

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-3-69-78

СВЯЗЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ РЕЦИПИЕНТОВ СЕРДЦА С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ БИОМАРКЕРОВ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ

Д.А. Великий¹, О.Е. Гичкун^{1, 2}, А.А. Улыбышева^{1, 3}, С.О. Шаранченко¹, А.В. Марченко¹, О.П. Шевченко^{1, 2}, А.О. Шевченко¹⁻³

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

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель: анализ связи уровня экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 с концентрацией биомаркеров, участвующих в развитии и потенциально значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца. **Материалы и методы.** В исследование включены 72 реципиента сердца, среди них мужчин – 56 (77,8%), средний возраст реципиентов составил $48,6 \pm 10,9$ (от 16 до 70) года, и 38 пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью, среди них мужчин – 29 (76,3%), средний возраст пациентов составил $48,8 \pm 9,9$ (от 26 до 70) года. Группу сравнения составили 12 здоровых лиц, значимо не отличающихся по полу и возрасту. Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови определялся методом количественной полимеразной цепной реакции. Определение концентрации VEGF-A, PLGF, MCP-1 и sCD40L в плазме крови проводили с помощью мультиплексного метода. Определение концентрации ST2 и галектина-3 в плазме крови проводили методом иммуноферментного анализа. **Результаты.** Установлены достоверно более высокие показатели экспрессии микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 в плазме крови у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности по сравнению со здоровыми лицами. У потенциальных реципиентов сердца уровень экспрессии микроРНК-339, микроРНК-424 коррелировал с концентрацией галектина-3, уровень экспрессии микроРНК-101 – с концентрацией PLGF-1, уровень микроРНК-27 – с концентрацией MCP-1. В ранние сроки после трансплантации у реципиентов сердца уровень экспрессии микроРНК-101, микроРНК-339 и микроРНК-424 был достоверно ниже, чем у пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью. Через год и более после трансплантации уровень экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 был достоверно выше, чем у реципиентов сердца в ранние сроки. У реципиентов сердца спустя год и более после трансплантации установлена корреляционная связь между уровнем экспрессии микроРНК-142 и концентрацией галектина-3 ($p = 0,05$), уровнем экспрессии микроРНК-27, микроРНК-424 и концентрацией ST2 ($p = 0,02$), уровнем экспрессии микроРНК-27 и концентрацией PLGF-1 ($p = 0,02$), уровнем экспрессии микроРНК-101 и концентрацией PAPP-A ($p = 0,05$). **Заключение.** У реципиентов сердца величина экспрессии микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-424 и микроРНК-101 связана с концентрацией биомаркеров фиброза (галектин-3), отторжения (ST2), неоангиогенеза (PLGF) и деструкции тканей (PAPP-A). Комплексный анализ до- и посттрансплантационных маркеров может открыть новые перспективы как в диагностике, оценке рисков посттрансплантационных осложнений, так и в понимании процессов, ведущих к их развитию.

Ключевые слова: трансплантация сердца, отторжение, микроРНК, ST2, галектин-3, плацентарный фактор роста (PLGF), ассоциированный с беременностью протеин-A (PAPP-A).

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

CORRELATION BETWEEN MICRORNA EXPRESSION LEVELS AND PLASMA CONCENTRATIONS OF BIOMARKERS OF POST-TRANSPLANT COMPLICATIONS IN HEART TRANSPLANT RECIPIENTS

D.A. Velikiy¹, O.E. Gichkun^{1, 2}, A.A. Ulybysheva^{1, 3}, S.O. Sharapchenko¹, A.V. Marchenko¹, O.P. Shevchenko^{1, 2}, A.O. Shevchenko¹⁻³

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

³ Pirogov Medical University, Moscow, Russian Federation

Objective: to analyze the correlation between the expression levels of microRNA-101, microRNA-142, microRNA-27, microRNA-339, and microRNA-424 and the plasma concentrations of biomarkers that are potentially significant for the diagnosis of post-transplant complications in heart recipients. **Materials and methods.** The study enrolled 72 heart recipients, among whom were 56 men (77.8%). The average age of recipients was 48.6 ± 10.9 (16 to 70) years. There were 38 patients with severe chronic heart failure, among whom were 29 men (76.3%). Patients' mean age was 48.8 ± 9.9 (26 to 70) years. The control group consisted of 12 healthy individuals who did not differ significantly by sex and age. microRNA expression levels in blood plasma were measured via quantitative polymerase chain reaction. Plasma concentrations of VEGF-A, PLGF, MCP-1, and sCD40L were determined using a multiplex method. ST2 and Galectin-3 concentrations were measured via enzyme-linked immunosorbent assay. **Results.** Patients with end-stage chronic heart failure were found to have significantly higher expression levels of microRNA-27, microRNA-339 and microRNA-424 in blood plasma compared with the healthy individuals. In potential heart recipients, the expression levels of microRNA-339 and microRNA-424 correlated with serum galectin-3 concentrations, microRNA-101 expression levels correlated with PLGF-1 concentrations, while microRNA-27 expression levels correlated with plasma MCP-1 concentrations. In the early post-transplant period, the expression levels of microRNA-101, microRNA-339, and microRNA-424 in heart recipients were significantly lower than in patients with severe chronic heart failure. In the early post-transplant period (one year or more after transplantation), microRNA-101 and microRNA-27 expression levels were significantly higher than in heart recipients. A year or more after transplantation, the following correlations were found in heart recipients: microRNA-142 expression level correlated with serum levels of galectin-3 ($p = 0.05$), microRNA-27 and microRNA-424 expression levels correlated with ST2 concentrations ($p = 0.02$), microRNA-27 expression level correlated with PLGF-1 concentrations ($p = 0.02$), while microRNA-101 expression level correlated with serum levels of PAPP-A ($p = 0.05$). **Conclusion.** In heart recipients, the expression levels of microRNA-142, microRNA-27, microRNA-424, and microRNA-101 correlate with the concentration levels of biomarkers of fibrosis (Galectin-3), rejection (ST2), neoangiogenesis (PLGF), and tissue destruction (PAPP-A). A comprehensive analysis of pre- and post-translational markers may open up new perspectives in diagnosis, assessment of the risks of post-transplant complications, and in understanding the processes leading to their development.

Keywords: heart transplantation, rejection, microRNA, ST2, Galectin-3, placental growth factor (PLGF), pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A).

Своевременная диагностика посттрансплантационных осложнений необходима для подбора и корректировки оптимальных дозировок иммуносупрессивной терапии и восстановления функции трансплантированного органа. На сегодняшний день стандартом определения степени и характера острого отторжения трансплантированного сердца является эндомикардиальная биопсия (ЭМБ), которая выполняется после трансплантации, в сроки, предусмотренные протоколом, а также при проявлении признаков нарушения функции трансплантата [1]. Вследствие того, что иннервация трансплантированного сердца нарушена, посттрансплантационные осложнения у реципиентов сердца не сопровождаются болевыми

ощущениями и могут развиваться бессимптомно. Для обеспечения длительного функционирования трансплантированного органа необходима ранняя диагностика осложнений после трансплантации и назначение своевременного лечения [2].

В последние годы было показано участие ряда биомаркеров в развитии сердечно-сосудистых осложнений у больных сердечной недостаточностью и у пациентов с трансплантированным сердцем, а также возможность использования оценки их концентрации для прогнозирования и диагностики острого отторжения, болезни коронарных артерий, фиброза сердечного трансплантата [3–6].

Отдельную группу сигнальных молекул, рассматриваемых в качестве перспективных кандидатов на роль биомаркеров посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца, составляют микроРНК – малые некодирующие РНК, регулирующие экспрессию генов. Считается, что микроРНК играют важную роль в регуляции функций как здоровых, так и поврежденных клеток. Изменение экспрессии некоторых микроРНК тесно связано с рядом патологических процессов, таких как аутоиммунные заболевания, злокачественные новообразования и отторжение трансплантированных органов [7–9].

В настоящей работе проведен анализ связи уровня экспрессии микроРНК-27, микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-339 и микроРНК-424, определяемого в плазме крови реципиентов сердца, с концентрацией биомаркеров, потенциально значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 72 пациента, 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 – 56 (77,8%), средний возраст реципиентов составил $48,6 \pm 10,9$ (от 16 до 70) года, и 38 пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью (III и IV функциональный класс по NYHA), среди них мужчин – 29 (76,3%), средний возраст пациентов составил $48,8 \pm 9,9$ (от 26 до 70) года. У 20 (52,6%) пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью была диагностирована дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), у 18 (47,4%) – ишемическая болезнь сердца (ИБС). Наблюдение реципиентов после трансплантации включало: ранний период – первый месяц после ТС (медиана 35 [15; 69] суток), отдаленный период – спустя год и более после ТС (медиана 404 [346,7; 783,5] суток). Группу сравнения составили 12 здоровых лиц, значимо не отличающихся по полу и возрасту.

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 цитоста-

тиков (микофенолата мофетил или микофеноловая 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 1,44). Образцы периферической крови пациентов собирались в одноразовые пробирки с антикоагулянтом этилендиаминуксусной кислотой (EDTA), центрифугировали в течение 10 минут при 3000 оборотах в минуту, после чего плазма крови отделялась от клеточного осадка и незамедлительно замораживалась при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 [10] 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.

Определение концентрации VEGF-A, PlGF, MCP-1 и sCD40L в плазме крови проводили с помощью мультиплексного метода, который объединяет принцип проточной флуориметрии и иммуноферментного анализа, с применением магнитных микросфер из полистирола, маркированных красными и инфракрасными флуорофорами, нагруженных специфическими антителами. Мультиплексная панель была сформирована на основе наборов реагентов Simplex ProcartaPlex™. Определение концентрации ST2 в плазме крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов Critical Diagnostics Presage® ST2 Assay (США). Измерение концентрации галектина-3 в плазме крови проводили иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов Human Galectin-3 Platinum ELISA (Bender MedSystems GmbH, Вена, Австрия). Оптическую плотность при длине волны 450 нм измеряли на спектрофотометре.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ полученных результатов был проведен при помощи пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 20 (IBM SPSS Inc., 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. Для оценки связи количественных и качественных порядковых признаков рассчитывался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень значимости принимался равным 5%, т. е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 у здоровых лиц и пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности представлен в табл. 1.

Данные представлены в виде медианы концентраций [интерквартильного размаха] с указанием достоверности различий, что обусловлено распределением значений, отличным от нормального.

У пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности уровень экспрессии микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 оказался достоверно выше, чем у здоровых лиц (рис. 1).

Уровень экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-142 в данных группах достоверно не различался ($p = 0,08$ и $p = 0,77$ соответственно).

У пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью уровень экспрессии микроРНК-101,

Таблица 1

Сравнительный анализ экспрессии микроРНК у здоровых лиц и пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью

Comparative analysis of microRNAs expression in healthy individuals and patients with severe chronic heart failure

МикроРНК ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$)	Здоровые лица	Пациенты с ХСН	Достоверность, p
МикроРНК-101	-5,66 [-6,85; -4,97]	-4,29 [-6,86; -3,21]	0,08
МикроРНК-142	-7,39 [-10,26; -6,36]	-7,35 [-8,19; -6,25]	0,77
МикроРНК-27	-5,79 [-6,70; 4,6]	-5,3 [-6,37; -1,22]	0,02
МикроРНК-339	-11,14 [-11,75; -11,03]	-6,06 [-7,89; -4,86]	0,0001
МикроРНК-424	-8,3 [-9,34; -7,41]	-5,46 [-7,54; -1,46]	0,001

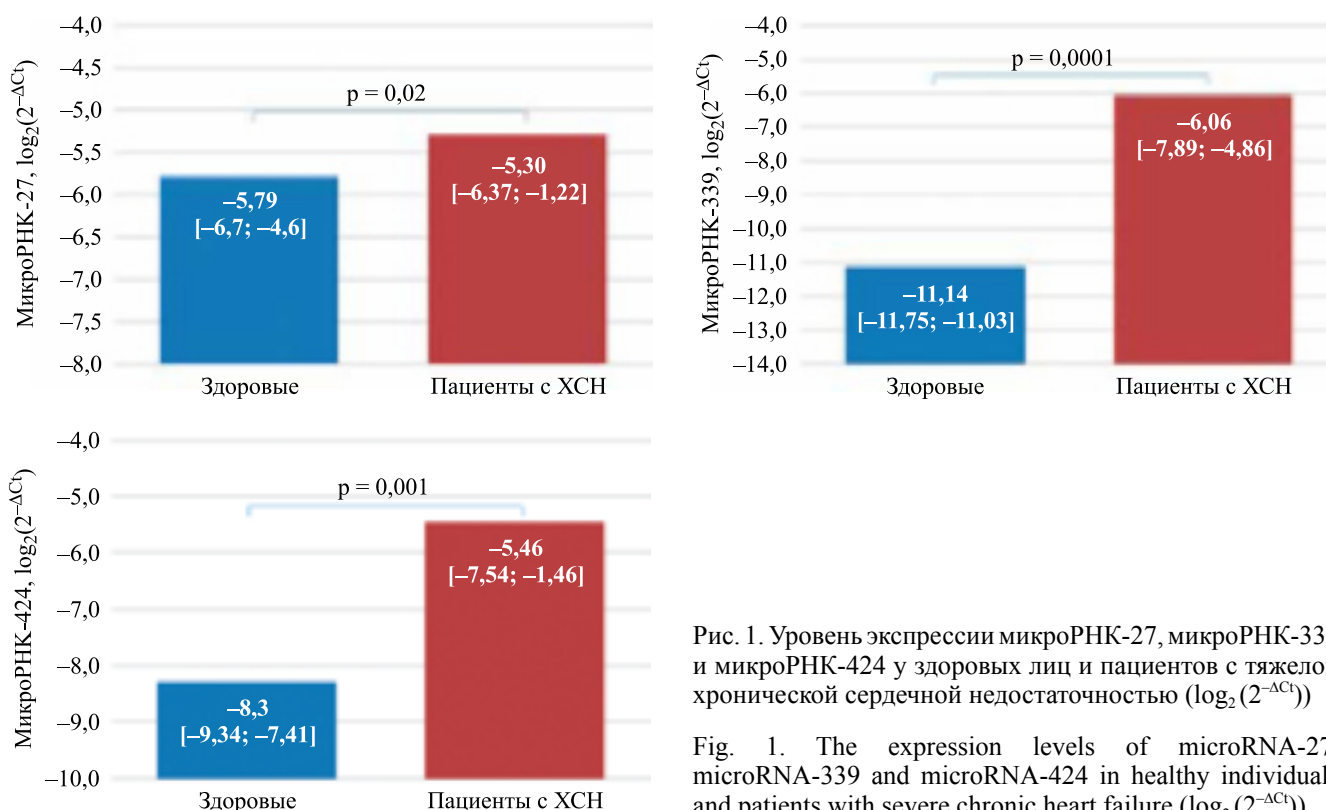


Рис. 1. Уровень экспрессии микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 у здоровых лиц и пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$)

Fig. 1. The expression levels of microRNA-27, microRNA-339 and microRNA-424 in healthy individuals and patients with severe chronic heart failure ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$)

микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 не различался у мужчин и женщин ($p = 0,93$, $p = 0,98$, $p = 0,63$, $p = 0,97$ и $p = 0,26$ соответственно). Показатели экспрессии микроРНК не зависели от возраста пациентов ($r = -0,304$, $p = 0,16$; $r = -0,236$, $p = 0,35$; $r = -0,361$, $p = 0,08$; $r = 0,146$, $p = 0,44$ и $r = -0,054$, $p = 0,82$ соответственно).

Уровень экспрессии микроРНК-339 у пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью, причиной развития которой была ишемическая болезнь сердца, был достоверно выше, чем у пациентов, у которых была диагностирована дилатационная кардиомиопатия (рис. 2).

Достоверных различий в уровне экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-27 и микроРНК-424 в зависимости от исходного диагноза (ДКМП или ИБС), послужившего причиной развития тяжелой хронической сердечной недостаточности, не выявлено ($p = 0,6$, $p = 0,52$, $p = 0,87$, $p = 0,57$ и $p = 0,12$ соответственно).

В настоящее исследование были включены следующие биомаркеры:

- фактор роста эндотелия сосудов А (VEGF-A), продуцирующийся макрофагами, фибробластами, эндотелиальными и другими клетками; участвующий в активации, пролиферации, миграции и дифференцировке клеток эндотелия кровеносных и лимфатических сосудов [12];
- плацентарный фактор роста (PLGF) – биомаркер неоангиогенеза, участвующий в инициации воспалительных процессов в сосудистой стенке [13];
- хемоаттрактантный белок макрофагов (MCP-1), продуцирующийся эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, фибробластами, лимфоцитами и другими клетками; MCP-1 активирует миграцию лейкоцитов в сосудистую стенку, участвует в активации и дегрануляции лейкоцитов, миелопоэзе, ангиогенезе и фиброгенезе [14];
- растворимая форма лиганда CD40 (sCD40L) – компонент системы костимуляции лимфоцитов CD40/CD40L; участвует в процессах воспаления, тромбообразования, вызывает активацию и пролиферацию гладкомышечных клеток [15];
- стимулирующий фактор роста (ST2), растворимая форма которого представляет циркулирующую форму рецептора к интерлейкину-33 и является биомаркером острого отторжения сердечного трансплантата; секреция интерлейкина-33 главным образом происходит в ответ на механическое растяжение фибробластов и кардиомиоцитов, приводя к активации сигнальных путей и препятствуя развитию гипертрофии миокарда [16];
- галектин-3, относящийся к семейству β -галактозидсвязывающих белков, играющих важную роль в регуляции процессов воспаления, иммунного ответа и фиброза; в месте повреждения галек-

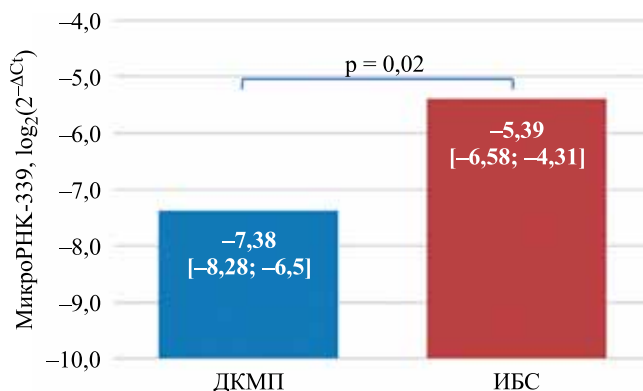


Рис. 2. Уровень экспрессии микроРНК-339 у пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью в зависимости от исходного диагноза: ДКМП или ИБС ($\log_2(2^{-\Delta C_t})$)

Fig. 2. The expression levels of microRNA-339 in patients with severe chronic heart failure depending on the initial diagnosis: DCM or CHD ($\log_2(2^{-\Delta C_t})$).

тин-3 способен секретироваться во внеклеточное пространство, что стимулирует процесс фиброза через активацию и размножение фибробластов [17].

Сравнительный анализ корреляционной связи уровня экспрессии микроРНК в плазме крови пациентов, страдающих терминальной сердечной недостаточностью, с содержанием белковых (посттрансляционных) биомаркеров посттрансплантационных осложнений представлен в табл. 2.

У пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности уровень экспрессии микроРНК-339 и микроРНК-424 имел обратную корреляцию с концентрацией галектина-3 (рис. 3).

Уровень экспрессии микроРНК-101 имел прямую корреляцию с концентрацией PLGF-1, а уровень экспрессии микроРНК-27 – обратную корреляцию с концентрацией MCP-1 ($r = 0,783$, $p = 0,01$ и $r = -0,717$, $p = 0,03$ соответственно).

Корреляционных связей уровня экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 и концентрации VEGF-A, sCD40L и PAPP-A у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности не выявлено.

При сравнительном анализе уровня экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 у пациентов с хронической сердечной недостаточностью и реципиентов сердца отмечена тенденция к снижению экспрессии в ранние сроки после трансплантации и постепенному повышению в отдаленные сроки (табл. 3).

На рис. 4 представлена динамика исследуемых микроРНК у пациентов с тяжелой хронической сер-

Таблица 2

Сравнительный анализ корреляционной связи уровня экспрессии микроРНК в плазме крови пациентов, страдающих терминальной сердечной недостаточностью, с содержанием биомаркеров, потенциально значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений

A comparative analysis of the correlation between of the microRNA expression levels in the blood plasma of the patients with severe chronic heart failure and the concentration of biomarkers potentially significant for the diagnosis of post-transplant complications

МикроРНК	Галектин-3	VEGF-A	PlGF-1	MCP-1	sCD40L	PAPP-A
МикроРНК-101	r = 0,174, p = 0,55	r = 0,4, p = 0,29	r = 0,783, p = 0,01	r = -0,017, p = 0,97	r = 0,324, p = 0,28	r = 0,0182, p = 0,96
МикроРНК-142	r = 0,321, p = 0,48	r = 0,5, p = 0,67	r = 0,5, p = 0,67	r = -0,5, p = 0,67	r = 0,314, p = 0,54	r = -0,6, p = 0,4
МикроРНК-27	r = -0,139, p = 0,62	r = -0,183, p = 0,64	r = -0,417, p = 0,26	r = -0,717, p = 0,03	r = 0,0813, p = 0,78	r = -0,248, p = 0,49
МикроРНК-339	r = -0,519, p = 0,03	r = -0,115, p = 0,75	r = 0,336, p = 0,31	r = 0,176, p = 0,63	r = -0,012, p = 0,97	r = 0,385, p = 0,19
МикроРНК-424	r = -0,714, p = 0,01	r = 0,286, p = 0,49	r = 0,690, p = 0,06	r = 0,476, p = 0,23	r = 0,0091, p = 0,98	r = 0,238, p = 0,57

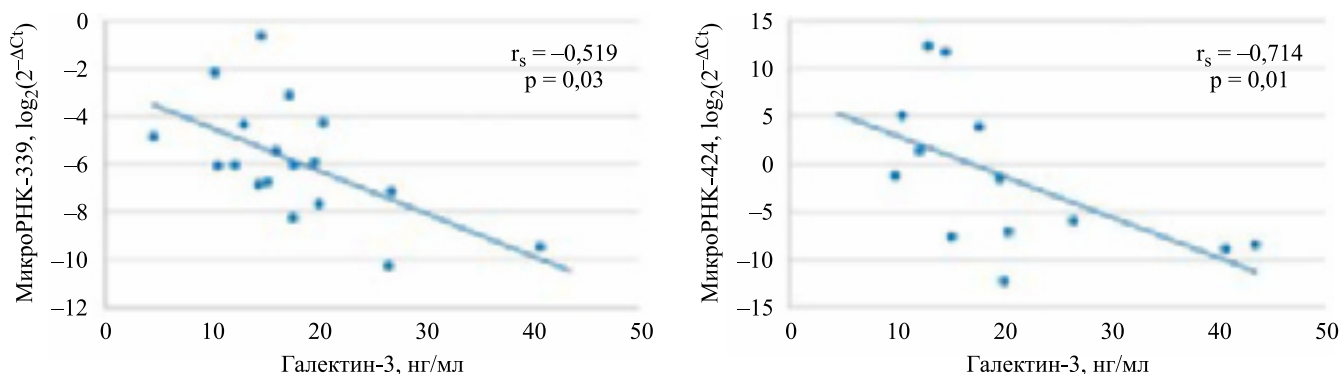


Рис. 3. Корреляционная связь уровня экспрессии микроРНК-339, микроРНК-424 и концентрации галектина-3 у пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$)

Fig. 3. Correlation between the expression level of microRNA-339, microRNA-424 and the concentration of Galectin-3 in patients with severe chronic heart failure ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$)

Таблица 3

Сравнительный анализ экспрессии микроРНК у пациентов с хронической сердечной недостаточностью и реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации

Comparative analysis of microRNAs expression in patients with chronic heart failure and heart transplant recipients at early and long-term after transplantation

МикроРНК ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$)	Пациенты с ХСН	Реципиенты сердца		Достоверность, p	
		1 месяц после ТС	1 год и более после ТС		
МикроРНК-101	-4,29 [-6,86; -3,21]	-8,28 [-9,74; -5,77]	-6,12 [-7,39; -4,61]	0,005*	0,03**
МикроРНК-142	-7,35 [-8,19; -6,25]	-7,03 [-8,35; -6,01]	-6,52 [-7,39; -5,09]	0,89*	0,25**
МикроРНК-27	-5,3 [-6,37; -1,22]	-5,76 [-6,24; -4,08]	-3,85 [-4,88; -1,73]	0,19*	0,02**
МикроРНК-339	-6,06 [-7,89; -4,86]	-9,91 [-11,29; -5,94]	-9,02 [-10,56; -5,80]	0,02*	0,44**
МикроРНК-424	-5,46 [-7,54; -1,46]	-7,21 [-8,25; -6,13]	-6,41 [-7,60; -5,50]	0,01*	0,09**

Примечание. * – при сравнении показателей пациентов с ХСН и реципиентов спустя 1 мес. после ТС; ** – при сравнении показателей реципиентов спустя 1 мес. и 1 год после ТС.

Note. * – comparison between groups of patients with CHF and recipients after 1 month after HT; ** – comparison between groups of recipients after 1 month and 1 year after HT.

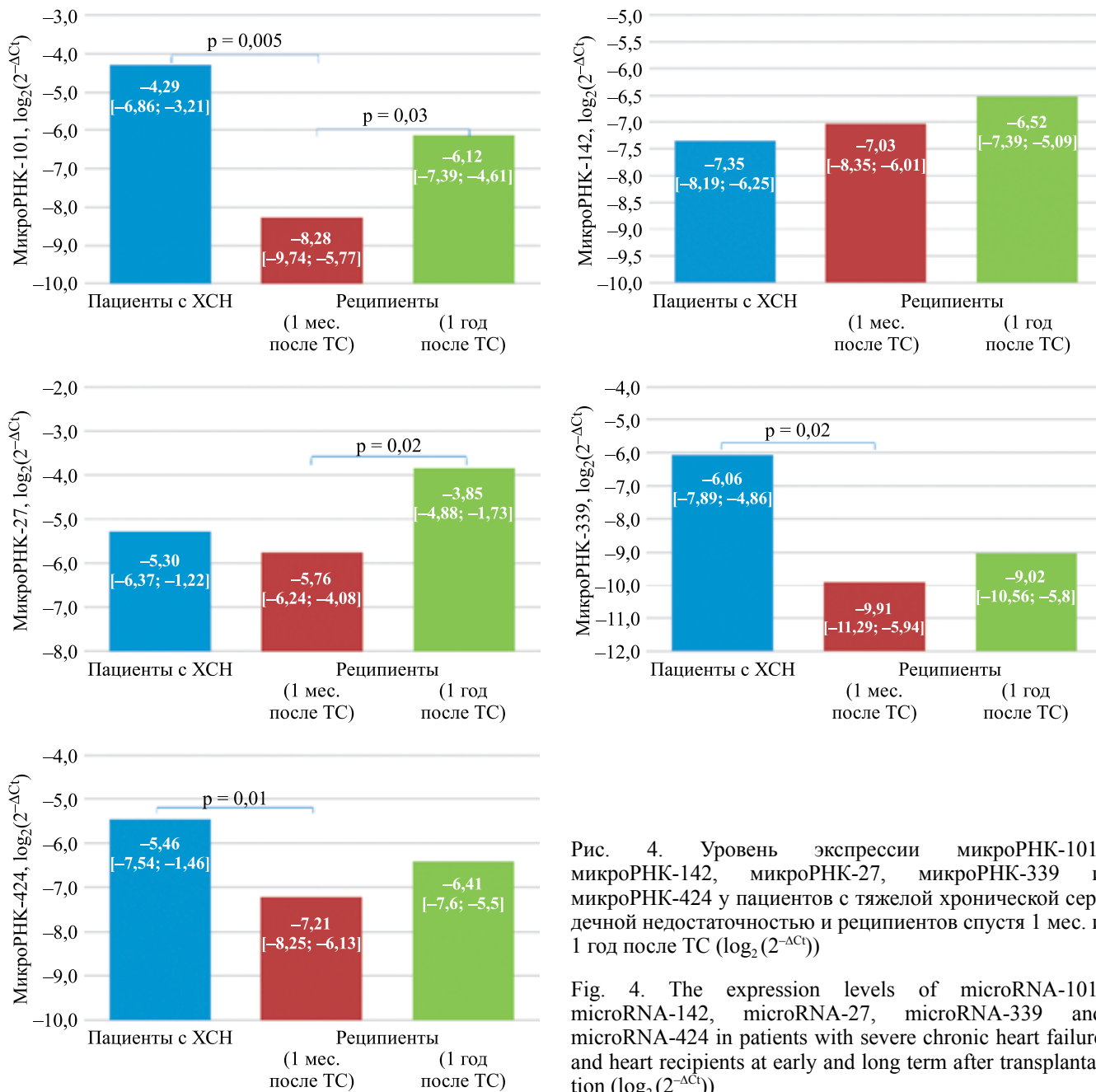


Рис. 4. Уровень экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 у пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью и реципиентов спустя 1 мес. и 1 год после ТС ($\log_2(2^{-\Delta C_t})$)

Fig. 4. The expression levels of microRNA-101, microRNA-142, microRNA-27, microRNA-339 and microRNA-424 in patients with severe chronic heart failure and heart recipients at early and long term after transplantation ($\log_2(2^{-\Delta C_t})$)

дечной недостаточностью и реципиентов в различные сроки после трансплантации.

У реципиентов сердца спустя 1 мес. после трансплантации уровень экспрессии микроРНК-101, микроРНК-339 и микроРНК-424 был достоверно ниже, чем у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности.

Уровень экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов сердца спустя 1 год и более после трансплантации был достоверно выше, чем через 1 мес. после ТС.

Не выявлено различий в экспрессии исследуемых микроРНК у пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью и реципиентов в отдаленные сроки после трансплантации ($p \geq 0,05$)

В ранние сроки после трансплантации уровень экспрессии микроРНК-101, микроРНК-339 и микроРНК-424 ниже, чем у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности. Спустя год и более после трансплантации уровень экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов сердца повышается по сравнению с показателями в ранние сроки, что может отражать развитие процессов фиброобразования в трансплантате.

Представленные данные, полученные при исследовании большого количества реципиентов сердца, подтверждают результаты нашей предыдущей работы [11] в отношении достоверности различий уровня экспрессии микроРНК-101 у пациентов с терминальной стадией ХСН и реципиентов в ранние

Таблица 4

Сравнительный анализ корреляционной связи уровня экспрессии микроРНК в плазме крови реципиентов спустя год и более после трансплантации сердца с содержанием биомаркеров, потенциально значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений

A comparative analysis of the correlation between of the microRNA expression levels in the blood plasma of the recipients at long-term after transplantation and the concentration of biomarkers potentially significant for the diagnosis of post-transplant complications

МикроРНК	Галектин-3	ST2	VEGF-A	PLGF-1	MCP-1	sCD40L	PAPP-A
МикроРНК-101	$r = 0,0673$, $p = 0,73$	$r = -0,209$, $p = 0,44$	$r = 0,119$, $p = 0,78$	$r = 0,491$, $p = 0,22$	$r = 0,143$, $p = 0,74$	$r = -0,429$, $p = 0,34$	$r = -0,557$, $p = 0,05$
МикроРНК-142	$r = -0,534$, $p = 0,05$	$r = 0,1$, $p = 0,87$	$r = 0,5$, $p = 0,67$	$r = 0,9451$, $p = 0,21$	$r = 0,5$, $p = 0,67$	н/д	$r = -0,4$, $p = 0,6$
МикроРНК-27	$r = 0,133$, $p = 0,51$	$r = -0,585$, $p = 0,02$	$r = 0,429$, $p = 0,34$	$r = 0,847$, $p = 0,02$	$r = 0,679$, $p = 0,09$	$r = -0,143$, $p = 0,79$	$r = -0,321$, $p = 0,34$
МикроРНК-339	$r = 0,0433$, $p = 0,83$	$r = -0,041$, $p = 0,88$	$r = 0,0303$, $p = 0,93$	$r = 0,377$, $p = 0,28$	$r = -0,03$, $p = 0,93$	$r = -0,405$, $p = 0,32$	$r = -0,303$, $p = 0,29$
МикроРНК-424	$r = 0,0148$, $p = 0,94$	$r = -0,542$, $p = 0,02$	$r = 0,286$, $p = 0,49$	$r = 0,539$, $p = 0,17$	$r = -0,381$, $p = 0,35$	$r = 0,2746$, $p = 0,55$	$r = -0,099$, $p = 0,76$

сроки после ТС, а также уровня микроРНК-101 и микроРНК-27 в ранние и отдаленные сроки после трансплантации. При этом показаны новые результаты относительно достоверности различий уровня экспрессии микроРНК-339 и микроРНК-424 у пациентов с терминальной стадией ХСН и реципиентов в ранние сроки после ТС.

Анализ корреляционной связи уровня экспрессии микроРНК в плазме крови реципиентов спустя 1 год и более после трансплантации с содержанием биомаркеров, потенциально значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений, представлен в табл. 4.

У реципиентов сердца спустя 1 год и более после трансплантации уровень экспрессии микроРНК-142

имел обратную корреляцию с концентрацией галектина-3 (рис. 5).

Имеются данные о том, что микроРНК-142 экспрессируется Т-лимфоцитами и участвует в регуляции процессов острого клеточного отторжения трансплантированного сердца [18]. Корреляционная связь между уровнем экспрессии микроРНК-142 и концентрацией галектина-3 позволяет предположить участие иммунных механизмов в процессах фиброобразования миокарда у реципиентов сердца.

Уровни экспрессии микроРНК-27 и микроРНК-424 у реципиентов сердца спустя 1 год и более после трансплантации имели обратную корреляцию с концентрацией ST2 (рис. 6).

Показано, что микроРНК-424 играет важную роль в патогенезе легочной гипертензии и последующей гипертрофии правого желудочка через ингибирование функции специфического регуляторного фактора SMURF [19].

Уровень экспрессии микроРНК-101 имел обратную корреляцию с концентрацией PAPP-A, а уровень экспрессии микроРНК-27 – прямую корреляцию с концентрацией PLGF-1 ($r = -0,557$, $p = 0,05$ и $r = 0,847$, $p = 0,02$ соответственно). Изменение профиля экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 связано с участием этих молекул в регуляции процессов фиброобразования миокарда через взаимодействие с фактором транскрипции RUNX1 и рецептором 1 трансформирующего фактора роста β (TGFBR1) [20, 21].

Корреляционных связей уровня экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 и концентрации VEGF-A, MCP-1 и sCD40L у реципиентов сердца спустя 1 год и более после трансплантации не выявлено.

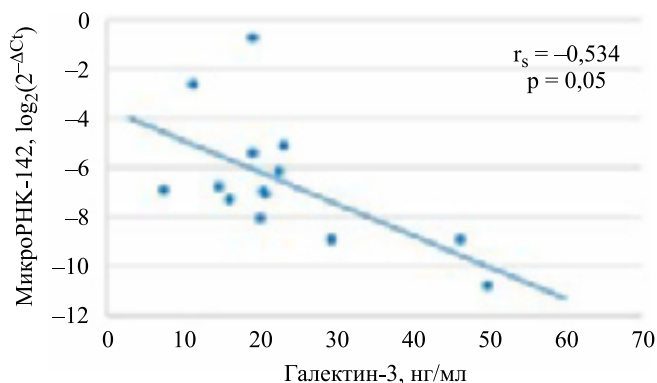


Рис. 5. Корреляционная связь уровня экспрессии микроРНК-142 и концентрации галектина-3 у реципиентов спустя 1 год и более после ТС ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$)

Fig. 5. Correlation between the expression level of microRNA-142 and the concentration of Galectin-3 in heart recipients at long-term after transplantation ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$)

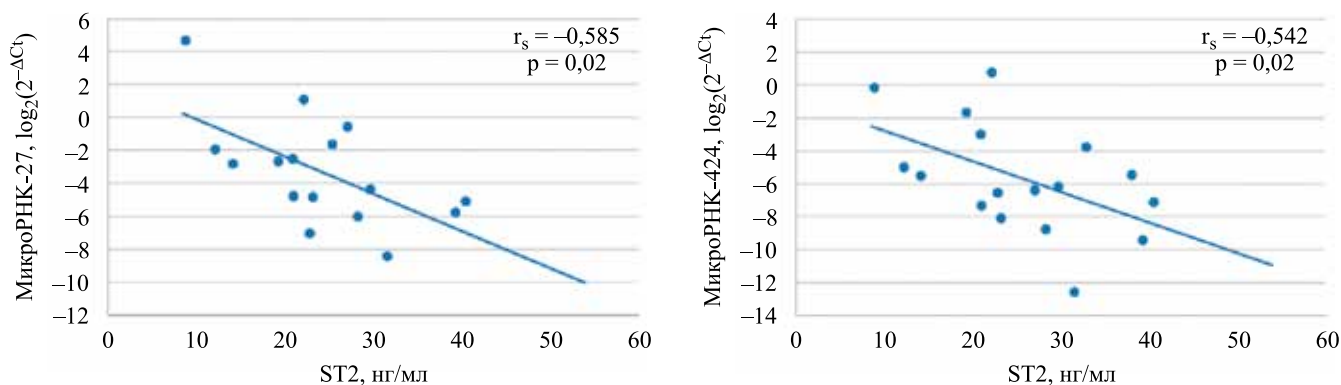


Рис. 6. Корреляционная связь уровня экспрессии микроРНК-27, микроРНК-424 и концентрации ST2 у реципиентов спустя 1 год и более после ТС ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$)

Fig. 6. Correlation between the expression level of microRNA-27, microRNA-424 and the concentration of ST2 in heart recipients at long-term after transplantation ($\log_2(2^{-\Delta Ct})$)

У реципиентов сердца спустя год и более после трансплантации имеет место корреляционная связь между уровнем экспрессии микроРНК-142 и концентрацией галектина-3, уровнем экспрессии микроРНК-27, микроРНК-424 и концентрацией ST2, уровнем экспрессии микроРНК-27 и концентрацией PLGF-1, уровнем экспрессии микроРНК-101 и концентрацией PAPP-A. Связь уровня экспрессии микроРНК с концентрацией биомаркеров, потенциально значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца, не только подтверждает имеющиеся данные об участии этих сигнальных молекул в регуляции различных патологических процессов, в том числе в трансплантате, но и позволяет предположить их диагностический потенциал для оценки риска развития отторжения и возможности минимизации иммуносупрессивной терапии. В этой связи особенно перспективным может стать совместное использование микроРНК с биомаркерами посттрансплантационных осложнений для формирования комплексных тестов (мультимаркерных панелей), позволяющих диагностировать изменения на различных трансляционных уровнях. Дальнейшие комплексные исследования до- и посттрансляционных маркеров могут открыть новые перспективы как в диагностике, оценке рисков посттрансплантационных осложнений, так и в понимании процессов, ведущих к их развитию.

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 serdцем: rukovodstvo dlya vrachej po vedeniyu pacientov, perenessih transplantaciyu serdca. M.: Triada, 2014; 144.
2. *Crespo-Leiro MG, Barge-Caballero G, Couto-Mallon D.* Noninvasive monitoring of acute and chronic rejection in heart transplantation. *Curr Opin Cardiol.* 2017 Mar 16. doi: 10.1097/HCO.0000000000000400. [Epub ahead of print].
3. *Kransdorf EP, Kobashigawa JA.* Novel molecular approaches to the detection of heart transplant rejection. *Per Med.* 2017 Jul; 14 (4): 293–297.
4. *van Gelder T.* Biomarkers in solid organ transplantation. *Br J Clin Pharmacol.* 2017 Dec; 83 (12): 2602–2604.
5. *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.
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. *Di Francesco A, Fedrigo M, Santovito D, Natarelli 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.
8. *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.
9. *Khush K, Zarafshar S.* Molecular Diagnostic Testing in Cardiac Transplantation. *Curr Cardiol Rep.* 2017 Oct 13; 19 (11): 118.
10. *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.
11. 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 otdalennye sroki posle transplantacii u recipientov serdca. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2020; 22 (1): 26–34.
 12. Daly KP, Stack M, Eisenga MF, Keane JF, Zurakowski D, Blume ED, Briscoe DM. Vascular endothelial growth factor A is associated with the subsequent development of moderate or severe cardiac allograft vasculopathy in pediatric heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2017 Apr; 36 (4): 434–442.
 13. Albonici L, Giganti MG, Modesti A, Manzari V, Bei R. Multifaceted Role of the Placental Growth Factor (PlGF) in the Antitumor Immune Response and Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 18; 20 (12): 2970.
 14. Abe T, Su CA, Iida S, Baldwin WM 3rd, Nonomura N, Takahara S, Fairchild RL. Graft-derived CCL2 increases graft injury during antibody-mediated rejection of cardiac allografts. *Am J Transplant*. 2014 Aug; 14 (8): 1753–1764.
 15. Michel NA, Zirlik A, Wolf D. CD40L and Its Receptors in Atherothrombosis—An Update. *Front Cardiovasc Med*. 2017 Jun 20; 4: 40.
 16. Grupper A, AbouEzzeddine OF, Maleszewski JJ et al. Elevated ST2 levels are associated with antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *Clin Transplant*. 2018; 32 (9): e13349.
 17. Coromilas E, Que-Xu EC, Moore D, Kato TS, Wu C, Ji R et al. Dynamics and prognostic role of galectin-3 in patients with advanced heart failure, during left ventricular assist device support and following heart transplantation. *BMC Cardiovasc Disord*. 2016 Jun 14; 16: 138.
 18. Sukma Dewi I, Hollander Z, Lam KK, McManus JW, Tebbutt SJ, Ng RT et al. Association of Serum MiR-142-3p and MiR-101-3p Levels with Acute Cellular Rejection after Heart Transplantation. *PLoS One*. 2017; 12 (1): e0170842.
 19. Baptista R, Marques C, Catarino S, Enguita FJ, Costa MC, Matafome P et al. MicroRNA-424(322) as a new marker of disease progression in pulmonary arterial hypertension and its role in right ventricular hypertrophy by targeting SMURF1. *Cardiovasc Res*. 2018 Jan 1; 114 (1): 53–64.
 20. 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.
 21. 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.

Статья поступила в редакцию 22.07.2020 г.
The article was submitted to the journal on 22.07.2020