ЕКСПРЕСИЯТА НА МИКРОРНК-191 - СЪВРЕМЕНЕН БИОМАРКЕР ЗА РАЗГРАНИЧАВАНЕ НА ЯЗВЕН КОЛИТ ОТ БОЛЕСТ НА КРОН

Антония Атанасова¹, Мария Тенева²

¹Катедра по анатомия и клетъчна биология, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

²Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ "Света Марина" ЕАД – Варна

THE EXPRESSION OF MIR-191 – A MODERN BIOMARKER FOR DISTINGUISHING ULCERATIVE COLITIS FROM CROHN'S DISEASE

Antonia Atanassova¹, Maria Teneva²

¹Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Laboratory of Clinical Immunology, St. Marina University Hospital, Varna

РЕЗЮМЕ

Въведение: По литературни данни микроРНК-191 (miR-191) може да се използва като потенциален диагностичен биомаркер, който да послужи за разграничаване на болестта на Крон (БК) и язвения колит (ЯК).

Цел: Целта на настоящото проучване е да се оцени серумната експресия на miR-191 при пациенти с хронични възпалителни болести на червата и да се определи ролята на микроРНК за разграничаване на БК от ЯК.

Материал и методи: При 70 пациенти с хронични възпалителни болести на червата (ХВБЧ) (35 пациенти с ЯК, 35 пациенти с БК) и 30 здрави контролни субекти е изследвана експресията на miR-191 в серума чрез обратна транскриптаза и количествена PCR в реално време (RT-qPCR). Резултати: Установи се, че miR-191 има повишена експресия при БК, активна болест, тънкочревна локализация и хронично персистираща форма на ЯК и екстраинтестинални прояви. Експресията на тази микроРНК корелира правопрпорционално с фекален калпротектин и CDAI.

Заключение: Серумната експресия на miR-191 е значително по-висока при пациентите с БК, в сравнение с пациентите с ЯК. Корелира с локализацията и активността при БК, а при ЯК се установява само връзка с формата на протичане и екстраинтестиналните прояви. Може да послужи като биомаркер за разграничаване на двете заболявания.

ABSTRACT

Introduction: Literature data shows that miR-191 can be used as a potential diagnostic biomarker to differentiate between Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC).

Aim: The aim of the present study is to evaluate the serum expression of miR-191 in patients with chronic inflammatory bowel disease and to determine the role of microRNAs in distinguishing CD from UC.

Materials and Methods: Serum miR-191 expression was tested in 70 patients with inflammatory bowel disease (IBD) (35 with UC, 35 patients with CD) and 30 healthy control subjects through reverse transcriptase and real-time quantitative PCR (RT-qPCR).

Results: The results show that miR-191 has increased expression in CD, active disease, small intestinal localization, and chronic persistent form of UC, and extraintestinal manifestations. The correlation analysis shows a positive correlation between the expression of miR-191 and faecal calprotectin and CDAI.

Conclusion: The serum expression of miR-191 was significantly higher in patients with CD compared to patients with UC. It correlated with the localization and activity in CD, and in UC there was only a correlation to the form of the course and the extraintestinal manifestations. It can be used to distinguish between the two diseases.

Ключови думи: микроРНК 191, биомаркер, БК, ЯК, ХВБЧ

Keywords: miR-191, biomarker, Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease

ВЪВЕДЕНИЕ

В последните години, изследванията в областта на микроРНК показват, че тя се прилага за диагностициране на редица имуномедиирани заболявания като неинвазивен биомаркер. В областта на възпалителните болести на червата (ХВБЧ), Lin et al. (4) докладват, че микроРНК-191 (miR-191) може да бъде потенциален диагностичен биомаркер, който да разграничи язвен колит (ЯК) от болест на Крон (БК), тъй като е въввлечена в регулацията на врождения и придобит имунитет (5). Някои автори свързват повишената експресия на miR-191 в тъкани от пациенти с Крон колит, в сравнение със здрави контроли (7). Скорешни проучвания разкриват, че експресията на miR-191 има за цел zonula occludens-1 и осъществява регулация на плътните свързвания като редуцира увредите причинени от TNF- α (1, 3, 6) и така участва в контрола на епителната бариера, увредата, на която е ключов момент в патогенезата на ХВБЧ.

В свое изследване Charman и Rekow установяват, че в тъканите на пациенти с БК има свръхекспресия на някои микроРНК, сред които се откроява и miR-191 (2).

ЦЕЛ

Цел на настоящото проучване е да се оцени серумната експресия на miR-191 при пациенти с ХВБЧ и да се определи ролята на микроРНК за разграничаване на БК от ЯК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

При 70 пациенти с ХВБЧ (35 с ЯК, 35 пациенти с БК) и 30 здрави контролни субекти е изследвана експресията на miR-191 в серума чрез с обратна транскриптаза и количествена PCR в реално време (RT-qPCR).

РЕЗУЛТАТИ

Поради липса на валидирани референтни прагови нива на експресията на микроРНК за разграничаване на пациенти с ХВБЧ от здрави индивиди бе определена праговата стойност (cut-off) на експресията на miR-191 за разграничаване на пациенти с ХВБЧ от здрави контроли, която е специфична за дадената популация и служи като ориентир за оценка на експресията при БК и ЯК. В нашето проучване праговата стойност на miR-191 е 1.11 (AUC=0.645 (0.520-0.771); $p=0.022$) с чувствителност 62.9 % и специфичност 63.3%.

Сравнителният анализ на експресията на miR-191_1 при пациенти с БК и праговата стойност показва наличието на съществена разлика, като miR-191_1 е със значително по-висока експресия при пациентите с БК (съответно 1.11 прагова стойност и 2.16 при БК). Експресията на miR-191_1 е по-висока при пациентите с активност на БК, но по отношение на праговата стойност както в активност, така и в ремисия, броят на пациентите с повишена експресия е 2 пъти по-висок от тези с понижена експресия. При ЯК не се установява съществена разлика между праговата стойност и експресията на miR-191_1. Разлика не се установява и в експресията на miR-191 при активност на ЯК и ремисия.

На Табл. 1 е представена характеристиката на изследваните пациенти в активност и ремисия и експресията на miR-191_1. Повишената експресия на miR-191_1 корелира с тънкочревната локализация на БК (L1). Хронично персистиращата форма (т.е. без формиране на ясно обособена ремисия) на ЯК корелира с високата експресия на miR-191_1.

Изследването на зависимостта между CDAI и експресията на miR-191_1 показва, че има правопрпорционална умерена

Табл. 1. Обща характеристика на изследваните лица

Показател	Болест на Крон (БК)		Язвен колит (ЯК)		Експресия на miR-191 при БК		Експресия на miR-191 при ЯК	
	Активен БК (n=20)	Ремисия БК (n=15)	Активен ЯК (n=20)	Ремисия ЯК (n=15)	Активен БК (n=20)	Ремисия БК (n=15)	Активен ЯК (n=20)	Ремисия ЯК (n=15)
Възраст, год. (mean±SD, range)	41.1±12.9 (18-71)	42.1±14.8 (23-75)	37.9±13.8 (19-73)	46.4±16.1 (18-71)				
Пол	Мъже	5/33 .3%	7/35 .0%	8/53 .3%	2.38±1.22	1.09±0.46	0.95±0.44	1.19±0.46
	Жени	7/35 .0%	10/66 .7%	13/65 .0%	2.45±1.71	2.22±2.43	1.47±0.82	1.52±1.26
	L1/E1	13/65 .0%	6/40 .0%	-	2.59±1.54	2.71±3.14	-	1.35
	L2/E2	-	5/33 .3%	8/40 .0%	-	1.54±0.24	1.26±0.49	0.76±0.09
Локализация БК/ЯК	L3/E3	7/35 .0%	4/26 .7%	12/60 .0%	2.06±0.98	0.92±0.42	1.31±0.89	1.50±1.01
	B1	5/25 .0%	12/80 .0%	-	1.50±0.52	2.07±2.25	-	-
	B2	9/45 .0%	2/13 .3%	-	2.28±1.71	1.01±0.14	-	-
	B3	5/25 .0%	1/6 .7%	-	3.32±0.59	0.81	-	-
	B2-B3	1/5 .0%	-	-	3.39	-	-	-
	Хронично рецидивираща	-	-	13/65 .0%	-	-	1.06±0.41	1.35±0.91
Форма на протичане	Хронично персистираща	-	-	7/35 .0%	-	-	1.73±1.03	1.35±0.91

зависимост ($r=0.330$; $p<0.05$), която показва, че в 10.89 % от случаите експресията на miR-191_1 се наблюдава при активност на БК.

При изследване на нивото на ФКП при пациенти с БК се установи, че експресията на miR-191_1 се увеличава при повишени нива на ФКП ($p=0.009$), като е намерена правопрпорционална умерена зависимост ($r=0.461$; $p=0.0063$), показваща, че в 21.3 % от случаите повишената експресия на miR-191_1 се наблюдава при повишените нива на ФКП при пациенти с това заболяване. Високата експресия на miR-191_1 се явява рисков фактор за повишаване нивата на ФКП при пациенти с БК ($OR=10.0$ (0.739-135.327); $p<0.05$).

Фиг. 1. Зависимост между нива на ФКП и експресията на miR-191_1 при пациенти с БК

Екстраинтестиналните прояви (ЕИП) корелират с повишената експресия на miR-191_1.

Експресията на изследваната микроРНК се различава съществено при пациентите с БК и ЯК, което ги прави разграничими по отношение на активността и тежестта на заболяването.

Подобно разграничение се наблюдава и при локализацията и формата на протичане, което показва, че експресията на конкретна микроРНК може да насочи клинициста при определяне на локализация и поведение на болестта още при нейното откриване.

ДИСКУСИЯ

Резултатите от настоящото изследване показват, че експресията на miR-191_1 е сигнификантно по-висока при пациенти с активен БК спрямо здрави контроли. За подобни резултати съобщават и Wu et al., които описват, че в биопсия от колон сигмоидеум на пациенти с активен БК експресията на miR-191 е значително повишена, в сравнение със здрави контроли (8). В по-ранно изследване Wu et al. Установяват, че експресията на miR-191 е повишена при пациенти с хронична активност на БК (7). Други автори също описват повишена експресия на микро-РНК-191 при пациенти с БК, в сравнение със здрави контроли (9).

Paraskevi et al. установяват, че има съществена разлика в експресията на тази микроРНК между пациенти с БК и ЯК ($p < 0.05$), като експресията е значително по-висока при пациентите с БК (съответно 3.42 ± 0.43 за БК и 0.84 ± 0.37 за ЯК) (5). Подобни резултати се установяват и в настоящото изследване.

За разлика от Zeng et al., които установяват повишена експресия на miR-191 в лигавица от колон при пациенти с БК (10), в настоящото проучване се установи повишена експресия на микроРНК при пациенти с ангажиране на терминален илеум (L1) от основния възпалителен процес.

Поради ограничения брой и обхват на публикуваните изследвания не бяха намерени резултати за връзката между експресията на miR-191 и индексите за активност на заболяването, както и за връзката с други маркери на възпалението. В нашето изследване установихме, че при пациенти с БК повишената експресия на miR-191_1 тя корелира умерено правопрпорционално с CDAI и ФКП, като остава повишена спрямо здрави контроли, дори и при постигане на ремисия на заболяването.

По отношение на пациентите с ЯК не се установи съществена разлика в експресията на miR-191_1 според активността и локализацията, като само при пациентите хронично персистираща активност експресията на микроРНК е значително по-

висока. Друга зависимост в тази група пациенти е свързана с ЕИП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От представените литературни данни и получените резултати от настоящото изследване може да се заключи, че серумната експресия на miR-191 може да бъде използвана като неинвазивен биомаркер за разграничаване на БК от ЯК. Резултатите показват, че експресията на тази микроРНК е значително по-висока при пациенти с активна БК, тънкочревна локализация, както и при пациенти с ЯК – хронично персистираща форма и екстраколонни прояви. При пациентите с БК miR-191 корелира с други неинвазивни биомаркери, като ФКП, както и оценъчни скали като CDAI.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bi K, Zhang X, Chen W, Diao H. MicroRNAs Regulate Intestinal Immunity and Gut Microbiota for Gastrointestinal Health: A Comprehensive Review. *Genes* (Basel). 2020 Sep 12;11(9):E1075. doi: 10.3390/genes11091075. PMID: 32932716.
2. Chapman CG, Pekow J. The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review. *Therap Adv Gastroenterol*. 2015;8(1):4–22. doi: 10.1177/1756283X14547360
3. Li M, Zhao J, Cao M, Liu R, Chen G, Li S, et al. Mast cells-derived MiR-223 destroys intestinal barrier function by inhibition of CLDN8 expression in intestinal epithelial cells. *Biol Res*. 2020 Mar 24;53(1):12. doi: 10.1186/s40659-020-00279-2. PMID: 32209121; PMCID: PMC7092522
4. Lin J, Cao Q, Zhang J, Li Y, Shen B, Zhao Z, et al. MicroRNA expression patterns in indeterminate inflammatory bowel disease. *Mod Pathol*. 2013;26:148–54. doi: 10.1038/modpathol.2012.131,
5. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M. Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2012;6(9):900–4. doi: 10.1016/j.crohns.2012.02.006.
6. ang L, Zhang R, Chen J, Wu Q, Kuang Z. Baicalin Protects against TNF- α -Induced

- Injury by Down-Regulating miR-191a That Targets the Tight Junction Protein ZO-1 in IEC-6 Cells. *Biol Pharm Bull.* 2017;40(4):435-443. doi: 10.1248/bpb.b16-00789.
7. Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Meltzer SJ, Brant SR, Kwon JH. Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(10):1729-38. doi: 10.1002/ibd.21267.
8. Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, et al. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(1):241-50. doi: 10.1002/ibd.21450.
9. 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):2206-18. doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2206.
10. Zeng Z, Mukherjee A, Zhang H. From genetics to epigenetics, roles of epigenetics in inflammatory bowel disease. *Front Genet.* 2019;10:1017. doi: 10.3389/fgene.2019.01017.

Адрес за кореспонденция:

Антония Атанасова
Факултет по медицина
Медицински университет – Варна
ул. Марин Дринов 55
9002 Варна
e-mail: aniatanassova@abv.bg