

ОГЛЯДИ

МікроРНК-126: новий перспективний напрям у діагностиці й терапії ішемічних захворювань кінцівок



**Н. Ю. Літвінова, Д. Є. Дубенко, А. М. Єлісеєва,
Г. С. Швачкіна, В. О. Рожкова, Ю. В. Хоцянівська**

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ

У статті наведено сучасні дані наукової літератури щодо вивчення мікроРНК-126 (мРНК-126). Особливу увагу приділено впливу мРНК-126 на патологічний і фізіологічний ангіогенез, можливості її застосування в діагностиці (як маркера активації неоангіогенезу) та в терапії ішемічних захворювань кінцівок. Висвітлено перспективи застосування мРНК-126 у судинній хірургії, кардіології, онкології.

Ключові слова: мікроРНК, ангіогенез, полімеразно-ланцюгова реакція, білок SPRED 1, ендотеліальний фактор росту судин.

МікроРНК (мРНК) — це некодувальні одноланцюгові молекули РНК, що складаються приблизно з 22 нуклеотидів [2]. Кодуються ядерною ДНК (інтронами й екзонами небілоксинтезувальних генів), при цьому висококонсервативні [1, 7]. Зазвичай вони розташовані всередині клітин (більшість відомих сьогодні видів мРНК високоспецифічні для конкретного типу клітин), але нещодавно було знайдено мРНК у плазмі та інших біологічних рідинах тіла людини й лабораторних тварин. Найпоширеніші лабораторні тварини для дослідів, пов'язаних із мРНК, — це миші, серед яких є й генномодифіковані види, проте описані також дослідження, виконані на кролях і собаках [20]. мРНК — важливий складник регуляторних систем, що забезпечують проліферацію, диференціацію, елімінацію клітин як нормальним, так і аберантним шляхом [20, 22].

Генно-молекулярні механізми дії мікроРНК

мРНК беруть участь у транскрипційній і посттранскрипційній регуляції експресії генів шляхом

Стаття надійшла до редакції 20 червня 2016 р.

Літвінова Наталя Юрївна, к. мед. н., асистент
01023, м. Київ, вул. Шовковична, 39/1. Тел. (44) 255-15-60

© Н. Ю. Літвінова, Д. Є. Дубенко, А. М. Єлісеєва, Г. С. Швачкіна,
В. О. Рожкова, Ю. В. Хоцянівська, 2016

РНК-інтерференції (комплементарно з'єднуються з ділянками мРНК і зумовлюють деградацію або інгібування трансляції) [14]. При цьому один тип мРНК може регулювати експресію одразу багатьох генів [10]. Розпізнають необхідну мРНК за 6–8 нуклеотидами на її 5'-кінці [15]. Можливо, вона з'єднується безпосередньо з ДНК під час РНК-залежного метилювання ДНК [17]. Діяльність мРНК реалізується завдяки низці генно-молекулярних механізмів: пригнічення приєднання 40S-рибосоми в ділянці кепу, пригнічення приєднання 60S-субодиниці, пригнічення елонгації, передчасна термінація, деградація котрансляційних допоміжних білків, від'єднання Р-тілець, розривання мРНК, розривання мРНК, пригнічення транскрипції через мРНК-опосередковану реорганізацію [18].

Різновиди мікроРНК та використання їх у практичній медицині

МікроРНК відкрили й експериментально підтвердили їх наявність у людському організмі в 1993 р. Активні дослідження в цьому напрямі почали в середині 2000-х років, переважно європейські та американські вчені. Протягом останніх п'яти років найбільша кількість наукових праць, присвячених мРНК, опублікована китайськими та індійськими науковцями. Сьогодні відомо близь-

ко 1800 різновидів мРНК, що синтезуються різними групами клітин [5, 8].

Нині мРНК розглядають як цінний діагностичний критерій (деякі види мРНК слугують доведеними маркерами захворювань, переважно неопластичних) та перспективний терапевтичний напрям. З дефектами мРНК доказово пов'язують такі захворювання, як спадковий кератоконус, хронічний лімфолейкоз, гліобластома, астроцитома, лімфома, пухлини кишечника, кардіоміопатії, порушення кардіогенезу та ангиогенезу, ожиріння, цукровий діабет 2 типу, остеоартрит [9, 11, 16]. Залежно від концентрації в крові певного типу мРНК, її статистичного аналізу, сумарні показники з урахуванням соматичного стану хворого, на основі комп'ютерних розрахунків складають прогнози п'ятирічної виживаності пацієнтів з пухлинами легень, лімфомаю Ходжкіна, пухлинами молочних залоз [12]. Унаслідок загальносвітового зростання кількості осіб із серцево-судинними захворюваннями особливу увагу дослідників привертають мРНК-126, мРНК-155, мРНК-221 та мРНК-222, які слугують маркерами атеросклеротичного процесу [6].

Методи дослідження мікроРНК

Встановлено, що мРНК, які виділяються клітинами, у деяких концентраціях містяться в біологічних рідин організму. Експериментально доведено наявність мРНК у плазмі крові, сечі, спинномозковій рідині, бронхоальвеолярних змивах. У цих рідинах мРНК залишаються у стабільному стані внаслідок формування міцних комплексів із білками й ліпопротеїнами або завдяки перебуванню у складі мембранних часток (екзосом, апоптотичних тілець, мікрочастинок). Руйнування таких комплексів лабораторним шляхом — високотехнологічний і високоартісний процес, який ускладнює виділення мРНК з біологічних рідин організму. Інші труднощі під час виділення мРНК — це значна кількість біополімерів нуклеотидної природи в початковому матеріалі, наявність у ньому інгібіторів ферментів, які використовуються при полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР) (наступний крок, необхідний для отримання результатів), значна кількість ферментів, що розщеплюють нуклеїнові кислоти. Таким чином, отримання препаратів високоочищених недеградованих мРНК — доволі важке лабораторне завдання. Сьогодні для отримання мРНК з біологічних рідин вдаються до способів, заснованих на фенольній екстракції, зазвичай з використанням комерційних біохімічних наборів з детальною інструкцією від виробника.

Наступний етап лабораторного дослідження для отримання якісної і кількісної інформації щодо мРНК — це ПЛР. Дослідження виконують поступово, у два послідовних етапи: ПЛР зі зворотною транскрипцією та ПЛР у реальному часі.

Точніший, але водночас більш високоартісний метод — визначення мРНК методом гібридизації з мікрочіпами, а також метод високоспецифічного секвенування [4, 11, 21].

МікроРНК-126

МікроРНК-126 продукується ендотеліальними клітинами й ендотеліальними клітинами-попередниками, виступає активним учасником фізіологічного ангиогенезу й неангиогенезу при ішемічних та неопластичних процесах. За умов підтримання стану «судинного спокою» — відсутності факторів пошкодження ендотелію, відсутності активного патологічного неангиогенезу — мРНК-126 слугує інгібітором ангиогенезу і чинником, який контролює пул ендотеліальних клітин. Однак у випадку гіпоксії, масивного пошкодження цілісності інтими судин мРНК-126 виявляє свої проангіогенні властивості, впливаючи на ендотеліальні клітини та ендотеліальний фактор росту судин (ЕФРС). Синтез мРНК-126 кодується інтроном 7 гена EGFL7, їй приписують модуляційну роль у патогенезі судинних захворювань. Дія мРНК-126 на гладенькі м'язи судинної стінки остаточно не вивчена (хоча відомо, що вона є функціональним регулятором клітин скелетних м'язів унаслідок модуляції сигнальної трансдукції у відповідь на дію інсуліноподібного фактора росту 1). Вплив мРНК-126 на інтиму судин відбувається за рахунок паракринного ефекту й виражається стимуляцією регенерації пошкодженого ендотелію.

МікроРНК-126 — важливий регулятор ангиогенезу у високоваскуляризованих тканинах (паренхіма легень, серце, мозок, скелетні м'язи). МікроРНК-126 сприяє реендотелізації після ураження ендотеліальних судин *in vitro*, що відбувається внаслідок транспортування її за допомогою ендотеліальних мікрочастинок, які виступають у ролі вектора до клітини-мішені, і подальшій деактивації (інгібуванню експресії) білка SPRED 1. SPRED 1 — негативний інгібітор ЕФРС, тобто негативний регулятор міграції і проліферації ендотеліальних клітин, який інгібує рухливість клітин і реорганізацію актину. Шляхом мРНК-126-опосередкованої депресії білка SPRED 1 відбувається також розвиток судин під час ембріогенезу. Зниження рівня мРНК-126 спричиняє дефект у процесі ангиогенезу. Водночас мРНК-126 інгібує пухлинний ангиогенез, впливаючи на сигналізацію ЕФРС. Пов'язана з плином крові активація мРНК-126 здійснюється в ендотеліальних клітинах за допомогою механочутливого фактора KLF2. Крім SPRED 1, мРНК-126 ще впливає на хемокін (який у людини закодований геном CXCL 12) і фосфоїнозитол-3-кіназу.

Позаклітинний рівень мРНК-126 також змінюється за різних метаболічних порушень, напри-

клад, він зменшений у пацієнтів із цукровим діабетом. Недостатність мРНК-126 спричиняє просочування крові із судин за механізмом діapedезу та кровотечі внаслідок порушення їх цілісності, частково внаслідок мРНК-126-залежного інгібування ЕФРС [3, 13, 19, 20, 24, 25].

Перспективи застосування мікроРНК-126

Дослідження останніх років показали, що клінічне виявлення мРНК-126 надзвичайно перспективне в різних галузях медицини. Зокрема, наукові праці, виконані у 2010–2016 роках, обґрунтовують необхідність дослідження мРНК-126 у пацієнтів з інфарктом міокарда й постінфарктними ускладненнями, в осіб із діабетичними ангіопатіями та ретинопатіями. Ці дослідження засновані на проангіогенетичних властивостях мРНК-126 і можливого позитивному терапевтичному ефекті

внаслідок ятрогенної корекції її рівня. Деякі дослідження наразі спрямовані на вивчення регуляції мРНК-126 патологічного ангіогенезу при онкологічних захворюваннях. В експериментальному дослідженні на генномодифікованих лабораторних мишах (у яких ендотеліоцити не продукували мРНК-126) спостерігали зменшення темпів пухлинної прогресії порівняно з контрольною групою (миші, у яких мРНК-126 продукувалася). На сьогодні встановлено значний вплив мРНК-126 на розвиток аденокарциноми кишечника, саркоми Капоші (опосередкований геном РІК3Р2), пухлин щитоподібної залози (опосередкований геном СХСР).

Міжнародні колективи вчених, базуючись на результатах проведених досліджень, наголошують на перспективності застосування мРНК-126 у діагностиці й терапії хронічної ішемії нижніх кінцівок у хворих із системним атеросклерозом [12, 24].

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція і дизайн дослідження – Н. Л., Д. Д.; збір і обробка матеріалу – Д. Д., А. Є., Г. Ш., написання тексту – Д. Д., В. Р., Ю. Х.; редагування – Н. Л.

Література

1. Апфель Б. Нуклеиновые кислоты: от А до Я. – М.: Бинном: Лаборатория знаний, 2013. – 413 с.
2. Галицкий В. А. Гипотеза о механизме инициации малыми РНК метилирования ДНК de novo и аллельного исключения // Цитология. – 2008. – 50 (4). – С. 277–286.
3. Anand S., Cheres D. A. Emerging Role of Micro-RNAs in the Regulation of Angiogenesis // Genes Cancer. – 2011. – Vol. 2(12). – P. 1134–1138.
4. Vuermans H. P., Ariyurek Y., van Ommen G. et al. New methods for next generation sequencing based microRNA expression profiling // BMC Genomics. – 2009. – P. 711–716. – DOI:10.1186/1471-2164-11-716.
5. Chen C., Ridzon D. A., Broomer A. J. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucleic Acids Res. – 2005. – 33 (20). – P. 179. – DOI:10.1093/nar/gni178. PMID 16314309.
6. Feng J., Sun G., Yan J. et al. Evidence for X-chromosomal schizophrenia associated with microRNA alterations // Sommer SS. – 2009. – P. 54.
7. Finch M. L., Marquardt J. U., Yeoh G. C., Callus B. A. Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2014. – DOI: 10.1016/j.biocel.2014.04.002. – PMID 24731940.
8. Friedländer M. R., Lizano E., Houben A. J. et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs // Genome Biol. – 2014. – Vol. 15 (4). – P. 57.
9. Gregory P. A., Bert A. G., Paterson E. L. et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1 // Nat. Cell Biol. – 2011. – 10 (5). – P. 593–601. – DOI:10.1038/ncb1722. PMID 18376396.
10. He L., Hannon G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation // Nature. – 2006. – 5 (7). – P. 522–531. – DOI: 10.1038/nrg1379. PMID 15211354.
11. Hughes A. E., Bradley D. T., Campbell M. et al. Mutation Altering the miR-184 Seed Region Causes Familial Keratoconus with Cataract // Am. J. Human Gen. – 2011. – 89 (5). – P. 628–633. – DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.09.014.
12. Insull W. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment // Am. J. Med. – 2009. – Vol. 122. – P. S3–S14.
13. Jansen F. et al. Endothelial Microparticle – Mediated Transfer of MicroRNA-126 Promotes Vascular Endothelial Cell Repair via SPRED1 and Is Abrogated in Glucose-Damaged Endothelial Microparticles // Circulation. – 2013. – Vol. 128 (18). – P. 12–14.
14. Kusenda B., Mraz M., Mayer J., Pospisilova S. MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance // Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. – 150 (2). – P. 205–215. – DOI: 10.5507/bp.2006.029. PMID 17426780.
15. Lewis B. P., Burge C. B., Bartel D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets // Cell. – 120 (1). – P. 15–20. – DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.035.
16. Møller H. G., Rasmussen A. P., Andersen H. H. et al. A Systematic Review of MicroRNA in Glioblastoma Multiforme: Micro-modulators in the Mesenchymal Mode of Migration and Invasion // Mol. Neurobiol. – 2013. – Vol. 47, N 1. – P. 131–144. – DOI: 10.1007/s12035-012-8349-7.
17. Morozova N., Zinovyev A., Nonne N. et al. Kinetic signatures of microRNA modes of action // RNA. – 2014. – 18 (9). – P. 1635–1655. – DOI: 10.1261/rna.032284.112. PMID 22850425.
18. Peterson S. M., Thompson J. A., Ufkin M. L. et al. Common features of microRNA target prediction tools // Front Genet. – 2014. – Vol. 5. – P. 23. – DOI: 10.3389/fgene.2014.00023. – PMID 24600468
19. Rivas D. A. et al. Diminished skeletal muscle microRNA expression with aging is associated with attenuated muscle plasticity and inhibition of IGF-1 signaling // FASEB J. – 2014. – 28 (9). – P. 4133–4147. – DOI: 10.1096/fj.14-254490.
20. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J. L., Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units // Genome Res. – 14 (10A). – P. 1902–1910. – DOI: 10.1101/gr.2722704. PMID 15364901.
21. Shingara J., Keiger K., Shelton J. et al. An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling // RNA. – 2008. – 11 (9). – P. 1461–17150. – DOI: 10.1261/rna.2610405. PMID 16043497.
22. Tanzer A., Stadler P. F. Molecular evolution of a microRNA cluster // J. Mol. Biol. – 339 (2). – P. 327–235. – DOI: 10.1016/j.jmb.2004.03.065. PMID 15136036.
23. Tomasetti M. et al. MicroRNA in Metabolic Re-Programming and Their Role in Tumorigenesis // HHS Public Access. – 2016. – P. 46.

24. Wei Y., Schober A., Weber C. Pathogenic arterial remodeling: the good and bad of microRNA // *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* — 2013. — N 74. — P. 1050–1059. — DOI: 10.1152/ajp-heart.00267.2012.
25. Zuo J. et al. MicroRNA Transcriptome Profile Analysis in Porcine Muscle and the Effect of miR-143 on the MYH7 Gene and Protein // *PLoS One.* — 2015. — 10 (4). — P. 1–21. — DOI: 10.1371/journal.pone.0124873.

МикроРНК-126: новое перспективное направление в диагностике и терапии ишемических заболеваний конечностей

**Н. Ю. Литвинова, Д. Е. Дубенко, А. Н. Елисева,
А. С. Швачкина, В. О. Рожкова, Ю. В. Хоцяновская**

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев

В статье приведены современные данные научной литературы по вопросам изучения микроРНК-126 (мРНК-126). Особое внимание уделено влиянию мРНК-126 на патологический и физиологический ангиогенез, возможности ее использования в диагностике (как маркера активации неоангиогенеза) и в терапии ишемических заболеваний конечностей. Освещены перспективы применения мРНК-126 в сосудистой хирургии, кардиологии, онкологии.

Ключевые слова: микроРНК, ангиогенез, полимеразно-цепная реакция, белок SPRED 1, эндотелиальный фактор роста сосудов.

MicroRNA-126: a new perspective direction in the diagnosis and treatment of ischemic limb diseases

**N. Yu. Litvinova, D. E. Dubenko, A. M. Eliseeva,
G. S. Shvachkina, V. O. Rozhkova, Yu. V. Hotsyanivska**

O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

The article highlights the modern scientific literature data on the research of microRNA-126. Particular attention is paid to the impact of microRNA-126 on the pathological and physiological angiogenesis, ways of its use in the diagnostics (as a marker of activation of angiogenesis) and in the treatment of ischemic limbs diseases. The article shows the prospects of microRNA-126 use in vascular surgery, cardiology, oncology.

Key words: microRNA, angiogenesis, polymerase chain reaction, SPRED 1 protein, vascular endothelial growth factor.