

ШАРАПЧЕНКО СОФЬЯ ОЛЕГОВНА

**МИКРОРНК ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЛЕГКИХ:
АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ
И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ**

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

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:

Доктор медицинских наук,
профессор

Шевченко Ольга Павловна

Официальные оппоненты:

Метельская Виктория Алексеевна – доктор биологических наук, профессор, руководитель отдела изучения биомаркеров риска хронических неинфекционных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Яблонский Петр Казимирович – доктор медицинских наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «15» декабря 2020 г. в 14⁰⁰ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.055.01 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 «____»

2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного Совета Д 208.055.01
кандидат ветеринарных наук

Волкова Елена Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Трансплантация легких (ТЛ) в настоящее время является радикальным и единственно возможным вариантом лечения хронических заболеваний легких в терминальной стадии [Kreisel D. et al., 2011; Cooper J. D. et al., 2016].

Согласно регистру Международного общества трансплантации сердца и лёгких (ISHLT), ежегодно в мире выполняется около 4000 пересадок легких и около 40 – сердечно-легочного комплекса [Yusen R. et al., 2019]. В России данное направление получило активное развитие относительно недавно [Готье С. В. и соавт., 2014]. В 2019 году в РФ было выполнено 25 трансплантаций легких, 17(68%) из которых – в федеральном государственном бюджетном учреждении «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).

К настоящему времени достигнуты значимые успехи в увеличении продолжительности и улучшении качества жизни реципиентов солидных органов [Готье С. В. и соавт., 2016; Шевченко А. О. и соавт., 2018], однако по данным Международного общества трансплантации сердца и легких, пятилетняя выживаемость реципиентов легких составляет около 53%. Главная проблема на пути к улучшению отдаленных результатов трансплантации легких – развитие посттрансплантационных осложнений, ведущих к дисфункции трансплантата [Gharib S. A. et al., 2015; Verleden S. E. et al., 2016; Weigt S.S. et al., 2013]. В числе факторов, определяющих отдаленные клинические результаты трансплантации легких, выступают особенности иммунных взаимоотношений трансплантата и организма реципиента [Todd J. L. et al., 2011; Готье С. В. и соавт., 2015; Diamond J. M. et al., 2016; Potestio C. et al., 2017].

Выполнение трансбронхиальной биопсии (ТББ) с последующим гистологическим исследованием биопсийного материала позволяет верифицировать патологию трансплантата, однако сопряжено с рисками и ограничениями, характерными для инвазивных вмешательств. В связи с этим разрабатываются технологии ранней диагностики осложнений у реципиентов солидных органов, что стимулирует интерес к изучению биомаркеров – растворимых молекул различной природы, изменение концентрации которых в плазме (сыворотке) крови или других биологических жидкостях отражает течение патологических процессов [Bartel D. P., 2009; Greenland J. R. et al., 2014; Hamilton

В. С. S. et al., 2017; Yang J. Y. C., 2017]. В последние годы активно изучаются микроРНК, представляющие собой семейство небольших некодирующих РНК, которые действуют как регуляторные элементы посттранскрипционных процессов. Считается, что микроРНК регулируют экспрессию более чем 30% генов, кодирующих структуру белков, и играют ключевую роль в реакциях иммунного ответа, развитии сердечно-сосудистых и других заболеваний, влияют на функции фибробластов, дендритных клеток, Т-лимфоцитов [Shan J. et al., 2011 Amrouche L. et al., 2014, Великий Д.А. и соавт., 2018].

На сегодняшний день имеются данные о связи изменения уровня экспрессии отдельных видов микроРНК в крови реципиентов солидных органов с развитием посттрансплантационных осложнений, однако роль микроРНК при трансплантации легких мало изучена, и представлены лишь единичные исследования, посвященные изучению сигнальных молекул у реципиентов легких [Sarma N. J. et al., 2012; Zhang W. et al., 2013].

Дальнейшие исследования роли как отдельных микроРНК, так и мультимаркерных тестов на их основе, должны позволить получить достоверные критерии для ранней диагностики риска осложнений после трансплантации легких и формированию принципиально новых подходов к терапии.

Цель исследования

Определить уровень экспрессии микроРНК, потенциально значимых при развитии посттрансплантационных осложнений у реципиентов легких, и оценить диагностическую значимость этих показателей.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать уровень экспрессии микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) в плазме крови пациентов, ожидающих трансплантацию легких, и определить связь этих показателей с клиническими и лабораторными данными.
2. Оценить изменения величины экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 у реципиентов легких в ранние и отдаленные сроки после трансплантации.
3. Определить связь величины экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 с клиническими и лабораторными показателями у реципиентов легких.
4. Определить связь величины экспрессии микроРНК с параметрами функции внешнего дыхания у реципиентов легких.

5. Провести сравнительный анализ величины экспрессии микроРНК у реципиентов с различным течением посттрансплантационного периода.

6. Определить диагностически значимое пороговое значение экспрессии miR-339 при развитии обструктивных процессов бронхиальных путей легочного трансплантата.

7. У реципиентов легких определить диагностическую эффективность комплексного теста, включающего определение уровня экспрессии miR-339 и концентрации галектина-3 в плазме крови.

Научная новизна

Новыми являются данные о величине и динамике экспрессии микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) в плазме крови пациентов до и в различные сроки после трансплантации легких.

Впервые выявлена связь уровня экспрессии miR-142 в плазме крови с показателями функции внешнего дыхания у пациентов до и после трансплантации легких.

Новыми являются данные о связи уровня экспрессии отдельных микроРНК в плазме крови реципиентов легких с величиной лабораторных параметров (содержанием лейкоцитов, тромбоцитов, креатинина, билирубина и др.).

Впервые установлена связь уровня экспрессии miR-27 и miR-101 с развитием верифицированного острого отторжения легочного трансплантата.

Впервые выявлена и охарактеризована связь величины экспрессии miR-339 с риском развития обструктивных процессов в бронхиальных путях у реципиентов трансплантированных легких.

Новым является комплексный тест, включающий miR-339 и галектин-3, обладающий диагностической эффективностью при обструктивных процессах в бронхиальных путях легочного трансплантата.

Теоретическая и практическая значимость

Данные об изменении величины экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 у реципиентов легких и связи этих показателей с клиническими (индекс массы тела, возраст, этиология дыхательной недостаточности), лабораторными (уровень лейкоцитов, тромбоцитов, креатинина, билирубина и др.) и функциональными параметрами (функция внешнего дыхания) указывают на участие этих молекул в регуляции гомеостаза у реципиентов легких, и могут быть использованы для разработки новых подходов к диагностике и лечению патологии легочного трансплантата.

Выявленная связь уровней экспрессии miR-142 в плазме крови реципиентов с клиническими и лабораторными показателями, а также наличием признаков обструктивных и рестриктивных изменений трансплантата может указывать на вовлеченность miR-142 в патогенез посттрансплантационных осложнений у реципиентов легких.

Измерение уровней экспрессии miR-27 и miR-101 может быть использовано в качестве скринингового лабораторного индикатора для выявления реципиентов легких с риском острого отторжения трансплантата.

Перспективы практического использования имеет выявленная диагностическая значимость miR-339 при развитии обструктивных процессов бронхов трансплантированных легких, а также повышение диагностических характеристик miR-339 в комбинации с измерением концентрации галектина-3.

Методология и методы исследования

В исследовании представлены результаты анализа уровня экспрессии пяти микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) в плазме крови у пациентов с дыхательной недостаточностью в терминальной стадии у реципиентов донорских легких в ранние и отдаленные сроки после трансплантации. Охарактеризована связь уровня экспрессии микроРНК с результатами лабораторных и биохимических показателей крови до и после трансплантации легких; исследована зависимость величины уровней микроРНК, галектина-3 и sCD40L от наличия и характера посттрансплантационных осложнений: инфекционных (выявленных на основании микробиологических исследований образцов крови, мокроты и бронхоальвеолярного лаважа) и осложнений со стороны дыхательных путей (выявленных на основании результатов спирографии, компьютерной томографии, трансбронхиальной биопсии). Для определения уровней экспрессии микроРНК был применен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР); концентрации галектина-3 и sCD40L измеряли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для анализа и обобщения результатов настоящего исследования применялись методы параметрической и непараметрической статистики, что обусловлено особенностями распределения значений исследуемых величин.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Величина экспрессии miR-27, miR-101 и miR-339 в плазме крови пациентов с хронической дыхательной недостаточностью выше, чем у здоровых лиц; уровень экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 после трансплантации легких варьирует в широком диапазоне

и не зависит от содержания иммуносупрессивных препаратов (такролимуса, эверолимуса) в крови реципиентов.

2. Уровень экспрессии miR-142 коррелирует со снижением показателей функции внешнего дыхания у пациентов с дыхательной недостаточностью и у реципиентов легких.

3. Экспрессия miR-27 и miR-101 у реципиентов с верифицированным острым отторжением легочного трансплантата выше, чем у реципиентов без признаков посттрансплантационных осложнений.

4. Измерение уровня экспрессии miR-339 обладает диагностической эффективностью в отношении развития обструктивных процессов в бронхиальных путях у реципиентов легких; совместная оценка величины экспрессии miR-339 и концентрации галектина-3 повышает диагностическую эффективность теста.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется объемом проведенных исследований (125 образцов плазмы крови, полученные от 69 пациентов, обследованных до и после трансплантации легких) с использованием современных и стандартизированных методов исследования и статистической обработки. Работа выполнена в рамках государственных заданий Минздрава России на осуществление научных исследований и разработок по темам: «Разработка биотехнологических, биомедицинских, клинических подходов к повышению эффективности трансплантации сердца и легких» (2015-2017 гг.), «Разработка путей повышения эффективности трансплантации легких как радикального метода лечения терминальных стадий хронических респираторных заболеваний у взрослых и детей» (2018-2020 гг.); 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 06 июля 2020 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, 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 IV Российском национальном конгрессе с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2019 г.), а также на X Всероссийском съезде трансплантологов с международным участием (Москва, 2020 г.).

Внедрение в практику

Результаты исследования используются в хирургическом отделении №3, в отделе регуляторных механизмов в трансплантологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в учебном процессе на кафедре 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).

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в разработке концепции и постановке задач исследования; самостоятельно осуществляла сбор материала для исследования, выполнила определение уровней экспрессии микроРНК методом ПЦР, а также концентрации биомаркеров с помощью иммуноферментного анализа. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведена статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, из них 6 статей в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной характеристике пациентов и методам исследования, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения, 7 выводов, практических рекомендаций и указателя используемой литературы, включающего 165 источников, из них 22 отечественных и 143 зарубежных. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, иллюстрирована 36 таблицами и 31 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В исследование включены 69 пациентов исходно страдавших хронической дыхательной недостаточности различной этиологии, в их числе 57 реципиентов в возрасте от 10 до 74 лет (в среднем 35 ± 15), которым в период с 2014 г. по 2019 г. выполнена трансплантация донорских легких в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России. Среди них шестеро детей (9%) – четыре мальчика 10, 12, 13 и 17 лет и девочки 13 и 14 лет; а также 51 взрослый реципиент от 18 до 74 (37 ± 14) лет, в том числе 30 (62,5%) мужчин.

Плановое обследование пациентов проводилось по программе потенциального реципиента легких в хирургическом отделении №3 ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России в соответствии с клиническими рекомендациями Российского трансплантологического общества. Использованы данные инструментальных и лабораторных исследований, проводившихся в специализированных подразделениях ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России.

К лабораторным методам диагностики относились общий и биохимический анализы крови, а также вирусологическое и бактериологическое исследования.

В числе инструментальных методов диагностики были: компьютерная томография (КТ) и рентгенография органов грудной клетки, бронхоскопия, трансбронхиальная биопсия, оценка функции внешнего дыхания. Посредством спирографии осуществлялось измерение объемов форсированного выдоха в одну секунду ОФВ1 и форсированной жизненной емкости легких ФЖЕЛ, расчет индекса Тиффно ($\text{ОФВ1} / \text{ФЖЕЛ} \times 100\%$).

Верификация острого клеточного отторжения производилась по результатам трансбронхиальной биопсии и на основании клинической картины острой дыхательной недостаточности с наличием диффузного интерстициального уплотнения в лёгких по данным КТ и рентгенологического исследования.

Для оценки развития инфекционных процессов производилось бактериологическое обследование посевов крови, мокроты, бронхоальвеолярного лаважа.

Все реципиенты получали индукцию базиликсимабом и иммуносупрессивную терапию такролимусом, препаратами микофеноловой кислоты и метилпреднизолоном, при необходимости назначали эверолимус.

В качестве материала для исследования использованы образцы периферической крови пациентов, которые собирали в утреннее время, с 8 до 10 часов утра, в одноразовые пробирки с антикоагулянтом этилендиаминуксусной кислотой (ЭДТА), от 1 до 4-х (в среднем 1,22) образцов от каждого пациента.

Уровень экспрессии панели из пяти микроРНК (miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424) измеряли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с помощью наборов реагентов SerumPlasma (Qiagen, США); концентрацию галектина-3 и растворимой формы лиганда CD40 (sCD40L) измеряли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов Human Galectin-3 Platinum ELISA и Human CD40L Platinum ELISA (Bender MedSystems GmbH, Вена, Австрия).

Статистический анализ полученных результатов был проведен при помощи программного обеспечения и стандартных методов статистической обработки пакета прикладных программ «Statistica» v.13.0, StatSoftInc. (США). Методы непараметрической статистики использованы: для сравнения независимых переменных использован (U-критерий Манна-Уитни), для оценки связи качественных и количественных порядковых признаков (расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена). Для непараметрических переменных данные представлены медианой (М) и интерквартильным размахом [25%-75%], а для параметрических – верхней и нижней границами 95%-ого доверительного интервала (95% ДИ). Критический уровень значимости для всех критериев и тестов принимался равным 5%, т.е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Посредством ROC-анализа осуществлялся выбор теста, обладающего наилучшей диагностической силой.

К каждому из исследуемых биомаркеров, проявивших значимость в отношении тех или иных осложнений, построена соответствующая ROC-кривая. Оптимальный порог отсечения в данной работе выявлен посредством определения баланса между чувствительностью и специфичностью (максимальные значения). Оценивались диагностические характеристики, включающие расчет относительного риска развития осложнений, диагностической чувствительности (Se), специфичности (Sp) и эффективности (De) тестов.

Результаты исследования

Анализ уровня экспрессии микроРНК у потенциальных реципиентов легких

Исследование уровней экспрессии микроРНК проводили в образцах плазмы крови, взятой у 29 пациентов, страдавших хронической дыхательной недостаточностью в терминальной стадии, ожидающих трансплантацию легких. Среди них 17 (58,6%) пациентов мужского пола и 12 (41,4%) – женского. Сравнительный анализ уровней экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 не выявил значимых различий между мужчинами и женщинами, ожидающими трансплантацию ($p=0,37$, $p=0,85$, $p=0,98$, $p=0,27$ и $p=0,34$ соответственно). Группу сравнения составили 14 здоровых лиц.

Среди обследованных до трансплантации основную долю составили пациенты, страдающие муковисцидозом ($n=11$; 37,9%), хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и эмфиземой легких ($n=6$; 20,7%), легочной артериальной гипертензией (ЛАГ), в том числе синдромом Эйзенменгера ($n=6$; 20,7%); также в исследование вошли пациенты, страдающие легочным фиброзом различной этиологии ($n=4$; 13,8%) и лимфангиолейомиоматозом ($n=2$; 6,9%) (рисунок 1).

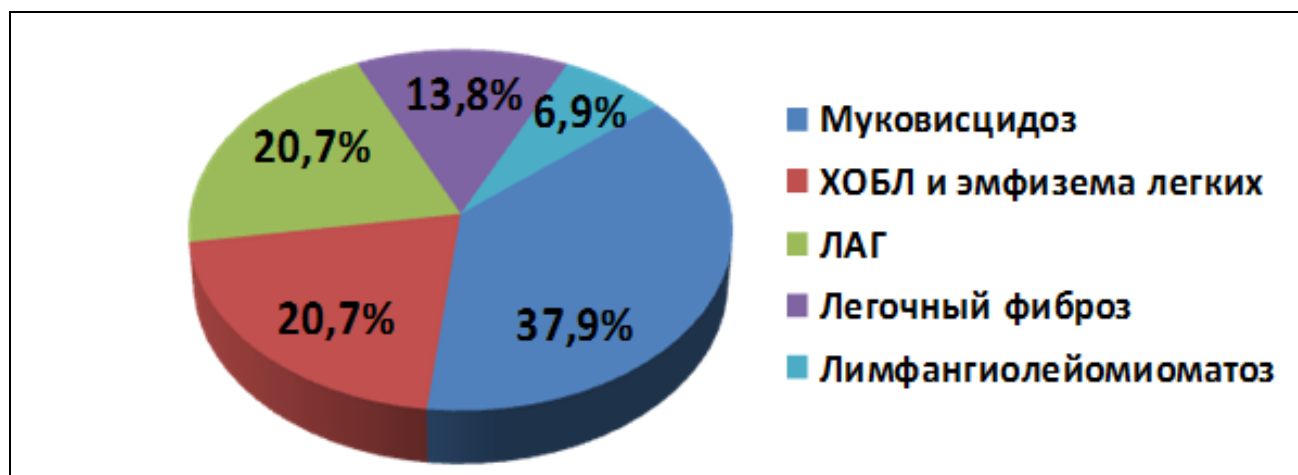


Рисунок 1 – Распределение основных заболеваний, послуживших причиной развития хронической дыхательной недостаточности у потенциальных реципиентов легких

Уровень экспрессии трех из пяти микроРНК(miR-27, miR-101 и miR-339) в группе потенциальных реципиентов легких достоверно выше такового у здоровых лиц ($p=0,02$, $p=0,03$ и $p=0,01$ соответственно); результаты сравнительного анализа представлены на рисунке 2.

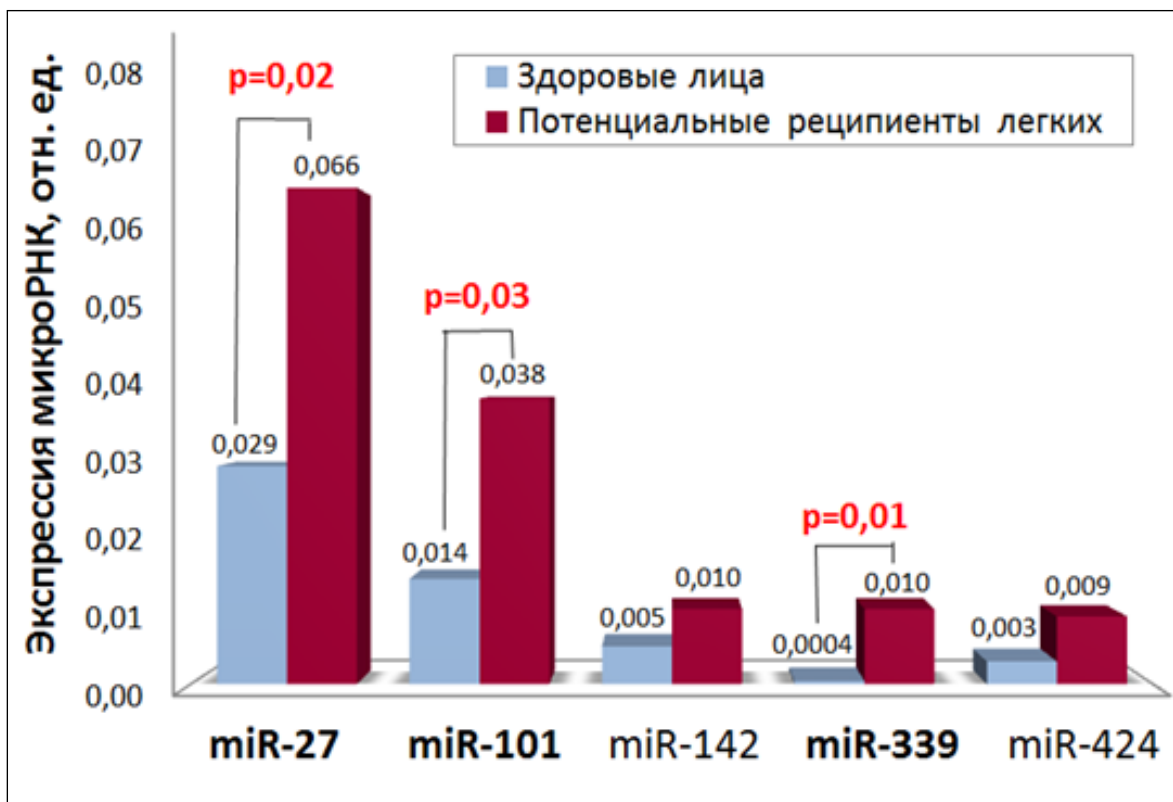


Рисунок 2 – Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 у потенциальных реципиентов и здоровых лиц

По сравнению со здоровыми лицами значимо более высокие показатели экспрессии miR-27 отмечались у пациентов с муковисцидозом ($p=0,008$). Повышенные значения экспрессии miR-101 зафиксированы у пациентов с муковисцидозом ($p=0,019$) и легочным фиброзом ($p=0,003$). Уровень экспрессии miR-142, существенно отличающийся от такового у здоровых лиц, зафиксирован у пациентов с муковисцидозом ($p=0,048$). Повышенный уровень miR-339 наблюдается у пациентов с ЛАГ ($p=0,003$). Значения экспрессии miR-424 отличаются от показателей здоровой группы и выше их только у пациентов с ХОБЛ и эмфиземой легких ($p=0,011$).

Проведен корреляционный анализ уровня экспрессии микроРНК у пациентов, ожидающих ТЛ, с основными клиническими и лабораторными данными, к которым относились: возраст, индекс массы тела (ИМТ), параметры функции внешнего дыхания, показатели общего и биохимического анализа крови.

Уровень экспрессии miR-339 коррелировал с возрастом потенциальных реципиентов легких ($p=0,04$; $r= -0,46$), и связь носила обратный характер, тогда как экспрессия остальных четырех микроРНК от возраста не зависела.

При обследовании пациентов до ТЛ установлено, что уровень экспрессии miR-27 находится в обратной зависимости ($r = -0,441$; $p = 0,027$) от величины ИМТ пациентов, находящихся в листе ожидания (рисунок 3); связи экспрессии miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 с ИМТ не обнаружено.

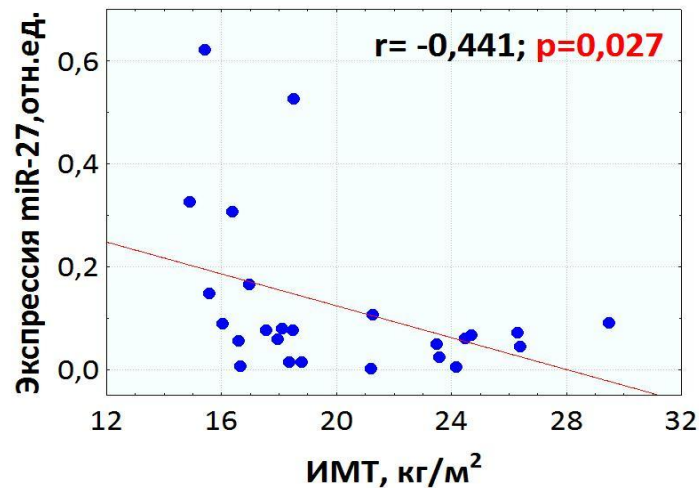


Рисунок 3 – Корреляция уровня экспрессии miR-27 с величиной индекса массы тела пациентов, ожидающих трансплантацию легких

Изучение показателей функциональных тестов внешнего дыхания позволило выявить обратную корреляцию экспрессии miR-142 со снижением процента ОФВ1 ($r = -0,663$; $p = 0,025$) и индекса Тиффно ($r = -0,605$; $p = 0,028$), что позволяет предположить вовлеченность miR-142 в развитие обструктивных процессов дыхательной системы.

Данные общеклинического анализа крови, включенные в исследование, составили следующие параметры: скорость оседания эритроцитов (СОЭ), содержанием гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов; относительным числом палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов, показателями гематокрита и тромбокрита. Анализ показал наличие прямой корреляции экспрессии miR-27 с содержанием лейкоцитов ($r = 0,498$; $p = 0,018$) и эозинофилов ($r = 0,560$; $p = 0,019$), miR-142 – с уровнем тромбоцитов ($r = 0,609$; $p = 0,004$), miR-339 – базофилов ($r = 0,511$; $p = 0,043$).

Были изучены возможные связи экспрессии исследуемых микроРНК с биохимическими показателями: активностью аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), концентрацией креатинина, мочевины, альбумина, общего белка, общего билирубина, холестерина, глюкозы, С-реактивного белка (СРБ). Выявлена связь miR-27 с содержанием глюкозы ($r = 0,561$; $p = 0,019$)

и креатинина ($r = -0,640; p = 0,002$); miR-142 – с концентрацией общего билирубина ($r = -0,531; p = 0,016$) и мочевины ($r = -0,631; p = 0,003$).

В качестве специальных лабораторных исследований проведена оценка связи экспрессии микроРНК с концентрацией биомаркеров, потенциально значимых при трансплантации солидных органов: биомаркера фиброза трансплантированных органов галектина-3 и растворимой формы костимулирующего фактора лимфоцитов лиганда CD40 (sCD40L). Результаты анализа демонстрируют прямую зависимость уровня экспрессии miR-27 ($r = 0,503; p = 0,047$) от концентрации галектина-3 (рисунок 4); зависимость miR-27 от концентрации sCD40L установить не удалось ($r = 0,430; p = 0,075$).

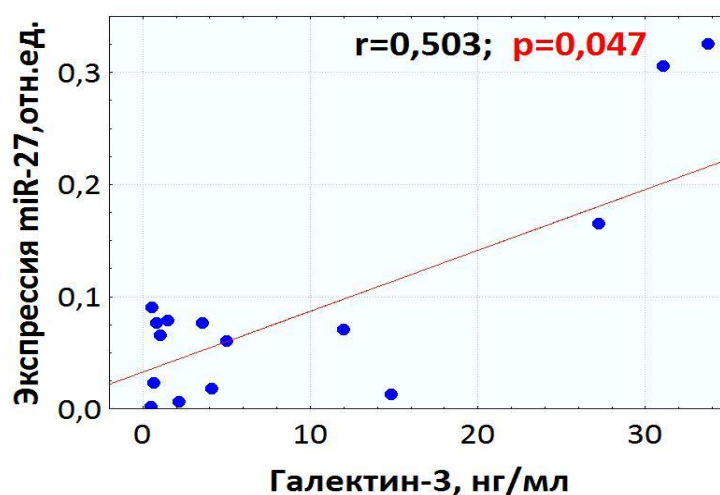


Рисунок 4 – Корреляция уровня экспрессии miR-27 с концентрацией галектина-3 в крови потенциальных реципиентов легких

Показатели экспрессии остальных четырех микроРНК miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 у пациентов на дотрансплантационном этапе не зависели от величины концентрации sCD40L ($p = 0,059$; $p = 0,308$; $p = 0,102$, $p = 0,161$ соответственно) и галектина-3 ($p = 0,087$; $p = 0,567$; $p = 0,168$, $p = 0,161$ соответственно).

Анализ уровня экспрессии микроРНК у реципиентов легких в ранние и отдаленные сроки после трансплантации

Период наблюдения реципиентов после ТЛ включал: ранний период – первые полгода после ТЛ (от 4 до 239, 88 ± 81 суток), отдаленные сроки – спустя год и более после ТЛ (от 260 до 1808, 704 ± 443 суток). Максимальная длительность наблюдения реципиентов после ТЛ составила 1808 суток (медиана 294 [85; 545]).

Значимых различий среднего уровня miR-27, miR-101, miR-142 и miR-339 у пациентов до, в ранние и отдаленные после ТЛ не выявлено (рисунок 5).

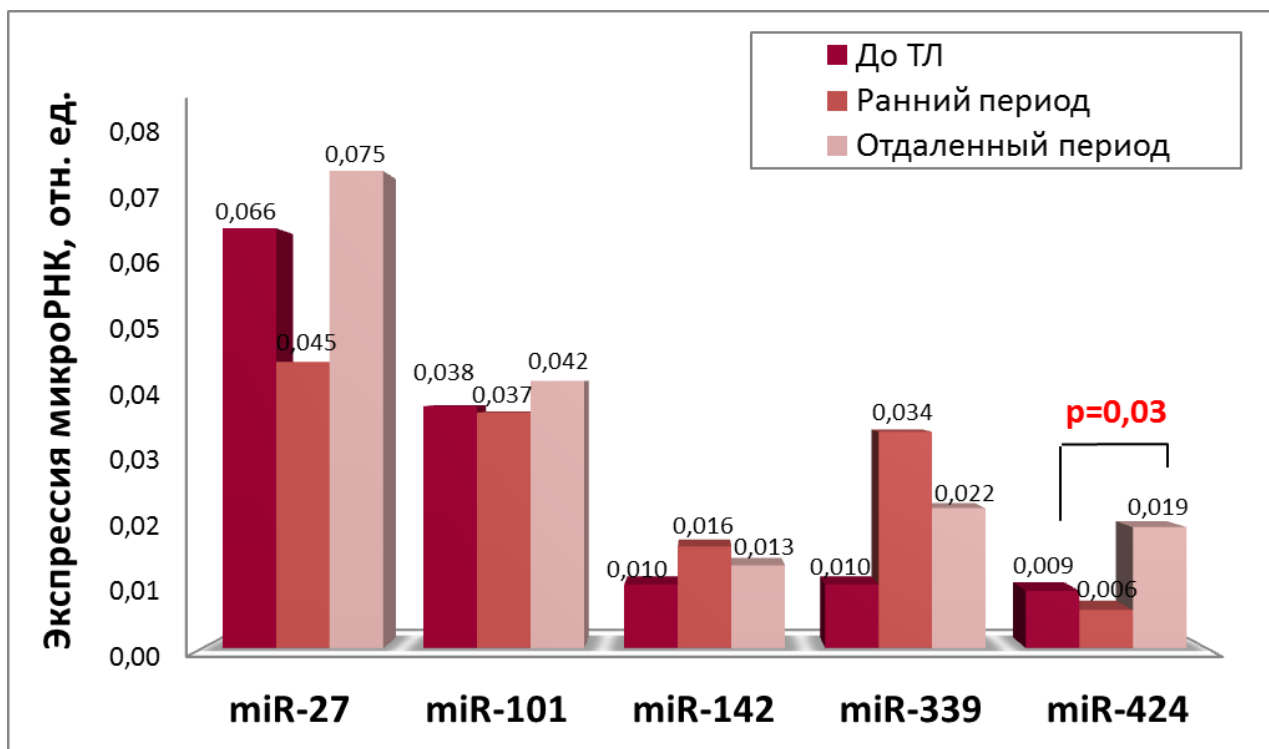


Рисунок 5 – Сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК у пациентов до ТЛ и реципиентов легких в раннем и отдаленном посттрансплантационном периоде

Уровень экспрессии miR-424 у реципиентов в отдаленные сроки достоверно отличался ($p=0,03$) и был выше, чем у пациентов до ТЛ.

В отдаленные сроки после ТЛ величина экспрессии miR-27 выше у реципиентов с дефицитом массы тела, установлена обратная корреляция экспрессии miR-27 с величиной ИМТ ($r= -0,328$; $p=0,047$, рисунок 6); в раннем посттрансплантационном периоде эта связь не столь значима ($r= 0,228$; $p=0,137$).

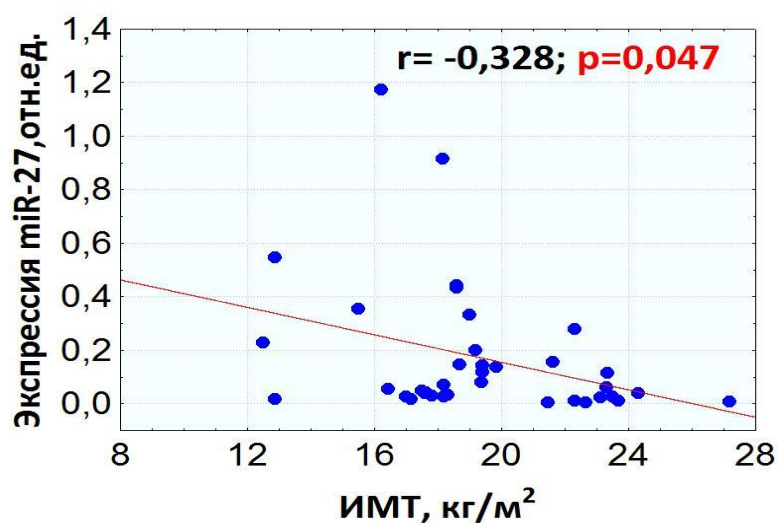


Рисунок 6 – Корреляция уровня экспрессии miR-27 с величиной индекса массы тела реципиентов в отдаленные сроки после ТЛ

Так в раннем послеоперационном периоде уровень экспрессии всех исследуемых сигнальных молекул у реципиентов не был связан с изменением показателей спирометрии, однако в более поздний период выявлена зависимость между экспрессией miR-142 и величиной индекса Тиффно ($r=0,612$; $p=0,035$), отражающего рестриктивную патологию, обусловленную нарушениями альвеолярного звена бронхо-легочной системы (рисунок 7).

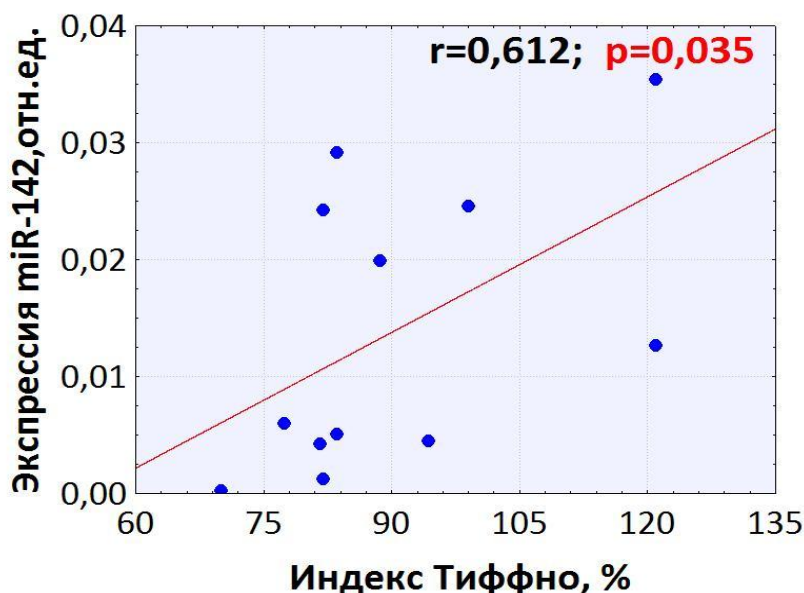


Рисунок 7 – Корреляция величины индекса Тиффно и уровня экспрессии miR-142 в крови реципиентов в отдаленном периоде после ТЛ

Значимая корреляция величины индекса Тиффно с экспрессией остальных микроРНК в отдаленные сроки отсутствовала.

Охарактеризована связь уровня экспрессии микроРНК с данными лабораторных исследований крови у реципиентов легких.

В раннем посттрансплантационном периоде установлена значимая обратная корреляция уровня miR-424 со скоростью оседания эритроцитов ($r= -0,593$; $p=0,042$); miR-101 – с относительным количеством палочкоядерных нейтрофилов ($r= -0,561$; $p=0,019$). Выявлена прямая связь уровня экспрессии miR-142 с показателями гемоглобина ($r= 0,550$; $p=0,018$) и гематокрита ($r= 0,497$; $p=0,049$). Связи содержания лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов с уровнями экспрессии микроРНК не выявлено.

Спустя год и более после ТЛ у реципиентов установлена прямая связь содержания лейкоцитов в крови и уровня экспрессии miR-27 ($r=0,659$; $p=0,0002$), miR-142 ($r=0,517$; $p=0,014$) и miR-424 ($r=0,568$; $p=0,001$), что отражено на рисунке 8.

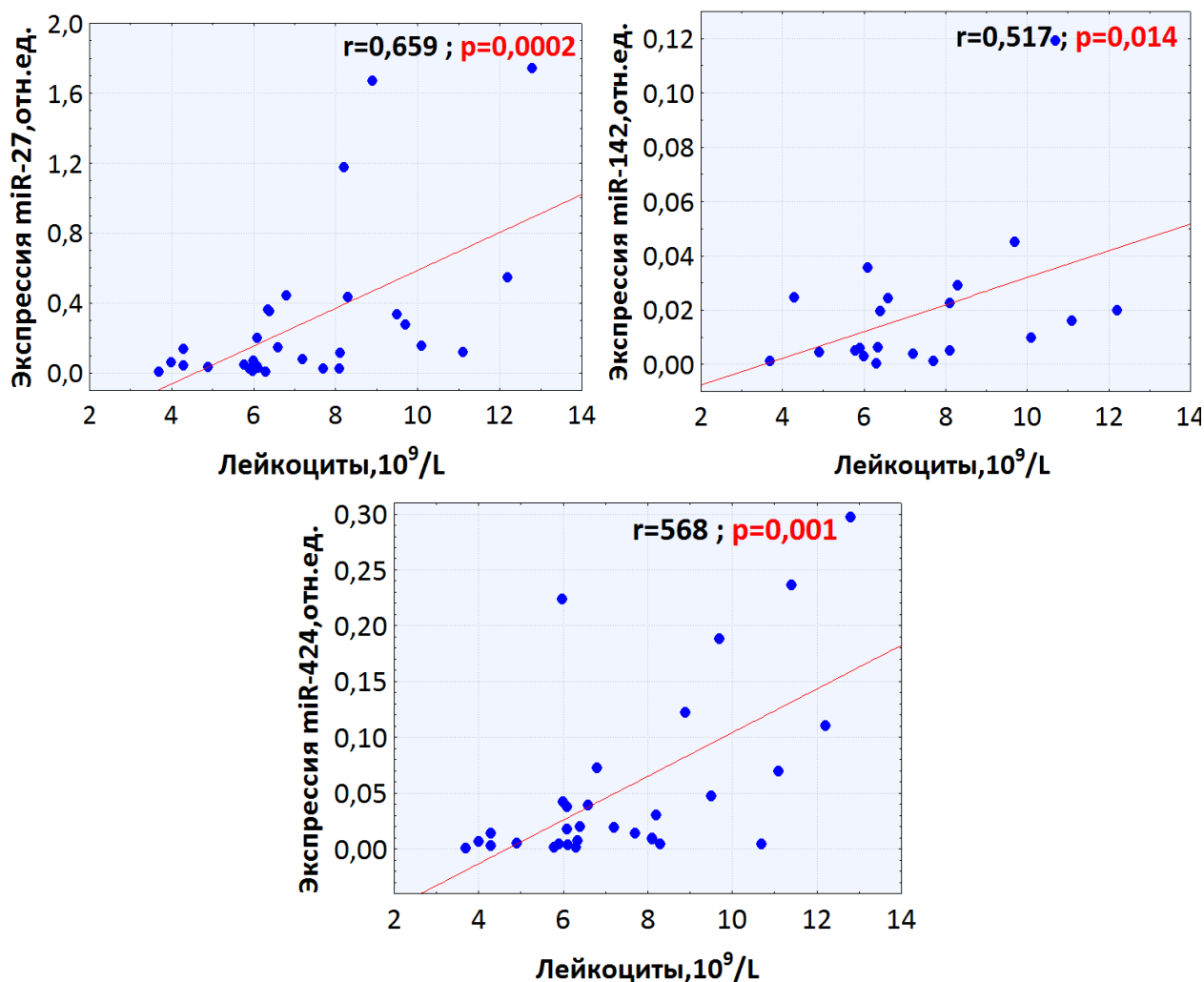


Рисунок 8 – Корреляция уровня экспрессии miR-27, miR-142 и miR-424 с содержанием лейкоцитов в крови реципиентов легких в отдаленном периоде

При анализе данных биохимического анализа крови у реципиентов в первые полгода после ТЛ удалось установить, что повышение уровня мочевины в крови было обратно связано с экспрессией miR-101 и miR-142, тогда как связь содержания холестерина с miR-27 носила прямой характер. Зависимость остальных параметров биохимического анализа от пяти исследуемых микроРНК не установлена. В отдаленные сроки после ТЛ у реципиентов легких удалось установить значимую обратную связь содержания маркеров цитолиза с экспрессией микроРНК: АЛТ с miR-27 ($r = -0,439$; $p=0,011$) и АСТ с miR-27 ($r = -0,408$; $p=0,018$) и miR-142 ($r = -0,408$; $p=0,018$). При корреляционном анализе содержания общего белка, альбумина, ЩФ и ГГТ значимой связи с экспрессией микроРНК не было выявлено.

Важно отметить, что вне зависимости от сроков перенесенной трансплантации, показатели экспрессии всех пяти микроРНК не зависели от величины содержания иммуносупрессивных препаратов в крови реципиентов.

Корреляционный анализ связи экспрессии изучаемых микроРНК с галектином-3 и sCD40L позволил установить связь концентрации sCD40L, роль которого опосредована костимуляцией Т-лимфоцитов, со значениями экспрессии miR-27 ($r=0,52$; $p=0,02$) и miR-142 ($r=0,53$; $p=0,02$) в плазме крови реципиентов в отдаленном посттрансплантационном периоде (рисунок 9); характер установленной связи может указывать на возможное участие miR-27 и miR-142 регуляции функционирования легочного трансплантата.

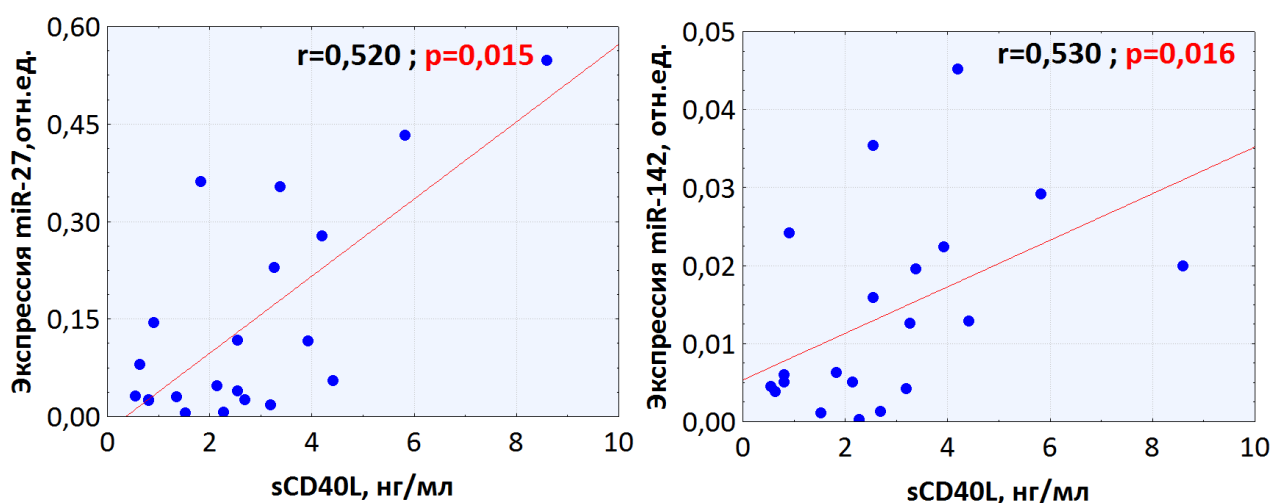


Рисунок 9 – Корреляция sCD40L с уровнями экспрессии miR-27 и miR-142 в крови реципиентов легких в отдаленном периоде

Выявленные корреляции величины экспрессии изучаемых микроРНК с рутинными лабораторными показателями крови отражают факт вовлеченности исследуемых сигнальных молекул в иммунологические механизмы повреждения трансплантированного органа и процессы воспаления в целом.

Анализ уровня экспрессии микроРНК у реципиентов трансплантированных легких с различным течением послеоперационного периода

У реципиентов, включенных в исследование, выделены следующие группы осложнений: инфекционные (инфекция кровотока и/или трахеобронхиального дерева, катетер-ассоциированный сепсис); иммуноопосредованные (острое и хроническое отторжение трансплантата); осложнения со стороны дыхательных путей (стеноз бронхов, бронхоэктазы, обструкция дыхательных путей).

Данные о характере и встречаемости указанных осложнений в различные сроки после ТЛ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Количественная характеристика пациентов с различным течением посттрансплантационного периода

Особенности течения посттрансплантационного периода	Число реципиентов (образцов плазмы)
Инфекционные осложнения	16 (23)
Острое отторжение трансплантата	3 (5)
Обструктивные процессы неинфекционного генеза	12 (17)
Без осложнений	27 (29)

Был предпринят сравнительный анализ показателей экспрессии сигнальных молекул при развитии различных осложнений в посттрансплантационном периоде и при их отсутствии.

Результаты сравнения группы реципиентов с развитием инфекционных процессов и без осложнений показал, что величина экспрессии всех пяти исследуемых микроРНК miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 сравниваемых групп значимо не различалась ($p=0,386$, $p=0,240$, $p=0,499$, $p=0,393$ и $p=0,209$ соответственно).

Сравнительный анализ реципиентов с клинической картиной острого отторжения легочного трансплантата с последующей верификацией отторжения при исследовании материала трансбронхиальной биопсии, и реципиентов без осложнений выявило значимые различия: у пациентов с верифицированным острым отторжением установлены более высокие уровни miR-27 и miR-101 ($p=0,010$ и $p=0,032$ соответственно), что отражено на рисунке 10.

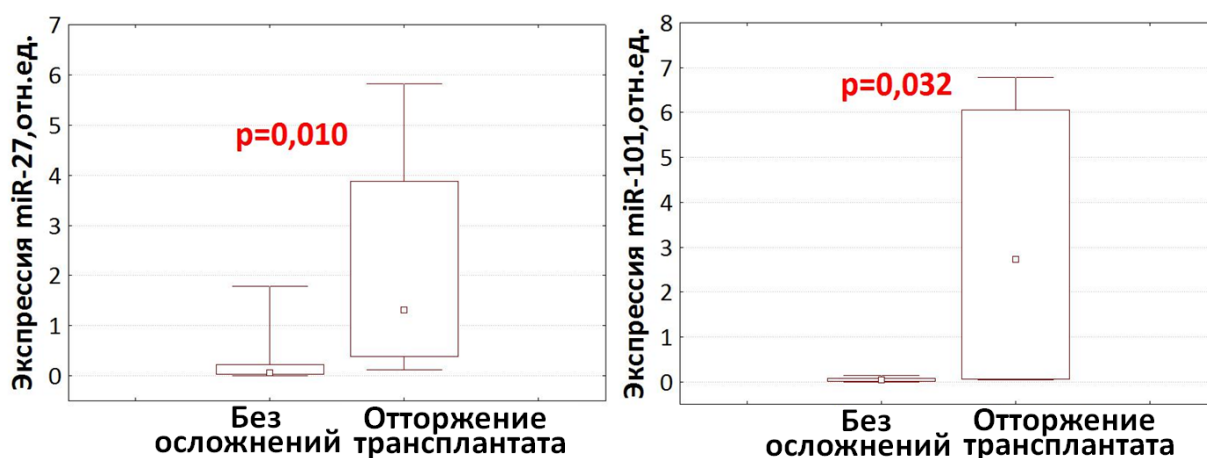


Рисунок 10 – Сравнительный анализ экспрессии miR-27 и miR-101 у реципиентов легких без осложнений и с острым отторжением трансплантата

В группе реципиентов с признаками обструктивных процессов в бронхиальных путях (стеноз бронхов) трансплантированных легких медиана экспрессии miR-339 превосходила ($p=0,036$) таковую в группе пациентов без осложнений (рисунок 11).

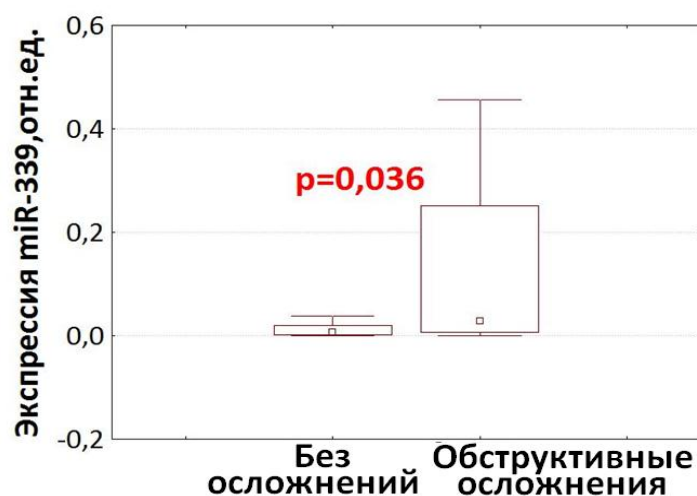


Рисунок 11 – Сравнительный анализ экспрессии miR-339 у реципиентов легких без осложнений и с развитием обструктивных процессов в бронхах трансплантата

В отношении остальных четырех микроРНК подобных различий не установлено ($p>0,05$).

Специальные лабораторные исследования, включавшие измерение содержания биомаркеров, потенциально значимых при трансплантации солидных органов (галектина-3 и sCD40L), в плазме крови реципиентов с различным течением послеоперационного периода показали, что концентрация галектина-3 у реципиентов с обструктивными изменениями бронхиальных путей значительно выше, чем у реципиентов без нежелательных событий в послеоперационном периоде ($p=0,014$).

Не было выявлено прямой связи величины sCD40L с основными факторами тяжелого течения реабилитационного периода после ТЛ: содержание sCD40L в плазме крови реципиентов с течением инфекционных процессов, острым отторжением трансплантата или обструктивных изменений бронхиальных путей значимо не различалось при сравнении реципиентами без указанных осложнений ($p=0,41$, $p=0,290$ и $p=0,843$ соответственно).

В соответствии с задачами, поставленными в работе, выделен ряд микроРНК, экспрессия которых существенно возрастает в зависимости от характера послеоперационных осложнений. В настоящем пилотном исследовании объем выборки реципиентов с острым отторжением

трансплантата (5 образцов от 3 пациентов) не позволяет произвести адекватную оценку диагностической значимости miR-27 и miR-101 в отношении данного осложнения, и представляет интерес для дальнейшего изучения.

Вместе с тем удалось рассчитать диагностически значимую пороговую величину экспрессии miR-339 в отношении развития обструктивных процессов в бронхиальных путях, которая составила 0,020 отн. ед. На рисунке 12 отражены результаты ROC-анализа, представленные ROC-кривой экспрессии miR-339 и графиком оптимального соотношения чувствительности и специфичности теста.

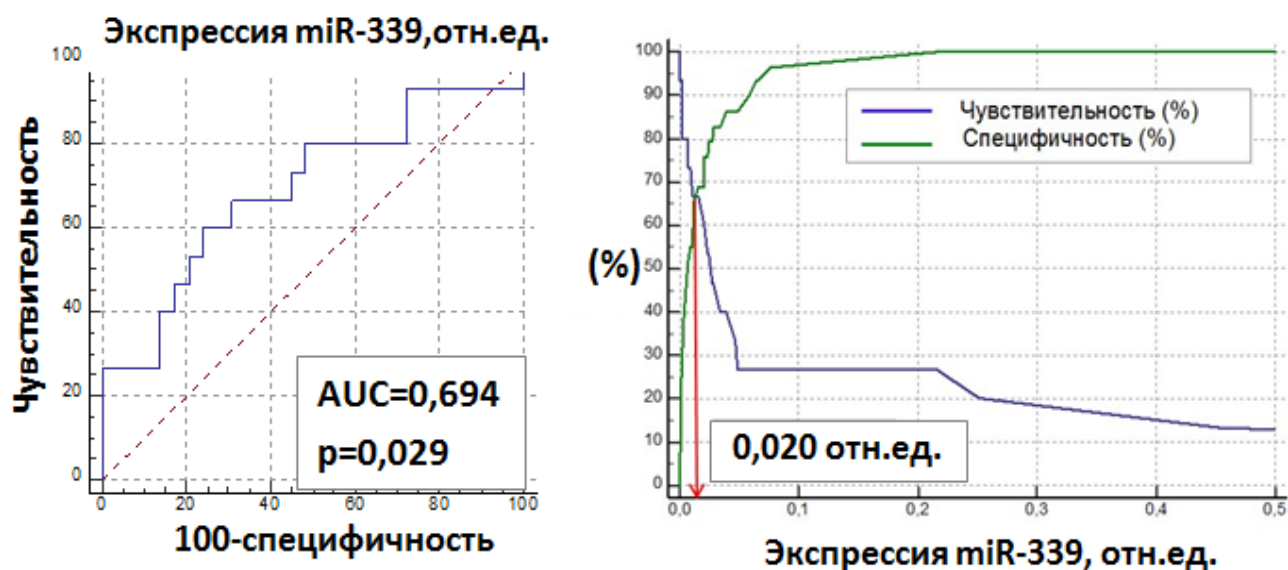


Рисунок 12 – ROC-кривая и график определения порогового уровня экспрессии miR-339 при развитии обструктивных процессов в бронхиальных путях

Согласно полученным результатам, площадь под кривой отличалась от величины 0,5 ($p=0,029$), а относительный риск (RR) выявления обструктивных процессов в бронхиальных путях у реципиентов с показателями экспрессии miR-339 выше порогового уровня составил ($RR=2,625\pm0,424$ [95% ДИ 1,144 – 6,023], $p=0,023$).

Ввиду выявленных различий концентрации галектина-3 у реципиентов без осложнений и с развитием обструктивных процессов в бронхиальных путях, был произведен расчет его пороговой концентрации, которая составила 11,655 нг/мл; площадь под кривой отличалась от величины 0,5 ($p=0,017$) при относительном риске $RR=3,619\pm0,578$ [95% ДИ 1,165 – 11,239], $p=0,026$ (рисунок 13).

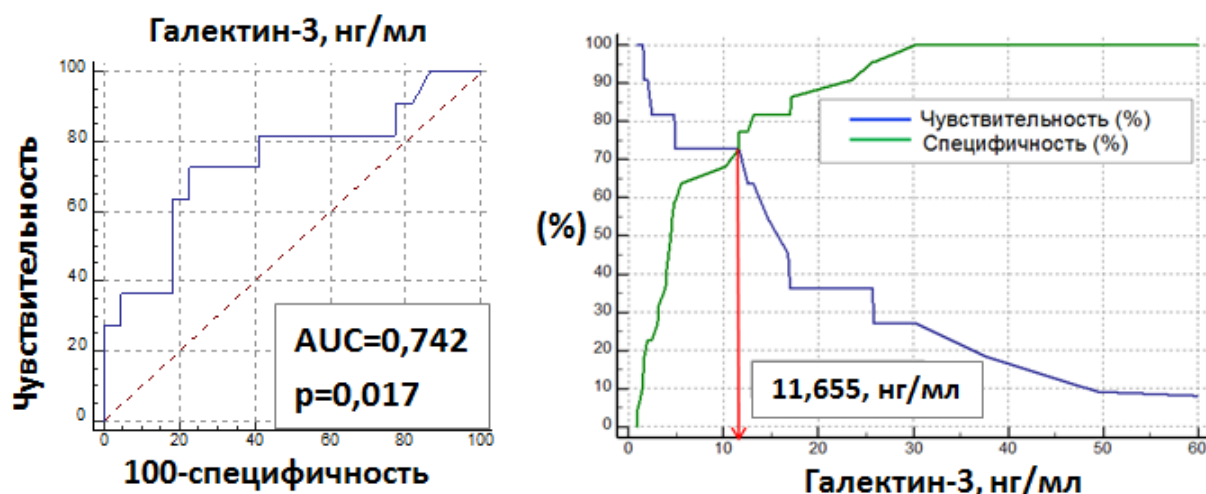


Рисунок 13 – ROC-кривая и график определения порогового значения концентрации галектина-3 при развитии обструктивных процессов в бронхиальных путях

Были оценены диагностические характеристики обоих тестов и их сочетания в отношении развития обструктивных процессов в бронхиальных путях у реципиентов после ТЛ (таблица 2).

Таблица 2 – Диагностические характеристики измерения уровней miR-339 и галектина-3 в отношении выявления обструктивных процессов в бронхиальных путях у реципиентов легких при уровне выше пороговых значений

Биомаркер	RR	Границы 95% ДИ	Se	Sp	De
miR-339	2,625	[1,144 – 6,023]	60,0 %	75,9 %	70,4%
галектин-3	3,619	[1,165 – 11,239]	72,7 %	72,7 %	78,8%
miR-339 + галектин-3	7,141	[1,049 – 48,601]	83,3 %	81,8 %	82,4%

Комплексный тест, включающий измерение экспрессии miR-339 и концентрации галектина-3, обладает наибольшей диагностической эффективностью (82,4%) в отношении выявления реципиентов со стенотическими изменениями бронхов после ТЛ.

Результаты настоящей работы показали, что измерение уровня экспрессии микроРНК в плазме крови реципиентов легких с одной стороны – расширяет представления о механизмах патологических процессов легочного трансплантата, открывая пути для возможного влияния на их течение, с другой стороны – может стать клинически значимым неинвазивным индикатором развития посттрансплантационных осложнений. Дальнейшее изучение как отдельных микроРНК, так и мультимаркерных тестов на их основе обеспечивает развитие новых подходов к диагностике и лечению реципиентов после трансплантации легких.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с тяжелой хронической дыхательной недостаточностью средний уровень экспрессии микроРНК miR-27, miR-101 и miR-339 в плазме крови достоверно выше, чем у здоровых лиц; наибольшие изменения величины экспрессии микроРНК выявлены у пациентов с муковисцидозом. Выявлена связь экспрессии miR-27 с величиной индекса массы тела ($r = -0,44$; $p = 0,02$), содержанием лейкоцитов ($r = 0,498$; $p = 0,018$), концентрацией креатинина ($r = -0,640$; $p = 0,002$) и глюкозы ($r = 0,561$; $p = 0,019$); miR-142 – с содержанием тромбоцитов ($r = 0,609$; $p = 0,004$), билирубина ($r = -0,531$; $p = 0,016$) и мочевины ($r = -0,631$; $p = 0,003$).

2. Средняя величина экспрессии miR-27, miR-101, miR-142, miR-339 и miR-424 у реципиентов легких варьирует в широких пределах в ранние и отдаленные сроки после трансплантации и не зависит от содержания иммуносупрессивных препаратов (такролимуса и эверолимуса) в крови реципиентов.

3. В отдаленные сроки после трансплантации легких у реципиентов выявлена прямая корреляция уровня экспрессии miR-27, miR-142 и miR-424 с содержанием лейкоцитов в крови; обратная – уровня экспрессии miR-27 с величиной индекса массы тела ($r = -0,328$; $p = 0,047$).

4. Повышение экспрессии miR-142 связано со снижением показателей функции внешнего дыхания: величиной ОФВ1 ($r = -0,663$; $p = 0,025$) до трансплантации; индексом Тиффно – до и после трансплантации ($p = 0,028$ и $p = 0,04$ соответственно).

5. У реципиентов с верифицированным острым отторжением легочного трансплантата величина экспрессии miR-27 и miR-101 достоверно выше ($p = 0,010$ и $p = 0,032$ соответственно), чем у реципиентов без посттрансплантационных осложнений.

6. При величине экспрессии miR-339 выше рассчитанного порогового значения (0,020 отн. ед.) риск развития обструктивных процессов в бронхиальных путях у реципиентов легких выше, чем у реципиентов с величиной экспрессии ниже такового ($RR = 2,6 + 0,42$ [95% ДИ 1,14 – 6,02]; чувствительность – 60%; специфичность – 75,9%).

7. Оценка уровня экспрессии miR-339 совместно с измерением концентрации галектина-3 повышает диагностическую эффективность теста в отношении обструктивных процессов в бронхиальных путях ($RR = 7,1 + 0,98$ [95% ДИ 1,05 – 48,60]; чувствительность – 83,3%, специфичность – 81,8%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Контроль уровня экспрессии miR-27, miR-101, miR-142 и miR-339 может быть использован для мониторинга состояния пациентов, страдающих муковисцидозом, ожидающих трансплантацию легких.

Измерение величины экспрессии miR-27 и miR-101 может быть полезным для выявления пациентов с риском развития острого отторжения легочного трансплантата.

Измерение уровня экспрессии miR-339 и концентрации галектина-3 в плазме крови реципиентов легких может быть рекомендовано в качестве эффективного неинвазивного способа диагностики обструктивных процессов в бронхиальных путях, приводящих к структурным изменениям трансплантата.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. К проблеме предупреждения послеоперационных инфекционных осложнений в хирургии высоких технологий. Состояние вопроса / С.О. Шарапченко, Н.И. Габриэлян, Р.Ш. Саитгареев, В.М. Захаревич, И.В. Дробкина, Н.М. Есенова, Л.Ю. Ромашкина, Т.Б. Сафонова, М.И. Петрухина, Л.Г. Столярова, Г.Н. Мельникова // Медицинский алфавит. – 2018. – Т. 1. – № 10 (347). – С. 9-14.
2. МикроРНК у реципиентов легких: перспективы клинического применения / Д.А. Великий, С.О. Шарапченко, И.В. Пашков, О.Е. Гичкун, О.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № 2. – С. 138-144.
3. Экспрессия молекул микроРНК у пациентов с терминальной стадией заболеваний легких различной этиологии / О.Е. Гичкун, О.М. Цирульникова, И.В. Пашков, С.О. Шарапченко, Д.А. Великий, О.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № 5. – С. 61-62.
4. Особенности профиля экспрессии микроРНК у потенциальных реципиентов легких / О.П. Шевченко, О.М. Цирульникова, О.Е. Гичкун, И.В. Пашков, С.О. Шарапченко, Д.А. Великий // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – № 3. – С. 33-38.
5. Уровень экспрессии микроРНК в ранние и отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов сердца / Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, С.О. Шарапченко, О.П. Шевченко, А.О. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – №1. – С. 26-34.
6. Экспрессия микроРНК у реципиентов легких: корреляции с клиническими и лабораторными данными / О.П. Шевченко, С.О. Шарапченко, О.М. Цирульникова, И.В. Пашков, О.Е. Гичкун, Д.А. Великий, Е.Ф. Шигаев, Д.О. Олешкевич, М.Т. Беков // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 2. – С. 86-96.
7. Связь уровня экспрессии микроРНК в плазме крови реципиентов сердца с концентрацией биомаркеров посттрансплантационных осложнений / Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, А.А. Улыбышева, С.О. Шарапченко, А.В. Марченко и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – №3. – С. 69-78.
8. Связь экспрессии микроРНК с показателями функции внешнего дыхания у пациентов с хронической дыхательной недостаточностью и реципиентов легких / О.П. Шевченко, С.О. Шарапченко, О.М. Цирульникова, И.В. Пашков, М.Т. Беков, Д.О. Олешкевич, О.Е. Гичкун, Д.А. Великий // Вестник трансплантологии и искусственных органов. Приложение. – 2020. – С. 55.
9. Анализ корреляции экспрессии микроРНК с клиническими и лабораторными данными пациентов до и после трансплантации легких / С.О. Шарапченко, О.М. Цирульникова, И.В. Пашков, О.Е. Гичкун, Д.А. Великий, Е.Ф. Шигаев, О.П. Шевченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. Приложение. – 2020. – С. 57.
10. Изучение связи концентрации биомаркеров фиброза галектина-3 и костимуляции лимфоцитов sCD40L у пациентов до и после трансплантации легких с показателями экспрессии микроРНК / О.П. Шевченко, С.О. Шарапченко, О.М. Цирульникова, И.В. Пашков, О.Е. Гичкун, Д.А. Великий // Вестник трансплантологии и искусственных органов. Приложение. – 2020. – С. 59.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспартатаминотрансфераза
ГГТ – гамма-глутамилтрансфераза
ДИ – доверительный интервал
СРБ – С-реактивный белок
ИМТ – индекс массы тела
ИФА – иммуноферментный анализ
КТ – компьютерная томография
ЛАГ – легочная артериальная гипертензия
микроРНК – микрорибонуклеиновая кислота
отн. ед. – относительные единицы
ОФВ1 – объем форсированного выдоха в 1 секунду
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ТББ – трансбронхиальная биопсия
ТЛ – трансплантация легких
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
ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь лёгких
ЩФ – щелочная фосфатаза
ЭДТА – этилендиаминуксусная кислота
ISHLT – (англ., International society for heart and lung transplantation) Международное общество трансплантации сердца и легких
miR – микроРНК
sCD40L – растворимая форма лиганда CD40