

УДК: 616.998+616.36-002+616-022.6-053.36

О.Г. Шадрін¹, Н.Ф. Чернега¹, В.Л. Гур'янова², В.Є. Досенко²
МікроРНК-21-3р і мікроРНК-885-5р як маркери
вірусних гепатитів у дітей раннього віку

¹Інститут ПАГ НАМН України, м. Київ

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАМН України, м. Київ

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA. 2015.1(65):96-101; doi 10.15574/SP.2015.65.96

Мета: вивчення рівнів сироваткових miRNAs у дітей раннього віку з вірусними гепатитами.

Пацієнти і методи. Під спостереженням знаходилися 22 дітей раннього віку з гепатитом — 17 цитомегаловірусної етіології і 5 HBV-етіології. Комплекс досліджень включав аналіз анамнестичних даних, клініко-параклінічних досліджень. Рівні miRNA-21-3р і miRNA-885-5р у сироватці крові дітей з гепатитами і здорових визначали із застосуванням методики TaqMan. Отримані дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR і відображені за допомогою графіків.

Результати. Виявлено, що рівні miRNA-21-3р і miRNA-885-5р у дітей з гепатитами вищі порівняно із здоровими ($p < 0,05$). При CMV-гепатиті miRNA-21-3р становить 2,2728 УО проти 0,6516 УО у здорових; miRNA-885-5р — 1,7244 УО проти 0,1801 УО. При HBV-гепатиті miRNA-21-3р — 38,9124 УО проти 0,6516 УО відповідно; miRNA-885-5р — 1,7244 УО проти 0,1801 УО у здорових. Рівень miRNA-21-3р достовірно вищий у групі дітей з гепатитом HBV-етіології порівняно з дітьми з гепатитом CMV-етіології ($p < 0,05$).

Висновки. Підвищення вмісту miRNA-21-3р при вірусних ураженнях печінки вказує на визначальну роль miRNA-21-3р як регулятора імунної відповіді і може бути використано в якості діагностичного біомаркера. Найвищий рівень miRNA-21-3р у групі дітей з HBV-гепатитами вказує на більш глибоке залучення імунних механізмів, що визначає подальший перебіг патології. Дані досліджень підтверджують необхідність включення гепатопротекторної та імюнокорегуючої терапії при вірусних гепатитах, залежно від ступеня активності запального процесу.

Ключові слова: мікроРНК, цитомегаловірус, вірус гепатиту В, гепатит, діти раннього віку.

Вступ

Ураження печінки у дітей раннього віку складають групу гетерогенних захворювань, обумовлених інфекційними агентами, вродженими порушеннями обміну речовин та аномаліями розвитку гепатобіліарної системи. Домінуючими у структурі є інфекційні ураження, серед яких вагому частку займають вірусні гепатити. На першому році життя вірусні ушкодження здебільшого визначаються групою герпесвірусів [4]. Перебіг герпесвірусних гепатитів у ранньому дитинстві залишається непередбачуваним, численні дослідження вказують на можливість хронічного перебігу патології у даній віковій групі [1]. Віруси гепатитів В (HBV) і С (HCV) серед дітей раннього віку, на відміну від старших, займають меншу частку і, за даними різних досліджень, становлять майже третину патології [2]. Особливостями їх перебігу є малосимптомність клінічних проявів і висока ймовірність формування хронічної форми захворювання. Численні дослідження вказують, що, незважаючи на патогенність гепатотропних вірусів до клітин печінки, ступінь ураження і перебіг вірусних гепатитів вагомо залежать від імунного статусу пацієнта, зокрема відповіді на вірусне навантаження. Саме незрілість імунної системи в ранньому дитинстві обумовлює високу активність і зтяжний перебіг патології.

МікроРНК (miRNAs) є ендогенними, некодуєчими РНК, які модулюють експресію генів на посттранскрипційному рівні. Підраховано, що геном людини може кодувати більше 2000 miRNAs, які контролюють до 60% людського геному [28]. МікроРНК виконують важливу функцію в різних видах діяльності організму, включаючи розвиток інфекційних захворювань. Наукові дослідження показали, що miRNAs можуть виконувати важливі функції у розвитку і диференціюванні імункомпетентних клітин [28]. Регулювання за допомогою miRNAs не має специфічності, припускається його спрямованість на конкретні локуси генів у певних типах клітин, що обумовлює їх функціональну активність у кон-

кретному часі і просторі. Проведені останніми роками дослідження доводять, що зміни рівнів певних miRNAs пов'язані з формуванням і прогресуванням патології печінки. Так, miR-155, miR-181, miR-21, miR-885 та інші пов'язані з патогенезом та прогресуванням хронічних форм HBV і HCV інфекції [15,21,27], miR-21, miR-29 тісно пов'язані з формуванням фіброзу печінки і є частиною ініціації сигналів до експресії трансформуючого фактору росту β (TGF- β) та інших цитокінів у зірчастих клітинах печінки [26]. У зворотному напрямку певні цитокіни, такі як TGF- β , фактор транскрипції ядерного фактору В та інші, які впливають на розвиток запалення і фіброзу, можуть активувати експресію деяких miRNAs (miR-221, miR-222), що сприяють проліферації зірчастих клітин [18,20].

На сьогодні широко вивчається експресія miRNAs при таких патологічних станах печінки, як хронічні гепатити (ХГ), фіброз печінки і гепатоцелюлярна карцинома (ГЦК), та активно вивчаються механізми передачі miRNAs з клітин печінки в кровотік і потенційні функції їх у плазмі. Сироваткові miRNAs можуть бути залучені в міжклітинні комунікації [13,22]. Припускається, що підвищення сироваткових рівнів miRNAs у дітей з ХГВ належить до хост-імунної відповіді і визначає в майбутньому розвиток ускладнень патології [12]. Вивчення циркулюючих miRNAs у сироватці крові відкриває новий клас потенційних маркерів для малоінвазивної діагностики і моніторингу стану пацієнтів із захворюваннями печінки. Так, нещодавні дослідження у дорослих пацієнтів з хронічним гепатитом В (ХГВ) виявили взаємодію miRNAs з HBsAg [6] і кореляцію між рівнями циркулюючого HBsAg і miR-122 [25]. При хронічному гепатиті С (ХГС) miRNAs у сироватці крові корелюють із стадією фіброзу печінки [9] та ступенем запалення [10]. Показано, що рівні miR-21, miR-122, miR-223 у сироватці крові хворих на ХГС достовірно вищі порівняно із здоровими [7], а рівні miR-10A і miR-125b — низькі у пацієнтів при HBV-позитивній ГЦК, на відміну від пацієнтів з ХГВ,

і їх поєднання може чітко диференціювати ці патологічні стани [24].

У регенераторних і фібротичних процесах у печінці доведена регуляторна роль miRNA-21 [11,14,19]. Встановлено, що підвищена експресія miRNA-21 сприяє фіброзу, стимулюючи SMAD-сигнальний каскад TGF- β — ключового медіатора фіброгенезу та експресії молекули матричної металопротеїнази-2 (MMP-2), що провокує деградацію молекул міжклітинного матриксу й інфільтрацію фібробластів [11]. Ряд авторів виявили посилення експресії miRNA-21 у проліферативній фазі печінкової регенерації після часткової гепатоектомії у мишей, а також довели, що дана miRNA, діючи на деякі гени-мішені, сприяє клітинній проліферації гепатоцитів [19]. Дослідження на щурах доводять, що функціональна модуляція miRNA-21 стимулює клітинну проліферацію і життєздатність гепатоцитів, а також зменшує загибель клітин [14]. Показано, що miRNA-21 здатна регулювати HBV-інфекцію на рівні транскрипції або таргетингу клітинних факторів транскрипції, необхідних для експресії генів HBV або безпосередньо прив'язки до HBV транскриптів [16]. Інші дослідження виявили підвищення рівня miRNA-21 у сироватці хворих з неалкогольною жировою хворобою печінки [5].

Потенційним маркером для виявлення патології печінки може бути визначення рівня сироваткової miRNA-885-5p. У фізіологічних умовах встановлено значну її кількість у паренхімі печінки. Рівень miR-885 значно підвищений у сироватці крові дорослих хворих з ХГВ, цирозом печінки, ГЦК і може служити скринінгом для виявлення хворих з патологією печінки [12]. Підтвердженням є підвищення рівня miRNA-885-5p у дітей та дорослих з ХГВ порівняно із здоровими [23]. Зміни рівня miRNA-885-5p у сироватці крові пацієнтів з печінковою патологією відображають метаболічний дисбаланс в органі, хоча механізм її дії остаточно не вивчений [23].

Таким чином, численні дослідження показують, що miRNAs беруть участь у модуляції експресії генів і реплікації гепатотропних вірусів та грають вирішальну роль у вірусних взаємодіях. Доведено, що вірусна інфекція призводить до змін експресії miRNAs профілю в печінці та рівня циркулюючих miRNAs у сироватці крові. Ми припускаємо, що вірусні ураження печінки у дітей можуть мати специфічний циркулюючий профіль miRNAs, який може бути використаний в якості діагностичного біомаркера, можливо, як характеристика ступеня ушкодження тканини печінки.

Метою роботи було визначення рівнів miRNA-21-3p і miRNA-885-5p у сироватці крові дітей раннього віку з вірусними гепатитами.

Матеріал і методи дослідження

Під нашим спостереженням знаходилися 22 дітей раннього віку з гепатитом, серед них 17 дітей — цитомегаловірусної етіології, 5 — HBV-етіології. Комплекс досліджень включав аналіз анамнестичних даних, клінічний огляд, загальний аналіз крові, дані біохімічного дослідження крові — рівень некон'югованої і кон'югованої фракцій білірубіну, трансаміназ, лужної фосфатази, ультразвукове дослідження органів черевної порожнини. З метою уточнення етіології захворювання визначалися маркери TORCH-інфекції, HBV і HCV, за показаннями проводилися реакція Вассермана, дослідження на вірус імунодефіциту людини. Вірусні гепатити діагностували за наявності маркерів: HBV (HBsAg, HBeAg, анти-HBc IgM, ДНК HBV), HCV (анти-HCV IgM, РНК HCV), специфіч-

них антитіл до вірусів CMV, EBV, HSV 2, 6, 7 класів М і G, ДНК CMV і ДНК EBV у крові і слині. Виключення вроджених порушень обміну з ураженням печінки проводилося з використанням спеціальних біохімічних методик і консультації генетика. Ступінь активності запального процесу визначалася за рівнем трансаміназ (АЛТ і АСТ): 1,5–2 норми — мінімальна, 3–5 норм — слабо виражена, 5–9 норм — помірна, 10 норм і більше — висока [3].

Дослідження проводились відповідно до вимог медичної етики, за умови письмової інформованої згоди батьків обстежених дітей.

Рівні miRNA-21-3p і miRNA-885-5p у сироватці крові дітей з гепатитами і здорових визначали із застосуванням методики TaqMan. Тотальну РНК виділяли з крові хворих з використанням miRvana PARIS (Ambion, США) за протоколом виробника. Концентрацію РНК вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies, США). miRNAs визначали методом зворотної транскрипції і полімеразно-лацюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США), специфічних праймерів для кожної miRNAs і 10 нг тотальної РНК. Кількісну ПЛР у реальному часі проводи-

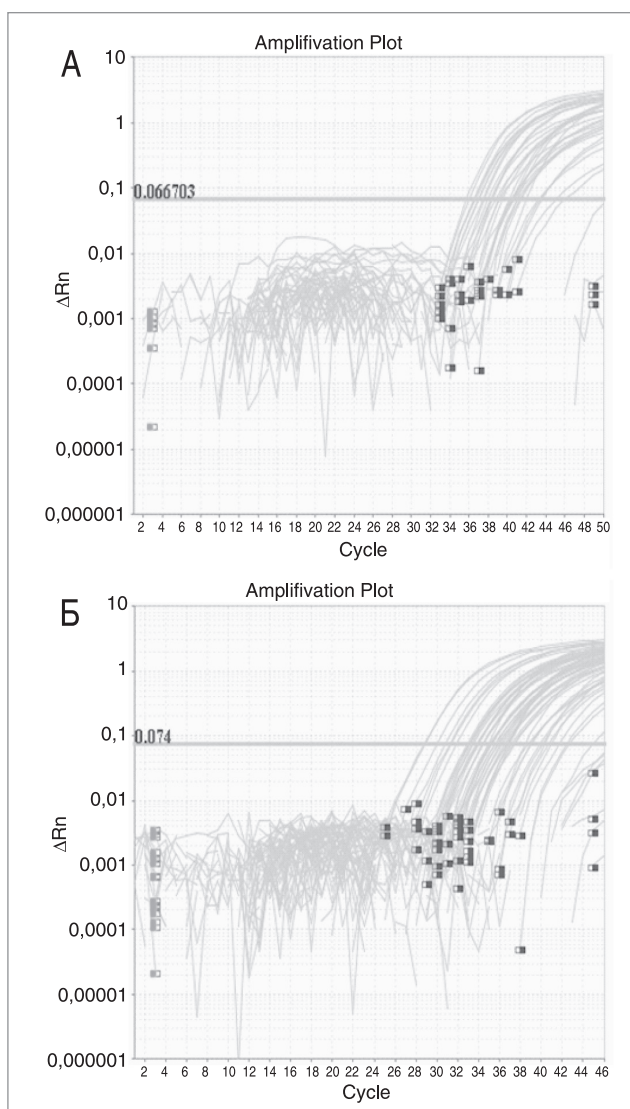


Рис.1. Графік приросту інтенсивності флюоресценції в ході ПЛР у реальному часі (А — miRNA-21-3p, Б — miRNA-885-5p)

Таблиця 1

Показники перебігу гепатиту в обстежених дітей

Показник	Група дітей	
	CMV	HBV
Стать (хлопчики/дівчата)	9/10	2/3
Вік (міс)	11,4±7,2	20,4±14,6
Загальний білірубін, мг/дл	150,3±20,6	185,2±73,5
Прямий білірубін, мг/дл	56,9±13,0	85,3±32,5
АЛТ, од/л	176,5±72	204,2±49,1

ли з використанням TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, США): U6 snRNA (як ендogenous контроль), hsa-miR-21-3p, has-885-5p. Температурний режим був таким: ініціальна денатурація 95°C – 10 хв.; 45 циклів 95°C – 15 с і 60°C – 60 секунд. Рівень miRNA розраховували за формулою (2^{ΔCt}*100), нормалізували до U6 snRNA і представляли в умовних одиницях (УО). Ампліфікацію проводили на 7500 Fast Real-time PCR (Applied Biosystems, США). Отримані дані (рис. 1 А, Б) були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real-time PCR і відображені за допомогою графіків.

Отримані цифрові дані опрацьовано за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Office 2007 і Statistica 6 (StatSoft Inc., США) з використанням описового, категоріального і порівняльного аналізу. Критичне значення рівня значущості приймалося за 5%. Нормальність розподілу даних була оцінена за допомогою критерія Шапіто-Уїлка: група дітей з CMV-гепатитом – в разі miRNA-21-3p-W=0,6444 (p=0,0238), miRNA-885-5p W=0,7682 (p=0,0334), група дітей з HBV-гепатитом – в разі miRNA-21-3p-W=0,6444 (p=0,0913), miRNA-885-5p-W=0,5456 (p=0,0109); при p<0,05 розподіл ознаки виявлявся відмінним від нормального. Враховуючи, що W-статистика була значущою (p<0,05), то вірогідність відмінностей у зразках визначали непараметричним методом (розрахунок U-критерію Манна-Вітні). Рівень досліджуваних miRNAs представлений у вигляді медіани та перцентилей (25, 75). Кореляційний зв'язок розраховувався за ранговим коефіцієнтом кореляції Спірмена.

Результати дослідження та їх обговорення

У 70,5% дітей CMV-гепатит проявився у віці до 6 місяців і визначався як вроджений, у 29,5% дітей CMV-гепатит мав набутий характер. Серед дітей з вродженим CMV-гепатитом 47,1% мали хронічний перебіг захворювання. Середній вік дітей з CMV-гепатитом склав 11,4±7,2 місяця.

Клінічні прояви CMV-гепатиту, як вродженого, так і набутого, включали жовтяницю (76,5%), гепатоспленомегалію різного ступеня (82,3%), інтоксикаційний синдром (47,1%), диспептичні прояви (41,2%), епізоди ахолічного стільця, транзиторну неврологічну симптоматику. Рівні АЛТ і АСТ були вищими двох норм у 35,3% випадків, у більшості випадків (58,9%) активність була слабо виражена, у 5,8% дітей активність була помірною.

Серед дітей з HBV 4 дітей були HBsAg-позитивними, 1 – HBsAg-негативною. Перинатальне інфікування мали 2 (40%) дітей, одна дитина інфікована парентеральним шляхом, у двох дітей шлях інфікування не встановлено. У більшості (60%) обстежених дітей з HBV клінічна картина була малосимптомною, що створювало певні труднощі для діагностики ураження печінки. Клінічна картина малосимптомного перебігу характеризувалась диспептичними проявами, нестійкими, з домішками слизу, випорожненнями, без жовтяниці. Активний гострий перебіг у 40% дітей характеризувався виразною

жовтяницею, збільшенням розмірів і змінами ехогенності печінки і селезінки.

Активність запального процесу у обстежених дітей оцінювалась за рівнем трансаміназ (табл. 1): середній рівень АЛТ у дітей з CMV-гепатитом становив 176,5±72 од/л. У 3 (60%) дітей з HBV превалювали малоактивні форми захворювання (мінімальна і низька активність), високої активності не було. Статевих відмінностей між групами хворих не виявлено.

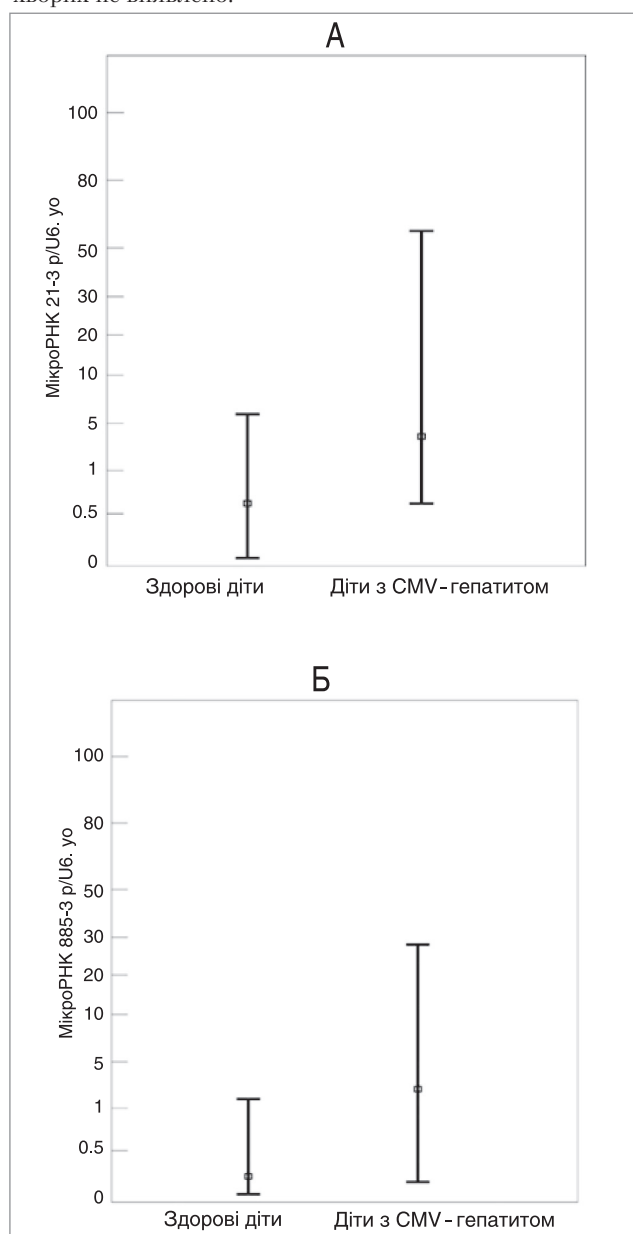


Рис. 2. Медіана і дисперсія рівня miRNAs у сироватці крові дітей з гепатитом CMV етіології і контрольної групи (УО): А — miRNA-21-3p, Б — miRNA-885-5p

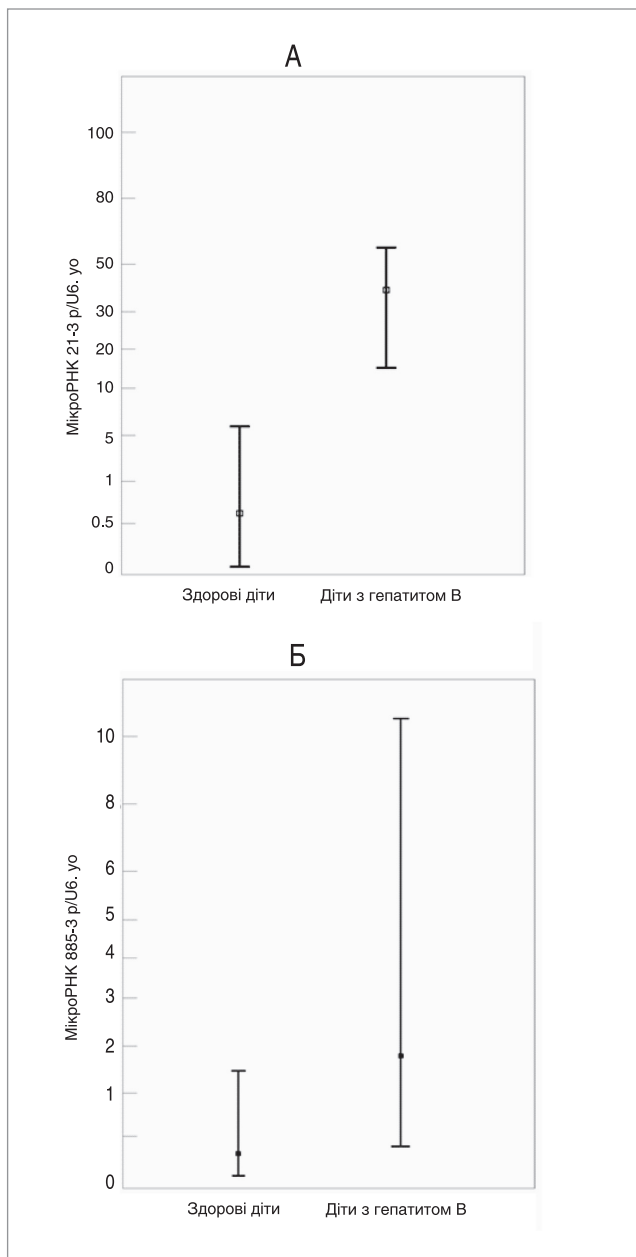


Рис. 3. Медіана і дисперсія рівня міРНАs у сироватці крові дітей з гепатитом HBV-етіології і контрольної групи (УО): А — miRNA-21-3p, Б — miRNA-885-5p

Статистичний аналіз отриманих результатів рівнів miRNA-21-3p і miRNA-885-5p у дітей з ураженням печінки CMV-етіології мав розбіжності з дітьми контрольної групи: miRNA-21-3p — 2,2728 (від 0,0579 до 58,8070) УО проти 0,6516 (від 0,0133 до 5,3708) УО відповідно (рис. 2А); miRNA-885-5p — 1,7244 (від 0,1297 до 28,5153) УО проти 0,1801 (від 0,0122 до 1,5653) УО у дітей контрольної групи (рис. 2Б). Отри-

мані емпіричні значення U_{emp} були меншими за критичне значення критерію U_{emp} для порівнюваних даних, що визначає наявність достовірних відмінностей між рівнями miRNA-21-3p і miRNA-885-5p у проаналізованих вибірках ($p < 0,05$).

У дітей групи HBV-гепатиту виявлено високий рівень miRNA-21-3p — 38,9124 (від 14,9408 до 58,8070) УО проти 0,6516 (від 0,0133 до 5,3708) УО в групі здорових дітей (рис. 3А). Отримане емпіричне значення U_{emp} було меншим за критичне значення критерію U_{emp} для порівнюваних груп, що визначає наявність достовірної відмінності між рівнями miRNA-21-3p. Рівень miRNA-885-5p не мав значущих відмінностей від показників у дітей контрольної групи — 1,7244 (від 0,2458 до 10,5819) УО проти 0,1801 (від 0,0122 до 1,5653) УО (рис. 3Б).

Для оцінки взаємозв'язку між рівнями miRNA-21-3p і показниками активності запального процесу, зокрема рівнем АЛТ, застосовувався метод кореляційних структур Спірмена (табл. 2).

Аналіз кореляційних зв'язків визначив статистично значущим коефіцієнт рангової кореляції між рівнем АЛТ та експресією miRNA-885-5p у дітей з CMV-гепатитом, ($0,05 > p > 0,01$). Рівень експресії miRNA-885-5p у дітей з показниками АЛТ до 150 од/л склав 0,2458 (0,1297; 0,9219) УО, а у дітей з рівнем АЛТ 151 од/л і вище — 2,1926 (0,9219; 16,1750) УО відповідно ($p < 0,05$). На тлі статистично значущої кореляції, яка була розрахована у всієї групи дітей з CMV-гепатитом, можна зробити висновок, що рівень miRNA-885-5p має пряму позитивну залежність від рівня підвищення АЛТ. У дітей з HBV-гепатитом кореляційний зв'язок був відсутнім, що, можливо, обумовлено малою кількістю обстежених дітей.

Висновки

Метою даної роботи було вивчення рівнів сироваткових miRNA-21-3p і miRNA-885-5p у дітей раннього віку з вірусними гепатитами. Дане дослідження є першим, яке характеризує рівні сироваткових miRNA-21-3p і miRNA-885-5p у дітей з гепатитами вищій порівняно із здоровими ($p < 0,05$). При CMV-гепатиті miRNA-21-3p становить 2,2728 УО проти 0,6516 УО у здорових; miRNA-885-5p — 1,7244 УО проти 0,1801 УО. При HBV-гепатиті miRNA-21-3p становить 38,9124 УО проти 0,6516 УО відповідно; miRNA-885-5p — 1,7244 УО проти 0,1801 УО у здорових. Рівень miRNA-21-3p є достовірно вищим у групі дітей з гепатитом HBV-етіології порівняно з дітьми з гепатитом CMV-етіології ($p < 0,05$).

Дослідженою функцією miRNA-21-3p є стимуляція клітинної проліферації і життєдіяльності гепатоцитів, а за даними деяких досліджень [12], гепатотропні віруси викликають вивільнення miRNA-21-3p до оптимальних умов реплікації. Підвищення вмісту miRNA-21-3p при вірусних ураженнях печінки вказує на визначальну роль miRNA-21-3p як регулятора імунної відповіді і може бути використано в якості діагностичного біомаркера. Найвищий рівень miRNA-21-3p в групі дітей з HBV-гепатитами

Таблиця 2

Кореляційний зв'язок між рівнями miRNA-21-3p, miRNA-885-5p і АЛТ у сироватці крові дітей з гепатитами

Корелююча ознака	CMV-гепатит				HBV-гепатит			
	miRNA-21-3p		miRNA-885-5p		miRNA-21-3p		miRNA-885-5p	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p
АЛТ	0,137	0,39-0,51	0,477*	0,43-0,54	0,34	0,47-0,91	0,15	0,52-0,73

Примітки: r_s^* — статистично значимий коефіцієнт рангової кореляції; p — критичне значення для груп дітей, при $0,05 > p > 0,01$

вказує на більш глибоке залучення імунних механізмів, що визначає подальший перебіг патології.

Експресія miRNA-885-5p, згідно з дослідженнями, визначається профіброгенною відповіддю організму щодо паренхіми печінки. Достовірне підвищення рівня miRNA-885-5p при вірусних ураженнях печінки і залежність її рівня від ступеня активності запального процесу у дітей раннього віку, на наш погляд, вказує, що процеси регенерації печінкової тканини відбуваються в прямій залежності від ступеня мембранодеструкції гепатоцитів.

Ступінь вірусного ураження печінки у дітей є клінічною проблемою. Маркером ураження, який широко використовується у загальній практиці, є рівень АЛТ. Однак діагностика ступеня вірус-індукованого ураження печінки за рівнем АЛТ, особливо на межі гранично нормального рівня, на сьогодні піддається сумніву [8,17]. Поодинокі дослідження на тваринах визначили, що плазмові рівні деяких miRNA є більш чутливими маркерами ураження печінки, ніж АЛТ [8]. Значуща кореляційна залежність між рівнями miRNA-885-5p і АЛТ може вказувати, що miRNA-885-5p є більш чутли-

вим маркером низького ступеня запального процесу в печінці, ніж рівень АЛТ. Обмеженням даного припущення в нашій роботі є відсутність контролю оцінки ураження печінки іншими способами, зокрема біопсією. Однак подальші дослідження у перспективі можуть визначити прогностичну чутливість miRNA-885-5p в якості маркера ураження печінки у дітей раннього віку при вірусних гепатитах, що може мати позитивні клінічні наслідки.

Таким чином, виявлені зміни вмісту miRNA-21-3p і miRNA-885-5p у дітей з вірусним ураженням печінки вказують на можливість використання miRNA-21-3p як діагностичного маркера ураження печінки при інфекції, а miRNA-885-5p може служити показником ступеня ураження. Розширене вивчення профілю miRNAs при гепатитах може забезпечити більш глибоке розуміння патогенетичних механізмів перебігу вірусних гепатитів у дітей раннього віку. Дані досліджень підтверджують необхідність включення гепатопротекторної та імунокорегуючої терапії при вірусних гепатитах залежно від ступеня активності запального процесу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Герпесвирусные гепатиты у детей / В. Ф. Учайкин, А. В. Смирнов, С. Б. Чуелов, А. Л. Россина // Педиатрия. — 2012. — Т. 91, № 3. — С. 136—142.
2. Крамарев С. А. Вирусные гепатиты у детей [Электронный ресурс] / С. А. Крамарев // Здоровье Украины. — 2013. — Режим доступа : <http://www.health-ua.org/archives/immuno/4.html>. — Название с экрана.
3. Современные критерии диагностики и подходы к лечению хронического гепатита у детей : метод. реком. — К., 2010. — 41 с.
4. Хаертынов Х. С. Клинико-эпидемиологические особенности неонатальных гепатитов / Х. С. Хаертынов, В. А. Анохин, Э. Р. Низамова // Казанский мед. журн. — 2012. — Т. XCII, № 6. — С. 921—926.
5. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver / Yamada H. [et al.] // Clin. Chim. Acta. — 2013. — Vol. 424. — P. 99—103.
6. Circulating hepatitis B surface antigen particles carry hepatocellular microRNAs [Electronic resource] / Novellino L., Rossi R. L., Bonino F. [et al.] // PLOS ONE. — 2012. — Vol. 7. — e31952.10.1371/journal.pone.0031952PubMed: 22470417
7. Circulating MicroRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis / Jian Xu¹, Chen Wu¹, Xu Che [et al.] // Molecular Carcinogenesis. — Vol. 50 (2). — P. 136—142.
8. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury / Wang K., Zhang S., Marzolf B. [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA 2009. — Vol. 106. — P. 4402-4407.10.1073/pnas.0813371106
9. Circulation RNA Molecules as Biomarkers in Liver Diseases / Liviu S. Enache, Elena L. Enache, Christophe Ramiere [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2014. — Vol. 15 (10). — P. 17644—17666.
10. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease [Electronic resource] / Murakami Y., Toyoda H., Tanahashi T. [et al.] // PLoS One. — 2012. — Vol. 7 (10). — e48366. doi: 10.1371/journal.pone.0048366. Epub 2012 Oct 31.
11. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans / Marquez R. T., Bandyopadhyay S., Wendlandt E. B. [et al.] // Lab. Invest. — 2010. — Vol. 90. — P. 1727—1736.
12. Differential Plasma MicroRNA Profiles in HBeAg Positive and HBeAg Negative Children with Chronic Hepatitis B / Winther T. N., Bang-Berthelsen C. H., Heiberg I. L. [et al.] // PLoS One. — 2013. — Vol. 8 (3). — e58236.
13. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [Electronic resource] / Valadi H., Ekstrom K., Bossios A. [et al.] // Nat Cell Tobapbiol. — 2007. — Vol. 9. — P. 654—659.10.1038/ncb1596PubMed: 17486113
14. Identification of microRNAs during rat liver regeneration after partial hepatectomy and modulation by ursodeoxycholic acid / Castro R. E., Ferreira D. M., Zhang X. [et al.] // Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol. — 2010. — Vol. 299 (4). — P. 887—897.
15. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism / Pedersen I. M., Cheng G., Wieland S. [et al.] // Nature. — 2007. — Vol. 449. — P. 919—922.
16. Liu W. H. Role of microRNAs in hepatitis B virus replication and pathogenesis / W. H. Liu, S. H. Yeh, P. J. Chen // Biochim Biophys Acta. — 2011. — Vol. 1809. — P. 678—685.
17. Marcellin P. Therapy of hepatitis C: patients with normal aminotransferase levels / P. Marcellin, S. Levy, S. Erlinger // Hepatology. — 1997. — Vol. 26. — P. 133—136. S.10.1002/hep.510260723
18. MicroRNA-21 activates hepatic stellate cells via PTEN/Akt signaling [Electronic resource] / Wei J., Feng L., Li Z. [et al.] // Biomed Pharmacother. — 2013. — Vol. 67. — 387—392 doi: 10.1016/j.biopha.2013.03.014. PubMed: 23643356
19. MicroRNA-21 is upregulated during the proliferative phase of liver regeneration, targets Pellino-1, and inhibits NF-kappaB signaling / Marquez R. T., Wendlandt E., Galle C. S. [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. — 2010. — Vol. 298. — P. 535—541.
20. MiR-21 Simultaneously Regulates ERK1 Signaling in HSC Activation and Hepatocyte EMT in Hepatic Fibrosis [Electronic resource] / Juan Zhao, Nan Tang, Kaiming Wu [et al.] // PLoS One. — 2014. — Vol. 9 (10). — e108005. Published online 2014 October 10. doi: 10.1371/journal.pone.0108005
21. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases / Zhang Y., Jia Y., Zheng R. [et al.] // Clin. Chem. — 2010. — Vol. 56. — P. 1830—1838.
22. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells [Electronic resource] / Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y. [et al.] // J. Tobapbiol Chem. — 2010. — Vol. 285. — P. 17442—17452.10.1074/jbc.M110.107821 PubMed: 20353945 [PMC free article]
23. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies [Electronic resource] /

- Junhao Gui, Yaping Tian, Xinyu Wen [et al.] // Clin. Sci (Lond). — 2011. — Vol. 120 (Pt 5). — P. 183—193. Prepublished online 2010 September 3. Published online 2010 November 19. doi: 10.1042/CS20100297
24. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers of HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma [Electronic resource] / Li L.-M., Hu Z.-B., Zhou Z.-X. [et al.] // Cancer Res. — 2010. — Vol. 70 (23). — P. 9798—807. [DOI: 10.1158/0008—5472.CAN-10-1001. PMID:21098710].
25. Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection / Waidmann O., Bihrer V., Pleli T. [et al.] // J. Viral. Hepat. — 2012. — Vol. 19 (2). — P. 58—65.
26. Serum MicroRNA-21 as Marker for Necroinflammation in Hepatitis C Patients with and without Hepatocellular Carcinoma [Electronic resource] / Verena Bihrer, Oliver Waidmann, Mireen Friedrich-Rust [et al.] // PLoS One. — 2011. — Vol. 6 (10). — e26971. Published online 2011 October 31. doi: 10.1371/journal.pone.0026971
27. Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in hepatitis C virus-infected human hepatoma cells / X. Liu, T. Wang, T. Wakita, W. Yang // Virology. — 2010. — Vol. 398. — P. 57—67.
28. Zhang B. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants / B. Zhang, Q. Wang, X. Pan // J. Cell Physiol. — 2007. — Vol. 210. — P. 279—289.

МикроРНК-21–3р и микроРНК-885–5р как маркеры вирусных гепатитов у детей раннего возраста

А.Г. Шадрин¹, Н.Ф. Чернега¹, В.Л. Гурьянова², В.Е. Досенко²

¹Институт ПАГ НАМН Украины, г. Киев

²Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАМН Украины, г. Киев

Цель: изучение уровней сывороточных miRNAs у детей раннего возраста с вирусными гепатитами.

Пациенты и методы. Под наблюдением находились 22 детей раннего возраста с гепатитом — 17 цитомегаловирусной этиологии и 5 HBV-этиологии. Комплекс исследований включал анализ анамнестических данных, клинико-параклинических исследований. Уровни miRNA-21–3р и miRNA-885–5р в сыворотке крови детей с гепатитами и здоровых определяли с применением методики TaqMan. Полученные данные были проанализированы с помощью программного обеспечения 7500 Fast Real-time PCR и отражены с помощью графиков.

Результаты. Выявлено, что уровни miRNA-21–3р и miRNA-885–5р у детей с гепатитами выше по сравнению со здоровыми ($p < 0,05$). При CMV-гепатите miRNA-21–3р составляет 2,2728 UE против 0,6516 UE у здоровых; miRNA-885–5р — 1,7244 UE против 0,1801 UE. При HBV-гепатите miRNA-21–3р — 38,9124 UE против 0,6516 UE соответственно; miRNA-885–5р — 1,7244 UE против 0,1801 UE у здоровых. Уровень miRNA-21–3р достоверно выше в группе детей с гепатитами HBV-этиологии по сравнению с детьми с гепатитом CMV-этиологии ($p < 0,05$).

Выводы. Повышение содержания miRNA-21–3р при вирусных поражениях печени указывает на определяющую роль miRNA-21–3р как регулятора иммунного ответа и может быть использовано в качестве диагностического биомаркера. Самый высокий уровень miRNA-21–3р в группе детей с HBV-гепатитами указывает на более глубокое вовлечение иммунных механизмов, что определяет дальнейший ход патологии. Данные исследований подтверждают необходимость включения гепатопротекторной и иммунокорректирующей терапии при вирусных гепатитах, в зависимости от степени активности воспалительного процесса.

Ключевые слова: микроРНК, цитомегаловирус, вирус гепатита В, гепатит, дети раннего возраста.

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA. 2015.1(65):96-101; doi 10.15574/SP.2015.65.96

MicroRNA-21–3p and microRNA-885–5p as markers of viral hepatitis in infants

A.G. Shadrin¹, N.F. Chernega¹, V.L. Guryanova², V.E. Dosenko²

¹ Institute of PAG NAMS of Ukraine, Kiev

² A.A. Bogomolets Institute of Physiology NAMS of Ukraine, Kiev

Objective: To study the levels of serum miRNAs in infants with viral hepatitis.

Patients and methods. A total of 22 infants with hepatitis — 17 of cytomegalovirus etiology and 5 HBV-etiology were under observation. Complex examinations included an analysis of anamnestic data and clinical and paraclinical investigations. Levels of miRNA-21–3p and miRNA-885–5p in the blood serum of children with hepatitis and healthy children were determined by the use of TaqMan method. The obtained data were analyzed with the use of «7500 Fast Real-time PCR» software and demonstrated in the graphic form.

Results. It is revealed that the levels of miRNA-21–3p and miRNA-885–5p in children with hepatitis are higher in comparison with healthy ($p < 0.05$). At CMV-hepatitis miRNA-21–3p is 2.2728 CU against 0.6516 CU in healthy; miRNA-885–5p — 1.7244 CU against 0.1801 CU. At HBV, hepatitis-miRNA-21–3p — 38.9124 CU against 0.6516 CU, respectively; miRNA-885–5p — 1.7244 CU against 0.1801 against CU in healthy. The level of miRNA-21–3p significantly higher in the group of children with hepatitis of HBV-etiology in comparison with children with hepatitis of CMV-etiology ($p < 0.05$).

Conclusions. The increase of the content of miRNA-21–3p during the viral liver lesions denote the decisive role of miRNA-21–3p as a regulator of the immune response and can be used as a diagnostic biomarker. The highest level of miRNA-21–3p in children with HBV-hepatitis pointed at a deeper involvement of the immune mechanisms that determine the further course of the disease. These studies confirm the need for inclusion of hepatoprotective and immunocorrective therapy during the viral hepatitis, according to the degree of inflammatory activity.

Key words: microRNA, cytomegalovirus, hepatitis B virus, hepatitis, infants

Сведения об авторах:

Шадрин Олег Геннадиевич — проф., д. мед. н., зав. отделения проблем питания и соматических заболеваний детей раннего возраста ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины». Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8; тел. (044) 483-81-17.

Чернега Наталья Федоровна — н.с. отделения проблем питания и соматических заболеваний детей раннего возраста ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии НАМН Украины». Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8; тел. (044) 483-81-17.

Гурьянова Вероника Леонидовна — аспирант каф. патофизиологии Института физиологии им. А.А. Богомольца НАМН Украины. Адрес: г. Киев, ул. Богомольца, 4; тел. (044) 256-24-81.

Досенко Виктор Евгеньевич — д. мед. н., проф. каф. патофизиологии Института физиологии им. А.А. Богомольца НАМН Украины. Адрес: г. Киев, ул. Богомольца, 4; тел. (044) 256-24-81; e-mail: dosenko@biph.kiev.ua.

Статья поступила в редакцию 16.01.2015 г.