

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК-122 ПРИ HDV ИНФЕКЦИИ

Ходжаева Малика Эркиновна, Хикматуллаева Азиза Сайдуллаевна, Ибадуллаева Наргиз Сапиевна, Жолдасова Елизавета Арустамовна, Абдукадырова Муаззам Алиевна
Научно-исследовательский институт Вирусологии Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний, Республика Узбекистан, г. Ташкент

HDV ИНФЕКЦИЯСИДА МИКРОРНК-122 ЭКСПРЕССИЯ ДАРАЖАСИНИ ЎРГАНИШ

Ходжаева Малика Эркиновна, Хикматуллаева Азиза Сайдуллаевна, Ибадуллаева Наргиз Сапиевна, Жолдасова Елизавета Арустамовна, Абдукадырова Муаззам Алиевна
Республика ихтисослаштирилган эпидемиология, микробиология, юкумли ва паразитар касалликлар илмий-амалий тиббиёт марказининг Вирусология илмий-тадқиқот институти,
Ўзбекистон Республикаси, Тошкент ш.

STUDY OF THE LEVEL OF EXPRESSION OF MICRORNA-122 IN HDV INFECTION

Khodjaeva Malika Erkinovna, Khikmatullaeva Aziza Saydullaevna, Ibadullaeva Nargiz Sapievna, Joldasova Elizaveta Arustanovna, Abdukadirova Muazzam Alievna
The Research Institute of Virology of the Republican specialized scientific practical medical center of epidemiology, microbiology, infectious and parasitic diseases, Republic of Uzbekistan, Tashkent

e-mail: dr.aziza75@gmail.com

Резюме. Мақсад: микроРНК-122 экспрессия даражаси ва қондаги HDV РНК кўрсаткичлари ўртасидаги боғлиқлик мавжудлигини аниқлаш. Касалликнинг белгиларисиз кечиши кузатилган 72 нафар HBsAg мусбат бўлган беморлар HDV инфекцияси мавжудлигига текширилди. Текширилаётган беморларнинг қон плазмаси намуналари микроРНК-122 экспрессия даражасини ўрганиш учун материал бўлиб хизмат қилди. HBV, HCV, HDV ни аниқлаш реал вақт режимидаги ПЗР усулида амалга оширилди. Натижалар: микроРНК-122 экспрессияси HBV вирусни юқори бўлган ва HDV РНКси аниқланмайдиган даражада бўлган беморлар гуруҳида иккала вирус аниқланган беморларга нисбатан сезиларли даражада юқори бўлиши аниқланди. Хулоса: микроРНК-122 нинг юқори даражалари билвосита HDV репликациясига таъсир қилиши мумкин. HDV репликациясига микроРНК-122 нинг ўзига хос таъсирини ўрганиш истиқболли йўналиш бўлиб, келгуси изланишларни талаб қилади.

Калим сўзлар: сурункали вирусли гепатит D, микроРНК-122, HBsAg, anti-HDV, HDV РНК.

Abstract. Objective: to reveal the presence of a relationship between the level of miRNA-122 expression and HDV RNA levels in the blood. We examined 72 HBsAg positive patients with asymptomatic course of the disease for the presence of HDV infection. The blood plasma samples of the examined patients served as the material for studying the expression level of miRNA-122. The determination of HBV, HCV, HDV was carried out by real-time PCR. Results: miRNA-122 expression was significantly higher in the group of patients with a high HBV viral load and an undetectable level of HDV RNA compared with patients in whom both viruses were detected. Conclusions. Elevated levels of miRNA-122 may indirectly affect HDV replication. The study of the specific effect of miRNA-122 on HDV replication is a promising direction and requires further study.

Key words: chronic viral hepatitis D, miRNA-122, HBsAg, anti-HDV, HDV RNA.

Актуальность. Вирусные гепатиты В и D являются одной из основных причин хронического гепатита, фиброза и цирроза печени, а также ГЦК [2]. Из всех вирусных гепатитов доля пациентов с HDV инфекцией, имеющей более агрессивный характер, варьирует от менее чем 1% до более 10% в разных популяциях. По всему миру вирусом гепатита D могут быть заражены около 20 млн. человек [6]. Хронический вирусный гепатит D характеризуется преимущественно прогрессирующим течением со значительно более быстрым развитием цирроза печени (у 15% пациентов в течение 1-2 лет, у 70% пациентов – в течение 5–10 лет), высокой смертностью от печеночной недостаточности (5- и 10-летняя выживаемость – 49% и 40%, соответственно), значительно более высоким по сравнению с ХВГВ риском развития гепатоцеллюлярной карциномы (в 3-6 раз), трансплантации печени (в 2 раза), смерти (в 2 раза). Пациенты чаще не дожи-

вают до развития ГЦК и погибают от осложнений ЦП [4].

На сегодняшний день, согласно базе данных MiRBase, количество обнаруженных микроРНК насчитывает 38589 и это цифра ежегодно растет (<http://www.mirbase.org>, Release 22: March 2018). Ввиду многообразия микроРНК, изучение и поиск конкретного спектра микроРНК имеющих значение при хронических гепатитах В, С и D является актуальным направлением современной гепатологии.

Цель исследования. Выявить наличие связи между уровнем экспрессии микроРНК-122 и показателями HDV РНК в крови.

Материал и методы. Нами проведено обследование 72 HBsAg положительных пациентов с бессимптомным течением заболевания на наличие HDV инфекции. Возраст пациентов колебался от 19 до 53 лет (средний возраст 51.5±8.4 лет). Материалом для исследования уровня экс-

прессии микроРНК-122 служили образцы плазмы крови обследованных больных. Плазма крови отбиралась согласно инструкции к набору miRNeasy Serum/Plasma (QIAGEN, Германия).

Серологические методы: Определение HBsAg, anti-HCV, anti-HDV проводилось методом ИФА с использованием коммерческих наборов реагентов «ДС-ИФА-HBsAg», «ДС-ИФА-anti-HCV», «ДС-ИФА-anti-HDV (Нижний Новгород, Россия) соответственно. Определение количественного HBsAg проводили на автоматическом иммуноанализаторе HISCL-800 (Sysmex).

Молекулярно-биологические методы: Определение HBV, HCV, HDV проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов «АмплиСенс® HBV-FL», АмплиСенс® HCV-FL», «АмплиСенс® HDV- FL».

До проведения исследований образцы хранились при температуре минус 80°C в морозильной камере. Перед экстракцией тотальной РНК плазма крови центрифугировалась при температуре 2-8°C в течение 15 минут для освобождения от преципитатов. Тотальную РНК из плазмы крови выделяли с применением набора miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для нормализации реакции и в качестве внутреннего контроля использовали набор MiRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control содержащий *C.elegans* miR-39 miRNA mimic. Обратная транскрипция ПЦР (ОТ-ПЦР) проводилась с использованием набора miScript II RT Kit (QIAGEN, Германия). Условия реакции обратной транскрипции: 37°C - 60 мин; 95°C - 5 мин. ПЦР в режиме реального времени проводилась с применением набора miScript SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN, Германия). Для детекции внутреннего контроля использовали универсальный обратный праймер, прилагаемый к набору для экстракции и прямой праймер *Ce_miR-39_1* miScript® Primer Assay, применялись специфические обратные праймеры (QIAGEN, Герма-

ния). Условия ПЦР: 95°C-15 мин; 94°C-15 сек; 55°C-30 сек; 70°C-30 сек - 40 циклов.

Статистическая обработка проводилась с применением компьютерной программы Bivariate fit, JMP и JASP 0.16.4 и коэффициента корреляции Пирсона.

Результаты и обсуждение. Для установления наличия связи между уровнем экспрессии микроРНК-122 и показателями HDV РНК нами обследовано 69 пациента с HBsAg в крови. Всех пациентов обследовали на маркеры инфицирования HDV-инфекции (anti-HDV). Пациентов с положительным результатом обследовали на наличие HDV РНК. Образцы были разделены на две группы: HDV РНК позитивные - 36 человек и HDV РНК негативные - 25 человек. В HDV РНК позитивной группе определяли вирусную нагрузку HDV, и в обеих группах была определена вирусная нагрузка HBV методом количественный ПЦР. Контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц.

В результате проведенных исследований установлено, что средний уровень микроРНК-122 существенно отличался в исследуемых группах (рис. 1). У здоровых лиц средний уровень микроРНК-122 составил $1,3 \pm 0,03 \cdot 2^{\Delta\Delta Ct}$. В образцах крови с позитивными показателями HDV РНК уровень микроРНК-122 соответствовал $1,6 \pm 0,17 \cdot 2^{\Delta\Delta Ct}$. Среднее значение вирусной нагрузки HDV в этой группе составило $1,7 \times 10^5$ копий/мл, а HBV - $2,5 \times 10^4$ копий/мл. В группе пациентов с негативными показателями HDV РНК в сыворотке крови уровень микроРНК-122 составил $14,0 \pm 2,8 \cdot 2^{\Delta\Delta Ct}$. При этом средний показатель HBV ДНК в этой группе составил $9,1 \times 10^5$ копий/мл. Неопределяемые показатели РНК HDV в сыворотке сопровождалась высокой вирусной нагрузкой HBV и достоверно более высоким уровнем микроРНК-122, превышающем показатели в 8,7 раз по сравнению с группой позитивных по HDV РНК пациентов ($p < 0,005$).

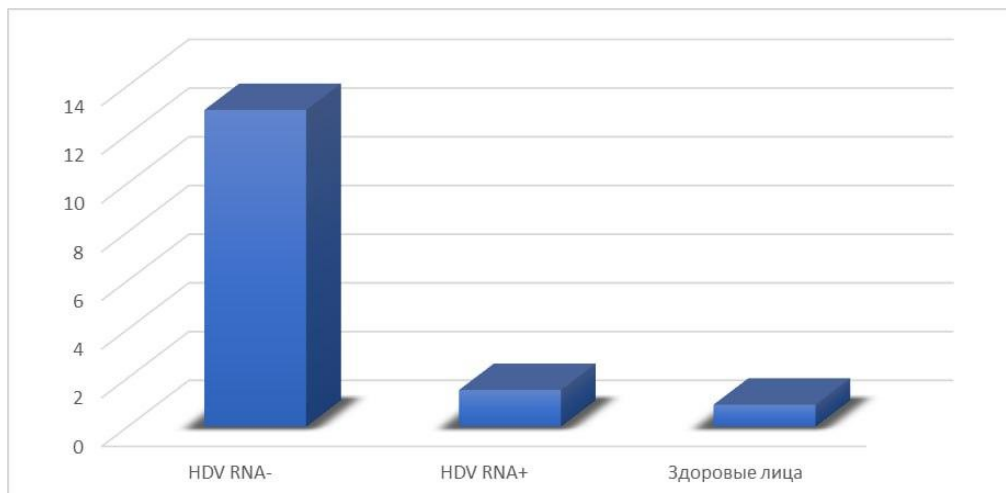


Рис. 1. Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-122 в трех исследуемых группах

Высокая распространенность HDV-инфекции у пациентов с хроническими заболеваниями печени указывает на то, что хронический гепатит D в настоящее время является основной причиной развития цирроза печени среди лиц с патологиями печени в Узбекистане. Использование микроРНК в качестве неинвазивных биомаркеров поражения печени представляет особый интерес при заболеваниях печени. В печени циркулирует множество различных классов микроРНК, и в многочисленных исследованиях было доказано, что их уровень может изменяться при повреждении печени. МикроРНК-122 представляет собой специфичную для печени многофункциональную РНК, которая играет центральную роль в различных аспектах печеночной функции и в развитии заболеваний печени [9]. Роль микроРНК-122 при HBV-инфекции и HCV-инфекции различна. При HCV-инфекции микроРНК-122 способствует репликации HCV, а при HBV-инфекции ингибирует репликацию HBV [5]. Исследование показали, что уровни miR-122 были обратно связаны с внутрипеченочной вирусной нагрузкой и некровоспалением печени, а истощение эндогенного miR-122 привело к усилению репликации HBV, тогда как сверхэкспрессия miR-122 ингибировала продукцию вируса [10]. В нашем исследовании наблюдались наиболее высокие показатели экспрессии микроРНК-122 у пациентов в группе с отсутствием клинических проявления HDV-инфекции и высокой вирусной нагрузкой HBV.

Выводы. Таким образом, наши исследования позволяют предположить, что повышенный уровень микроРНК-122 может косвенно влиять на репликацию HDV. Изучение специфического влияния микроРНК-122 на репликацию HDV является перспективным направлением и требует более глубокого изучения.

Литература:

1. Eman El-Ahwany., Faten Nagy., Mona Zoheiry., Mohamed Shemis. et al. Circulating miRNAs as Predictor Markers for Activation of Hepatic Stellate Cells and Progression of HCV-Induced Liver Fibrosis // *Electronic Physician* January 2016. - Volume 8. - Issue: 1. - P.1804-1810.
2. Fattovich, G.; Giustina, G.; Christensen, E.; Pantalena, M. et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut* 2000, 46, 420–426.
3. Joeri Lambrecht., Pieter Jan Poortmans., Stefaan Verhulst., Hendrik Reynaert. et al. Circulating ECV-Associated miRNAs as Potential Clinical Biomarkers in Early Stage HBV and HCV Induced Liver Fibrosis // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. –February. - Volume 8. - Article 56. - P.1-13.

4. Komaz NP, Ghosh S, Abdou-Chekarou M, Pradat P, Al Hawajri N, Manirakiza A, et al. Hepatitis B and hepatitis D virus infections in the Central African Republic, twenty-five years after a fulminant hepatitis outbreak, indicate continuing spread in asymptomatic young adults // *Plos Negl Trop Dis*. - 2018;12:e0006377.
5. Kyoungsub Song., Chang Han., Srikanta Dash., Luis A Balart., Tong Wu. MiR-122 in hepatitis B virus and hepatitis C virus dual infection // *World J Hepatol*. – 2015. - March 27. - 7(3). P.498-506.
6. Miao Z., Zhang S., Ou X., Li S., Ma Z., Wang W., Peppelenbosch M.P., Liu J., Pan Q. Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection // *J Infect Dis*. – 2020. - Apr 27;221(10):1677-1687.
7. Omran A.A., Osman K.S., Kamel H.M., Abdel-Naem E.A., Hasan D.E. MicroRNA-122 as a Novel Non-Invasive Marker of Liver Fibrosis in Hepatitis C Virus Patients // *Clin Lab*. – 2016. - Jul 1. - 62(7). P.1329-1337.
8. Shaobo Zhang. et al. Dysregulated Serum MicroRNA Expression Profile and Potential Biomarkers in Hepatitis C Virus-infected Patients // *Int. J. Med. Sci*. – 2015. - Vol. 12. - P.590-598.
9. Simonetta Bandiera., Sébastien Pfeffer., Thomas F. MiR-122 – A key factor and therapeutic target in liver disease // *Journal of Hepatology*. – 2015. - Vol. 62. – P.448–457.
10. Wang S., Qiu L., Yan X., Jin W., Wang Y., Chen L., Wu E. et al. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1) -modulated P53 activity // *Hepatology*. – 2012. – Vol.55. - P.730-741

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК-122 ПРИ HDV ИНФЕКЦИИ

Ходжаева М.Э., Хикматуллаева А.С.,

Ибадуллаева Н.С., Жолдасова Е.А., Абдукадырова М.А.

Резюме. Цель исследования является выявить наличие связи между уровнем экспрессии микроРНК-122 и показателями HDV РНК в крови. Материал и методы: нами проведено обследование 72 HBsAg положительных пациентов с бессимптомным течением заболевания на наличие HDV инфекции. Материалом для исследования уровня экспрессии микроРНК-122 служили образцы плазмы крови обследованных больных. Определение HBV, HCV, HDV проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Результаты: микроРНК-122, значительно выше в группе пациентов с высокой вирусной нагрузкой HBV и неопределяемым уровнем РНК HDV по сравнению с пациентами у которых выявляются оба вируса. Выводы: повышенный уровень микроРНК-122 может косвенно влиять на репликацию HDV. Изучение специфического влияния микроРНК-122 на репликацию HDV является перспективным направлением и требует более глубокого изучения.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит D, микроРНК-122, HBsAg, анти-HDV, РНК HDV.