

## Клініко-патогенетична роль lncRNA MEG3 і miRNA-421 при неалкогольній жировій хворобі печінки в дітей з ожирінням

Н. Ю. Завгородня \*

ДУ «Інститут гастроентерології Національної академії медичних наук України», м. Дніпро

Небезпечність «тихої епідемії» неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП) у дітей полягає в зростанні кількості хворих із незворотними формами уражень печінки, коморбідними станами, високою швидкістю прогресування захворювання порівняно з дорослими, тому пошук біомаркерів ранніх стадій НАЖХП стає визначальним для ефективного лікування.

**Мета роботи** – дослідити відмінності рівнів циркулюючих lncRNA MEG3 і miR-421 у дітей із НАЖХП та ожирінням порівняно з дітьми з нормальною вагою та ожирінням без НАЖХП, вивчити зв'язок транскриптомних маркерів із клініко-лабораторними й інструментальними параметрами.

**Матеріали та методи.** Під спостереженням перебували 66 пацієнтів віком від 8 до 17 років. Середній вік обстежених –  $12,40 \pm 2,46$  року. Наявність стеатозу печінки визначали за допомогою вимірювання контрольованого параметра атенуації ультразвуку (controlled attenuation parameter – CAP) апаратом FibroScan®502 touch (Echosens, Франція). За наявності стеатозу печінки (за показником CAP) та ожиріння (за індексом маси тіла) обстежених поділили на 3 групи: 1 – 29 хворих на НАЖХП та ожиріння; 2 – 30 пацієнтів з ожирінням без стеатозу печінки; 3 (група контролю) – 7 осіб із нормальною масою тіла без стеатозу печінки. Вивчили біохімічну гепатограму, показники вуглеводного обміну, ліпідного обміну, цитокератину-18, цитокіновий профіль імуноферментним методом. Рівні циркулюючих miR-421, lncRNA MEG3 визначали шляхом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

**Результати.** Порівняльний аналіз вмісту lncRNA MEG3 і miR-421 у сироватці крові показав наявність вірогідного підвищення lncRNA MEG3 і miR-421 у дітей з ожирінням порівняно з групою контролю ( $p < 0,05$ ), а також у хворих на НАЖХП порівняно з показниками дітей 2 групи ( $p < 0,05$ ). Встановили позитивну асоціацію середньої сили вмісту lncRNA MEG3 і miR-421 з показниками, що характеризують розподіл жирової тканини, ступенем ожиріння, параметрами еластичності паренхіми печінки, ступенем стеатозу підшлункової залози. Вміст miR-421 позитивно корелював із рівнем TNF $\alpha$ , співвідношенням прозапальних і протизапальних цитокінів, негативно – із вмістом ЛПВЩ. Концентрація циркулюючих lncRNA MEG3 і miR-421 мала тенденцію до позитивного кореляційного зв'язку з HOMA-IR.

**Висновки.** У дітей із НАЖХП та ожирінням спостерігали значуще підвищення вмісту lncRNA MEG3 і miR-421 у сироватці крові, що асоціюється з надлишком і характером розподілу жирової тканини, ступенем жирової інфільтрації печінки та підшлункової залози, інсулінорезистентністю, дисліпідемією, активністю запалення. Це можна використати для ранньої діагностики НАЖХП у педіатричній клінічній практиці.

### Ключові слова:

жирова хвороба печінки, некодувальні РНК, транскриптом, ожиріння, діти.

Запорізький медичний журнал. 2022. Т. 24, № 3(132). С. 293-300

\*E-mail: [nzavgorodni75@gmail.com](mailto:nzavgorodni75@gmail.com)

## The clinical and pathogenetic role of lncRNA MEG3 and miRNA-421 in obese children with non-alcoholic fatty liver disease

N. Yu. Zavhorodnia

The danger of a “silent epidemic” of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in children is the growing number of patients with irreversible liver disease, comorbid conditions, high rate of disease progression compared to adults, so finding biomarkers of early stages of NAFLD is crucial for effective treatment.

**Aim.** To examine the differences in the circulating lncRNA MEG3 and miR-421 levels in children with NAFLD and obesity compared to normal weight and obese children without NAFLD and to study the relationship of transcriptome markers with clinical, laboratory and instrumental parameters.

**Materials and methods.** 66 patients aged 8 to 17 years were included in the study. The mean age of patients was  $12.40 \pm 2.46$  years. The presence of hepatic steatosis was determined by measuring the controlled attenuation parameter (CAP) with FibroScan®502 touch (Echosens, France). Based on the presence of hepatic steatosis (according to CAP) and obesity (according to body mass index), patients were divided into 3 groups: group 1 consisted of 29 obese patients with NAFLD, group 2 – 30 obese patients without hepatic steatosis, group 3 – 7 patients with normal weight without hepatic steatosis. Parameters of transaminase activity, carbohydrate metabolism and lipid metabolism were quantified, cytochrome-18, cytokine profile were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Levels of circulating miR-421, lncRNA MEG3 were assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction.

**Results.** Comparative analysis of serum lncRNA MEG3 and miR-421 levels showed a significant increase in lncRNA MEG3 and miR-421 levels in obese children compared with those in the control group ( $P < 0.05$ ), as well as in patients with NAFLD compared with children in group 2 ( $P < 0.05$ ). Serum lncRNA MEG3 and miR-421 levels were moderately positively correlated with adipose tissue distribution parameters, the degree of obesity, the liver parenchyma elasticity, the degree of pancreatic steatosis. miR-421 was positively correlated with TNF $\alpha$  levels, the ratio of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, negatively – with HDL levels. The serum levels of lncRNA MEG3 and miR-421 showed a tendency for a positive correlation with HOMA-IR.

**Conclusions.** In obese children with NAFLD, a significant increase in serum lncRNA MEG3 and miR-421 levels is observed, which is associated with excessive adipose tissue and its distribution parameters, the degree of liver and pancreatic steatosis, insulin resistance, inflammation, dyslipidemia, that may be useful for early diagnosis of NAFLD in pediatric clinical practice.

### Key words:

fatty liver, non-coding RNA, transcriptome, obesity, children.

Zaporozhye medical journal 2022; 24 (3), 293-300

Істотне прискорення темпів зростання захворюваності на неалкогольну жирову хворобу печінки (НАЖХП) у світовій педіатричній популяції, що, за даними епідеміологічних досліджень, становило 62 % за останні 9 років, призвело до сталого позиціонування НАЖХП у категорії найпоширеніших хронічних захворювань печінки в дітей [1]. Стрімке підвищення захворюваності на НАЖХП пояснюється комбінацією багатьох факторів, серед них важливе значення має, з одного боку, збільшення абсолютної кількості дітей з ожирінням унаслідок урбанізації та поширення «західного» способу життя, з іншого, – впровадження скринінгу на НАЖХП [2].

У дослідженні Amandeep K. Sahota et al. показано: тільки в 12,3 % дітей із позитивними скринінговими тестами (елевациєю аланінамінотрансферази) здійснюють додаткові діагностичні процедури для верифікації діагнозу НАЖХП. Отже, чимала кількість випадків, імовірно, залишаються не діагностованими через недосконалість скринінгових програм і недостатність їхнього втілення у клінічну практику, а також через складність процедури клінічної діагностики [1].

Небезпечність «тихої епідемії» НАЖХП полягає передусім у зростанні кількості хворих із тяжкими та незворотними формами уражень печінки (розвинутий фіброз, цироз, гепатоцелюлярна карцинома), а також у збільшенні кількості пацієнтів із НАЖХП-асоційованими коморбідними станами (цукровий діабет 2 типу, дисліпідемія, обструктивне апное сну, депресивні та тривожні розлади тощо). Це істотно погіршує якість життя дітей, а також обтяжує функціонування системи охорони здоров'я [3]. Важливий аспект педіатричної НАЖХП – вищий ступінь тяжкості перебігу та швидкості прогресування порівняно з дорослими, тому пошук біомаркерів ранніх стадій захворювання є визначальним для ефективного лікування [4].

Розвиток технологій секвенування та картування експресованих транскриптів дали змогу підтвердити високу тканинну специфічність їхньої експресії, а також довести: молекули, що раніше вважали «транскрипційним шумом», беруть участь у механізмах регуляції життєдіяльності клітини [6]. Численні дослідження останніх десятиліть показали, що некодувальні РНК (ncRNA), до яких належать довгі некодувальні РНК (long non-coding RNA – lncRNA, більше ніж 200 нуклеотидів) і мікроРНК (miR, завдовжки 21–23 нуклеотиди), – багатогранні, універсальні регулятори більшості клітинних процесів [5]. Ключова властивість цих молекул, що надає перевагу для їх використання як біомаркерів, – висока стабільність. Вона забезпечується ефективними механізмами захисту від деградації, як-от здатністю до циркуляції в вигляді мембранних везикул або зв'язаних із білками/ліпопротеїнами комплексів. Інший аспект, що робить молекули ncRNA оптимальними кандидатами в біомаркери, – надзвичайна чутливість методик виявлення нуклеїнових кислот на основі полімеразної ланцюгової реакції порівняно з методиками виявлення протеїнів. Профіль експресії циркулюючих ncRNA корелює з певними фізіологічними та патологічними станами і може бути проаналізований за допомогою високопродуктивних методів, включаючи секвенування нового покоління [7].

Нині повногеномний аналіз профілів експресії lncRNA у пацієнтів із НАЖХП показав індукцію експресії

535 і пригнічення експресії 1200 lncRNA [8], але функціональна роль lncRNA в молекулярних механізмах, що беруть участь у розвитку і прогресуванні захворювання, залишається нез'ясованою [9,10]. В експериментах *in vivo* та *in vitro* виявлено: під час формування фіброзу печінки спостерігають зниження експресії lncRNA гена 3, експресованого материнським алелем (maternally expressed gene 3 – MEG3), а відновлення експресії lncRNA MEG3 призводить до пригнічення активації печінкових зірчастих клітин і прискорення зворотного розвитку фіброзу печінки [11,12]. Окремі дослідження показали асоціацію lncRNA MEG3 із запальними та ліпогенними процесами, що можуть призвести до розвитку інсуліно-резистентності через взаємодію з певними мікроРНК, факторами транскрипції та білками, однак прямий зв'язок між lncRNA MEG3 і сигнальним шляхом інсуліну або метаболізмом глюкози та основні печінкові ефекти lncRNA MEG3 залишаються остаточно невизначеними [13]. Якщо сигнатура транскриптома miR для діагностики, моніторингу, прогнозування перебігу, ефективності терапії НАЖХП та фіброзу печінки в дорослих і дітей досить детально вивчена, але не валідована у великих когортах хворих [14–16], роль lncRNA MEG3 та її зв'язок із miR при НАЖХП потребують уточнення, оскільки ці дані можна використати для удосконалення ранньої діагностики НАЖХП у дітей.

## Мета роботи

Дослідити відмінності рівнів циркулюючих lncRNA MEG3 і miR-421 у дітей із НАЖХП та ожирінням порівняно з дітьми з нормальною вагою та ожирінням без НАЖХП, вивчити зв'язок транскриптомних маркерів із клініко-лабораторними й інструментальними параметрами.

## Матеріали і методи дослідження

У дослідження залучили 66 пацієнтів віком від 8 до 17 років, які перебували у відділенні дитячої гастроентерології ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України»; 47 (71,2 %) хлопців, 19 (28,8 %) дівчат. Середній вік пацієнтів становив  $12,40 \pm 2,46$  року.

Критерій відбору до обстеження – наявність надмірної ваги та ожиріння. Критерії виключення з дослідження – інфекційні чи інші запальні хвороби, наявність клініко-анамнестичних, біохімічних і серологічних ознак хронічного вірусного, аутоімунного та токсичного гепатитів, хвороби Вільсона.

Усім обстеженим здійснили антропометричні дослідження з визначенням індексу маси тіла (ІМТ) за формулою:  $IMT = \text{маса тіла (кг)} / \text{зріст (м)}^2$ . Стан трофіки оцінювали за рекомендаціями ВООЗ згідно з таблицями стандартних відхилень значень ІМТ відповідно до віку та статі [17]. Діагноз НАЖХП верифікували за рекомендаціями Європейського товариства дитячих гастроентерологів, гепатологів та нутриціологів (ESPGHAN) [18]. Наявність і ступінь стеатозу, фіброзу печінки визначали за допомогою вимірювання контрольованого параметра атенуації ультразвуку (controlled attenuation parameter – CAP) та жорсткості печінки (liver stiffness measurement – LSM) апаратом FibroScan®502 touch (Echosens, Франція) з використанням М-датчика. Стеатометрію печінки та

підшлункової залози з визначенням коефіцієнта затухання ультразвуку (КЗУ, дБ/см), оцінювання характеру розподілу жирової тканини з розрахунком жирового індексу (ЖІ) виконали за допомогою ультразвукового сканера «Toshiba Xario SSA660-A» (Японія).

За наявності стеатозу печінки (за показником CAP) та ожиріння (за ІМТ) обстежених поділили на 3 групи: 1 – 29 хворих на НАЖХП та ожиріння; 2 – 30 пацієнтів з ожирінням без стеатозу печінки; 3 (група контролю) – 7 осіб із нормальною вагою без стеатозу печінки.

У сироватці крові визначали вміст загального холестерину (ХС), тригліцеридів (ТГ), холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) з використанням наборів реактивів «Comtea» (Польща) за допомогою біохімічного аналізатора Stat Fax 1904 Plus, Awareness Technology (США), розраховували холестерин ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїнів дуже низької щільності (ХС ЛПДНЩ), коефіцієнт атерогенності (КА). Вміст інсуліну в сироватці крові визначали імуноферментним методом тест-набором фірми «DRG International, Inc.» (ФРН). Для оцінювання інсулінорезистентності використовували індекс НОМА-ІР (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance), який розраховували за формулою:  $\text{НОМА-ІР} = \frac{\text{глюкоза натще (ммоль/л)} \times \text{інсулін натще (мкОд/мл)}}{22,5}$ . Концентрацію ІЛ-6, ІЛ-10, TNF- $\alpha$  в сироватці крові кількісно визначали шляхом ІФА за допомогою імуноферментного аналізатора «Stat Fax 303 Plus» (США). Рівень СК18 у сироватці крові – шляхом ІФА за допомогою наборів фірми IDL Biotech AB (Швеція). Рівні циркулюючих miR-421, lncRNA MEG3 встановлювали на базі відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України шляхом кількісної ПЛР у реальному часі з використанням наборів для зворотної транскрипції та специфічних праймерів TaqMan® (Applied Biosystems, США). Рівень miRNA-421, lncRNA MEG3 навели в умовних одиницях.

Статистичне опрацювання результатів досліджень здійснили методами варіаційної статистики, реалізованими стандартним пакетом прикладних програм Statistica 6.1 (StatSoft Inc., США, ліцензійний № AGAR909E415822FA). Для статистичного аналізу даних використали дескриптивну та варіативну статистику; середні значення змінних порівнювали за допомогою параметричних методів (t-критерій Стьюдента), якщо показники відповідали нормальному розподілу; в інших випадках використали непараметричний метод (U-критерій Манна–Вітні). Відповідність до закону нормального розподілу перевіряли за допомогою методу Шапіро–Вілка. Середні значення наведені як  $M \pm m$  або  $Me$  (LQ; UQ) залежно від характеру розподілу змінних. Різницю вважали вірогідною, якщо рівень значущості (p) становив менше ніж 0,05. Кореляційний аналіз в умовах нормального розподілу змінних і лінійного зв'язку між ними виконали з розрахунком коефіцієнта кореляції Пірсона; якщо розподіл відрізнявся від нормального та в разі нелінійного зв'язку між змінними, розраховували коефіцієнт кореляції Спірмена.

До початку дослідження батьків пацієнтів поінформували про методи та обсяг досліджень, вони надали письмову згоду на участь. Дослідження здійснили відповідно до вимог Гельсінської декларації, Конвенції про права дитини, правил належної клінічної практики

**Таблиця 1.** Поділ дітей із груп дослідження за статтю та віком

Група	Чоловіча стать, n	%	Жіноча стать, n	%	Середній вік, $M \pm m$	Загалом, n
1 група	20	69,0 %*	9	31,0 %	12,10 $\pm$ 2,55	29
2 група	22	73,3 %*	8	26,7 %	12,90 $\pm$ 2,34	30
3 група	5	71,4 %*	2	28,6 %	12,30 $\pm$ 2,50	7
Загалом	47	71,2 %*	19	28,8 %	12,40 $\pm$ 2,46	66

\*:  $p < 0,05$  – значущість відмінностей внутрішньогрупових показників за F-критерієм Фішера.

**Таблиця 2.** Характеристика антропометричних даних, активності трансаміназ, ліпідограми дітей із груп дослідження

Показник, одиниці вимірювання	1 група, n = 29	2 група, n = 30	3 група, n = 7
Вага, кг	67,11 $\pm$ 3,21*	58,87 $\pm$ 2,42*	42,25 $\pm$ 2,95
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	27,07 $\pm$ 0,83*	24,06 $\pm$ 0,81*	17,24 $\pm$ 0,37
Z-score ІМТ	1,90 $\pm$ 0,23*	1,83 $\pm$ 0,13*	0,60 $\pm$ 0,11
Обвід талії, см	89,32 $\pm$ 1,31*	84,4 $\pm$ 1,53*	61,47 $\pm$ 1,05
Перцентиль ОТ	98,71 $\pm$ 1,71#*	84,50 $\pm$ 7,30*	57,95 $\pm$ 6,06
Обвід стегна, см	65,98 $\pm$ 1,91*	57,7 $\pm$ 1,85	51,27 $\pm$ 1,99
ОТ/ОС	1,43 $\pm$ 0,03*	1,46 $\pm$ 0,47*	1,22 $\pm$ 0,50
ЖІ	0,44 $\pm$ 0,03*	0,33 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,02
ГТТП, од/л	27,74 $\pm$ 1,94#*	16,61 $\pm$ 0,87	14,96 $\pm$ 1,03
АЛТ, од/л	45,37 $\pm$ 4,15#*	14,70 $\pm$ 0,72	14,68 $\pm$ 1,29
АСТ, од/л	35,83 $\pm$ 3,76#*	14,93 $\pm$ 0,76	13,13 $\pm$ 1,20
ТГ, ммоль/л	1,03 $\pm$ 0,12#*	0,71 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,05
ЛПВЩ, ммоль/л	0,98 $\pm$ 0,05*	0,97 $\pm$ 0,04*	1,47 $\pm$ 0,10
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,49 $\pm$ 0,05*	0,44 $\pm$ 0,03*	0,25 $\pm$ 0,02
КА	2,82 $\pm$ 0,15*	2,63 $\pm$ 0,12*	1,82 $\pm$ 0,24

\*:  $p < 0,05$  – значущість відмінностей між показниками за U-критерієм Манна–Вітні порівняно з 3 групою; #:  $p < 0,05$  – значущість відмінностей між показниками за U-критерієм Манна–Вітні порівняно з 2 групою.

та належної лабораторної практики, національних нормативно-правових документів у сфері біоетики.

## Результати

Серед дітей у групах дослідження переважали представники чоловічої статі (табл. 1). Співвідношення хлопців і дівчат у 1 групі становило 2,2:1,0, у 2 – 2,8:1,0, у 3 групі – 2,5:1,0. Групи хворих зіставні за віком.

Діти з НАЖХП (1 група) вірогідно відрізнялися від дітей з ожирінням (2 група) за типом розподілу жирової тканини (перцентильне значення обводу талії,  $p < 0,05$ ), активністю печінкових трансаміназ (АЛТ, АСТ,  $p < 0,05$ ) і маркерів холестазу (ГТТП,  $p < 0,05$ ), рівнем тригліцеридів ( $p < 0,05$ ) (табл. 2), активністю запалення (ІЛ-6, ІЛ-10, TNF $\alpha$ /ІЛ-10,  $p < 0,05$ ), апоптозу (СК18,  $p < 0,05$ ), інсулінорезистентності (рівні інсуліну, НОМА-ІР,  $p < 0,05$ ) (табл. 3). Це супроводжувалося змінами жорстко-еластичних властивостей паренхіми печінки – зростанням жорсткості (LSM,  $p < 0,05$ ) та коефіцієнта атенуації ультразвуку (CAP, КЗУ печінки,  $p < 0,05$ ) (табл. 4).

Медіани рівнів циркулюючої lncRNA MEG3 у 1, 2 і 3 групах становили 145,91 (24,31; 223,52), 29,32 (5,94; 81,12), 2,41 (0,72; 3,91) умовних одиниць відповідно. Медіани рівнів циркулюючої miR-421 у 1, 2 і 3 групах дорівнювали 30,82 (5,21; 74,73), 14,53 (6,73; 35,62), 1,94 (0,32; 3,64) умовних одиниць відповідно. Рівні циркулюючих lncRNA MEG3 і miR-421 у групах дослідження змінювалися в одному напрямі. Так, порівняльний аналіз вмісту циркулюючих lncRNA MEG3 і miR-421 показав наявність вірогідного підвищення і lncRNA MEG3, і miR-421 у дітей

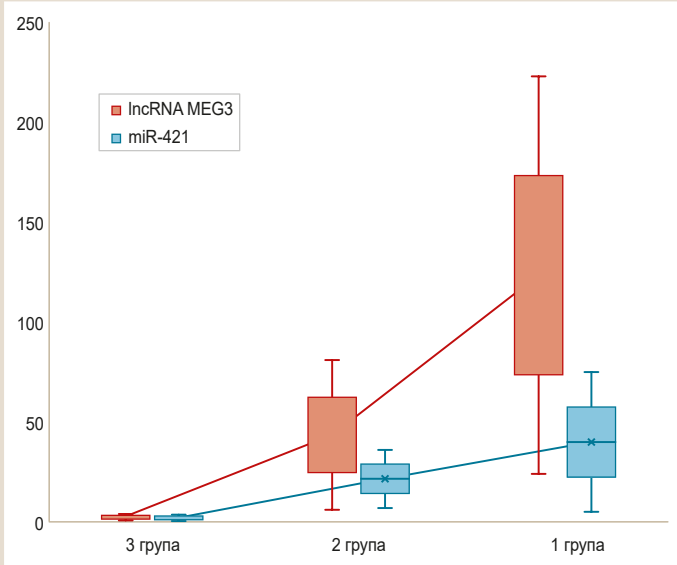


Рис. 1. Експресія транскриптів lncRNA MEG3 і miR-421 у групах дослідження.

Таблиця 3. Характеристика вуглеводного обміну, активності апоптозу, цитокінового балансу дітей із груп дослідження

Показник, одиниці вимірювання	1 група, n = 29	2 група, n = 30	3 група, n = 7
Інсулін, мкОд/мл	37,90 (22,31; 52,72)*#	18,50 (14,12; 23,81)	12,31 (8,51; 14,85)
НОМА-ІR	7,95 (3,98; 12,71)*#	3,32 (2,91; 3,63)	2,42 (1,64; 2,92)
ІL-6, пг/мл	3,10 (0,81; 5,21)*#	1,91 (0,97; 4,92)*	1,01 (0,22; 1,14)
ІL-10, пг/мл	2,60 (1,03; 9,63)*#	7,90 (2,53; 12,84)	8,72 (5,45; 11,43)
TNFα, пг/мл	1,50 (0,21; 4,81)*	1,01 (0,31; 3,65)*	0,21 (0,12; 0,28)
TNFα/ ІL-10	0,75 (0,12; 3,12)*#	0,41 (0,09; 1,03)*	0,02 (0,01; 0,11)
СК18, У/л	115,75 (91,63; 176,82)*#	43,3 (40,51; 70,42)	59,21 (57,62; 63,74)

\*:  $p < 0,05$  – значущість відмінностей між показниками за U-критерієм Манна–Вітні порівняно з 3 групою; #:  $p < 0,05$  – значущість відмінностей між показниками за U-критерієм Манна–Вітні порівняно з 2 групою.

Таблиця 4. Характеристика жорстко-еластичних властивостей печінки та підшлункової залози дітей із груп дослідження

Показник, одиниці вимірювання	1 група, n = 29	2 група, n = 30	3 група, n = 7
САР, дБ/м	262,61 ± 22,52*#	199,92 ± 24,12	166,40 ± 38,31
LSM, кПа	4,73 ± 0,92#	4,05 ± 0,81	4,12 ± 0,71
КЗУ печінки, дБ/см	2,20 (2,07; 2,44)*#	1,96 (1,87; 2,15)	1,86 (1,77; 1,94)
КЗУ ПЗ, дБ/см	3,23 (3,06; 3,71)*	2,90 (2,54; 3,32)*	1,93 (1,82; 2,79)

\*:  $p < 0,05$  – значущість відмінностей між показниками за U-критерієм Манна–Вітні порівняно з 3 групою; #:  $p < 0,05$  – значущість відмінностей між показниками за U-критерієм Манна–Вітні порівняно з 2 групою.

з ожирінням (2 група) порівняно з групою контролю ( $p < 0,05$ ), а також у хворих на НАЖХП (1 група) порівняно з показниками дітей 2 групи ( $p < 0,05$ ) (рис. 1).

Аналіз кореляційних зв'язків вмісту циркулюючих lncRNA MEG3 і miR-421 виявив позитивну асоціацію середньої сили з показниками, що характеризують розподіл жирової тканини (обвід талії, жировий індекс), ступенем ожиріння (ІМТ) (табл. 5), параметрами еластичності паренхіми печінки (САР, КЗУ печінки), ступенем стеатозу підшлункової залози за даними УЗД (табл. 6). Спостерігали тенденцію до позитивного

кореляційного зв'язку вмісту циркулюючої miR-421 із жорсткістю печінки ( $p = 0,06$ ). Виявили позитивний кореляційний зв'язок вмісту miR-421 із рівнем TNFα, співвідношенням прозапальних і протизапальних цитокінів TNFα/ІL 10, негативний кореляційний зв'язок із вмістом ЛПВЩ (табл. 7). Концентрація циркулюючих lncRNA MEG3 і miR-421 мала тенденцію до позитивного кореляційного зв'язку з НОМА-ІR ( $p = 0,12$ ,  $p = 0,11$  відповідно).

## Обговорення

У нашій роботі показано підвищення вмісту lncRNA MEG3 у сироватці крові дітей з ожирінням і НАЖХП. У доступній фаховій літературі не виявили подібних досліджень у дітей. Наші дані збігаються з результатами групи американських дослідників Xiao Cheng et al., які в експериментальній мишачій моделі ожиріння, індукованого дієтою з високим вмістом жирів (high fat diet – HFD), показали: серед численних lncRNA-транскриптів у судинному ендотелії печінки, скелетних м'язів і білої жирової тканини однією з найбільш піддаваних індукції є експресія lncRNA MEG3 [13]. Автори показали підвищення рівня експресії lncRNA MEG3 в 1,6 і 1,9 раза у зразках печінки пацієнтів із НАЖХП і неалкогольним стеатогепатитом (НАСГ) відповідно. Китайські дослідники отримали результати, що свідчать про пригнічення експресії lncRNA MEG3 у тканині печінки хворих на НАЖХП [19].

Підвищення експресії lncRNA MEG3 у дітей із НАЖХП, імовірно, виконує функцію своєрідного компенсаторного механізму. Підтвердження цієї гіпотези – відомі ефекти впливу lncRNA MEG3. Нині найбільш вивченим і доведеним численними експериментальними даними є факт супресивного впливу lncRNA MEG3 на пухлини різного тканинного походження, принаймні раку печінки, шлунка, жовчного міхура, яєчників, ендометрія та легень, через здатність індукувати апоптоз та інгібувати проліферацію пухлинних клітин [20]. Останніми роками з'являється все більше доказів зв'язку lncRNA MEG3 із печінковою інсулінорезистентністю [21], ендотеліальною дисфункцією [13,22,23], оксидативним стресом [24], печінковим фіброгенезом [25], механізмами диференціації жирових [26] і загибелі печінкових клітин [27], акумуляції ліпідів [19], гомеостазом жовчних кислот [28], тобто ключовими патогенетичними компонентами НАЖХП [29].

Механізми, за допомогою яких lncRNA MEG3 реалізує свій вплив, остаточно не з'ясовано. Припускають, що lncRNA можуть функціонувати шляхом безпосереднього зв'язування з ДНК або факторами транскрипції для регуляції експресії генів на транскрипційному рівні; модулювання активності та стабільності мРНК, miR або білків для регуляції експресії на посттранскрипційному рівні; втручання в комплекси хроматину для репресії або активації експресії генів епігенетичним способом [30]. У нашій роботі показано односпрямовані зміни вмісту lncRNA MEG3 і miR-421 у сироватці крові, що, гіпотетично, може бути непрямим підтвердженням «спонжингу» цих молекул шляхом конкурентного зв'язування (рис. 2А, В).

Здатність lncRNA MEG3 до реципрокної регуляції miR-421 експериментально підтверджена на стовбуро-

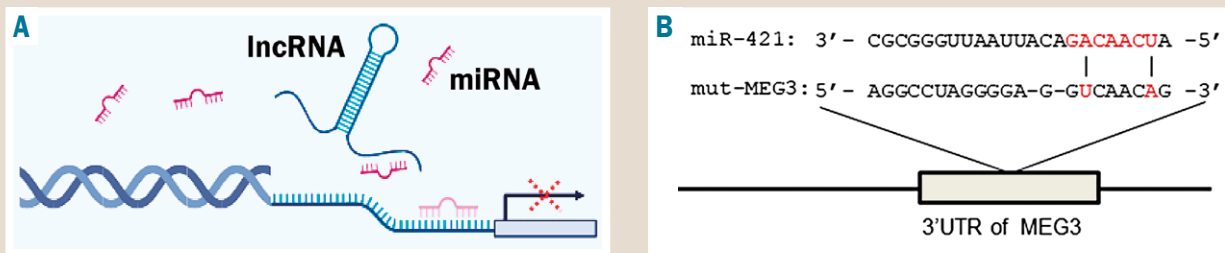


Рис. 2. Гіпотетичний механізм взаємодії lncRNA MEG3 і miR-421 [20,31, модифікація]. А: узагальнене схематичне зображення конкурентного секвестрування miR від таргетної mRNA на lncRNA («молекулярна пастка»); В: «спонжінг» внаслідок комплементарності певних ділянок нуклеотидних послідовностей lncRNA MEG3 і miR-421.

вих клітинах раку яєчників [32]. Окрім miR-421, lncRNA MEG3 діє як конкуруюча ендегенна РНК шляхом секвестрування кількох miR, включаючи miR-466i-5p, miR-574-5p і miR-770-5p, спрямованих на так звані хаб-гени, що експресуються в жировій тканині та беруть участь у регуляції запалення, фіброзу, інсулінового сигналіну в умовах інсулінорезистентності [33].

Роль miR-421 у патогенезі НАЖХП показана на тваринних моделях захворювання печінки: посилення експресії miR-421 супроводжувалось розвитком оксидативного стресу та порушень ліпідного обміну [34], а також спричиняло окисне пошкодження клітин, викликаючи мітохондріальну дисфункцію [35]. Доведена здатність miR-421 пригнічувати експресію фарнезоїдного X-рецептора (Farnesoid X receptor – FXR) [36], що може посилювати активність ліпогенезу, викликати порушення оксидації вільних жирних кислот і циркуляції жовчних кислот. У нашій роботі показано, що рівень miR-421 негативно корелює з рівнями ліпопротеїнів високої щільності; це підтверджує вплив miR-421 на ліпідний обмін. Отже, lncRNA MEG3 і miR-421 характеризуються протилежними ефектами впливу в контексті НАЖХП, тому з'ясоване в нашій роботі односпрямоване збільшення вмісту циркулюючих miR-421 і lncRNA MEG3 може підтримувати концепцію можливості їхнього конкурентного зв'язування.

Результати нашого дослідження показали зв'язок вмісту lncRNA MEG3 і miR-421 із показниками, що характеризують ступінь розвитку та розподіл жирової тканини (обвід талії, жировий індекс, ІМТ). Ці дані збігаються з результатами дослідження Javad Daneshmoghdam et al., які вивчали профіль експресії lncRNA MEG3 у різних компартментах жирової тканини жінок і виявили позитивний зв'язок експресії lncRNA MEG3 підшкірної жирової тканини з антропометричними індексами ожиріння [37]. Можливе пояснення таких змін – припущення про компенсаторний характер змін експресії lncRNA, оскільки доведено: lncRNA MEG3 не тільки гармонізує клітинне старіння/апоптоз мезенхімальних стовбурових клітин, але й бере участь у визначенні напрямку їхньої диференціації, зокрема інгібує адипогенез і сприяє остеогенезу [26].

Аналіз вмісту lncRNA MEG3 і miR-421 у сироватці крові хворих на НАЖХП у нашому дослідженні також показав позитивний кореляційний зв'язок із показниками, що характеризують ступінь ектопічного накопичення жирової тканини в печінці (САР, КЗУ) та підшлунковій залозі (ступінь стеатозу за даними УЗД). Peng Huang et al. в експериментальному дослідженні клітинної лінії

Таблиця 5. Кореляційні зв'язки транскриптомних маркерів і антропометричних параметрів

Показник, одиниці вимірювання	lncRNA MEG3		miR-421	
	r	p	r	p
ІМТ, кг/м <sup>2</sup>	0,38	0,01	0,37	0,01
Обвід талії, см	0,39	0,01	0,37	0,01
ЖІ	0,31	0,05	0,33	0,05

Таблиця 6. Кореляційні зв'язки транскриптомних маркерів і структурних змін печінки, підшлункової залози

Показник, одиниці вимірювання	lncRNA MEG3		miR-421	
	r	p	r	p
КЗУ ПЗ, дБ/см	0,17	0,40	0,28	0,16
Ступінь стеатозу ПЗ (УЗД)	0,37	0,02	0,45	0,01
LSM печінки, кПа	0,17	0,25	0,27	0,06
САР, дБ/м	0,39	0,01	0,42	0,01
КЗУ печінки, дБ/см	0,39	0,01	0,42	0,01

Таблиця 7. Кореляційні зв'язки транскриптомних, імунологічних і метаболічних маркерів

Показник, одиниці вимірювання	lncRNA MEG3		miR-421	
	r	p	r	p
ЛПВЩ, ммоль/л	-0,17	0,21	-0,32	0,02
ІЛ10, мкмоль/л	-0,10	0,50	0,12	0,91
TNFA, мкмоль/л	0,23	0,09	0,42	0,01
TNFA / ІЛ10	0,1	0,20	0,38	0,01
СК18, УЛ	0,053	0,83	0,16	0,49
НОМА-ІR	0,22	0,12	0,23	0,11

НерG2 виявили здатність lncRNA MEG3 до пригнічення експресії ліпогенез-асоційованих генів, секреції тригліцеридів, а отже до супресії акумуляції ліпідів у гепатоцитах шляхом конкурентного зв'язування з miR-21 [19]. Імовірно, підвищення рівня lncRNA MEG3 у поєднанні з підвищенням miR-421 у дітей із НАЖХП виконує своєрідну «захисну» функцію.

Доведено, що експресія lncRNA MEG3 в ендотелії судин підтримує гомеостаз глюкози й інсуліновий сигналінг, захищаючи ендотелій печінки від клітинного старіння при ожирінні. MEG3-нокаутні мишачі моделі ожиріння показали розвиток інсулінорезистентності, яка, всупереч традиційним уявленням про її причинний зв'язок із хронічним запаленням, не мала впливу на показники системного запалення. Це дало підстави припустити, що інсулінорезистентність, викликана но-

каутом MEG3, спричинена іншими механізмами [13]. У нашій роботі вміст lncRNA MEG3 мав тільки тенденцію до позитивної кореляції з індексом HOMA-IR ( $p = 0,12$ ), і, на відміну від miR-421, не встановили значущу асоціацію з рівнями прозапальних і протизапальних цитокінів. Рівень miR-421 також мав тенденцію до позитивної кореляції з індексом HOMA-IR ( $p = 0,11$ ), але її зв'язок із рівнями TNF $\alpha$  та TNF $\alpha$ /IL10 був значущим. Це збігається з результатами дослідження Аесіо А. Braga et al., які визначили позитивний кореляційний зв'язок miR-421 із рівнями С-реактивного протеїну та IL-6 у пацієнтів із метаболічним синдромом [38].

Отже, ncRNAs, зокрема lncRNA MEG3 і miR-421, – важливі регулятори різноманітних клітинних процесів у дітей із НАЖХП та ожирінням. Це підтверджується асоціацією їхніх сироваткових рівнів із метаболічними, антропометричними, імунологічними параметрами. Значуща елевация вмісту lncRNA MEG3 і miR-421 у сироватці крові дітей, які хворі на НАЖХП та ожиріння, міцний позитивний кореляційний зв'язок зі ступенем жирової інфільтрації тканини печінки дають підстави до використання цих маркерів для діагностики та моніторингу перебігу НАЖХП у дітей. Незважаючи на певний прогрес у напрямі імплементації lncRNA у відому регуляторну мережу мікроРНК-мРНК-білок при НАЖХП, їхнє клінічне та патогенетичне значення залишається дискусійним та остаточно нез'ясованим. Чітке розуміння їхньої ролі в патогенезі НАЖХП, клінічного значення в перебігу захворювання відкриває нові перспективи щодо розроблення інноваційних діагностичних і терапевтичних підходів. На нашу думку, необхідні наступні дослідження для визначення діагностичної цінності цих показників і можливості їх втілення в клінічну практику.

## Висновки

1. У дітей із НАЖХП та ожирінням виявили значуще збільшення вмісту lncRNA MEG3 і miR-421 у сироватці крові порівняно з дітьми з нормальною масою тіла й ожирінням без стеатозу. Це дає підстави вважати названі транскриптомні маркери ймовірними кандидатами для ранньої діагностики НАЖХП у педіатричній клінічній практиці.

2. Збільшення вмісту lncRNA MEG3 у сироватці крові позитивно корелює з надлишком і характером розподілу жирової тканини, ступенем жирової інфільтрації печінки та підшлункової залози, інсулінорезистентністю, а вміст miR-421 асоціюється зі ступенем ектопічного накопичення жиру, дисліпідемією, активністю запалення й інсулінорезистентністю.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у визначенні діагностичної цінності транскриптомних маркерів і можливості їх впровадження в клінічну практику.

## Фінансування

Дослідження здійснене в рамках НАР ДУ «Інститут гастроентерології Національної академії медичних наук України»: «Вивчити фактори впливу й предиктори формування фіброзу при неалкогольній жировій хворобі печінки у дітей та обґрунтувати нові підходи до діагностично-лікувальної тактики», № держреєстрації 0120U103044.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

**Conflict of interests:** author has no conflict of interests to declare.

Надійшла до редакції / Received: 10.02.2022

Після доопрацювання / Revised: 27.03.2022

Прийнято до друку / Accepted: 05.04.2022

## Відомості про автора:

Завгородня Н. Ю., канд. мед. наук, зав. відділу дитячої гастроентерології, ДУ «Інститут гастроентерології Національної академії медичних наук України», м. Дніпро.  
ORCID ID: [0000-0001-5821-1351](https://orcid.org/0000-0001-5821-1351)

## Information about author:

Zavhorodnia N. Yu., MD, PhD, Head of the Department of Pediatric Gastroenterology, SI "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro.

## Список літератури

- [1] Incidence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: 2009-2018 / A. K. Sahota et al. *Pediatrics*. 2020. Vol. 146. Issue 6. P. e20200771. <https://doi.org/10.1542/peds.2020-0771>
- [2] Shapiro W. L., Noon S. L., Schwimmer J. B. Recent advances in the epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in children. *Pediatric Obesity*. 2021. Vol. 16. Issue 11. P. e12849. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12849>
- [3] Mitsinikos T., Mrowczynski-Hernandez P., Kohli R. Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Pediatric Clinics of North America*. 2021. Vol. 68. Issue 6. P. 1309-1320. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2021.07.013>
- [4] Diagnosis and Staging of Pediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Is Classical Ultrasound the Answer? / A. Papachristodoulou et al. *Pediatric Reports*. 2021. Vol. 13. Issue 2. P. 312-321. <https://doi.org/10.3390/pediatric13020039>
- [5] Bridges M. C., Daulagala A. C., Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function. *Journal of Cell Biology*. 2021. Vol. 220. Issue 2. P. e202009045. <https://doi.org/10.1083/jcb.202009045>
- [6] Абатуров О. С., Бабиш В. Л. Світ мікроРНК гепатобіліарної системи. *Здоров'я дитини*. 2021. Т. 16. № 1. С. 84-93. <https://doi.org/10.22141/2224-0551.16.1.2021.226462>
- [7] Clinical and Molecular Biomarkers for Diagnosis and Staging of NAFLD / S. Di Mauro et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. Issue 21. P. 11905. <https://doi.org/10.3390/ijms222111905>
- [8] Genome-wide analysis of long noncoding RNA expression profiles in patients with non-alcoholic fatty liver disease / C. Sun et al. *IUBMB Life*. 2015. Vol. 67. Issue 11. P. 847-852. <https://doi.org/10.1002/iub.1442>
- [9] Non-Coding RNAs: Novel Players in Insulin Resistance and Related Diseases / C. Formichi et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. Issue 14. P. 7716. <https://doi.org/10.3390/ijms22147716>
- [10] Role of Long Non-Coding RNAs and the Molecular Mechanisms Involved in Insulin Resistance / V. A. Tello-Flores et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. Issue 14. P. 7256. <https://doi.org/10.3390/ijms22147256>
- [11] lncRNA MEG3 reverses CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis by targeting NLRC5 / Y. Y. Wu et al. *European Journal of Pharmacology*. 2021. Vol. 911. P. 174462. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174462>
- [12] lncRNA-MEG3 inhibits activation of hepatic stellate cells through SMO protein and miR-212 / F. Yu et al. *Cell Death & Disease*. 2018. Vol. 9. Issue 10. P. 1014. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1068-x>
- [13] Long non-coding RNA Meg3 deficiency impairs glucose homeostasis and insulin signaling by inducing cellular senescence of hepatic endothelium in obesity / X. Cheng et al. *Redox Biology*. 2021. Vol. 40. P. 101863. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101863>
- [14] Tadokoro T., Morishita A., Masaki T. Diagnosis and Therapeutic Management of Liver Fibrosis by MicroRNA. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. Issue 15. P. 8139. <https://doi.org/10.3390/ijms22158139>
- [15] MicroRNAs as the promising markers of comorbidities in childhood obesity – A systematic review / M. Hutny, J. Hofman, A. Zachurzok, P. Matusik. *Pediatric Obesity*. P. e12880. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12880>
- [16] Zhang J. W., Pan H. T. microRNA profiles of serum exosomes derived from children with nonalcoholic fatty liver. *Genes & Genomics*. 2021. <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01150-8>
- [17] Growth reference 5-19 years – BMI-for-age (5-19 years). *World Health Organization*. URL : <https://www.who.int/toolkits/growth-reference-data-for-5to19-years/indicators/bmi-for-age>

- [18] Diagnosis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents Position Paper of the ESPGHAN Hepatology Committee / P. Vajro et al. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012. Vol. 54. Issue 5. P. 700-713. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318252a13f>
- [19] LncRNA MEG3 functions as a ceRNA in regulating hepatic lipogenesis by competitively binding to miR-21 with LRP6 / P. Huang et al. *Metabolism*. 2019. Vol. 94. P. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.01.018>
- [20] Long Non-Coding RNA MEG3 in Cellular Stemness / P. F. Hsieh, C. C. Yu, P. M. Chu, P. L. Hsieh. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. Issue 10. P. 5348. <https://doi.org/10.3390/ijms22105348>
- [21] Pielok A., Marycz K. Non-Coding RNAs as Potential Novel Biomarkers for Early Diagnosis of Hepatic Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21. Issue 11. P. 4182. <https://doi.org/10.3390/ijms21114182>
- [22] Simion V., Haemig S., Feinberg M. W. LncRNAs in vascular biology and disease. *Vascular Pharmacology*. 2019. Vol. 114. P. 145-156. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.01.003>
- [23] LncRNA Meg3 protects endothelial function by regulating the DNA damage response / M. S. Shihabudeen Haider Ali et al. *Nucleic Acids Research*. 2019. Vol. 47. Issue 3. P. 1505-1522. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1190>
- [24] N-acetylcysteine (NAC) alleviates the peripheral neuropathy associated with liver cirrhosis via modulation of neural MEG3/PAR2/ NF- $\kappa$ B axis / D. I. Mohamed et al. *Neurochemistry International*. 2020. Vol. 132. P. 104602. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104602>
- [25] Heterogeneity of Hepatic Stellate Cells in Fibrogenesis of the Liver: Insights from Single-Cell Transcriptomic Analysis in Liver Injury / W. Zhang et al. *Cells*. 2021. Vol. 10. Issue 8. P. 2129. <https://doi.org/10.3390/cells10082129>
- [26] Long non-coding RNA MEG3 inhibits adipogenesis and promotes osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells via miR-140-5p / Z. Li et al. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017. Vol. 433. Issue 1-2. P. 51-60. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3015-z>
- [27] The Long Non-coding RNA MEG3/miR-let-7c-5p Axis Regulates Ethanol-Induced Hepatic Steatosis and Apoptosis by Targeting NLR5 / Q. Wang et al. *Frontiers in Pharmacology*. 2018. Vol. 9. P. 302. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00302>
- [28] Long noncoding RNAMEG3 induces cholestatic liver injury by interaction with PTBP1 to facilitate shp mRNA decay / L. Zhang et al. *Hepatology*. 2017. Vol. 65. Issue 2. P. 604-615. <https://doi.org/10.1002/hep.28882>
- [29] Абатуров А. Е., Степанов Ю. М., Загорюдня Н. Ю. МикроРНК при неалкогольной жировой болезни печени у детей. Днепр : Доминанта Принт, 2019. 250 с.
- [30] Long non-coding RNAs: From disease code to drug role / Y. Chen, Z. Li, X. Chen, S. Zhang. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021. Vol. 11. Issue 2. P. 340-354. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.001>
- [31] LncRNA MEG3 inhibits self-renewal and invasion abilities of oral cancer stem cells by sponging miR-421 / P. Y. Chen et al. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2021. Vol. 120. Issue 4. P. 1137-1142. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.09.006>
- [32] Anisomycin inhibits angiogenesis in ovarian cancer by attenuating the molecular sponge effect of the lncRNAMeg3/miR421/PDGFR $\alpha$  axis / W. Ye et al. *International Journal of Oncology*. 2019. Vol. 55. Issue 6. P. 1296-1312. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4887>
- [33] Identification of differentially expressed mRNA and the Hub mRNAs modulated by lncRNA Meg3 as a competing endogenous RNA in brown adipose tissue of mice on a high-fat diet / Y. Zhang et al. *Adipocyte*. 2020. Vol. 9. Issue 1. P. 346-358. <https://doi.org/10.1080/21623945.2020.1789283>
- [34] MicroRNA-421 induces hepatic mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease mice by inhibiting sirtuin 3 / Y. Cheng et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016. Vol. 474. Issue 1. P. 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.065>
- [35] The Interplay between Oxidative Stress and miRNAs in Obesity-Associated Hepatic and Vascular Complications / J. Infante-Méndez et al. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9. Issue 7. P. 607. <https://doi.org/10.3390/antiox9070607>
- [36] Downregulation of Human Farnesoid X Receptor by miR-421 Promotes Proliferation and Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells / Y. Zhang et al. *Molecular Cancer Research*. 2012. Vol. 10. Issue 4. P. 516-522. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0473>
- [37] The gene expression of long non-coding RNAs (lncRNAs): MEG3 and H19 in adipose tissues from obese women and its association with insulin resistance and obesity indices / J. Daneshmoghdam et al. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021. Vol. 35. Issue 5. P. e23741. <https://doi.org/10.1002/jcla.23741>
- [38] High serum miR-421 is associated with metabolic dysregulation and inflammation in patients with metabolic syndrome / A. A. Braga et al. *Epigenomics*. 2021. Vol. 13. Issue 6. P. 423-436. <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0247>
- ## References
- [1] Sahota, A. K., Shapiro, W. L., Newton, K. P., Kim, S. T., Chung, J., & Schwimmer, J. B. (2020). Incidence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children: 2009-2018. *Pediatrics*, 146(6), Article e20200771. <https://doi.org/10.1542/peds.2020-0771>
- [2] Shapiro, W. L., Noon, S. L., & Schwimmer, J. B. (2021). Recent advances in the epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in children. *Pediatric Obesity*, 16(11), Article e12849. <https://doi.org/10.1111/jipo.12849>
- [3] Mitsinikos, T., Mrowczynski-Hernandez, P., & Kohli, R. (2021). Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Pediatric Clinics of North America*, 68(6), 1309-1320. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2021.07.013>
- [4] Papachristodoulou, A., Kavvadas, D., Karamitsos, A., Papamitsos, T., Chatzidimitriou, M., & Sioga, A. (2021). Diagnosis and Staging of Pediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Is Classical Ultrasound the Answer? *Pediatric Reports*, 13(2), 312-321. <https://doi.org/10.3390/pediatric13020039>
- [5] Bridges, M. C., Daulagala, A. C., & Kourtidis, A. (2021). LNCcation: lncRNA localization and function. *Journal of Cell Biology*, 220(2), Article e202009045. <https://doi.org/10.1083/jcb.202009045>
- [6] Abatur, A. E., & Baby, V. L. (2021). Svit mikroRNK hepatobiliarnoi systemy [The world of microRNAs of the hepatobiliary system]. *Zdorov'ya dytyny*, 16(1), 84-93. <https://doi.org/10.22141/2224-0551.16.1.2021.226462> [in Ukrainian].
- [7] Di Mauro, S., Scamporrino, A., Filippello, A., Di Pino, A., Scicali, R., Malaguamera, R., Purrello, F., & Piro, S. (2021). Clinical and Molecular Biomarkers for Diagnosis and Staging of NAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), Article 11905. <https://doi.org/10.3390/ijms222111905>
- [8] Sun, C., Liu, X., Yi, Z., Xiao, X., Yang, M., Hu, G., Liu, H., Liao, L., & Huang, F. (2015). Genome-wide analysis of long noncoding RNA expression profiles in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *IUBMB Life*, 67(11), 847-852. <https://doi.org/10.1002/iub.1442>
- [9] Formichi, C., Nigi, L., Grieco, G. E., Maccora, C., Fignani, D., Brusco, N., Licata, G., Sebastiani, G., & Dotta, F. (2021). Non-Coding RNAs: Novel Players in Insulin Resistance and Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), Article 7716. <https://doi.org/10.3390/ijms22147716>
- [10] Tello-Flores, V. A., Beltrán-Anaya, F. O., Ramírez-Vargas, M. A., Esteban-Casales, B. E., Navarro-Tito, N., Alarcón-Romero, L., Luciano-Villa, C. A., Ramírez, M., Del Moral-Hernández, Ó., & Flores-Alfaro, E. (2021). Role of Long Non-Coding RNAs and the Molecular Mechanisms Involved in Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), Article 7256. <https://doi.org/10.3390/ijms22147256>
- [11] Wu, Y. Y., Wu, S., Li, X. F., Luo, S., Wang, A., Yin, S. Q., Huang, C., & Li, J. (2021). LncRNA MEG3 reverses CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis by targeting NLR5. *European Journal of Pharmacology*, 911, Article 174462. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174462>
- [12] Yu, F., Geng, W., Dong, P., Huang, Z., & Zheng, J. (2018). LncRNA-MEG3 inhibits activation of hepatic stellate cells through SMO protein and miR-212. *Cell Death & Disease*, 9(10), Article 1014. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1068-x>
- [13] Cheng, X., Shihabudeen Haider Ali, M. S., Moran, M., Viana, M. P., Schlichte, S. L., Zimmerman, M. C., Khalimonchuk, O., Feinberg, M. W., & Sun, X. (2021). Long non-coding RNA Meg3 deficiency impairs glucose homeostasis and insulin signaling by inducing cellular senescence of hepatic endothelium in obesity. *Redox Biology*, 40, Article 101863. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101863>
- [14] Tadokoro, T., Morishita, A., & Masaki, T. (2021). Diagnosis and Therapeutic Management of Liver Fibrosis by MicroRNA. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), Article 8139. <https://doi.org/10.3390/ijms22158139>
- [15] Hutny, M., Hofman, J., Zachurzok, A., & Matusik, P. (2021). MicroRNAs as the promising markers of comorbidities in childhood obesity – A systematic review. *Pediatric Obesity*, Article e12880. <https://doi.org/10.1111/jipo.12880>
- [16] Zhang, J. W., & Pan, H. T. (2021). microRNA profiles of serum exosomes derived from children with nonalcoholic fatty liver. *Genes & Genomics*. <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01150-8>
- [17] World Health Organization. (n.d.). *Growth reference 5-19 years – BMI-for-age (5-19 years)*. <https://www.who.int/toolkits/growth-reference-data-for-5to19-years/indicators/bmi-for-age>
- [18] Vajro, P., Lenta, S., Socha, P., Dhawan, A., McKiernan, P., Baumann, U., Durmaz, O., Lacaille, F., McLin, V., & Nobili, V. (2012). Diagnosis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents Position Paper of the ESPGHAN Hepatology Committee. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(5), 700-713. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318252a13f>
- [19] Huang, P., Huang, F. Z., Liu, H. Z., Zhang, T. Y., Yang, M. S., & Sun, C. Z. (2019). LncRNA MEG3 functions as a ceRNA in regulating hepatic lipogenesis by competitively binding to miR-21 with LRP6. *Metabolism*, 94, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.01.018>

- [20] Hsieh, P. F., Yu, C. C., Chu, P. M., & Hsieh, P. L. (2021). Long Non-Coding RNA MEG3 in Cellular Stemness. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), Article 5348. <https://doi.org/10.3390/ijms22105348>
- [21] Pielok, A., & Marycz, K. (2020). Non-Coding RNAs as Potential Novel Biomarkers for Early Diagnosis of Hepatic Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), Article 4182. <https://doi.org/10.3390/ijms21114182>
- [22] Simion, V., Haemmig, S., & Feinberg, M. W. (2019). LncRNAs in vascular biology and disease. *Vascular Pharmacology*, 114, 145-156. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.01.003>
- [23] Shihabudeen Haider Ali, M. S., Cheng, X., Moran, M., Haemmig, S., Naldrett, M. J., Alvarez, S., Feinberg, M. W., & Sun, X. (2019). LncRNA Meg3 protects endothelial function by regulating the DNA damage response. *Nucleic Acids Research*, 47(3), 1505-1522. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1190>
- [24] Mohamed, D. I., Khairy, E., Khedr, S. A., Habib, E. K., Elayat, W. M., & El-Kharashi, O. A. (2020). N-acetylcysteine (NAC) alleviates the peripheral neuropathy associated with liver cirrhosis via modulation of neural MEG3/PAR2/ NF- $\kappa$ B axis. *Neurochemistry International*, 132, Article 104602. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104602>
- [25] Zhang, W., Conway, S. J., Liu, Y., Snider, P., Chen, H., Gao, H., Liu, Y., Isidan, K., Lopez, K. J., Campana, G., Li, P., Ekser, B., Francis, H., Shou, W., & Kubal, C. (2021). Heterogeneity of Hepatic Stellate Cells in Fibrogenesis of the Liver: Insights from Single-Cell Transcriptomic Analysis in Liver Injury. *Cells*, 10(8), Article 2129. <https://doi.org/10.3390/cells10082129>
- [26] Li, Z., Jin, C., Chen, S., Zheng, Y., Huang, Y., Jia, L., Ge, W., & Zhou, Y. (2017). Long non-coding RNA MEG3 inhibits adipogenesis and promotes osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells via miR-140-5p. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 433(1-2), 51-60. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3015-z>
- [27] Wang, Q., Li, M., Shen, Z., Bu, F., Yu, H., Pan, X., Yang, Y., Meng, X., Huang, C., & Li, J. (2018). The Long Non-coding RNA MEG3/miR-let-7c-5p Axis Regulates Ethanol-Induced Hepatic Steatosis and Apoptosis by Targeting NLR5. *Frontiers in Pharmacology*, 9, Article 302. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00302>
- [28] Zhang, L., Yang, Z., Trottier, J., Barbier, O., & Wang, L. (2017). Long noncoding RNA MEG3 induces cholestatic liver injury by interaction with PTBP1 to facilitate shp mRNA decay. *Hepatology*, 65(2), 604-615. <https://doi.org/10.1002/hep.28882>
- [29] Abatur, A. E., Stepanov, Yu. M., & Zavgorodnyaya, N. Yu. (2019). *MikroRNK pri nealkogol'noi zhirovoi bolezni pecheni u detei [MicroRNA in children with non-alcoholic fatty liver disease]*. Dominanta Print. [In Russian].
- [30] Chen, Y., Li, Z., Chen, X., & Zhang, S. (2021). Long non-coding RNAs: From disease code to drug role. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(2), 340-354. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.001>
- [31] Chen, P. Y., Hsieh, P. L., Peng, C. Y., Liao, Y. W., Yu, C. H., & Yu, C. C. (2021). LncRNA MEG3 inhibits self-renewal and invasion abilities of oral cancer stem cells by sponging miR-421. *Journal of the Formosan Medical Association*, 120(4), 1137-1142. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.09.006>
- [32] Ye, W., Ni, Z., Yicheng, S., Pan, H., Huang, Y., Xiong, Y., & Liu, T. (2019). Anisomycin inhibits angiogenesis in ovarian cancer by attenuating the molecular sponge effect of the lncRNAMeg3/miR421/PDGFR $\alpha$  axis. *International Journal of Oncology*, 55(6), 1296-1312. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4887>
- [33] Zhang, Y., Fu, Y., Zheng, Y., Wen, Z., & Wang, C. (2020). Identification of differentially expressed mRNA and the Hub mRNAs modulated by lncRNA Meg3 as a competing endogenous RNA in brown adipose tissue of mice on a high-fat diet. *Adipocyte*, 9(1), 346-358. <https://doi.org/10.1080/21623945.2020.1789283>
- [34] Cheng, Y., Mai, J., Hou, T., & Ping, J. (2016). MicroRNA-421 induces hepatic mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease mice by inhibiting sirtuin 3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474(1), 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.065>
- [35] Infante-Menéndez, J., López-Pastor, A. R., González-López, P., Gómez-Hernández, A., & Escribano, O. (2020). The Interplay between Oxidative Stress and miRNAs in Obesity-Associated Hepatic and Vascular Complications. *Antioxidants*, 9(7), Article 607. <https://doi.org/10.3390/antiox9070607>
- [36] Zhang, Y., Gong, W., Dai, S., Huang, G., Shen, X., Gao, M., Xu, Z., Zeng, Y., & He, F. (2012). Downregulation of Human Farnesoid X Receptor by miR-421 Promotes Proliferation and Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Molecular Cancer Research*, 10(4), 516-522. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0473>
- [37] Daneshmoghadam, J., Omidfar, A., Akbari Dilmaghani, N., Karimi, Z., Emamgholipour, S., & Shanaki, M. (2021). The gene expression of long non-coding RNAs (lncRNAs): MEG3 and H19 in adipose tissues from obese women and its association with insulin resistance and obesity indices. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(5), Article e23741. <https://doi.org/10.1002/jcla.23741>
- [38] Braga, A. A., Bortolin, R. H., Graciano-Saldarriaga, M. E., Hirata, T. D., Cerda, A., de Freitas, R. C., Lin-Wang, H. T., Borges, J. B., França, J. I., Masi, L. N., Curi, R., Pithon-Curi, T. C., Sampaio, M. F., Castro, L. R., Bastos, G. M., Hirata, R. D., & Hirata, M. H. (2021). High serum miR-421 is associated with metabolic dysregulation and inflammation in patients with metabolic syndrome. *Epigenomics*, 13(6), 423-436. <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0247>