

НОВЫЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР КРОВИ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕМОТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Л.Ю. Вергун

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», Киев

Резюме. В работе представлены сведения об использовании молекулярно-генетического метода микроРНКкПЦР (*microRNAqPCR*) в диагностике. Показана ценность перспективного биомаркера микрорибонуклеиновой кислоты (микроРНК) для раннего обнаружения и прогноза болезни, а также как предиктора ответа на целевую терапию.

Ключевые слова: биомаркеры, реал-тайм полимеразная цепная реакция (ПЦР), микроРНК, экспрессия мРНК, вирус гепатита С (HCV)

NEW MOLECULAR GENETIC MARKER OF BLOOD IN THE DIAGNOSIS OF BLOODBORNE INFECTIONS

L.Yu. Vergun

SI «Institute of Haematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

Summary. The information of using molecular genetic method *microRNA qPCR* in diagnostics are represented in this work. The value of perspective biomarker *microribonucleic acid (microRNA)* is demonstrated for early detection, prognosis of disease and as a predictor of response to treatment.

Key words: biomarkers, real-time polymerase chain reaction (PCR), *microRNA*, expression of *miRNA*, hepatitis C virus (HCV).

Складовою безпеки донорської крові є ефективність тестування гемотрансмісивних інфекцій. У зв'язку зі збільшенням критеріїв безпеки, обґрунтованими «великими» і «малими» ризиками, це особливо актуально. У сучасній діагностиці відсутня система, що має 100% ефективність визначення патогенів у препаратах крові [2].

Діагностична цінність специфічних молекулярно-генетичних і серологічних маркерів основних трансмісивних інфекцій установлена і продовжує удосконалюватися. Японські науковці шукають нові генетичні послідовності вірусів гепатиту «ні А – ні Е» в крові донорів із підвищеною активністю трансфераз, оскільки етіологія 10-20% гострих гепатитів у Японії залишається нез'ясованою [1]. Вивченню щодо нового класу біомаркерів микрорибонуклеїнової кислоти (міРНК = miR) присвячено багато робіт, їх кількість від декількох у 2002 р. зростає до 10000 у 2012 р. (High Wire і Pub Med публікації).

МікроРНК – перспективний біомаркер для раннього виявлення, скрінінгу та прогнозу хвороби. Крім того, вивчають регуляцію микрорібо-

нуклеїновою кислотою апоптозу, що викликаний цитотоксичними матеріалами (у т.ч. наноматеріалами), ліками. Відомо 2042 анотованих міРНК людини. Аналіз профілів експресії міРНК – надійний метод для дослідження біологічних процесів завдяки стабільності міРНК і впровадження прогресивних методів сиквенса. міРНК – посттранскрипційний регулятор генної експресії мессенджер РНК (мРНК). 30% генів людини регулюється міРНК. Вона включається майже в усі біологічні процеси: рак, регуляцію стовбурових клітин, імунні функції, нейрогенез, метаболізм. Зміни в міРНК корелюють зі змінами експресії генів при розвитку, диференціації, інфекційних процессах [3, 6, 8, 14, 17], вікових змінах.

Піонером у галузі міРНК полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) визнано доктора Yu Li. Його дослідження були сконцентровані на ідентифікації нових біомаркерів міРНК у біорідинах тіла для діагностики та прогнозу рідкісної, але загрозливою життю хвороби печінки, а також для вивчення відповіді на лікарську терапію. В цей же час виходить сенсаційна робота Jopling C.L. та Sarnow P. щодо міРНК (miR-122-HCV) у журналі Science [13], виконана на власних (in house) тест-системах реал-тайм міРНК ПЛР. Що ж це таке міРНК? Зрілі міРНК (miRNAs) – це короткі одноланцюгові молекули РНК довжиною від 19 до 24 нуклеотидів (за даними різних авторів), що не кодується. Уперше міРНК була ідентифікована при вивченні розвитку нематод *Caenorhabditis elegans* у 1993 р., вона також була виявлена у багатьох видів рослин і тварин [10].

У клітинах ссавців синтез РНК проходить на матриці ДНК, цей процес одержав назву транскрипції. Фермент РНК-полімераза, відкритий у 1956–1964 рр., є клітинним каталізатором синтезу РНК на одному з ланцюгів ДНК, структура цієї РНК визначається матричною ДНК (комплементарна нитка РНК).

Канонічний шлях біогенезу міРНК представляється на сьогодні так: інформація з ДНК на РНК транскрибується за участю ферменту РНК полімерази II у довгий первинний (primary) транскрипт (pri-міРНК), який може містити більш ніж одну міРНК. У ядрі pri-міРНК перетворюються на шпигелоподібні прекурсорні (~ 70 нуклеотидів) pre-міРНК за участю РНК-аза III-подібного ферменту Drosha DGCR 8. Потім pre-міРНК експортується з ядра в цитоплазму завдяки Exportin 5. Подальші процеси відбуваються у цитоплазмі клітини. Pre-міРНК за участю ферменту РНК-аза III, подібного до Dicer-TRBP, перетворюються в зрілі, лінійні, одноланцюгові міРНК. Ці міРНК об'єднуються в РНК-індукований комплекс (RISC). Далі існують два шляхи: високої гомології і часткової гомології. Шлях часткової гомології – це міРНК із недосконалою парою основ цільової мРНК або інформаційної РНК (іРНК), що веде до трансляційної регресії та/або деградації іРНК. Шлях високої гомології веде до мРНКзі специфічними послідовностями [9, 10].

Сума знань, що отримана в ході виконання проекту «Геном Людини», завершеного в 2003 р., сприяла відкриттю та вивченню міРНК. Близько 700 генів міРНК ідентифіковано в геномі людини. Відомо близько 1000 міРНК-последовностей людини, які відіграють важливу регуляторну роль майже в усіх біологічних процесах, у т.ч. при багатьох хворобах. міРНК регулює експресію ключових білків у лікарської відповіді: предиктор відповіді на цільову терапію. Існують не тільки наукові дослідження в галузі міРНК, але і компанії з виробництва, напрацювання тест-систем для визначення класів міРНК.

В основу тест-систем покладена ПЛР із зворотною транскрипцією (ЗТ) у режимі реального часу, формат або платформа реакції можуть бути різні: пробірочний (individual assays), планшетний 96-, 384-лунковий (multiple assays), чіповий (microarray). ПЛР у режимі реального часу має більш високу чутливість і ширшу область застосування, ніж місгоагау. ПЛР включає в собі традиційні етапи: виділення РНК, ЗТ, ампліфікацію, детекцію.

Виділення РНК. Можна використовувати всі існуючі методи. Розроблено набори з виділення міРНК. Можливе об'єднане очищення міРНК і загальної РНК або окреме очищення міРНК збагаченої фракції і загальної РНК. Зразками для виділення міРНК можуть бути всі компоненти крові: еритроцити, лейкоцити, тромбоцити, пухлинні клітини, що циркулюють у крові, плазма, сироватка (об'єм зразка – 200 мкл), клітини та тканини, фіксовані і залиті в парафін зразки. Позаклітинна міРНК є в усіх біорідинах тіла: сльозі, сечі, грудному молоці, сім'яній рідині, слині, амніотичній рідині, бронхіальному лаважі, цереброспинальній, плевральній, перетоніальній рідинах, молозові [12]. Якщо РНК, що вільно циркулює, швидко деградує під впливом нуклеаз, то міРНК у сироватці та плазмі має дивну стабільність: вона стабільна при кімнатній температурі і багатократному заморожуванні-відтаюванні [11]. Навіть при низьких рівнях загальної РНК міРНК залишається менше заторкнутою. Для великої кількості зразків допускається пулірування. Наприклад, для 30 зразків однієї нозології хвороби беруть навмання 30 зразків клінічно здорових людей, готують 3 нормальних пули і 3 пули хворих, кожен пул містить РНК 10 зразків. Зворотною транскрипцію виконують для кожного пулу. Зразки архівних матеріалів банків тканин, патоморфологічних лабораторій, лабораторій біомедичних досліджень з успіхом використовуються для виділення міРНК.

Зворотня транскрипція (ЗТ). Загальноприйнята схема ЗТ реал-тайм ПЛР методу для виявлення міРНК не підходить через її малі розміри (19-24 нуклеотидів) і тому є утрудненою посадкою праймера. Конвертація міРНК у комплементарну-ДНК (кДНК) здійснюється через універсальний

хвіст (3Г праймер). Архівована кДНК добре зберігається і може використовуватися для визначення інших або нових міРНК у майбутньому.

Ампліфікація і детекція. За методиками реал-тайм ПЛР, із використанням комп'ютерного програмного забезпечення. Обов'язкова наявність контролів реакції, наприклад, тест-системи компанії QIAGEN (Німеччина) із 96-лунковим форматом містять 12 контрольних лунок.

Через роки чутливість і специфічність міРНК реал-тайм ПЛР істотно збільшилися завдяки LNA-технологіям (Locked Nucleic Acid).

Враховуючи те, що міРНК є перспективним біомаркером для раннього виявлення та прогнозу хвороб, зважаючи на високу стабільність її у сироватці/плазмі, можна припустити, що цей біомаркер здатний зіграти позитивну роль при визначенні якості донорської крові.

Протягом 2001 і 2005 років близько 202000 жінок-волонтерів зареєструвалися на UKSTOCS (United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening). Очолив цю роботу професор I. Jacobs, академічний фундатор Abcodia Ltd. при інституті здоров'я жінки (Англія). Волонтери здавали зразки сироватки для досліджень щорічно. Сироватка відбиралася строго за протоколом і зберігалася в рідкому азоті в біобанку. Нещодавно було успішно завершено одне з пілотних досліджень із міРНК – визначення в UKSTOCS сироватках. Abcodia Ltd. займається відкриттям та валідацією біомаркерів раннього виявлення та скринінгу хвороби і має ексклюзивну комерційну ліцензію для широкомасштабних досліджень сироваткових біобанків.

Експериментальні роботи з вивчення експресії міРНК-122 (miR-122) при HCV-інфекції свідчать, що miR-122 може стимулювати реплікацію або трансляцію вірусу гепатиту С (HCV). Kambara H. і колеги показали участь печінка-специфічної miR-122 у реплікації HCV на культурі клітин Huh7 [7]. Li S. і співробітники виявили в експерименті на культуральній клітинній моделі Huh 7.5.1 істотне збільшення miR-122 експресії на пізній стадії інфекції і вивчали зв'язок між синтезом корового (core) білка HCV і експресією miR-122 *in vitro* [16]. Науковці з Медичного Університету в Лодзі (Польща) вивчали зв'язок між рівнями експресії miRNA-155 і miRNA-196b у мононуклеарних клітинах периферичної крові (МК ПК) і реплікацією HCV у МК ПК пацієнтів із хронічним гепатитом С. miRNA-155 і miRNA-196b визначалися в усіх зразках МК ПК, що досліджувались, але їх рівні варіювали залежно від присутності антигенного РНК ланцюга HCV у МК ПК [4]. Вивчалася кінетика miR-122 в сироватці пацієнтів із хронічною HCV-інфекцією у період антивірусної терапії, паралельно визначали рівень експресії miR-16. Зроблено висновок, що сироватковий рівень miR-122 добре відображає

успіх інтерферон/рибавиринової терапії у пацієнтів із хронічною HCV-інфекцією, тоді як експресія miR-16 не змінювалася під час терапії [15].

Таким чином, аналіз доступної літератури дозволяє зробити висновок про перспективність вивчення ролі нового біомаркера міРНК для цілей раннього виявлення й тестування захворювань різного генезу, в тому числі тих, що можуть потрапляти до організму людини з інфікованою донорською кров'ю, отже для використання при обстеженні донорів.

Література

1. Жибурт Е.Б. Методические вопросы скрининга инфекции у доноров крови / Е.Б. Жибурт, С.Р. Мадзаев, Р.З. Магзумова // Вестник службы крови России. – 2013. – № 1. – С. 30–32.

2. Марчнер С. Применение технологии патогенной редукции/инактивации тромбоцитов, плазмы и цельной крови с использованием рибофлавина и УФ облучения / С. Марчнер, М. Кардозо, Р. Гудрия // Вестник службы крови России. – 2013. – № 1. – С. 41–47.

3. Changes in microRNA expression induced by rabies virus infection in mouse brains / P. Zhao, L. Zhao, T. Zhang [et al.] // Microbial Pathogenesis. – 2011. – Vol. 52, № 1. – P. 47–54.

4. Coordinated increase of miRNA-155 and msRNA-196b expression correlates with the detection of the antigenomic strand of hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells / M. Grek, A. Piekarska, J. Bartkowiak [et al.] // Intern. J. Mol. Med. – 2011. – Vol. 28, № 5. – P. 875–880.

5. Dhar S. Resveratrol and prostate cancer: promising role for microRNAs / S. Dhar, C. Hicks, A.S. Levenson // Mol. Nutr. Food Res. – 2011. – Vol. 55, № 8. – P. 1219–1229.

6. Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T Cell lymphomas / R. Ramakrishnan, H. Donahne, D. Garcia [et al.] // PLoSOne. – 2011. – Vol. 6, № 11. – e 27271.

7. Establishment of a novel permissive cell line for the propagation of hepatitis C virus by expression of microRNA miR122 / H. Kambara, T. Fukuhara, M. Shiokawa [et al.] // J. Virol. – 2012. – Vol. 86, № 3. – P. 1382–1393.

8. HSV-1 infection of human brain cells induces miRNA-146a and Alzheimer-type inflammatory signaling / J.M. Hill, Y. Zhao, C. Clement [et al.] // Neuroreport. – 2009. – Vol. 20, № 16. – P. 1500–1505.

9. Krol J. The widespread regulation of mi RNA biogenesis, function and decay / J. Krol, I. Loedige, W. Filipowich // Nature Rev. Genetics. – 2010. – Vol. 11, № 9. – P. 597–610.

10. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation / J. Winter, S. Keller, R.I. Gregory, S. Diederich // Nature Cell Biology. – 2009. – Vol. 11, № 3. – P. 228–234.

11. MicroRNA are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins / K.C. Vickers, B.T. Palmisano, B.M. Shoucri [et al.] // Nat. Cell. Biol. – 2011. – Vol. 13, № 4. – P. 423–433.

12. MiRNeasy, miScript PCR system / J.A. Weber, D.H. Baxter, S.Zhang [et al.] // Clinical. Chem. – 2010. – Vol. 56, № 11. – P. 1733–1741.

13. Modulation of HCV RNA abundance by a liver-specific micro RNA / C.L. Jopling, M.Yi, A.M. Lancaster [et al.] // Science. – 2005. – Vol. 309. – P. 1577–1581.

14. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29 / Y. Li, F. Wang, Y. Xu [et al.] // J. Pathol. – 2011. – Vol. 224, № 4. – P. 484–495.

15. Serum microRNA-122 kinetics in patients with chronic hepatitis C virus infection during antiviral therapy / V. Koberle, O. Waidmann, B. Kronenberge [et al.] // J. Viral. Hepat. – 2013 Aug. – Vol. 20, № 8. – P. 530–535.

16. The effects of hepatitis C virus core protein on the expression of miR-122 in vitro / S.Li, X.Xing, O. Yang [et al.] // Virol. J. – 2013. – Vol. 10. – P. 98.

17. Wolbachia uses host microRNAs to manipulate host gene expression and facilitate colonization of the denge vector Aedes aegypti / M. Hussain, F.D. Frentin, L.A. Moreira [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2011. – Vol. 108, № 22. – P. 9250–9255.

УДК 615.38

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПРЕПАРАТІВ З ДОНОРСЬКОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

М.І. Вороняк¹, Н.Ф. Мосінг¹, Г.О.Потьомкіна², І.М. Паробецька²

¹ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»,

²Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Резюме. *Описано застосування електрофорезу на агарозних гелях для перевірки якості препаратів плазми крові.*

Ключові слова: *препарати плазми крові, електрофорез, агароза, альбумін, імуноглобуліни спрямованої дії, полібіолін.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ ИЗ ДОНОРСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

М.И. Вороняк¹, Н.Ф. Мосинг¹, Г.О.Потьомкина², И.М. Паробецкая²

¹ГУ «Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН Украины»,

²Львовский национальный медицинский институт им. Даниила Галицкого

Резюме. *Описано применение электрофореза на агарозных гелях для проверки качества препаратов плазмы крови.*