

УДК 616-092

*Д.О. Корнилов¹, М.А. Тряпицын¹, В.М. Симарзина¹,
Д.С. Королева¹, Д.Ю. Гребнев^{1,2}, И.Ю. Маклакова¹*

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОРНК В СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДАХ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ

¹ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

² ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская
Федерация

Резюме. МикроРНК — это эволюционно консервативные малые некодирующие молекулы РНК длиной 18–25 нуклеотидов, обнаруженные у растений, животных и некоторых вирусов, принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путем РНК-интерференции. Благодаря уникальным биохимическим и биофизическим свойствам связанного с микроРНК каталитического белкового комплекса RISC (РНК-индуцируемый комплекс нокдауна гена), данные молекулы осуществляют эпигенетическую регуляцию экспрессии поразительно большого количества регуляторных мишеней, в том числе у человека. В данной статье обзревается основы и последние открытия в области молекулярных механизмов функционирования микроРНК, роль микроРНК в патогенезе и течении социальнозначимых заболеваний и заболеваний, занимающих ключевые позиции в структуре смертности населения, а именно сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных новообразований, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Также в данной статье представлены некоторые последние достижения биоинженерии и фармакологии в разработке новых препаратов на основе РНК-интерференции.

Ключевые слова: микроРНК, РНК-интерференция, целевой ген, острый инфаркт миокарда, рак легких, когнитивные нарушения, вирус иммунодефицита человека

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Гребнев Дмитрий Юрьевич

dr-grebnev77@mail.ru

Дата поступления 16.03.2022 г.

Образец цитирования:

Корнилов Д.О., Тряпицын М.А., Симарзина В.М., Королева Д.С., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Перспективы использования микроРНК в современных методах диагностики и терапии. Вестник уральской медицинской академической науки. 2022, Том 19, №2, с. 109–131, DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-2-109-131

Введение

В реалиях современного мира, когда заболеваемость социальнозначимыми заболеваниями растет, появляются новые штаммы вирулентных микроорганизмов с высокой антибиотикорезистентностью, необходимо увеличивать возможности терапии и диагностики. Толчок развитию возможностям медицины может дать открытие и исследование микроРНК. Применение химиотерапии, широко используемой в современной медицине, сопряжено с рядом проблем: образование устойчивых вариантов микроорганизмов, длительный прием препаратов, невозможность полной элиминации патогена. В связи с этим особую значимость приобретает разработка молекулярно-биологических подходов к лечению.

В 1993 году Виктор Амброс и его коллеги Розалинд Ли и Ронда Фейнбаум сообщили в журнале “Cell”, что они обнаружили одноцепочечные регуляторные молекулы РНК в организме *C. elegans* (свободноживущая почвенная нематода). Предыдущие исследования показали, что ген *C. elegans*, известный как *lin-4*, важен для нормального личиночного развития *C. elegans*, которую часто изучают как модельный организм. В частности, *lin-4* отвечал за прогрессирующую репрессию белка LIN-14 во время личиночного развития червя; у мутантных червей с дефицитом *lin-4* обнаруживались высокие уровни LIN-14 и временные дефекты развития.

В. Амброс и его коллеги обнаружили, что *lin-4* не кодирует регуляторный белок. Вместо этого он является матрицей для синтеза двух небольших молекул РНК длиной в 22 и 61 нуклеотидов, которые Амброс назвал *lin-4S* (короткие) и *lin-4L* (длинные). Анализ последовательности показал, что *lin-4S* был частью *lin-4L*: считалось, что *lin-4L* образует структуру стержень-петля, при этом *lin-4S* содержится в 5' плече. Кроме того, Амброс вместе с Гэри Рувкуном обнаружили, что *lin-4S* частично комплементарен нескольким последовательностям в 3'-нетранслируемой области матричной РНК (мРНК), кодирующей белок LIN-14. Амброс и его коллеги предположили, что *lin-4* может регулировать LIN-14 посредством связывания *lin-4S* с этими последовательностями в транскрипт *lin-4* одним из механизмов антисмысловой РНК (рисунок 1).[1]

Однако как отдельный класс биологических регуляторных молекул с определёнными функциями, микроРНК стали рассматривать только в начале 2000-х. В 2000 году была охарактеризована вторая микроРНК: *let-7* РНК, которая репрессирует ген *lin-41* и способствует более позднему переходу в развитии у *C. elegans*. Было обнаружено, что РНК *let-7* консервативна у многих видов, что привело к предположению, что РНК *let-7* и дополнительные «малые временные РНК» могут регулировать время развития у различных животных, включая человека.[2]

В 2018 году Дэвид П. Бартель точно описал микроРНК, как эволюционно консервативную рибонуклеиновую кислоту из 22 нуклеотидов, которые управляют посттранскрипционной репрессией мРНК-мишеней в различных эукариотических клонах. У людей и других млекопитающих микроРНК помогают стимулировать экспрессию большинства мРНК.[3]

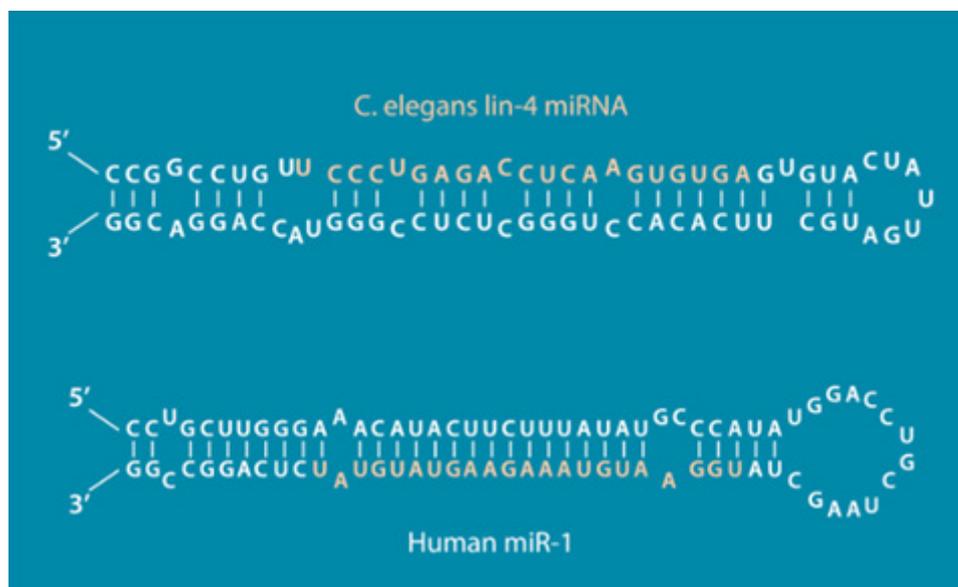


Рис. 1. Предшественники первой открытой микроРНК (сверху) и первой открытой микроРНК у человека (снизу).[1]

Fig. 1. Precursors of the first open microRNA (top) and the first open microRNA in humans (bottom).[1]
Биогенез микроРНК

Большинство генов микроРНК расположены в межгенных областях или в антисмысловых последовательностях аннотированных генов. Они образуют независимые единицы транскрипции

(transcription units). Другие гены микроРНК находятся в интронах (в редких случаях в экзонах), которые транскрибируются в составе аннотированных генов. Первоначально считалось, что РНК-полимераза III опосредует транскрипцию микроРНК, потому что она транскрибирует большинство малых РНК, такие как тРНК (транспортная РНК) и U6 snРНК (U6 малая ядерная РНК). Но на данный момент существуют несколько опровержений данной гипотезы: в некоторых случаях примикроРНК (primiR) имеют длину более нескольких тысяч оснований и содержат последовательности из более чем четырех оснований урацила, которые терминируют транскрипцию РНК-полимеразой III; [4] в результате анализа EST (expressed sequence tag) был обнаружен ряд химерных транскриптов, содержащих последовательности микроРНК и фрагменты смежных мРНК, многие из которых содержали поли(А)-хвосты и иногда подвергались сплайсингу, что свидетельствует о транскрипции РНК-полимеразой II. [5] В своем исследовании Yoontae Lee et al. предоставили прямые доказательства того, что РНК-полимераза II действительно отвечает за транскрипцию генов микроРНК. [6] РНК-полимераза II связывается с промотором, находящимся рядом с последовательностью аннотированного гена и кодирует часть, которая станет петлей шпильки пре-микроРНК. Полученный транскрипт закрывается на 5'-конце, полиаденилируется, и подвергается сплайсингу. [7]

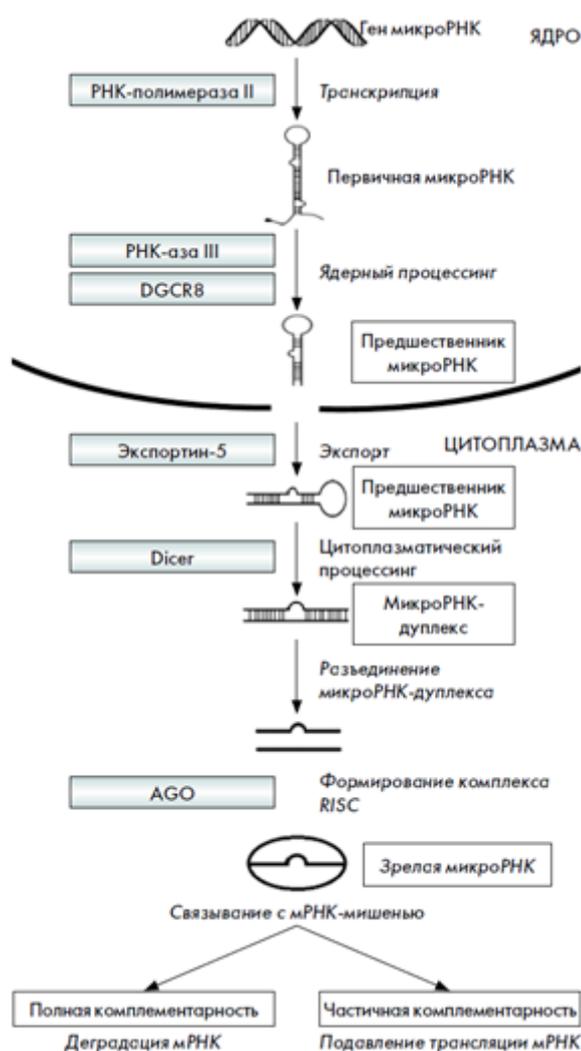


Рис.2 Биогенез микроРНК

(Камышова Е.С., Бобкова И.Н., Кутырина И.М. Современные представления о роли микроРНК при диабетической нефропатии: потенциальные биомаркеры и мишени таргетной терапии. Сахарный диабет. 2017;20(1):42-50.) [11]

Fig.2 microRNA biogenesis

(Kamyshova E.S., Bobkova I.N., Kutyrina I.M. Modern ideas about the role of microRNAs in diabetic nephropathy: potential biomarkers and targets of targeted therapy. Diabetes mellitus. 2017;20(1):42-50.) [11]

Одна при-микроРНК содержит примерно 60–70 нуклеотидов. R. I. Gregory et al. обнаружили белковый комплекс, который они назвали микропроцессорным комплексом. Микропроцессорный комплекс включает в себя фермент Droscha и ген критической области 8 синдрома Ди Джорджи двухцепочечного РНК-связывающего белка (DGCR8). Droscha расщепляет при-микроРНК, высвобождая пре-микроРНК в форме шпильки. [8] В настоящее время открыт альтернативный способ биогенеза микроРНК, наблюдаемый при процессинге миртронов. Миртроны представляют собой тип микроРНК, которые расположены в интронах мРНК, кодирующих гены хозяина. Интроны с короткой шпилькой используют сплайсинг, чтобы обойти расщепление DROSHA, которое в остальном необходимо для генерации канонических микроРНК животных. Миртроны возникают из сплайсированных интронов и, как известно, функционируют подобно классическим микроРНК. [9]

После процессинга, полученные пре-микроРНК экспортируются ядерным транспортным фактором, экспортином-5 (XPO5). В цитоплазме цитоплазматический белок типа РНКазы III, Dicer, нарезает транспортируемые пре-микроРНК с образованием 22-нуклеотидных дуплексов микроРНК. Одна цепь, выбранная на основании наивысшей термодинамической нестабильности, остается в виде зрелой микроРНК — «направляющей» — и участвует в сборке эффекторного комплекса с белками семейства Argonaute (AGO 1, AGO 2, AGO 3, AGO 4), называемого RISC (РНК-индуцируемый комплекс нокдауна гена), а вторая — «пассажирская», обладающая наибольшей стабильностью и наименьшей энергией деградирует цитоплазматическими РНКазами или закрепляется на комплементарной мРНК-мишени и служит матрицей для распознавания целевого участка (рисунок 2). [10]

РНК-индуцируемый комплекс нокдауна гена (RISC)

RISC — это общий термин для семейства гетерогенных молекулярных комплексов, которые могут быть запрограммированы на нокдаун почти любого гена. Благодаря направленности действия, реализуемой при помощи микроРНК, RISC может ингибировать гены-мишени с помощью механизмов, действующих на уровне трансляции, на уровне транскрипта, посредством деградации мРНК или на уровне самого генома за счет образования гетерохроматина или элиминации ДНК. [12]

Механизм образования RISC представлен, как ранее было сказано, процессами сборки белков семейства Argonaute со зрелой микроРНК. В каждом RISC микроРНК функционирует как направляющая, которая ведет RISC к своей цели посредством связывания с комплементарными РНК-транскриптами. Роль белка Argonaute заключается в связывании микроРНК и размещении ее в конформации, которая облегчает распознавание мишени. Белки Argonaute могут либо напрямую расщеплять РНК-мишени, либо рекрутировать другие белки, подавляющие гены, к идентифицированным мишеням. В настоящее время данные о структуре эукариотических Argonaute крайне скудны, однако уже было описано кристаллическое строение некоторых прокариотических Argonaute, которые используют аналогичную направляющую функцию ДНК. [13] Это позволило получить большое количество данных об общей архитектуре и механизмах Argonaute. Белки Argonaute имеют двудольную структуру, каждая доля которой отвечает за связывание противоположных концов направляющей нуклеиновой кислоты (ДНК в случае прокариотической клетки и РНК в случае прокариотической клетки). N-концевая доля содержит домен PAZ (Piwi, Argonaut и Zwiile), который связывает 3'-конец направляющей нуклеиновой кислоты. С-концевая доля содержит срединный домен, который связывается с 5'-фосфатом направляющей ДНК, и домен PIWI (домен высококонсервативных белков обеспечивающих неполную дифференцировку стволовых клеток - Piwi), концевая карбоксильная группа которого взаимодействует с 5'-фосфатом посредством координации двухвалентного катиона. Домен PIWI принимает РНКазу Н-подобную структуру и, следовательно, может гидролизовать РНК-мишени с использованием РНКазы Н-подобного механизма. [14] При связывании с направляющей нуклеиновой кислотой первое и последнее основание направляющей нуклеиновой кислоты заправляются в специальные карманы и не оказывают влияния на распознавание целевого участка. Остальная часть ДНК контактирует с белком исключительно через его фосфодиэфирный остов, что объясняет, как Argonaute может связываться с любой направляющей цепью, независимо от последовательности нуклеотидов. Центральная часть направляющей нуклеиновой кислоты имеет неупорядоченную кристаллическую структуру, что указывает на высокую подвижность конструкции и объясняет способность Argonaute связываться с направляющими последовательностями разной длины. [12] При взаимодействии с РНК-мишенью открывается щель,

связывающая направляющую нуклеиновую кислоту. Основания 2–8 направляющей нуклеиновой кислоты связываются с целевым участком РНК-мишени и образуют двойную комплементарную спираль А-формы. При этом остальная часть направляющей нуклеиновой кислоты остается неупорядоченной и не формирует кристаллической структуры. На основании этого можно судить о том, что 3'-конец направляющей РНК в RISC менее эффективно спаривается со своей мишенью, чем 5'-конец. Основания 2–6 направляющей нуклеиновой кислоты остаются открытыми и обращены к растворителю в конформации, близкой к А-форме. Это является важным условием, так как данные основания, называемые «исходной областью», являются наиболее важной частью направляющей нуклеиновой кислоты для распознавания целей.[15] Выпячивая «исходную» область к растворителю, RISC может использовать ее в качестве начального зонда для РНК-мишеней. После связывания со своей РНК-мишенью RISC может подавлять экспрессию генов с помощью одного из нескольких механизмов, в зависимости от типа Argonaute и клеточного контекста. В цитоплазме RISC производит трансляционную репрессию целевых мРНК-мишеней либо расщепляет их с помощью связанного с ним слайсера. В ядре RISC может принимать форму комплекса RITS (RNA-induced transcriptional silencing), который взаимодействует с РНК-полимеразой II и формирующимися транскриптами РНК и модулирует ремоделирование хроматина для достижения нокдауна. [16] Описанные выше биохимические и биофизические свойства RISC обуславливают универсальность, эффективность и эволюционную значимость РНК-интерференции.

Классификация микроРНК

В клетках эукариот существуют многочисленные группы малых некодирующих РНК. МикроРНК (miR) присутствуют у большинства эукариот и обладают некоторыми чертами сходства с sРНК (малые РНК) бактерий, но меньше по размеру и отличаются по своему механизму действия. В геноме человека насчитывают около 1000 генов, кодирующих микроРНК, которые относятся к интерферирующим (РНКi), причем одна их половина происходит от интронов кодирующих генов, а другая от больших некодирующих РНК. МикроРНК могут происходить из псевдогенов, вероятнее всего представляющих собой неактивные области, напоминающие гены, которые как считается, не несут никакой функции. Упомянутые микроРНК обозначаются по-разному. stРНК (Small temporal RNA) – короткие (малые) временные РНК. Они участвуют в процессах развития, регулируя время экспрессии генов в ходе развития эукариот. [17]

piwi-РНК/piРНК (Piwi-взаимодействующая РНК) — связывается с белками Piwi, которые экспрессируются в основном в зародышевой линии и необходимы для сперматогенеза. [18] piwi-РНК присутствуют в клетках зародышевого пути и активно участвуют в подавлении мобильных элементов, присутствующих в половых клетках. [17] Они играют важную роль в эпигенетическом подавлении и активации. Недавно было доказано их присутствие в относительно небольших количествах в соматических клетках и активное участие в контроле экспрессии целевых генов. [19]

siРНК (small interfering RNA) — синтезируется при вирусной инфекции. Существует две категории siРНК: siРНК — защитники целостности генома, активирующиеся в ответ на чужеродные или инвазивные нуклеиновые кислоты, такие как транспозоны, трансгены и вирусы, и siРНК, как регуляторы эндогенных генов. [20] siРНК отличаются по своему происхождению. Они образуются при вирусных инфекциях: обычно транскрибируются обе цепи и образуются двухцепочечные РНК. Эти большие молекулы подвергаются процессингу под действием нуклеазы Dicer, подобно тому, как это происходит при процессинге микроРНК, и доставляются к комплексу RISC. siРНК образуются также при транскрипции транспозонов и обеспечивают их выключение. У растений данный процесс обеспечивается РНК-зависимой РНК-полимеразой. У человека и большинства животных такая полимеразная система отсутствует. [17]

ra siРНК (repeat associated small interfering) — присутствуют в герминальных клетках. Данный вид РНК участвует в регуляции формирования структуры хроматина и трансляционном сайленсинге. [21]

snoРНК (Small nucleolar RNA) — это некодирующие РНК (нкРНК), расположенные в ядрышке, участвующие в модификациях рибосомальной РНК (рРНК).[22] Большинство snoRNAs функционируют в посттранскрипционной модификации рибосомных РНК, что важно для производства эффективных РНК. Были описаны две основные группы snoРНК, C/D snoРНК и H/ACA snoРНК,

которые определяются характерными вторичными структурами и консервативными элементами сигнатуры-последовательности. РНК C/D и H/ACA необходимы для биологических процессов, таких как трансляция белков, сплайсинг мРНК и стабильность генома. Большинство известных C/D и H/ACA РНК ответственны за модификацию других нкРНК. Недавнее исследование продемонстрировало, что малая ядрышковая РНК 24 (snoRNA24), H/ACA snoРНК, сверхэкспрессируется в опухолях легких. Подавление snoRNA24 с помощью siRNA уменьшало онкогенность *in vitro* клеток немелкоклеточного рака легкого и подавляло пролиферацию раковых клеток. [23] Недавние исследования демонстрируют, что деконденсация хроматина из МВП/НВП snoРНК играет важную роль в регуляции размера ядрышка во время созревания нейронов. [22]

sdРНК — производные snoРНК. Во многих сообщениях описывается, что snoРНК процессируются с образованием более мелких фрагментов, sdРНК или sno-производных РНК с микроРНК-подобной функциональностью. sdРНК демонстрируют более сильную дифференциальную экспрессию, чем микроРНК, и их процессинг значительно усиливается при раке простаты. [23] Недавно было выявлено, что sdРНК в линиях клеток человека могут регулировать экспрессию генов, влияя на стабильность транскриптов и трансляцию. sdРНК и snoРНК могут выполнять различные клеточные функции в ответ на стрессовые условия во время регуляции трансляции. [24]

snRNA (Small nuclear RNA) — одна из малых РНК со средним размером 150 нуклеотидов. Геномы эукариот кодируют множество некодирующих РНК, и snРНК представляет собой класс РНК, локализованных в ядре и выполняющих важные функции в интронном сплайсинге и в других видах процессинга РНК. Как правило, при сплайсинге транскриптов snРНК представляет собой рибонуклеопротеиновые частицы (snRNP) вместе с дополнительными белками, которые образуют большой комплекс в виде частиц (сплайсосомы), связанный с несплайсированными первичными транскриптами РНК, опосредующие этот процесс. Помимо сплайсинга, дополнительные доказательства указывают на функцию snRNP в ядерном созревании первичных транскриптов мРНК, регуляции экспрессии генов, процессинге 3'-конца зависимых от репликации мРНК гистонов, а также в качестве участка-донора в процессе сплайсинга в неканонических системах. [25]

Клеточная роль микроРНК и перспективы использования микроРНК в современных методах диагностики и терапии

Функции и роли микроРНК активно изучаются. Morozova et al. в 2012 году описали и выявили кинетические сигнатуры 9 основных механизмов действия микроРНК и объединили их в единую математическую модель:

1. Ингибирование инициации Cap-40S
2. Ингибирование присоединения 60S рибосомной единицы
3. Ингибирование удлинения
4. Выпадение рибосом (преждевременное завершение)
5. Котрансляционная деградация зарождающегося белка
6. Секвестрация в P-тельцах
7. Распад мРНК (дестабилизация)
8. Расщепление мРНК
9. Ингибирование транскрипции за счет реорганизации хроматина, опосредованной микроРНК, с последующим нокдауном генов. [26]

Ключевая клеточная роль микроРНК, как ясно из всего вышеперечисленного, заключается в эпигенетической регуляции синтеза практически всех белков, практически любого организма. Основываясь на этом, можно сделать вывод о колоссальном потенциале использования микроРНК-интерференции как в диагностических, так и в терапевтических целях.

Несмотря на внутриклеточный биосинтез микроРНК и их дальнейшее взаимодействие с мРНК, ряд микроРНК обнаруживается во внеклеточном пространстве, включая различные биологические жидкости — кровь, слюна, моча, грудное молоко, перитонеальная жидкость, спинномозговая жидкость, бронхиальная слизь и семенная жидкость. В кровеносной системе микроРНК оказываются благодаря трем основным механизмам клеточной жизнедеятельности: секреции, некрозу и апоптозу. Данные микроРНК названы циркулирующими (ц-микроРНК) и служат перспективными био-

маркерами.[27].

МикроРНК как биомаркеры могут указывать на наличие патологии и даже на стадию, прогрессирование или генетическую связь патогенеза. [28] Именно такие микроРНК можно измерить в биологических образцах для оценки развития патологического процесса или жизнеспособности опухоли. Поскольку микроРНК способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, их потенциально можно количественно определять в рутинных анализах крови, сыворотки или плазмы в качестве меры для различных нейродегенеративных нарушений и нарушений развития нервной системы.

На доступность и способ извлечения и анализа микроРНК как биомаркера большое влияние оказывает источник исследуемой микроРНК. МикроРНК в кровоток может попадать несколькими путями, включая внеклеточные везикулы(экзосомы). [29] МикроРНК, заключенные во внеклеточные везикулы (особенно экзосомы) для транспорта на большие расстояния, могут регулировать функцию соседних и даже отдаленных клеток, тканей или органов, поскольку экзосомы/внеклеточные везикулы могут инкапсулировать микроРНК для уменьшения деградации, тем самым увеличивая вероятность их действия в качестве диагностических и прогностических биомаркеров. Уровни микроРНК в биологических жидкостях обычно количественно оценивают в академических, отраслевых и больничных лабораториях с помощью секвенирования нового поколения, ПЦР в реальном времени или платформ микрочипов, а данные впоследствии нормализуют для соответствующих контролей малых РНК.

Тот факт, что анализ циркулирующих микроРНК является минимально инвазивным, что микроРНК стабильны в бесклеточной среде и довольно устойчивы к процедурам, которые обычно вызывают деградацию РНК и белка, еще больше подтверждает их потенциал в качестве подходящего биомаркера. Более того, количественный анализ микроРНК сравнительно прост и хорошо воспроизводим. Кроме того, есть доказательства того, что уровни микроРНК в венозной крови и плазме, определяемые с помощью количественной ПЦР, сравнимы с уровнями, полученными при анализе капиллярной крови, полученной из пальца. Эти данные подтверждают идею о том, что анализ сигнатуры микроРНК может быть подходящим для разработки тестов по месту оказания медицинской помощи или даже домашних тестов, которые позволили бы использовать минимально инвазивные и недорогие подходы к информативному скринингу.[30]

МикроРНК в диагностике и терапии опухолевых заболеваний

На сегодняшний день существуют различные исследования, показывающие взаимосвязь между экспрессией микроРНК и опухолевыми заболеваниями. МикроРНК могут действовать как онкогены, нацеливаясь на гены-супрессоры опухолей, а также как супрессоры опухолей, либо ингибируя экспрессию клеточных онкогенов, либо регулируя гибель клеток. При этом стоит учитывать, что одна и та же микроРНК может выполнять различные функции в разных опухолях. При регуляции биогенеза микроРНК экспрессия некоторых микроРНК может частично изменяться, оказывая влияние на прогноз опухоли, регулируя гены, связанные с онкогенезом, регулируя апоптоз, аутофагию, благодаря чему микроРНК могут использоваться не только в качестве биомаркеров, но и в таргетной терапии опухолевых заболеваний, за счет ее способности одновременно нацеливаться на несколько эффекторов путей, участвующих в дифференцировке, пролиферации и выживании клеток.

Два прототипа опухолевых супрессоров, ретинобластома (RB) и белки p53, играют ключевую роль в отключении онкогенных сигналов, вызывая остановку клеточного цикла, что приводит к клеточному старению или апоптозу. Нарушение регуляции этих путей позволяет опухолевым клеткам избежать ингибирования роста.[31] miR-15a и miR-16 часто подавляются при немелкоклеточном раке легких. Высокий уровень экспрессии miR-15a/miR-16 будет подавлять циклин D1, вышестоящий регулятор пути RB (retinoblastoma protein), вызывая активацию RB и остановку клеточного цикла. MiR-449a, нацеленная на E2F3 (активатор транскрипции, который совместно связывает ДНК с белками DP через сайт узнавания E2), имеет низкую экспрессию в тканях рака легкого. Повышающая регуляция miR-449a будет вызывать супрессию E2F3 и приводить к остановке клеточного цикла и старению.[32] miR-641 и miR-660 могут усиливать апоптоз клеток рака легких путем нацеливания на MDM2 (Mouse double minute 2 homolog), вышестоящий супрессор пути p53. [33]

Не стоит забывать, что раковые клетки обладают неограниченным репликативным потенциалом. Ключевыми факторами являются теломеры и связанные с ними теломеразы, которые представляют собой ДНК-полимеразу, способную добавлять повторяющиеся сегменты теломер к концам теломерной ДНК. Однако теломераза отсутствует почти во всех неиммортизированных клетках с неизбежной участью клеточного старения. Многие микроРНК напрямую нацелены на hTERT (Telomerase reverse transcriptase) для контроля длины теломер. miR-512-5p нацелена на hTERT и подавляет репликацию опухоли при плоскоклеточной карциноме головы и шеи, а miR-498 действует сходным образом при раке яичников. [34] Кроме того, длина теломер также контролируется ДНК-метилтрансферазами (DNMT). Семейство miR-29 проявляет эффект подавления опухолей путем нацеливания на DNMT3A и DNMT3B в клетках рака легкого.

Каскад инвазии-метастазирования, характерный для рака, представляет собой многоэтапный процесс: локальная инвазия, интравасация, переход, экстравазация и колонизация. Эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), центральный процесс метастазирования рака, обычно наблюдается на стадии эмбрионального развития. EMT характеризуется потерей E-кадгерин-опосредованной клеточной адгезии и увеличением подвижности клеток, что способствует инвазии опухоли и метастазированию. [34] miR-200 нацеливается на гомеобокс (ZEB)1 и ZEB2, связывающий E-бокс с цинковыми пальцами, которые кодируют репрессоры транскрипции E-cadherin. Активация miR-200 приводит к увеличению экспрессии E-cadherin и снижению подвижности клеток рака легкого. [35]

МикроРНК также участвуют в процессе взаимодействия между раковыми клетками и иммунной системой. Опухолевые клетки способны избегать иммунно-опосредованного разрушения клеток, путем взаимодействия PD-1 с PD-L1 (лиганда смерти 1), иницирующие ингибирующие сигналы, которые предотвращают последующую эрадикацию опухолевых клеток. Семейство miR-34 напрямую связано с экспрессией PD-L1. MiR-34a связывается с 3'UTR мРНК PD-L1 и подавляет экспрессию PD-L1. Семейство miR-200 нацелено на PD-L1. Чем ниже экспрессия miR-200, тем больше подавление инфильтрации клеток CD8+, что приводит к усилению пролиферации опухолевых клеток и метастазированию. [35]

Неоваскуляризация также важна для развития рака. Факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) участвуют в индукции ангиогенеза, тогда как тромбоспондин-1 (TSP-1) играет роль в ингибировании ангиогенеза. MiR-107 участвует в ингибировании ангиогенеза в клеточных линиях рака толстой кишки путем подавления VEGF путем нацеливания на индуцируемый гипоксией фактор-1β (HIF-1β). MiR-200 ингибируют ангиогенез, нацеливаясь на VEGF. [36] Активация miR-126 и miR-128, которые непосредственно нацелены на VEGF-A и VEGF-C, демонстрирует способность ингибировать ангиогенез в клеточных линиях рака легкого. С другой стороны, микроРНК способны индуцировать ангиогенез: miR-494 способствует ангиогенезу путем нацеливания на фосфатазу и гомолог тензина (PTEN). А экспрессия miR-23a в экзосомах в условиях гипоксии усиливает ангиогенез путем нацеливания на пролилгидроксилазы 1 и 2 (PHD1 и 2), индуцируя HIF-1 α и, следовательно, активируя путь VEGF. [37]

Одним из отличительных свойств рака является его способность к уклонению от апоптоза. Некоторые микроРНК стимулируют апоптоз, путем ингибирования семейства BCL-2, за счет чего индуцируется клеточный апоптоз в клетках рака легкого. [38]

МикроРНК в диагностике и терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы

Многие микроРНК экспрессируются в эмбриональном, постнатальном и взрослом сердце и сосудах. Их аномальная экспрессия или генетическая делеция связаны с аномальной дифференцировкой сердечных клеток, нарушением сердечного развития и сердечной дисфункцией. В результате этого микроРНК участвуют в таких разнообразных патологиях, как инфаркт миокарда и ремоделирование сердца (miR-1, miR-133a, miR-208a/b и miR-499, miR-24, miR-320, miR-29, miR-15/16, miR-21), аритмии (miR-1, miR-133a), гипертония (miR-155, miR-199, miR-23a), сердечная недостаточность (miR-765, miR-25, miR-24, miR-30d).

Реперфузионное повреждение (ишемия), связанное с инфарктом миокарда, приводит к ремоделированию миокарда, которое контролируется различными микроРНК. Активация сигнальных путей стресса запускает изменения в экспрессии микроРНК. Это приводит к повышенной регуляции, так

называемого семейства *myomiR* (мышечно-специфичные микроРНК), а именно *miR-1*, *miR-133a*, *miR-208a/b* и *miR-499*, вскоре после ОИМ. [21, 39] Кроме того, наблюдается подавление экспрессии *miR-24*, *miR-320*, *miR-29*, *miR-15/16*, *miR-21*. *MiR-1* представляет собой мышечно-специфичную микроРНК, которая обнаруживается как в сердечных, так и в скелетных мышцах, и это первая микроРНК, участвующая в развитии сердца. Ее высвобождение при ОИМ указывает на некроз кардиомиоцитов. [40] *miR-133a*, как и *miR-1*, является ключевым регулятором развития сердечной и скелетных мышц, а также участвует в дифференцировке клеток гладкой мускулатуры сосудистой стенки. [40,41] При этом, образуясь из общей РНК-предшественницы, *miR-1* и *miR-133a* участвуют в развитии нормального сердца, регулируя пролиферацию, дифференцировку клеток и сердечную проводимость, однако играют совершенно противоположные роли: *miR-1* способствует, а *miR-133* ингибирует дифференцировку кардиомиоцитов. *MiR-208a/b* и *miR-499* принадлежат к семейству *miR-208*. При этом, *miR-208a* кодируется в генах тяжелой цепи миозина α -сердечной мышцы и способствует регуляции проводящей системы, а *miR-208b* и *miR-499* кодируются в интронах генов тяжелой цепи миозина β -сердечной мышцы и являются специфичными для сердца микроРНК. Признаком сердечного заболевания является переход от изоформы тяжелой цепи альфа-миозина (α -МНС) взрослых к экспрессии гена β -МНС плода с сопутствующим снижением сердечной функции. [42] Действия *miR-208a*, по-видимому, опосредуются набором белков-репрессоров транскрипции, которые регулируют экспрессию сердечных генов в ответ на стресс. Следовательно, можно сделать вывод, что *miR-208a* требуется для стрессовой реакции, которая способствует развитию многих сердечных заболеваний. *Thrap1/MED13*, компонент комплекса Mediator, является одной из самых сильных мишеней *miR-208a*. Повышенная регуляция *Thrap1*, которая происходит в отсутствие *miR-208a*, накладывает блокаду на активацию нижестоящих чувствительных к стрессу генов, включая β -МНС, что приводит к задержке начала сердечной дисфункции и позволяет оценить ключевую роль этой микроРНК в патологическом ремоделировании сердца, а также предполагая терапевтический потенциал ингибиторов *miR-208a* при сердечных заболеваниях. [43] *MiR-499* влияет на апоптоз кардиомиоцитов, подавляя кальциневрин и динамин-родственный белок 1 (*Dpr1*), который участвует в делении митохондрий. Трансгенная сверхэкспрессия *miR-499* снижает апоптоз кардиомиоцитов и уменьшает размер инфаркта после ишемии/реперфузионного повреждения, в то время как нокдаун *miR-499* модифицированным холестерином антагомиром способствует апоптозу миокарда и расширяет зону инфаркта. [44] При диагностике ОИМ, *miR-208a* имеет самую высокую точность, при этом уровни значительно повышаются у 100% пациентов с ОИМ в течение 4 часов.

MiR-24 ингибирует трансляцию *Vim* (*Bcl-2*-подобный белок 11), проапоптотического белка. Восстановление *miR24* до физиологических уровней с помощью специфических имитаторов микроРНК ослабляет апоптоз и уменьшает размер рубца. [45] Проапоптотические свойства приписываются также *miR-320*, негативно регулирующий белок теплового шока 20 (*HSP20*), который функционирует как защитник клеток после ишемического повреждения. [46] *MiR-29* контролирует гены, кодирующие коллаген (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*) и белки внеклеточного матрикса, включая фибриллин (*FBN1*) и эластин (*ELN1*). *MiR-29* блокирует фиброз, подавляя экспрессию компонентов ЕСМ. Поэтому низкая экспрессия *miR-29* после инфаркта миокарда приводит к образованию рубцов. *MiR-199* подавляется в сердечных миоцитах во время кислородного голодания. Это индуцирует гены-мишени: индуцируемый гипоксией фактор-1 α (*HIF-1 α*) и сиртуин 1 (*Sirt 1*), и последующая активация путей, запускаемых гипоксией. Восстановление физиологических уровней *miR-199* ингибирует экспрессию *HIF-1 α* и его стабилизацию *p53*, опухолевого супрессора, ответственного за поддержание целостности генома, что приводит к снижению апоптоза.

Во время неонатального развития семейство *miR-15* активируется в сердце, что совпадает с необратимым выводом кардиомиоцитов из клеточного цикла и потерей регенеративного потенциала. [47] Экспрессия семейства *miR-15/16* увеличивается после инфаркта миокарда, вызывая необратимую потерю кардиомиоцитов и сердечную дисфункцию. Следовательно, *miR-15/16* регулирует пролиферацию и выживаемость кардиомиоцитов в ответ на повреждение, а его ингибирование защищает кардиомиоциты от апоптоза. [48]

MiR-214, которая увеличивается в тканях после инфаркта миокарда, выполняет защитный механизм во время ишемии/реперфузии. *MiR-214* снижает перегрузку кальцием кардиомиоцитов, обе-

спечивая их выживание путем ингибирования экспрессии обменника натрия/кальция NCX1 и Vim. [48]

MiR-208a, который кодируется в интроне гена α -MHC, играет важную роль в переключении экспрессии гена с изоформы взрослого α -MHC на β -MHC плода, которая происходит при ремоделировании сердца. MiR-208a вызывает гипертрофию кардиомиоцитов, фиброз и повышая экспрессию β -MHC. Поэтому его удаление способствует защите сердца от патологического ремоделирования в стрессовых условиях, что можно добиться путем инъекции LNA-anti-miR. Белок 1, связанный с рецепторами тиреоидных гормонов (THRAP1), считается геном-мишенью для miR-208a. [48, 49]

MiR-21, в отличие от miR-29, способствует гипертрофии и фиброзу миоцитов путем репрессии фактора транскрипции Sprouty2, который контролирует путь про-фиброзной внеклеточной киназы, которая активируется с помощью передачи сигналов MAPK/ERK в ответ на кардиальный стресс. Специфическое antagomiR-опосредованное ингибирование miR21 блокирует этот каскад и приводит к снижению как гипертрофии, так и фиброза. Однако генетическая делеция miR-21 не изменяет патологический ответ сердца на перегрузку давлением. Это несоответствие указывает на то, что miR-21 играет сложную роль в патофизиологии сердечных заболеваний, что требует дальнейшего изучения. [44] Другая возможность может заключаться в существовании компенсаторного механизма, обнаруживаемого при перманентном нокдауне miR-21.

Кардиомиоциты обладают индуцированными защитными механизмами для смягчения травм, связанных с ишемией и инфарктом. Поэтому дальнейшее изучение участия микроРНК в этих процессах может предоставить новые терапевтические цели для уменьшения степени поражения после инфаркта миокарда.

При развитии у человека сердечной недостаточности в результате нарушения усвоения кальция, происходит сверхэкспрессия miR-765, который играет важную роль в сократительном регулировании за счет увеличения уровня активности протеинфосфатазы 1 (PP-1) и последующей дефосфорилировании ключевых белков, реализующих циклический цикл кальция, путем подавления его эндогенного ингибитора-1. [44] Также наблюдается повышенная активность miR-25 в пораженном сердце, которая контролирует сократительную функцию миоцитов, подавляя насос поглощения кальция саркоплазматическим ретикулумом. [50] Кроме того, miR-24 регулирует гомеостаз кальция посредством репрессии юнктофилина-2, что приводит к снижению эффективности взаимодействия возбуждения-сокращения (E-C) в кардиомиоцитах.

Важную роль в компенсации сердечной недостаточности играет miR-30d, обеспечивая защиту кардиомиоцитов от воспаления, вызванного TNF- α , и гибели клеток, воздействуя на белок MAP4K4, что приводит к благотворному ремоделированию сердца. Не менее важно отметить, что miR-30d оказывает значительное влияние на ответы на сердечную ресинхронизирующую терапию (CRT). [51] При недостаточности правого желудочка вследствие легочной артериальной гипертензией, особая роль уделяется miR-126, накопление которого способствует улучшению плотности микрососудов. Поэтому введение имитаторов miR-126 позволит уменьшить фиброз и обеспечить восстановление функции правого желудочка.

Существенную роль в патогенезе перипортальной кардиомиопатии (PPCM) играет miR-146a, экспрессия которого индуцируется в эндотелиальных клетках с помощью 16K PRL. Основной мишенью miR-146a является ген NRAS, в результате этого отмечается снижение пролиферации и жизнеспособности эндотелиальных клеток и происходит разрушение микрососудов сердца. Также 16K PRL обеспечивает перенос miR-146a к кардиомиоцитам, что приводит к подавлению ErbB4, Notch1 и Irak1 общей метаболической активности и повышенной уязвимости к апоптозу. Поэтому фармакологическое ингибирование переносчика 16K PRL или самой miR-146a улучшает сердечную функцию. [52]

Вышеупомянутые MiR-1 и miR-133 играют важную роль в патофизиологии не только инфаркта миокарда, но и аритмий. Аритмогенные свойства miR1 включают репрессию GJA1 и KCNJ2, которые кодируют коннексин 43 и Kir2. [53] Также miR-1 и miR-133 регулируют избыточную экспрессию HCN2 и HCN4, которые поддерживают механизмы, подверженные аритмии. HCN2 и HCN4 принадлежат к семейству генов, активируемых гиперполяризацией циклических нуклеотидно-управляемых каналов (HCN), и обнаруживаются в пейсмекерных, предсердных и желудочковых клетках. Связанные с возрастом низкие уровни miR-1 и miR-133 способствуют сверхэкспрессии

HCN2 и HCN4, что приводит к аномальной электрической активности сердца. [54]

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (RAAS) играет центральную роль в регуляции артериального давления. Взаимодействие между рецептором ангиотензина II типа 1 AGTR1 и микроРНК может быть ответственным за гипертензию и сердечно-сосудистые осложнения, потому что молчащий полиморфизм (+1166A/C SNP) AGTR1 распознается miR-155. AGTR1 отрицательно коррелирует с экспрессией miR-155 и положительно с кровяным давлением, подтверждая потенциальную роль miR-155 в регуляции кровяного давления. Ингибирование miR-155 в клетках яичников китайского хомячка привело к усилению регуляции AGTR1 и активации ERK1/2. [55] Кроме того, за счет расположения гена miR-155 было установлено, что трисомия 21 хромосомы приводит к низкой экспрессии AGTR1 и активации miR-155. [56] miR-155 может распознавать 3'-UTR человеческого AGTR1, и они совместно экспрессировались в клетках яичника китайского хомячка, поскольку трансфекция ингибитором miR-155 привела к усилению активации AGTR1 и ERK1/2. [56]

МикроРНК в диагностике и терапии заболеваний нервной системы

У микроРНК были обнаружены связи со специфическими функциями ЦНС, такими как развитие мозга, нейросекреция, нейрогенез и другими. Детальный функциональный анализ микроРНК человека был выполнен для преобладающей в головном мозге miR-124, которая может действовать на разных уровнях регуляции генов для видообразования нейронов, включая сложные механизмы регуляции и сплайсинга. Другая микроРНК, процессируемая в головном мозге, miR-9 выполняет несколько функций в зависимости от ее клеточного контекста, например, в развитии ЦНС, формировании границ между средним и задним мозгом или в реакциях на оксидативный стресс.

Взаимосвязь между дисфункцией микроРНК и неврологическими заболеваниями наиболее ярко иллюстрируется на примере нарушения Хрупкого белка умственной отсталости типа X (FMRP1). У таких пациентов нарушены функции белка Dicer и комплекса RISC, которые необходимы для опосредованной микроРНК синаптической пластичности и развития дендритов. Нарушение в формировании RISC-комплексов имеет место и при патологии болезни Гентингтона. Уровень же miR-200a увеличивается при болезни Альцгеймера в головном мозге и в мононуклеарных клетках периферической крови, однако функция данной микроРНК еще не установлена. При болезни Паркинсона наблюдается дефицит miR-133b в дофаминергических нейронах среднего мозга. [57]

Исследования, посвященные экспрессии микроРНК в головном мозге при шизофрении, показали увеличение процессинга miR-181b. Считается, что сниженная экспрессия белкового фактора BCL2 при шизофрении, возможно, возникает в ответ на повышенную экспрессию семейства miR-15 и способствует повышенному апоптозу коры и церебральной атрофии. [58] Kocerha, J. et al. в своем исследовании предположили, что подавление miR-219 у пациентов при шизофрении может быть частью компенсаторного механизма восстановления передачи сигналов через NMDA-рецепторы. [28]

Дефицит или нарушение структуры белка Dicer в переднем мозге нарушает процессинг нескольких микроРНК (miR-29a, miR-9, miR-134, miR-107 и miR-124), что в конечном итоге приводит к патологическому гиперфосфорилированию тау-белка, которое наблюдается при различных нейродегенеративных расстройствах. [59]

МикроРНК в диагностике и терапии ВИЧ

Разработка эффективной стратегии, направленной на противодействие ВИЧ, зависит от понимания клеточных механизмов, участвующих в репликации ВИЧ. Среди таких клеточных процессов активность микроРНК влияет на продукцию ВИЧ, регулируя вирусные транскрипты, а также факторы зависимости клетки-хозяина от ВИЧ-1. Комбинированная антиретровирусная терапия (кАРТ) нацелена на разные стадии жизненного цикла вируса, подавляя виремию ВИЧ-1. Однако кАРТ не может искоренить инфекцию, так как ее целью являются активно реплицирующиеся вирусы, а не вирусы, сохраняющиеся в латентной форме.

Было высказано предположение, что микроРНК отрицательно влияют на ВИЧ-1 путем прямого нацеливания на геном вирусной РНК и/или путем репрессии вирусозависимых клеточных кофакторов; эти miR включают miR-29, miR-150, miR-28, miR-125b, miR-223 и miR-382. [60] МикроРНК способны воздействовать на репликацию ВИЧ-1 как напрямую (связываясь с вирусными транскриптами и ингибируя трансляцию), так и косвенно (воздействуя на факторы зависимости от ВИЧ-

1 клетки-хозяина, которые регулируют интеграцию и транскрипцию ВИЧ-1). [61] На уровне транскрипции микроРНК могут усиливать латентность ВИЧ-1 посредством регуляции конститутивно экспрессируемых факторов, которые контролируют клеточную пролиферацию. Одним из них является циклин Т1, чья ассоциация с CDK9 в комплексе Р-TEFb (The positive transcription elongation factor) необходима для транскрипции ВИЧ-1. МикроРНК, нацеленные на циклин Т1 (miR-27b, miR-29b, miR-150, miR-198 и miR-223), могут играть ключевую роль в регуляции латентности ВИЧ-1. Вместо этого miR-17-5p и miR-20a участвуют в эпигенетическом контроле репликации ВИЧ-1, оказывая воздействие на клеточные уровни р300/CBP-associated factor (PCAF), гистоновой ацетилазы, которая усиливает транскрипцию ВИЧ-1 путем ацетилирования как гистоновых белков, так и компонента р65 NF-κB. [62] Другим регулятором активности NF-κB является miR-155 за счет ингибирования убиквитинирующего эффекта TRIM-32 на IκBα, тем самым повышая доступность IκB и последующую секвестрацию NF-κB в цитоплазме. И наоборот, некоторые микроРНК могут модулировать инфекцию ВИЧ-1 путем ингибирования клеточных репрессоров репликации вируса. Например, miR-34a и miR-217 подавляют SIRT-1, p65 и Tat deacetylase, тем самым повышая их эффективность при транскрипции ВИЧ-1. [63] Таким образом, эта группа микроРНК может быть ответственна за усиление репликации вируса при прерывании латентного периода.

МикроРНК также могут напрямую связываться с вирусными транскриптами, что открывает двери для более специфичных для ВИЧ-1 терапий на основе микроРНК. Так miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 и miR-382 могут подавлять транскрипты, содержащие фрагмент размером 1,2 килобазы из 3'UTR ВИЧ. Однако ингибирование пяти микроРНК одновременно может вызывать реактивацию инфекции ВИЧ в Т-клетках CD4 у пациентов с ВИЧ-1, получавших кАРТ. [64]

Одним из новых противовирусных медиаторов является miR-128, который подавляет экспрессию гена-хозяина TNPO3, отвечающий за модуляцию репликации ВИЧ-1. Три белка, кодируемые членами семейства генов импортина, TNPO1, TNPO2 и TNPO3, содержат предсказанные сайты связывания miR-128. Это примечательно, поскольку TNPO3 необходим для успешного переноса в ядро преинтеграционного комплекса ВИЧ-1 (PIC) для репликации вируса. [65] CPSF6 является условным кофактором ВИЧ-1, помогающим на ядерных стадиях репликации вируса в клетках, сохраняющих функцию TNPO3. Если TNPO3 нарушен, CPSF6 накапливается в цитоплазме и ингибирует репликацию вируса ВИЧ-1. [66] miR-128 экспрессируется в клетках-мишенях ВИЧ-1, включая CD4+ Т-клетки и моноциты. Таким образом, если miR-128 репрессирует экспрессию белков TNPO, включая экспрессию TNPO3, то miR-128 репрессирует репликацию ВИЧ-1. Сверхэкспрессия miR-128 значительно истощает клетки TNPO3, вызывая значительный кумулятивный противовирусный эффект на репликацию и распространение ВИЧ-1.

кАРТ может обеспечить стойкое подавление вируса, но терапия требует постоянного доступа к лекарствам, строгого соблюдения режима лечения и сопряжена с токсичностью. Поэтому имеющиеся на сегодняшний день данные о микроРНК могут быть использованы для повышения эффективности стратегий эрадикации.

Последние достижения доклинических и клинических исследований препаратов микроРНК

В данном разделе представлены перспективные исследования препаратов микроРНК, проведенные за последние 5 лет.

Патисиран — лекарственный препарат для лечения полинейропатии у людей с наследственным транстиретин-опосредованным амилоидозом. Это первый препарат на основе малых интерферирующих РНК, одобренный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), и первый препарат, одобренный FDA для лечения данного заболевания. [67] Патисиран представляет собой двухцепочечную малую интерферирующую РНК (21 нуклеотид), которая нацелена на последовательность в мРНК транстиретина (TTR), для снижения продукции печенью мутантного белка. Благоприятное влияние Патисирана на течение полинейропатии и качество жизни было одинаковым во всех основных подгруппах (которые отбирались, основываясь по возрасту, полу, расе, региону проживания, степени выраженности нейропатии в начале лечения, стадии семейной амилоидной полинейропатии) в исследовании APOLLO. Патисиран оказал положительное влияние на несколько клинически важных моментов по сравнению с плацебо, включая двигательную силу, скорость ходьбы и вегетативные симптомы. Патисиран

в целом хорошо переносился и доказал свою безопасность у пациентов с наследственным TTR-опосредованным амилоидозом на всех этапах клинического исследования, в которых 218 пациентов принимали терапию в течение 4 лет. Было последовательно показано, что Патисиран обеспечивает быстрое начало (пиковый эффект в течение ~2 недель), сильное (~80–90%) и устойчивое (>36 месяцев) снижение TTR в сыворотке крови при дозе 0,3 мг/кг массы тела каждые 3 недели. Предшествующее лечение стабилизаторами TTR не влияло на фармакологическую активность Патисирана.[68]

Миравирсен — экспериментальный препарат для лечения гепатита С, разработанный компанией Santaris Pharma и представляет собой модифицированную фосфоротиоат-радикалом олигонуклеотидную закрытую нуклеиновую кислоту (LNA — locked nucleic acid) из 15 оснований, которая комплементарна 5'-концу зрелой miR-122. MiR-122 продуцируется гепатоцитами, наличие данной молекулы является обязательным условием для заражения гепатитом С. Миравирсен же действует как ингибитор (AntimiR-122), связываясь с miR-122, новообразованные гетеродуплексы Миравирсен-miR-122 предотвращает связывание miR-122 с вирусной РНК, нарушая репликацию HCV (вирус гепатита С). Этап доклинического исследования (проводилось на яванских мартышках и шимпанзе) дал положительные результаты, было выявлено долгосрочное подавление виремии и реконвалесценция при патологии печени без вирусной резистентности или побочных эффектов. [69]. В 2017 году препарат был допущен к клиническим испытаниям на людях, на I фазе Миравирсен подтвердил свою безопасность, вызывал дозозависимый эффект, хорошо переносился и не проявлял токсичности. В ходе II фазы изучались безопасность, переносимость и противовирусные эффекты у пациентов с хронической инфекцией HCV генотипа 1. Пациенты (36 человек) с вирусной нагрузкой выше 75 000 МЕ/мл, которые не проходили предшествующую противовирусную терапию, получали пять еженедельных подкожных инъекций Миравирсена в дозах 3 мг, 5 мг или 7 г на килограмм массы тела или плацебо в течение 29 дней. Наблюдение за данными пациентами велось в течение 18 недель. Миравирсен вызывал значительное дозозависимое и устойчивое снижение вирусной нагрузки HCV. Через девять недель после приема последней дозы (7 мг/кг) один из испытуемых потерял сознание. У двух других, получавших данную дозу, наблюдались характерные для олигонуклеотидных препаратов местные реакции (эритема, зуд, жжение). Изменения лабораторных показателей не были клинически значимыми для прекращения приема Миравирсена. Таким образом, данный препарат хорошо переносился и проявлял противовирусную активность при хронической инфекции HCV. Ретроспективный анализ тех же пациентов показал безопасность и эффективность Миравирсена в долгосрочной перспективе. [70] Помимо этого, было проведено исследование, направленное на оценку действия Миравирсена в сочетании с другими противовирусными препаратами. Миравирсен оказывал совместное действие с интерфероном α , рибавирином, VX-222, 2'-метилцитидином и телупревином. Однако были обнаружены мутации в 5'-нетранслируемой области HCV после серии подкожных введений (на 72-й день) *in vitro*. [71]

MRG-110 — представляет собой модифицированную закрытую нуклеиновую кислоту (LNA - locked nucleic acid) комплементарную miR92a (AntimiR92a). MiR92a (микроРНК-92a-3p) сильный антиангиогенный фактор, таким образом ингибирование данной микроРНК, с помощью MRG-110, приводит к усилению ангиогенеза во многих системах органов, что приводит к восстановлению функций миокарда после инфаркта, восстановлению сосудов после ишемии конечностей, повреждения сосудов и переломов костей. Доклинические исследования (проводились на лабораторных мышках и свиньях) показали, что MRG-110 ускоряет ангиогенез, образование грануляционной ткани и закрытие ран при скомпрометированных и острых ранах как у мышей, так и у свиней. Эти результаты позволяют предположить, что MRG-110 может быть эффективным терапевтическим средством для лечения как хронических, так и острых ран. Только у свиней были замечены фармакодинамические дозозависимые эффекты трансфекции MRG110, демонстрирующие пороговый эффект при активных дозах. Поскольку кожа свиньи физиологически больше схожа с кожей человека, это говорит о том, что MRG-110 потенциально может быть эффективен при местном лечении ран, используя низкие клинические дозы, тем самым снижая вероятность системных побочных реакций. [72]

Терапия с помощью малых интерферирующих РНК имеет множество преимуществ. На данный момент эта область крайне скудно изучена и исследована, нет ни одного препарата на основе ми-

кроРНК, которые участвовали в III фазе клинических исследований, что предполагает массу возможностей для биоинженеров и специалистов в области клинических исследований. [73]

Вывод

МикроРНК — уникальный класс биологически активных молекул, участвующий в эпигенетической регуляции экспрессии практически всех генов человеческого организма. Данные молекулы играют важную регуляторную роль в онкогенезе, в патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы, нервной системы. Молекулы микроРНК обладают высокой химической и физической стабильностью, что открывает возможности для использования их в качестве биомаркеров многих заболеваний. Универсальность и эволюционная консервативность РНК-интерференции позволяет использовать микроРНК и антисмысловые РНК олигонуклеотиды для разработки потенциально новых препаратов патогенетической терапии в кардиологии, онкологии и неврологии. В данной статье рассмотрена лишь небольшая часть полученного за время изучения микроРНК научного опыта, но и эта часть позволяет судить о колоссальном потенциале использования микроРНК в современной медицине.

МикроРНК были обнаружены почти тридцать лет назад, и за этот срок научное сообщество выявило множество ее функций. Благодаря изучению различных семейств микроРНК, появился потенциал для инновационной диагностики и таргетной терапии многих заболеваний, в том числе социально значимых. МикроРНК сопровождают и оказывают влияние почти во всех процессах в человеческом организме, что сподвигает нас изучать и совершать еще более удивительные открытия относительно этой молекулы. В заключение хотелось бы привести цитату ученого, точно описавшего микроРНК, Дэвида П. Бартеля в 2018 году: «Какими будут открытия в области микроРНК — время покажет, но судя по прошлому опыту, микроРНК нас не разочарует».[3]

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993, Vol. 75 (5), pp. 843–854. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
2. Tanzer A., Stadler P.F. Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *Journal of molecular biology*. 2004, Vol. 339 (2), pp. 0–335. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.03.065.
3. Bartel D.P. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018, Vol. 173 (1), pp. 20–51. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
4. Lee Y., Jeon K., Lee J.T.; et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002, Vol. 21 (17), pp. 4663–4670. DOI: 10.1093/emboj/cdf476.
5. Smalheiser N.R. EST analyses predict the existence of a population of chimeric microRNA precursor-mRNA transcripts expressed in normal human and mouse tissues. *Genome Biol*. 2003, Vol. 4 (7), pp. 403. DOI: 10.1186/gb-2003-4-7-403.
6. Yoontae L., Minju K., Jinju H.; et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004, Vol. 23 (20), pp. 4051–4060. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600385.
7. Cai X., Hagedorn C.H. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004, Vol. 10 (12), pp. 1957–1966. DOI: 10.1261/rna.7135204.
8. Gregory R.I., Chendrimada T.P., Shiekhattar R. «MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex». *MicroRNA Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2006, Vol. 342, pp. 33–47. DOI: 10.1385/1-59745-123-1:33
9. Da Fonseca B.H.R., Domingues D.S., Paschoal A.R. (2019-10-01). «mirtronDB: a mirtron knowledge base». *Bioinformatics*. 2019, Vol. 35 (19), pp. 3873–3874. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz153.
10. Han J., Lee Y., Yeom K.H.; et al. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*. 2006, Vol. 125 (5), pp. 0–901. DOI: 10.1016/j.cell.2006.03.043.
11. Kamyshova E.S., Bobkova I.N., Kutyrina I.M. Modern ideas about the role of microRNAs in diabetic nephropathy: potential biomarkers and targets of targeted therapy. *Diabetes mellitus*. 2017, Vol. 20 (1), pp.42-50. DOI: 10.14341/DM8237.
12. Wang Y., Juranek S., Li H.; et al. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*. 2008, Vol. 456 (7224), pp. 921–926. DOI: 10.1038/

nature07666.

13. Pratt A., MacRae I. The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, Vol. 284 (27), pp. 17897–17901. DOI: 10.1074/jbc.R900012200.
14. Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J.; et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. 2004, Vol. 305, pp. 1434–1437. DOI: 10.1038/ng1104-1141.
15. Benjamin P. L., Christopher B.B., David P.B. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*. 2005, Vol. 120 (1), pp. 0–20. DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.035.
16. Liu J. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science*. 2004, Vol. 305 (5689), pp. 1437–1441. DOI: 10.1126/science.1102513.
17. Krebs J.E., Goldstein E.S., Kilpatrick S.T. *Lewin's GENES XII 12th Edition*
18. *Nucleic Acids and Molecular Genetics Gerald Litwack Ph.D., in Human Biochemistry 2018*
19. Ishizu H., Siomi H., Siomi, M.C. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes & Development*. 2012, Vol. 26 (21), pp. 2361–2373. DOI: 10.1101/gad.203786.112.
20. Dana H., Chalbatani G.M., Mahmoodzadeh H.; et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci*. 2017, Vol. 13 (2), pp. 48–57.
21. Cheng C., Wang Q., You W.; et al. MiRNAs as Biomarkers of Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2014, Vol. 9 (2), e88566. DOI: 10.1371/journal.pone.0088566.
22. Reiter L.T. Developmental disabilities, autism, and schizophrenia at a single locus. *Neurodevelopmental Disorders*. 2020, Vol. 9, pp. 201–221. DOI:10.1016/B978-0-12-814409-1.00009-4
23. *Cancer and Noncoding RNAs Volume 1, 2018, Dr.Jayprokas Chakrabarti, Dr. Sanga Mitra*
24. Mleczko /M., Machtel P., Walkowiak M.; et al. Levels of sdrRNAs in cytoplasm and their association with ribosomes are dependent upon stress conditions but independent from snoRNA expression. *Scientific Reports*, 2019, Vol. 9 (1), pp. 18397. DOI: 10.1038/s41598-019-54924-2.
25. Parthasarathy S., Hari R. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. 2019, Vo. 3, pp. 230-240.
26. Morozova N., Zinovyev A., Nonne N.; et al. Kinetic signatures of microRNA modes of action. *RNA*. 2012, Vol. 18 (9), pp. 1635–55. DOI: 10.1261/rna.032284.112.
27. Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S.; et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem*. 2010, Vol. 56 (11), pp. 1733–1741. DOI: 10.1373/clinchem.2010.147405.
28. Kocerha J., Faghihi M.A., Lopez-Toledano M.A.; et al. MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, Vol. 106 (9), pp. 3507–3512. DOI: 10.1073/pnas.0805854106.
29. Hanna J., Hossain G.S., Kocerha J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Frontiers in Genetics*. 2019, Vol. 10, pp. 478. DOI: 10.3389/fgene.2019.00478.
30. Vliegenthart A.D., Berends C., Potter Carmelita M.J.; et al. MicroRNA-122 can be measured in capillary blood which facilitates point-of-care testing for drug-induced liver injury. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2017, Vol. 83 (9), pp. 2027-2033. DOI: 10.1111/bcp.13282.
31. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, Vol. 144 (5), pp. 646–674. DOI :10.1016/j.cell.2011.02.013
32. Ren X.S., Yin M.H., Zhang X.; et al. Tumor-suppressive microRNA-449a induces growth arrest and senescence by targeting E2F3 in human lung cancer cells. *Cancer Letters*. 2014, Vol. 344 (2), pp. 195–203. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.10.031.
33. Kasiappan R., Shen Z., Tse A.; et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Suppresses Telomerase Expression and Human Cancer Growth through MicroRNA-498. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, Vol. 287 (49), pp. 41297–41309. DOI: 10.1074/jbc.m112.407189.
34. Du L., Pertsemliadis A. microRNAs and lung cancer: tumors and 22-mers. *Cancer Metastasis Rev*. 2010, Vol. 29 (1), pp. 109–122. DOI: 10.1007/s10555-010-9204-9.
35. Chen L., Gibbons D.L., Goswami S.; et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nature Communications*. 2014, Vol. 5, pp. 5241. DOI: 10.1038/ncomms6241.
36. Pecot C.V., Rupaimoole R., Yang D.; et al. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family.

Nature Communications. 2013, Vol. 4, pp. 2427. DOI: 10.1038/ncomms3427.

37. Mao, Guangmei; Liu, Yan; Fang, Xi; Liu, Yahan; Fang, Li; Lin, Lianjun; Liu, Xinmin; Wang, Nanping (2015). Tumor-derived microRNA-494 promotes angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Angiogenesis*, 18(3), 373–382. doi:10.1007/s10456-015-9474-5.

38. Wang W., Chen J., Dai J.; et al. MicroRNA-16-1 Inhibits Tumor Cell Proliferation and Induces Apoptosis in A549 Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells. *Oncol Res*. 2016, Vol. 24 (5), pp. 345–351. DOI: 10.3727/096504016X14685034103194.

39. Wang Q., Ma J., Jiang Z.; et al. Identification of microRNAs as diagnostic biomarkers for acute myocardial infarction in Asian populations: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017, Vol. 96, e7173. DOI: 10.1097/MD.00000000000007173.

40. Chen J.F., Mandel E.M., Thomson J.M.; et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics*. 2005, Vol. 38, pp. 228–233. DOI: 10.1038/ng1725.

41. Kondkar A.A., Abu-Amero K.K. Utility of circulating microRNAs as clinical biomarkers for cardiovascular diseases. *Biomed Res Int*. 2015, Vol. 2015 (4), pp. 1–10. DOI: 10.1155/2015/821823.

42. Callis T.E., Pandya K., Seok H.Y.; et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J. Clin. Investig.* 2009, Vol. 119 (9), pp. 2772–2786. DOI: 10.1172/JCI36154.

43. Montgomery R.L., Hullinger T.G., Semus H.M.; et al. Therapeutic Inhibition of miR-208a Improves Cardiac Function and Survival During Heart Failure. *Circulation*. 2011, Vol. 124 (14), pp. 1537–1547. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.030932.

44. Mendell J.T., Olson E.N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012, Vol. 148 (6), pp. 1172–1187. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.005

45. Hata A. Functions of microRNAs in cardiovascular biology and disease. *Annu Rev Physiol*. 2013, Vol. 75, pp. 69–93. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183737.

46. van Rooij E., Sutherland L.B., Thatcher J.E.; et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, Vol. 105 (35), pp. 13027–13032. DOI: 10.1073/pnas.0805038105

47. Rane S., He M., Sayed D.; et al. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 α and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009, Vol. 104 (7), pp. 879–886. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.193102.

48. Quiat D., Olson E.N. MicroRNAs in cardiovascular disease: From pathogenesis to prevention and treatment. *J Clin Invest*. 2013, Vol. 123 (1), pp. 11–18. DOI: 10.1172/JCI62876.

49. Condorelli G., Latronico M.V., Cavarretta E. MicroRNAs in cardiovascular diseases: Current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol*. 2014, Vol. 63(21), pp. 2177–2187. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.01.050

50. Wahlquist C., Jeong D., Rojas-Munoz A., et al. Inhibition of miR25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature*. 2014, Vol. 508 (7497), pp. 531–535. DOI: 10.1038/nature13073

51. Melman Y.F., Shah R., Danielson K.; et al. Circulating MicroRNA-30d is associated with response to cardiac resynchronization therapy in heart failure and regulates cardiomyocyte apoptosis: A translational pilot study. *Circulation*. 2015, Vol. 131(25), pp. 2202–2216. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013220

52. Halkein J., Tabruyn S.P., Ricke-Hoch M.; et al. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2013, Vol. 123 (5), pp. 2143–2154. DOI: 10.1172/JCI64365

53. Cai B., Pan Z., Lu Y. The roles of microRNAs in heart diseases: A novel important regulator. *Curr Med Chem*. 2010, Vol. 17 (5), pp. 407–411. DOI: 10.2174/092986710790226129.

54. Li Y.D., Hong Y.F., Yusufuaji Y.; et al. Altered expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and microRNA-1 and -133 in patients with age-associated atrial fibrillation. *Mol Med Rep*. 2015, Vol. 12 (3), pp. 3243–3248. DOI: 10.3892/mmr.2015.3831.

55. Shi L., Liao J., Liu B.; et al. Mechanisms and therapeutic potential of microRNAs in hypertension. *Drug Discov Today*. 2015, Vol. 20 (10), pp. 1188–1204. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.05.007.

56. Batkai S., Thum T. MicroRNAs in hypertension: Mechanisms and therapeutic targets. *Curr Hypertens Rep*. 2012, Vol. 14 (1), pp. 79–87 DOI: 10.1007/s11906-011-0235-6.

57. Maes O.C., Chertkow H.M., Wang E.; et al. MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Curr Genomics*. 2009, Vol. 10 (3), pp. 154–168. DOI: 10.2174/138920209788185252.
58. Beveridge N.J., Gardiner E., Carroll A.P.; et al. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol Psychiatry*. 2010, Vol. 15 (12), pp. 1176–1189. DOI: 10.1038/mp.2009.84.
59. Hébert S.S., Papadopoulou A.S., Smith P.; et al. Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*. 2010, Vol. 19 (20), pp. 3959–3969. DOI: 10.1093/hmg/ddq311.
60. Chiang K., Rice A.P. Mini ways to stop a virus: microRNAs and HIV-1 replication. *Future Virol*. 2011, Vol. 6 (2), pp. 209–221. DOI: 10.2217/fvl.10.92.
61. Swaminathan G., Rossi F., Sierra L.J.; et al. A role for microRNA-155 modulation in the anti-HIV-1 effects of Toll-like receptor 3 stimulation in macrophages. *PLoS Pathog*. 2012, Vol. 8 (9), e1002937. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002937.
62. Chiang K., Sung T.L., Rice A.P. Regulation of cyclin T1 and HIV-1 Replication by microRNAs in resting CD4+ T lymphocytes. *J Virol*. 2012, Vol. 86 (6), pp. 3244–3252. DOI: 10.1128/JVI.05065-11.
63. Zhang H.S., Wu T.C., Sang W.W.; et al. MiR-217 is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation by down-regulation of SIRT1. *Biochim Biophys Acta* 2012, Vol. 1823 (5), pp. 1017–1023. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.014.
64. Huang J., Wang F., Argyris E.; et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med*. 2007, Vol. 13 (10), pp. 1241–1247. DOI: 10.1038/nm1639.
65. König R., Zhou Y., Elleder D., Diamond T.L.; et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell*. 2008, Vol. 135 (1), pp. 49–60. DOI: 10.1016/j.cell.2008.07.032.
66. Lee K., Ambrose Z., Martin T.D.; et al. Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe*. 2010, Vol. 7 (3), pp. 221–233. DOI: 10.1016/j.chom.2010.02.007.
67. Ledford H. Gene-silencing technology gets first drug approval after 20-year wait. *Nature*. 2018, Vol. 560 (7718), pp. 291–292. DOI: 10.1038/d41586-018-05867-7.
68. Kristen A.V., Ajroud-Driss S., Conceição I.; et al. Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegenerative Disease Management*. 2019, Vol. 9 (1), pp. 5-23. DOI: 10.2217/nmt-2018-0033.
69. Lanford R.E., Hildebrandt-Eriksen E.S., Petri A.; et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*. 2010, Vol. 327 (5962), pp. 198–201. DOI: 10.1126/science.1178178.
70. Janssen H.L., Reesink H.W., Lawitz E.J.; et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med*. 2013, Vol. 368 (18), pp. 1685–94. DOI: 10.1056/NEJMoa1209026.
71. Titze-de-Almeida R., David C., Titze-de-Almeida S.S. (2017). The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharmaceutical Research*. 2017, Vol. 34 (7), pp. 1339–1363. DOI: 10.1007/s11095-017-2134-2.
72. Gallant-Behm C., Piper J., Dickinson B. (2018). A synthetic microRNA-92a inhibitor (MRG-110) accelerates angiogenesis and wound healing in diabetic and non-diabetic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, (), -. doi:10.1111/wrr.12660
73. Zhang S, Cheng Z, Wang Y.; et al. The Risks of miRNA Therapeutics: In a Drug Target Perspective. *Drug Design, Development and Therapy*. 2020, Vol. 15, pp. 721–733. DOI: 10.2147/DDDT.S288859.

Авторы

Корнилов Даниил Олегович

ФГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава

Студент 4 курса педиатрического факультета

Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина 3

danilovkornil@gmail.com

Тряпицын Михаил Андреевич
ФГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава
Студент 4 курса педиатрического факультета
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина 3
misha.tryapitsyn@yandex.ru

Симарзина Вероника Михайловна
ФГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава
Студентка 4 курса педиатрического факультета
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина 3
beatle-eye@yandex.ru

Королева Дарья Сергеевна
ФГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава
Студентка 4 курса педиатрического факультета
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина 3
ds_koroleva10@mail.ru

Гребнев Дмитрий Юрьевич
ФГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава
ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина 3
Доктор медицинских наук
dr-grebnev77@mail.ru

Маклакова Ирина Юрьевна
ФГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава
Кандидат медицинских наук
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина 3
makliu@mail.ru

*D.O. Kornilov¹, M.A. Tryapitsyn¹, V.M. Simarzina¹, D.S. Koroleva¹,
D.Yu. Grebnev^{1,2}, L.Yu. Maklakova¹*

PROSPECTS FOR THE USE OF MICRORNAS IN MODERN METHODS OF DIAGNOSIS AND THERAPY

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;

² Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. MicroRNAs are evolutionarily conserved small non-coding RNA molecules 18–25 nucleotides long found in plants, animals, and some viruses that are involved in the transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression by RNA interference. Due to the unique biochemical and biophysical properties of the microRNA-associated catalytic protein complex RISC (RNA-inducible gene knockdown complex), these molecules carry out epigenetic regulation of the expression of a surprisingly large number of regulatory targets, including in humans. This article reviews the fundamentals and recent discoveries in the field of molecular mechanisms of microRNA functioning, the role of microRNA in the pathogenesis and course of socially significant diseases and diseases that occupy key positions in the structure of population mortality, namely, cardiovascular diseases, malignant neoplasms, human immunodeficiency virus (HIV). Also, this article presents some of the latest achievements in bioengineering and pharmacology in the development of new drugs based on RNA interference.

Keywords: miRNA, RNA interference, gene detection, AMI, lung cancer, cognitive impairment, HIV

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Dmitriy Yu. Grebnev

dr-grebnev77@mail.ru

Received 16.03.2022

For citation:

Kornilov D.O., Tryapitsyn M.A., Simarzina V.M., Koroleva D.S., Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu. Prospects for the use of microRNAs in modern methods of diagnosis and therapy. *Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki.* = *Journal of Ural Medical Academic Science.* 2022, Vol. 19, no. 2, pp. 109–131. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-2-109-131 (In Russ)

REFERENCES

1. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993, Vol. 75 (5), pp. 843–854. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
2. Tanzer A., Stadler P.F. Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *Journal of molecular biology.* 2004, Vol. 339 (2), pp. 0–335. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.03.065.
3. Bartel D.P. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018, Vol. 173 (1), pp. 20–51. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
4. Lee Y., Jeon K., Lee J.T.; et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002, Vol. 21 (17), pp. 4663–4670. DOI: 10.1093/emboj/cdf476.
5. Smalheiser N.R. EST analyses predict the existence of a population of chimeric microRNA precursor–mRNA transcripts expressed in normal human and mouse tissues. *Genome Biol.* 2003, Vol. 4 (7), pp. 403. DOI: 10.1186/gb-2003-4-7-403.
6. Yoontae L., Minju K., Jinju H.; et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004, Vol. 23 (20), pp. 4051–4060. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600385.
7. Cai X., Hagedorn C.H. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004, Vol. 10 (12), pp. 1957–1966. DOI: 10.1261/rna.7135204.
8. Gregory R.I., Chendrimada T.P., Shiekhattar R. «MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex». *MicroRNA Protocols. Methods in Molecular Biology.* 2006, Vol. 342, pp. 33–47. DOI: 10.1385/1-59745-123-1:33
9. Da Fonseca B.H.R., Domingues D.S., Paschoal A.R. (2019-10-01). «mirtronDB: a mirtron knowledge base». *Bioinformatics.* 2019, Vol. 35 (19), pp. 3873–3874. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz153.
10. Han J., Lee Y., Yeom K.H.; et al. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell.* 2006, Vol. 125 (5), pp. 0–901. DOI: 10.1016/j.cell.2006.03.043.
11. Kamysheva E.S., Bobkova I.N., Kutyrina I.M. Modern ideas about the role of microRNAs in diabetic nephropathy: potential biomarkers and targets of targeted therapy. *Diabetes mellitus.* 2017, Vol. 20 (1), pp.42-50. DOI: 10.14341/DM8237.
12. Wang Y., Juraneck S., Li H.; et al. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature.* 2008, Vol. 456 (7224), pp. 921–926. DOI: 10.1038/nature07666.
13. Pratt A., MacRae I. The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *Journal of Biological Chemistry.* 2009, Vol. 284 (27), pp. 17897–17901. DOI: 10.1074/jbc.R900012200.
14. Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J.; et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science.* 2004, Vol. 305, pp. 1434–1437. DOI: 10.1038/ng1104-1141.
15. Benjamin P. L., Christopher B.B., David P.B. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell.* 2005, Vol. 120 (1), pp. 0–20. DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.035.
16. Liu J. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science.* 2004, Vol. 305 (5689), pp. 1437–1441. DOI: 10.1126/science.1102513.
17. Krebs J.E., Goldstein E.S., Kilpatrick S.T. *Lewin’s GENES XII 12th Edition*

18. Nucleic Acids and Molecular Genetics Gerald Litwack Ph.D., in Human Biochemistry 2018
19. Ishizu H., Siomi H., Siomi, M.C. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes & Development*. 2012, Vol. 26 (21), pp. 2361–2373. DOI: 10.1101/gad.203786.112.
20. Dana H., Chalbatani G.M., Mahmoodzadeh H.; et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci*. 2017, Vol. 13 (2), pp. 48–57.
21. Cheng C., Wang Q., You W.; et al. MiRNAs as Biomarkers of Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2014, Vol. 9 (2), e88566. DOI: 10.1371/journal.pone.0088566.
22. Reiter L.T. Developmental disabilities, autism, and schizophrenia at a single locus. *Neurodevelopmental Disorders*. 2020, Vol. 9, pp. 201–221. DOI:10.1016/B978-0-12-814409-1.00009-4
23. Cancer and Noncoding RNAs Volume 1, 2018, Dr.Jayprokas Chakrabarti, Dr. Sanga Mitra
24. Mleczko /M., Machtel P., Walkowiak M.; et al. Levels of sdRNAs in cytoplasm and their association with ribosomes are dependent upon stress conditions but independent from snoRNA expression. *Scientific Reports*, 2019, Vol. 9 (1), pp. 18397. DOI: 10.1038/s41598-019-54924-2.
25. Parthasarathy S., Hari R. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. 2019, Vo. 3, pp. 230-240.
26. Morozova N., Zinovyev A., Nonne N.; et al. Kinetic signatures of microRNA modes of action. *RNA*. 2012, Vol. 18 (9), pp. 1635–55. DOI: 10.1261/rna.032284.112.
27. Weber J.A., Baxter D.H., Zhang S.; et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem*. 2010, Vol. 56 (11), pp. 1733–1741. DOI: 10.1373/clinchem.2010.147405.
28. Kocerha J., Faghihi M.A., Lopez-Toledano M.A.; et al. MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, Vol. 106 (9), pp. 3507–3512. DOI: 10.1073/pnas.0805854106.
29. Hanna J., Hossain G.S., Kocerha J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Frontiers in Genetics*. 2019, Vol. 10, pp. 478. DOI: 10.3389/fgene.2019.00478.
30. Vliegenthart A.D., Berends C., Potter Carmelita M.J.; et al. MicroRNA-122 can be measured in capillary blood which facilitates point-of-care testing for drug-induced liver injury. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2017, Vol. 83 (9), pp. 2027-2033. DOI: 10.1111/bcp.13282.
31. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, Vol. 144 (5), pp. 646–674. DOI :10.1016/j.cell.2011.02.013
32. Ren X.S., Yin M.H., Zhang X.; et al. Tumor-suppressive microRNA-449a induces growth arrest and senescence by targeting E2F3 in human lung cancer cells. *Cancer Letters*. 2014, Vol. 344 (2), pp. 195–203. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.10.031.
33. Kasiappan R., Shen Z., Tse A.; et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Suppresses Telomerase Expression and Human Cancer Growth through MicroRNA-498. *Journal of Biological Chemistry*. 2012, Vol. 287 (49), pp. 41297–41309. DOI: 10.1074/jbc.m112.407189.
34. Du L., Pertsemlidis A. microRNAs and lung cancer: tumors and 22-mers. *Cancer Metastasis Rev*. 2010, Vol. 29 (1), pp. 109–122. DOI: 10.1007/s10555-010-9204-9.
35. Chen L., Gibbons D.L., Goswami S.; et al. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nature Communications*. 2014, Vol. 5, pp. 5241. DOI: 10.1038/ncomms6241.
36. Pecot C.V., Rupaimoole R., Yang D.; et al. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nature Communications*. 2013, Vol. 4, pp. 2427. DOI: 10.1038/ncomms3427 .
37. Mao, Guangmei; Liu, Yan; Fang, Xi; Liu, Yahan; Fang, Li; Lin, Lianjun; Liu, Xinmin; Wang, Nanping (2015). Tumor-derived microRNA-494 promotes angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Angiogenesis*, 18(3), 373–382. doi:10.1007/s10456-015-9474-5.
38. Wang W., Chen J., Dai J.; et al. MicroRNA-16-1 Inhibits Tumor Cell Proliferation and Induces Apoptosis in A549 Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells. *Oncol Res*. 2016, Vol. 24 (5), pp. 345–351. DOI: 10.3727/096504016X14685034103194.
39. Wang Q., Ma J., Jiang Z.; et al. Identification of microRNAs as diagnostic biomarkers for acute myocardial infarction in Asian populations: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017, Vol. 96, e7173. DOI: 10.1097/MD.00000000000007173.
40. Chen J.F., Mandel E.M., Thomson J.M.; et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in

skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics*. 2005, Vol. 38, pp. 228-233. DOI: 10.1038/ng1725.

41. Kondkar A.A., Abu-Amero K.K. Utility of circulating microRNAs as clinical biomarkers for cardiovascular diseases. *Biomed Res Int*. 2015, Vol. 2015 (4), pp. 1-10. DOI: 10.1155/2015/821823.

42. Callis T.E., Pandya K., Seok H.Y.; et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J. Clin. Investig*. 2009, Vol. 119 (9), pp. 2772–2786. DOI: 10.1172/JCI36154.

43. Montgomery R.L., Hullinger T.G., Semus H.M.; et al. Therapeutic Inhibition of miR-208a Improves Cardiac Function and Survival During Heart Failure. *Circulation*. 2011, Vol. 124 (14), pp. 1537–1547. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.030932.

44. Mendell J.T., Olson E.N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012, Vol. 148 (6), pp. 1172–1187. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.005

45. Hata A. Functions of microRNAs in cardiovascular biology and disease. *Annu Rev Physiol*. 2013, Vol. 75, pp. 69–93. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183737.

46. van Rooij E., Sutherland L.B., Thatcher J.E.; et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, Vol. 105 (35), pp. 13027–13032. DOI: 10.1073/pnas.0805038105

47. Rane S., He M., Sayed D.; et al. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009, Vol. 104 (7), pp. 879–886. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.193102.

48. Quiat D., Olson E.N. MicroRNAs in cardiovascular disease: From pathogenesis to prevention and treatment. *J Clin Invest*. 2013, Vol. 123 (1), pp. 11–18. DOI: 10.1172/JCI62876.

49. Condorelli G., Latronico M.V., Cavarretta E. MicroRNAs in cardiovascular diseases: Current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol*. 2014, Vol. 63(21), pp. 2177–2187. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.01.050

50. Wahlquist C., Jeong D., Rojas-Munoz A., et al. Inhibition of miR25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature*. 2014, Vol. 508 (7497), pp. 531–535. DOI: 10.1038/nature13073

51. Melman Y.F., Shah R., Danielson K.; et al. Circulating MicroRNA-30d is associated with response to cardiac resynchronization therapy in heart failure and regulates cardiomyocyte apoptosis: A translational pilot study. *Circulation*. 2015, Vol. 131(25), pp. 2202–2216. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013220

52. Halkein J., Tabruyn S.P., Ricke-Hoch M.; et al. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2013, Vol. 123 (5), pp. 2143–2154. DOI: 10.1172/JCI64365

53. Cai B., Pan Z., Lu Y. The roles of microRNAs in heart diseases: A novel important regulator. *Curr Med Chem*. 2010, Vol. 17 (5), pp. 407–411. DOI: 10.2174/092986710790226129.

54. Li Y.D., Hong Y.F., Yusufuaji Y.; et al. Altered expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and microRNA-1 and -133 in patients with age-associated atrial fibrillation. *Mol Med Rep*. 2015, Vol. 12 (3), pp. 3243–3248. DOI: 10.3892/mmr.2015.3831.

55. Shi L., Liao J., Liu B.; et al. Mechanisms and therapeutic potential of microRNAs in hypertension. *Drug Discov Today*. 2015, Vol. 20 (10), pp. 1188–1204. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.05.007.

56. Batkai S., Thum T. MicroRNAs in hypertension: Mechanisms and therapeutic targets. *Curr Hypertens Rep*. 2012, Vol. 14 (1), pp. 79–87 DOI: 10.1007/s11906-011-0235-6.

57. Maes O.C., Chertkow H.M., Wang E.; et al. MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Curr Genomics*. 2009, Vol. 10 (3), pp. 154–168. DOI: 10.2174/138920209788185252.

58. Beveridge N.J., Gardiner E., Carroll A.P.; et al. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol Psychiatry*. 2010, Vol. 15 (12), pp. 1176–1189. DOI: 10.1038/mp.2009.84.

59. Hébert S.S., Papadopoulou A.S., Smith P.; et al. Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*. 2010, Vol. 19 (20), pp. 3959–3969. DOI: 10.1093/hmg/ddq311.

60. Chiang K., Rice A.P. Mini ways to stop a virus: microRNAs and HIV-1 replication. *Future Virol*. 2011, Vol. 6 (2), pp. 209–221. DOI: 10.2217/fvl.10.92.

61. Swaminathan G., Rossi F., Sierra L.J.; et al. A role for microRNA-155 modulation in the anti-HIV-1 effects of Toll-like receptor 3 stimulation in macrophages. *PLoS Pathog.* 2012, Vol. 8 (9), e1002937. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002937.
62. Chiang K., Sung T.L., Rice A.P. Regulation of cyclin T1 and HIV-1 Replication by microRNAs in resting CD4+ T lymphocytes. *J Virol.* 2012, Vol, 86 (6), pp. 3244– 3252. DOI: 10.1128/JVI.05065-11.
63. Zhang H.S., Wu T.C., Sang W.W.; et al. MiR-217 is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation by down-regulation of SIRT1. *Biochim Biophys Acta* 2012, Vol. 1823 (5), pp. 1017– 1023. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.014.
64. Huang J., Wang F., Argyris E.; et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med.* 2007, Vol. 13 (10), pp. 1241– 1247. DOI: 10.1038/nm1639.
65. Konig R., Zhou Y., Elleder D., Diamond T.L.; et al. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell.* 2008, Vol. 135 (1), pp. 49–60. DOI: 10.1016/j.cell.2008.07.032.
66. Lee K., Ambrose Z., Martin T.D.; et al. Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe.* 2010, Vol. 7 (3), pp. 221–233. DOI: 10.1016/j.chom.2010.02.007.
67. Ledford H. Gene-silencing technology gets first drug approval after 20-year wait. *Nature.* 2018, Vol. 560 (7718), pp. 291–292. DOI: 10.1038/d41586-018-05867-7.
68. Kristen A.V., Ajroud-Driss S., Conceição I.; et al. Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegenerative Disease Management.* 2019, Vol. 9 (1), pp. 5-23. DOI: 10.2217/nmt-2018-0033.
69. Lanford R.E., Hildebrandt-Eriksen E.S., Petri A.; et al.. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science.* 2010, Vol. 327 (5962), pp. 198–201. DOI: 10.1126/science.1178178.
70. Janssen H.L., Reesink H.W., Lawitz E.J.; et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med.* 2013, Vol. 368 (18), pp. 1685–94. DOI: 10.1056/NEJMoa1209026.
71. Titze-de-Almeida R., David C., Titze-de-Almeida S.S. (2017). The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharmaceutical Research.* 2017, Vol. 34 (7), pp. 1339–1363. DOI: 10.1007/s11095-017-2134-2.
72. Gallant-Behm C., Piper J., Dickinson B. (2018). A synthetic microRNA-92a inhibitor (MRG-110) accelerates angiogenesis and wound healing in diabetic and non-diabetic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, (), –. doi:10.1111/wrr.12660
73. Zhang S, Cheng Z, Wang Y.; et al. The Risks of miRNA Therapeutics: In a Drug Target Perspective. *Drug Design, Development and Therapy.* 2020, Vol. 15, pp. 721—733. DOI: 10.2147/DDDT.S288859.

Authors

Daniil O. Kornilov

Ural State Medical University

Fourth year student of pediatric

3, st. Repin, Yekaterinburg, Russian Federation, 620028

danilovkornil@gmail.com

Michail A. Tryapitsyn

Ural State Medical University

Fourth year student of pediatric

3, st. Repin, Yekaterinburg, Russian Federation, 620028

misha.tryapitsyn@yandex.ru

Veronika M. Simarzina

Ural State Medical University

Fourth year student of pediatric

3, st. Repin, Yekaterinburg, Russian Federation, 620028

beatle-eye@yandex.ru

Daria S. Koroleva
Ural State Medical University
Fourth year student of pediatric
3, st. Repin, Yekaterinburg, Russian Federation, 620028
ds_koroleva10@mail.ru

Dmitriy Yu. Grebnev
Ural State Medical University
Institute of Medical Cell Technologies
Doctor of medical science.
3, st. Repin, Yekaterinburg, Russian Federation, 620028
dr-grebnev77@mail.ru

Maklakova Yu. Irina
Ural State Medical University
Ph.D. in Medicine
3, st. Repin, Yekaterinburg, Russian Federation, 620028
makliu@mail.ru