

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-218-10-160-167>

Уровень экспрессии длинных некодирующих РНК MALAT1, GAS5, DANCR и TUG1 в лейкоцитах периферической крови пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени

Курбатова И. В.¹, Васильева А. В.¹, Топчиева Л. В.¹, Дуданова О. П.², Шиповская А. А.²

¹ Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», (ул. Пушкинская, 11, г. Петрозаводск, 198910, Россия)

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет», (ул. Ленина, 33, г. Петрозаводск, 185910, Россия)

Для цитирования: Курбатова И. В., Васильева А. В., Топчиева Л. В., Дуданова О. П., Шиповская А. А. Уровень экспрессии длинных некодирующих РНК MALAT1, GAS5, DANCR и TUG1 в лейкоцитах периферической крови пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2023; 218(10): 160–167. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-218-10-160-167

✉ Для переписки:

Курбатова Ирина Валерьевна

irina7m@yandex.ru

Ирина Валерьевна Курбатова, к.б.н., с.н.с. лаборатории генетики

Васильева Алина Валерьевна, стажер-исследователь, аспирант

Топчиева Людмила Владимировна, к.б.н., в.н.с., руководитель лаборатории генетики

Дуданова Ольга Петровна, проф., д.м.н., зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней и гигиены Медицинского института

Шиповская Анастасия Андреевна, к.м.н., доц. кафедры пропедевтики внутренних болезней и гигиены Медицинского института

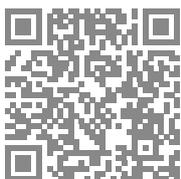
Резюме

Цель: Сравнительный анализ уровня экспрессии длинных некодирующих РНК *MALAT1*, *GAS5*, *DANCR*, *TUG1* в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) здоровых людей и пациентов с НАЖБП (стеатозом печени, неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ) разной активности, циррозом печени).

Материалы и методы: Обследовано 106 больных с диагнозом НАЖБП, установленным впервые: 31 пациент со стеатозом печени (СП), 64 пациента с НАСГ слабой (СА), умеренной (УА) и высокой (ВА) активности и 11 пациентов на стадии цирроза печени (ЦП). Контрольную группу составили 30 здоровых доноров. Уровень мРНК генов *TUG1*, *DANCR*, *MALAT1*, *GAS5* в ЛПК определяли методом ПЦР-РВ.

Результаты: Зарегистрирован более высокий уровень экспрессии гена *TUG1* в ЛПК больных НАСГ-СА по сравнению с СП, а также выявлена тенденция повышения уровня мРНК *TUG1* в ЛПК при нарастании активности НАСГ, что указывает на возможность использования уровня экспрессии *TUG1* в ЛПК в качестве малоинвазивного диагностического (для разграничения СП и НАСГ-СА) и прогностического маркера (при прогрессировании НАЖБП). Анализ уровня экспрессии днРНК *MALAT1* показал отсутствие достоверных различий между всеми исследованными группами. Получены результаты, свидетельствующие о сложной динамике уровня экспрессии *GAS5*: уровень транскриптов повышается при формировании стеатоза печени и затем снижается при переходе в НАСГ. Показано, что уровень экспрессии *DANCR* в ЛПК пациентов с НАСГ-СА ниже, чем у пациентов со стеатозом печени и НАСГ-УА.

EDN: NGNFFA



Заключение: Получены новые данные по уровню экспрессии днРНК *MALAT1*, *GAS5*, *DANCR*, *TUG1* в ЛПК пациентов с НАЖБП, свидетельствующие о возможности использования уровня экспрессии *TUG1* в ЛПК в качестве малоинвазивного диагностического и прогностического маркера при НАЖБП. Также показано, что уровень мРНК *DANCR* в ЛПК может иметь определенную диагностическую ценность при разграничении СП и НАСГ-СА.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), днРНК, *MALAT1*, *GAS5*, *DANCR*, *TUG1*



Expression level of long non-coding RNA MALAT1, GAS5, DANCR and TUG1 in peripheral blood leukocytes of patients with non-alcoholic fatty liver disease

I. V. Kurbatova¹, A. V. Vasileva¹, L. V. Topchieva¹, O. P. Dudanova², A. A. Shopovskaya²

¹ Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS), (11 Pushkinskaya Str., Petrozavodsk, 185910, Russia)

² Petrozavodsk State University, (33 Lenin Str., Petrozavodsk, 185910, Russia)

For citation: Kurbatova I. V., Vasileva A. V., Topchieva L. V., Dudanova O. P., Shopovskaya A. A. Expression level of long non-coding RNA MALAT1, GAS5, DANCR and TUG1 in peripheral blood leukocytes of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2023; 218(10): 160–167. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-218-10-160-167

✉ **Corresponding author:**

Irina V. Kurbatova
irina7m@yandex.ru

Irina V. Kurbatova, PhD, Senior Research Associate in the Laboratory for Genetics; ORCID: 0000-0001-7620-7065, Scopus Author iD: 6603406315

Alina V. Vasileva, trainee researcher, graduate student in the Laboratory for Genetics; ORCID: 0000-0003-3849-6796, Scopus Author iD: 57925603400

Ludmila V. Topchieva, PhD, Leading Researcher, head of the Laboratory for Genetics; ORCID: 0000-0001-8697-2086, Scopus Author iD: 15137309400

Olga P. Dudanova, MD, professor, Head of Department of Propaedeutics of Internal Diseases and Hygiene; ORCID: 0000-0003-2613-5694, Scopus Author iD: 6603343207

Anastasiya A. Shopovskaya, PhD, Associate Professor of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases and Hygiene; ORCID: 0000-0003-3830-6446, Scopus Author iD: 57925603400

Summary

Purpose: Comparative analysis of the expression level of long non-coding RNAs MALAT1, GAS5, DANCR, TUG1 in peripheral blood leukocytes (PBL) of healthy people and patients with NAFLD (liver steatosis, NASH of varying activity, liver cirrhosis).

Materials and methods: We examined 106 patients diagnosed with NAFLD for the first time: 31 patients with liver steatosis (LS), 64 patients with weak (WA), moderate (MA) and high (HA) NASH activity and 11 patients at the stage of liver cirrhosis (LC). The control group consisted of 30 healthy donors. The mRNA level of the TUG1, DANCR, MALAT1, GAS5 genes in PBL was determined by RT-PCR.

Results: A higher level of expression of the TUG1 gene was registered in the PBL of patients with NASH-WA compared to LS, and a tendency was revealed to increase the level of TUG1 mRNA in the PBL with increasing NASH activity, which indicates the possibility of using the level of TUG1 expression in the PBL as a minimally invasive diagnostic (to distinguish between LS and NASH-WA) and a prognostic marker (with the progression of NAFLD). Analysis of the expression level of lncRNA MALAT1 showed no significant differences between all studied groups.

Results were obtained indicating complex dynamics of the GAS5 expression level: the level of transcripts increases during the formation of liver steatosis and then decreases during the transition to NASH. It was shown that the level of DANCR expression in the PBL of patients with NASH-WA is significantly lower than in patients with liver steatosis and NASH-MA.

Conclusion: New data were obtained on the expression level of the MALAT1, GAS5, DANCR, TUG1 lncRNAs in the PBL of patients with NAFLD, indicating the possibility of using the level of TUG1 expression in the PBL as a minimally invasive diagnostic and prognostic marker in NAFLD. It has also been shown that the level of DANCR mRNA in PBL may have some diagnostic value in distinguishing between LS and NASH-WA.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), non-alcoholic steatohepatitis (NASH), lncRNA, MALAT1, GAS5, DANCR, TUG1

Введение

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) — широко распространенное (по различным данным, от 20 до 40% населения планеты страдают НАЖБП), многофакторное метаболическое заболевание, которое является основной причиной заболеваемости и смертности, связанной с болезнями печени, в экономически развитых странах. В России НАЖБП в настоящее время занимает лидирующие позиции среди заболеваний внутренних органов [1]. В связи с этим, актуальным становится поиск молекул, имеющих потенциальное прогностическое и клиническое значение при НАЖБП. В качестве биологических маркеров развития патологий печени могут выступать длинные некодирующие РНК (днРНК). Так, у мышей с экспериментально вызванной НАЖБП выявлено изменение экспрессии 3111 днРНК [2]. В работе [3] Leti и соавторы идентифицировали изменение профиля экспрессии 4057 длинных некодирующих РНК в тканях печени пациентов с неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ), имеющих гистологические признаки развитого фиброза печени по сравнению с пациентами без признаков фиброза и лобулярного воспаления [3]. В последнее время в литературе опубликован ряд обзоров, касающихся роли днРНК в этиологии и патогенезе заболеваний печени [4–7]. Однако анализ данных литературы пока не позволяет четко выявить ассоциацию экспрессии этих молекул с определенными формами и тяжестью (степень активности, наличие фибротических изменений) НАЖБП. Более того, для одной и той же днРНК получены противоречивые результаты относительно вклада в патогенез данного заболевания. Так, показано, что экспрессия *GAS5* снижена в образцах фиброзной печени мышей, крыс и человека, а также в активированных звездчатых клетках печени (ЗКП) [8]. Сверхэкспрессия *GAS5* подавляла активацию первичных ЗКП *in vitro* и уменьшала накопление коллагена в фиброзных тканях печени *in vivo* [8]. В то же время имеются данные о том, что уровень экспрессии *GAS5* в плазме пациентов с НАЖБП может повышаться или снижаться у пациентов с разной степенью фиброза [9].

Лейкоциты периферической крови (ЛПК) являются основными клетками, реализующими

иммуновоспалительные процессы в печени при патогенезе НАЖБП, однако данных по экспрессии днРНК в ЛПК пациентов НАЖБП практически нет в литературе. Данное обстоятельство, а также перспективность использования малоинвазивных маркеров для диагностики и прогнозирования НАЖБП, обуславливают актуальность изучения экспрессии днРНК в ЛПК пациентов с различными клинкоморфологическими формами НАЖБП. В связи с чем, в настоящем исследовании для изучения выбраны следующие днРНК: *MALAT1*, *GAS5*, *DANCR*, *TUG1*. В литературе есть данные о роли указанных днРНК в развитии патологий печени. Так, показано, что повышение уровня экспрессии днРНК *MALAT1* положительно коррелирует с развитием фиброза, воспаления, ингибированием аутофагии, усилением выработки хемокина *CXCL5* в звездчатых клетках печени [10]. При этом показано, что *MALAT1* участвует в пролиферации здоровых клеток печени и выполняет регенеративную функцию [11]. Вероятно, функциональная роль данной днРНК определяется ее уровнем и активностью сигнальных путей, в регуляцию которых она вовлечена [12]. Выявлено участие днРНК *GAS5* в патогенетических механизмах фиброза печени и прогрессирования НАЖБП [13, 14]. Что касается днРНК *DANCR* и *TUG1*, показано их участие в развитии гепатоцеллюлярной карциномы [15, 16].

Таким образом, данные литературы подтверждают значительный вклад днРНК в развитие патологий печени, однако сведения относительно экспрессии днРНК в периферической крови пациентов с ранними и продвинутыми стадиями прогрессирования НАЖБП (стеатозом печени (СП), неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ), циррозом печени (ЦП)) недостаточны для того, чтобы их обозначить как биомаркеры указанных процессов, что, безусловно, имело бы важное клиническое и прогностическое значение.

Цель настоящего исследования — сравнительный анализ уровня экспрессии длинных некодирующих РНК *MALAT1*, *GAS5*, *DANCR*, *TUG1* в лейкоцитах периферической крови здоровых людей и пациентов с НАЖБП (стеатозом печени, НАСГ разной активности, циррозом печени).

Методы исследования

Обследовано 106 больных НАЖБП с установленным впервые диагнозом: 31 пациент со стеатозом печени (СП), 64 пациента с НАСГ слабой (НАСГ-СА), умеренной (–УА) и высокой (–ВА) активности и 11 больных НАЖБП на стадии ЦП (ЦП классов А и В по Чайлд-Пью). Контрольную группу составили 30 здоровых доноров (без клинических проявлений НАЖБП). Клиническая характеристика исследуемых групп приведена в Табл. 1.

Диагноз НАЖБП с оценкой степени активности НАСГ и класса ЦП по Чайлд-Пью устанавливался на основании традиционных клинических, лабораторных, инструментальных и гистологических данных. Выполнялось ультразвуковое исследование

органов брюшной полости (аппарат Vivid Pro-7, General Electric, США) с оценкой эхогенности и размеров печени, размеров селезенки, наличия асцита, при доплерографии определялись диаметры воротной и селезеночной вен и линейная скорость кровотока в них для выявления портальной гипертензии. При эзофагогастроскопии оценивалось наличие варикозного расширения вен пищевода и кардиального отдела желудка. Части больных выполнялась спиральная компьютерная томография печени с оценкой плотности печени. У части пациентов для определения формы заболевания применялся гистологический метод. Доноры включены в исследование на основании информированного

Таблица 1.
Клинико-лабораторная характеристика групп

Показатель	Контроль (n=30)	СП (n=31)	НАСГ-СА (n=26)	НАСГ-УА (n=19)	НАСГ-ВА (n=19)	ЦП (n=11)
Возраст, лет	48.14±2.73 (49.65)	55.00±1.56 (54.00)	50.00±1.77 (52.00)	49.08±2.04 (49.54)	48.06±2.70 (49.62)	52.21±2.32 (52.43)
Мужчин/ женщин (n)	16/14	16/15	15/11	11/8	10/9	6/5
АлАТ, Ед/л	20.48±4.66 (15.00)	27.36±3.19 (24.60)	37.55±2.73 (39.35)*,Δ	69.57±4.93 (67.68)*,Δ,δ	191.18±54.13 (118.95)*,Δ,δ,**	53.47± 8.91 (51.56)*,Δ,δ,**,0
АсАТ, Ед/л	19.28±1.45 (19.00)	26.39 ± 3.19 (21.00)	31.23 ± 2.03 (29.55)*,Δ	47.92±5.4 (43.00)*,Δ,δ	141.15±35.85 (83.45)*,Δ,δ,**	59.97± 11.70 (52.47)*,Δ,δ,**,0
Билирубин общий, мкмоль/л	13.67±3.22 (11.06)	12.18±0.83 (11.65)	16.69 ± 1.56 (15.25)	19.78±3.04 (16.76)	19.56±3.24 (17.61)Δ	58.80±11.49 (58.41)*,Δ,δ,**,0
Билирубин прямой, мкмоль/л	5.45±1.80 (6.11)	7.56±1.56 (7.39)	8.42±1.60 (7.71)	7.17±1.47 (7.44)	9.34±2.15 (7.20)	42.33±10.27 (47.38)*,Δ,δ,**,0
ЩФ, Ед/л	141.55±13.05 (139.40)	153.76±13.21 (160.33)	187.50±16.42 (197.00)*	229.76±14.05 (222.31)Δ,δ	270.75±16.2 (244.05)*,Δ,δ	257.34±30.01 (225.37)*,Δ,δ
СРБ, мг/л	0.84±0.12 (0.43)	1.35±0.42 (0.73)	2.27±1.37 (0.83)*	2.41±0.90 (0.74)*	7.76±2.53 (4.05)Δ	11.31±3.43 (11.02)*,Δ,δ,**,0
СОЭ, мм/ч	8.83±1.56 (5.50)	7.54±0.46 (6.00)	8.17±0.33 (6.50)	14.57±1.32 (13.62)*	18.58±3.39 (18.34)*,Δ,δ	29.67±3.54 (26.00)*,Δ,δ,0
Альбумин, г/л	44.50±1.54 (46.09)	42.88±0.78 (42.75)	40.15±1.62 (41.34)	42.5±0.5 (42.50)	42.48±3.24 (39.52)*	39.48±2.02 (37.60)*
Протромбин, %	85.21±4.50 (86.92)	82.29±7.72 (84.76)	85.20±2.20 (85.32)	95.13±3.09 (88.10)	104.76±13.01 (91.11)	69.66±5.17 (71.18)*,Δ,δ,**,0
Глюкоза, моль/л	5.05 ± 0.2 (4.98)	5.7 ± 0.31 (5.69)	5.49±0.17 (5.20)	5.79±0.25 (5.50)	6.01±0.5 (5.60)	6.22±1.11 (5.80)
ОХС, ммоль/л	5.73±0.47 (5.09)	5.15±0.30 (5.31)	5.79±0.23 (5.92)*	6.66±0.60 (6.15)*,Δ	6.39±0.45 (6.67)*,Δ	5.22±0.60 (5.10)**,0
ЛПВП, ммоль/л	1.42 ± 0.09 (1.34)	1.67±0.21 (1.28)	1.31±0.14 (1.09)	1.25±0.12 (1.10)*	1.1±0.09 (1.04)Δ	1.08±0.19 (1.00)Δ
ЛПНП, ммоль/л	3.32±0.35 (3.50)	2.90±0.28 (3.01)	3.79±0.33 (3.79)Δ	4.38±0.37 (4.33)*,Δ,δ	4.31±0.24 (4.50)*,Δ,δ	3.03±0.48 (2.90)*,0
ТГ, ммоль/л	1.45±0.20 (1.14)	2.06±0.28 (1.76)	2.27±0.30 (2.31)*	3.24±0.68 (2.43)*	2.25±0.21 (2.03)*	1.12±0.17 (0.96)Δ,δ,**,0

Примечание. Данные представлены в виде М±m. В скобках — медиана. p<0.05 по сравнению с *контролем, Δс группой СП, #с группой НАСГ-СА, **с группой НАСГ-УА, δс группой НАСГ-ВА (U критерий Манна-Уитни).

согласия. Критерии исключения, общие для изучаемых групп: перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, беременность и лактация, курение. У обследованных лиц исключен вирусный, лекарственный и аутоиммунный генез поражения печени, сахарный диабет 1-го и 2-го типа. Все доноры являлись жителями Республики Карелия. На проведение исследований получено согласие Комитета по медицинской этике Министерства здравоохранения Республики Карелия и Петрозаводского государственного университета.

В качестве материала для исследования использовали образцы венозной крови доноров изучаемых групп. Взятие материала для исследования проводилось до назначения гепатопротекторной и иной терапии. Оценивались печеночные функциональные пробы: активность АлАТ, АсАТ, уровень общего и прямого билирубина, ЩФ, альбумина, протромбина, СРБ, ОХС, ЛПВП, ЛПНП, ТГ — на анализаторе Random Access F-15 (BioSystems, Испания). Также оценивалась скорость оседания эритроцитов (СОЭ) (методом Вестергрена).

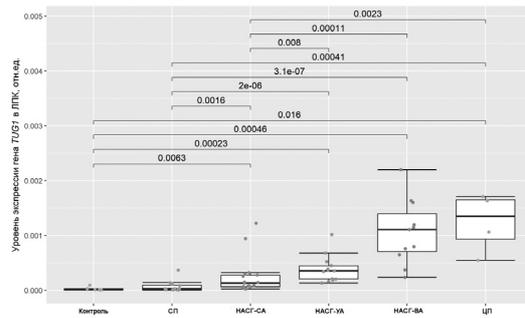
Для определения уровня транскрипции генов *TUG1*, *DANCR*, *MALAT1*, *GAS5* из цельной крови выделяли лейкоциты периферической крови (ЛПК).

Тотальную РНК из ЛПК выделяли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). Первую цепь комплементарной ДНК синтезировали из тотальной РНК с помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия). Степень чистоты и концентрацию кДНК определяли на приборе SmartSpecPlus (Bio-Rad, США). Уровень мРНК генов в ЛПК оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе LightCycler 96 (Roche), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («Евроген», Россия). Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Повторность при ПЦР-анализе — 2-кратная.

Уровень транскрипции изучаемых генов был рассчитан относительно уровня транскрипции гена *18S rRNA* [17]. Праймеры для определения уровня транскрипции генов *TUG1* (прямой 5'-cggaggatggttggttg-3', обратный 5'-tacagagtgactcgctaagg-3'), *DANCR* (прямой 5'-agcgcaggttgacaactaca-3', обратный 5'-ggacacgtggttgctacaag-3'), *MALAT1* (прямой 5'-acgagtgctgctatcttag-3', обратный 5'-gattctgtgtatgcctggttag-3'), *GAS5* (прямой 5'-gactcctgtgaggtatggtg-3', обратный 5'-gctattctatccttctggg-3') конструировали в программе Beacon Designer 5.

Рис. 1.
Уровень экспрессии гена *TUG1* в ЛПК пациентов с НАЖБП и у доноров контрольной группы.

Примечание. Горизонтальная линия внутри прямоугольника — медиана. Приведены значения $p < 0.05$ (U критерий Манна-Уитни).

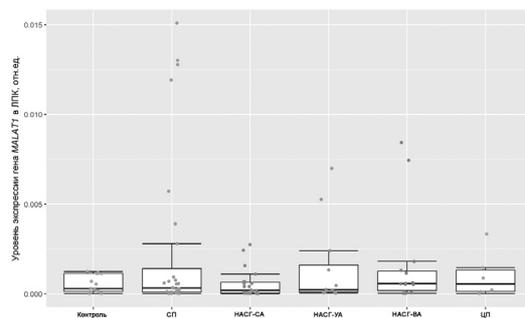


Результаты

Проведен сравнительный анализ общеклинических биохимических маркеров у пациентов НАЖБП изучаемых групп и у здоровых людей (Табл. 1).

Рис. 2.
Уровень экспрессии гена *MALAT1* в ЛПК пациентов с НАЖБП и у доноров контрольной группы.

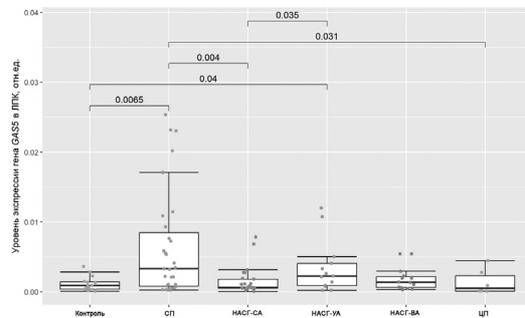
Примечание. Горизонтальная линия внутри прямоугольника — медиана. Приведены значения $p < 0.05$ (U критерий Манна-Уитни).



Значения всех изучаемых клинических показателей крови у пациентов СП не отличаются от контроля и находятся в пределах клинической нор-

Рис. 3.
Уровень экспрессии гена *GAS5* в ЛПК пациентов с НАЖБП и у доноров контрольной группы.

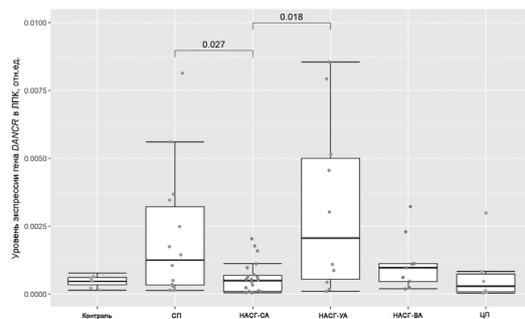
Примечание. Горизонтальная линия внутри прямоугольника — медиана. Приведены значения $p < 0.05$ (U критерий Манна-Уитни).



мы. При НАСГ слабой активности, по сравнению со стеатозом печени, наблюдается достоверно более высокий уровень аминотрансфераз, ЛПНП. При

Рис. 4.
Уровень экспрессии гена *DANCR* в ЛПК пациентов с НАЖБП и у доноров контрольной группы.

Примечание. Горизонтальная линия внутри прямоугольника — медиана. Приведены значения $p < 0.05$ (U критерий Манна-Уитни).



нарастании активности НАСГ зарегистрировано достоверное повышение уровней аминотрансфераз и ЩФ, а также изменения в липидном спектре.

Статистический анализ проведен с помощью языка статистического программирования и среды R (версия 4.3.1) с открытым исходным кодом, визуализация выполнена с использованием пакета ggplot2. Статистический анализ проведен с использованием критерия U Вилкоксона — Манна — Уитни. Проводили тест на соответствие результатов нормальному распределению. Значения $p < 0.05$ рассматривались как статистически значимые.

При высокой активности НАСГ нарастает уровень маркеров воспаления (СРБ, СОЭ), а также уровень ОХС, вероятно, за счёт повышения уровня ЛПНП в крови. У пациентов с НАЖБП на цирротической стадии, по сравнению с НАСГ-ВА, снижен уровень аминотрансфераз. Уровень общего и прямого билирубина, а также СОЭ и СРБ, при ЦП находятся на высоком уровне и значимо отличаются от данных показателей крови у доноров всех остальных изучаемых групп. Ослабление белок-синтетической функции печени при ЦП также отражается в понижении уровней альбумина и протромбина. При ЦП отмечается также нарушение липидного метаболизма (снижается уровень всех клинических показателей липидного спектра).

В результате сравнительного анализа уровней транскриптов *TUG1* в ЛПК пациентов НАЖБП изучаемых групп и здоровых людей (Рис. 1), обнаружено, что уровень экспрессии гена *TUG1* в ЛПК здоровых людей значительно ниже, чем у больных НАСГ и НАЖБП на стадии ЦП. Уровни экспрессии *TUG1* в ЛПК здоровых людей и у пациентов СП не различаются. Среди больных НАЖБП, пациенты со стеатозом печени имели минимальный уровень экспрессии гена *TUG1* в ЛПК. Уровень экспрессии *TUG1* в ЛПК при НАСГ слабой активности оказался выше, чем при СП, но ниже, чем при НАСГ умеренной и высокой активности и циррозе печени. При этом отличий уровня транскрипции *TUG1* между группами НАСГ-УА, НАСГ-ВА и ЦП не обнаружено (Рис. 1). Таким образом, выявлен более высокий уровень экспрессии гена *TUG1* в ЛПК у больных НАСГ слабой активности по сравнению с СП, а также тенденция повышения уровня мРНК *TUG1* в ЛПК при нарастании активности НАСГ.

Анализ уровня экспрессии днРНК *MALAT1* (Рис. 2) показал отсутствие достоверных различий между всеми исследуемыми группами (контроль, стеатоз печени, НАСГ различной степени активности и цирроз печени).

Показано, что у пациентов группы СП уровень мРНК *GAS5* в ЛПК выше, чем у здоровых людей, пациентов с НАСГ-СА и ЦП (Рис. 3). Пациенты с НАСГ-УА имеют более высокий уровень экспрессии *GAS5* в ЛПК по сравнению с контролем и НАСГ-СА (Рис. 3).

Количество транскриптов *DANCR* в ЛПК пациентов с НАСГ-СА оказалось ниже, чем у пациентов со стеатозом печени и НАСГ-УА (Рис. 4).

Проведен корреляционный анализ всех изучаемых показателей в группах исследования. Обнаружена значимая положительная корреляция

между уровнями экспрессии *TUG1* и *GAS5* ($r_s=0.801$, $p=0.002$), а также *GAS5* и *DANCR* ($r_s=0.943$, $p=0.035$) в ЛПК пациентов СП. У пациентов с НАСГ высокой

активности положительно коррелируют уровни экспрессии в ЛПК днРНК *MALAT1* и *DANCR* ($r_s=0.857$, $p=0.036$).

Обсуждение

Нами зарегистрированы специфические изменения клинической картины при прогрессировании НАЖБП (Табл. 1). Так, по мере нарастания активности НАСГ зафиксировано повышение уровня маркеров цитолиза, воспаления, а также изменения липидного обмена. При ЦП изменения клинических показателей свидетельствуют о развитии печеночно-клеточной недостаточности вследствие уменьшения массы паренхиматозной ткани, нарушении белкового и липидного обменов, прогрессирующем воспалении. В целом, биохимические показатели у каждой группы пациентов соответствуют степени прогрессирования НАЖБП.

Нами впервые выявлен более высокий уровень экспрессии гена *TUG1* в ЛПК у больных НАСГ слабой активности по сравнению с ранней формой НАЖБП (СП), а также тенденция повышения уровня мРНК *TUG1* в ЛПК при нарастании активности НАСГ. По данным литературы, *TUG1* преимущественно расположена в ядре и может участвовать в регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции [18]. Имеются сведения о том, что эта днРНК может играть определенную роль в развитии фиброза печени [19]. Например, известно, что повышенная экспрессия *TUG1* способствует усилению пролиферации и миграции опухолевых клеток при раке поджелудочной железы посредством участия в регуляции TGF- β -Smad сигнального пути и эпителиально-мезенхимального перехода [20]. *TUG1* может модулировать генные локусы, связанные с опухолевым ростом, метастазированием, эпителиально-мезенхимальным переходом в тканях путем связывания с белками EZH2 (метилтрансфераза) и EED комплекса PRC2, таким образом, участвуя в ремоделировании хроматина [21]. Нарушение взаимодействия *TUG1* с указанными коровыми элементами PRC2 комплекса приводит к снижению уровня мРНК гена *MMP2*, тогда как повышенная экспрессия *TUG1*, напротив, способствует усилению взаимодействия *TUG1*/PRC2 и усилению экспрессии *MMP2* [22]. Нам не удалось обнаружить в литературе сведения относительно уровня экспрессии *TUG1* в ЛПК при стеатозе печени и НАСГ различной степени активности. Исследования, в которых рассматривается роль *TUG1* в патогенезе заболеваний печени, в основном касаются цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Показана тесная связь повышенной экспрессии *TUG1* с риском цирроза печени [19]. Lin и соавторы предлагают использовать эту днРНК в качестве терапевтической мишени при ГЦК [15].

Полученные нами в настоящем исследовании новые данные указывают на потенциальную возможность использования уровня экспрессии *TUG1* в лейкоцитах периферической крови в качестве малоинвазивного диагностического (для разграничения СП и НАСГ-СА) и прогностического маркера (при прогрессировании НАЖБП).

Нами не обнаружено значимых различий количества транскриптов днРНК *MALAT1* в ЛПК индивидов исследуемых групп (Рис. 2). Надо отметить, что полученные нами данные не коррелируют с результатами других исследований, в которых выявлено повышение уровня экспрессии *MALAT1* при заболеваниях печени [3, 23]. Вероятно, это может быть обусловлено различиями в материале для исследования (различные типы клеток), а также разными критериями формирования групп исследования. В представленной нами работе было проведено строгое деление пациентов на группы — отдельно были выделены пациенты с СП, НАСГ различной степени активности и ЦП. В экспериментах других авторов используются культуры клеток и модельные животные. В клинических же исследованиях часто при формировании групп пациентов не проводится их достаточной дифференцировки по степени активности заболевания. Так, в исследовании [23] сравнивали контрольную группу и группу с НАЖБП, не разделяя пациентов на группы СП, НАСГ и ЦП.

Тем не менее, в настоящее время имеются сведения, указывающие на роль *MALAT1* в усилении накопления липидов в печени, в частности регуляции оси PPAR α /CD36, развитии воспаления и фиброза при НАЖБП [3; 24]. Как правило, у пациентов с НАЖБП наблюдается увеличение количества молекул *MALAT1* в клетках печени [3]. *MALAT1* участвует в регуляции многих биохимических и физиологических процессов в различных тканях организма. Многофункциональность этой днРНК обусловлена ее взаимодействием с широким спектром молекулярных мишеней. Так, при исследовании возможных взаимодействий *MALAT1* с белками с помощью веб-ресурса STRING, Liao и соавторы [25] выявили 10 белков, с которыми может связываться эта днРНК. Среди этих белков указаны белки PRC2 комплекса EZH2, SUZ12, а также гистонацетилаза HDAC9, транскрипционный фактор SP1, белок AGO2 комплекса Argonaute (участвующего в образовании и регулировании активности микроРНК), фактор сплайсинга SRSF1. Это свидетельствует о включении *MALAT1* в регуляцию экспрессии генов, контролирующей клеточный гомеостаз на уровне транскрипции. Кроме этого, указанная днРНК регулирует процессы фиброгенеза, липогенеза через конкурентное связывание («спожирание») с определенными микроРНК. Например, показано, что увеличение экспрессии *MALAT1* в гепатоцитах мышей, находящихся на высокожировой диете, способствует усилению уровня экспрессии гена ядерного транскриптора рецептора ароматических углеводов *ARNT* посредством связывания с микроРНК-206. В свою очередь, белок ARNT может ингибировать экспрессию PPAR α и способствовать накоплению липидов [23].

В настоящей работе был также проведен анализ экспрессии днРНК *GAS5* в ЛПК доноров изучаемых

групп. Было показано, что у пациентов с ранней формой НАЖБП (СП) уровень мРНК *GAS5* в ЛПК выше, чем у здоровых людей и пациентов НАСГ-СА и ЦП. У пациентов с НАСГ-УА уровень экспрессии *GAS5* в ЛПК выше по сравнению с контролем и НАСГ-СА (Рис. 3).

Имеющиеся в литературе данные относительно экспрессии *GAS5* при НАЖБП не однозначны. Некоторыми авторами показана прямая положительная корреляция экспрессии *GAS5* с уровнем фиброза при НАСГ, а также с прогрессированием НАЖБП [9]. Однако в данной работе пациенты с НАЖБП разделены на СП и НАСГ без учета степени активности, а также среди пациентов с НАЖБП не были исключены лица с сахарным диабетом [9]. В работе с использованием активированных звездчатых клеток LX-2 исследована роль *GAS5* в регуляции фиброза. Показано, что *GAS5* оказывает ингибирующее действие на активацию ЗКП путем подавления передачи сигналов NF-κB посредством регуляции оси miR-433-3p/TLR10 [26]. На мышинной модели раскрыт один из механизмов участия *GAS5* в прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени путем нацеливания на ось микроРНК-29a-3p/NOTCH2 у мышей, находящихся на высокожировой диете [13]. При этом другие авторы [14] указывают на снижение экспрессии *GAS5* в клетках печени и повышении экспрессии miR-28a-5p у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD), и мышей с дефицитом лептина, страдающих ожирением (Ob/Ob) [14].

В настоящем исследовании получены результаты (Рис. 3), свидетельствующие о сложной динамике уровня экспрессии *GAS5* в ЛПК при прогрессировании НАЖБП. Вероятно, уровень *GAS5* повышается при формировании стеатоза печени и затем начинает снижаться при переходе в НАСГ. Противоречивые данные, полученные в различных исследованиях, указывают на необходимость

Заключение

Таким образом, получены новые данные по уровню экспрессии днРНК *MALAT1*, *GAS5*, *DANCR*, *TUG1* в ЛПК пациентов с НАЖБП, свидетельствующие о возможности использования уровня экспрессии *TUG1* в ЛПК в качестве малоинвазивного

Финансовая поддержка

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № FMEN-2022-0009 (№ гос. регистрации 122031100064-4) на оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра Карельский научный центр Российской академии наук и с использованием Уникальной научной установки (УНУ) «Многокомпонентный

Financial support

The work was carried out within the framework of the state assignment on the topic No. FMEN-2022-0009 (state registration No. 122031100064-4) on the equipment of the Center for Collective Use of the Federal Research Center Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences and using the Unique

сравнительного анализа в группах пациентов с СП, НАСГ различной степени активности и ЦП со строгим дифференцированием их по степени активности воспаления, степени фиброза, а также исключением сопутствующих патологий.

На сложность регуляции количества транскриптов изучаемых днРНК, в том числе *GAS5*, в ЛПК пациентов НАЖБП разных групп, указывают и данные корреляционного анализа, согласно которым уровни экспрессии положительно коррелируют между собой в зависимости от группы исследования.

Нами также было показано, что уровень экспрессии *DANCR* в ЛПК пациентов с НАСГ-СА достоверно ниже, чем у пациентов со стеатозом печени и НАСГ-УА (Рис. 4). Имеющиеся литературные данные о роли *DANCR* в патогенезе патологий печени касаются главным образом ГЦК. Повышенный уровень *DANCR* связывают с прогрессированием ГЦК [27]. ДнРНК *DANCR* преимущественно расположена в цитоплазме и регулирует экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, «спонжируя» (то есть действуя как молекулярная губка) множество микроРНК. *DANCR* регулирует активность путей PI3K/AKT/NF-κB, Wnt/β-катенин, ERK/SMAD, MAPK, IL-6/JAK1/STAT3, Smad2/3, p53, FAK/PI3K/AKT/GSK3β/Snail [28]. Известно, что *DANCR* способствует прогрессированию ГЦК посредством поглощения miR-125b-5p и активации пути MAPK [29].

Нами получены абсолютно новые данные о различиях уровня экспрессии *DANCR* в ЛПК пациентов с НАЖБП (со стеатозом печени, НАСГ слабой и умеренной активности) (Рис. 4). Вероятно, уровень мРНК *DANCR* в лейкоцитах периферической крови может иметь определенную диагностическую ценность при разграничении СП и НАСГ-СА. Однако это предположение требует дополнительных доказательств, которые будут получены в ходе дальнейшего изучения.

диагностического и прогностического маркера при НАЖБП. Также показано, что уровень мРНК *DANCR* в ЛПК может иметь определенную диагностическую ценность при разграничении СП и НАСГ-СА.

программно-аппаратный комплекс для автоматизированного сбора, хранения, разметки научно-исследовательских и клинических биомедицинских данных, их унификации и анализа на базе ЦОД с использованием технологий искусственного интеллекта» (рег. номер: 2075518).

Scientific Installation (UNU) “Multi-component software hardware complex for automated collection, storage, marking of research and clinical biomedical data, their unification and analysis based on a data center using artificial intelligence technologies» (registration number: 2075518).

Литература | References

- Lazebnik L. B., Golovanova E. V., Turkina S. V. et al. Non-alcoholic fatty liver disease in adults: clinic, diagnostics, treatment. Guidelines for therapists, third version. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;1(1):4–52. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-4-52.
Лазебник Л. Б., Голованова Е. В., Туркина С. В. и др. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов, третья версия. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021; 185(1): 4–52. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-185-1-4-52.
- Ye L., Zhao D., Xu Y. et al. LncRNA-Gm9795 promotes inflammation in non-alcoholic steatohepatitis via NF- κ B/JNK pathway by endoplasmic reticulum stress. *J. Transl. Med.* 2021; 19:101. doi: 10.1186/s12967-021-02769-7.
- Leti F., Legendre C., Still C. D. et al. Altered expression of MALAT1 lncRNA in nonalcoholic steatohepatitis fibrosis regulates CXCL5 in hepatic stellate cells. *Translational Research*. 2017; 190: 25–39. doi: 10.1016/j.trsl.2017.09.001.
- Bu F., Wang A., Zhu Y. et al. LncRNA NEAT1: shedding light on mechanisms and opportunities in liver diseases. *Liver Int.* 2020; 40(11): 2612–2626. doi: 10.1111/liv.14629.
- He Z., Yang D., Fan X. et al. The Roles and Mechanisms of lncRNAs in Liver Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(4): 1482. doi:10.3390/ijms21041482.
- Rohilla S., Kaur S., Puria R. Long non-coding RNA in Non-alcoholic fatty liver disease. *Adv Clin Chem.* 2022;110:1–35. doi: 10.1016/bs.acc.2022.06.001.
- Zeng Q., Liu C. H., Wu D. et al. LncRNA and circRNA in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *Biomolecules* 2023; 13, 560. doi:10.3390/biom13030560.
- Yu F., Zheng J., Mao Y. et al. Long Non-coding RNA Growth Arrest-specific Transcript 5 (GAS5) Inhibits Liver Fibrogenesis through a Mechanism of Competing Endogenous RNA. *J Biol Chem.* 2015; 290(47): 28286–28298. doi: 10.1074/jbc.M115.683813.
- Han M.-H., Lee J. H., Kim G. et al. Expression of the Long Noncoding RNA GAS5 Correlates with Liver Fibrosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Genes*. 2020; 11, 545. doi: 10.3390/genes11050545.
- Mukherjee A. G., Wanjari U. R., Gopalakrishnan A. V. et al. Exploring the Regulatory Role of ncrRNA in NAFLD: A Particular Focus on PPARs. *Cells*. 2022; 11, 3959. doi: 10.3390/cells11243959.
- Tripathi V., Ellis J. D., Shen Z. et al. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*. 2010; 39(6): 925–38. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.011.
- Lu J., Guo J., Liu J. et al. Long non-coding RNA MALAT1: A key player in liver diseases. *Frontiers in Medicine*. 2022; 734643. doi: 10.3389/fmed.2021.734643.
- Cui J., Wang Y., Xue H. Long non-coding RNA GAS5 contributes to the progression of nonalcoholic fatty liver disease by targeting the microRNA-29a-3p/NOTCH2 axis. *Bioengineered*. 2022; 13(4): 8370–8381. doi: 10.1080/21655979.2022.2026858.
- Chen, T., Meng, Y., Zhou, Z. et al. GAS5 protects against nonalcoholic fatty liver disease via miR-28a-5p/MARCH7/NLRP3 axis-mediated pyroptosis. *Cell Death Differ.* 2023; 30: 1829–1848. doi: 10.1038/s41418-023-01183-4.
- Lin Y. H., Wu M. H., Huang Y. H. et al. Taurine up-regulated gene 1 functions as a master regulator to coordinate glycolysis and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018; 67(1): 188–203. doi: 10.1002/hep.29462.
- Guo D., Li Y., Chen Y. et al. DANCR promotes HCC progression and regulates EMT by sponging miR-27a-3p via ROCK1/LIMK1/COFILIN1 pathway. *Cell Prolif.* 2019; 52(4): e12628. doi: 10.1111/cpr.12628.
- Pinto J. P., Dias V., Zoller H. et al. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology*. 2010; 130(2): 217–230. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03226.x.
- Wang W. Y., Wang Y. F., Ma P. et al. Taurine-upregulated gene 1: a vital long non-coding RNA associated with cancer in humans (review). *Mol Med Rep.* 2017; 16(5): 6467–6471. doi: 10.3892/mmr.2017.7472.
- Han X., Hong Y., Zhang K. Tug1 is involved in liver fibrosis and activation of hscs by regulating mir-29b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018; 503: 1394–1400. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.054.
- Qin C. F., Zhao F. L. Long non-coding RNA TUG1 can promote proliferation and migration of pancreatic cancer via EMT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017; 21(10): 2377–2384. PMID: 28617552.
- Sun J., Ding C., Yang Z., et al. The long non-coding RNA TUG1 indicates a poor prognosis for colorectal cancer and promotes metastasis by affecting epithelial-mesenchymal transition. *J Transl Med.* 2016; 14:42. doi: 10.1186/s12967-016-0786-z.
- Hu M., Wang Y., Meng Y. et al. Hypoxia induced-disruption of lncRNA TUG1/PRC2 interaction impairs human trophoblast invasion through epigenetically activating Nodal/ALK7 signalling. *J Cell Mol Med.* 2022; 26: 4087–4100. doi: 10.1111/jcmm.17450.
- Xiang J., Deng Y. Y., Liu H. X. et al. LncRNA MALAT1 promotes PPAR α /CD36-mediated hepatic lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease by modulating miR-206/ARNT axis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022; 10: 858558. doi: 10.3389/fbioe.2022.858558.
- Zeng Q., Liu C. H., Wu D. et al. LncRNA and circRNA in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *Biomolecules*. 2023; 13(3): 560. doi: 10.3390/biom13030560.
- Liao X., Chen J., Luo D. et al. Prognostic value of long non-coding RNA MALAT1 in hepatocellular carcinoma: A study based on multi-omics analysis and RT-PCR validation. *Pathology and Oncology Research*. 2023; 28: 1610808. doi: 10.3389/pore.2022.1610808.
- Su S. B., Tao L., Liang X. L. et al. Long noncoding RNA GAS5 inhibits LX-2 cells activation by suppressing NF- κ B signalling through regulation of the miR-433-3p/TLR10 axis. *Dig Liver Dis.* 2022; 54(8): 1066–1075. doi: 10.1016/j.dld.2021.11.002.
- Yuan S., Wang J., Yang F. et al. Long noncoding RNA DANCR increases stemness features of hepatocellular carcinoma by derepression of CTNBN1. *Hepatology*. 2016; 63(2):499–511. doi: 10.1002/hep.27893.
- Ghafouri-Fard S., Khoshbakht T., Hussen B. M. et al. A review on the role of DANCR in the carcinogenesis. *Cancer Cell Int.* 2022; 22(1): 194. doi: 10.1186/s12935-022-02612-z.
- Yang L., Jiang M. N., Liu Y. et al. Crosstalk between lncRNA DANCR and miR-125b-5p in HCC cell progression. *Tumori J.* 2021;107(6): 504–513. doi: 10.1177/0300891620977010.