

НЕАЛКОХОЛНА МАСТНА ЧЕРНОДРОБНА БОЛЕСТ И ЕКСПРЕСИЯ НА МИКРОРНКИ В ДЕТСКАТА ВЪЗРАСТ

Михаил Сирوماхов^{1,2}, Ния Рашева^{1,2}, Красимира Колева^{1,2},
Антония Атанасова^{3,4}, Миглена Георгиева^{1,2}

¹Катедра по педиатрия, Факултет по медицина, Медицински университет – Варна

²II детска клиника, УМБАЛ „Света Марина“

³Катедра по анатомия, хистология и ембриология, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

⁴Клиника по хепатогастроентерология, УМБАЛ „Света Марина“

NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE AND MICRORNA EXPRESSION IN CHILDREN

Mihail Siromahov^{1,2}, Niya Rasheva^{1,2}, Krasimira Koleva^{1,2},
Antonia Atanasova^{3,4}, Miglena Georgieva^{1,2}

¹Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Second Pediatric Clinic, St. Marina University Hospital, Varna

³Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

⁴Clinic of Hepatogastroenterology, St. Marina University Hospital, Varna

РЕЗЮМЕ

С разрастване на епидемията от затлъстяване през последните десетилетия, неалкохолната мастна чернодробна болест (НАМЧБ) се превръща във водеща причина за хронично чернодробно заболяване не само сред възрастни, но и сред деца. Към настоящия момент златен стандарт за поставяне на диагнозата НАМЧБ в детската възраст е чернодробната биопсия. Това е инвазивна процедура, асоциирана с потенциални тежки усложнения. Поради това, настоящите усилия са насочени към разработването на нови неинвазивни и достъпни методи за ранна диагностика на чернодробните болести. Сред потенциалните биомаркери са микроРНК-молекулите – малки молекули, състоящи се от 20-25 нуклеотидни бази, упражняващи своя биологичен ефект като регулатори на протеиновата синтеза. Целта на настоящата статия е да даде кратко описание на функцията на микроРНКите, асоциирани с чернодробния метаболизъм и възможната им употреба в диагностиката на НАМЧБ в детската възраст. Разглеждат се специфични микроРНКи, с доказана връзка в регулацията на чернодробния метаболизъм – микроРНК-122, микроРНК-34а, микроРНК-29а.

ABSTRACT

With the rise of the obesity epidemic in recent decades, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become the leading cause of chronic liver disease, not only in adults but in children as well. At present, the gold standard in diagnosing pediatric NAFLD is liver biopsy – an invasive procedure associated with potentially severe complications. Therefore, the current efforts are directed towards the development of new non-invasive and accessible methods for the early diagnosis of NAFLD. Among the potential biomarkers are the micro-ribonucleic acids (miRNAs) – small molecules made up of 20-25 nucleotides, which exert their biological effect as regulators of protein synthesis. The aim of the present article is to provide a short description of miRNA function in hepatic metabolism and their possible use in diagnosing pediatric NAFLD.

Ключови думи: деца, затлъстяване, НАМЧБ, микроРНКи, диагностика

Keywords: children, obesity, NAFLD, miRNA, diagnostics

УВОД

През последните десетилетия затлъстяването се превръща във водещ проблем за общественото здравеопазване. Според данни на Световната здравна организация около 39% от всички лица над 18-годишна възраст са с наднормено тегло, като около 1/3 от тях страдат от затлъстяване (5). Подобна характеристика се наблюдава и в детската възраст: около 18% от децата на възраст между 5 и 19 години са с наднормено тегло. Докато през 1975 година децата с болестно затлъстяване са под 1%, към 2016 година те са около 7% сред детската популация. Същите тревожни съобщения се появяват и в България. Според тях 15.2% от всички деца в предучилищна възраст са с наднормено тегло. Най-големият дял принадлежи на деца, живеещи при лоши социално-битови условия (11).

Заедно с повишената честота на затлъстяването в детска възраст, се повишават и асоциираните усложнения, сред които е и неалкохолната мастна чернодробна болест (НАМЧБ) (8). НАМЧБ е сборно понятие, обхващащо спектър от заболявания, сред които са: обикновена чернодробна стеатоза, неалкохолен стеатохепатит (НАСХ), НАСХ с чернодробна фиброза и НАСХ с чернодробна цироза (17). Поради рязкото увеличаване на пациентите със затлъстяване НАМЧБ е втората най-честа причина за чернодробна трансплантация сред възрастните в САЩ (19). По дефиниция НАМЧБ в детска възраст има ранно начало, водещо до по-напреднало чернодробно увреждане, в сравнение с възрастните, което предполага по-агресивна прогресия на заболяването в детската популация и необходимост от по-ранна диагностика и лечение (17).

Според Европейската общност по детска гастроентерология, хепатология и хра-

нене (ESPGHAN) настоящият златен стандарт за поставяне на диагнозата НАМЧБ в детска възраст е посредством чернодробна биопсия с хистологично изследване, която се прилага при повишени чернодробни трансминази (>2 пъти референтната стойност) и липса на доказателства за специфична етиология (16). Инвазивният характер и асоциираните усложнения правят чернодробната биопсия неприложима, поради което настоящите усилия се насочват към разработването на нови неинвазивни методи за ранна диагностика.

Наред с конвенционалните екстрацелуларни протеини, микрорибонуклеиновите киселини (микроРНКи) се превръщат в обект на засилен интерес от научната общност като биомаркери при различни заболявания, сред които и НАМЧБ.

Общи особености на микроРНКите

Синтезът на микроРНКите започва с транскрипция на първична микроРНК и нейната преработка от нуклеарен ензимен комплекс (Drosha/DGCR8), водеща до формирането на пре-микроРНКи в ядрото на клетката. Синтезираните пре-микроРНКи биват транспортирани до цитозола, където биват преработени от ензимът Dicer, в следствие на което се образуват „зрели“ микроРНКи. МикроРНКите са малки молекули от 20-25 нуклеотида, които упражняват своята функция посредством включване в РНК-индуциран комплекс на заглушаване (RISC). Така образуваният комплекс има възможността да се свърже към 3'-UTR (untranslated region) на комплементарната информационна РНК и да инхибира нейната трансляция (6). Важна особеност на микроРНКите е, че една молекула може да се свърже с 3'-UTR на множество информационни РНК, както и обратно – една информационна РНК може да се влияе от множество микроРНКи.

Освен горепосоченият биологичен механизъм, съществуват доказателства, според които микроРНКите могат да имат катализиращ ефект върху транслацията на информационни РНКи (20), а също така да упражняват директен ефект върху toll-like рецептори или митохондриални РНКи (6). Това доказва разнообразните биологични функции и потенциалното приложение на микроРНКите в съвременната медицинска наука.

Потенциал на специфични микроРНКи в диагностиката на НАМЧБ

Основните качества на микроРНКите като биомаркери при различни заболявания се дължат на следните техни свойства: стабилност в телесни течности (плазма, урина, кръв и други); достъпна технология за екстракция; специфичност към определени тъкани и метаболитни процеси (2). В настоящата статия авторите разглеждат специфични микроРНКи с доказана връзка в регулацията на чернодробния метаболизъм.

◆ МикроРНК-122

МикроРНК-122 е високоспецифична за черния дроб молекула, представляваща около 72% от всички микроРНКи, съдържащи се в чернодробните клетки (10). Въпреки че точният механизъм на действие на микроРНК-122 не е напълно изяснен, редица проучвания върху експериментални животни доказват, че инхибицията на микроРНК-122 води до понижение в нивата на серумния холестерол и триглицериди, без изява на остра или хронична чернодробна недостатъчност сред изследваните животни (4).

Подобна корелация е установена от P. Willeit et al. (18), които, освен че потвърждават ефекта на антагонистите на микроРНК-122 в миши модели, проследяват нивата на микроРНК-122 сред участници в проспективно, популационно-базирано проучване сред възрастни пациенти между 40 и 79 години. Според изследването високата експресия на микроРНК-122 е свързана с по-високи нива на чернодробни трансаминази, затлъстяване, системно

възпаление, инсулинова резистентност и неблагоприятен липиден профил (по-високи триглицериди и по-нисък HDL холестерол). Участниците, диагностицирани с метаболитен синдром, са с 160% по-висока експресия на микроРНК-122, в сравнение с пациенти, непокриващи критериите. Пациентите със захарен диабет тип 2 (ЗДТ2) имат 214% по-висока експресия на микроРНК-122, в сравнение с пациенти без ЗДТ2. Освен сред болните с метаболитен синдром, високи серумни нива на микроРНК-122 са доказани и сред пациенти с НАМЧБ. Според H. Miyaakietal et al. (12), които изолират тоталната РНК от чернодробната тъкан на 67 биопсирани пациенти с НАМЧБ и тоталната РНК от серум на 52 от тези болни, пациентите с тежка стеатоза показват значително по-високи нива на микроРНК-122 в черния дроб, в сравнение с тези с лека стеатоза. Същевременно, експресията на микроРНК-122 в черния дроб и серума е значително по-висока при пациенти с лека фиброза, отколкото при тези с тежка фиброза.

Значението на микроРНК-122 по отношение на НАМЧБ в детската възраст бива потвърдено от колектива на S. Brandtetal et al. (1). Авторите изследват връзката между серумната експресия на микроРНК-122, серумни маркери за чернодробен метаболизъм и НАМЧБ в 3 кохорти от препубертетни деца със затлъстяване и ехографски данни за НАМЧБ. Авторите доказват положителна корелация между експресията на РНК-122 и нивата на чернодробните трансаминази в трите кохорти пациенти.

◆ МикроРНК-34a

Въпреки че микроРНК-34a е слабо представена в чернодробните клетки в нормални условия, съществуват данни за нейната повишена експресия при миши модели с НАМЧБ (3). Според авторите микроРНК-34a инхибира действието на PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) – транскрипционен фактор и основен индуктор на усвояването и катаболизма на мастни киселини в хепатоцитите. Според редица проучвания тази мик-

роРНК е значително повишена в плазмата и хепатоцитите на възрастни пациенти с НАСХ (10). Според мета-анализа на С-Н Liu et al. (10) тя може да бъде използвана като добър и достоверен биомаркер за диференциална диагноза между НАСХ и обикновена стеатоза при възрастни.

Проучвайки достъпната литература, авторите намират само едно изследване, разглеждащо ролята на микроРНК-34а, наред с други 19 микроРНК-и, при децата, страдащи от НАМЧБ. Според М. D. Thompson et al. (15) съществува статистически значимо увеличение в експресията на микроРНК-34а при пациенти със затлъстяване и ехографска характеристика на НАМЧБ, в сравнение със здрави контроли.

◆ МикроРНК-29а

През 2011 г. С. Roderburg et al. (14) за първи път изследват значението на микроРНК-29 в неинвазивната диагностика на чернодробна фиброза сред миши модели и възрастни пациенти. Те доказват, че ниската експресия на микроРНК-29 корелира директно със степента на фиброза в чернодробната тъкан. Същото е потвърдено от К. Јамрока et al. (7), които съобщават, че ниските нива на микроРНК-29а могат да бъдат използвани като диагностичен биомаркер с чувствителност от 60.87% и специфичност 82.35%. В педиатричната практика единствено М. D. Thompson et al. (15) потвърждават диагностичните възможности на микроРНК-29а при деца с НАМЧБ.

Според проучвания върху животински модели свръхекспресията на микроРНК-29а води до понижаване на степента на чернодробна стеатоза, възпаление и фиброза чрез редуциране на окислителния стрес, което я прави потенциален таргет с терапевтична цел (9). Част от ефектите на микроРНК-29а могат да бъдат обяснени чрез упражняването на епигенетичен контрол върху клетъчния апарат посредством инхибиция на специфични ДНК метилтрансферази (9). Точният механизъм, чрез който микроРНК-29а подобрява митохондриалната функция и понижава оксидативния стрес, предстои да бъде изяснен.

Съществуват редица други микроРНК-и, които са асоциирани с НАМЧБ във възрастната популация (10). За съжаление към момента едва няколко изследвания описват експресията на микроРНК-и при деца със затлъстяване, застрашени от НАМЧБ (13).

В заключение, микроРНК-ите са стабилни молекули с широка биологична функция, които откриват нови перспективи за диагностика и лечение на НАМЧБ. В момента усилията в тази област са насочени към валидиране на резултатите в големи кохорти от пациенти, което би довело до рутинната им употреба в ежедневната клинична практика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brandt S, Roos J, Inzaghi E, Kotnik P, Kovac J, Battelino T, et al. Circulating levels of miR-122 and nonalcoholic fatty liver disease in pre-pubertal obese children. *Pediatr Obes* [Internet]. 2018 Mar;13(3):175–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijpo.12261>
2. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* [Internet]. 2020 Jan 23 [cited 2020 Nov 12];9(2):276. Available from: [/pmc/articles/PMC7072450/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3272450/)
3. Ding J, Li M, Wan X, Jin X, Chen S, Yu C, et al. Effect of miR-34a in regulating steatosis by targeting PPAR α expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Sep 2 [cited 2020 Nov 13];5(1):13729. Available from: www.nature.com/scientificreports
4. Elmén J, Lindow M, Silahtaroglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, et al. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2020 Sep 6];36(4):1153–62. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/36/4/1153/2410055>

5. Geneva. Consideration of the evidence on childhood obesity for the Commission on Ending Childhood Obesity Report of the Ad hoc Working Group on Science and Evidence for Ending Childhood Obesity [Internet]. 2016 [cited 2020 Nov 5]. Available from: <http://www.who.int>
6. Gjorgjieva M, Sobolewski C, Dolicka D, Correia de Sousa M, Foti M. miRNAs and NAFLD: from pathophysiology to therapy. *Gut* [Internet]. 2019;68(11):2065–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31300518>
7. Jampoka K, Muangpaisarn P, Khongnomnan K, Treeprasertsuk S, Tangkijvanich P, Payungporn S. Serum miR-29a and miR-122 as Potential Biomarkers for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *MicroRNA* [Internet]. 2018 Sep 6;7(3):215–22. Available from: <http://www.eurekaselect.com/162596/article>
8. Kelsey MM, Zaepfel A, Bjornstad P, Nadeau KJ. Age-related consequences of childhood obesity. *Gerontology*. 2014;60(3):222–8.
9. Lin HY, Yang YL, Wang PW, Wang FS, Huang YH. The Emerging Role of MicroRNAs in NAFLD: Highlight of MicroRNA-29a in Modulating Oxidative Stress, Inflammation, and Beyond. *Cells*. 2020;9(4).
10. Liu C-H, Ampuero J, Gil-Gómez A, Montero-Vallejo R, Rojas Á, Muñoz-Hernández R, et al. miRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* [Internet]. 2018 Dec;69(6):1335–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.08.008>
11. Manios Y, Androutsos O, Katsarou C, Vampouli EA, Kulaga Z, Gurzkowska B, et al. Prevalence and sociodemographic correlates of overweight and obesity in a large Pan-European cohort of preschool children and their families: The ToyBox-study. *Nutrition* [Internet]. 2018;55–56:192–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.05.007>
12. Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, et al. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* [Internet]. 2014 Aug;34(7):e302-7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ijpo.12133>
13. Oses M, Margareto Sanchez J, Portillo MP, Aguilera CM, Labayen I. Circulating miRNAs as Biomarkers of Obesity and Obesity-Associated Comorbidities in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Nutrients* [Internet]. 2019 Nov 27;11(12):2890. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31783635>
14. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, et al. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* [Internet]. 2011 Jan [cited 2020 Nov 14];53(1):209–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20890893/>
15. Thompson MD, Cismowski MJ, Serpico M, Pusateri A, Brigstock DR. Elevation of circulating microRNA levels in obese children compared to healthy controls. *Clin Obes* [Internet]. 2017 Aug;7(4):216–21. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/cob.12192>
16. Vajro P, Lenta S, Socha P, Dhawan A, McKiernan P, Baumann U, et al. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: Position paper of the ESPGHAN hepatology committee. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(5):700–13.
17. Vos MB, Abrams SH, Barlow SE, Caprio S, Daniels SR, Kohli R, et al. NASPGHAN Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: Recommendations from the Expert Committee on NAFLD (ECON) and the North American Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nu. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;64(2):319–34.
18. Willeit P, Skroblin P, Moschen AR, Yin X, Kaudewitz D, Zampetaki A, et al. Circulating MicroRNA-122 Is Associated With the Risk of New-Onset Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2017 Feb;66(2):347–57. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/db16-0731>
19. Wong RJ, Aguilar M, Cheung R, Perumpail RB, Harrison SA, Younossi ZM, et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Is the Second

Leading Etiology of Liver Disease Among Adults Awaiting Liver Transplantation in the United States. *Gastroenterology* [Internet]. 2015 Mar [cited 2019 May 27];148(3):547–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25461851>

20. Xiao M, Li J, Li W, Wang Y, Wu F, Xi Y, et al. MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA Biol* [Internet]. 2017 Oct 3 [cited 2020 Nov 11];14(10):1326–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2015.1112487>

Адрес за кореспонденция:

Михаил Сиромахов
УМБАЛ „Света Марина“
бул. Христо Смирненски 1
9000 Варна
e-mail: mihail.siromahov@gmail.com
