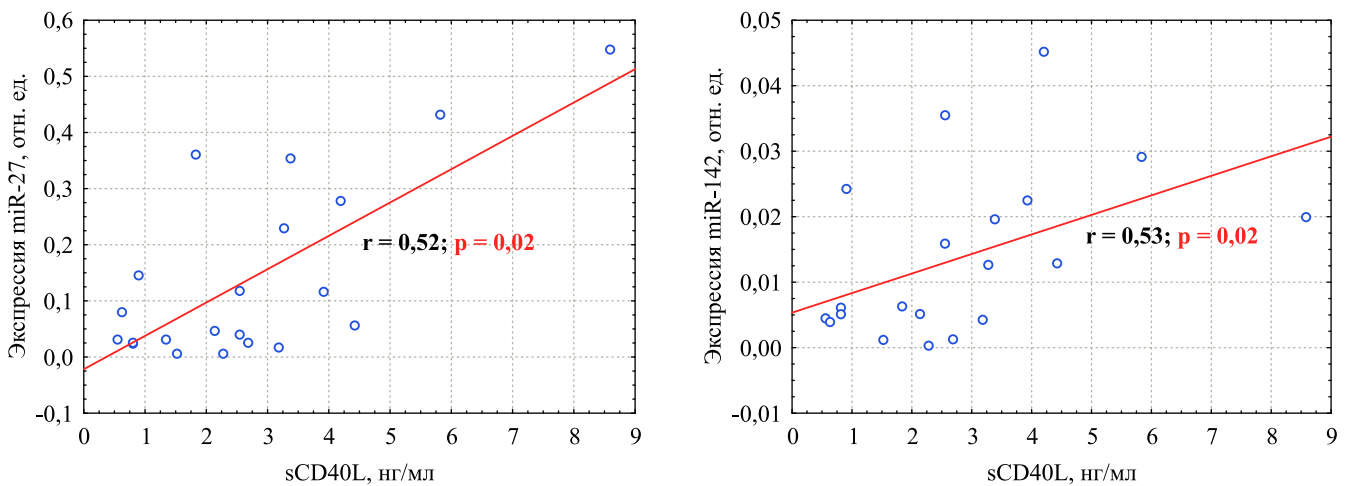


Рис. 6. Корреляция sCD40L и уровня экспрессии miR-27 и miR-142 в крови реципиентов легких в отдаленном периоде

Fig. 6. Correlation of sCD40L and miR-27, miR-142 expression in lung recipients in the long-term period

фибробластов сосудов легких [14], что имеет большое значение при развитии хронической дисфункции трансплантата. В другом исследовании на экспери-

ментальной модели трансплантации легких у крыс отмечено увеличение экспрессии miR-146a и miR-155 при развитии синдрома облитерирующего бронхито-

лита [15]. Схожие данные о возможной диагностической значимости при отторжении трансплантата легких были получены при исследовании miR-376-5p, miR-338-3p, miR-16 и miR-195 [16]. Было показано, что микроРНК-199b регулирует выраженность иммунных реакций при развитии отторжения после трансплантации легких [17].

В сыворотке крови пациентов с терминальной стадией дыхательной недостаточности в разные сроки после трансплантации легких было отмечено значительное увеличение экспрессии miR-21, miR-29a, miR-103 и miR-191 [18].

Последние результаты изучения микроРНК у реципиентов солидных органов позволяют охарактеризовать их в качестве потенциальных биомаркеров посттрансплантационных осложнений [19], однако ввиду немногочисленности исследований существует необходимость дальнейшего изучения вовлеченности данной группы молекул в биологические процессы у реципиентов донорских легких.

Задачей настоящего исследования было установление связи величины экспрессии микроРНК с изменением клинических и лабораторных показателей у пациентов с тяжелой дыхательной недостаточностью и у реципиентов после трансплантации легких, с последующим определением возможности их использования в качестве потенциальных биомаркеров посттрансплантационных осложнений. Для исследования были отобраны микроРНК, регулирующие экспрессию генов, потенциально ассоциированных с развитием осложнений у реципиентов трансплантированных органов, в первую очередь отторжения, инфекции, фиброза трансплантата.

Установлено, что у потенциальных реципиентов легких экспрессия трех из пяти исследованных микроРНК (miR-27, miR-101 и miR-339) превышает таковую у здоровых лиц, что может указывать на их вовлеченность в патологический процесс. Достоверных изменений уровня экспрессии каждой из микроРНК, в сравнении с таковым у пациентов, ожидающих трансплантацию, у реципиентов в ранние и в отдаленные сроки после трансплантации нам не удалось обнаружить.

Сравнительный анализ уровня экспрессии исследуемых микроРНК у реципиентов с инфекционно-опосредованными, обструктивными осложнениями в отдаленные сроки после трансплантации и пациентов без таковых также не позволил выявить достоверных различий. Нельзя исключить, что отсутствие различий в средних показателях величины экспрессии между указанными группами может быть обусловлено небольшим числом наблюдений, особенно если принять во внимание широкий диапазон вариаций величины экспрессии микроРНК, а также большое разнообразие факторов, способных оказы-

вать влияние на эти параметры, как в ранние, так и в отдаленные сроки после трансплантации.

На сегодняшний день идентифицировано и охарактеризовано достаточно большое число различных видов микроРНК. Для настоящего исследования были отобраны пять из них, предположительно играющих роль в развитии заболеваний легких, сердечно-сосудистой системы и/или потенциально значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений у реципиентов легких [13]. Механизмы влияния отдельных микроРНК на трансплантационный иммунитет и различные аспекты взаимоотношений трансплантата с организмом реципиента изучены недостаточно, большая часть сведений основана на результатах экспериментальных исследований [13, 15, 20]. Однако имеющиеся данные об участии отдельных микроРНК в регуляции иммунного ответа на трансплантацию, в процессах острого клеточного и хронического отторжения, об их влиянии на функции фибробластов, дендритных клеток, Т-лимфоцитов являются основанием для углубленных исследований роли сигнальных молекул в патогенезе посттрансплантационных осложнений, с последующим развитием принципиально новых подходов к их диагностике и лечению [6, 14, 19].

В настоящем исследовании показано, что величина экспрессии miR-27 у реципиентов легочного трансплантата связана с рядом клинических и лабораторных параметров – индексом массы тела, активностью печеночных трансаминаз, количеством лейкоцитов в крови. Согласно опубликованным данным, miR-27 и его изоформы участвуют в регуляции процессов метаболизма, фиброобразования за счет подавления экспрессии трансформирующего фактора роста β (TGF- β) [12, 21].

С числом лейкоцитов в крови, активностью АСТ у реципиентов легких коррелирует также экспрессия miR-142. МикроРНК miR-142 экспрессируется на Т-лимфоцитах, играющих основную роль в развитии острого клеточного отторжения. Тот факт, что miR-142 происходит из иммунных клеток, а не из ткани трансплантата, позволяет предположить возможность прогнозирования отторжения еще до повреждения самого органа. Более того, недавно показана регулирующая роль miR-142 в патогенезе воспалительных заболеваний легких за счет подавления активации макрофагов [12, 22]. В этом контексте особый интерес может представлять обнаруженная нами зависимость между экспрессией miR-142 и индексом Тиффно, отражающим рестриктивную патологию, обусловленную нарушениями альвеолярного звена бронхолегочной системы.

Наличие прямой зависимости экспрессии miR-27 и miR-142 и концентрации в крови растворимой формы лиганда CD40, роль которого при трансплантации

солидных органов опосредована через костимуляцию Т-лимфоцитов [23], может, с одной стороны, указывать на один из механизмов регуляции функционирования легочного трансплантата, с другой – служить основанием для разработки диагностических подходов.

В нашем исследовании также установлена связь экспрессии miR-424 с числом лейкоцитов в крови реципиентов легких. МикроРНК miR-424 секретируется эндотелиальными клетками легочных артерий и играет важную роль в патогенезе легочной гипертензии. Недавно было показано, что miR-424 оказывает защитное влияние на клетки альвеолярного эпителия при остром респираторном дистресс-синдроме; это действие опосредовано через нуклеарный фактор kB (NF-kB) [24].

Предпринятое в настоящей работе сравнительное исследование уровня экспрессии микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) в плазме крови пациентов, страдающих хроническими заболеваниями легких различной этиологии в терминальной стадии, у реципиентов легких в ранние и отдаленные сроки после трансплантации позволяет сделать заключение о целесообразности дальнейших исследований панели микроРНК и оценке их эффективности в качестве потенциальных молекулярно-генетических маркеров при наблюдении пациентов, ожидающих трансплантацию, и реципиентов донорских легких.

Обнаруженные корреляционные связи уровней экспрессии микроРНК с клиническими, функциональными и лабораторными показателями могут указывать на участие микроРНК в механизмах регуляции взаимоотношений трансплантат–реципиент и на целесообразность дальнейшего изучения вовлеченности исследуемых микроРНК в иммунологические механизмы повреждения трансплантированного органа, их диагностической эффективности при развитии посттрансплантационных осложнений.

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. Hamilton BCS, Kukreja J, Ware LB, Matthay MA. Protein Biomarkers Associated With Primary Graft Dysfunction Following Lung Transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017; 312 (4): 531–541. doi: 10.1152/ajplung.00454.2016.
2. Harris A, Krams SM, Martinez OM. MicroRNAs as immune regulators: implications for transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2010; 10 (4): 713–719.
3. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136 (2): 215–233.
4. Amrouche L, Rabant M, Anglicheau D. MicroRNAs as biomarkers of graft outcome. *Transplantation Reviews*. 2014; 28 (3): 111–118.
5. Vahed SZ, Zonouzi AP, Mahmoodpoor F. Circulating miR-150, miR-192, miR-200b, and miR-423-3p as Non-invasive biomarkers of chronic allograft dysfunction. *Archives of Medical Research*. 2017; 48 (1): 96–104.
6. Sarma NJ, Tiriveedhi V, Ramachandran S. Modulation of immune responses following solid organ transplantation by microRNA. *Experimental and Molecular Pathology*. 2012; 93 (3): 378–385.
7. Carlo S Di, Rossi E, Politano G. Identification of miRNAs potentially involved in bronchiolitis obliterans syndrome: a computational study. *PLoS One*. 2016; 11 (8): 1–22.
8. Duong Van Huyen JP, Tible M, Gay A. MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection. *European Heart Journal*. 2014; 35 (45): 3194–3202.
9. Farid WRR, Pan Q, Van der Meer AJP. Hepatocyte-derived microRNAs as serum biomarkers of hepatic injury and rejection after liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2012; 18 (3): 290–297.
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 zabolevanij, perspektivy klinicheskogo primeneniya. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (7): 403–409.
11. Liu X, Dong C, Jiang Z. MicroRNA-10b downregulation mediates acute rejection of renal allografts by derepressing BCL2L1. *Experimental Cell Research*. 2015; 333 (1): 155–163.
12. Общероссийская общественная организация трансплантологов «Российское трансплантологическое общество». Клинические рекомендации. Трансплантация легких и комплекса «сердце–легкие». 2016. Obshcherossiyskaya obshchestvennaya organizatsiya transplantologov «Rossiyskoe transplantologicheskoe obshchestvo». Klinicheskie rekomendatsii. Transplantatsiya legkikh i kompleksa «serdtse–legkie». 2016.
13. Hamdorf M, Kawakita S, Everly M. The Potential of MicroRNAs as Novel Biomarkers for Transplant Rejection. *Journal of Immunology Research*. 2017; 2017: 1–12. doi: 10.1155/2017/4072364.
14. Wang D, Zhang H, Li M. MicroRNA-124 controls the proliferative, migratory, and inflammatory phenotype of pulmonary vascular fibroblasts. *Circulation Research*. 2014; 114 (1): 67–78.
15. Wang J, Cao H, Hong X. MicroRNA screening and functional study of obliterative bronchiolitis in a rat model simulating lung transplantation. *Genetics and Molecular Research*. 2015; 14 (4): 19309–19316.

16. Dong M, Wang X, Zhao HL. Integrated analysis of transcription factor, microRNA and LncRNA in an animal model of obliterative bronchiolitis. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*. 2015; 8 (6): 7050–7058.
17. Xu Z, Nayak DK, Benshoff N. De novo-developed antibodies to donor MHC antigens lead to dysregulation of microRNAs and induction of MHC class II. *The Journal of Immunology*. 2015; 194 (12): 6133–6143.
18. Zhu L, Xu H, Lu W. MiR-199b-5p regulates immune-mediated allograft rejection after lung transplantation through the GSK3 β and NF- κ B pathways. *Inflammation*. 2018; 41 (4): 1524–1535. doi: 10.1007/s10753-018-0799-2.
19. Shan J, Feng L, Luo L. MicroRNAs: potential biomarker in organ transplantation. *Transplant Immunology*. 2011; 24 (4): 210–215.
20. Zhang W, Zhou T, Ma SF. MicroRNAs implicated in dysregulation of gene expression following human lung transplantation. *Translational Respiratory Medicine*. 2013; 1 (12): 1–9.
21. Ma M, Yin Z, Zhong H, Liang T, Guo L. Analysis of the expression, function, and evolution of miR-27 isoforms and their responses in metabolic processes. *Genomics*. 2019; 111 (6): 1249–1257. doi: 10.1016/j.ygeno.2018.08.004.
22. Zhang D, Lee H, Wang X, Groot M, Sharma L, Dela Cruz CS, Jin Y. A potential role of microvesicle-containing miR-223/142 in lung inflammation. *Thorax*. 2019; 74 (9): 865–874. doi: 10.1136/thoraxjnl-2018-212994.
23. Shevchenko OP, Khalilulin TA, Shevchenko AO. Predictive value of PAPP-A, sCD40L, anti-HLA antibodies detected by Elisa and Luminex in heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2013; 33 (4): 135.
24. Cheng D, Zhu C, Liang Y, Xing Y, Shi C. MiR-424 overexpression protects alveolar epithelial cells from LPS-induced apoptosis and inflammation by targeting FGF2 via the NF- κ B pathway. *Life Sci*. 2020; 242: 117213. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117213.

*Статья поступила в редакцию 20.03.2020 г.
The article was submitted to the journal on 20.03.2020*