

DOI: 10.26693/jmbs04.04.077

УДК 616-056.3-06:[616.98:578.825.13]-07:577.216-07

Зубченко С. О.¹, Маруняк С. Р.², Ломіковська М. П.¹

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ХРОНІЧНОЇ ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ НА РІВЕНЬ ЕКСПРЕСІЇ miR-146A ТА miR-155 У ПАЦІЄНТІВ З АЛЕРГОПАТОЛОГІЄЮ

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Україна²Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика, Київ, Україна

svitlana_zu@meta.ua

Вірус Епштейна-Барр (EBV) здатний до пожиттєвої персистенції в організмі людини, в імунокомпетентних клітинах перебуває у латентній фазі і може реактивуватися за умов впливу різних екзо- та ендогенних несприятливих чинників. Специфічна тропність вірусу до імунокомпетентних клітин може впливати на рівень експресії в них мікроРНК (miR), які є активними регуляторами імунної відповіді. У даному дослідженні проведена порівняльна оцінка рівня експресії miR-146a та miR-155 у двох групах пацієнтів з алергопатологією на тлі активної (1-а група) і латентної (2-а група) фаз хронічної EBV-інфекції і контрольної групи здорових осіб. Пацієнтам проводились клінічні, загальні лабораторні, інструментальні, специфічні алергологічні, молекулярно-генетичні дослідження, цитологічні дослідження мазка відбитка зі слизової порожнини носа. Шкірні прик тести виконували екстрактами алергенів (Diater, Іспанія). Оцінка функціонального стану легень проводилась на підставі спірографії (Vitalograf ALPHA № AL011734, Німеччина). Клінічний діагноз АР та / або БА визначені за критеріями ARIA (2016), GINA (2016-2017). Для визначення загального і специфічних IgE (sIgE) до алергенів і специфічних антитіл до EBV (EBNA-IgG, EBV-VCA-IgG) використовували метод імуноферментного аналізу з використанням тест систем «Euroimmun», Німеччина згідно з інструкцією фірми виробника. Визначення ДНК EBV у крові, слині та слизовій задньої стінки глотки виконували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на діагностикумах «AmpliSens» (РФ) при використанні «Rotor Gene 6000» (Corbett Research, Австралія).

Виявлено, що у латентній фазі ЕБВ використовує власні механізми латенції для уникнення імунної відповіді, що характеризуються підвищеним синтезом miR-155 і miR-146a порівняно з контрольною групою, однак протилежним вектором змін цих мікроРНК з антагоністичними властивостями, порівняно з активною фазою інфекції. Натомість, в активній фазі ЕБВ-інфекції даний напрямок змін ли-

ше посилювався і асоціювався з гострими проявами алергопатології. Досліджено, що хронічна ЕБВ-інфекція у пацієнтів з алергопатологією має різний вплив на рівень miR-155 і miR-146a залежно від фази вірусної персистенції.

Ключові слова: вірус Епштейна-Барр, алергічні хвороби, miR-155, miR-146a.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є частиною НДР кафедри клінічної імунології та алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Прогнозування розвитку вірусіндукованих фенотипів алергічних хвороб з персоналізацією їх діагностики та лікування», № державної реєстрації 0118U000110.

Вступ. Вірус Епштейна-Барра (EBV) відноситься до гама-герпесвірусів людини, пов'язаний з різними патологічними станами, включаючи злоякісні пухлини. В організмі вірус перебуває у літентній (активній) і латентній фазах [4]. Латентний стан вірусу забезпечується кількома білками латенції LMP1-6. Латентний мембранний білок-1 (LMP1) є функціональним гомологом сімейства рецепторів фактора некрозу пухлин, який активує ядерний фактор-каппаВ (NF-каппаВ) [6]. Доведено, що через активацію NF-каппаВ EBV ініціює порушення експресії клітинних мікроРНК, які беруть участь у регуляції функцій імунної системи, внаслідок чого даний герпесвірус уникає імунного нагляду [20].

Важливо відзначити, що серед різних miRs, яким надають месенджерну роль у контролі над імунною відповіддю, саме miR-146 (miR-146a і miR-146b) і miR-155 є ключовими; нерегульована експресія цих мікроРНК бере участь також у розвитку деяких видів раку [15,17]. miR-146 і miR-155 зберігаються в їх еволюційному значенні у всіх видах хребетних, але можуть відрізнятися за послідовністю складових. Дані miRs виникають з різних генетичних локусів і генеруються за допомогою різних шляхів обробки РНК: miR-146a з пре-мРНК;

miR-146b з інтрона мРНК; miR-155 з екзона довгої некодуєчої РНК. Обидві miR-146a і miR-155 особливо чутливі до багатьох запальних стимулів, зокрема, індукованих деякими цитокінами (TNF α , IL-1 β , інтерферонами типу I і II (IFN) або RANKL) або Toll-подібними рецепторами і їх лігандами в різних типах клітин, особливо в моноцитах / макрофагах [7,10]. Обидві miRs націлюються і пригнічують кілька ефекторів TLR4, таких як TNF α , PU.1, SHIP1, SOCS1 (miR-155), TNFR-асоційований фактор 6 (TRAF6), IRAK1, IRAK2, IRF3 і IRF5 (miR-146a).

У підсумку, експресія обох цих мікроРНК пов'язана з різними патологічними станами, що характеризуються хронічним аутоімунним запаленням, онкопроцесом, а також вони мають вплив на формування протиінфекційного захисту та алергопатології [1].

Таким чином, вивчення експресії мікроРНК за умов персистенції EBV в організмі людини є актуальним з точки зору патогенетичного впливу на формування різних патологічних станів, в т.ч. алергопатології.

Метою даної роботи було оцінити рівні експресії miR-146a та miR-155 у пацієнтів з алергопатологією на тлі активної і латентної фаз EBV-інфекції.

Матеріали та методи дослідження. Під спостереженням знаходилось 228 пацієнтів, які звернулись на консультативний прийом впродовж 2016-2018 років і в яких було діагностовано бронхіальну астму (БА) та / або алергічний риніт (АР), сенсibiliзацію до пилоквих алергенів. З них у групу дослідження увійшло 46 пацієнтів з алергопатологією і хронічною EBV - інфекцією в активній/латентній фазах, віком 18-59 років, з них 63% жінок (29 осіб), 37% чоловіків (17 осіб). Контрольну групу склали 20 здорових осіб відповідного віку і статі.

Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р. Кожен пацієнт підписував інформовану згоду на участь у дослідженні і вжиті всі заходи для забезпечення анонімності пацієнтів.

Пацієнтам проводились клінічні, загальні лабораторні, інструментальні, специфічні алергологічні, молекулярно-генетичні дослідження, цитологічні дослідження мазка відбитка зі слизової порожнини носа. Шкірні прик тести (ШПТ) виконували екстрактами алергенів (Diater, Іспанія). Оцінка функціонального стану легень проводилась на підставі

спірографії (Vitalograf ALPHA № AL011734, Німеччина). Клінічний діагноз АР та / або БА визначені за критеріями ARIA (2016), GINA (2016-2017).

Для визначення загального і специфічних IgE (sIgE) до алергенів і специфічних антитіл до EBV (EBNA-IgG, EBV-VCA-IgG) використовували метод імуоферментного аналізу з використанням тест систем «Euroimmun», Німеччина згідно з інструкцією фірми виробника. Визначення ДНК EBV у крові, слині та слизовій задньої стінки глотки виконували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на діагностикумах «AmpliSens» (РФ) при використанні «Rotor Gene 6000» (Corbett Research, Австралія).

Визначення експресії miR-146a та miR-155 у зразках сироватки проводили наступним чином: тотальну РНК виділяли з використанням mirVana™ PARIS™ (Ambion, США); miRNAs визначали методом зворотної транскрипції і ПЛР у реальному часі. Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США), специфічних праймерів для кожної miRNAs і 10 нг тотальної РНК. Кількісну ПЛР у реальному часі проводили з використанням TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, США): U6 snRNA (як ендогенний контроль). Температурний режим: ініціальна денатурація 95°C - 10 хв.; 45 циклів 95°C - 15 с і 60°C - 60 секунд. Рівень miRNA розраховували за формулою (2 $\Delta\Delta C_t$ *100), нормалізували до U6 snRNA і представляли в умовних одиницях (YO). Ампліфікацію проводили на 7500 Fast Real_time PCR (Applied Biosystems, США). Отримані дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення 7500 Fast Real_time PCR і відображені за допомогою графіка (рис. 1).

Результати досліджень аналізували з використанням статистичного пакету IBM SPSS Statistics v.21. Для первинного аналізу та побудови графіків

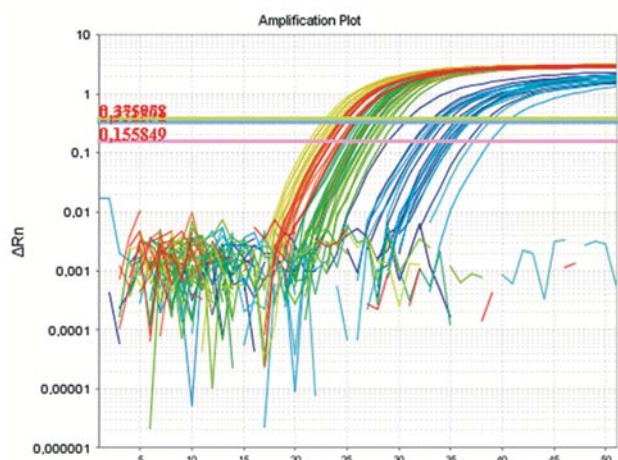


Рис. 1. Графік приросту інтенсивності флюоресценції в ході ПЛР у реальному часі

використовували пакет Microsoft Excel. Вірогідність різниці між вибірками оцінювали за t-критерієм Стьюдента, розбіжності вважали вірогідними при $p < 0,05$. Усі кількісні показники наведено у вигляді $x \pm SD$, де x - середнє арифметичне, SD - середньоквадратичне відхилення.

Результати дослідження. На підставі проведених клінічних, загальних лабораторних, інструментальних, специфічних алергологічних і молекулярно-генетичних досліджень для досягнення поставленої мети було відібрано 46 пацієнтів, яких поділили на 2 групи: 1-а група – 27 осіб з алергопатологією на тлі активної фази хронічної EBV-інфекції (ПЛР «+» слина і/або слизова) і 2-а група – 19 осіб з алергопатологією і латентною фазою EBV-інфекції, визначеній на підставі наявності специфічних EBNA-IgG⁺ та EBV-VCA-IgG⁺ антитіл і негативних даних ПЛР. Зауважимо, що у виокремлені групи увійшли пацієнти лише з моно EBV-інфекцією у латентній чи активній фазах хронічної персистенції вірусу, а також те, що жодного пацієнта з реплікацією EBV у крові виявлено не було.

Проведений анамнестичний і клініко-лабораторний аналіз даних показав, що в групі хворих з активною фазою хронічної персистенції EBV частіше спостерігалися симптоми АД в стадії загострення, полінозу з полісенсibiliзацією. Натомість у хворих з латентною фазою хронічної персистенції EBV частіше спостерігалися полінози з бронхообструктивним синдромом в анамнезі, наявність еозинофілії в крові та назоцитограми. Високий рівень загального IgE ($^3 100,0$ МО/мл) виявлено у 18 (66,7%) осіб 1-ї групи (середній показник - $271 \pm 9,20$ МО/мл) і 12 (63,2%) осіб 2-ї групи (середній показник - $202 \pm 5,40$ МО/мл).

Проведений порівняльний аналіз рівнів експресії miR-146a та miR-155 в обох групах пацієнтів і контрольній групі осіб, результати якого наведено в таблиці 1.

Таблиця 1 – Рівні експресії miR-146a та miR-155 у пацієнтів досліджуваних груп (N=46)

мікроРНК	1 група	2 група	Контроль
miR-146a	$35,7 \pm 4,2^1$	$32,9 \pm 3,9^2$	$29,9 \pm 4,2$
miR-155	$47,9 \pm 4,7^3$	$40,7 \pm 1,1$	$38,3 \pm 3,0$

Примітки: ¹ – $p=0,015$ – у порівнянні між 1-ю групою та контролем; ² – $p=0,034$ – у порівнянні між 2-ю групою та контролем; ³ – $p=0,006$ – у порівнянні між 1-ю групою та контролем.

Як видно з таблиці 1, у пацієнтів обох груп з алергопатологією на тлі хронічної EBV-інфекції як в активній, так і в латентній фазах спостерігалися достовірно вищі рівні експресії антизапальної miR-146a на 19,3% ($p=0,015$) та на 9,1% ($p=0,034$) порівняно з контрольною групою. Хоча рівень miR-146a

у групі пацієнтів з активною фазою EBV-інфекції був в 1,1 разів вищим ніж у 2-й групі осіб, однак без достовірної різниці ($p > 0,05$) (рис. 2).

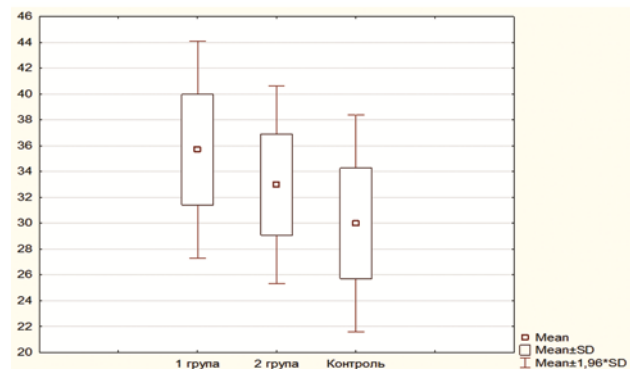


Рис. 2. Рівні експресії miR-146a у групах дослідження, n=46

Що стосується рівня експресії miR-155, то у пацієнтів з алергопатологією і активною фазою EBV-інфекції експресія даної мікроРНК виявлялася достовірно на 25,1% ($p=0,006$) вищою порівняно з контрольною групою. У той же час, достовірних відмінностей між рівнями miR-155 у пацієнтів 2-ї і контрольної груп не виявлялося. Подібно як й у випадку з miR-146a, рівень експресії miR-155 у пацієнтів з активною фазою EBV-інфекції був в 1,8 разів вищим, ніж у 2-й групі осіб ($p > 0,05$), (рис. 3).

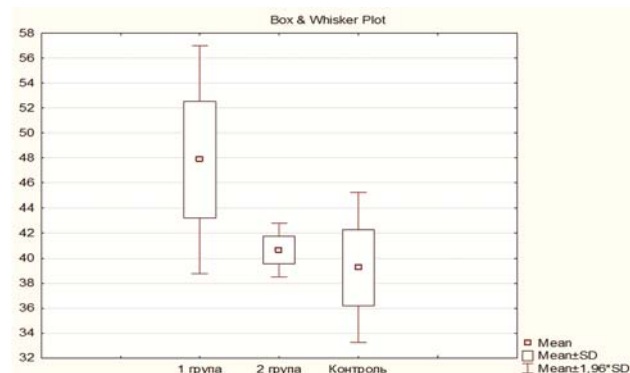


Рис. 3. Рівні експресії miR-155 у групах дослідження, n=46

Таким чином, ми виявили активацію експресії обох досліджуваних miRs у пацієнтів з алергопатологією і хронічною EBV-інфекцією, однак, якщо рівень miR-146 був більшим при активній і латентній фазах персистенції EBV порівняно з контролем, то достовірне збільшення експресії miR-155 виявлено лише у хворих з активною фазою персистенції EBV порівняно з контрольною групою осіб. Щодо порівняння між досліджуваними групами пацієнтів з алергопатологією на тлі EBV-інфекції, то хоча рівні як miR-146, так і miR-155 були вищими при

активній фазі EBV-інфекції порівняно з латентною, однак без достовірної різниці.

Обговорення отриманих результатів. Вірус Епштейна-Барра, потрапивши у людський організм, індукує експресію різноманітних клітинних miRNAs, зокрема miR-155, miR-21 або miR-146a [12]. У EBV-трансформованих клітинних лініях вірус вимикає експресію свого літичного гена і експресує лише обмежений набір «латентних» генів. Наприклад, більшість клітин, інфікованих EBV, знаходяться в латентному режимі III типу і експресують шість ядерних антигенів (EBNA1-6), три мембранно-асоційовані білки (LMP1, LMP2A, LMP2B) і некодуєчі EBER-1 і EBER-2 РНК. LMP1 є основним трансформуючим білком вірусу, діє як конститутивно активований рецептор сімейства TNF-рецепторів і активує різними способами експресію генів [2].

У роботі N. Motsch і співавторів було доведено, що кодований EBV онкопротеїн LMP1 стимулює експресію miR-146a через NFκB-залежний шлях [11]. Автори припустили, що індукція miR-146a грає роль у підтримці хронічної персистенції EBV в організмі людини шляхом модуляції вроджених імунних відповідей на вірус інфіковані клітини-господаря. У цій же роботі виявлено, що стимуляція експресії miR-155 при EBV-інфекції може бути результатом роботи інших від LMP1 вірусних генних продуктів.

Відомо, що ключову роль при вірусній інфекції відіграють цитотоксичні клітини набутого імунітету CD8+ лімфоцити. Експресія miR-146a помітно збільшується у CD8+ лімфоцитах після вірусних інфекцій, як це спостерігається у хворих на хронічний гепатит В: у цих пацієнтів рівні miR-146a у CD8+ клітинах корелювали з параметрами некротичного запалення [18]. Stat1 є важливою мішенню miR-146a в цих клітинах, і його націлювання зменшує продукцію антивірусних цитокінів і сприяє вірусній інфекції. Блокування *in vitro* miR-146a в CD8+ Т-лімфоцитах значно підвищувало вірусспецифічну активність Т-клітин. Ці спостереження підтримують роль miR-146a як негативного регулятора шляху IFN в Т-клітинах.

Натомість, дослідження, проведені в miR-155-дефіцитних мишей, показали, що оптимальна експресія miR-155 необхідна для ефекторних CD8+ Т-клітинних відповідей на вірусну інфекцію і рак [5]. З іншого боку, надекспресія miR-155 посилювала антивірусну, а також протипухлинну CD8 + Т-клітинну відповідь *in vivo* [3].

Опрацювавши дані наукової літератури, ми спробували пояснити результати даного дослідження. Зокрема: при ЕБВ інфекції в фазі латенції за рахунок експресії вірусом LMP1 підвищується продукція протизапальної miR146, що дозволяє

герпесвірусу даного типу переховуватися від імунного нагляду. Хоча при латентній фазі ЕБВ ми спостерігали підвищення рівнів miR155, однак були відсутні достовірні зміни порівняно з групою контролю. Це могло вказувати з одного боку на включення природжених протиінфекційних клітинних механізмів (за рахунок стимуляції miR155 прозапальних цитокінів), а з іншого боку на переважаючу експресію протизапальної miR146a для уникнення імунного нагляду. Таким чином, на нашу думку, за рахунок підвищення експресії miR146a у відповідь на вірусний LMP1 формується імунна толерантність ЕБВ при латентній фазі. У той же час, при активній фазі ЕБВ інфекції, за наявності копій вірусної ДНК у біологічних середовищах, відбувається значна активація запальної імунної відповіді за гуморальним типом, при якій уже підвищена експресія miR146a не здатна забезпечити толерантність до вірусу, що ми прослідковуємо в результатах дослідження: достовірне зростання антизапальної miR146a на тлі достовірного зростання прозапальної miR155.

Щодо алергії і miR-155, то науковці отримали дискусійні дані у своїх дослідженнях. Зокрема, у ранніх роботах, проведених Malmhäll et al. повідомлялось, що в miR-155-дефіцитних мишей був знижений рівень еозинофілів і гіперсекреції слизу в легенях, експериментально стимульованих алергеном, і що Th2 клітини і цитокіни з антизапальною активністю (IL-4, IL-5 і IL-13) також були знижені, що вказувало за порушення активації Th2 [9]. Цей результат викликав інтерес, оскільки він суперечив попередньому дослідженню Rodriguez et al. [13], де вказано, що відсутність експресії miR-155 сприяла поляризації та активації Th2. Malmhäll et al. пояснили цю невідповідність з різними клітинними лініями, які використовувалися у дослідженнях [45]. Група Rodriguez et al. виділяла CD4+ Т-клітини у miR-155-дефіцитних мишей, які поляризувалися в клітини Th2 *in vitro*, тоді як Th2 зразки Malmhäll et al. [9] були зібрані з алерген-інфікованих мишей з порушенням презентації антигену в дендритних клітинах (DC), що могло впливати на низхідні відповіді Th2 лімфоцитів. Ця невідповідність була потім частково підтверджена групою Okoye et al., які дійшли висновку, що miR-155 і miR-146a грають протилежні ролі в регуляції імунітету, ініційованого Th2 клітинами (алергічний і гельмінтний імунітет) [16]. Зрештою, науковці констатували, що відсутність miR-155 стимулює диференціювання клітин Th2 через IL-4, але інгібує DC-викликане диференціювання Th2 щодо алергії. Правильність висновків підтверджена тим, що при експериментальній БА miR-155-дефіцитні миші показали очевидне послаблення бронхіальної гіперреактивності, яка є

однією з домінуючих ознак астми [19]. Як виробництво слизу, так і запальні клітини, зокрема, еозинофіли, індуковані астмою, були значно зменшені в легенях miR-155-дефіцитних мишей порівняно з мишами дикого типу [9].

Останнім часом також запропоновано новий механізм, при якому miR-155 діє як ключовий позитивний регулятор в алерген-індукованому запаленні дихальних шляхів через вроджені лімфоїдні клітини 2 типу (ILC2s, раніше відомі як натуральні хелпери) та IL-33 [14]. ILC2s - тип Th2 цитокінів, що продукуються клітинами в слизовій оболонці дихальних шляхів [19]. Активізація ILC2s сприяє алергічному запаленню легень. miR-155-дефіцитні миші демонстрували зменшення IL-33-опосередкованого алергічного запалення і збільшення ILC2s [14]. Поряд з астмою, ефект miR-155 на алергію також був виявлений при atopічному дерматиті. Порівняно зі здоровими суб'єктами, miR-155 був гіперекспресований у пацієнтів з ураженням шкіри при atopічному дерматиті. При цьому гіперекспресія miR-155 виявлялась у кількох лініях імунних клітин, включаючи Т-клітини, DC, фібробласти і тучні клітини [8].

За даними дослідження, підвищення рівнів miR-155 у пацієнтів 1-ї групи асоціювалось з частішими проявами АД, полінозу з полісенсibiliзацією. Причому, найвищі рівні miR-155 виявлені у пацієнтів з тяжкою формою АД в стадії загострення і гіпер IgE-синдромом.

У пацієнтів 2-ї групи також виявлені вищі рівні miR-155, хоча без достовірної різниці з контрольною групою, при цьому пацієнти 2-ї групи характеризувались наявністю пилкової алергії з бронхообструктивним синдромом в анамнезі, еозинофілією

в крові та назоцитогамі. На нашу думку, дисбаланс між miR-155 і miR-146a, яку EBV «створював» для забезпечення фази латенції, сприяв хронізації алергічного запального процесу. Зроблений нами висновок підтверджував дані Окоуе і колег про антагоністичну роль miR-155 і miR-146a у регуляції імунної відповіді, керованої Th2 [16].

Висновки. Підсумовуючи результати даної роботи можна зробити висновки, що хронічна ЕБВ-інфекція у пацієнтів з алергопатологією має різний вплив на рівень miR-155 і miR-146a залежно від фази вірусної персистенції. У латентній фазі ЕБВ використовує власні механізми латенції для уникнення імунної відповіді, що характеризуються підвищенням синтезом miR-155 і miR-146a порівняно з контрольною групою, однак протилежним вектором змін цих miRs з антагоністичними властивостями, порівняно з активною фазою. В активній фазі ЕБВ-інфекції даний напрямок змін лише посилювався, особливо на прикладі miR-155 і асоціювався з гострими проявами алергопатології. Збільшення експресії miR-155 ініціювало недостатньо ефективну протівірусну відповідь зі сторони як гуморального, так і клітинного імунітету, посилювало клітинно-опосередковане запалення, працюючи в унісон з miR-146a.

У перспективі подальших досліджень є вивчення ймовірного взаємозв'язку рівнів експресії miR-146a і miR-155 і цитокінового профілю, зокрема рівнями цитокінів з протівірусною активністю (IL12, IL1b, IL33, TNF- α , IFN- γ), регуляторних (IL10), антизапальних (IL4, IL5, IL9, IL13), а також з клінічним перебігом різних алергічних хвороб і впливу на них вірусу Епштейна-Барр як імунотропного.

References

1. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *The Journal of experimental medicine*. 2011; 208(6): 1189-201. PMID: 21555486. PMCID: PMC3173243. DOI: 10.1084/jem.20101823
2. Callegari S, Gastaldello S, Faridani OR, Masucci MG. Epstein-barr virus encoded microRNAs target sumo-regulated cellular functions. *FEBS J*. 2014; 281: 4935-50. PMID: 25205475. DOI: 10.1111/febs.13040
3. Dudda JC, Salaun B, Ji Y, Palmer DC, Monnot GC, Merck E, Boudousquie C, et al. MicroRNA-155 is required for effector CD8+ T cell responses to virus infection and cancer. *Immunity*. 2013; 38(4): 742-53. PMID: 23601686. PMCID: PMC3788592. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.12.006
4. Esau D. Viral Causes of Lymphoma: The History of Epstein-Barr Virus and Human T-Lymphotropic Virus 1. *Virology: research and treatment*. 2017; 8: 1178122X17731772. PMID: 28983187. PMCID: PMC5621661. DOI: 10.1177/1178122X17731772
5. Gracias DT, Stelekati E, Hope JL, Boesteanu AC, Doering TA, Norton J, et al. The microRNA miR-155 controls CD8 (+) T cell responses by regulating interferon signaling. *Nature immunology*. 2013; 14(6): 593-602. PMID: 23603793. PMCID: PMC3664306. DOI: 10.1038/ni.2576
6. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *Journal of oral microbiology*. 2013; 5. PMID: 24167660. PMCID: PMC3809354. DOI: 10.3402/jom.v5i0.22766
7. Labbaye C, Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *Journal of hematology and oncology*. 2012; 5: 13. PMID: 22453030. PMCID: PMC3342163. DOI: 10.1186/1756-8722-5-13

8. Liu WH, Kang SG, Huang Z, Wu CJ, Jin HY, Maine CJ, et al. A miR-155-Peli1-c-Rel pathway controls the generation and function of T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2016; 213: 1901–19. PMID: 27481129. PMCID: PMC4995083. DOI: 10.1084/jem.20160204
9. Malmhäll C, Alawieh S, Lu Y, Sjostrand M, Bossios A, Eldh M, et al. MicroRNA-155 is essential for Th2-mediated allergen-induced eosinophilic inflammation in the lung. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133: 1429–38. PMID: 24373357. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.11.008
10. Mashima R. Physiological roles of miR-155. *Immunology.* 2015; 145(3): 323–33. PMID: 25829072. PMCID: PMC4479532. DOI: 10.1111/imm.12468
11. Motsch N, Pfuhl T, Mrazek J, Barth S, Grässer FA. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol.* 2007; 4(3): 131–7. PMID: 18347435
12. Riley KJ, Rabinowitz GS, Yario TA, Luna JM, Darnell RB, Steitz JA. EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency. *The EMBO journal.* 2012; 31(9): 2207–21. PMID: 22473208. PMCID: PMC3343464. DOI: 10.1038/emboj.2012.63
13. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science.* 2007; 316(5824): 608–11. PMID: 17463290. PMCID: PMC2610435. DOI: 10.1126/science.1139253
14. O'Connell R, Kahn D, Gibson W, Round T, Schole R, Chaudhuri A, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity.* 2010; 33: 607–19. PMID: 20888269. PMCID: PMC2966521. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.09.009
15. Okada H, Kohanbash G, Lotze MT. MicroRNAs in immune regulation--opportunities for cancer immunotherapy. *The international journal of biochemistry and cell biology.* 2010; 42(8): 1256–61. PMID: 20144731. PMCID: PMC2889234. DOI:10.1016/j.biocel.2010.02.002
16. Okoye IS, Czieso S, Ktistaki E, Roderick K, Coomes SM, Pelly VS, et al. Transcriptomics identified a critical role for Th2 cell-intrinsic miR-155 in mediating allergy and antihelminth immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: E3081–E3090. PMID: 25024218. PMCID: PMC4121777. DOI: 10.1073/pnas.1406322111
17. Paladini L, Fabris L, Bottai G, Raschioni C, Calin GA, Santarpia L. Targeting microRNAs as key modulators of tumor immune response. *Journal of experimental and clinical cancer research: CR.* 2016; 35: 103. PMID: 27349385. DOI: 10.1186/s13046-016-0375-2
18. Wang S, Zhang X, Ju Y, Zhao B, Yan X, Hu J, et al. MicroRNA-146a feedback suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol.* 2013; 191(1): 293–301. PMID: 23698745. DOI: 10.4049/jimmunol.1202100
19. Zech A, Ayata CK, Pankratz F, Meyer A, Baudiss K, Cicko S, et al. MicroRNA-155 modulates P2R signaling and Th2 priming of dendritic cells during allergic airway inflammation in mice. *Allergy.* 2015; 70(9): 1121–29. PMID: 25944053. DOI: 10.1111/all.12643
20. Zubchenko SO, Maruniak SR. Effects of herpesvirus infections on formation of allergy pathology. *East European Scientific Journal.* 2016; 1(10): 15–20.

УДК 616-056.3-06:[616.98:578.825.13]-07:577.216-07

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭПШТЕЙНА-БАРР ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ miR-146a И miR-155 У ПАЦИЕНТОВ С АЛЛЕРГОПАТОЛОГИЕЙ
Зубченко С. А., Маруняк С. Р., Ломиковская М. П.

Резюме. Вирус Эпштейна-Барр (EBV) способен к пожизненной персистенции в организме человека, в иммунокомпетентных клетках находится в латентной фазе и может реактивироваться в условиях воздействия различных экзо- и эндогенных неблагоприятных факторов. Специфическая тропность вируса к иммунокомпетентным клеткам может влиять на уровень экспрессии в них микроРНК (miR), которые являются активными регуляторами иммунного ответа. В данном исследовании проведена сравнительная оценка уровня экспрессии miR-146a и miR-155 в двух группах пациентов с аллергопатологией на фоне активной (1-а группа) и латентной (2-я группа) фаз хронической EBV-инфекции и контрольной группы здоровых лиц. Пациентам проводились клинические, общие лабораторные, инструментальные, специфические аллергологические, молекулярно-генетические исследования, цитологические исследования мазка отпечатка из слизистой полости носа. Кожные прик тесты выполняли экстрактами аллергенов (Diater, Испания). Оценка функционального состояния легких проводилась на основании спирографии (Vitalograf ALPHA № AL011734, Германия). Клинический диагноз АР и / или БА определены по критериям ARIA (2016), GINA (2016-2017). Для определения общего и специфических IgE (sIgE) к аллергенам и специфическим антителам к EBV (EBNA - IgG, EBV - VCA - IgG) использовали метод иммуноферментного анализа с использованием тест систем "Euroimmun" (Германия) согласно инструкции фирмы производителя. Определения ДНК EBV в крови, слюне и слизистой задней стенки глотки выполняли методом

полимеразной цепной реакции (ПЦР) на диагностикумах "AmpliSens" (РФ) при использовании "Rotor Gene 6000" (Corbett Research, Австралия). Обнаружено, что в латентной фазе EBV использует собственные механизмы латенции для избежания иммунного ответа, которые характеризуются увеличением синтеза miR-155 и miR-146a по сравнению с контрольной группой, однако противоположным вектором изменений этих микроРНК с антагонистическими свойствами, по сравнению с активной фазой инфекции. В активной фазе EBV-инфекции данное направление изменений только усиливалось и ассоциировалось с острыми проявлениями аллергопатологии. Доказано, что хроническая EBV-инфекция у пациентов с аллергопатологией имеет различное влияние на уровень miR-155 и miR-146a в зависимости от фазы вирусной персистенции.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр, аллергические болезни, miR-155, miR-146a.

UDC 616-056.3-06:[616.98:578.825.13]-07:577.216-07

Investigation of Influence of Chronic Epstein - Barr Virus Infection on the Level of Mir-146A and Mir-155 Expression in Patients with Allergopathy

Zubchenko S. O., Maruniak S. O., Lomikovska M. P.

Abstract. Epstein-Barr (EBV) has the ability of long-life persistence in the human body; it exists in latent form in immunocompetent cells and can be reactivated under the influence of different exo- and endogenous unfavorable factors. Specific tropism of the virus to immunocompetent cells can influence their expression level of microRNA, which are active regulators of immune response.

The purpose of the study was to conduct a comparative assessment of miR-146A and miR-155 expression level.

Material and methods. The comparative assessment was conducted in two groups of patients with allergopathy in combination with active (1st group) and latent (2nd group) phases of chronic Epstein-Barr virus infection and control group of healthy individuals. Patients underwent clinical, general laboratory, instrumental, specific allergic, molecular genetic studies, cytological examination of the smear from the nasal mucosa. Skin tests were performed with allergen extracts (Diater, Spain). An assessment of the functional state of the lungs was performed on the basis of spinography (Vitalograph ALPHA No. AL011734, Germany). Clinical diagnosis of AR and / or BA was based on the criteria of ARIA (2016), GINA (2016-2017).

To determine the general and specific IgE (sIgE) to EBV (EBNA-IgG, EBV-VCA-IgG) antigens and specific antibodies, we used an immunoassay with the Euroimmun test system, Germany, according to the manufacturer's instructions. Determination of DNA of Epstein-Barr virus infection in blood, saliva and mucous membrane of the pharynx was performed the polymeric chain reaction method on AmpliSens diagnostic sets using Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Australia).

Results and discussion. The study results showed that in latent phase, Epstein-Barr virus infection used own mechanisms of latency to avoid immune response, which was characterized by increased synthesis of miR-155 and miR-146A compared with control group. However, the opposite vector of changes of these microRNAs with antagonistic properties was observed compared with active phase. In active phase of Epstein-Barr virus infection, this direction of changes only intensified and was associated with acute manifestations of allergopathy. Patients in the 2nd group also showed higher levels of miR-155, although without a significant difference with the control group, while patients in the 2nd group were characterized by a history of pollen allergy with a history of broncho-obstruction syndrome, blood eosinophilia and nasocytogram. In our opinion, the imbalance between miR-155 and miR-146a, which Epstein-Barr virus infection created to provide a phase of lation, contributed to the chronicity of the allergic inflammatory process. Our conclusion confirmed the data of Okoye and colleagues about the antagonistic role of miR-155 and miR-146a in the regulation of the immune response administered by Th2.

Conclusions. The chronic Epstein-Barr virus infection in patients with allergopathy had different influence on miR-155 and miR-146A levels depending on the phase of virus persistence. The increase in the expression of miR-155 initiated an inadequate antiviral response from the side of both humoral and cellular immunity, enhanced cell-mediated inflammation, working unison with miR-146a.

Keywords: Epstein-Barr virus, allergic diseases, miR-155, miR-146A.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 17.03.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування