

KERATIN-18 ȘI MICRO-ARN – BIOMARKERII LEZIUNILOR HEPATICE DE ORIGINE MEDICAMENTOASĂ

Ana VESELOVSKAIA, Anatolie VIȘNEVSKI

Catedra de medicina de laborator, USMF „Nicolae Testemițanu”

Rezumat. Leziunile hepatice induse de medicamente (LHIM) sunt patologii care se dezvoltă independent de doza de medicament (pentru unele medicamente), calea sau durata administrării. Leziunile hepatice induse de medicamente fac parte din cauzele care stau la baza dezvoltării insuficienței hepatice acute. Diagnosticul se face după excluderea altor cauze ale patologiei hepatice și, prin urmare, morbiditatea prin LHIM este deseori subestimată. Studiile privind noi biomarkeri serici, cum ar fi glutamat dehidrogenaza, protein box-1 cu mobilitate înaltă, keratina-18 și microARN-122 ar putea oferi informații suplimentare pentru diagnosticare și utilizare prognostică și ar oferi perspective importante asupra mecanismului de patogeneză a leziunii hepatice induse de droguri. Aproximativ 1000 preparate farmaceutice sunt implicate în leziunile hepatice medicamentoase. În prezent, există un interes tot mai mare în dezvoltarea „medicamentelor personalizate” în care un anumit medicament este furnizat unui anumit pacient pe baza eficacității sale furnizate de datele genomice ale pacientului și/sau expresia genelor tisulare specifice. Hepatocitele exprimă polipeptidele keratin 8 și 18 (K8/K18), în timp ce colangiocitele exprimă K8/K18 și keratina 7 și 19 (K7/K19). Un studiu recent demonstrează că microARN-122 și keratina-18 sunt biomarkeri mai sensibili și mai specifici pentru LHIM comparativ cu biomarkerii standard ai proteinei utilizați în prezent.

Cuvinte-cheie: biomarker, leziuni hepatice induse de medicamente, ALT, miRNA-122, keratina-18, APAP

Summary. Keratin-18 and micro-RNA - biomarkers of drug-induced liver injury

Drug-induced liver injury (DILI) are pathologies that develop independently from the drug dose (for some drugs), route, or duration of administration. Drug-induced liver damage is part of the underlying causes in the development of acute liver failure.

Diagnosis is made after excluding other causes of liver pathology, and therefore morbidity through DILI is often underestimated. Studies on new serum biomarkers, such as glutamate dehydrogenase, high-mobility group box-1 protein, keratin-18 and microRNA-122 could provide additional information for diagnostic and prognostic use and would provide important insights into the mechanism of hepatic lesion pathogenesis induced by drugs. Approximately 1000 pharmaceutical preparations are involved in hepatic drug lesions. At present, there is increasing interest in the development of “personalized medicine” in which a particular drug is provided to a particular patient based on its efficacy provided by the patient’s genomic data and / or the expression of specific tissue genes. Hepatocytes express keratin polypeptides 8 and 18 (K8/K18), while the cholangiocytes express K8 / K18 and keratin 7 and 19 (K7/K19). A recent study demonstrates that microARN-122 and keratin-18 are more sensitive and specific biomarkers for DILI compared to standard protein biomarkers currently used.

Key-words: biomarker, drug-induced liver injury, ALT, miRNA-122, keratin-18, APAP.

Rezюме. Кератин-18 и микро-РНК - маркеры лекарственного повреждения печени

Поражения печени лекарственными препаратами представляют собой патологию, которая развивается независимо от дозы (для некоторых препаратов), пути или продолжительности введения препарата. Лекарственные поражения печени являются основной причиной острой печеночной недостаточности. Диагноз подтверждается после исключения других причин патологии печени, поэтому заболеваемость данной патологией часто оказывается неучтённой. Изучение новых биомаркеров, таких как глутамат дегидрогеназа, box-1 белок из группы с высокой подвижностью, кератин-18 и микро-РНК-122, может предоставить дополнительную информацию для постановки диагноза и определения прогноза, а также важную информацию о механизме патогенеза поражения печени вызванных лекарственными препаратами. Около 1000 фармацевтических препаратов могут вызвать поражения печени. В настоящее время возрастает интерес к «персонализированной медицине», в которой конкретный лекарственный препарат предоставляется конкретному пациенту на основании его эффективности и геномных данных пациента и/или экспрессии генов определенных тканей. Отмечается экспрессия кератина-8 и 18 (K8/K18) гепатоцитами, тогда как холангиоциты экспрессируют и K8/K18 и кератин-7 и 19 (K7/K19). Недавнее исследование показывает, что микроРНК-122 и кератин-18 являются более чувствительными и специфическими биомаркерами при поражениях печени лекарственными препаратами по сравнению со стандартными биомаркерами, которые используются в настоящее время.

Ключевые слова: биомаркер, поражения печени лекарственными препаратами, АЛТ, микроРНК-122, кератин-18, ацетоминофен.

Introducere.

Leziunile hepatice induse de medicamente (LHIM) sunt patologii care se dezvoltă independent de doza (pentru unele medicamente), calea sau durata administrării preparatelor medicamentoase. Mai mult, LHIM nu este o singură entitate a bolii, dar mai degrabă un spectru de boli cu manifestări clinice, histologice și de laborator variate [15]. Leziunile hepatice induse de medicamente sunt parte a cauzelor de bază în dezvoltarea insuficienței hepatice acute. S-a constatat o rată a mortalității în jur de 10% la pacienții care au fost examinați în primele 6 luni după înregistrarea patologiei respective [14].

Studiile privind noi biomarkeri serici, cum ar fi glutamat dehidrogenaza, high-mobility group box-1 protein, keratin-18 și microARN-122, ar putea furniza informații suplimentare pentru utilizarea în diagnostic și prognostic și ar oferi perspective importante asupra mecanismelor patogenezei leziunilor hepatice induse de medicamente [7, 15]. Patologia ficatului indusă de medicamente este o provocare pentru specialiști în evaluarea pacienților, nu numai din cauza gravității sale potențiale, dar și din incapacitatea de a stabili un diagnostic definitiv în majoritatea cazurilor [7].

Cu toate acestea, aproximativ 40% din cazurile LHIM nu pot fi apreciate în studiile preclinice, motiv pentru care este necesar aprecierea de noi biomarkeri mai sensibili și cu specificitate mai înaltă [14].

Material și metode.

A fost efectuat un studiu a literaturii de specialitate din baza de date MEDLINE utilizând motorul de căutare PubMed. În procesul de căutare au fost utilizate următoarele cuvinte cheie – „leziuni hepatice induse de medicamente“, „markeri ai leziunilor hepatice“, „micro-ARN“ și „keratin-18“.

Rezultatele obținute.

Leziunile hepatice induse de medicamente (LHIM) sunt cauza principală a insuficienței hepatice acute și reprezintă o problemă importantă în ceea ce privește siguranța medicamentelor și este cea mai frecventă cauză a retragerilor medicamentelor de pe piață [15]. Incidența LHIM este estimată, în funcție de autori diferiți, de la 10 la 19 cazuri la 100.000 de persoane pe an. În acest caz, între anii 1969 și 2012 au fost retrase 76 de tipuri de medicamente din practica clinică, dintre care numai 12 - s-au datorat dezvoltării hepatotoxicității [10].

LHIM reprezintă aproximativ 10% din toate cazurile de hepatită acută și este cea mai frecventă cauză a insuficienței hepatice acute [17]. Leziunile hepatice induse de medicamente reprezintă până la 5% din toate bolile hepatobiliare, aproximativ 10% dintre cazurile de hepatita au origine medicamentoasă [12, 14]. Pacienții cu LHIM au rate ridicate de morbiditate și mortalitate: 53% dintre pacienți necesită spitalizare, 2% necesită transplant de ficat, iar rata mortalității este estimată la 5%. Diagnosticul se face după excluderea altor cauze ale patologieilor hepatice și, prin urmare, morbiditatea prin LHIM este adesea subestimată [1].

Leziunile hepatice induse de medicamente sunt definite ca o leziune sau patologie hepatică cauzată de medicamente, plante medicinale sau alte substanțe toxice. LHIM implică două categorii principale, intrinseci (medicamente care pot provoca leziunile hepatice în doze mari) și idiosincratice (reacție neobișnuită a medicamentelor la persoanele sensibile [7, 17, 10, 16].

Aproximativ 1000 de preparatele farmaceutice sunt implicate în apariția leziunilor hepatice medicamentoase [2, 5]. Conform datelor unui studiu realizat

în SUA (2012), au fost stabilite principalele grupele de medicamente care pot induce diverse leziuni hepatice [2, 7, 9, 17]:

1. preparatele antimicrobiene – 45,5% - anti-TB și antivirale: augmentin, nitrofurantoin, bactrim, ciprofloxacina, levofloxacina, terbinafin;
2. preparatele utilizate în tratamentul afecțiunilor SNC – 15% - antiepileptice, antidepresive, antipsihotice: duloxetin, valproat, phenytoin, lamotrigin;
3. imunomodulatorii și analgezice – 10,5% - interferon- β , diclofenac;
4. suplimentele alimentare – 9%.

Petra Thulin et al., [15] confirmă că alanin aminotransferaza serică (ALT), parametru de rutină, se utilizează pentru detectarea leziunilor hepatice de la introducerea în procesul de monitorizarea clinică mai mult de 50 de ani. ALT este o enzimă intracelulară cu localizare bogată în ficat. Leziunile hepatocelulare provoacă o creștere a ALT în ser, care reflectă eliberarea enzimei din celulele lezate. Nivelurile ridicate ale ALT serice sunt asociate cu semne ale leziunilor hepatice cum ar fi steatoza hepatică, necroza și inflamație. Există mai multe motive pentru care ALT nu este un biomarker ideal pentru leziuni hepatice. Nu este specifică numai pentru ficat, dar și pentru rinichi, inimă, mușchi scheletici și pancreas. De aceea, ALT plasmatică crescută poate fi și consecința leziunilor țesutului muscular sau a infarctului miocardic. De asemenea, inducția enzimatică a genei ALT se manifestă în timpul perturbărilor metabolice, cum ar fi inaniția, diabetul zaharat sau în timpul tratamentului cu medicamente care modifică metabolismul. În plus, ALT nu corelează întotdeauna cu datele histopatologice preclinice, ceea ce duce la probleme în interpretarea datelor clinice, deoarece țesutul hepatic nu este de obicei disponibil. Prin urmare, sunt necesari biomarkeri adiționali pentru evaluarea studiilor preclinice și clinice. Biomarkerii care indică LHIM mai precoce decât ALT, precum și markerii de diagnostic ce identifică răspunsurile la tratament la pacienți ar fi instrumente utile pentru diagnosticul clinic. Astfel, descoperirea și calificarea noilor biomarkeri a LHIM, care dau o perspectivă și permit predicția LHIM, este un obiectiv important pentru diagnosticul și monitorizarea LHIM [2,4,7,10,15].

În prezent crește interesul în dezvoltarea “medicinii personalizate” în care un anumit medicament este oferit pentru un anumit pacient pe baza eficacității sale prevăzute din datele genomice a pacientului și/sau expresia genelor țesuturilor specifice. Exemplele personalizării respective include: genotiparea IL28-B înainte de terapia cu interferon pentru infecția cu virusul hepatitei C (HCV) și utilizarea expresiei CD117

în tumorile stromale gastro-intestinale pentru a alege varianta de chimioterapie. Abordările genomice și transcriptomice pot, de asemenea, să îmbunătățească siguranța pacienților prin evitarea utilizării medicamentelor potențial periculoase la persoanele sensibile. De exemplu, evitarea utilizării de abacavir la indivizii cu HLA-B5701 pozitivi la pacienți cu infecție HIV a redus incidența unei reacții de hipersensibilitate potențial severe de la 15% la aproape 0% [15].

Actualmente, biomarkerii serici care se utilizează mai frecvent pentru detectarea și monitorizarea leziunilor hepatice acute și cronice sunt: alaninaminotransferaza (ALT), aspartataminotransferaza (AST), fosfataza alcalină (FA) și bilirubina totală [6, 7, 15]. Actualmente, se depun eforturi în identificarea de noi biomarkeri cu sensibilitatea și specificitatea înaltă a leziunilor hepatice de origine medicamentoasă [2, 5, 7, 10].

Rezultatele mai multor studii demonstrează că keratinele 8 (K8) și 18 (K18) sunt componente principale ale celulelor epiteliale și ale tumorilor derivate din aceste celule. Modificările structurale ale celulelor în timpul apoptozei sunt mediate de proteaze din familia caspazei-6, -3 și -7 [1, 7, 9, 15, 18]. Ku NO et al., [9] precizează că keratinele, cunoscute anterior sub denumirea de citokeratine, fac parte din subgrupul proteinelor intermediare fibrilare. Hepatocitele exprimă polipeptidele de keratin 8 și 18 (K8/K18), în timp ce colangiocitele exprimă K8/K18 și keratinele 7 și 19 (K7/K19). Funcția principală a keratinelor este protejarea hepatocitelor de apoptoză și necroză, care a fost demonstrată utilizând mai multe modele experimentale genetice la șoareci. Această funcție citoprotectoare a fost elucidată de Church R.J. et al. [2] mai târziu prin identificarea variantelor fiziologice de keratină umană care sunt în concentrații normale, dar devin crescute în timpul leziunilor hepatice acute sau cronice mediate de toxine, infecții virale sau stres metabolic. În timpul apoptozei, caspazele scindează K18 și K19 la locul locației aspartatului (K18/K19: (235) Val-Glu-Val-Asp (↓)), după ce epitopul este expus și recunoscut de anticorpii M30 în sânge și țesuturi. În timpul necrozei, pierderea integrității membranei celulare va duce la eliberarea proteinelor intracelulare, inclusiv a CK18, în compartimentul extracelular. Apoptoza reprezintă o formă activă de moarte celulară care păstrează inițial integritatea membranei plasmactice, dar care este frecvent urmată de „necroza secundară” în care componentele intracelulare sunt eliberate [1, 2, 5, 7].

Krauskopf J. et al. [8] dovedesc că microARN-urile (miARN) se consideră ca biomarker promițător ale țesuturilor afectate. Aceste ARN-uri mici necodificate de aproximativ 22 de nucleotide reglea-

ză expresia genei post-transcripţionale. Este cunoscut faptul că microARN-urile reglează majoritatea transcriptelor care codifică proteinele și, prin urmare, sunt implicate în multe procese biologice. Mai mult, unele tipuri de miARN au fost identificate pentru diferite ţesuturi. După afectarea tisulară miARN-urile sunt eliberate în fluxul sanguin. În sânge, miARN-urile sunt stabile deoarece sunt incorporate (modificate) în microvesicule sau sunt legate cu proteine care le protejează de descompunerea de ribonucleazele. Prima dată, s-a demonstrat că miARN este biomarker promiţător al leziunilor hepatice induse de medicamente, când s-a efectuat un studiu la șoareci care au primit doze toxice de acetaminofen (APAP), ca rezultat a fost determinat creșterea nivelului seric al miARN specifice pentru ficat, în special miARN-122 și miARN-192. Creșterile ale miARN-122 induse de APAP au fost confirmate ulterior în studii pe oameni. Studiul respectiv generează un fundal pentru dezvoltarea unui test non-invaziv de screening pentru diagnosticarea patologiei hepatice, capabil să furnizeze informații relevante clinic privind efectele toxice ale substanțelor chimice și patogeneza bolilor în ficat. Determinarea secvențelor specifice de acizi nucleici a devenit o metodă importantă în cercetări științifice, în diagnosticul și tratamentul diferiților patologii. Domeniul de diagnostic molecular - detectarea secvențelor specifice permite diagnosticul cancerului, bolilor infecțioase și bolilor ereditare - a apărut din aceste tehnologii. În ultimii ani, utilizarea și determinarea în special a secvențelor scurte (<100 de nucleotide) de ARN, s-a dovedit că este utilă și importantă pentru mai buna înțelegere a sistemelor biologice de control.

De exemplu, microARN circulantă (miARN) (~22 nucleotide) reglează expresia genelor și este propusă ca biomarker de diagnostic pentru mai multe tipuri de cancer și alte patologii. Reacția de polimerizare în lanț (PCR) și tehnologiile de secvențiere de generație următoare (NGS) domină în detectarea acizilor nucleici. Aceste metode au unele limite în detectarea acizilor nucleici, în special a lungimilor scurte de ARN. Detectarea secvențelor scurte este o provocare care necesită molecule multiple de legare, de exemplu, primeri de analiză PCR sau de legare de tip sandwich. Determinarea miARN, la om și rozătoare este de aproximativ 22 de nucleotide în lungime, a prezentat provocări analitice atunci când este nevoie de o foarte mare precizie și cuantificare exactă în scopul de diagnostic [13]. Valoarea determinării a miARN pentru diagnostic și prognostic ca biomarker a fost totuși recunoscută în multe publicații științifice. În special, s-a arătat că microARN-122 (miARN-122) este un biomarker mai sensibil și specific pentru leziunile hepatice în comparație cu biomarkerii proteici stan-

dard care se utilizează în prezent. Un studiu recent, care a fost efectuat de un grup mare de cercetători, s-a bazat pe sensibilitatea și specificitatea metodei pentru determinarea miARN-122 [2, 6]. A fost determinată miARN-122 în serul pacienților cu supradozaj de acetaminofen (paracetamol) care au suferit leziunile hepatice semnificative clinic și în serul indivizilor sănătoși. Acetaminofenul este cea mai frecventă cauză a leziunilor hepatice induse de medicamente în lume, dar metodele actuale pentru stratificarea pacienților cu patologia respectivă sunt inadecvate. Recent, totuși, s-a demonstrat că determinarea miARN-122 cu sensibilitate și specificitate înaltă la prima adresare a pacienților permite stratificarea riscului de insuficiența hepatică. Datele obținute în acest studiu sugerează că determinarea miARN-122 poate fi utilizată în stările de urgență și la etapele inițiale de testare a medicamentelor [3, 4, 7, 11, 13].

Un studiul recent cu acetaminofen demonstrează concentrațiile serice ale keratin-18 (biomarkerul M65) și microARN-122 au crescut semnificativ mai precoce decât ALT. Mai mult, creșterea maximă a keratinei-18 și a microARN-122 a depășit creșterea ALT. În studiul efectuat pe un grup de pacienți care au primit tratamentul specific pentru HIV/TB, toți biomarkerii noi analizați au crescut după o săptămână de tratament. Spre deosebire de ALT, biomarkerii noi au rămas nemodificați într-o cohorta umană cu leziuni musculare induse de efortul fizic [15].

Concluzii.

1. Cazurile de leziuni hepatice de origine medicamentoasă reprezintă una dintre problemele sănătății publice.

2. Keratin-18 și microARN-122 sunt biomarkeri potențiali a LHIM superior ALT în ceea ce privește sensibilitatea și specificitatea.

3. Pentru a îmbunătăți diagnosticul și prognosticul leziunilor hepatice de origine medicamentoasă este necesar implementarea biomarkerilor noi cu sensibilitate și specificitate înaltă în practică clinică.

Bibliografia.

1. Caulín C., Salvesen G. *Caspase Cleavage of Keratin 18 and Reorganization of Intermediate Filaments during Epithelial Cell Apoptosis*. Journal of Cell Biology, 1997, 138(6), p. 1379.
2. Church R., Kullak-Ublick G. *Candidate biomarkers for the diagnosis and prognosis of drug-induced liver injury: An international collaborative effort*. Hepatology. 2019, 69(2), p. 760-773.
3. Church R., Watkins P. *The transformation in biomarker detection and management of drug-induced liver injury*. Liver Int. 2017, 37(11), p. 1582-1590.

4. Clarke J.I., Dear J.W. *Recent advances in biomarkers and therapeutic interventions for hepatic drug safety - false dawn or new horizon?* Expert Opin Drug Saf. 2016, 15(5), p. 625-34.
5. Daniel J. Antoine D., Jenkins R. *Molecular forms of HMGB1 and Keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity.* J Hepatol. 2012, 56(5), p. 1070–1079.
6. Dear J., Platt V. *Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury.* Hepatology. 2011, 54(5), p. 1767-76.
7. Fontana R. *Pathogenesis of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury and Clinical Perspectives.* Gastroenterology. 2014, 146(4), p. 914–928.
8. Krauskopf Ju., Kok T. *Serum microRNA signatures as “liquid biopsies” for interrogating hepatotoxic mechanisms and liver pathogenesis in human.* PLoS One. 2017, 12(5), p. 0177928.
9. Ku N.O., Strnad P. *Keratins: Biomarkers and modulators of apoptotic and necrotic cell death in the liver.* Hepatology. 2016, 64(3), p. 966-76.
10. Kullak-Ublick G., Andrade R. *Drug-induced liver injury: recent advances in diagnosis and risk assessment.* Gut. 2017, 66(6), p. 1154–1164.
11. Mercedes Robles-Díaz M., Inmaculada Medina-Caliz I. *Biomarkers in DILI: One More Step Forward.* Front Pharmacol. 2016, 7, p. 267.
12. Munz M., Grummich H. *Severe Drug-Induced Liver Injury as an Adverse Drug Event of Antibiotics: A Case Report and Review of the Literature.* Chemotherapy. 2017, 62, p. 367-373.
13. Rissin D., López-Longarela B. *Polymerase-free measurement of microRNA-122 with single base specificity using single molecule arrays: Detection of drug-induced liver injury.* PLoS One. 2017, 12(7), p. 0179669.
14. Teschke R., Danan G. *Drug-induced liver injury, mortality, and liver transplantation: is it reasonable to use a global introspection causality assessment?* AME Medical Journal, 2017, 2, p. 144.
15. Thulin P., Nordahl G. *Keratin-18 and microRNA-122 complement alanine aminotransferase as novel safety biomarkers for drug-induced liver injury in two human cohorts.* Liver International, 2014, 34(3), p. 367-378.
16. Sarges P., Steinberg J.M. *Drug-Induced Liver Injury: Highlights from a Review of the 2015 Literature.* Drug Saf. 2016, 39(9), p. 801-21.
17. Касимова А.Р., Филиппова А.В. *Генотоксичность новых оральных антикоагулянтов.* Рациональная фармакотерапия в кардиологии, Москва, 2018, 14(4), с. 621-628.
18. <http://www.medicina-interna.ro/articol.php?articol=844&lang=ro>.