

МИКРОРИБОНУКЛЕИНОВИ КИСЕЛИНИ ПРИ ДЕЦА С БОЛЕСТ НА КРОН

Красимира Колева, Миглена Георгиева

Втора детска клиника, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна
Катедра по педиатрия, Медицински университет – Варна

MICRORIBONUCLEIC ACIDS IN CHILDREN WITH CROHN'S DISEASE

Krasimira Koleva, Miglena Georgieva

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Редица микрорибонуклеинови киселини (микроРНК) вече се използват като обещаващи неинвазивни биомаркери при пациенти с болест на Крон. Количествените характеристики на експресията на 11 различни серумни микроРНК са изследвани с помощта на верижна полимеразна реакция в реално време при общо 42 деца. Касае се за 22 деца, 16 момичета и 6 момчета на възраст между 9 и 17 г. с болест на Крон, и 20 здрави деца, 12 момичета и 8 момчета на възраст между 4 и 17 г. Експресията на всички микроРНК е по-висока при пациентите, отколкото при здравите деца. Стойностите на микроРНК142-3р и микроРНК642-b3 са статистически значимо по-големи при децата с болест на Крон, отколкото при здравите деца (съответно $t=2,05$; $p<0,05$ и $t=2,00$; $p<0,05$). Някои микроРНК играят диагностичната роля при децата с болест на Крон. Необходими са допълнителни системни изследвания при децата и възрастните с това заболяване.

Ключови думи: болест на Крон, микрорибонуклеинови киселини, деца

ABSTRACT

In recent years, several microribonucleic acids (microRNA) have been used as promising non-invasive biomarkers in patients with ulcerative colitis. Quantitative characteristics of the expression of 11 different serum microRNAs were examined by means of real-time polymerase chain reaction in a total of 33 children. There were 22 children, 16 girls and six boys, aged between nine and 17 years with Crohn's disease and 20 healthy children, 12 girls and eight boys, aged between four and 17 years. There was a higher expression of all the microRNAs in patients than in healthy children. The values of microRNA142-3p and microRNA642-b3 were statistically reliably greater in children with Crohn's disease than in healthy children ($t=2.05$; $p<0.05$ and $t=2.00$; $p<0.05$, respectively). Some microRNAs play a diagnostic role in children with Crohn's disease. An additional systematic research is needed for children and adults with this disease.

Keywords: Crohn's disease, microribonucleic acids, children

ВЪВЕДЕНИЕ

Медико-социалната значимост на възпалителните чревни заболявания при децата и юношите нараства стремително през последните две десетилетия в глобален мащаб (7). Протичането на тези трудно лечими заболявания е по-разпространено и по-тежко при децата, отколкото при възрастните. През периода между 1970 г. и 2018 г. се наблюдава по-висока заболяемост от болестта на Крон при децата в Северна Европа, отколкото в другите европейски страни (11). Заболяемостта нараства значително (до 9 или 10 на 100 000 души население) в Швеция, Уелс, Англия, Чешката република, Дания и Унгария, а болестността варира между 8,2 и 60 на 100000 души население.

Разработени са разнообразни методи за ранна и прецизна диагностика на болестта на Крон в зрялата и детската възраст.

Микрорибонуклеиновите киселини (микроРНК) представляват клас от еднородни, малки не кодиращи РНК, които регулират генната експресия, действайки на мястото на взаимодействие между околната среда и унаследяемите молекулярни и клетъчни фенотипове (4). Докато до 2015 г. са известни над 2500 зрели човешки транскрипта на микроРНК (4), в началото на 2020 г. вече са познати повече от 5400 микроРНК, които имат за мишена множествени гени транскрипти (1).

Циркулиращите микроРНК все повече се използват като обещаващи неинвазивни биомаркери при болните с възпалителни чревни заболявания (15,17 и др.).

Ние не установихме данни за проучвания от български автори, посветени на използването на микроРНК при деца с болестта на Крон. Поради това проведехме настоящото пилотно изследване с цел разкриване на количествените характе-

ристики на 11 различни микроРНК при деца с това заболяване.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Настоящото изследване е проведено през периода между 1.I.2018 г. и 31.XII.2019 г. Количествените характеристики на експресията на 11 различни серумни микроРНК (микроРНК122, микроРНК142-3p, микроРНК196-b, микроРНК642-b3, микроРНК155, микроРНК131-a, микроРНК125-a, микроРНК16-a, микроРНК21, микроРНК223 и микроРНК195) са изследвани с помощта на верижна полимеразна реакция в реално време в Лабораторията по нутригеномика, функционални храни и нутрацевтици при Катедрата по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна. Касае се за общо 42 деца – за 22 деца, 16 момичета и 6 момчета на възраст между 9 и 17 г. с болест на Крон, хоспитализирани във Втора детска клиника на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна при Катедрата по педиатрия на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, и за 20 здрави деца, 12 момичета и 8 момчета на възраст между 4 и 17 г.

Получените данни са обработени статистически с помощта на вариационен анализ при урвен на значимост от $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ

Стойностите на тези 11 микроРНК при децата с болестта на Крон са представени на Табл. 1.

Вижда се, че експресията на всички микроРНК е по-висока при децата с болест на Крон. Поради сравнително малкия обем на извадката и наличието на значителна дисперсия между най-ниските и най-високите стойности на тези микроРНК не се долавят статистически

Таблица 1. Стойности на 11 микроРНК при 22 деца с болест на Крон

МикроРНК	средна стойност	стандартно отклонение	максимална стойност	минимална стойност
miRNA122	1,97	2,39	9,17	0,07
miRNA143-3p	2,15	2,58	12,56	0,38
miRNA196-b	1,46	1,75	8,67	0,36
miRNA642-3b	1,88	2,00	8,39	0,13
miRNA155	1,44	1,63	7,64	0,18
miRNA131-a	2,62	3,96	19,18	0,19
miRNA125-a	1,58	2,08	10,31	0,17
miRNA16-a	0,88	2,22	4,59	0,29
miRNA21	1,78	2,86	13,70	0,26
miRNA223	3,21	5,56	22,62	0,26
miRNA195	0,71	0,54	2,82	0,07

достоверни различия между болните и здравите деца. Изключение правят две микроРНК: микроРНК142-3р ($t=2,05$; $p<0,05$) и микроРНК642-b3 ($t=2,00$; $p<0,05$). При други две микроРНК се кацае за гранична статистическа значимост на разликата между двете групи деца (при микроРНК131-a - $t=1,88$; $p>0,05$ и при микроРНК223 - $t=1,80$; $p>0,05$).

ОБСЪЖДАНЕ

През последните години се появиха единични публикации от чужди автори, посветени на някои от тези микроРНК – микроРНК223, микроРНК122, микроРНК21 и микроРНК155.

Активността на серумната микроРНК223 се регулира по сигналния път на интерлевкин-23 (14). Експресията ѝ е с 2,2 пъти по-висока при 50 болни с болест на Крон, отколкото при 50 контролни лица в Китай (14). Концентрацията ѝ корелира с показателите за тежестта на заболяването. Тя показва статистически достоверно по-високи стойности на корелационния коефициент на Spearman при болните спрямо СУЕ ($r=0,566$; $p<0,001$) и С-реактивния протеин с висока чувствителност ($r=0,635$; $p<0,001$).

Експресията на микроРНК122 е по-висока в макроскопски интактните участъци на дебелото черво на децата с болест на Крон, отколкото при децата с улцерозен колит и здравите деца в Унгария (2). При изследването на тази експресия при 20 деца с болест на Крон (10 деца с възпалена и 10 – без възпалена лигавица на дуоденума) и 10 здрави деца в Унгария не се установяват значими различия между трите групи деца (12).

Регулацията на микроРНК122 се нарушава при прогресирането на болестта на Крон (5). Генът нуклеотидно-свързващ олигомеризационен домейн 2, значително свързан с предразположението към това заболяване, е функционална мишена на тази микроРНК. Той активира нуклеарния фактор карра-В и стимулира отслабването на провъзпалителните явления. МикроРНК122 и нейната мишена играят важна роля при увреждането на чревните епителни клетки, предизвикано от липополизахаридите.

При 46 деца на средна възраст от $13,7\pm 3,0$ г. с болест на Крон се установява средно изразена експресия на микроРНК21 от $2,72\pm 0,24$ (17). Тази стойност е статистически достоверно по-ниска при 32 здрави деца на средна възраст от $13,1\pm 4,1$ г. ($p<0,0001$). Чувствителността на микроРНК21 е 76,09%, а специфичността ѝ – 84,38%. Експресията на тази серумна микроРНК намалява значи-

телно след шестмесечно лечение на децата с болест на Крон.

Експресията на циркулиращата микроРНК21 е по-висока при 12 деца с болест на Крон на средна възраст от $15,4\pm 3,9$ г. с болест на Крон, отколкото при 20 здрави деца на средна възраст от $14,8\pm 2,5$ г. (18). Тази експресия е значително по-силна в чревната лигавица на болните с болестта на Крон, отколкото при контролните лица (16).

Експресията на микроРНК155 е по-висока във възпалената, отколкото в интактната чревна лигавица на деца с болест на Крон в Унгария (2). Тя е статистически достоверно по-висока при 20 деца с болест на Крон (10 от които с възпалена и 10 – без възпалена лигавица на дуоденума), отколкото при 10 здрави деца в Унгария ($4,87\pm 1,02$ спрямо $1,00\pm 0,40$; $p\leq 0,001$) (12). Лечението с трансформиращия растежен фактор- β понижава статистически значимо експресията на микроРНК155 в тънкочревните епителни клетки ($0,7\pm 0,083$ спрямо $1\pm 0,09$; $p\leq 0,05$) и в дуоденалните фибробласти в сравнение с контролите, третирани с плацебо ($0,72\pm 0,09$ спрямо $1\pm 0,06$; $p\leq 0,05$).

Експресията на микроРНК155 в чревната лигавица е значително по-силна при болните с болестта на Крон, отколкото при контролните лица (16). Тя е повишена при болните с болест на Крон, независимо от локализацията на възпалителните увреждания (дебело черво, право черво и дуоденум), тъй като те са по-скоро специфични за самото възпаление, отколкото за засегнатия орган (2,9).

Представяват интерес и проучванията върху някои други микроРНК при пациенти с болест на Крон, публикувани неотдавна.

При съпоставителното изследване на няколко микроРНК в 28 проби от черва на деца се установява, че микроРНК27-a и микроРНК191 са подходящи за анализ при болестта на Крон на тънкото черво (3).

При изследването на експресията на няколко микроРНК в тъкани от дебелото черво при 20 болни (13 жени и седем мъже) с болест на Крон се доказва, че микроРНК31-5р и микроРНК203 са вероятни регулатори на профилите на генната експресия, свързана с болестта на Крон (10). Те са клинично полезни прогностични маркери и идентифицират болните, които се повлияват най-добре от най-ефективните терапевтични интервенции.

Налице е статистически достоверно намаление на експресиите на микроРНК141 ($p=0,002$), микроРНК200-a ($p=0,002$), микроРНК200-c

($p=0,001$) и микроРНК429 ($p=0,004$) в свеж материал от резекция при болни със стенозираща илеална болест на Крон (8). Понижената експресия на семейството на микроРНК-200 е локализирана в епитела (между $p=0,001$ и $p=0,015$).

Експресията на микроРНК31 е по-силно изразена в епителни клетки на дебелото черво при деца с болест на Крон, отколкото при здрави деца (6). Ниската експресия на тази микроРНК при децата при диагностицирането на заболяването е свързана с по-късното развитие на фиброstenозираща илеална болест на Крон, която налага извършването на оперативно лечение.

При 46 деца на средна възраст от $13,7\pm 3,0$ г. с болест на Крон се установява средно изразена на микроРНК195 от $5,67\pm 0,90$ (17). Тази стойност е статистически значимо по-ниска при 32 здрави деца на средна възраст от $13,1\pm 4,1$ г. ($p<0,0001$). Чувствителността на микроРНК195 е 69,57%, а специфичността ѝ – 96,88%. Експресията на тази серумна микроРНК намалява значително след шестмесечно лечение на децата с болест на Крон.

МикроРНК15-а и нейният прицелен ген цикъл 42 на клетъчното деление са изследвани при 19 деца с активна форма на болестта на Крон, седем деца с болест на Крон в ремисия и 21 здрави деца (13). Експресията на микроРНК15-а нараства ($p=0,0038$), а тази на цикъла 42 на клетъчното деление намалява ($p=0,0013$) в клетките, стимулирани посредством тумор-некротизиращия фактор- α . При децата с активна форма на болестта на Крон е налице повишение на експресията на микроРНК15-а и намаление на тази на цикъла 42 на клетъчното деление в сравнение с контролната група деца ($p<0,05$). При децата с болест на Крон в ремисия се касае за намаление на експресията на микроРНК15-а и за повишение на тази на цикъла 42 на клетъчното деление в сравнение с контролната група деца ($p<0,05$). Експресията на микроРНК15-а корелира положително с Педиатричния индекс за активността на болестта на Крон ($p=0,006$) и отрицателно – с цикъла 42 на клетъчното деление при децата с възпалителни чревни заболявания ($p=0,0045$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нашите първоначални резултати и данните от чуждата литература доказват ролята на някои микроРНК като допълнителен диагностичен критерий при децата с болест на Крон. Необходимо са по-нататъшни изследвания върху по-голям контингент от пациенти с това заболяване в детската и зрялата възраст.

ЛИТЕРАТУРА

1. Altaf-Ul-Amin M, Karim MB, Hu P, Ono N, Kanaya S. Discovery of inflammatory bowel disease-associated miRNAs using a novel bipartite clustering approach. *BMC Med Genomics*. 2020;13(Suppl 3):10. doi: 10.1186/s12920-020-06660-y.
2. Béres NJ, Szabó D, Kocsis D, Szűcs D, Kiss Z, Müller KE, et al. Role of altered expression of miR-146a, miR-155, and miR-122 in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(2):327-335.
3. Buonpane C, Ares G, Benyamen B, Yuan C, Hunter CJ. Identification of suitable reference microRNA for qPCR analysis in pediatric inflammatory bowel disease. *Physiol Genomics*. 2019;51(5):169-175.
4. Chapman CG, Pekow J. The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review. *Therap Adv Gastroenterol*. 2015;8(1):4-22.
5. Chen Y, Wang C, Liu Y, Tang L, Zheng M, Xu C, et al. MiR-122 targets NOD2 to decrease intestinal epithelial cell injury in Crohn's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;438(1):133-139.
6. Keith BP, Barrow JB, Toyonaga T, Kazgan N, O'Connor MH, Shah ND, et al. Colonic epithelial miR-31 associates with the development of Crohn's phenotypes. *JCI Insight*. 2018;3(19):e122788.
7. Malmborg P, Hildebrand H. The emerging global epidemic of paediatric inflammatory bowel disease - causes and consequences. *J Intern Med*. 2016;279(3):241-258.
8. Mehta SJ, Lewis A, Nijhuis A, Jeffery R, Biancheri P, Di Sabatino A, et al. Epithelial down-regulation of the miR-200 family in fibrostenosing Crohn's disease is associated with features of epithelial to mesenchymal transition. *J Cell Mol Med*. 2018;22(11):5617-5628.
9. Min M, Peng L, Yang Y, Guo M, Wang W, Sun G. MicroRNA-155 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis by targeting FOXO3a. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(4):652-659.
10. Peck BC, Weiser M, Lee SE, Gipson GR, Iyer VB, Sartor RB, et al. MicroRNAs classify different disease behavior

- phenotypes of Crohn's disease and may have prognostic utility. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(9):2178-2187.
11. Roberts SE, Thorne K, Thapar N, Broekaert I, Benninga MA, Dolinsek J, et al. A systematic review and meta analysis of paediatric inflammatory bowel disease incidence and prevalence across Europe. *J Crohns Colitis.* 2020 Feb 28. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa037.
 12. Szűcs D, Béres NJ, Rokony R, Boros K, Borka K, Kiss Z, et al. Increased duodenal expression of miR-146a and -155 in pediatric Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(26):6027-6035.
 13. Tang WJ, Peng KY, Tang ZF, Wang YH, Xue AJ, Huang Y. MicroRNA-15a - cell division cycle 42 signaling pathway in pathogenesis of pediatric inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2018;24(46):5234-5245.
 14. Wang H, Chao K, Ng SC, Bai AH, Yu Q, Yu J, et al. Pro-inflammatory miR-223 mediates the cross-talk between the IL23 pathway and the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Genome Biol.* 2016;17:58. doi: 10.1186/s13059-016-0901-8.
 15. Wang H, Zhang S, Yu Q, Yang G, Guo J, Li M, et al. Circulating microRNA223 is a new biomarker for inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore).* 2016a;95(5):e2703. doi: 10.1097/MD.0000000000002703.
 16. Xu XM, Zhang HJ. miRNAs as new molecular insights into inflammatory bowel disease: Crucial regulators in autoimmunity and inflammation. *World J Gastroenterol.* 2016;22(7):2206-2218.
 17. Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR. Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;53(1):26-33.
 18. Zahm AM, Hand NJ, Tsoucas DM, Le Guen CL, Baldassano RN, Friedman JR. Rectal microRNAs are perturbed in pediatric inflammatory bowel disease of the colon. *J Crohns Colitis.* 2014;8(9):1108-1117.

Настоящото проучване е осъществено с финансовата подкрепа на проект № 18022 по фонд „Наука“ на Медицинския университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Адрес за кореспонденция:
д-р Красимира Колева
Втора детска клиника
УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна
Катедра по педиатрия
Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
Варна 9010
бул. „Христо Смирненски“ 1
тел. 0899929666
e-mail: krasi0617@abv.bg