

© Шевченко-Макаренко О.П., 2020
УДК 616.36-002-036.1:616.98:577.21]-074
DOI 10.11603/1681-2727.2020.3.11551

О.П. Шевченко-Макаренко

АНАЛІЗ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ МІКРОРНК-29А У ХВОРИХ З РІЗНИМИ КЛІНІЧНИМИ ВАРІАНТАМИ ХРОНІЧНОЇ НСV-ІНФЕКЦІЇ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Мета роботи – провести аналіз базового рівня експресії мікроРНК-29а у хворих на хронічний гепатит С (ХГС) з 1-м генотипом НСV залежно від ступеня фіброзу печінки, наявності цирозу печінки, навантаження НСV, часу хвороби та інших чинників.

Пацієнти і методи. Обстежено 74 пацієнти з 1-м генотипом хронічної НСV-інфекції віком ($47,5 \pm 1,4$) років. Контрольну групу склали 11 здорових осіб з негативними маркерами до вірусних гепатитів віком ($38,5 \pm 5,5$) років. За ступенем фіброзу за шкалою METAVIR хворі розподілились наступним чином, кількість (%): F1 – 25 (33,8), F2 – 21 (28,4), F3 – 11 (14,9), F4 – 17 (22,9). Серед хворих зі стадією фіброзу F4 лише 10 (58,8 %) хворих мали клінічні ознаки цирозу печінки та стадію цирозу печінки класу А за класифікацією Чайлд-П'ю. Рівень експресії мікроРНК-29а (синоніми: miR-29a, hsa-miRNA-29a) визначався двоетапним дослідженням згідно з протоколом виробника на базі відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де після виділення тотальної РНК з плазми крові проводили зворотну транскрипцію методом кількісної ПЛР в реальному часі з використанням аналізу мікроРНК TaqMan® (Applied Biosystems, США). Статистична обробка і аналіз даних проводилися за допомогою програмного продукту Statistica v.6.1®.

Результати та висновки. Результати дослідження продемонстрували аберрантну гіперекспресію мікроРНК-29а у хворих на ХГС порівняно із здоровими особами: медіана рівня експресії miR-29а у всіх хворих у 20,6 разу перевищувала показник у здорових осіб та Log_{10} miR-29а в 4,9 разу вище відповідно ($p < 0,001$, U). Не виявлено достовірної різниці між рівнями експресії мікроРНК-29а у групі хворих залежно від статі ($p = 0,940$), віку ($p = 0,473$), терміну хвороби від моменту детекції НСV ($p = 0,771$) та навантаження НСV ($p = 0,505$). Визначено різницю ($p = 0,002$, H) рівня експресії мікроРНК-29а між хворими на ХГС з різним ступенем фіброзу та контрольною групою: F0-F1

($p < 0,001$), F0-F2 ($p = 0,007$), F0-F3 ($p < 0,001$), F0-F4 ($p = 0,027$). Середній рівень експресії miR-29 у хворих дозволяє ($p < 0,001$) виключити початкові стадії фіброзу печінки у хворих на хронічну НСV-інфекцію та стати додатковим високоінформативним неінвазивним біо-маркером при диференціюванні між ранніми стадіями фіброзу печінки та розвиненим фіброзом печінки у хворих на ХГС. Рівень експресії мікроРНК-29а дозволяє диференціювати прогресування фіброзу та цирозу печінки у хворих і дає можливість швидко і чітко відокремлювати хворих на цироз печінки класу А за класифікацією Чайлд-П'ю ($p = 0,025$, H) для подальшого ефективного менеджменту і призначення відповідних схем противірусної терапії.

Ключові слова: хронічний гепатит С, НСV-інфекція, фіброз печінки, цироз печінки, мікроРНК-29а.

Захворюваність і поширеність ХГС та смертність від наслідків хронічної НСV-інфекції залишаються високими й продовжують зростати з року в рік, незважаючи на існуючу стратегію ВООЗ з елімінації вірусних гепатитів. Хронічна НСV-інфекція має ряд таких небажаних наслідків, як розвиток цирозу печінки (ЦП) або гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК), тому пошук нових регуляторних механізмів і запобігання їх розвитку є одним з напрямків сучасної гепатології [1, 2]. На швидкість розвитку ЦП та ГЦК у хворих на ХГС впливають різні фактори вірусу, хазяїна та зовнішнього середовища: вірусне навантаження та генотип НСV, вік і стать хворих, куріння, вживання алкоголю чи наркотичних речовин, ожиріння та ін. [3, 4].

Циркуючі мікроРНК – нещодавно відкритий клас малих молекул, які відіграють важливу роль у регуляції генів і міжклітинних взаємодіях, які раніше вважались «генетичним сміттям». Щодня відкривають все нові мікроРНК і вивчають в експерименті, на моделях та культурах клітин, але їх роль у хворих *in vivo* при різній патології ще мало досліджена. Останнім часом для різних мікроРНК було показано, що вони відіграють одну з

ключових ролей у регуляції процесів клітинного циклу, апоптозу, росту, інвазії, проліферації клітин при пухлинах різних локалізацій, відзначено їх безпосередню участь у формуванні імунної відповіді тощо [5]. МікроРНК більш високоспецифічні порівняно з профілем мРНК, що говорить про придатність малих молекул як високоінформативних біомаркерів при злоякісних пухлинах та інших захворюваннях. Також позитивним моментом на користь можливості використання мікроРНК як біомаркерів служать їх малий розмір і біологічні особливості, які забезпечують високу стабільність молекул, що підтверджено низкою досліджень. Більшість досліджень свідчить, що експресія мікроРНК відрізняється значною тканинною специфічністю. Доведено, що шляхом апоптозу елімуються трансформовані клітини при вірусній інфекції, канцерогенній дегенерації тощо [6].

Серед мікроРНК в дослідження була обрана мікроРНК-29а (синоніми: miR-29a, hsa-miRNA-29a) як молекула, відносно якої в літературі представлені дані, що доводять її значну роль при патології печінки, апоптозі та фіброзоутворенні. На експериментальних моделях було вивчено, що мікроРНК-29а пригнічує активацію зірчастих клітин печінки та зворотно контролює фіброз печінки [7]. Значний фіброз та ремоделювання тканин в печінці призводять до цирозу печінки, а ризик розвитку ГЦК посилюється з підвищенням стадії фіброзу печінки. Тому контроль фіброзу печінки є ключовим фактором запобігання ЦП. МікроРНК-29а обґрунтовано відіграють критичну роль при різних захворюваннях. Доведено, що мікроРНК-29а пригнічує канцерогенез та метастазування ГЦК, а зниження рівня експресії мікроРНК-29а у хворих може стати негативним предиктором канцерогенезу печінки [4]. МікроРНК-29 діє як антифіброгенний медіатор, перешкоджаючи взаємодії профіброгенних клітин за допомогою впливу на фактор росту тромбоцитів С (PDGF-C) та інсуліноподібний фактор росту (IGF-I). Таким чином, антифіброгенна дія miR-29 досягається шляхом пригнічення формування екстрацелюлярного матриксу та взаємодією з профіброгенними клітинами і сигнальними шляхами. Антифібротична дія мікроРНК-29а вивчалась на культурі клітин і лабораторних тваринах та, як перспективний напрямок, опрацьовується гіпотеза чи є hsa-miRNA-29a кандидатом для проведення лікування фіброзу печінки прямої дії з високим профілем безпеки для хворих [8]. Але ця тема ще вивчена недостатньо.

Нами вперше на українській когорті вивчався патерн експресії трьох мікроРНК у хворих на ХГС з 1-м генотипом HCV порівняно із здоровими особами, а саме, рівень експресії мікроРНК-29а, мікроРНК-122 та мікроРНК-196а, про що повідомлялось у наших попередніх роботах [9-12]. Наступним кроком є подальше опрацьову-

вання отриманих даних з рівня експресії мікроРНК-29а у хворих на ХГС залежно від різних чинників і клініко-лабораторних показників.

Мета роботи – провести аналіз базового рівня експресії мікроРНК-29а у хворих на ХГС з 1-м генотипом HCV залежно від ступеня фіброзу печінки, наявності цирозу печінки, навантаження HCV, терміну хвороби та інших чинників.

Пацієнти і методи

Для вирішення поставлених завдань було проаналізовано результати клініко-лабораторних та інструментальних досліджень 74 хворих з 1-м генотипом хронічної HCV-інфекції. Вивчення гендерного складу визначило майже рівне співвідношення жінок і чоловіків – 36 (48,6 %) та 38 (51,4 %) відповідно. Вік хворих становив (47,5±1,4) років, межі віку коливалися від 18 до 70 років. Пацієнти перебували на лікуванні у гепатологічному відділенні «Міської клінічної лікарні №21 ім. проф. Є.Г. Попкової» ДМР» м. Дніпро та були обстежені відповідно до клінічних протоколів і біоетичних норм. У хворих визначалися генотип і навантаження HCV, рівень фіброзу печінки тощо. Рівень фіброзу встановлювали за допомогою неінвазивних методів, що відповідають оцінці ступеня фіброзу за шкалою METAVIR (компресійної еластографії печінки та/або Фібротесту™), додатково обчислювали інші неінвазивні тести (APRI, FIB4, GUCI, LOC та ін.) і порівнювали їх дані. Контрольну групу склали 11 здорових осіб з негативними маркерами до вірусних гепатитів, у тому числі чоловіків – 5 (45,5 %), жінок – 6 (54,5 %). Середній вік становив (38,5±5,5) років (з межами віку від 18 до 65 років). Обидві групи були статистично співрозмірними за статтю ($p=0,715$ за критерієм χ^2) та віком пацієнтів ($p=0,142$ t).

На початку було вивчено деякі демографічні показники у хворих на ХГС, потім було проведено аналіз клініко-анамнестичних даних, лабораторних та інструментальних досліджень. Середня тривалість захворювання з моменту детекції HCV та вперше встановленого діагнозу ХГС (Me) становила 4,0 роки (IQR: 2,0; 8,0) та в деяких випадках досягала 27 років. За ступенем фіброзу за шкалою METAVIR, хворі розподілились наступним чином, кількість (%): F1 – 25 (33,8), F2 – 21 (28,4), F3 – 11 (14,9), F4 – 17 (22,9).

Середня тривалість захворювання у хворих з F4 (Me) становила 5 (2,25; 10,5) років. Цих хворих було поділено на дві підгрупи: F4-a – 7 (41,2 %) осіб мали клініко-лабораторні ознаки хронічного гепатиту без системних проявів цирозу печінки (синдромів портальної гіпертензії (ПГ) та печінково-клітинної недостатності (ПКН)); та F4-b – 10 (58,8 %) хворих, які мали клініко-лабораторні ознаки цирозу печінки та стадію цирозу печінки клас А за класифікацією Чайлд-Пью та/або мали в анамнезі ознаки суб-/декомпенсації, а саме, спленомегалію з ознаками гіперспленізму

(носові кровотечі, тромбоцитопенію), портальну гіпертензію, керований асцит, початкові ознаки печінково-клітинної недостатності і печінкової енцефалопатії (безсоння уночі, зміна почерку), полінейропатії, астено-вегетативного синдрому та ін.

Вірусне навантаження РНК HCV (Me) серед усіх хворих на ХГС становило: 1 019 700 (IQR: 274 642; 2 090 000) МО/мл; 3 700 000 (IQR: 1 220 000; 6 887 840) коп./мл; \log_{10} РНК HCV 6,01 (IQR: 5,44; 6,32) МО/мл; 6,57 (IQR: 6,09; 6,84) коп./мл.

Для вивчення рівня експресії циркулюючої hsa-miRNA-29a використовувалося двохетапне дослідження згідно з протоколом виробника на базі відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, м. Київ (директор – проф. А.А. Кришталь, завідувач відділу – проф. В.Є. Досенко). Спочатку тотальну РНК виділяли з плазми крові методом фенол-хлороформної екстракції. Потім, щоб оцінити рівень зрілих мікроРНК, виконували зворотну транскрипцію з набору мікроРНК TaqMan® (Applied Biosystems, США), як ендогенний контрольний ген використовували snRNA U6. Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) в реальному часі проводили з використанням аналізу мікроРНК TaqMan® (Applied Biosystems, США): hsa-miR-29a та snRNA U6. Термічні цикли ампліфікації ПЛР були ідентичні виявленню pri-miRNA. Рівень miRNA розраховували за формулою $(2^{-\Delta\Delta Ct})$, де Ct – пороговий цикл ампліфікації, нормалізували до гену домашнього господарства (англ. housekeeping gene) U6 snRNA і представляли в умовних одиницях (ум. од.) [9-12].

Статистична обробка і аналіз даних проводилися за допомогою програмного продукту Statistica v.6.1®. Кількісні дані представлені у вигляді діапазону значень (мінімум-максимум), середнього арифметичного і його стандартної похибки ($M \pm m$) при нормальному розподілі (критерій Шапіро-Уїлка), і як медіана (Me) та інтерквартильний розмах (IQR: Q25; Q75) – в інших випадках, 95 % довірчого інтер-

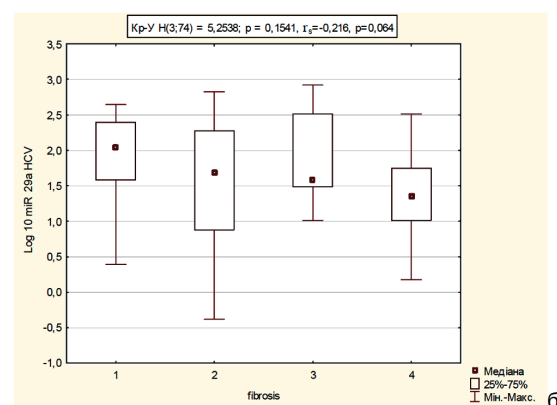
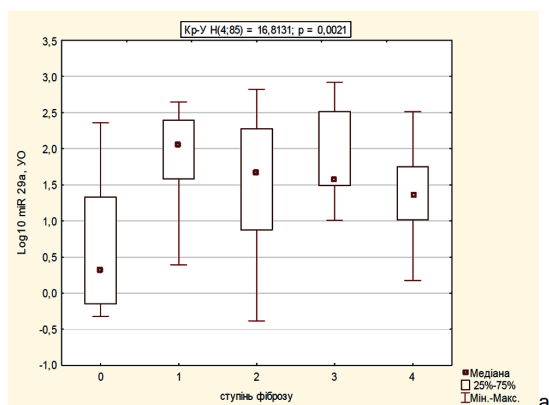
валу для середньої (95 % ДІ). Для порівняння середніх величин застосовувалися критерії Стьюдента (t), Манна-Уїтні (U), Краскела-Уоліса (H), Даннетта (D); для відносних величин – двосторонній точний критерій Фішера (FET) для таблиць спряженості 2×2 і критерій χ^2 Пірсона в інших випадках. Взаємозв'язок між ознаками оцінювався за коефіцієнтами рангової кореляції Спірмена (r_s). Статистично значущим вважався рівень $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Нами було виявлено аберрантну гіперекспресію мікроРНК-29a у хворих на хронічний гепатит С порівняно із здоровими особами. А саме, медіана рівня експресії miR-29a у всіх хворих склала 44,59 (IQR: 12,50; 188,68) ум. од. і в 20,6 разу перевищувала показник у групі здорових осіб – 2,16 (IQR: 0,71; 21,54) ум. од. при $p < 0,001$ за критерієм U. Медіани десяткових логарифмів показників (\log_{10} miR-29a, ум. од.) відповідно у хворих на ХГС та здорових осіб становили 1,65 (IQR: 1,10; 2,28) і 0,34 (IQR: -0,15; 1,33) ум. од., що демонструє в 4,9 разу перевищення показника у хворих порівняно з контрольною групою ($p < 0,001$, U) [9].

Подальше вивчення рівня експресії мікроРНК-29a у різних групах пацієнтів з ХГС проводилось залежно від ступеня фіброзу печінки, навантаження HCV, терміну хвороби від моменту детекції HCV, вікових і гендерних ознак. Нами не було виявлено достовірної різниці між рівнями експресії мікроРНК-29a у групах хворих залежно від: статі ($p = 0,940$), віку ($p = 0,473$), терміну хвороби від моменту детекції HCV ($p = 0,771$) та навантаження HCV ($p = 0,505$).

Аналіз середнього рівня експресії miR-29a (\log_{10} miR-29a, ум. од.) у плазмі крові хворих на ХГС залежно від ступеня фіброзу печінки (F1, F2, F3, F4) та в контрольній групі (F0) представлено на малюнку 1.



Мал. 1. Діаграма розкиду для середнього рівня експресії miR-29a (\log_{10} miR-29a, ум. од.) у пацієнтів з ХГС порівняно з контрольною групою (1а) та залежно від ступеня фіброзу печінки (1б): вказано Me (IQR), відрізки мінімум-максимум, значення критерію Краскела-Уоліса (H), коефіцієнт кореляції Спірмена (r_s), 0-4 ступінь фіброзу печінки (F0, F1, F2, F3, F4).

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Як видно з малюнка 1а, виявлена достовірна різниця ($p=0,002$ за критерієм Н) рівня експресії мікроРНК-29а між хворими на ХГС з різним ступенем фіброзу та контрольною групою. Водночас відзначено тенденцію до зменшення показника Log_{10} miR-29a при збільшенні ступеня фіброзу печінки у хворих на ХГС (мал. 1б) –

$r_s=-0,216$, $p=0,064$, що потребує ретельної деталізації ознак всередині групи хворих на ХГС.

Більш докладно рівень експресії мікроРНК-29а в ум. од. та десяткових алгоритмах у хворих на ХГС з різним ступенем фіброзу та клінічними варіантами хронічної HCV-інфекції представлено у таблиці 1.

Таблиця 1

Рівень експресії мікроРНК-29а у хворих на хронічну HCV-інфекцію залежно від рівня фіброзу печінки та наявності цирозу печінки і у контрольній групі (F0)

Рівень фіброзу печінки	Кількість хворих (n)	miR-29a, ум. од.		Log10 miR-29a, ум. од.		Різниця з контрольною групою (p)
		Me (Q25; Q75)	мінімум-максимум	Me (Q25; Q75)	мінімум-максимум	
F0 (контрольна група)	11	2,16 (0,71; 21,54)	0,48 – 226,52	0,34 (-0,15; 1,33)	-0,32 – 2,36	-
F1	25	112,84 (38,78; 259,81)	2,47 – 441,56	2,05 (1,59; 2,41)	0,39 – 2,64	<0,001
F2	21	48,20 (10,31; 188, 61)	0,41 – 666,68	1,68 (0,98; 2,28)	-0,38 – 2,82	0,007
F3	11	38,31 (34,90; 422,98)	10,25 – 827,35	1,58 (1,54; 2,60)	1,01 – 2,92	<0,001
F4, у т.ч.	17	22,40 (10,40; 83,27)	1,50 – 326,89	1,35 (1,02; 1,91)	0,18 – 2,51	0,027
- F4-a	7	92,33 (34,30; 297,00)	3,74 – 326,89	1,97 (1,54; 2,47)	0,57 – 2,51	0,002
- F4-b	10	10,91 (5,13; 22,40)	1,50 – 56,08	1,04 (0,71; 1,35)	0,18 – 1,75	0,247

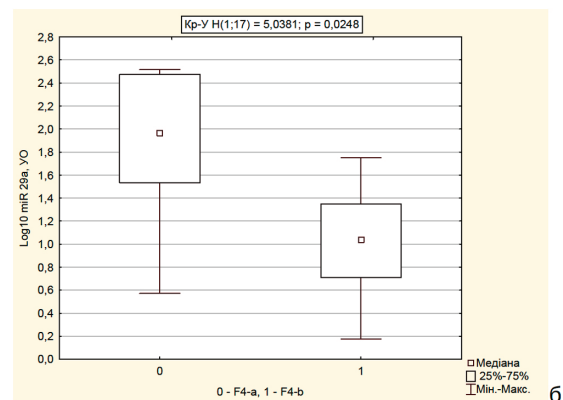
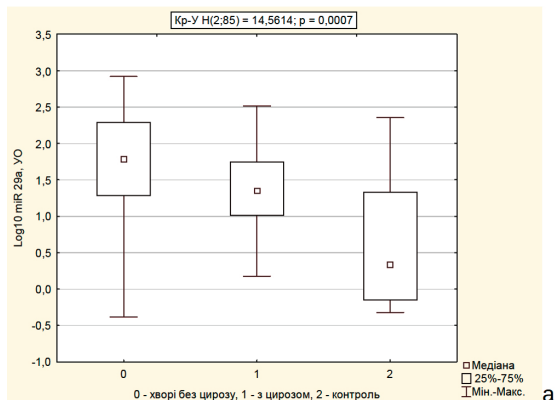
Примітка. Рівень значущості різниці з контрольною групою (p) розраховано за критерієм Даннетта (D).

Як видно з таблиці 1, при вивченні взаємозв'язків і різниці рівня експресії мікроРНК-29а між хворими з різним ступенем фіброзу та контрольною групою (F0) було визначено достовірні розбіжності (за критерієм D), а саме: F0-F1 ($p<0,001$), F0-F2 ($p=0,007$), F0-F3 ($p<0,001$), F0-F4 ($p=0,027$). При цьому якщо медіана середнього рівня експресії мікроРНК-29а (Log_{10} miR-29a) у хворих з фіброзом печінки 1-го ступеня (F1) перевищувала відповідний показник у здорових осіб в 6 разів, 2-го ступеня (F2) – в 4,9 разу, 3-го ступеня (F3) – в 4,6 разу, то у хворих на розвинений фіброз та цироз печінки з F4 ($n=17$) середній показник Log_{10} miR-29a становив 1,35 (1,02; 1,91) ум. од., відрізняючись від показників контрольної групи в 4 рази при $p=0,027$.

Найбільш інформативні дані отримані між хворими на ХГС без ознак цирозу печінки та хворими, які мали клінічно стадію цирозу печінки класу А за класифікацією Чайлд-П'ю (підгрупа F4-b, $n=10$) (мал. 2).

Як видно з таблиці 1 та малюнку 2, медіана (Me (IQR)) рівня експресії miR-29а у хворих на цироз печінки класу А за класифікацією Чайлд-П'ю (група F4-b) становила

10,91 (5,13; 22,40) ум. од., Log_{10} miR-29a – 1,04 (0,71; 1,35) ум. од., в той час як відповідні показники у групі хворих на ХГС без клінічних ознак цирозу печінки (групи F1, F2, F3, F4-a) становили 61,83 (23,94; 221,65) ум. од. і 1,79 (1,37; 2,34) при $p=0,004$ за критерієм U. Це може стати додатковим біомаркером при диференціюванні стадій між початковим фіброзом печінки та цирозом печінки у хворих на ХГС. Такі ж тенденції щодо достовірної різниці між рівнем експресії мікроРНК-29а та наявністю цирозу печінки відзначено у хворих на хронічну HCV-інфекцію з фіброзом F4 у групах F4-a та F4-b ($p=0,025$, Н, U) (мал. 2б). Адже рівень фіброзу печінки, як зазначалось раніше, встановлювали за допомогою неінвазивних методів, що відповідають оцінці ступеню фіброзу за шкалою METAVIR і за допомогою визначення рівнів експресії мікроРНК-29а у хворих на хронічну HCV-інфекцію з фіброзом F4. Можна припустити що miR-29a є чутливішим тестом для стратифікації наявності у хворого ознак прогресування фіброзу у компенсований чи субкомпенсований цироз печінки з клінічними ознаками портальної гіпертензії тощо.



Мал. 2. Діаграма розкиду для середнього рівня експресії miR-29a (Log_{10} miR-29a, ум. од.) у плазмі крові пацієнтів з ХГС: 3а – за наявності цирозу печінки і в контрольній групі, де 0 – усі хворі без цирозу печінки (групи F1, F2, F3 та група F4-a) (n=64), 1 – хворі з наявним цирозом печінки клас А за класифікацією Чайлд-П'ю (n=10), 2 – контрольна група (n=11); 3б – хворі з F4 фіброзом без клінічних ознак цирозу печінки (n=7) та за наявності цирозу печінки клас А за класифікацією Чайлд-П'ю (n=10): вказано Ме (IQR), відрізки мінімум-максимум, де 0 – група F4-a, 1 – група F4-b.

Таким чином, у хворих на ЦП, асоційований з HCV, рівень експресії Log_{10} miR-29a значно знижувався порівняно з показниками у хворих на ХГС без цирозу печінки ($p < 0,05$), та наближався до показників контрольної групи ($p > 0,05$). Водночас перевищення рівня експресії Log_{10} miR-29a у хворих на хронічну HCV-інфекцію з фіброзом F1 показників у контрольній групі у 6 разів дозволяє з високим ступенем достовірності ($p < 0,001$) визначати початкові стадії фіброзу печінки у хворих і диференціювати прогресування фіброзу та цирозу печінки, визначеними іншими неінвазивними методами та тестами, і надає можливість швидко й чітко відокремлювати хворих на цироз печінки класу А за класифікацією Чайлд-П'ю ($p = 0,025$, Н) для подальшого ефективного менеджменту і призначення відповідних схем противірусної терапії [3].

Зіставляючи дані інших досліджень [4, 6], зниження рівня експресії мікроРНК-29а у хворих на ХГС може стати несприятливою прогностичною ознакою подальшого розвитку канцерогенезу печінки і потребує подальшого вивчення.

Все вищенаведене робить мікроРНК-29а новим доступним високоінформативним неінвазивним біомаркером, який може широко застосовуватись у лабораторній та клінічній практиці для точнішої діагностики при хронічній HCV-інфекції і раннього визначення початкового фіброзу печінки. Зазначений тест може бути додатковим критерієм при диференційній діагностиці з розвинутою стадією фіброзу чи цирозу печінки, оскільки не потребує додаткового устаткування та навчання персоналу, адже визначення рівнів мікроРНК проводять методом ПЛР, який вже є більш-менш доступним та високочутливим тестом.

Висновки

1. Вперше на українській когорті досліджено рівень експресії мікроРНК-29а у хворих на хронічний гепатит С з першим генотипом HCV та виявлено її аберрантну гіперекспресію порівняно зі здоровими особами: медіана рівня експресії miR-29a у всіх хворих у 20,6 разу перевищувала показник у здорових осіб та Log_{10} miR-29a був в 4,9 разу вище відповідно ($p < 0,001$, U).

2. Більшість загальних і клініко-лабораторних даних не впливає на рівень експресії мікроРНК-29а у хворих на ХГС, а саме, не залежить від статі ($p = 0,940$), віку ($p = 0,473$), терміну хвороби від моменту детекції HCV ($p = 0,771$) та вірусного навантаження HCV ($p = 0,505$).

3. Виявлена достовірна різниця ($p = 0,002$, Н) рівня експресії мікроРНК-29а між хворими на ХГС з різним ступенем фіброзу та у контрольній групі. Середній рівень експресії Log_{10} miR-29a у хворих на ХГС з фіброзом F1 у 6 разів перевищував показники здорових осіб, що дозволяє достовірно ($p < 0,001$) виключити початкові стадії фіброзу печінки у хворих на хронічну HCV-інфекцію та стати додатковим високоінформативним неінвазивним біомаркером при диференціюванні стадій фіброзу печінки.

4. Рівень експресії мікроРНК-29а дозволяє диференціювати прогресування фіброзу та цирозу печінки у хворих на хронічну HCV-інфекцію з фіброзом F4, визначеними іншими неінвазивними методами та тестами, і дає можливість швидко й чітко відокремлювати хворих на цироз печінки класу А за класифікацією Чайлд-П'ю ($p = 0,025$, Н) для подальшого ефективного менеджменту і призначення відповідних схем противірусної терапії.

Література

- World Health Organization. Progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections 2019. Accountability for the global health sector strategies, 2016-2021 // Geneva: World Health Organization. – 2019 (WHO/CDS/HIV/19.7). – 48 p. URL : <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/324797/WHO-CDS-HIV-19.7-eng.pdf?ua=1>.
- Шевченко-Макаренко О.П. Прогноз розвитку епідемічного процесу гепатиту С на 2018–2020 роки в Дніпропетровському регіоні та Україні / О.П. Шевченко-Макаренко // Інфекційні хвороби. – 2018. – № 2. – С. 28-35. DOI: <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2018.2.9031>
- EASL recommendations on treatment of hepatitis C // Journal of Hepatology. – 2018. – Vol. 69(2). – P. 461-511. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026>. URL : <https://easl.eu/wp-content/uploads/2018/10/HepC-English-report.pdf>.
- MiR-29a suppresses the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma through IFITM3 / Y. Liang, E. Li, J. Min [et al.] // Oncology Reports. – 2018. – Vol. 40, N 6. – P. 3261-3272. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6745>.
- Circulating liver-specific microRNAs as noninvasive diagnostic biomarkers of hepatic diseases in human / G. Musaddaq, N. Shahzad, M. A. Ashraf, M. I. Arshad // Biomarkers. – 2019. – Vol. 24, N 2. – P. 103-109. URL : DOI: <https://doi.org/10.1080/1354750X.2018.1528631>. Epub 2018 Oct 23. PMID: 30252499.
- MikroRNS-ek a hepatocarcinogenesisben [MicroRNAs in hepatocarcinogenesis] / G. Lendvai, A. Kiss, I. Kovalszky, Z. Schaff // Orv. Hetil. – 2012. – Vol. 53, N 25. – P. 978-989. DOI:10.1556/OH.2012.29387.
- MiR-29a assists in preventing the activation of human stellate cells and promotes recovery from liver fibrosis in mice / Y. Matsumoto, S. Itami, M. Kuroda [et al.] // Molecular Therapy. – 2016. – Vol. 24(10). – P. 1848-1859. DOI: <https://doi.org/10.1038/mt.2016.127>.
- MicroRNA-29: a crucial player in fibrotic disease / Z. Deng, Y. He, X. Yang [et al.] // Molecular Diagnosis & Therapy. – 2017. – Vol. 21 (3). – P. 285-294.
- Шевченко-Макаренко О.П. Уровень экспрессии микроРНК-29а у больных хроническим вирусным гепатитом С / О.П. Шевченко-Макаренко // Клиническая инфектология и паразитология. – 2019. – Т.8, № 2. – С. 229-235.
- Шостакович-Корецька Л.Р. Базовий рівень експресії мікроРНК-196а у хворих на хронічний вірусний гепатит С з першим генотипом HCV / Л.Р. Шостакович-Корецька, О.П. Шевченко-Макаренко, Т.Ю. Лаликова-Бригинська // Гепатологія. – 2019. – № 2(44). – С. 35-44. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/gepat_2019_2_7
- МікроРНК-122 як біологічний маркер хронічного вірусного гепатиту С / О.П. Шевченко-Макаренко, Л.Р. Шостакович-Корецька, В.Є. Досенко, Т.І. Древицька // Міжнародний медичний журнал. – 2020. – Т. 26, № 1(101). – С. 72-75. DOI: <https://doi.org/10.37436/2308-5274-2020-1-16>
- Shostakovych-Koretskaya, L. The level of expression of miR-196a in patients with chronic viral hepatitis C with the first genotype of HCV according to previous experience of antiviral therapy / L. Shostakovych-Koretskaya, O. Shevchenko-Makarenko, T. Lapikova-Bryhynska // Медичні перспективи. – 2020. – Вип. 25, № 2. – С. 130-137. – Access mode : DOI: <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2020.2.206387>

References

- World Health Organization. (2019). Progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections 2019: accountability for the global health sector strategies, 2016-2021 (N WHO/CDS/HIV/19.7). *World Health Organization*. Retrieved from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/324797/WHO-CDS-HIV-19.7-eng.pdf?ua=1>.
- Shevchenko-Makarenko, O. (2018). Prognosis of development of hepatitis C epidemic process in 2018-2020 in the Dnipropetrovsk region and Ukraine. *Infektsiini khvoroby – Infectious Diseases*, (2), 28-35. Retrieved from: <https://doi.org/10.11603/1681-2727.2018.2.9031> [in Ukrainian].
- Pawlotsky, J.M., Negro, F., Aghemo, A., Berenguer, M., Dalgard, O., Dusheiko, G., ... & Wedemeyer, H. (2018). EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2018. *J. Hepatol.*, 69 (2), 461-511. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026>. Retrieved from: <https://easl.eu/wp-content/uploads/2018/10/HepC-English-report.pdf>.
- Liang, Y., Li, E., Min, J., Gong, C., Gao, J., Ai, J., Liao, W., & Wu, L. (2018). miR-29a suppresses the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma through IFITM3. *Oncology Reports*, 40 (6), 3261-3272. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6745>.
- Musaddaq, G., Shahzad, N., Ashraf, M. A., & Arshad, M. I. (2019). Circulating liver-specific microRNAs as noninvasive diagnostic biomarkers of hepatic diseases in human. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 24 (2), 103-109. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2018.1528631> Epub 2018 Oct 23. PMID: 30252499.
- Lendvai, G., Kiss, A., Kovalszky, I., & Schaff, Z. (2012). MikroRNS-ek a hepatocarcinogenesisben [MicroRNAs in hepatocarcinogenesis]. *Orv. Hetil.*, 153 (25), 978-989. DOI:10.1556/OH.2012.29387.
- Matsumoto, Y., Itami, S., Kuroda, M., Yoshizato, K., Kawada, N., & Murakami, Y. (2016). MiR-29a assists in preventing the activation of human stellate cells and promotes recovery from liver fibrosis in mice. *Molecular Therapy*, 24 (10), 1848-1859. DOI: <https://doi.org/10.1038/mt.2016.127>.
- Deng, Z., He, Y., Yang, X., Shi, H., Shi, A., Lu, L., & He, L. (2017). MicroRNA-29: a crucial player in fibrotic disease. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 21 (3), 285-294.
- Shevchenko-Makarenko, O. (2019). The expression level of miRNA-29a in patients with chronic viral hepatitis C. *Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya – Clinical Infectology and Parasitology*, 8 (2), 229-235.
- Shostakovych-Koretska, L.R., Shevchenko-Makarenko, O., & Lapikova-Bryhynska, T.Yu. (2019). Baseline level of miRNA-196a expression in patients with chronic viral hepatitis C with the first HCV genotype. *Hepatolohiya – Hepatology*, 2(44), 35-44. Retrieved from: http://nbuv.gov.ua/UJRN/gepat_2019_2_7 [in Ukrainian].
- Shevchenko-Makarenko, O., Shostakovych-Koretska, L., Dosenko, V., & Drevytska, T. (2020). MicroRNA-122 as a biological marker of chronic viral hepatitis C. *Mizhnarodnyi medychnyi zhurnal – International Medical Journal*, 26 (1(101)), 72-75. DOI: <https://doi.org/10.37436/2308-5274-2020-1-16>

org/10.37436/2308-5274-2020-1-16. Retrieved from: <http://www.imj.kh.ua/archive/2020/1/16> [in Ukrainian].

12. Shostakovych-Koretskaya, L., Shevchenko-Makarenko, O., & Lapikova-Bryhynska, T. (2020). The level of expression of miR-

196a in patients with chronic viral hepatitis C with the first genotype of HCV according to previous experience of antiviral therapy. *Medycni Perspektyvy – Medical Perspectives*, 25 (2), 130-137. DOI: <http://dx.doi.org/10.26641/2307-0404.2020.2.206387>.

ANALYSIS OF THE EXPRESSION LEVEL OF MICRORNA-29A IN PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL VARIANTS OF CHRONIC HCV-INFECTION

O.P. Shevchenko-Makarenko

Dnipropetrovsk State Medical Academy

SUMMARY. *The purpose* of the work was to analyze the baseline level of microRNA-29a expression in patients with chronic viral hepatitis C with genotype 1 of HCV, depending on the degree of liver fibrosis, the presence of cirrhosis, viral load of HCV, the duration of the disease, and other factors.

Patients and methods: The study examined 74 patients with genotype 1 of chronic HCV infection with a mean age of (47.5±1.4) years. The control group consisted of 11 healthy individuals with negative markers for viral hepatitis, mean age (38.5±5.5) years. According to the degree of fibrosis on the METAVIR scale, patients were distributed as follows, number (%): F1 – 25 (33.8), F2 – 21 (28.4), F3 – 11 (14.9), F4 – 17 (22.9). Moreover, among patients with stage F4 fibrosis, only 10 (58.8 %) patients had clinical signs of liver cirrhosis and stage A liver cirrhosis according to the Child-Pugh classification. The expression level of microRNA-29a (synonyms: miR-29a, hsa-miRNA-29a) was determined by a two-stage study according to the manufacturer's protocol based on the Department of General and Molecular Pathophysiology of the Institute of Physiology, O.O. Bohomolets of the National Academy of Sciences of Ukraine, where after isolation of total RNA from blood plasma, reverse transcription was performed by quantitative real-time PCR using TaqMan® microRNA analysis (Applied Biosystems, USA). Statistical processing and analysis of data were performed using the software product Statistica v.6.1®.

Results and conclusions. The results of the study showed that aberrant hyperexpression of microRNA-29a was detected in patients with chronic viral hepatitis C compared to healthy individuals: the median level of miR-29a expression in all patients was 20.6 times higher than in the group of healthy individuals and Log10

miR-29a in 4.9 times higher, respectively ($p < 0.001$, U). We have not found significant difference expression level of microRNA-29a in patients according to gender ($p = 0.940$), age ($p = 0.473$), duration of the disease from the time of detection of HCV ($p = 0.771$) and viral load HCV ($p = 0.505$). A significant difference ($p = 0.002$, H) in the expression level of microRNA-29a between patients with chronic HCV infection with varying degrees of fibrosis and in the control group: F0-F1 ($p < 0.001$), F0-F2 ($p = 0.007$), F0-F3 ($p < 0.001$), F0-F4 ($p = 0.027$). The mean level of miR-29 expression in patients can significantly ($p < 0.001$) exclude the initial stages of liver fibrosis in patients with chronic HCV infection and become an additional highly informative noninvasive biomarker in differentiating between early stages of liver fibrosis and advanced liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis C. The level of miRNA-29a expression allows to differentiate the progression of liver fibrosis and cirrhosis in patients and allows to quickly and clearly separate patients with cirrhosis of class A liver according to Child-Pugh classification ($p = 0.025$, H) for further effective management and appropriate antiviral therapy regimens.

Key words: chronic hepatitis C; HCV infection; liver fibrosis; liver cirrhosis; microRNA-29a.

Відомості про автора:

Шевченко-Макаренко Ольга Петрівна – к. мед. н., доцент кафедри інфекційних хвороб ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»; e-mail: dsmainfect@ukr.net; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8859-6229>

Information about the author:

Shevchenko-Makarenko O. P. – PhD (Medicine), Associate Professor of the Department of Infectious Diseases, State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine"; e-mail: dsmainfect@ukr.net; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8859-6229>

Конфлікт інтересів: немає.

Author has no conflict of interest to declare.

Отримано 22.08.2020 р.