НА ГРАНИЦАТА НА ВЪЗПАЛЕНИЕТО И ФИБРОЗАТА - СЕРУМНА ЕКСПРЕСИЯ НА МИКРОРИБОНУКЛЕИНОВАТА КИСЕЛИНА 29 ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНИ ВЪЗПАЛИТЕЛНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ НА ЧЕРВАТА

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

AT THE BORDER OF INFLAMMATION AND FIBROSIS - SERUM EXPRESSION OF MICRORIBONUCLEIC ACID 29 IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL 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: Напоследък се проучва експресията на микрорибонуклеиновите киселини (микроРНК) в периферна кръв и тъкани при пациенти с хронични възпалителни заболявания на червата (ХВБЧ) като биомаркер за диагностика и проследяване на активността.

Цел: Целта на това изследване е да оцени корелацията между серумната експресия на микрорибонуклеиновата киселина 29 (miR-29) и различни клинични параметри: активност, тежест и обхват на заболяването при пациенти с ХВБЧ.

Материал и методи: При 70 пациенти с ХВБЧ (35 с язвен колит (ЯК), 35 пациенти с болест на Крон (БК)) и 30 здрави контролни субекти е изследвана експресията на miR-29 в серума чрез обратна транскриптаза и количествена PCR в реално време (RT-qPCR).

Резултати: Групата на пациентите показва средна експресия на miR-29 в серума от 1.69 за БК, 1.23 за ЯК и 1.07 за контролната група, като има значима разлика в експресията между отделните групи.

Заключение: Съществува значима връзка между повишената серумна експресия на miR-29 и активността на заболяването, тежестта и обхвата при пациенти с ЯК.

ABSTRACT

Introduction: Recently, the expression of micro ribonucleic acids (microRNAs) in peripheral blood and tissues in patients with chronic inflammatory bowel disease (IBD) has been studied as a biomarker for diagnosis and monitoring of activity.

Aim: The aim of this study is to evaluate the correlation between serum microribonucleic acid 29 (miR-29) expression and different clinical parameters: activity, severity and extent of disease in IBD patients.

Materials and Methods: Serum miR-29 expression was tested in 70 patients with IBD (35 with ulcerative colitis (UC), 35 patients with Crohn's disease (CD)) and 30 healthy control subjects through reverse transcriptase and real-time quantitative PCR (RT-qPCR).

Results: The group of patients showed a mean serum miR-29 expression of 1.69 for CD, 1.23 for UC and 1.07 for the control group with a significant difference in expression between the groups.

Conclusion: There is a significant relation between increased serum miR-29 expression and disease activity, severity and extent in patients with UC.

Ключови думи: *miR-29, язвен колит, болест на Крон, хронични възпалителни заболявания на червата*

Keywords: *miR-29, ulcerative colitis, Crohn's disease, chronic inflammatory bowel disease*

ВЪВЕДЕНИЕ

МикроРНКите са ендеогенни некодиращи РНКи (ncRNAs), които са с дължина около 19-24 нуклеотида. Биогенезата на микроРНКите минава през няколко стъпки на посттранскрипционни модификации в ядрото и цитоплазмата.

МикроРНКите са важни регулатори на различни клетъчни процеси, включващи развитие, диференциация, сигнализация, програмирана клетъчна смърт (5,11). Нарушената регулация на специфични микроРНКи води до различни заболявания: метаболитни нарушения, сърдечно-съдови, чернодробни, имуномедиирани заболявания, както и появата на неоплазми (1,10,15).

Семейството на микрорибонуклеиновата киселина 29 (miR-29) има три представители: miR-29a, miR-29b и miR-29c, които са кодирани от два отделни геномни локуса. В мезенхимните клетки на множество органи се наблюдава експресия на miR-29. Някои растежни фактори или цитокини, като трансформиращ растежен фактор- β (TGF- β), тумор-некротичен фактор алфа (TNF- α) и интерлевкин-4 (IL-4), потискат експресията на miR-29 (4).

Интересът към тази микроРНК се засили след като се установи, че взаимодействието на miR-29 с nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) е предпоставка за развитието на хронични възпалителни заболявания на червата. Чрез изследване на дендритна клетъчна линия се установи, че NOD2 индуцира освобождаване на miR-29 и ограничено освобождаване на интерлевкин-23 (IL-23).

Полиморфизми на NOD2 нарушават експресията на miR-29 в дендритните клетки и това води до свръхекспресия на IL-23 с последващо възпаление (3).

NOD2 полиморфизмът намалява експресията на miR-29, увеличава риска от образуване на стриктури при пациенти с болест на Крон (БК) (2) и развитието на този фенотип, който се характеризира с тежка чревна фиброза (14). NOD2 рецепторната система влияе и върху състава на микробиома (12), а miR-29 контролира и функцията на микробиома при чревна фиброза.

miR-29 има за цел (мишени) гените на основните компоненти на екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ): колаген, еластин, фибрили-1 (FBN1) и пероксидазин (4).

Антифибротичният ефект на miR-29 е демонстриран при миши модели по отношение на чревната фиброза чрез инхибиране на TGF β -медирано производство и отлагане на ЕЦМ (2).

Тези отличителни характеристики правят miR-29 изключително подходящ потенциален кандидат за антифиброзна терапия.

ЦЕЛ

Целта на това проучване е да се оцени серумната експресия на miR-29 при пациенти с хронични възпалителни заболявания на червата (ХВБЧ) и нейната корелация с обхвата, активността и тежестта на язвения колит (ЯК) и БК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

При 70 пациенти с ХВБЧ (35 с ЯК, 35 с БК) и 30 здрави контролни субекта е изследвана експресията на miR-29 в серума чрез обратна транскриптаза и количествена PCR в реално време (RT-qPCR). За оценка на тежестта са използвани Crohn's Disease Activity Index (CDAI) (7) за пациенти с БК, а за пациенти с ЯК са използвани Mayo score (8) и Монреалска класификация за активност на ЯК (S (severity)) (13) със степени от 0 (ремисия) до 3 (тежка активност). Резултатите са обработени статистически с

SPSS v. 20.0, като са използвани вариационен, дисперсионен, сранителен (ANOVA, t-test), корелационен и ROC curve анализ.

РЕЗУЛТАТИ

Изследвани са 70 пациенти с ХВБЧ и 30 здрави контроли, като резултатите са представени на Табл. 1.

0.751); $p=0.054$) с чувствителност 61.4% и специфичност 63.3 % (Фиг. 1). Тя е специфична за дадената популация и служи като ориентир за оценка експресията на БК и ЯК.

На Табл. 2 е представена характеристика на пациентите и сравнителен анализ на експресията на miR-29 при пациентите с БК и ЯК. Средните нива на серумна-

Табл. 1. Характеристика на пациентите с ХВБЧ според Монреалската класификация

Показател		Пациенти		
		БК (n=35)	ЯК (n=35)	Контроли (зdravi лица) (n=30)
Възраст, год. (mean±SD, range)	Моментна	41.51±13.55 (18-75)	41.54±15.21 (18-73)	26.2±6.2 (18-42)
Пол	Мъже	18/51.4 %	15/ 42.9%	15/50.0%
	Жени	17/48.6%	20/ 57.1 %	15/50.0%
Локализация БК/ЯК	L1/E1	19/54.3 %	1/ 2.9 %	-
	L2/E2	5/4.3%	11/ 31.4 %	-
	L3/E3	11/31.4 %	23/ 65.7 %	-
Форма на протичане	B1	17/48.6 %	-	-
	B2	11/31.4 %	-	-
	B3	6/17.1 %	-	-
	B2-B3	1/ 2.9 %	-	-
	Хронично рецидивираща	-	28/ 80.0 %	-
	Хронично персистираща	-	7/ 20.0 %	-
Давност на ХВБЧ, мес.	(median, range)	48.0 (3-204)	75 (1-492)	-
CDAI	CDAI < 150 - ремисия	18/52.9 %	-	-
	CDAI 150-220 - лека активност	5/14.7 %	-	-
	CDAI 221-450 - умерена активност	11/ 31.4 %	-	-
S (severity)	S0 – ремисия	-	8/22.9 %	-
	S1 – лека активност	-	13/37.1 %	-
	S2 – умерена активност	-	4/11.4 %	-
	S3 – тежка активност	-	10/28.6 %	-
Mayo score	Mayo score 0 – ремисия	-	8/22.9 %	-
	Mayo score 1 – лека активност	-	10/28.6 %	-
	Mayo score 2 – умерена активност	-	8/22.9 %	-
	Mayo score 3 – тежка активност	-	9/25.7 %	-
Лечение	5ACA	2/ 5.7 %	12/ 34.3 %	-
	КС	7/ 20.0 %	8/ 22.9 %	-
	Имуномодулатори	2/ 5.7 %	3/ 8.6 %	-
	Биологично лечение	24/ 68.6 %	12/ 34.3 %	-

Липсват валидирани референтни прагови нива на експресията на микроРНКите. Бе определена праговата стойност (cut-off) на експресията на miR-29 при здрави контроли, която е 1.07 (AUC=0.622 (0.493-

та експресия на miR-29 са 2.41±2.96 (95%CI 1.31-3.52) Резултатите показват, че при пациентите с БК не се установява статистически значима разлика според изследвани-

Фиг. 1. ROC curve анализ за определяне на праговата стойност на експресията на miR-29

те показатели, докато при пациентите с ЯК се установява разлика в експресията спо-

ред локализацията и активността. Впечатление прави, че има правопрпорционална умерена зависимост между експресията на miR-29 и възрастта на пациентите с БК ($r=0.336$; $p=0.049$), докато при пациентите с ЯК не беше установена подобна корелация ($r=0.275$; $p=0.109$). При здрави контроли се установи обратнопропорционална умерена зависимост между серумната експресия на miR-29 и възрастта ($r=-0.349$; $p=0.039$). От друга страна и при двете заболявания се установява правопрпорционална умерена зависимост между експресията на микроРНКата и давността на заболяването (съответно Spearman's $\rho=0.314$; $p=0.046$ за БК и Spearman's $\rho=0.322$; $p=0.049$ за ЯК).

При сравняване на получените резултати с праговата стойност при здравите контроли е намерена съществена разли-

Табл. 2. Серумна експресия на miR-29 ($\text{mean} \pm \text{SD}$; 95%CI) според Монреалската класификация

Показател		Експресия на miR-29	
		БК (n=35)	ЯК (n=35)
Пол	Мъже	1.79 $\pm$ 1.04 (1.27-2.32)	1.21 $\pm$ 0.64 (0.85-1.56)
	Жени	1.59 $\pm$ 0.77 (1.19-1.99)	1.25 $\pm$ 0.69 (0.93-1.57)
Локализация БК/ЯК	L1/E1	1.92 $\pm$ 0.98 (1.44-2.39)	2.43
	L2/E2	1.44 $\pm$ 0.30 (1.06-1.82)	1.01$\pm$0.44 (0.71-1.31)
	L3/E3	1.43 $\pm$ 0.92 (0.81-2.06)	1.28$\pm$0.70 (0.98-1.58)
Форма на протичане	B1	1.37 $\pm$ 0.52 (1.10-1.64)	-
	B2	1.92 $\pm$ 1.18 (1.12-2.72)	-
	B3	2.11 $\pm$ 1.11 (0.94-3.28)	-
	B2-B3	2.33	-
	Хронично рецидивираща	-	1.21 $\pm$ 0.70 (0.94-1.48)
	Хронично персистираща	-	1.31 $\pm$ 0.49 (0.84-1.76)
CDAI	CDAI < 150 – ремисия	1.54 $\pm$ 0.69 (1.20-1.89)	-
	CDAI 150-220 – лека активност	1.43 $\pm$ 0.86 (0.36-2.51)	-
	CDAI 221-45 – умерена активност	1.98 $\pm$ 1.22 (1.17-2.80)	-
S (severity)	S0 – ремисия	-	1.07$\pm$0.43 (0.71-1.43)
	S1 – лека активност	-	1.53$\pm$0.86 (1.01-2.05)
	S2 – умерена активност	-	1.56$\pm$0.30 (1.08-2.04)
	S3 – тежка активност	-	0.84$\pm$0.32 (0.60-1.07)
Mayo score	Mayo score 0 – ремисия	-	1.57 $\pm$ 1.04 (0.70-2.44)
	Mayo score 1 – лека активност	-	1.26 $\pm$ 0.49 (0.91-1.62)
	Mayo score 2 – умерена активност	-	0.97 $\pm$ 0.52 (0.54-1.41)
	Mayo score 3 – тежка активност	-	1.12 $\pm$ 0.44 (0.78-1.46)
Лечение	5ACA	1.38 $\pm$ 0.22 (0.58-3.35)	1.07 $\pm$ 0.62 (0.68-1.47)
	KC	1.91 $\pm$ 1.46 (0.56-3.26)	1.21 $\pm$ 0.51 (0.78-1.65)
	Имуномодулатори	1.61 $\pm$ 0.92 (0.49-2.73)	1.63 $\pm$ 0.92 (0.64-3.92)
	Биологично лечение	1.67 $\pm$ 0.81 (1.33-2.01)	1.29 $\pm$ 0.75 (0.82-1.77)

ка по всички показатели като за пациентите с БК, така и за пациентите с ЯК.

Впечатление прави, че при пациентите с лъв колит и тези с умерена и тежка активност на ЯК експресията на miR-29 е под тази установена за прагова стойност. При пациентите в ремисия, според Монреалската класификация (S), стойностите на експресията се доближават до тези на здравите контроли.

ДИСКУСИЯ

Резултатите от настоящото изследване показват, че експресията на miR-29 има 61.4% чувствителност и 63.3% специфичност при разграничаването на пациенти с хронични възпалителни заболявания на червата от здрави контроли (AUC=0.622 (0.493-0.751); $p=0.054$). В литературата не бяха открити данни за чувствителността и специфичността на miR-29 при пациенти с ХВБЧ, но J. Wang и J. Gu (2012), при изследването на 74 пациента с колоректален карцином, установяват, че miR-29 има 75% специфичност и чувствителност (AUC=0.803) (16). През 2016 г. Zhu et al., отново при пациенти с простатен карцином, установяват 85% чувствителност и 61% специфичност на микроРНКата (AUC=0.777) (20).

Изследването на серумната експресия на miR-29 при пациенти с БК показва значително повишени стойности (1.69) спрямо пациенти с ЯК (1.23) и здрави контроли (1.07). Подобни резултати при пациенти с БК се съобщават от Paraskevi et al. (9), съответно 1.89 ± 0.39 за пациенти с БК и 0.85 ± 0.44 за пациенти с ЯК. От друга страна някои автори (6,17,18) установяват, че експресията на микроРНКата е повишена и при пациенти с ЯК, за разлика от настоящото изследване. При сравняването на експресията на miR-29 при пациенти с активен БК и в ремисия спрямо здрави контроли Fasseu et al. установяват повишена експресия (6), което се потвърждава и в настоящото проучване. Подобни резултати са установени и при пациенти с ЯК.

Експресията на miR-29 според формата на протичане на БК показва понижена експресия при пациентите със стриктури-

ращ фенотип (1.92), като резултатите подкрепят тези в литературата (19). По литературни данни понижена експресия на miR-29 при тежка болест и активност при пациентите с ХВБЧ спрямо здравите контроли се свързва с повишено фиброобразуване и стенолитични усложнения (19).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резултатите от настоящото проучване показват, че има повишена експресия на miR-29 както при пациентите с БК, така и при тези с ЯК спрямо здрави контроли, независимо от активността и постигнатата ремисия. Експресията на miR-29 се различава сигнификантно според локализацията и тежестта на заболяването при пациентите с ЯК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blenkiron C, Miska EA. 2007. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1:R106–R113
2. Brain O, Owens BM, Pichulik T, Allan P, Khatamzas E, Leslie A, Steevens T, Sharma S, Mayer A, Catuneanu AM. The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity*.2013;39:521-536
3. Chuang AY, Chuang JC, Zhai Z, Wu F, Kwon JH. NOD2 expression is regulated by microRNAs in colonic epithelial HCT116 cells. *Inflamm Bowel Dis*.2014;20:126-135
4. Cushing L, Kuang P, Lü J. The role of miR-29 in pulmonary fibrosis. *Biochem Cell Biol* 2015;93(2):109–18. doi: 10.1139/bcb-2014-0095
5. Du T, Zamore PD. 2007. Beginning to understand microRNA function. *Cell Res* 17(8):661–663
6. Fasseu M, Treton X, Guichard C, et al. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One* 2010; 5:e13160
7. Liu JK., Lichtenstein GR. Chapter 21 - Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Gastrointestinal Endoscopy* (Second Edition). 2012, 243-264

8. Mantzaris G. Mucosal healing. State of the art lecture. 35th ECCO Educational Workshop. ECCO Guidelines. 13 June 2014, Sofia
9. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, et al. Circulating microRNA in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2012; 6:900–904
10. Poy MN, Spranger M, Stoffel M. 2007. microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes Obes Metab* 9 Suppl 2:67–73
11. Rane S, Sayed D, Abdellatif M. 2007. MicroRNA with a MacroFunction. *Cell Cycle* 6(15):1850–1855
12. Rehman A, Sina C, Gavrilova O, Häslér R, Ott S, Baines JF, et al. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011;60(10):1354–62. doi: 10.1136/gut.2010.216259
13. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 2: Current management. *Journal of Crohn's and colitis* (2012)6, 991-1030
14. Seiderer J, Brand S, Herrmann KA, Schnitzler F, Hatz R, Crispin A, et al. Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(12):1114–21. doi: 10.1097/01.mib.0000235836.32176.5e
15. van Rooij E, Olson EN. 2007. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 117(9):2369–2376
16. Wang LG, Gu J. Serum microRNA-29a is a promising novel marker for early detection of colorectal liver metastasis. *Cancer Epidemiol* 2012;36:e61–7
17. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology* 2008; 135:1624–1635
18. Xu XM, Zhang HJ. miRNAs as new molecular insights into inflammatory bowel disease: Crucial regulators in autoimmunity and inflammation. *World J Gastroenterol*. 2016 Feb 21;22(7):2206-18. doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2206
19. Zeng Z, Mukherjee A, Zhang H. From Genetics to Epigenetics, Roles of Epigenetics in Inflammatory Bowel Disease. *Front Genet*. 2019;10:1017. Published 2019 Oct 31. doi:10.3389/fgene.2019.01017
20. Zhu, Y., Xu, A., Li, J., Fu, J., Wang, G., Yang, Y., et al. (2016). Fecal miR-29a and miR-224 as the noninvasive biomarkers for colorectal cancer. *Cancer Biomark*. 16, 259–264. doi: 10.3233/CBM-150563

Адрес за кореспонденция:

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