

На правах рукописи

МАРЧЕНКО АЛЕКСЕЙ ВАСИЛЬЕВИЧ

**МИКРОРНК-424 ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СЕРДЦА:
АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель

Член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Шевченко Алексей Олегович

Официальные оппоненты:

Космачева Елена Дмитриевна – доктор медицинских наук, заведующая кафедрой терапии №1 факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель главного врача по медицинской части Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края.

Долгов Владимир Владимирович – доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «28» декабря 2021 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Диссертационного Совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте <http://www.transpl.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСТИО 001.21
кандидат ветеринарных наук

Волкова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Более чем полувековой мировой опыт трансплантации аллогенного донорского сердца человеку позволил достичь впечатляющих результатов: в условиях тщательно подобранной и контролируемой иммуносупрессии, регулярного наблюдения со своевременной диагностикой осложнений и сопутствующих заболеваний удается добиться многолетней выживаемости реципиентов с поддержанием высокого качества их жизни. История трансплантации сердца (ТС) в нашей стране насчитывает 35 лет; ближайшие и отдаленные результаты не уступают мировым [Готье С. В. и соавт., 2014; Готье С. В., 2017].

Клинические результаты трансплантации во многом определяются эффективностью послеоперационного ведения реципиентов и качеством ранней диагностики осложнений, среди которых особую опасность в первый год после трансплантации представляют острое отторжение трансплантата и инфекционные осложнения, развивающиеся на фоне приема иммуносупрессивной терапии [Шевченко А. О. и соавт., 2018; Viderman P. et al., 2015; From A. M., 2011].

Многочисленные исследования последних десятилетий направлены на поиск неинвазивных (малоинвазивных) биомаркеров посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца и других солидных органов, что диктуется потребностью в доступном надежном скрининге и, по возможности, в ограничении числа инвазивных диагностических вмешательств при длительном наблюдении реципиентов. Имеются данные об эффективности биомаркеров костимуляции и активации лимфоцитов (sCD40L, ST2 и др.), макрофагов (неоптерин), воспаления и неоангиогенеза (моноцитарный хемоаттрактантный протеин MCP-1, плацентарный фактор роста PlGF и др.), фиброза (галектин-3) для ранней диагностики осложнений у реципиентов сердца. Однако многофакторность поражения и неспецифичность каждого биомаркера для сердечного трансплантата не позволяют считать проблему неинвазивной диагностики решенной [Шевченко О.П. и соавт., 2019; Ghosh G. et al., 2010].

Новый класс биомаркеров – микроРНК, регулирующие экспрессию отдельных генов, участвующие в широком спектре биологических процессов, включая дифференцировку, пролиферацию, апоптоз клеток, иммунный ответ и др. Выявленные корреляции профиля экспрессии отдельных микроРНК в тканях и биологических жидкостях с развитием и тяжестью заболеваний послужили основанием для их исследования в целях диагностики и прогноза, а

их аналогов или ингибиторов – для терапии тяжелых хронических, в том числе сердечно-сосудистых, заболеваний.

МикроРНК-424 (miR-424), как показано в экспериментальных исследованиях, играет важную физиологическую роль при гипоксии, постишемическом ремоделировании сердца и сосудов, ангиогенезе; уровень его экспрессии связан с тяжестью атеросклероза, прогрессированием легочной артериальной гипертензии и гипертрофии правого желудочка [Baptista R., et al., 2018; Malik R. et al., 2017]. MiR-424 обладает иммуносупрессивным потенциалом: подавляет периферический иммунный и воспалительный ответ [Li G. et al., 2021]. Данных о физиологической роли и диагностическом потенциале микроРНК у реципиентов сердца крайне мало.

Цель исследования

Определить клиническое значение экспрессии микроРНК (miR-424) при трансплантации сердца и диагностическую эффективность данного показателя при развитии посттрансплантационных осложнений.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать величину экспрессии miR-424 в плазме крови потенциальных реципиентов сердца и провести сравнительный анализ уровня циркулирующей miR-424 у пациентов с хронической сердечной недостаточностью и у здоровых лиц.

2. У потенциальных реципиентов сердца оценить связь величины экспрессии miR-424 с клиническими и лабораторными данными, а также концентрацией биомаркеров посттрансплантационных осложнений.

3. Оценить изменения величины экспрессии miR-424 в ранние и отдаленные сроки после трансплантации сердца и связь этого показателя с клинико-лабораторными данными у реципиентов сердца.

4. Охарактеризовать связь величины экспрессии miR-424 в плазме крови реципиентов сердца с концентрацией такролимуса и с наличием гистологических и иммуногистохимических признаков острого отторжения трансплантата.

5. Определить связь уровня циркулирующей miR-424 у реципиентов сердца с выявлением бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами.

б. Определить диагностическую эффективность уровня экспрессии miR-424 и дуплексного теста на miR-424 и С-реактивный белок при бактериальной инфекции, вызванной грамотрицательными микроорганизмами, у реципиентов сердца и легких.

Научная новизна

Новыми являются данные о величине и динамике экспрессии сигнальной молекулы miR-424 в плазме крови пациентов до и в различные сроки после трансплантации сердца; впервые показана связь уровня экспрессии miR-424 в плазме крови с развитием хронической сердечной недостаточности и ее этиологией.

Впервые установлена связь уровня циркулирующей miR-424 в плазме крови реципиентов сердца с концентрацией ингибитора кальциневрина (такролимус) в крови в ранние сроки после трансплантации.

Впервые установлена и охарактеризована связь величины экспрессии miR-424 с выявлением бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, в ранние сроки после трансплантации сердца; новыми являются данные о диагностической эффективности комплексного теста, включающего определение уровня miR-424 и С-реактивного белка при бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, у реципиентов сердца и легких.

Теоретическая и практическая значимость

Обнаруженные изменения величины экспрессии miR-424 у больных хронической сердечной недостаточностью и корреляция уровня циркулирующей miR-424 с содержанием эритроцитов, гемоглобина и биомаркера неоангиогенеза PLGF могут иметь теоретическое значение при изучении его физиологической роли при гипоксии, постишемическом ремоделировании сосудов и неоангиогенезе и иметь потенциальное прогностическое и диагностическое значение у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Данные об изменении уровня экспрессии miR-424 у пациентов до и после трансплантации сердца (ТС) указывают на ее вовлеченность в развитие патологических процессов у реципиентов сердца и могут иметь перспективу использования для разработки новых диагностических и терапевтических тактик при осложнениях посттрансплантационного периода.

Выявленная взаимосвязь между уровнем циркулирующей miR-424 и содержанием ингибитора кальциневрина (такролимуса) в крови реципиентов сердца указывает на участие miR-424 в процессах формирования иммунных

взаимоотношений организма реципиента и трансплантата, может иметь значение при разработке подходов к персонализации иммуносупрессии.

Измерение уровня экспрессии miR-424 может быть полезным в качестве скринингового лабораторного теста для выявления реципиентов сердца с риском развития бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами в ранние сроки после трансплантации.

Практическое значение имеет выявленная диагностическая значимость miR-424 при бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, а также повышение диагностических характеристик miR-424 в дулексном тесте с С-реактивным белком.

Методология и методы исследования

В работе представлен анализ уровня экспрессии miR-424 в плазме крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью и реципиентов сердца в различные сроки после трансплантации.

Оценена связь величины экспрессии miR-424 с развитием острого отторжения трансплантированного сердца, верифицированного по данным исследования образцов эндомиокардиальных биоптатов, и бактериемии, верифицированной на основании микробиологических исследований.

Определение уровня экспрессии miR-424 осуществлялось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР); концентрация протеомных биомаркеров измерялась иммуноферментным методом в различных модификациях.

Валидизация и оценка диагностических характеристик лабораторных тестов проводилась с помощью ROC-анализа, определения порогового значения, чувствительности, специфичности, позитивной и негативной предсказательной значимости. Статистический анализ и интерпретация полученных результатов производились с использованием непараметрических методов статистики, исходя из характеристики распределения значений исследуемых величин.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Величина экспрессии miR-424 в плазме крови пациентов с хронической сердечной недостаточностью выше, чем у здоровых лиц и зависит от этиологии сердечной недостаточности у потенциальных реципиентов сердца.

2. Уровень экспрессии miR-424 после трансплантации сердца коррелирует с содержанием иммуносупрессанта такролимуса в крови реципиентов в ранние сроки после трансплантации.

3. Экспрессия miR-424 у реципиентов сердца с верифицированной бактериемией, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, достоверно выше, чем у реципиентов без таковой.

4. Величина экспрессии miR-424 обладает диагностической эффективностью в отношении развития инфекционных осложнений у реципиентов сердца и легких; совместная оценка величины экспрессии miR-424 и содержания С-реактивного белка повышает диагностическую эффективность теста.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется объемом проведенных исследований (образцы плазмы крови, полученные от 121 обследованного) с использованием современных и стандартизированных методов исследования и статистической обработки.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России на осуществление научных исследований и разработок по теме: «Разработка подходов к улучшению отдаленных результатов трансплантации сердца путем создания персонализированных методов диагностики и лечения острой и хронической дисфункции трансплантата и коморбидных состояний у реципиентов» (2018-2020 гг.), а также в рамках гранта Президента Российской Федерации (2020-2021 гг.) для государственной поддержки ведущих научных школ по теме: «Молекулярно-генетические маркеры структурного и функционального ремоделирования трансплантата сердца, легкого и разработка персонализированных подходов к лечению сердечной, легочной недостаточности у реципиентов» НШ-2598.2020.7.

Апробация работы состоялась 7 октября 2021 г. на совместной конференции научных и клинических подразделений федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России), кафедры трансплантологии и искусственных органов Института клинической медицины имени Н. В. Склифосовского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова).

Основные результаты работы доложены и обсуждены на X Всероссийском съезде трансплантологов с международным участием (Москва, 5-7 октября 2020 г.); на V Российском национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (с международным участием; Москва, 27-29 сентября 2021 г.).

Внедрение в практику

Результаты исследования используются в кардиологическом отделении ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в клинко-диагностической лаборатории и лаборатория иммунологического мониторинга ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в учебном процессе на кафедре трансплантологии и искусственных органов ИКМ им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в разработке концепции и постановке задач исследования; самостоятельно осуществлял сбор материала для исследования, выполнял определение уровня циркулирующей miR-424 в плазме крови пациентов. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведены статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук. Получен патент РФ и два положительных решения Федеральной службы по интеллектуальной собственности (Роспатент) о выдаче патентов на изобретения.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной характеристике пациентов и методов исследования, трех глав результатов собственных исследований, обсуждения, 7 выводов, практических рекомендаций и указателя используемой литературы, включающего 25 отечественных и 113 зарубежных источников. Работа изложена на 114 страницах машинописного текста, иллюстрирована 24 таблицами и 21 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование включено 83 пациента с застойной сердечной недостаточностью в возрасте от 16 до 70 (48 ± 13) лет, из них 64 (77,1%) – мужчины, которым в период с 2013 по 2016 гг. была выполнена ортотопическая трансплантация сердца (ТС) в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России.

Дополнительно в исследование были включены 26 реципиентов легких в возрасте от 10 до 74 (36 ± 16) лет, оперированных в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России в период с 2014 по 2020 годы; группу сравнения составили 12 здоровых лиц.

Обследование пациентов проводилось в соответствии со стандартным протоколом и включало: общеклиническое физикальное обследование; лабораторные исследования (общий анализ крови и мочи, развернутый биохимический анализ крови, развернутая коагулограмма, концентрация такролимуса, бактериологические и вирусологические исследования и др.), рентгенологические исследования; электрокардиография; магнитно-резонансная и мультиспиральная компьютерная томография, мультипроекционная коронарография, исследования параметров центральной гемодинамики.

Все реципиенты получали трехкомпонентную иммуносупрессивную терапию, включающую комбинацию ингибиторов кальциневрина (такролимус) и цитостатиков (микофенолата мофетил или микофеноловая кислота), а также варьирующие дозы преднизолона перорально, в зависимости от сроков после операции и частоты эпизодов отторжения трансплантата и адьювантную медикаментозную терапию по показаниям).

Измерение концентрации такролимуса проводили иммунохимическим методом, используя анализатор ARCHITECT i2000 (Abbott, США) и набор реагентов ARCHITECT TacrolimusKit (Abbott, США) (клинико-диагностическая лаборатория – зав. к.м.н. Н.П. Шмерко).

Верификацию острого отторжения трансплантата производили на основании гистологического и иммуногистохимического исследования образцов тканей миокарда, полученных при эндомикардиальной биопсии (ЭМБ) (отделение рентгеноэндоваскулярной диагностики и хирургического лечения – зав. отделением профессор Б.Л. Миронков; отделение патологоанатомическое – зав. отделением д.м.н. Н.П. Можейко).

Верификация бактериемии производилась на основании данных бактериологических исследований посевов крови. Идентификация выделенных

штаммов микроорганизмов и определение антибиотикочувствительности осуществлялись с применением бактериологического анализатора MicroScanWalkAway 96 PlusSystem (США); на анализаторе Osiris (Biorad Laboratories, Франция) определялись зоны задержки роста микроорганизмов (бактериологическая лаборатория отдела эндотоксикозов и гнойно-септических осложнений – зав. д.м.н. Н.И. Габриэлян).

В качестве материала для исследования использованы образцы плазмы венозной крови пациентов; кровь собирали в утреннее время в одноразовые пробирки с этилендиаминуксусной кислотой; плазму замораживали и хранили при -20°C .

Уровень экспрессии miR-424 измеряли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с помощью наборов реагентов SerumPlasma (Qiagen, США). Концентрацию галектина-3 измеряли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов Human Galectin-3 Platinum ELISA (Bender MedSystems GmbH, Вена, Австрия); плацентарного фактора роста PlGF-1 и хемоаттрактантного белка макрофагов MCP-1 – с помощью технологии xMAP, устройства для фиксирования магнитных частиц на дне планшета (Hand-Held Magnetic) и наборов реагентов Simplex ProcartaPlex™ (Affymetrix, США).

Статистический анализ результатов проведен с помощью пакета программ Statistica v. 13.0 (StatSoftInc, США) и MEDCALC 12.7.5.0 (MedCalc software, Бельгия). Применение статистических критериев (U-критерий Манна-Уитни) обусловлено типом анализируемых данных. Для оценки связи качественных и количественных признаков применялся Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r).

Значения непараметрических данных выражены медианой и интерквартильным размахом [25%-75%]. Показатели параметрических данных представлены в виде верхней и нижней границы 95%-ого доверительного интервала (95% ДИ).

Для всех критериев и тестов двусторонний уровень обозначения статистической значимости выбран $p < 0,05$. Посредством ROC-анализа осуществлялся выбор теста, обладающего наилучшей диагностической силой. Диагностическую значимость теста определяли путем расчета чувствительности (Se), специфичности (Sp), относительного риска (RR), диагностической эффективности (De), положительного и отрицательного прогностического значения теста (PPV и NPV соответственно).

Результаты исследования

Анализ уровня циркулирующей miR-424 у пациентов, страдающих хронической сердечной недостаточностью (потенциальных реципиентов сердца)

Исследование уровня экспрессии miR-424 проводили в образцах плазмы крови 83 пациентов, исходно страдавших хронической сердечной недостаточностью (ХСН), среди которых: 50 пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП), 30 – с ишемической болезнью сердца (ИБС), 3 – дисфункции ранее трансплантированного сердца, что стало показанием к ретрансплантации. Группы пациентов с ИБС, ДКМП и здоровых лиц не отличались по полу (70%, 66% и 62% мужчин соответственно); пациенты с ИБС были несколько старше (52 ± 6 лет), чем пациенты с ДКМП (40 ± 12 лет) и здоровые лица (44 ± 2 лет).

Величина экспрессии miR-424 у пациентов с ХСН варьировала в широких пределах и значимо не различалась у мужчин и женщин, ожидающих ТС ($p=0,14$). Не выявлено значимой корреляции экспрессии miR-424 с возрастом потенциальных реципиентов ($r=0,24$; $p=0,26$).

У пациентов с ХСН установлены достоверно более высокие значения miR-424 в сравнении со здоровыми лицами ($p=0,003$), что может свидетельствовать о возможной связи miR-424 с развитием патологии сердечно-сосудистой системы. У пациентов с ИБС медиана экспрессии miR-424 значимо выше в сравнении с группой здоровых лиц ($p=0,00001$), и пациентов с ДКМП ($p=0,02$) (рисунок 1).

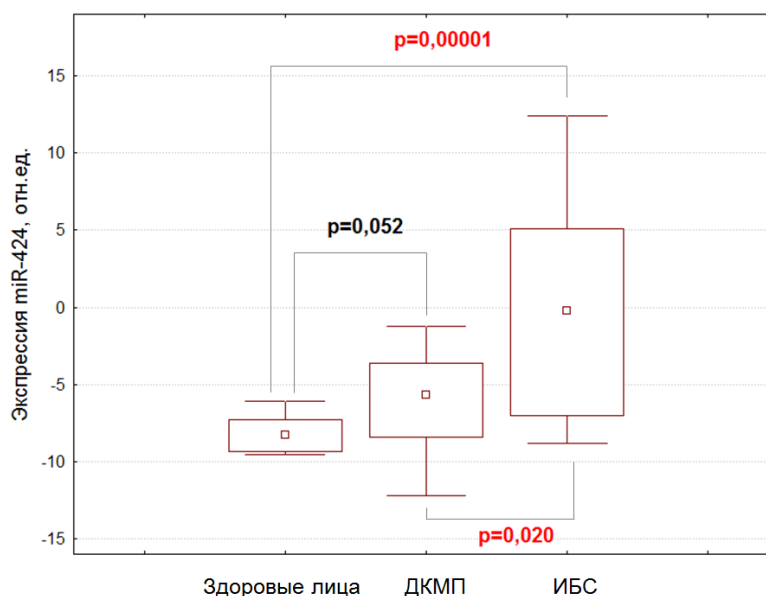


Рисунок 1 – Анализ уровня экспрессии miR-424 у пациентов с ДКМП и ИБС в сравнении с группой здоровых лиц

При анализе влияния сопутствующих заболеваний на уровень микроРНК не выявлено различий экспрессии miR-424 у пациентов с сахарным диабетом ($p=0,91$) или хронической болезнью почек ($p=0,40$) в сравнении с пациентами без указанных заболеваний.

Корреляционный анализ уровня циркулирующей miR-424 с показателями общего и биохимического анализов крови пациентов, ожидающих ТС, показал, что величина экспрессии miR-424 не зависела от большинства общеклинических показателей крови, однако имела место прямая корреляция уровня miR-424 с содержанием в крови эритроцитов ($r=0,581$; $p=0,009$) и гемоглобина ($r=0,500$; $p=0,033$) (таблица 1).

Таблица 1 – Корреляционный анализ уровня экспрессии miR-424 с показателями общего анализа крови у пациентов до ТС

Параметры общего анализа крови	Корреляция Спирмена	
	r	p
Эритроциты ($10^{12}/л$)	$r= 0,581$	$p=0,009$
Гемоглобин (г/л)	$r= 0,500$	$p=0,033$
Лейкоциты ($10^9/л$)	$r= -0,300$	$p=0,197$
Тромбоциты ($10^9/л$)	$r= -0,108$	$p=0,668$
Нейтрофилы		
палочкоядерные (%)	$r= -0,175$	$p=0,678$
сегментоядерные(%)	$r= -0,140$	$p=0,663$
Лимфоциты (%)	$r= -0,020$	$p=0,948$
Эозинофилы (%)	$r= 0,139$	$p=0,665$
Базофилы (%)	$r= -0,297$	$p=0,348$
Моноциты (%)	$r= -0,216$	$p=0,501$
СОЭ (мм/час)	$r= -0,330$	$p=0,250$

Корреляционный анализ уровня экспрессии miR-424 и основных параметров биохимического анализа крови пациентов с ХСН не выявил достоверной связи ни с одним из показателей.

Выявлена обратная корреляция уровня экспрессии miR-424 с концентрацией биомаркера фиброза тканей галектина-3 ($r= -0,596$; $p=0,025$); а также прямая корреляция с уровнем биомаркера неоангиогенеза плацентарного фактора роста PLGF-1 ($r=0,683$; $p=0,042$), связи между концентрацией MCP-1 (хемоаттрактантный белок макрофагов, биомаркер воспаления) и уровнем miR-424 не обнаружено ($r=0,400$; $p=0,286$).

Сравнительный анализ концентрации галектина-3, MCP-1 и PLGF-1 (0,421; 0,261; 0,223, соответственно) не выявил различий между группами пациентов с ДКМП и ИБС.

Анализ экспрессии miR-424 у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации

У реципиентов сердца величина экспрессии miR-424 в плазме крови варьирует в широких пределах в ранние и отдаленные сроки после ТС.

При сравнительном анализе величины miR-424 в различные сроки после трансплантации установлено, что в раннем (30±14 суток) посттрансплантационном периоде уровень miR-424 достоверно ниже, чем у пациентов до трансплантации ($p=0,01$) (рисунок 2).

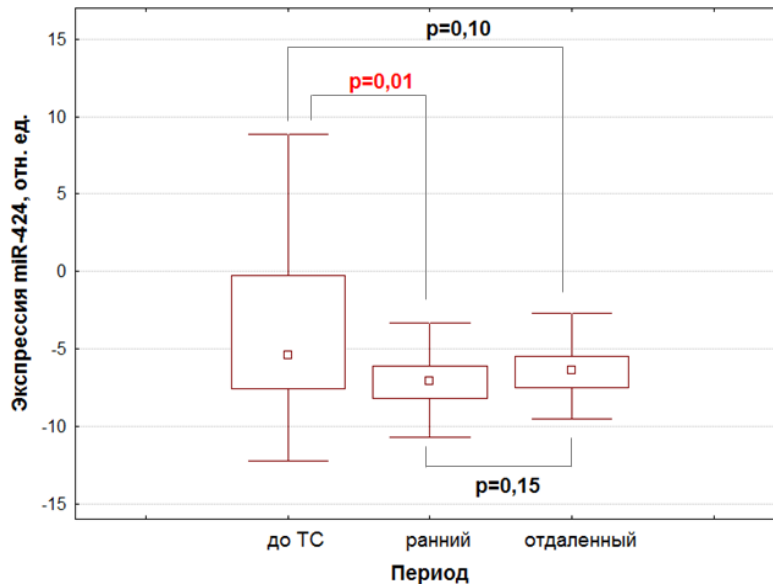


Рисунок 2 – Сравнительный анализ уровня экспрессии miR-424 у пациентов до ТС и реципиентов сердца в раннем и отдаленном периодах

Достоверных различий уровня циркулирующей miR-424 у реципиентов спустя год после ТС (334±69 суток, отдаленный период) с пациентами, ожидающими трансплантацию, как и с уровнем у реципиентов в ранние сроки, не установлено ($p=0,10$).

Анализ связи величины циркулирующей miR-424 у реципиентов сердца в различные сроки после трансплантации с основными клиническими и лабораторными данными показал отсутствие различий у реципиентов с исходным диагнозом ИБС и ДКМП как в раннем, так и в отдаленном послеоперационном периоде ($p=0,88$ и $p=0,36$ соответственно).

У 17 реципиентов в раннем посттрансплантационном периоде отмечалась острая почечная недостаточность (ОПН), требовавшая применения методов заместительной почечной терапии; значимых различий в уровне циркулирующей miR-424 с реципиентами сердца без ОПН установлено не было ($p=0,18$, рисунок 3).

Среди реципиентов с ОПН пять пациентов до трансплантации страдали ХБП и ОПН, развившаяся на фоне приема лекарственных препаратов.

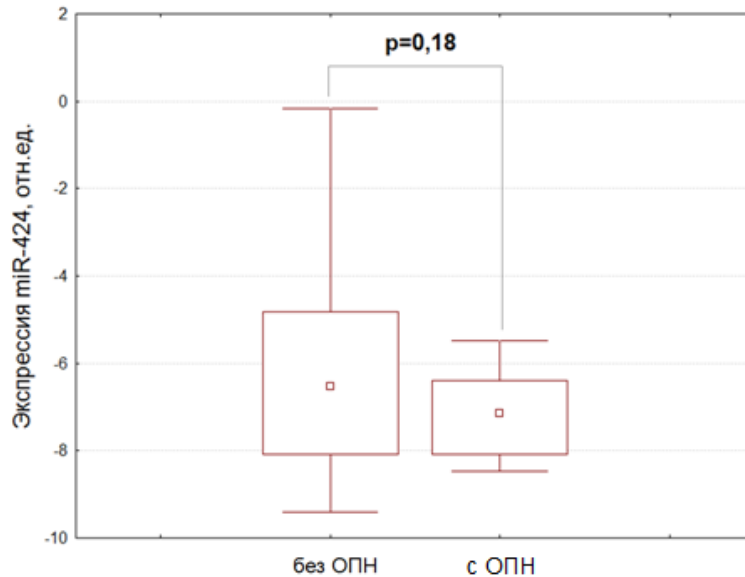


Рисунок 3 – Сравнительный анализ уровня экспрессии miR-424 у реципиентов сердца с ОПН и без таковой

Сравнительный анализ пациентов с ОПН с реципиентами без таковой показал, что величина экспрессии miR-424 не зависела от функции почек.

При сравнении с реципиентами без ОПН значимых различий в уровне циркулирующей miR-424 ни в подгруппе реципиентов с предшествующей ХБП ($p=0,44$), ни с ОПН, развившейся после ТС ($p=0,14$), не установлено.

Корреляционный анализ общеклинических параметров крови и величины экспрессии miR-424 показал наличие обратной связи miR-424 с содержанием моноцитов у реципиентов сердца в раннем посттрансплантационном периоде ($r= -0,659$; $p=0,027$) (рисунок 4).

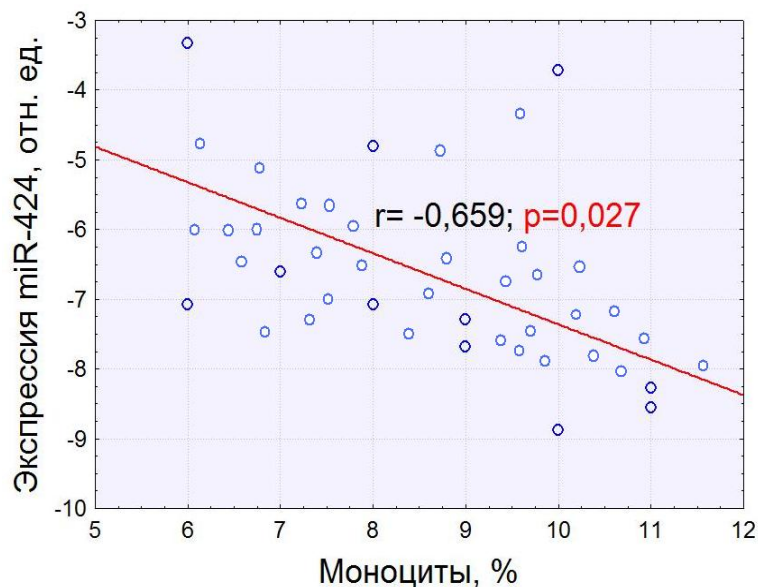


Рисунок 4 – Корреляция уровня экспрессии miR-424 с содержанием моноцитов в крови реципиентов в ранние сроки после ТС

У реципиентов сердца спустя год и более после операции значимых корреляций величины miR-424 с другими параметрами общего анализа крови не установлено ($p>0,05$), т.е. имела место независимость уровня циркулирующей miR-424 от традиционных лабораторных параметров крови.

При корреляционном анализе экспрессии miR-424 с содержанием параметров биохимического анализа крови достоверной связи с большей частью показателей не было установлено (таблица 2).

Таблица 2 – Корреляционный анализ показателей экспрессии miR-424 с биохимическими показателями крови у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после ТС

Параметры биохимического анализа крови	Корреляция Спирмена (r, p)	
	Ранний период	Отдаленный период
Белок общий (г/л)	r= 0,112; p=0,728	r= 0,223; p=0,359
Билирубин общий (мкмоль/л)	r= -0,381; p=0,220	r= -0,121; p=0,613
Мочевина (ммоль/л)	r= -0,434; p=0,158	r= 0,255; p=0,264
Креатинин (мкмоль/л)	r= -0,336; p=0,285	r= 0,005; p=0,982
АЛТ (Ед/л)	r= -0,133; p=0,678	r= -0,381; p=0,097
АСТ (Ед/л)	r= -0,372; p=0,233	r= -0,524; p=0,018
ЩФ (Ед/л)	r= -0,316; p=0,684	r= -0,500; p=0,117
Холестерин (ммоль/л)	r= 0,500; p=0,667	r= -0,146; p=0,576
Глюкоза (ммоль/л)	r= -0,286; p=0,534	r= 0,138; p=0,654
СРБ (мг/л)	r= 0,752; p=0,019	r= -0,414; p=0,355

В первый месяц после ТС у реципиентов сердца имела место прямая связь miR-424 с содержанием С-реактивного белка ($r= 0,752$; $p=0,019$); в отдаленные сроки после ТС наблюдается обратная корреляция активности маркера цитолиза АСТ с экспрессией miR-424 ($r= -0,524$; $p=0,018$).

У реципиентов сердца в различные сроки после ТС проведен корреляционный анализ величины циркулирующей miR-424 с концентрацией биомаркеров, значимых для диагностики посттрансплантационных осложнений. Установлено, что в ранние сроки после ТС экспрессия miR-424 обратно коррелирует с концентрацией галектина-3 ($r=-0,534$; $p=0,033$). Ни в ранние ни в отдаленные сроки после ТС не выявлено значимых корреляций с биомаркерами осложнений, связанными с воспалением и неоангиогенезом, MCP-1 и PlGF-1 ($p>0,05$).

Исследование связи уровня циркулирующей miR-424 с концентрацией такролимуса в крови реципиентов сердца

Анализ связи величины экспрессии miR-424 с содержанием ингибитора кальциневрина (такролимуса) в крови реципиентов сердца показал, что концентрация такролимуса в крови реципиентов в раннем посттрансплантационном периоде обратно коррелировала с величиной экспрессии miR-424 ($r=0,383$; $p=0,044$) (рисунок 5).

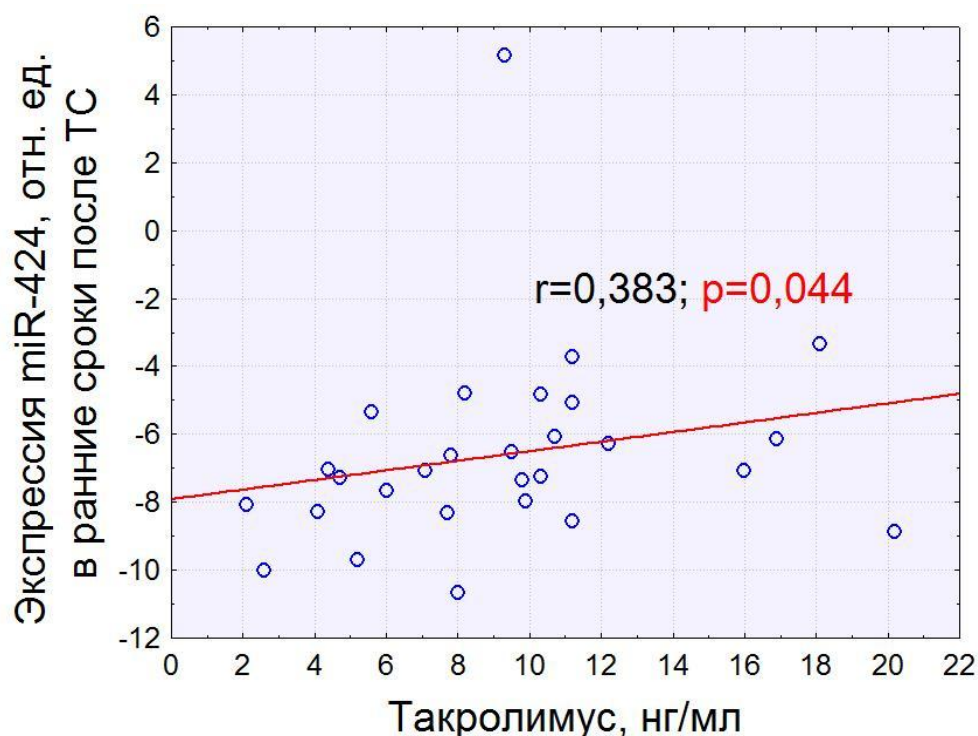


Рисунок 5 – Корреляция уровня экспрессии miR-424 с содержанием такролимуса в крови реципиентов в ранние сроки после ТС

С учетом выявленной зависимости уровня циркулирующей miR-424 и концентрации такролимуса в крови реципиентов сердца проведен сравнительный анализ величины экспрессии miR-424 в плазме крови реципиентов сердца с гистологическими и иммуногистохимическими признаками острого отторжения трансплантата и без таковых.

В течение первого месяца после ТС у 40 реципиентов были верифицированы кризы острого отторжения, по данным исследования эндомикардиальных биоптатов. Сравнение величины экспрессии miR-424 в крови реципиентов сердца с острым отторжением и без такового не показало достоверных различий (рисунок 6).

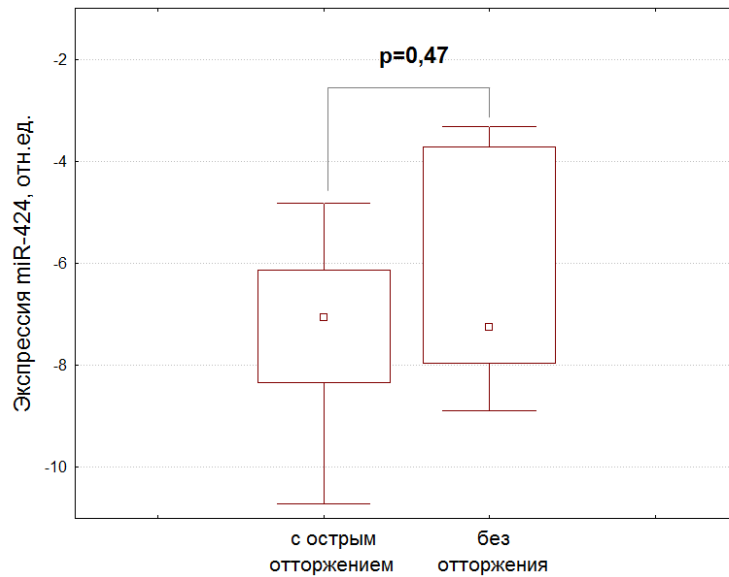


Рисунок 6 – Уровень экспрессии miR-424 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата в ранние сроки после ТС и без такового

В соответствии с классификацией ISHLT-2004 выделены 36 реципиентов с острым клеточным отторжением (R1G – R3G степени) и 4 реципиента – с гуморальным и оценен уровень экспрессии исследуемой микроРНК в зависимости от характера отторжения (рисунок 7).

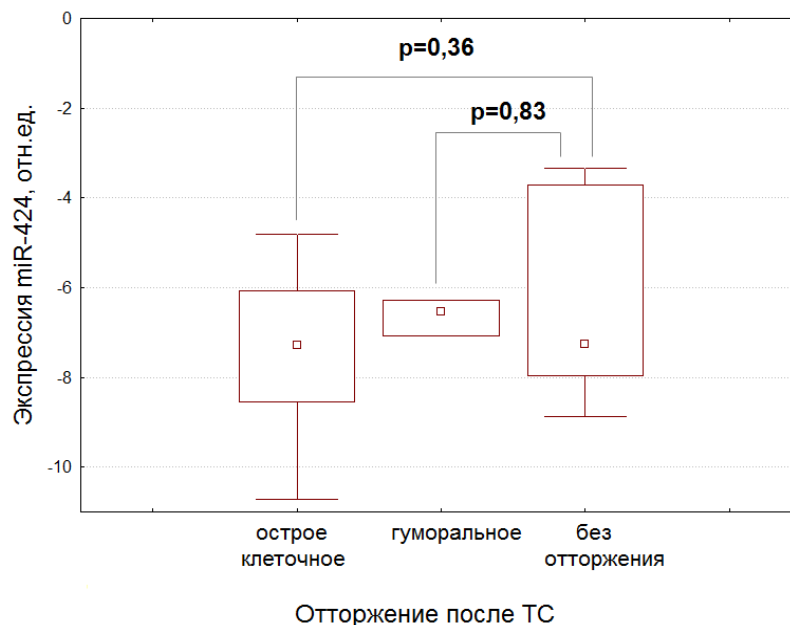


Рисунок 7 – Уровень экспрессии miR-424 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата в ранние сроки после ТС и без такового

Сравнительный анализ показал, что в группах реципиентов сердца как с острым клеточным, так и с гуморальным отторжением трансплантата, величина экспрессии miR-424 достоверно не различалась с группой реципиентов без признаков отторжения ($p=0,36$ и $p=0,83$ соответственно).

Анализ экспрессии miR-424 в плазме крови реципиентов сердца с верифицированной бактериемией, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами

По результатам бактериологических исследований посевов крови у 20 реципиентов сердца в раннем посттрансплантационном периоде верифицирована бактериемия, ассоциированная с различными возбудителями. Согласно результатам бактериологических исследований, основную долю микроорганизмов составили представители грамотрицательных бактерии *Acinetobacter baumannii* (55,0 %), *Acinetobacter lwoffii* (20,0 %) и *Klebsiella pneumoniae* (40,0 %), обладающие широкой лекарственной устойчивостью.

Проведен сравнительный анализ уровня экспрессии miR-424 у реципиентов сердца с признаками бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, и без таковых (рисунок 8).

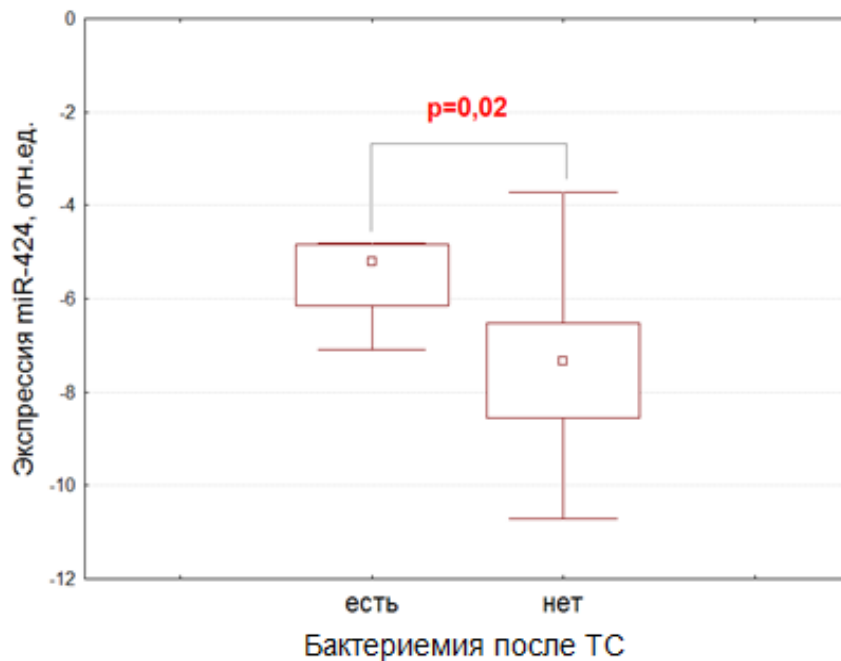


Рисунок 8 – Уровень экспрессии miR-424 у реципиентов сердца с бактериемией, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, в ранние сроки после ТС и без таковых

Установлено, что у реципиентов сердца с верифицированной бактериемией, ассоциированной с грамотрицательной микрофлорой, имел место значимо более высокий уровень циркулирующей miR-424 ($p=0,02$).

Медиана концентрации такролимуса в крови реципиентов сердца составила 9,6 [6,3; 12,1] нг/мл. Достоверных различий в медианах концентрации такролимуса в крови реципиентов сердца с бактериемией и без таковой не обнаружено (таблица 3).

Таблица 3 – Сравнительный анализ концентрации такролимуса в группах реципиентов сердца с бактериемией, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, и без таковой

Бактериemia после ТС	Концентрация такролимуса	Достоверность, р*
Есть	8,2 [5,8; 11,2]	0,48
Нет	9,8 [7,7; 12,5]	

Частота развития бактериемии у реципиентов сердца с концентрацией такролимуса в крови выше и ниже медианы составила 23% и 35% соответственно и достоверно не различалась ($p=0,63$).

Установленный факт показывает, что величина концентрации такролимуса в крови реципиента не может быть индикатором риска развития бактериемии после ТС.

Определение диагностической значимости miR-424 при верифицированной бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, у реципиентов сердца и легких

Установленный факт более высокого уровня циркулирующей miR-424 у реципиентов сердца с бактериемией, ассоциированной с грамотрицательной микрофлорой, указывает на связь miR-424 с инфекцией у пациентов после ТС и его возможное диагностическое значение. Для валидации miR-424 как лабораторного теста необходимо произвести расчеты его диагностической значимости.

Для более точной характеристики диагностической значимости теста на miR-424 в отношении бактериальной инфекции в исследование были дополнительно включены 26 пациентов, перенесших трансплантацию легких (ТЛ) в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России. Группы реципиентов легких и реципиентов сердца не различались по гендерному составу ($p=0,13$). Реципиенты легких были несколько моложе (36 ± 16 лет) реципиентов сердца ($p=0,001$), что не препятствует объединению реципиентов, поскольку величина циркулирующей miR-424 с возрастом достоверно не коррелирует. Сравнительный анализ уровня циркулирующей miR-424 у реципиентов сердца и легких не показал достоверных различий ни до трансплантации ($p=0,74$), ни после нее ($p=0,11$).

Среди 26 реципиентов легких у 17-ти в раннем посттрансплантационном периоде была выявлена бактериemia. Как и у реципиентов сердца, в большинстве случаев ее возбудителями выступали грамотрицательные микроорганизмы *Acinetobacter baumannii* (52,9%) и *Klebsiella pneumoniae* (52,9%). Как и в группе реципиентов сердца, у реципиентов легких с бактериемией, ассоциированной с

граммотрицательными бактериями, величина циркулирующей miR-424 значимо выше, чем у реципиентов легких без таковой ($p=0,04$, рисунок 9).

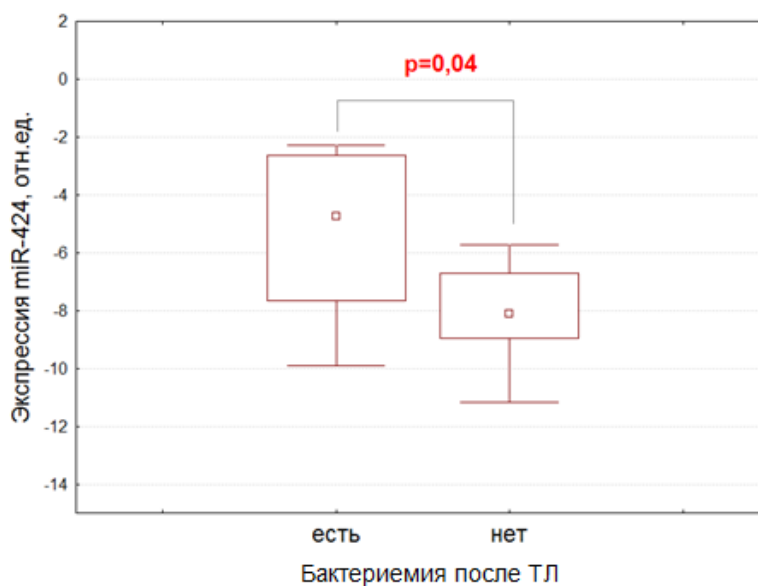


Рисунок 9 – Уровень экспрессии miR-424 у реципиентов легких с бактериемией, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, и без таковой в ранние сроки после ТЛ

При сравнении реципиентов сердца и легких с бактериемией (таблица 4) значимых различий в уровне miR-424 также не было установлено ($p=0,66$), что дает основание объединить реципиентов сердца и легких с бактериемией для оценки диагностической значимости экспрессии miR-424.

Таблица 4 – Сравнительный анализ уровня экспрессии miR-424 у реципиентов с бактериемией и без таковых в ранние сроки после трансплантации сердца и легких (ТС и ТЛ)

Реципиенты	Экспрессия miR-424 медиана [интерквартильный размах]		Достоверность, р
	ТС	ТЛ	
Без бактериемии	-7,34 [-8,44; -6,57]	-8,10 [-8,92; -6,79]	0,47
С бактериемией	-5,22 [-5,95; -4,89]	-4,74 [-7,48; -2,93]	0,66

Оценка диагностической значимости miR-424 при бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, проводили с помощью ROC-анализа. Оценена площадь под ROC-кривой, которая составила $0,75 \pm 0,07$ [95% ДИ 0,61 – 0,85] и достоверно отличалась от величины 0,5 ($p=0,001$, рисунок 10).

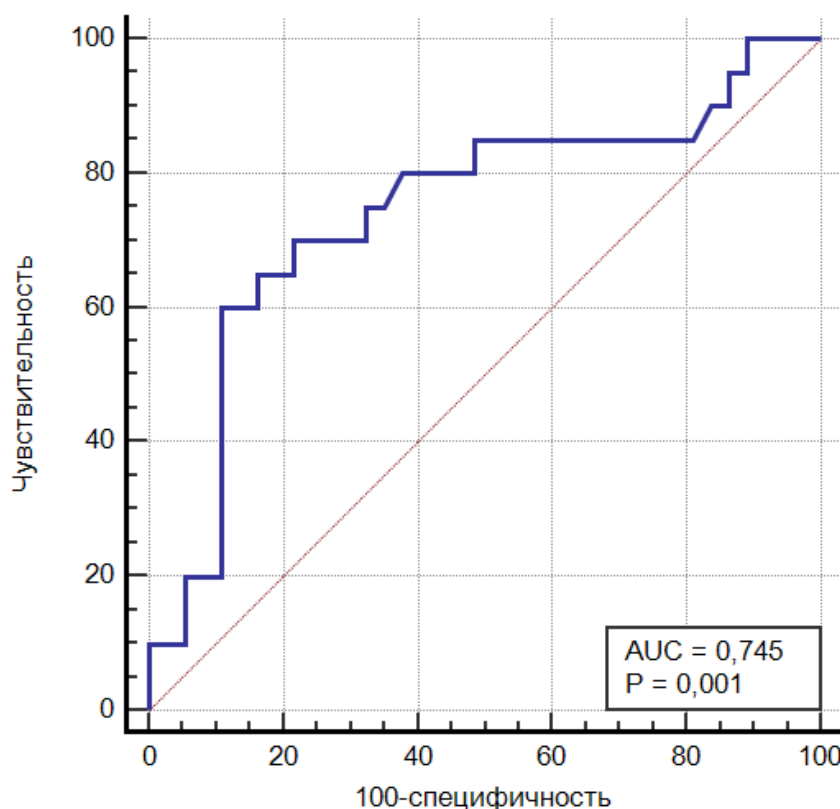


Рисунок 10 – ROC-кривая уровня экспрессии miR-424 у реципиентов сердца и легких с развитием бактериемии в раннем посттрансплантационном периоде

Диагностически значимый пороговый уровень miR-424 в отношении развития бактериемии составил $-5,72$ отн. ед.; относительный риск выявления бактериемии, вызванной грамотрицательными микроорганизмами, при величине экспрессии miR-424 выше рассчитанного порогового уровня составил $RR=3,84+0,35$ [95% ДИ 1,94–7,61]), $p=0,0001$ при чувствительности и специфичности теста 60,0% и 89,2% соответственно.

Доля реципиентов сердца с бактериемией, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, и без таковой достоверно различалась в зависимости от величины экспрессии miR-424 (рисунок 11).

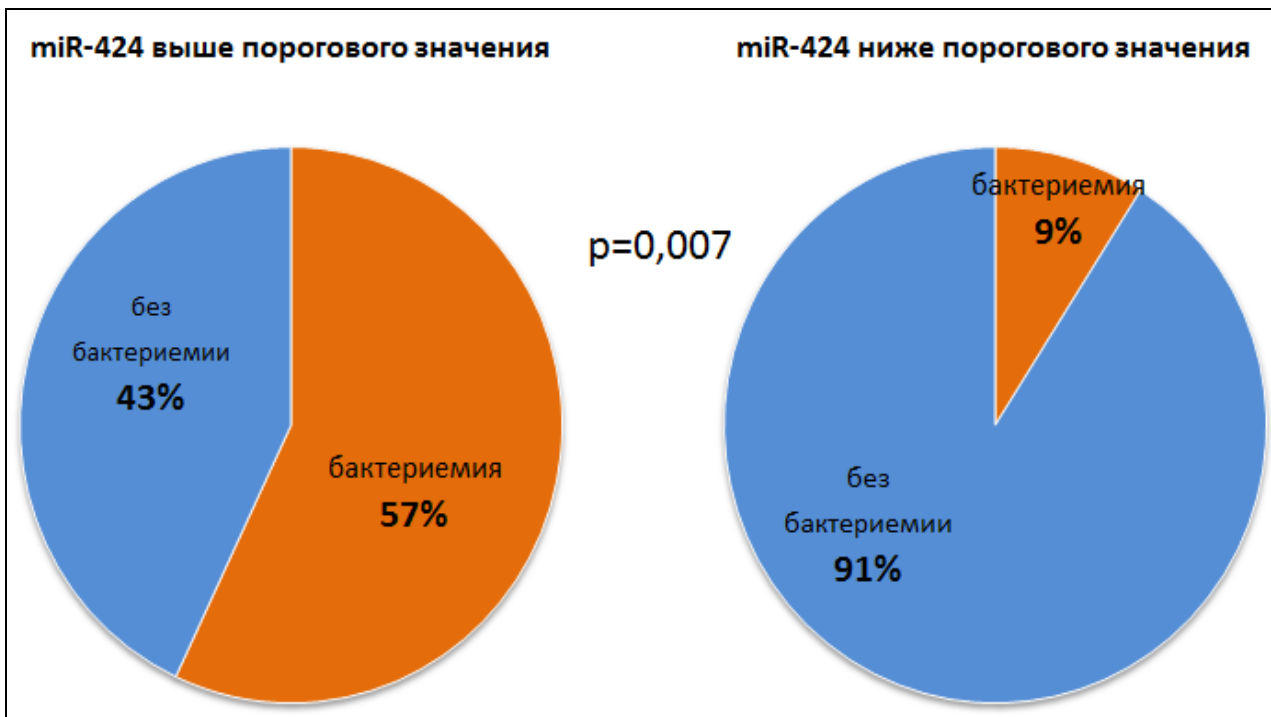


Рисунок 11 – Доля реципиентов сердца с бактериемией, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, в группах реципиентов сердца с уровнем miR-424 выше и ниже порогового значения

В группе реципиентов сердца с уровнем циркулирующей miR-424 выше рассчитанного порогового значения частота развития бактериемии достоверно выше, чем в группе с величиной экспрессии ниже порогового значения ($p=0,007$). Таким образом, в отличие от такролимуса, концентрация которого в крови у реципиентов сердца не отражает наличие бактериемии после ТС, уровень циркулирующей miR-424 может иметь практическое значение для мониторинга осложнений бактериального генеза.

Ввиду наличия у реципиентов сердца корреляции циркулирующей miR-424 с содержанием С-реактивного белка (СРБ), индикатора острой фазы воспаления, была проанализирована его диагностическая значимость для выявления пациентов бактериемией. В качестве порогового уровня концентрации СРБ принимали 7 мг/л, при этом относительный риск выявления бактериемии у реципиентов сердца и легких составлял 2,01 раза при чувствительности и специфичности 61,9% и 69,2% соответственно (таблица 5).

Таблица 5 – Диагностические характеристики совместного измерения уровней экспрессии miR-424 и концентрации СРБ у реципиентов сердца и легких с бактериемией

Биомаркер	RR	Границы 95% ДИ	Se	Sp	De	PPV	NPV
СРБ	2,0 1	[1,03 – 3,92]	61,9 %	69,2 %	66,0 %	61,9 %	69,2 %
miR-424	3,8 4	[1,94 – 7,61]	60,0 %	89,2 %	78,9 %	75,0 %	80,5 %
miR-424+СРБ	9,1 7	[1,37 – 61,46]	83,3 %	90,1 %	88,2 %	83,3 %	90,9 %

RR – относительный риск; Se – чувствительность; Sp – специфичность; De – диагностическая эффективность; PPV, NPV – положительное и отрицательное прогностическое значение теста

Тест, включающий совместное определение величины экспрессии miR-424 и концентрации СРБ, обладает наилучшими диагностическими характеристиками: при уровне экспрессии miR-424 выше порогового значения (-5,72 отн. ед.) и одновременном превышении концентрации СРБ в крови реципиентов более 7 мг/л риск развития бактериемии возрастает до 9,2 раза (RR=9,17±0,97 [95% ДИ 1,37– 61,46]), при этом чувствительность и специфичность составила 83,3% и 90,1%, соответственно (рисунок 12).

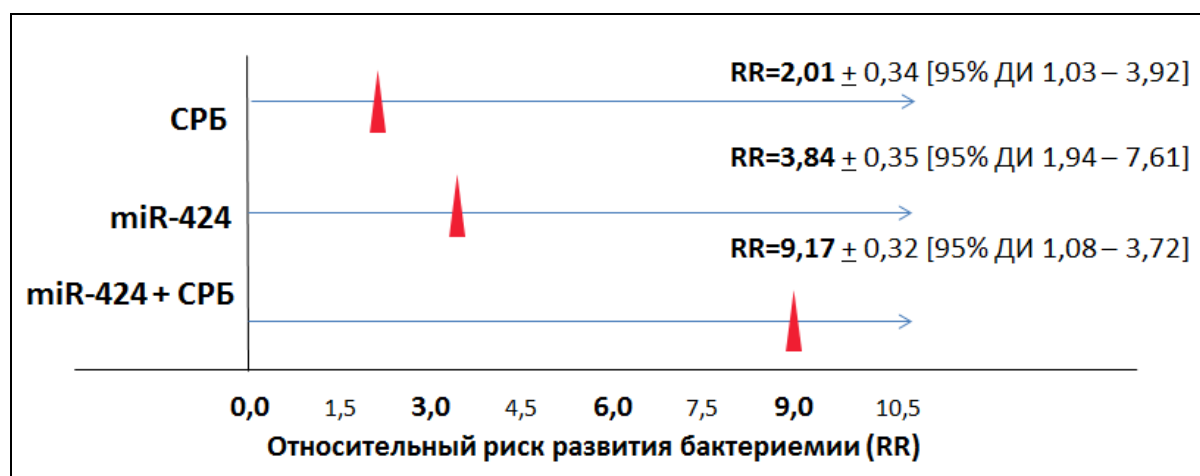


Рисунок 12 – Относительный риск развития бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, у реципиентов сердца и легких с уровнем miR-424 выше порогового значения(-5,72 отн. ед.)

Представленные результаты позволяют сделать вывод об эффективности сочетания miR-424 с неспецифическим маркером воспаления СРБ в комплексном тесте для скрининга пациентов с бактериемией после трансплантации сердца и легких, а также перспективности дальнейшего изучения циркулирующих микроРНК в качестве эффективных биомаркеров осложнений у реципиентов солидных органов.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с хронической сердечной недостаточностью средний уровень циркулирующей miR-424 достоверно выше, чем у здоровых лиц ($p=0,003$); отличия уровня циркулирующей miR-424 от здоровых более выражены у пациентов с ИБС, нежели с ДКМП.

2. У пациентов с ХСН величина экспрессии miR-424 не зависит от пола, возраста, наличия сопутствующих сахарного диабета, хронической болезни почек и не коррелирует с большинством лабораторных параметров крови, но связана с содержанием эритроцитов ($r=0,581$; $p=0,009$), гемоглобина ($r=0,500$; $p=0,033$), концентрацией биомаркеров фиброза (галектина-3; $r= -0,596$; $p=0,025$) и неоангиогенеза (плацентарного фактора роста PLGF-1; $r=0,683$; $p=0,042$).

3. У реципиентов сердца величина экспрессии miR-424 варьирует в широких пределах и коррелирует в раннем посттрансплантационном периоде с содержанием моноцитов ($r= -0,659$; $p=0,027$) и С-реактивного белка ($r= 0,752$; $p=0,019$).

4. Уровень циркулирующей miR-424 связан с содержанием такролимуса в крови реципиентов сердца в ранние сроки после трансплантации ($r=0,383$; $p=0,044$), но не различается у реципиентов с гистологическими и иммуногистохимическими признаками отторжения трансплантата и без таковых.

5. У реципиентов сердца с верифицированной бактериемией, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, уровень циркулирующей miR-424 достоверно выше, чем у реципиентов без таковой ($p=0,02$).

6. При величине экспрессии miR-424 выше рассчитанного порогового значения риск развития бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, у реципиентов сердца, легких в 3,9 раза выше, чем у реципиентов с величиной экспрессии ниже порогового уровня.

7. При одновременном выявлении у реципиента уровня циркулирующей miR-424 выше $-5,72$ отн. ед. и концентрации С-реактивного белка более 7 мг/л риск обнаружения бактериемии, ассоциированной с грамотрицательными микроорганизмами, в 9,2 раза выше, чем у остальных реципиентов, при чувствительности и специфичности теста $83,3\%$ и $90,1\%$, соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Контроль уровня циркулирующей miR-424 может быть полезным для оценки состояния пациентов с хронической сердечной недостаточностью и реципиентов в ранние сроки после трансплантации сердца.

Определение величины экспрессии miR-424 у реципиентов сердца может иметь значение для персонализированного подхода к выбору оптимального режима иммуносупрессивной терапии.

Измерение уровня циркулирующей miR-424 у реципиентов сердца целесообразно использовать для скрининга пациентов с риском развития инфекционных осложнений бактериального генеза.

Реципиентам сердца с уровнем циркулирующей miR-424 выше -5,72 отн. ед. рекомендовано клиническое обследование на наличие бактериальной инфекции.

С целью повышения чувствительности и специфичности теста в отношении выявления реципиентов с риском инфекционных осложнений, рекомендовано совместное измерение уровня miR-424 и концентрации С-реактивного белка.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. МикроРНК-27 и -339 при фиброзе миокарда трансплантированного сердца: анализ диагностической значимости. / Шевченко О.П., Великий Д.А., Шарапченко С.О., Гичкун О.Е., Марченко А.В., Улыбышева А.А., Павлов В.С., Можейко Н.П., Колоскова Н.Н., Шевченко А.О. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23. – № 3. – С.73-81.

2. Связь уровня экспрессии микроРНК в плазме крови реципиентов сердца с концентрацией биомаркеров посттрансплантационных осложнений. / Великий Д.А., Гичкун О.Е., Улыбышева А.А., Шарапченко С.О., Марченко А.В., Шевченко О.П., Шевченко А.О. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 69-78.

3. Великий Д.А., Шевченко О.П., Шарапченко С.О., Гичкун О.Е., Марченко А.В., Можейко Н.П., Улыбышева А.А., Павлов В.С., Колоскова Н.Н., Шевченко А.О. Анализ диагностической значимости микроРНК miR-27 и miR-339 при фиброзе миокарда трансплантированного сердца. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2021;23(S):48.

4. Великий Д.А., Гичкун О.Е., Марченко А.В., Улыбышева А.А., Шевченко А.О., Шевченко О.П. Уровень экспрессии микроРНК у реципиентов сердца и его связь с концентрацией биомаркеров отторжения и фиброза миокарда. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2020;22(S):38-39.

Патенты и изобретения:

1. Способ неинвазивной диагностики фиброза миокарда трансплантированного сердца. Великий Д.А., Шарапченко С.О., Гичкун О.Е., Марченко А.В., Можейко Н.П., Улыбышева А.А., Шевченко А.О., Шевченко О.П. Решение о выдаче патента на изобретение от 24.09.2021, Заявка № 2021108611 от 30.03.2021.

2. Способ диагностики острого отторжения трансплантата у реципиентов трансплантированного сердца. Шевченко О.П., Великий Д.А., Гичкун О.Е., Можейко Н.П., Марченко А.В., Шарапченко С.О., Шевченко А.О. Решение о выдаче патента на изобретение от 28.09.2021, Заявка № 2020142677 от 23.12.2020

3. Амид нонапептида, обладающий способностью предотвращать повышение проницаемости эндотелия сосудов. Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н., Куликова Т.Г., Марченко А.В., Молокоедов А.С., Секридова А.В., Сидорова М.В., Степанова О.В., Ширинский В.П. Патент на изобретение RU 2402565 C1, 27.10.2010. Заявка № 2009116126/04 от 29.04.2009.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспартатаминотрансфераза
ДИ – доверительный интервал
ДКМП – дилатационная кардиомиопатия
ИБС – ишемическая болезнь сердца
miR – микрорибонуклеиновая кислота микроРНК
ОПН – острая почечная недостаточность
СОЭ – скорость оседания эритроцитов
СРБ – С-реактивный белок
ТЛ – трансплантация легких
ТС – трансплантация сердца
ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России – федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
ХСН – хроническая сердечная недостаточность
ЩФ – щелочная фосфатаза
ЭМБ – эндомиокардиальная биопсия
MCP-1 – хемоаттрактантный белок макрофагов
PLGF-1 – плацентарный фактор роста-1