

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет медико-фармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «ПРИКЛАДНІ ЗАСТОСУВАННЯ мікроРНК В БІОЛОГІЇ,
МЕДИЦИНИ ТА СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ»**

Виконала: здобувач вищої освіти 2 курсу, групи
ПБТМ23(1,10з)-01а

спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія

Катерина ОЛЬХОВСЬКА

Керівник: професорка закладу вищої освіти
кафедри біотехнології, д.б.н., проф.

Ольга ФІЛІПЦОВА

Рецензенти: професорка закладу вищої освіти
кафедри клінічної лабораторної діагностики,
мікробіології та біологічної хімії, д.б.н., проф.

Римма ЕРЬОМЕНКО

АНОТАЦІЯ

У роботі досліджено прикладні аспекти функціонування мікроРНК, які виконують ключову роль у посттранскрипційній регуляції експресії генів. Проведено аналіз механізмів біогенезу мікроРНК, їх взаємодії з мішеневими мРНК, а також сучасних методів виділення, профілювання та функціональної валідації. Особливу увагу приділено практичним можливостям застосування мікроРНК у трьох основних галузях: у медицині, біології, сільському господарстві. У результаті роботи узагальнено сучасні підходи до використання мікроРНК у прикладних біотехнологіях, а також розроблено структурну схему їх застосування некодуючих РНК. Робота складається зі вступу, трьох розділів, висновку. Загальний обсяг роботи – 59 стор., кількість рисунків 6, таблиця 1, джерел літератури 38, додатків 1.

Ключові слова: мікроРНК, біотехнологія, експресія генів, біогенез, біомаркери, діагностика, терапія, агротехнологія.

ABSTRACT

The paper investigates the applied aspects of the functioning of microRNAs, short non-coding RNAs that play a key role in the post-transcriptional regulation of gene expression. We analyze the mechanisms of microRNA biogenesis, their interaction with target mRNAs, as well as modern methods of isolation, profiling, and functional validation. Particular attention is paid to the practical applications of microRNAs in three main fields: medicine, biology, and agriculture. As a result of the work, the current approaches to the use of microRNAs in applied biotechnology are summarized, and a structural scheme of their use of non-coding RNAs is developed. The work consists of an introduction, three chapters, and a conclusion. The total volume of the work is 59 pages, the number of figures is 6, table 1, references 38, appendices 1.

Keywords: microRNA, biotechnology, gene regulation, biogenesis, diagnostics, therapy, biomarkers, agrotechnology.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1. Поняття мікроРНК.....	9
1.2. Виділення мікроРНК.....	11
1.3. Біогенез мікроРНК.....	13
1.4. Динаміка дії мікроРНК.....	16
1.4.1. Глобальний погляд на мікроРНК на клітинному рівні.....	16
1.5. Циркуляція мікроРНК.....	17
1.5.1. МікроРНК в біологічних рідинах.....	17
1.6. Невловима роль мікроРНК	18
Висновок до розділу 1.....	18
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	20
2.1. Об'єкт дослідження.....	20
2.2. Методи дослідження.....	20
2.3. Застосування мікроРНК в медицині.....	20
2.3.1. Потенційне застосування мікроРНК у діагностиці та прогнозуванні.....	20
2.3.2. Використання мікроРНК у трансляційній медицині.....	23
2.3.3. Терапія на основі мікроРНК.....	27
2.3.4. Роль мікроРНК у розвитку раку.....	32
2.4. Застосування в сільському господарстві.....	36
2.4.1. Функціональні ролі мікроРНК рослин.....	36
2.4.2. Функції мікроРНК у зернових культурах.....	37
2.4.3. МікроРНК для покращення росту та розвитку рослин.....	40
2.5. Розробка мікроРНК біомаркерів і потенційне терапевтичне застосування в тваринництві.....	46

2.5.1. Важливі мікроРНК біомаркери при хворобах худоби.....	52
Висновок до розділу 2.....	53
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	56
3.1. Загальна схема застосування мікроРНК.....	56
Висновок до розділу 3.....	58
ВИСНОВКИ.....	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	60
ДОДАТОК.....	65

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

РНК - рибонуклеїнова кислота

МікроРНК, microRNA, miRNA - мікрорибонуклеїнова кислота

мРНК - матрична рибонуклеїнова кислота

3' UTR - 3' Untranslated Region , 3'-нетранслювальна ділянка або 3'-нетрансльована область.

miRTarBase - microRNA Target Base

с-miRNA - циркулюючих мікроРНК

NPM-1 - нуклеофосмін-1

AGO - білками Argonaute

AGO-2 – білок Argonaute 2

RISC - RNA-Induced Silencing Complex, комплекс індукованого РНК заглушення

miRISC - microRNA-Induced Silencing Complex, комплекс заглушення, індукований мікроРНК.

pri-miRNA – primary microRNA, первинна мікроРНК

pre-miRNA - precursor microRNA, попередня мікроРНК

DGCR8 - DiGeorge Critical Region 8, білок 8 критичного регіону делеції 22-ї хромосоми

RanGTP - білок Ran у формі, зв'язаній з гуанозинтрифосфатом

m⁷G – 7-метилгуанозином

shRNA - short hairpin RNA, шпилькоподібна РНК

MRE - MicroRNA Response Elements, елементи відповідності мікроРНК

ceRNA - competitive endogenous RNA, "конкуруюча ендегенна РНК"

MAP - Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis

ВСТУП

Актуальність теми. Одним із найважливіших відкриттів останніх десятиліть стало виявлення некодуючих РНК, зокрема мікроРНК. Це невеликі молекули довжиною близько 20–24 нуклеотидів, які відіграють важливу роль у регуляції експресії генів. Вони здатні взаємодіяти з комплементарними ділянками матричної РНК (мРНК), що призводить до пригнічення трансляції або деградації мішеневих РНК.

У сучасній науці мікроРНК привертають дедалі більшу увагу. Вони виявлені майже у всіх еукаріотичних організмах, і за останні роки інтерес до них стрімко зріс через їхню участь у багатьох життєво важливих процесах: розвитку, диференціації клітин, імунній відповіді, адаптації до стресів тощо.

Біофармацевтичні компанії активно інвестують у дослідження та розробки в цій стрімко зростаючій галузі. У 2024 році Нобелівську премію з фізіології та медицини отримали американські науковці Віктор Амброс і Гарі Рувкун за відкриття мікроРНК та дослідження її ролі в посттранскрипційному регулюванні генів. Працюючи з мікроскопічними нематодами виду *Caenorhabditis elegans*, вчені виявили короткі некодуючі РНК-послідовності, які, як з'ясувалося, можуть пригнічувати активність певних генів. Надалі ці РНК були названі мікроРНК. Виявлено, що механізм їхньої дії полягає у зв'язуванні з комплементарними ділянками матричної РНК, яка переносить генетичну інформацію від ДНК до білків. Зокрема, було встановлено, що ген *lin-4* у нематод кодує мікроРНК, яка блокує експресію гена *lin-14*, знижуючи вироблення відповідного білка. Це призводить до змін у розвитку організму, зокрема до затримки певних стадій [1]. Також ці особливі молекули відіграють важливу роль у запуску процесів омолодження, відкриваючи нові горизонти в догляді за шкірою. Останні дослідження показали, що мікроРНК здатні регулювати експресію основних білків, які беруть участь у виробництві колагену та еластину – основних компонентів матриці шкіри [2].

У медицині мікроРНК використовуються як чутливі біомаркери, що дозволяють неінвазивно виявляти патологічні процеси на ранніх стадіях. Завдяки високій специфічності та стабільності в біологічних рідинах, вони стали перспективними для діагностики, прогнозування перебігу хвороб та моніторингу ефективності лікування. Крім того, ведуться активні дослідження зі створення нових терапевтичних підходів, заснованих на модуляції активності мікроРНК — як шляхом їхнього пригнічення (антагоміри), так і шляхом доставки синтетичних мікроРНК (міметики).

У сільському господарстві застосування мікроРНК відкриває нові горизонти в селекції та біотехнології. Вони використовуються для створення культур, стійких до посухи, патогенів, шкідників, а також для регулювання росту, цвітіння, дозрівання плодів. Генетична інженерія мікроРНК у тваринництві дозволяє впливати на ріст, продуктивність та імунітет сільськогосподарських тварин.

У біології дослідження мікроРНК сприяє кращому розумінню регуляторних механізмів, міжклітинної комунікації, а також еволюційних процесів. Вивчення мікроРНК стало невід'ємною частиною системної біології, де інтегруються геномні, транскриптомні та протеомні дані.

Метою дослідження було вивчення загальних властивостей мікроРНК та їх використання в різних галузях медицини, фармації, біотехнології та сільського господарства.

Завданнями дослідження:

1. провести аналіз наукових джерел щодо загальних властивостей мікроРНК та їх використання в різних галузях медицини, фармації, біотехнології та сільського господарства;
2. дослідити сучасні методи виявлення та аналізу мікроРНК;
3. проаналізувати застосування мікроРНК у медицині — діагностика, прогностика, терапевтичне використання (міметики, антагоміри);

4. проаналізувати застосування мікроРНК у сільському господарстві — у створенні стійких до стресів культур, покращенні врожайності, тваринництві;
5. згідно проведеного аналізу скласти загальну схему використання мікроРНК у різних галузях.

Об’єктом дослідження є молекули мікроРНК як елемент регуляції експресії генів у живих організмах.

Предметом дослідження є прикладні аспекти використання мікроРНК у біології, медицині та сільському господарстві.

Методи дослідження. Було використано літературний пошук з обраної теми та аналіз знайденої інформації.

Апробація результатів дослідження і публікації. Окремі результати досліджень представлені на XXXI Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів», і опубліковані у матеріалах:

1. Ольховська К.О. Прикладні аспекти застосування мікроРНК/ Ольховська К.О., наук. керівн. Філіпцова О.В. // I Науково-практична Internet-конференція з міжнародною участю «Фармацевтичні технології, стандартизація та забезпечення якості лікарських засобів», 21 листопада 2024 року, НФаУ. – Харків, 2024. – С. 97 - 98.

2. Ольховська К.О. МікроРНК: сучасні можливості для медицини та сільського господарства мікроРНК/ Ольховська К.О., наук. керівн. Філіпцова О.В. // XXXI Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів», 23-25 квітня 2025 року, НФаУ. – Харків, 2025. – С. 185 - 186.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Робота складається зі вступу, трьох розділів - огляду літератури, об’єктів та методів дослідження, експериментальної частини, висновку. Загальний обсяг роботи – 64 стор.,

кількість рисунків – 6, таблиць – 1, схема – 1, джерел літератури – 37, додатків – 1.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Поняття мікроРНК

МікроРНК (рис.1.1) — це клас некодуючих РНК довжиною приблизно 22 нуклеотиди, які відіграють важливу роль у регуляції експресії генів [3]. МікроРНК являють собою короткі молекули РНК розміром від 19 до 25 нуклеотидів, які регулюють вихід білка після транскрипції [4]. Більшість мікроРНК транскрибується з послідовностей ДНК у первинні мікроРНК і перетворюється в мікроРНК-попередник і, нарешті, у зрілі мікроРНК. У більшості випадків мікроРНК взаємодіють з 3' нетрансльованою областю (3' UTR) цільових мРНК, щоб викликати деградацію мРНК і репресію трансляції. Вони складають 1-2% усіх генів у черв'яків, мух і ссавців. Одна мікроРНК може націлюватись на сотні мРНК і впливати на експресію багатьох генів, які часто беруть участь у функціональному шляху взаємодії.

МікроРНК кодуються генами, перший з яких (*lin-4*) виявлений у 1993 р. під час вивчення механізмів розвитку відомого модельного організму — нематоди *Caenorhabditis elegans* вченими Гарвардського університету [5]. На даний момент 3012 унікальних мікроРНК людини були розпізнані та збережені в репозиторії miRTarBase, з величезною, оціненою ємністю 4475477 потенційних взаємодій мікроРНК-мішень [6]. Крім того, було зареєстровано кілька проблем щодо якості анотацій мікроРНК у загальнодоступних базах даних, а також відтворюваності досліджень мікроРНК [7]. Захоплююче те, що кілька ендогенних клітинних РНК, таких як кільцеві РНК, довгі некодуючі РНК, транскрибовані псевдогени та мРНК, діють як природні губки мікроРНК, здатні міцно взаємодіяти з цільовими мікроРНК і руйнувати їх, таким чином порушуючи контрольовані ними мережі [8].

Хоча невелика кількість мікроРНК має тканиноспецифічний розподіл, більшість виявляють широку тканинну локалізацію. Враховуючи поширену присутність нуклеаз, припускають, що молекули РНК схильні до швидкої деградації у позаклітинному середовищі. Тим не менш, було виявлено, що молекули мікроРНК зберігають неочікувану стабільність у плазмі та інших фізіологічних рідинах, оскільки вони можуть бути упаковані з клітин у формі мікровезикул і екзосом або білкових комплексів, таких як Argonaute 2 (бере участь у РНК комплекс глушіння), нуклеофосмін-1 (РНК-зв'язуючий білок, який бере участь у експорті ядра рибосоми) або ліпопротеїни високої щільності. Ці форми здатні активно вивільнятися у позаклітинний простір і досягати клітин-реципієнтів, де вони можуть впливати на трансляцію цільових генів, таким чином визначаючи явну роль мікроРНК у міжклітинній комунікації [9]. Відповідно, відкриття близько 300 циркулюючих мікроРНК підкреслило потенціал мікроРНК як міжклітинних сигнальних молекул і біомаркерів захворювань, оскільки нерегульована експресія мікроРНК може порушити жорстко контрольовані мережі РНК у тканинах і органах, потенційно сприяючи аномаліям [10]. Тим не менш, більша частина функціонального значення с-miRNA на сьогоднішній день залишається невідомою, і розрив між відкриттям і функцією ще належить подолати.

Багато досліджень виявили кореляції між зміненими рівнями мікроРНК і фізіопатологією багатьох процесів, включаючи мітохондріальні, серцево-судинні, нейродегенеративні, імунні захворювання, запальні, рідкісні генетичні розлади тощо; більшість цих досліджень зосереджено на мікроРНК як біомаркерах раку, підкреслюючи їхню актуальність як персоналізованих тераностичних факторів. Цікаво, що мікроРНК є не тільки проспективними маркерами початку та прогресування неопластичних захворювань, але також індикаторами відповідей на терапію раку, а також їх зв'язку з резистентністю до ліків і модуляцією відповідей на лікування раку [11].

Контролюючи найважливіші метаболічні процеси, мікроРНК також було виявлено, що відіграють роль в енергетичному балансі та нагляді за метаболічними шляхами в живих організмах [11].

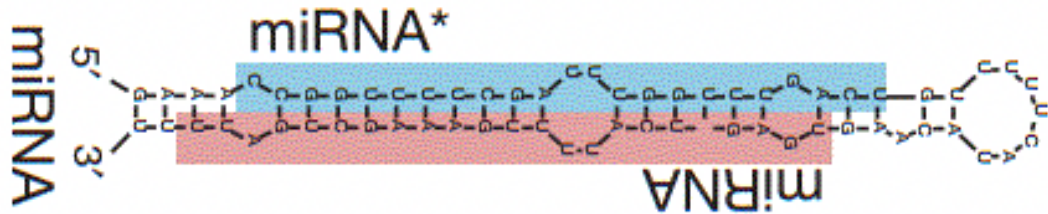


Рис.1.1 – Структура мікроРНК [12]

1.2. Виділення мікроРНК

МікроРНК можна виділити з клітин, тканин і рідин організму, таких як плазма, сироватка, слюзи або сеча [13]. Ще раніше було досліджено виділення мікроРНК шляхом екстракції фенолом-хлороформом з подальшим осадженням РНК (рис.1.2 (А)).

Широко використовуваним реактивом є Тризол. Проте при використанні цього методу часто спостерігається наявність високого рівня забруднень. Також було виявлено, що мікроРНК з низьким вмістом GC вибірково втрачаються під час фенол-хлороформної екстракції з невеликої кількості клітин. Це пов'язано з неефективністю осадження малих нуклеїнових кислот порівняно з довгими нуклеїновими кислотами. Використання методу адсорбції РНК на основі колонки під час ізоляції мікроРНК дозволяє уникнути цих проблем [13]. Початковий метод на основі колонки передбачає завантаження водної фази з фенол-хлороформної екстракції на колонку для адсорбції РНК з подальшим промиванням та елююванням мікроРНК (рис.1.2 (Б)).

Набори mirVana та miRNEasy є широко використовуваними наборами для цього методу. Нові доступні набори, такі як набори Direct-zol, пропускають етап розділення фаз. Фенольний реагент, що містить

мікроРНК, можна безпосередньо завантажувати на колонку для адсорбції РНК з подальшим промиванням та елююванням мікроРНК (рис.1.2 (В)). Для того, щоб уникнути перевантаження колонок слід бути обережним, оскільки перевантаження значно знижує вихід і якість РНК. Більшість комерційних наборів, розроблених для виділення мікроРНК, забезпечують протокол виділення загальної РНК, що містить мікроРНК, і альтернативний протокол для поділу малої фракції, збагаченої РНК (<200 нуклеотидів), і великої фракції РНК (>200 нуклеотидів). Промивний буфер RW1, що входить до складу набору для виділення тотальної РНК Qiagen RNEasy, вимиває всі малі нуклеїнові кислоти під час етапу промивання буфера, тому цей набір не підходить для виділення мікроРНК. Однак, якщо зразки вже були лізовані в буфері лізису RLT, включеному в набір Qiagen RNEasy, доступні модифіковані протоколи для повторного захоплення мікроРНК.

Виділення мікроРНК з рідин організму представляє додаткові проблеми, оскільки вихід мікроРНК в рідинах організму набагато нижчий порівняно з клітинами або тканинами. Часто потрібна велика кількість початкового зразка рідини організму, яка перевищує ліміт вхідного об'єму зразка для деяких комерційно доступних наборів. Обидва набори для сироватки/плазми miRNEasy та набір для виділення РНК miRCURY - Biofluids мають максимальний об'єм зразка рідини 200 мкл. Набір mirVana PARIS розроблено для виділення РНК із рідкого зразка об'ємом до 625 мкл. Для більшого вхідного об'єму зразка можна використовувати набір циркулюючої нуклеїнової кислоти QIAmp, який дає змогу виділяти мікроРНК із вихідного зразка об'ємом до 3 мл. Необхідно звернути увагу на використання протоколу мікроРНК і використання буфера лізису без РНК-носія мікроРНК [13].

Figure 1A

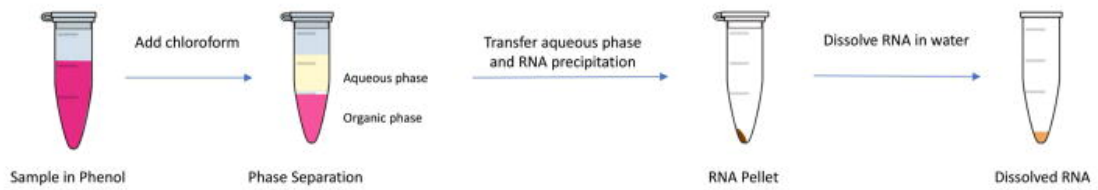


Figure 1B

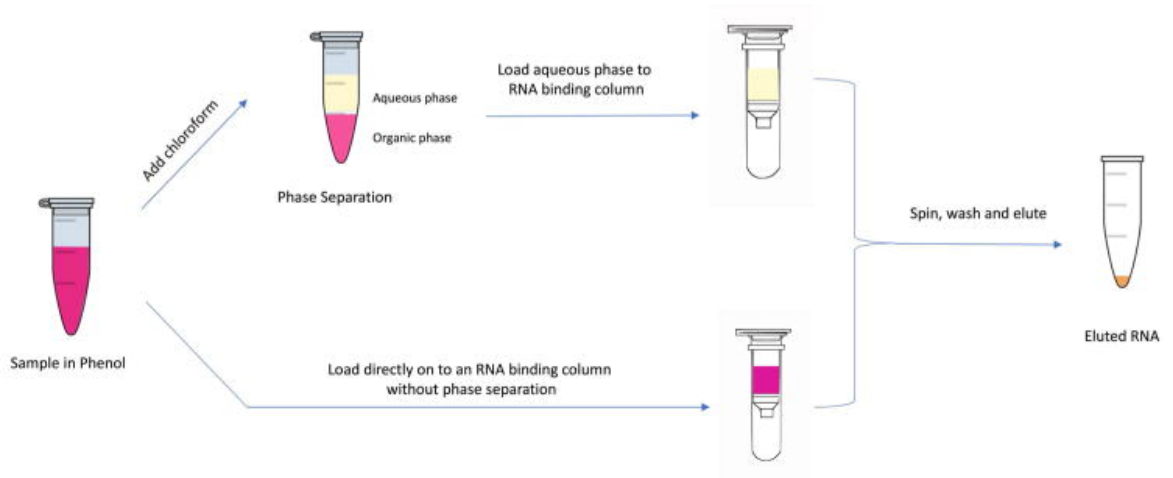


Рис.1.2 - Методи екстракції мікроРНК:

А - розділення фаз на основі фенолу та хлороформу з подальшим гранулюванням РНК і повторним розчиненням у воді, вільній від нуклеази. Б - водна фаза з фенол-хлороформу може бути завантажена на колонку для адсорбування РНК. Після етапів промивання РНК елюють водою, вільною від нуклеаз. Крім того, нові набори для екстракції мікроРНК дозволяють користувачеві пропустити етап поділу фаз. Зразки, гомогенізовані у фенолі, можна завантажувати, направляючи на колонку для адсорбування РНК, з наступними етапами промивання та елюції РНК. Замість реагенту на основі фенолу виробник може надати власний буфер для лізису мікроРНК [13].

1.3. Біогенез мікроРНК

Біогенез мікроРНК опосередковується декількома етапами: транскрипцією первинних транскриптів мікроРНК, ядерним процесингом

Drosha, нуклеоцитоплазматичним експортом, цитоплазматичним процесингом Dicer та утворенням РНК-індукованого мовчазного комплексу з білками Argonaute [14].

Біогенез мікроРНК класифікується на канонічні та неканонічні шляхи [5] (рис. 1.3).

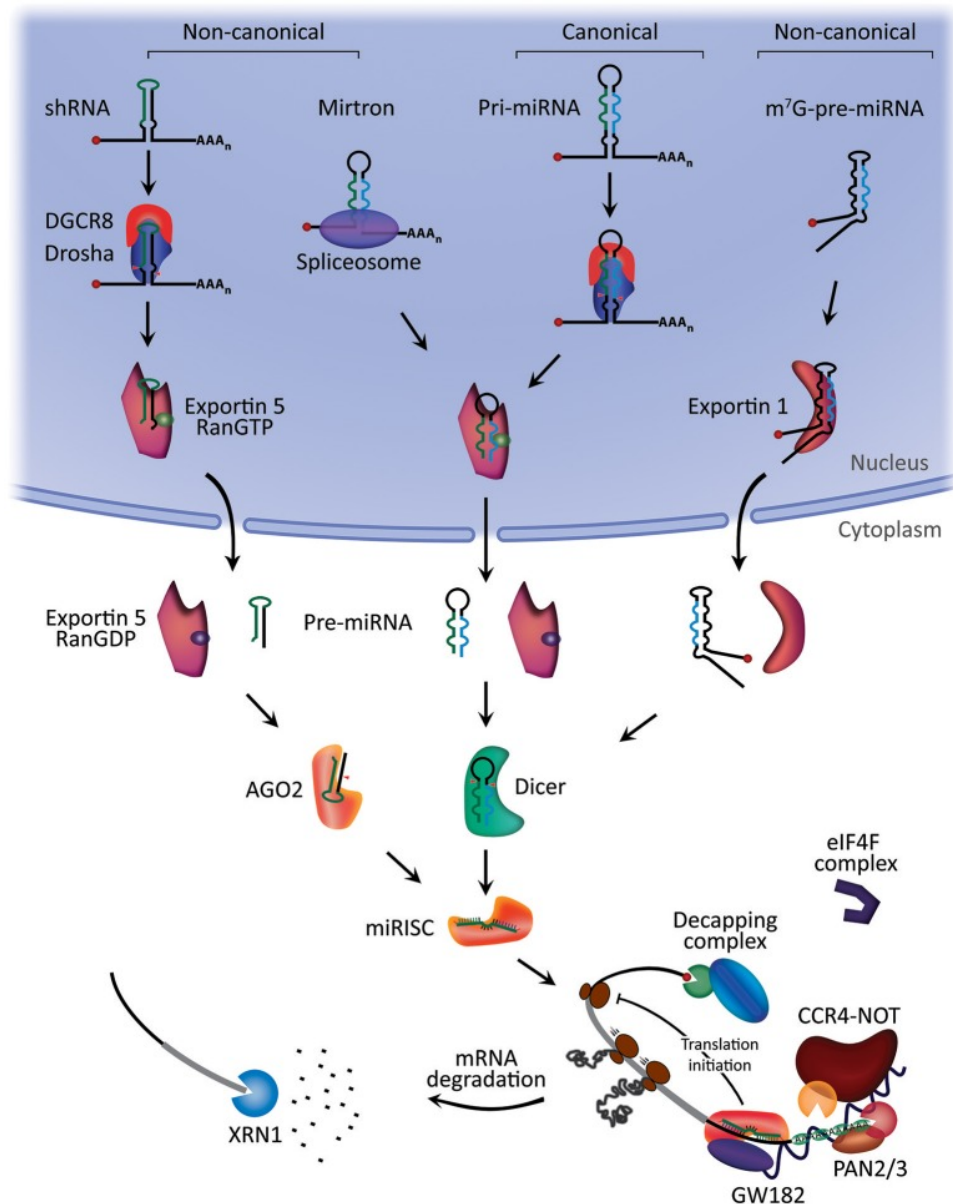


Рис.1.3 - Шлях біогенезу мікроРНК

Канонічний шлях біогенезу мікроРНК

Канонічний шлях біогенезу є домінуючим шляхом процесингу мікроРНК. У цьому шляху pri-miRNA транскрибуються з їхніх генів, а потім переробляються в pre-miRNA за допомогою мікропроцесорного

комплексу, який складається з РНК-зв'язуючого білка критичної області 8 синдрому ДіДжорджа і ферменту рибонуклеази III Дроша. Канонічний біогенез мікроРНК починається з генерації транскрипту при-міРНК. Мікропроцесорний комплекс, DGCR8, розщеплює pri-miRNA для отримання мікроРНК-попередника. Pre-miRNA експортується в цитоплазму Exportin5/RanGTP-залежним способом і обробляється для отримання зрілого дуплексу мікроРНК. Нарешті, ланцюги 5p або 3p зрілого дуплексу мікроРНК завантажуються в сімейство білків AGO для формування індукованого мікроРНК комплексу глушіння [15].

Неканонічні шляхи біогенезу мікроРНК

На сьогоднішній день було з'ясовано кілька неканонічних шляхів біогенезу мікроРНК. Ці шляхи використовують різні комбінації білків, залучених до канонічного шляху, головним чином Drosha, Dicer, exportin 5 і AGO2. Загалом, неканонічний біогенез мікроРНК можна згрупувати в Drosha/DGCR8-незалежні та Dicer-незалежні шляхи. Pre-miRNA, що виробляються Drosha/DGCR8-незалежним шляхом, нагадують субстрати Dicer. Прикладом таких pre-miRNA є мітрони, які виробляються з інтронів мРНК під час сплайсингу. Іншим прикладом є pre-miRNA, закрита 7-метилгуанозином. Ці зароджувані РНК безпосередньо експортуються в цитоплазму через експортин 1 без необхідності розщеплення Дроши. Існує сильне зміщення ланцюга 3p, швидше за все, через обмеження m⁷G, що запобігає завантаженню ланцюга 5p в Argonaute. З іншого боку, Dicer-незалежні мікроРНК обробляються Drosha з ендогенних коротких шпилькових РНК транскриптів. Ці pre-miRNA потребують AGO2 для завершення свого дозрівання в цитоплазмі, оскільки вони мають недостатню довжину, щоб бути субстратами Dicer. Це, у свою чергу, сприяє завантаженню всієї pre-miRNA в AGO2 і AGO2-залежному нарізанню ланцюга 3p. Обрізка 3'-5' нитки 5p завершує їх дозрівання [15].

1.4. Динаміка дії мікроРНК

Дослідження показали, що регуляція генів, опосередкована мікроРНК, є динамічною та допомагає буферизувати експресію генів до стабільного стану.

Фактори, які можуть сприяти надійності регуляції генів, опосередкованої мікроРНК, включають функціональну компартменталізацію та переміщення miRISC всередині клітин. Доступність і велика кількість мікроРНК та їх цільових мРНК також є факторами, що впливають на визначення того, які гени регулюються. Хоча це не завжди так, пригнічення мікроРНК мішеней мРНК не є повсюдним для типів клітин. Альтернативний сплайсинг і альтернативне поліаденілювання, що впливають на 3' UTR, і специфічні для клітинного типу РНК-зв'язувальні білки, які впливають на вторинні структури цільової мРНК, змінюють доступний пул MRE [16, 17]. Це робить підмножини мРНК чутливими або нечутливими до регуляції генів, опосередкованої мікроРНК, залежно від типу клітини.

1.4.1. Глобальний погляд на мікроРНК на клітинному рівні

Взаємодія між великою кількістю/локалізацією мікроРНК, типом і станом клітини та опосередкованою мікроРНК регуляцією все ще інтенсивно досліджується. Було встановлено, що приблизно половина експресованих мікроРНК збагачена клітинним типом, одна чверть має широку експресію, а решта мали низький рівень експресії незалежно від типу клітини. Ці дані допомагають зміцнити загальну роль мікроРНК у клітинах. Як правило, мікроРНК може регулювати генні мережі динамічно та/або тимчасово, наприклад, петлі зворотного зв'язку та прямого зв'язку [18], а також регуляцію генів у стаціонарному стані, наприклад, посилення регуляції мікроРНК під час диференціювання. Інтригуючим є те, що мікроРНК не виключно або, можливо, навіть переважно, функціонують як цільово-специфічні регулятори, але можуть відігравати ключову роль у посттранскрипційному зменшенні шуму експресії.

Важливою концепцією зв'язку між динамікою мікроРНК і клітинними мережами експресії генів є ідея навантаження MRE [19]. Існує навантаження MRE для кожної мікроРНК, яка представляє загальну кількість доступних сайтів зв'язування на всіх цільових молекулах РНК у клітині.

Індивідуальна мРНК може містити багато MRE [20], і, таким чином, сприяє численним навантаженням MRE для різних мікроРНК. Хоча певною мірою кожна окрема мРНК із декількома MRE може діяти як seRNA, кілька MRE також можуть діяти для збільшення зайнятості miRISC.

1.5. Циркуляція мікроРНК

Численні дослідження показали, що мікроРНК можуть вивільнятися в позаклітинні рідини. Позаклітинні мікроРНК можна використовувати як біомаркери для різноманітних захворювань. Позаклітинні мікроРНК можуть бути доставлені до клітин-мішеней, і вони можуть діяти як аутокринні, паракринні та ендокринні регулятори для модуляції клітинної діяльності. У цьому відношенні мікроРНК мають гормоноподібну активність [5].

1.5.1. МікроРНК в біологічних рідинах

Багато досліджень виявили позаклітинні/циркулюючі мікроРНК у біологічних рідинах, таких як плазма та сироватка, спинномозкова рідина, слина, грудне молоко, сеча, слюзи, молозиво, перитонеальна рідина, бронхіальна рідина та інші. На відміну від клітинних видів РНК, позаклітинні мікроРНК дуже стабільні, протистоять деградації при кімнатній температурі до 4 днів і в шкідливих умовах, таких як кип'ятіння, численні цикли заморожування, розморожування та високий або низький рН.

У біологічних рідинах існують дві популяції позаклітинних мікроРНК. Один можна знайти в везикулах, таких як екзосоми, мікровезикули та апоптотичні тіла, а інший пов'язаний з білками, особливо AGO2 [5].

1.6. Невловима роль мікроРНК

Практично кожен біологічний процес підлягає регуляції, залежній від мікроРНК. Як додатковий доказ їх функціональної значущості, мікроРНК та їх мішені часто демонструють вражаючу еволюційну консервацію.

Незважаючи на їх очевидну важливість як класу регуляторних молекул, визначення біологічної значущості окремих мікроРНК виявилось складним завданням. Здебільшого, фізіологічні функції специфічних мікроРНК були зроблені з досліджень надекспресії на тваринах і культивованих клітинах або з досліджень, які використовували антисмислові молекули як засіб порушення їхнього сполучення з мішенями. Ці експерименти приписували критичні ролі мікроРНК у таких процесах, як клітинна проліферація, диференціювання та виживання, і залучали їх як вирішальних гравців під час нормального розвитку, гомеостазу та захворювань. Дивно, але очікування, викликані цими ранніми дослідженнями, виправдалися зростаючою кількістю нокаутованих тварин із дуже скромними фенотипами або без них. Крім того, на даний момент було показано, що лише два гени мікроРНК (міРНК-17~92 і мікроРНК-96) викликають дефекти розвитку у людей при мутації.

Висновок до розділу 1

МікроРНК є важливим класом некодуючих РНК, які здійснюють посттранскрипційну регуляцію експресії генів. Завдяки здатності взаємодіяти з численними мРНК, мікроРНК формують складні регуляторні мережі, що контролюють критичні клітинні процеси, такі як проліферація, диференціація та апоптоз. Біогенез мікроРНК опосередковується декількома етапами: транскрипцією первинних транскриптів мікроРНК, ядерним процесингом Drosha, нуклеоцитоплазматичним експортом, цитоплазматичним процесингом Dicer та утворенням RISC з білками Argonaute. Він здійснюється як канонічними, так і неканонічними шляхами.

Виділення мікроРНК із біологічних зразків є важливим етапом для подальших досліджень їх функціональної активності. Незважаючи на

складність виділення з рідин організму, сучасні методики дозволяють досягати високої чистоти та цілісності РНК.

Циркуючі мікроРНК, що присутні в плазмі, слині, сечі та інших рідинах, виявляють високу стабільність і потенціал для використання як неінвазивних біомаркерів різноманітних захворювань. Разом з тим, остаточне розуміння їх біологічної ролі залишається недостатнім через складність експериментального підтвердження функціональних ефектів.

Таким чином, мікроРНК становлять перспективний об'єкт для подальших фундаментальних та прикладних досліджень у галузі молекулярної біології, медицини та біотехнології.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом дослідження є молекули мікроРНК як елемент регуляції експресії генів у живих організмах.

2.2. Методи дослідження

Було використано літературний пошук з обраної теми та аналіз знайденої інформації. На даний момент приблизно 3000 унікальних мікроРНК людини були розпізнані та збережені в репозиторії miRTarBase, з величезною, оціненою ємністю 4,4 мільйони потенційних взаємодій мікроРНК-мішень. Відомо, що кілька ендогенних клітинних РНК, таких як кільцеві РНК, довгі некодуючі РНК, транскрибовані псевдогени та мРНК, діють як природні губки мікроРНК, здатні міцно взаємодіяти з цільовими мікроРНК і руйнувати їх, таким чином порушуючи контрольовані ними мережі.

2.3. Застосування мікроРНК в медицині

2.3.1. Потенційне застосування мікроРНК у діагностиці та прогнозуванні

Циркулюючі мікроРНК розглядаються як перспективні біомаркери для багатьох захворювань людини, оскільки вони відповідають декільком критеріям, включаючи високу специфічність, легкий доступ і чутливість. Було виявлено, що мікроРНК існують у багатьох біологічних рідинах, де вони дуже стабільні. Її можна легко виділити, наприклад, з крові або інших рідких біопсій. МікроРНК також має високу специфічність до різних типів тканин або клітин. Наприклад, miRNA-122-5p високо збагачена в печінці або miRNA-140 є хрящово-селективною miRNA. Ця особливість підвищує можливість використання специфічних мікроРНК для визначення ініціації та прогресування захворювання. Було продемонстровано, що чутливість міРНК може змінюватися відповідно до прогресування захворювання або відповіді на

терапію. Завдяки цим перевагам мікроРНК є неінвазивним методом для точної діагностики, прогнозу прогресування захворювання, а також для лікування [21].

МікроРНК були визнані біомаркерами раку з 2008 року, після використання у дослідженні дифузної великоклітинної В-лімфоми в сироватці крові пацієнтів. Відтоді було запропоновано їх передбачувану корисність як біомаркерів для численних розладів людини.

Численні дослідження виявили кілька циркулюючих мікроРНК, які були deregulовані в плазмі та сироватці крові хворих на рак. При раку шлунка було виявлено збільшення miR-20a-5p і miR-221 як у зразках плазми, так і в сироватці. Цікаво, що зміни miR-221-3p, miR-378c-3p і miR-744-5p у сироватці крові можуть допомогти передбачити рак шлунка за 5 років до появи будь-яких клінічних симптомів. При колоректальному раку повідомлялося про постійну зміну miR-21-5p і miR-29-3p у плазмі та сироватці пацієнтів. Важливо, що плазматична експресія мікроРНК-21-5p може диференціювати пацієнтів з колоректальним раком з 90% чутливістю та специфічністю. Крім того, рівні мікроРНК-29a-3p і мікроРНК-92a-3p у плазмі потенційно можуть забезпечити хорошу діагностику з 83% чутливістю та приблизно 85% специфічністю. У гепатоцелюлярній карциномі було виявлено, що мікроРНК-122-5p, збагачена гепатоцитами мікроРНК, постійно змінюється у зразках сироватки та плазми. Рівень цієї мікроРНК у сироватці може допомогти відрізнити пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою з приблизно 82% чутливістю та 83% специфічністю. При раку підшлункової залози кілька циркулюючих мікроРНК показали потенційну діагностичну цінність. Було показано, що підвищення рівня мікроРНК-196a постійно змінюється в різних дослідженнях і типах зразків. Надмірна експресія miR-200a-3p і miR-200b-3p у сироватці крові дала чутливість від 71,7% до 84,4% для виявлення раку підшлункової залози [21].

Крім мікроРНК, згаданих вище, існує ще багато мікроРНК, які змінюють експресію в різних типах раку. Однак для певного раку було визначено кілька

мікроРНК, що перекриваються. Таким чином, можливість пошуку унікальної циркулюючої мікроРНК для окремого типу раку може бути важкою [21].

Рання діагностика раку має вирішальне значення для покращення кінцевого результату терапії та загального рівня виживання пацієнтів. Повідомлялося, що численні циркулюючі набори мікроРНК мають здатність ідентифікувати початкові стадії раку з високою специфічністю та чутливістю. Наприклад, два набори мікроРНК (miR-378 і miR-199a) і набір сигнатур з п'яти плазмових мікроРНК (miR-486-5p, -451, -92a, -25 і -16) були потенційними біомаркерами для раннього виявлення раку шлунка; знижені рівні мікроРНК-122 і підвищені рівні мікроРНК-192 у плазмі пацієнтів з раком шлунка можуть бути використані для ранньої діагностики віддалених метастазів [21].

Циркулюючі мікроРНК можуть бути прогностичними маркерами раку, у яких їх змінені рівні можна використовувати для прогнозування ефекту хіміотерапії та рецидиву захворювання. При раку молочної залози підвищення регуляції miR-125b може виявити нижчу терапевтичну відповідь на 5-фторурацил (5-FU), циклофосфамід. Більш високі рівні miR-210 вказували на стійкість до трастузумабу та розвиток пухлини [21].

Для інших розладів людини також повідомлялося, що циркулюючі мікроРНК є потенційними маркерами для діагностики та прогнозу. При хворобі Альцгеймера набір із 7 циркулюючих мікроРНК у плазмі (miR-545-3p, -301a-3p, -191-5p, -142-3p, -15b-5p, let-7g-5p і let-7d-5p) міг виявити пацієнтів з хворобою Альцгеймера з точністю 95% у здорових донорів. При ревматоїдному артриті (РА) експресія miR-125b у сироватці та крові пацієнтів була збільшена у порівнянні з остеоартритом та нормальним контролем. При ожирінні підвищені рівні циркулюючих miR-222, miR-142-3p і miR-140-5p і знижені рівні miR-532-5p, miR-520c-3p, miR-423-5p, miR-221, спостерігалися мікроРНК-130b, мікроРНК-125b і мікроРНК-15a. При хронічному болю циркулююча мікроРНК-27b була значно збільшена, тоді як мікроРНК-181a, мікроРНК-22 і let-7b були знижені у пацієнтів жіночої статі з мігренню [21].

Сфера діагностики на основі мікроРНК значно просунулася вперед завдяки численним діагностичним інструментам.

До них відноситься:

- панель miRview™ Mets для виявлення раку невизначеного або невідомого первинного походження;
- панель RosettaGX Reveal для розрізнення невизначених або доброякісних вузлів щитовидної залози;
- ThyraMir (класифікатор мікроРНК) для ідентифікації раку щитовидної залози;
- CogniMIR проходить клінічні випробування для ранньої діагностики хвороби Альцгеймера;
- OsteomiR для перевірки ризику першого перелому у жінок з діабетом 2 типу та постменопаузальним остеопорозом;
- ThrombomiR для оцінки функції тромбоцитів [21].

У 509 валідаційних зразках панель miRview™ Mets дозволила ідентифікувати з точністю до 90% і показала 88% кореляцію з клініко-патологічною оцінкою пацієнта. Панель RosettaGX Reveal дала негативну прогностичну цінність 91%, специфічність 72% і чутливість 85%. Поєднання ThyGeNEXT (онкогенної панелі для стратифікації раку щитовидної залози) і ThyraMir припускає цікаву можливу причину невдачі 15-30% стандартних цитологічних оцінок для диференціації доброякісних стадій від злоякісних. ThyraMir дає позитивну прогностичну цінність у 74%, негативну прогностичну цінність у 94% і зменшує на 85% кількість необов'язкових операцій раку щитовидної залози [21].

2.3.2 Використання мікроРНК у трансляційній медицині

З моменту першого звіту про некодуючу РНК, ідентифіковану в *C. elegans* у 1993 році, більшість із 153 210 статей про дослідження мікроРНК,

перелічених у PubMed (січень 2023 року), показують їх критичний вплив на хвороби людини. Кількість і різноманітність досліджень вказують на дивовижну складність і обмеження досліджень мікроРНК, які все більше орієнтуються на медицину наступного покоління. Відповідно до незвичайних рівнів мікроРНК, виявлених у деяких нездорових умовах, очікуються нові стратегії молекулярної діагностики, які глибоко заохочують дослідників і виробників зосередитися на мікроРНК як відповідних неінвазивних біомаркерах захворювань. Однак поки що немає згоди щодо конкретних мікроРНК, придатних для раннього виявлення захворювань, навіть у важливих тематичних областях, таких як дослідження раку *in vivo*. Поточні обмеження в цій галузі відкриттів пов'язані з методами розпізнавання с-міРНК, які мають бути надзвичайно специфічними та здатними розпізнавати невеликі кількості цільових молекул, а також брати до уваги наявність небажаних забруднень та інгібіторів, які можуть заважати подальшим аналітичним методологіям [11]. Крім того, стрімке збільшення РНК-препаратів в останніх дослідженнях і клінічних розробках, частково зумовлене успіхом месенджерних РНК-вакцин у боротьбі з пандемією SARS-CoV-2, підштовхнуло пошук препаратів на основі мРНК для лікування інших захворювань [11].

Терапевтичні агенти класично базуються на синтетичних малих молекулах, моноклональних антитілах або великих білках. Традиційні препарати можуть не вразити призначені терапевтичні мішені через недоступність активних місць у тривимірній структурі мішені.

Терапія на основі РНК:

- може запропонувати виняткову можливість потенційно досягти будь-якої відповідної цілі з терапевтичною метою;
- уникнути потреби у трудомістких процедурах синтезу. Тим не менш, послідовність розпізнавання може бути швидко переглянута та адаптована до цілі;

- мають проблеми зі специфічністю, які несуть ризик побічних ефектів; сприйнятливість препаратів на основі РНК до деградації може визначати погану фармакодинаміку.

Деякі з цих проблем можна пом'якшити хімічними змінами в структурі синтетичного полімеру (РНК або ДНК). Слід зазначити, що препарати на основі РНК зазвичай більші за розміром, ніж препарати для лікування малими молекулами, і несуть електричні заряди, що ускладнює їх внутрішньоклітинну доставку в нативній формі [11].

У цьому контексті терапевтичний потенціал лікування мікроРНК приділяється увага під час клінічних випробувань майже всіх захворювань людини. Враховуючи здатність мікроРНК націлюватися на специфічні мРНК, інгібітори, засновані на послідовності надекспресованих мікроРНК, можуть бути використані проспективно у формі анти-міРНК для зниження підвищених рівнів мікроРНК і, у свою чергу, відновлення їх транскриптів зі зниженою регуляцією. Анти-miR зазвичай базуються на антисмислових одноланцюгових олігонуклеотидах (ASO) першого покоління або їх хімічно модифікованих формах у вигляді блокованих нуклеїнових кислот (LNA), які своєчасно розроблені для розпізнавання цільових мРНК. Тим не менш, анти-miR з 2'-О-метоксиетиловим заміщенням класифікуються як антагоміР [53]. Міміки мікроРНК - це хімічно синтезовані дволанцюгові невеликі молекули РНК, які імітують зрілі ендогенні мікроРНК (замісна терапія мікроРНК) після трансфекції в клітини, дія яких спрямована на заміну зниженої або відсутньої експресії мікроРНК [11].

Застосування опосередкованої вірусом терапії на основі мікроРНК показало великий успіх на моделях на тваринах, де аденовіруси успішно доставляли як анти-міРНК, так і міміки мікроРНК. Однак, незважаючи на високу ефективність систем доставки мікроРНК на основі вірусів, залишається ряд проблем, включаючи токсичність, імуногенність і обмеження розміру вставки. Щоб подолати ці труднощі, з роками з'явилися невірусні

підходи до виробництва та доставки ліків на основі мікроРНК. Суттєві покращення в дизайні, синтезі, афінності зв'язування, стабільності та цільових модуляційних ефектах як імітаторів мікроРНК, так і анти-міР були досягнуті завдяки хімічним змінам нуклеотидного остова, оскільки основною проблемою для терапевтичних стратегій на основі РНК є можлива деградація олігонуклеотидів РНКазми в позаклітинних і внутрішньоклітинних компартментах. Відповідно, хімічний склад олігонуклеотидів був значно змінений шляхом модифікації нуклеотидів, введення модифікацій основ, модифікацій рибозного фрагмента та модифікацій фосфатної групи в цукор-фосфатному скелі (рис. 2.1).

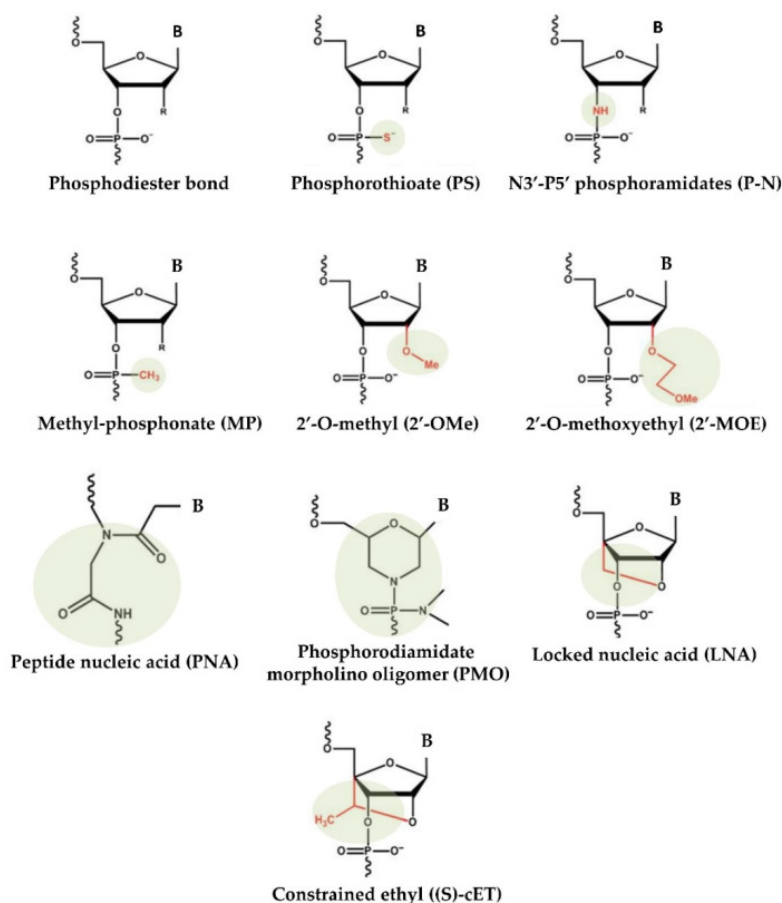


Рис.2.1 - Хімічні зміни олігонуклеотидів, що використовуються в основних клінічних дослідженнях [11].

Інший стратегічний підхід, що полегшує терапію на основі РНК у клінічному застосуванні, полягає в інкапсуляції імітаторів мікроРНК або анти-міР у транспортних засобах для надання їм захисту від нуклеази.

Терапевтичні мікроРНК включають негативно заряджені полімери, які не можуть безпосередньо перетинати клітинні мембрани. Щоб досягти намічених цілей, їм потрібні відповідні склади, включаючи носії, а також хімічні модифікації.

Стратегія інкапсуляції наноносія може як захистити, так і доставити ліки до клітин-реципієнтів, тоді як біологічні перешкоди, такі як імуногенність і нуклеаза, часто усуваються шляхом хімічної модифікації нуклеотидної структури [22]. Для покращення біодоступності все частіше використовуються різні методи транспортування, включаючи ліпосоми та біорозкладні полімери. У цьому контексті ліпосоми, які протягом тривалого часу використовувалися як імунологічні ад'юванти у вакцинації, адекватно виконують цю роль [23].

Наночастинки ліпідів є найбільш часто використовуваною невірусною технологією доставки ліків і вакцин на основі нуклеїнових кислот. Вони складаються з комплексів аніонних нуклеїнових кислот і синтетичних катіонних ліпідів. Катіонні ліпіди характерно включають похідні амінів, такі як первинні, вторинні та третинні аміни, на додаток до четвертинного амонію, солей амідинію та різних комбінацій амінів. Переваги транспортних систем на основі ліпідів полягають у легкості збирання, здатності до біологічного розкладання, здатності екранувати нуклеїнові кислоти, захоплені нуклеазами, захисті ниркового кліренсу, здатності сприяти поглинанню клітинами та уникненню ендосом.

2.3.3. Терапія на основі мікроРНК

Терапія на основі мікроРНК є перспективною. Однак існує багато проблем, пов'язаних з доставкою мікроРНК, що обмежує її ефективність. Системне введення використовується для доставки ліків у прагматичному клінічному застосуванні. Однак міміки чи інгібітори мікроРНК будуть розщеплені РНКазою в кровообігу навіть за хімічної модифікації. Крім того, мікроРНК може бути захоплена іншими органами, що призводить до неспецифічних ефектів. Щільний позаклітинний матрикс у деяких тканинах

також може служити фізико-хімічним бар'єром для запобігання проникненню в клітину імітаторів чи інгібіторів мікроРНК. Крім того, негативний заряд нуклеїнових кислот і відносно велика молекулярна маса можуть перешкоджати пасивній дифузії мікроРНК або інгібітора через аніонну фосфоліпідну двошарову мембрану для входу в цитозоль. Якщо це було розміщено за допомогою ендоцитозу, ендосомальна ліпосомальна торгівля може призвести до деградації мікроРНК у компартменті лізосоми. Тому існує потреба в багатофункціональній системі доставки, щоб подолати всі перешкоди доставки мікроРНК, щоб використовувати переваги терапії на основі мікроРНК.

Існують такі методи доставки мікроРНК: кон'югація, вірус-асоційована доставка, і наночастинки. Незважаючи на те, що експериментально доведено, що вірус-асоційована доставка міРНК є ефективною для лікування раку, проблеми безпеки, пов'язані з вірусом, обмежують її клінічне застосування і інші невірусні системи доставки видаються більш перспективними. Система кон'югації, в якій ліпіди або ліганди, спрямовані на клітинні рецептори, безпосередньо кон'югуються з міРНК, є гарним підходом для доставки міРНК. Хоча кон'юговані системи з міРНК є простими і чітко визначеними, невідповідний розподіл призводить до домінантної агрегації мікроРНК у печінці та потреби у високій дозі для достатньої доставки, що обмежує їх застосування. RG-101, анти-міРНК-122, ковалентно кон'югований з N-ацетилгалактозаміном, був розроблений для доставки в гепатоцити. Цей препарат пройшов клінічні випробування. Наночастинки мають багато переваг для доставки мікроРНК. Зазвичай вони включають катіонний компонент, який утворює комплекси з аніонними мікроРНК, таким чином захищаючи їх від деградації та затверджуючи взаємодію з клітинними мембранами для полегшення клітинного поглинання [21].

Розробка та комерціалізація нових діагностичних і терапевтичних засобів є тривалим процесом. Незважаючи на значну кількість доклінічних досліджень, розробка як діагностичних, так і терапевтичних застосувань

мікроРНК все ще знаходиться в зародковому стані, і лише незначна кількість терапій на основі мікроРНК перейшла до клінічної розробки (рис.2.2, табл. 2.1).

Перелік ліків на основі мікроРНК у клінічних випробуваннях розширюється щодня, причому кілька кандидатів, спрямованих проти генетичних, метаболічних та онкологічних захворювань, досягають стадії клінічних випробувань [24].

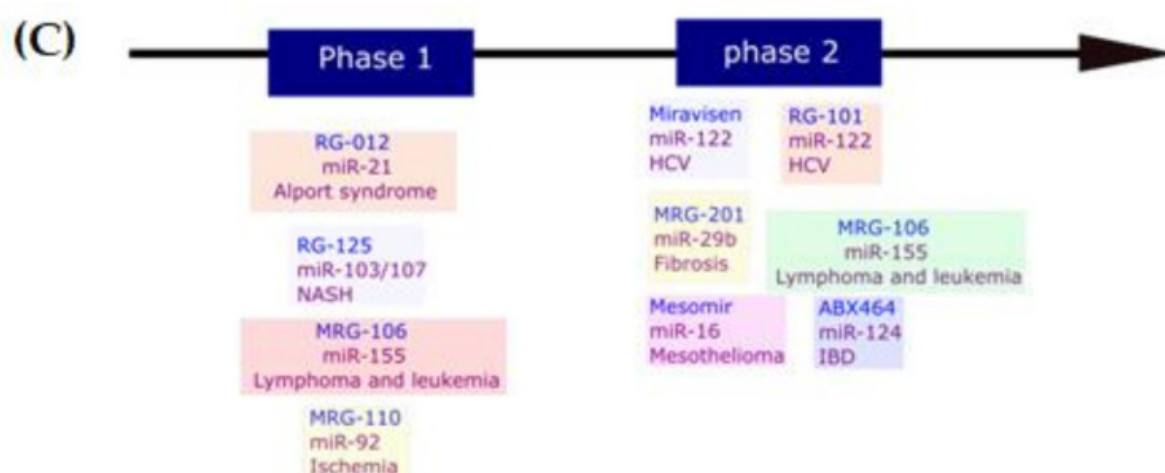


Рис.2.2 - Сучасна терапія на основі мікроРНК [21]

Miravirsen

Це перша антисмислова мікроРНК, яка пройшла клінічні випробування як цільова терапія для лікування інфекції вірусу гепатиту С. Препарат складається з 15-mer LNA-PS-модифікованого ASO, здатного націлюватися на miR-122, який контролює реплікацію гепатиту С у печінці. Довгострокову ефективність і безпеку Miravirsen у пацієнтів з хронічною інфекцією гепатиту С оцінювали в дослідженні II фази. Під час дослідження препарат пацієнту вводили шляхом підшкірної ін'єкції. Серйозні побічні ефекти призупинили випробування [11].

Cobomarsen (MRG-106)

miR-155 посилюється в кількох підтипах лімфоми, а також у дифузній великоклітинній В-клітинній лімфомі. Cobomarsen — це антагоміР на основі LNA, націлений на miR-155. Молекула, розроблена компанією miRagen

Therapeutics (Viridian Therapeutics Inc), наразі проходить фазу II випробувань для лікування шкірної Т-клітинної лімфоми, Т-клітинної лімфоми та лейкої [11].

MRG-107

MRG-107 також розробляється miRagen Therapeutics і, як і MRG-106, націлений на miR-155. МіРНК виконує відповідні функції в імунних механізмах і запальних процесах при бічному аміотрофічному склерозі. У спинному мозку пацієнтів з бічним аміотрофічним склерозом підвищується рівень miR-155. Інгібування miR-155 полегшило симптоми та подовжило виживаність у доклінічних моделях захворювання [11].

MRX34

miR-34a є природним супресором пухлин, який експресується на знижених рівнях у багатьох типах пухлин. Клінічні дослідження показали негативну кореляцію між зниженою експресією мікроРНК-34 і виживанням у кількох типах пухлин. MRX34 — це ліпосомальна композиція miR-34a. Він вважається першим у своєму класі імітатором мікроРНК для лікування широкого спектру ракових захворювань, включаючи рак яєчників, товстої кишки, шийки матки, гепатоцелюлярну карциному, недрібноклітинний рак легенів та інші. Формулювання в даний час знаходиться на фазі I клінічних випробувань [11].

Remlarsen (MRG-201)

Препарат призначений для імітації активності miR-29, мікроРНК, яка знижує рівень колагену та інших білків, які беруть участь у формуванні рубців. Рівні членів родини miR-29 зазвичай знижуються при фіброзних захворюваннях. Remlarsen, імітатор LNA РНК, досліджується, щоб визначити, чи може він обмежити утворення фіброзної рубцевої тканини при введенні шляхом внутрішньошкірної ін'єкції в місці ексцизійної рани. Наразі триває II фаза клінічних випробувань [11].

MGN-1374

miRagen Therapeutics — це компанія, яка розробляє кілька препаратів на основі мікроРНК, серед яких ASO MGN-1374 націлений на ділянку насіння сімейства miR-15. 8-мерний олігонуклеотид LNA знаходиться на доклінічній стадії для контролю ремоделювання після інфаркту міокарда [11].

Таблиця 2.1

Терапія на основі мікроРНК для лікування захворювань людини та їх стадії розвитку [21]

Терапевтичні назви	Лікування захворювань людини	Цільові мікроРНК	Стадія розвитку
Miravirsen	Вірус гепатиту С	AntagomiRs targeting miR-122	II етап
RG-101	Вірус гепатиту С	AntagomiRs targeting miR-122	На утриманні
RG-125 (AZD4076)	Неалкогольний стеатогепатит	AntagomiRs targeting miR- 103/107	На утриманні
RGLS5040	Холестатичні захворювання	AntagomiRs targeting miR-27	На утриманні
RG-012	Фіброгенез органів, пов'язаний із синдромом Альпорта	AntagomiRs targeting miR-21	На утриманні
MRG-201 (Remlarsen)	Фіброзні захворювання	LNA RNA mimic miR-29a	Фаза I
MRX34	Раки	RNA mimic miR- 34a	Фаза I
MRG-106 (Cobomarsen)	Лімфома і лейкоз	LNA antagomiRs targeting miR-155	II етап

Терапевтичні назви	Лікування захворювань людини	Цільові мікроРНК	Стадія розвитку
Mesomir	Злоякісна мезотеліома плеври	RNA mimic miR- 16	II етап
ABX464	Хвороба Крона та виразковий коліт	Compound inducing miR- 124	II етап
MRG-110	Ішемічні стани, такі як серцева недостатність	Mixer of LNA and DNA antagomiR targeting miR-92	Фаза I
MRG-107	Бічний аміотрофічний склероз	AntagomiRs targeting miR- 155	Доклінічний

2.3.4 Роль мікроРНК у розвитку раку

Рак - багатоетапний процес, у якому нормальні клітини зазнають генетичних змін, які прогресують через серію передзлоякісних станів (ініціація) до інвазивного раку (прогресування), який може поширюватися по всьому тілу (метастази) або складне та гетерогенне захворювання, характеризується послідовністю генетичних і геномних аномалій, які сприяють пухлиногенезу [25]. Ці зміни в геномі впливають на функцію гена, часто є результатом геномних аберацій, таких як хромосомні транслокації, ампліфікації, делеції, вставки, одонуклеотидні мутації або епігенетичні модифікації. Ці генетичні та епігенетичні зміни часто призводять до активації онкогенів і придушення генів-супресорів пухлин. Крім того, мікроРНК були визначені як додаткові геномні регулятори, які також відіграють вирішальну

роль у різних аспектах розвитку організму, нормальних фізіологічних процесах і розвитку захворювань, включаючи багато видів раку [26].

МікроРНК відіграють ключову роль у всіх відомих процесах, залучених до раку, таких як проліферація, виживання, метастазування та апоптоз. Порушення регуляції функції мікроРНК, через її втрату або посилення, сприяє розвитку раку шляхом активізації або придушення певних цільових генів. МікроРНК мають здатність регулювати всі визнані ознаки раку, діючи як супресори пухлин або сприяючи онкогенним процесам.

Зміни в процесі біогенезу мікроРНК можуть впливати на доступність цільових мРНК, у тому числі пов'язаних із розвитком раку [27]. Коли мікроРНК або апарат, який бере участь у процесингу мікроРНК, змінюються або порушуються, це часто призводить до втрати нормального гомеостатичного стану, що в свою чергу призводить до злоякісної трансформації, включаючи різні типи раку.

Завдяки своїй ключовій ролі в регуляції експресії численних генів, пов'язаних із клітинними реакціями на стресори навколишнього середовища, такі як гіпоксія, окислювальний стрес, пошкодження ДНК і дефіцит поживних речовин, мікроРНК можуть служити як онкогени (онкоміри) або супресори пухлин (онкосупресорні мікроРНК) .

Дисрегульовані циркулюючі мікроРНК продемонстрували зв'язок із походженням захворювання, прогресуванням, відповіддю на лікування та виживанням пацієнтів. Наприклад, відмінна тканинна специфічність мікроРНК, що має вирішальне значення для підтримки нормальних клітин і тканин, робить їх перспективними кандидатами на потенційні біомаркери в діагностиці раку невідомої первинної форми. З частими генетичними та епігенетичними змінами, ідентифікованими в конкретних мікроРНК та елементах, залучених у біогенез мікроРНК у різних типах раку, онкогенні та пухлинні супресори мікроРНК з'явилися як багатообіцяючі кандидати в якості терапевтичних засобів на основі мікроРНК [28].

МікроРНК як біомаркери діагностики раку та прогнозування ефективності ліків

Проводиться багато клінічних випробувань, що вивчають клінічний потенціал мікроРНК як біомаркерів для прогнозування відповіді на лікування раку та діагностики [4].

В якості діагностичних маркерів були протестовані мікроРНК у зразках крові або тканин хворих на рак. Наприклад, miR-155 використовувався для діагностики неінвазивного раку сечового міхура (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT03591367), а профіль мікроРНК використовувався для прогнозування розвитку мультицентричного раку молочної залози (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT04516330). Низка додаткових діагностичних клінічних випробувань з використанням зразків крові або тканин пацієнтів триває. Випробовується здатність let-7a та miR-124 діагностувати неходжкінську лімфому та гострий лейкоз (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT05477667). МіРНК плазми також профілюють, щоб виявити нові діагностичні мікроРНК при раку легенів і гінекологічному раку (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT02247453 & NCT03776630). Крім того, у клінічних випробуваннях перевіряється здатність деяких мікроРНК характеризувати некласифіковані типи ракових клітин. Випробовується здатність десяти мікроРНК визначати та характеризувати невизначені типи раку щитовидної залози (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT04285476). Цікаво, що нові маркери мікроРНК для скринінгу колоректального раку шукають у зразках фекалій (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT05346757). Також тривають клінічні випробування для вивчення маркерів мікроРНК, які регулюються пробіотиками. Пробіотичні добавки з ерадикацією *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) сприяють регресу кишкової метаплазії шляхом регулювання сигнального шляху Wnt-/β-катенін. Оскільки мікроРНК відіграють вирішальну роль у регулюванні сигнального шляху Wnt-/β-катеніну в канцерогенезі шлунка, пробіотики можуть модулювати мікроРНК, задіяні в сигнальному шляху Wnt-/β-катеніну та канцерогенезі шлунка. Таким чином, одне клінічне

випробування (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT05544396) мало на меті ідентифікувати та охарактеризувати маркери мікроРНК, що регулюються пробіотиками в канцерогенезі шлунка. На додаток до цих клінічних випробувань, інші клінічні випробування, спрямовані на ідентифікацію мікроРНК або тестування діагностичної корисності біомаркерів мікроРНК при раку [4].

Також була вивчена здатність мікроРНК передбачати ефективність різних методів лікування раку. МіРНК клінічно оцінюють як прогностичні маркери хіміотерапевтичної ефективності при метастатичному кастраційно-резистентному раку простати (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT04662996). Щоб підвищити ефективність ад'ювантної терапії раку товстої кишки, шість мікроРНК (miR-21, miR-20a, miR-103a-3p, miR-106b, miR-143 і miR-215) перебувають у стадії клінічних досліджень (ідентифікатор ClinicalTrials.gov : NCT02466113). Також досліджено потенціал мікроРНК-маркерів для прогнозування ефективності цільової імунотерапії. У NSCLC екзосомальні мікроРНК профілювали та характеризували до або після введення імунотерапії, націленої на PD-1 або PD-L1 (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT04427475). Щоб перевірити здатність мікроРНК передбачати ефективність кількох хіміотерапевтичних препаратів (епірубіцину, циклофосфаміду, паклітакселу та карбоплатину), кореляція між рівнями мікроРНК у крові та резистентністю до ліків була вивчена при потрійному негативному раку молочної залози (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT04771871) . MiR-371a-3p у сироватці крові оцінюється як маркер резистентності до хімічних препаратів (карбоплатин, етопозид і цисплатин) і променевої терапії при пухлинах зародкових клітин яєчок (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT05529251). Кореляція miR-141 і miR-375 із радіаційною стійкістю також досліджується при раку простати (ідентифікатор ClinicalTrials.gov: NCT02391051). Оскільки багато ліній доказів показали, що багато мікроРНК беруть участь у резистентності до різних терапевтичних модальностей і стратегій при раку, слід розробити більше

клінічних випробувань, які б оцінювали корисність мікроРНК як предиктивних і прогностичних маркерів лікування раку [4].

З моменту відкриття функцій мікроРНК при раку багато мікроРНК були ідентифіковані в різних типах раку. Крім того, було виявлено, що додаткові мікроРНК специфічно порушуються в різних типах раку через відкриття нових мікроРНК і розробку нових технологій виявлення протягом останнього десятиліття. Наприклад, було виявлено, що мікроРНК-34697, мікроРНК-45165, мікроРНК-638 і мікроРНК-152 відіграють роль у розвитку недрібноклітинного раку легенів; виявлено, що miR-885-5p відіграє роль у розвитку раку нирки; і було виявлено, що miR-1285 відіграє роль у розвитку раку простати. Зовсім недавно було виявлено, що генетичні та епігенетичні модифікації мікроРНК можуть бути використані як діагностичні та прогностичні маркери раку. Однонуклеотидні поліморфізми, виявлені в мікроРНК, пов'язані зі схильністю до раку. Розробка нових технологій, таких як MeRIP-Seq (m6A-seq), призвела до ідентифікації мікроРНК з модифікаціями m6A. Метилування мікроРНК пов'язане з прогнозом і стійкістю до ліків при раку [4].

2.4. Застосування в сільському господарстві

2.4.1 Функціональні ролі мікроРНК рослин

МікроРНК беруть участь у багатьох біологічних процесах, де вони відіграють вирішальну роль у розвитку та зростанні, підтримці цілісності геному, передачі сигналу, гормональних сигнальних шляхах, гормональному гомеостазі, вродженому імунитеті та відповіді на різні екологічні абіотичні та біотичні стреси.

Нещодавні дослідження показали, що мікроРНК можуть бути використані для перепрограмування клітинного метаболізму після сприйняття молекул мікробно-асоційованого молекулярного патерну під час атаки патогенів у рослинах, що призводить до динамічних змін мікротранскриптому,

пов'язаного з диференціальною регуляцією транскрипції на підтримку імунітету та базальної [29].

2.4.2 Функції мікроРНК у зернових культурах

Рис (*oryza sativa*)

Рис є основним джерелом їжі для більш ніж половини населення світу. Як і інші культури, рис піддається різноманітним екологічним стресам, включаючи посуху, сіль, холод, спеку та дефіцит поживних речовин, які є основними обмежувачими факторами для його росту та врожаю.

Сьогодні багато мікроРНК рису ідентифіковано за допомогою 592 послідовностей мікроРНК, присутніх у miRbase версії 21. Існує багато літератури щодо ідентифікації мікроРНК з даних NGS рису, і відомо, що кілька консервативних мікроРНК беруть участь у відповіді на абіотичний стрес: виявили, що miR393 (OsmiR393), який націлений на два гомологи гена рецептора ауксину рису (OsTIR1 і OsAFB2), сильно експресується в умовах посухи. Його надмірна експресія призвела до зниження стійкості до посухи, а також до солі. Однак рослини з надлишковою експресією *OsmiR393* показали два нових фенотипи: інтенсивне кущення та раннє цвітіння, які є корисними для продуктивності. В інших дослідженнях, пов'язаних з екстремальними температурами (холодом або спекою), було виявлено кілька мікроРНК, що реагують на холодний стрес (miR167, miR319, miR812q і miR1425). Повідомлялося, що OsmiR397 є чутливою до високої температури мікроРНК, яка модулює експресію L-аскорбатоксидази (OsLAC) у відповідь на тепловий стрес і адаптацію рису. Надмірна експресія OsmiR397 і зниження регуляції відповідного цільового гена OsLAC призвели до покращення врожайності за рахунок збільшення розміру зерна, а також до підвищення стійкості до грибкового збудника *Magnaporthe oryzae* [29].

Кукурудза (*zea mays*)

Кукурудза є другою за важливістю продовольчою культурою в усьому світі, яка використовується для харчових продуктів, кормів і кормів, а також як

джерело етанолу для виробництва палива. Окрім її сільськогосподарського та економічного значення, кукурудзу також використовували в дослідженнях як модельну рослину.

П'ять мікроРНК, включаючи сімейства miR156, miR160, miR166, miR167, miR169 беруть участь у розвитку, зростанні та відповідях на біотичний стрес кукурудзи. Версія miRbase 21 містить список 321 мікроРНК кукурудзи, які відіграють важливі функції у рості, розвитку та реакції рослин на біотичні та абіотичні стреси. Було показано, що miR164 негативно регулює ZmNAC1 (NAM, ATAF і CUC), специфічне для рослин сімейство TF, яке бере участь у розвитку та регуляції стресу. Крім того, було ідентифіковано 95 консервативних мікроРНК, таких як miR156a, miR160a, miR164e, miR164a, miR167d, miR168, miR169a, miR393a, miR397b, miR408b, miR528a тощо, які належать до 20 родин, включаючи 11 нових сімейств мікроРНК. Регуляторні ролі під час розвитку ендосперму кукурудзи. Інші дослідження показали, що три мікроРНК кукурудзи, miR528a, miR167a і miR160b важливі для проростання колоса, розвитку та фізіології рослини. Нещодавно було ідентифіковано 124 консервативних мікроРНК кукурудзи та 68 нових мікроРНК кукурудзи, які пов'язані зі стійкістю до стресу від посухи, де вони відіграють вирішальну роль у регуляції генів, залучених у відповідь на стрес від посухи [29].

Пшениця (*triticum aestivum*)

Пшениця є однією з найважливіших зернових культур у всьому світі завдяки своїм поживним якостям і величезному внеску в продовольчу безпеку.

Було докладено багато зусиль для дослідження мікроРНК на субгеномних рівнях у пшениці за допомогою секвенування, що призвело до відкриття 58 мікроРНК пшениці, що складаються з 43 родин мікроРНК; 20 із цих родин були збережені (miR156/157, miR159, miR160, miR164, miR165/166, miR167, miR168, miR169, miR170/171, miR172, miR319, miR390, miR393, miR396, miR397, miR399 і miR408), а 23 були новими (miR501, miR502, miR503, miR504, miR505, miR506, miR510, miR514 і miR516 тощо),

які беруть участь у розвитку пшениці та різноманітних фізіологічних процесах. Багато мікроРНК пшениці були ідентифіковані за допомогою 116 послідовностей мікроРНК, присутніх у miRbase версії 21. Шістдесят дві консервативні мікроРНК, що належать до 30 сімейств мікроРНК, і кілька нових мікроРНК були ідентифіковані в пшениці за допомогою аналізу EST, і відомо, що їхні передбачувані потенційні цільові гени беруть участь у різних біологічних процесах, що включають розвиток (miR397, miR437), стійкість до хвороб (miR1436, miR1439, miR5067, miR5205), відповідь на абіотичний стрес (miR395d, miR1435), транспортування іонів (miR5181, miR5175), метаболічні шляхи (miR774, miR1126) і передача сигналу (miR530, miR5175). У недавньому дослідженні на тканинах пшениці було проведено широке дослідження мікроРНК, і 323 нові мікроРНК, що належать до 276 сімейств, були охарактеризовані за допомогою відповідних цільових генів. Ці мікроРНК були переважно експресовані в зерні, що свідчить про те, що вони відіграють вирішальну роль у розвитку зерна [29].

Ячмінь (*hordeum vulgare*)

Ячмінь є ще однією важливою культивованою культурою в усьому світі з точки зору виробництва. Зерно ячменю використовується як для споживання людиною, так і для годування худоби. На додаток до його сільськогосподарського значення, це модель рослини для таксономічної родини *Triticeae*, а його генетика, геноміка та селекція добре вивчені.

Близько 100 мікроРНК були вперше ідентифіковані в ячмені за допомогою глибокого секвенування, з яких 56 (miR156/157, miR159, miR319, miR160, miR172, miR393, miR396, miR408 тощо) мали ортологи в пшениці чи рисі. Подібно до інших важливих сільськогосподарських культур, ячмінь викликав інтерес для досліджень мікроРНК, і 69 мікроРНК ячменю присутні в miRbase 21. Уже в 2012 році комбінація аналізів деградоми малих РНК і мРНК дозволила ідентифікувати та охарактеризувати 84 консервативні мікроРНК (miR156, miR166, miR390, miR408 тощо) і сім нових мікроРНК (hvu-miR5071b, hvu-miR1120b, hvu-miR6001, hvu-miR6002, hvu-miR6003, hvu-miR6004 і hvu-

miR6005) разом із 96 передбачуваними цільовими генами мікроРНК, які, як передбачається, беруть участь у різних функціях, включаючи транслокацію вуглеводів, клітинну диференціація, захист відповідь, фотосинтез і шляхи передачі сигналів фітогормонів. Це відкриття показало, що мікроРНК відіграють важливу роль у регулюванні раннього розвитку насіння ячменю. Вони беруть участь у координації тканинної специфікації та мобілізації енергії для забезпечення належного росту та розвитку зерна ячменю. Використовуючи високопродуктивне секвенування Solexa коротких РНК, 133 нові та 126 висококонсервативних мікроРНК ячменю були ідентифіковані з бібліотек. Було припущено, що нові мікроРНК (miR-n026, miR-n028 і miR-n029) відіграють важливу роль у реакціях на посуху та сольовий стрес [29].

2.4.3 МікроРНК для покращення росту та розвитку рослин

МіРНК набувають все більшого значення, оскільки більшість генів, на які спрямовані ці крихітні нуклеотиди, кодують фактори транскрипції (ФТ), що вказує на роль мікроРНК у білок-білковій взаємодії та регуляції білків ДНК. Крім того, ФТ регулюють процеси росту та розвитку рослин протягом усього життєвого циклу рослини. Різноманітні процеси росту та розвитку рослин включають розвиток і диференціацію клітин, розвиток органів, фазовий перехід, гомеостаз поживних речовин, взаємодію фітогормонів і процеси старіння в рослинах. Протягом життєвого циклу рослини мають зазнавати різноманітних фізіологічних і морфологічних змін, що лежать в основі вегетативних і репродуктивних фаз.

Регуляція вегетативного росту рослин кількома мікроРНК

Пари або окремі мікроРНК, що сповільнюють стадії росту рослин, були виявлені в різних видах сільськогосподарських культур. Використання молекулярних методів і обчислювальних підходів продемонструвало підтвердження гіпотези, і на поточному етапі було підтверджено функцію мРНК на кількох стадіях росту.

Нещодавнє дослідження показало, що 56 із 65 пар взаємодії мікроРНК-мРНК були залучені до різних стадій розвитку насіння гречки татарської (*Fagopyrum tataricum*). Ці пари взаємодії в основному беруть участь у диференціації клітин, подовженні клітин, ембріоні, розвитку ендосперму та розмірі насіння. miRNA156 є важливим регулятором спокою насіння. Інтегрований аналіз мРНК і мікроРНК показав, що морфофізіологічний стан спокою гінкго (*Ginkgo biloba*) пов'язаний з мікроРНК156, яка регулює мережу фітогормонів. Було встановлено, що на соматичний розвиток ембріона в деяких рослинах впливає активна участь набору мікроРНК. Також вчені показали, що miR160 морської сосни (*Pinus pinaster*) (ppi-miR160) взаємодіє *in vivo* з цільовим сайтом PrARF18 за допомогою репортерної системи люциферази (LUC) для активності мікроРНК у протопластах *Arabidopsis*. При необмежувальних рівнях ARGONAUTE1 первинний miR160 морської сосни був надмірно експресований у протопластах, що призвело до помітного підвищення активності цільового розщеплення miR160. З іншого боку, активність miR160 була знижена, коли основна мікроРНК і цільова міміка MIM160 спільно експресувалися.

Розвиток кореня є важливим процесом, який бере участь у життєвому циклі рослини. Багато мікроРНК активно реагують на стадії росту та розвитку коренів, регулюючи ФТ. Розвиток коренів — це динамічний процес, який складається з багатьох компонентів. Дослідження показало, що 64% інтерпретованих мікроРНК експресуються в коренях *Arabidopsis*. У виноградної лози (*Vitis vinifera*) було помічено, що 96 із 119 передбачених мікроРНК, залучених до розвитку коренів, подібні до інших видів, тоді як було ідентифіковано 23 нові мікроРНК виноградної лози, які спільно регулюють розвиток бокового кореня. Було виявлено, що мікроРНК (miR156 і miR390) і ФТ, такі як NAC4, ARF2 і AFB3, сильно експресуються в бічному корені в умовах дефіциту калію. Експерименти з функціональної характеристики яблука (*Malus domestica*) показали, що надмірна експресія mdm-miR164b і глушіння *MdORE1* демонструють посилене утворення додаткових коренів у

тютюні (*Nicotiana tabacum*) і яблуні. Характеристика мікроРНК у солодкій картоплі (*Ipomoea batatas*) надала докази того, що деякі консервативні та нові мікроРНК, включаючи нові 104, 120, 140, 214, 359 і 522, мали сильний зв'язок із підвищенням регуляції абсцизової кислоти (ABA), що вказує на їх роль у розвитку коренів. Деякі звіти свідчать про те, що vvi-miR164b винограду відіграє активну роль у формуванні ряду коренів, і генетична трансформація *Arabidopsis* підтверджує цю теорію. Подібним чином, надмірна експресія SimiR396d у просі лисячого (*Setaria italica*) показали важливу роль у довжині кореня.

Архітектура рослин в основному регулюється генетичними компонентами. Наприклад, лінії miR319-OE в насінні ріпаку (*Brassica napus* L.) продемонстрували значний вплив на висоту рослин і аномальний розвиток апікальної меристеми та розміщення листків. Вторинні метаболіти відіграють важливу роль у рості та розвитку рослин. Було виявлено, що деякі мікроРНК активно регулюють синтез метаболітів у рослинах. Наприклад, різноманітний набір мікроРНК (miR2093-5p, miR4414b, miR5037a, miR829-3p.1 і miR838-3p) у китайській сапані (*Gleditsia sinensis*) виявлено для участі в синтезі терпеноїдів. Функціональна перевірка за допомогою трансгенного підходу в ріпаку виявила, що регулювання архітектури рослини регулюється miR319. В іншому дослідженні охарактеризували miR166 у сої (*Glycine max*) і виявили, що висота рослин була значно знижена в рослинах з нокдауном та шлях з катаболізмом біосинтезу гіберелінової кислоти, був пов'язаний з висотою рослини. Важлива роль мікроРНК osa-miR528 виявила, що в рослинах із надмірною експресією ріст проростків рису (*Oryza sativa*) позитивно модулювався в умовах дефіциту азоту. Нітрат-залежна регуляція мікроРНК також була додатково підтверджена дослідженнями, розвиток коренів рису був прискорений у трансгенних рослинах, що виробляють цільовий імітатор miR444. Незважаючи на те, що miR444 може націлюватися на численні гени, результати показали, що OsMADS27 діє як основна мішень miR444, яка

контролює експресію транспортерів нітратів, а також кількох важливих генів, таких як розширення та ті, що пов'язані з передачею сигналів ауксину, для підтримки росту коренів. У поєднанні з цим пригнічення мікроРНК-резистентного гена OsMADS27 призвело до зниження росту коренів і підвищення стійкості до абіотичного стресу [29].

Внесок мікроРНК у цвітіння рослин і зав'язування плодів/зерна

Квітковий перехід найбільш необхідний для розмноження рослин. Виявлено різні фактори, що регулюють цвітіння рослин.

Деякі нещодавні дослідження показали роль деяких нових кандидатів у регуляції цвітіння рослин. Наприклад, кореляційний аналіз профілів експресії в бібліотеках мікроРНК, деградомі та транскриптомі показав, що пари miR172a-LfAP2, miR156s-LfSPL2, miR159a-LfSPL2 і miR164a-LfNAC виявилися тісно пов'язаними з цвітінням. Роль модулів miR157a-SPL і miR160a-ARF у цвітінні тополі китайського тюльпана нещодавно підтвердила RLM-RACE. Регулювання часу цвітіння було описано у лісовій суниці шляхом miR390-tasiRNA3-ARF4. Кількість квітів важлива для отримання більшого врожаю рослин; архітектура розгалуження та суцвіття *Arabidopsis* регулюється опосередкованими miRNA157D модулями прямого зв'язку ZF-HD. Нещодавно повідомлялося, що деякі мікроРНК мають вирішальне значення для розвитку залозистого трихома. Експеримент показав, що надмірна експресія MIR160 пригнічує утворення залозистого трихома та знижує вироблення артемізиніну в полину, тоді як придушення його експресії мало протилежний ефект, демонструючи, що miR160 негативно регулює розвиток залозистого трихома та біосинтез артемізиніну. Було виявлено, що взаємодія ncRNA під час розвитку пилку в капусті капусти, надмірна експресія bra-miR5718HG у китайській капусті серйозно перешкоджали розвитку пилкових трубок і, зрештою, вплинули на насіннєвий матеріал [29].

МікроРНК для покращення стійкості рослин до абіотичного стресу

Природно, рослини стикаються з кількома абіотичними у польових умовах, що значно впливає на їхній ріст і кінцеву врожайність. Завдяки недавньому прогресу в молекулярній біології рослин мікроРНК стали перспективними гравцями для покращення врожаю в епоху сучасної біотехнології.

Солоний стрес

Засолення ґрунту є одним із основних факторів навколишнього середовища, що загрожує реалізації продовольчої та харчової безпеки в усьому світі. Передбачається, що до 2050 року 50% усіх орних земель у світі постраждають від засолення через зміну клімату. Нерегулярні та непередбачувані опади вимагають зрошення як заміни або додаткової стратегії. Було виявлено, що мікроРНК відіграють важливу роль для розуміння та розвитку культур, які можуть переносити стрес із засоленням. Наприклад, відомо про *miR396*, яка націлена на фактор регулювання росту шляхом позитивної регуляції реакції солі у повзучої трави.

Ще було визначено *miR393* для націлювання на *AsAFB2iAsTIR1* у повзучій траві повзучої в умовах сольового стресу (200 мМ NaCl), що підвищило стійкість до солі за рахунок збільшення поглинання калію та підвищеної стійкості до теплового стресу, пов'язаного з індукованою експресією невеликого білка теплового шоку. Подібна тенденція також спостерігалася в пшоні. *miR156* націлена на *SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like (SPL)* (*MdSPL13*, *MD10G1291800*) у яблуці та модулює толерантність до солі шляхом підвищення регуляції *MdWRKY100*. *miR156* націлена на *SPL*, що призводить до підвищення стійкості до солі в тютюні.

Як показано на рисі та арабідопсисі, одним з важливих механізмів, за допомогою якого рослини вторгаються в сольовий стрес, є виробництво газоподібного фітогормону етилену. У цьому контексті ідентифікували *miR319-PvPCF*, які позитивно регулюють стійкість до солі у шляхом посилення синтезу етилену. При трьох концентраціях солі (100, 200 і 300 мМ

NaCl) виявили, що miR390 націлена на TAS3a/b/c, *tasiARF-1/2/3* (переробляє невеликі інтерферуючі РНК, що впливають на фактори відповіді на ауксин) і ARF2/3/4 у топінамбура із змінною реакцією на сольовий стрес. MiR167 посилює передачу сигналів ауксину шляхом синергічної зміни генів транспортера ауксину AUX1, PIN1 і PIN2 для підвищення стійкості до солі в тютюні, культивованому при концентраціях 12,5 і 25 мМ NaCl. Мімічні лінії miR167 показали більший рівень органогенезу та підвищений вміст хлорофілу та клітинний гомеостаз шляхом зміни антиоксидантної активності ферментів каталази і пероксидази [29].

Стрес від посухи

Через постійні зміни клімату посуха стає одним із основних абіотичних стресів, які обмежують урожайність сільськогосподарських культур у всьому світі. Щоб поглибити розуміння при розгадуванні молекулярного механізму, що лежить в основі посухи, протягом останніх років було проведено багато досліджень для профілювання мікроРНК для виведення посухостійких сортів. Серед них кілька мікроРНК були підтверджені для регулювання стійкості до посухи або вразливості різноманітних культур. Було ідентифіковано miR393 (*Osa-miR393a*) та її мішені AsAFB2 і AsTIR1 за допомогою трансгенного експерименту, який призвів до більш довгих культиваторів із підвищеною стійкістю до стресу від посухи, а також до зменшення щільності проростів і щільнішої кутикули повзучої трави.

Також продемонстровано, що miR156 та його мішені (SPL) регулюють декілька процесів розвитку рослин, наприклад, miR156-SPL підвищують посухостійкість тютюну без зміни архітектури рослини шляхом збільшення довшого кореня та більшої біомаси. Подібним чином відомо, що mdm-miR156 та інші мікроРНК (miR166, mdm-miR172, mdm-miR319 і mdm-miR399) позитивно регулюють MdMYB88 і MdMYB124, щоб модулювати посухостійкість яблука шляхом регуляції експресії MdNCED3, ключового ферменту в АВА біосинтез.

Вчені виявили шість нових мікроРНК (мікроРНКhvu-x9a, мікроРНКhvu-x9b, мікроРНКhvu-x11, мікроРНКhvu-13, мікроРНКhvu-x8 і мікроРНКhvu-x10) в ячмені (*Hordeum vulgare*) в умовах посухи. У саджанцях люцерни було виявлено загалом 90 відомих мікроРНК із 46 сімейств і 177 нових мікроРНК під час стресу, спричиненого посухою через ПЕГ. Серед них mtr-miR5213-5p, mtr-miR1591, mtr-miR398b, mtr-miR396a-5p, mtr-miR167b-5p, mtr-miR2643a, mtr-miR166a, mtr-miR7696a-3p, mtr-miR7696c-3p і mtr-miR396b-5b були ідентифіковані як найбільш збагачені мікроРНК після посухового стресу. Дані показали, що mtr-miR156e і mtr-miR156g-5p і їхній цільовий ген (SBP) і mtr_miR172a з AP2 регулювалися протилежним чином [29].

2.5. Розробка мікроРНК біомаркерів і потенційне терапевтичне застосування в тваринництві

Можливість і практичні аспекти використання мікроРНК як біомаркерів інтенсивно розглядалися при багатьох захворюваннях людини, таких як рак, ревматичні захворювання, цукровий діабет та інфекційні захворювання. У сільськогосподарських тварин виявлення біомаркерів буде мати вирішальне значення для лікування хвороби.

Біомаркер - це вимірюваний показник певного біологічного стану, наприклад, здоров'я або хвороби. Початковими біомаркерами, що використовувалися в лікуванні захворювань людини, були білкові біомаркери, але виявлення нових і вдосконалених білкових біомаркерів виявилось дорогою і трудомісткою справою, головним чином через низьку доступність клінічно значущих білків, їхню складну природу і відсутність точних і повторюваних методів виявлення [30]. Тейлор нещодавно узагальнив загальні кваліфікуючі фактори біомаркера: (1) легкодоступність (тобто, виявлення і вимірювання легко і з використанням мінімальних інвазивних процедур); (2) специфічність для досліджуваного стану (специфічність); (3) висока чутливість (легко і точно виявляється, в ідеалі до появи клінічних симптомів і потенційно змінюється

залежно від стадій захворювання або відповіді на терапію); і (4) можливість перекладу з дослідження/розробки на застосування.

МікроРНК можна використовувати як біомаркери, які можуть служити діагностичними, прогностичними або терапевтичними цілями для лікування захворювань худоби. Розробка біомаркера зазвичай вимагає трьох основних кроків. Перший крок включає (1) відкриття: ідентифікувати потенційні маркери-кандидати для конкретних умов; (2) підтвердження та валідація: перевірити ідентифіковані маркери в інших популяціях або інших зразках; (3) адаптація: розробка відповідних масивів або тестів для ідентифікованих маркерів (рис.2.2 А) [31].

На сьогоднішній день більшість досліджень міРНК при захворюваннях тварин зосереджені на профілюванні змін міРНК (стадія відкриття). Хоча функції деяких міРНК були підтверджені, експерименти проводилися переважно *in vitro* і можуть не відображати реальні складні біологічні регуляторні механізми, що лежать в основі цих процесів. Наскільки нам відомо, комерційних мікроРНК-біомаркерів для лікування захворювань худоби немає.

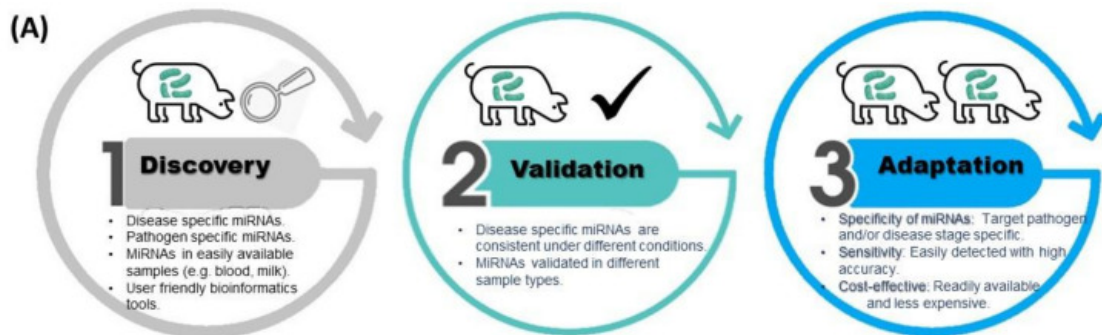


Рис.2.3 (А) - Розробка відповідних масивів або тестів для ідентифікованих маркерів

По-друге, слід враховувати багато факторів, включаючи специфічність, чутливість експресії, валідацію у великій когорті, щоб забезпечити її ефективність, послідовність результатів і вплив як на вартість (рентабельний), так і на час (довгостроковий) . Тому, щоб кваліфікувати як мікроРНК біомаркер, специфічність експресії та узгодженість для конкретного стану

повинні бути встановлені в початковій популяції, а повторюваність в інших популяціях підтверджена. Крім того, довгострокові наслідки витрат повинні бути сприятливими, щоб дозволити прийняти кінцевими користувачами.

По-третє, валідований біомаркер мікроРНК повинен знайти застосування в будь-якому з наступного: діагностиці, прогнозі, терапії та для прогнозування відповіді на терапію. Наприклад, різні групи мікроРНК біомаркерів можна використовувати для лікування хвороби Джона у худоби таким чином: (1) для ранньої діагностики інфекції, (2) для класифікації через різні штами *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, і (3) для прогнозування стадії і (4) як ефективне лікування (терапевтичне).

Потенційне застосування мікроРНК як біомаркерів у покращенні худоби додатково посилюється великою кількістю нещодавніх звітів, які повідомляють про диференціальну реакцію мікроРНК на різні захворювання худоби.

Терапевтичні підходи на основі мікроРНК для лікування хвороб сільськогосподарських тварин можуть полягати в інгібуванні мікроРНК (зменшення експресії мікроРНК, спричинених захворюванням) або заміні мікроРНК (відновлення експресії мікроРНК, пригнічених захворюванням). Успіх терапії мікроРНК значною мірою залежить від відповідних, ефективних і специфічних систем доставки [32]. Деякі високоефективні та специфічні методи доставки мікроРНК були через екзосоми та наночастинки. Терапія мікроРНК для лікування захворювань худоби може бути привабливим варіантом для доповнення або заміни сучасних методів лікування захворювань. Однак розуміння специфічних функцій і механізмів взаємодії між мікроРНК та іншими біомолекулами в патогенезі захворювання є першим кроком у розробці мікроРНК терапії хвороб худоби.

Переваги мікроРНК біомаркерів для лікування захворювань були нещодавно узагальнені і включають (1) використання для раннього виявлення захворювання, що важливо для покращення прогнозу та обмеження поширення патогенних мікроорганізмів; (2) використання для покращення

виявлення патогенів при перших ознаках появи симптомів захворювання; (3) використання для виявлення латентної фази інфекції, яка має вирішальне значення для обмеження розповсюдження патогенів і втрати прибутку через низьку продуктивність, якщо її не виявлено; та (4) використання для виявлення та контролю регіональних відмінностей у патогенності захворювання. Біомаркери мікроРНК також важливі, оскільки їх можна використовувати для розробки ефективних методів лікування захворювань худоби [33].

МікроРНК і хвороба Джона

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis є збудником хвороби Джона великої рогатої худоби, овець, кіз та інших домашніх і диких тварин. Хвороба Джона накладає значний економічний тягар на молочну промисловість і вона поширена в усьому світі. *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* і хвороба Джона привернули увагу через припущення про їх зв'язок із хворобою Крона у людини.

Сучасні стратегії контролю хвороби перешкоджають відсутності точних і надійних діагностичних тестів. Тим часом кілька досліджень вказали на потенціал мікроРНК як діагностичних так і прогностичних інструментів MAP. Наприклад, ідентифікували сім активованих мікроРНК (miR-19b, miR-19b-2, miR-1271, miR-100, miR-301a, miR-32, and one novel miRNA) і два знижених (miR-6517 and miR-7857) мікроРНК у крові MAP-позитивних тварин порівняно з неекспонованими тваринами [34]. Також розробили модель прогнозування з використанням комбінації чотирьох мікроРНК (miR-1976, miR-873-3p, miR-520f-3p і miR-126-3p), яка відрізняла тварин із помірним і важким ступенем інфікування хвороби Джона від здорових тварин. Клубова кишка та клубові лімфатичні вузли є важливими тканинами під час MAP-інфекції, оскільки вони є місцями взаємодії MAP та імунних клітин хазяїна, і де господар ініціює імунну відповідь на патоген [35]. Було продемонстровано корисність ряду мікроРНК у бичачих фекаліях у диференціації здорових

тварин від тварин з пізньою стадією хвороби Джона, тим самим забезпечуючи потенційні біомаркери для інфекції МАР та прогресування захворювання [36].

Потенційна регуляторна роль мікроРНК у захворюваннях свиней

Перший набір мікроРНК свиней, ідентифікованих шляхом пошуку гомології послідовності з відомими мікроРНК людини, належав до кластера miR17-92 і включав miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b і miR-92a. Дослідження функцій мікроРНК були зосереджені на конкретних захворюваннях або патогенах, в основному з використанням експериментів *in vivo* [37].

МікроРНК і інфекція свинячого грипу

Грип є зоонозним вірусним захворюванням, яке становить загрозу для здоров'я та економіку людей і тварин у всьому світі. У ссавців віруси грипу розмножуються переважно в дихальних шляхах, зазвичай супроводжуються клінічними ознаками, у птахів основним місцем реплікації є кишковий тракт без клінічних симптомів. Кілька досліджень з різними підходами досліджували вплив мікроРНК на інфекцію свинячого грипу. Використовуючи обчислювальні процедури, початкові дослідження ідентифікували 36 свинячих мікроРНК з передбачуваними цільовими генами у послідовностях вірусу свинячого грипу, виділених протягом 38 років, що вказує на те, що передбачувані цільові гени та мікроРНК хазяїна (miR-124a, miR-136 і miR-145) взаємодії зберігалися майже протягом всієї еволюції вірусу. На основі профілювання експресії мікроРНК кілька авторів припустили, що мікроРНК регулюють гени, залучені до вродженого імунітету або апоптозу та регуляції клітинного циклу у свиней, інфікованих вірусом грипу. Також дослідили п'ять мікроРНК (miR-15a, miR-18a, miR-21, miR-29b і miR-590-3p), які використовуються, як потенційні модулятори розпізнавання вірусних патогенів і апоптозу в легеневих тканинах свиней на 3-й день після зараження вірусом грипу А вірус H1N2. Ще досліджено, що інфекція вірусу свинячого

грипу H1N1/2009 може модулювати експресію мікроРНК хазяїна (міРНК-204 і мікроРНК-4331), щоб полегшити його реплікацію в хазяїні [37].

Потенційна регуляторна роль мікроРНК у захворюваннях домашньої птиці

Перше дослідження курячих мікроРНК ідентифікувало 25 мікроРНК з курячих ембріонів і тканин дорослої курки (головного мозку, мозочка, серця, легень, печінки, нирок і селезінки) за допомогою клонування та секвенування малих РНК. З тих пір багато досліджень досліджували експресію мікроРНК у зв'язку як з продуктивністю, так і з ознаками захворювання у курчат. Повідомлялося про 882 попередники та 1232 зрілі мікроРНК для курчат [37].

МікроРНК та інфекція вірусу пташиного лейкозу

Вірус лейкозу птахів належить до роду *Alpharetrovirus* сімейства *Retroviridae*. Цей вірус може індукувати пухлини у птахів-господарів, включаючи В-клітинну лімфому, гемангіому та мієлоцитому. Було припущено, що сім регуляторних міРНК (miR-221, miR-222, miR-1456, miR-1704, miR-1777, miR-1790 і miR-2127), ідентифікованих у печінці 10-тижневих курчат, інфікованих вірусом пташиного лейкозу підгрупи J, можуть відігравати пухлиноутворюючу роль, тоді як п'ять регуляторних міРНК (let-7b, let-7i, miR-125b, miR-375 і miR-458) можуть бути пов'язані з втратою пухлинопригнічувальної функції. Надмірна експресія мікроРНК-375 пригнічує гени yes-associated protein 1, цикліну E та гени інгібітора білка 1 апоптозу дрозофіли і, як наслідок, знижує проліферацію клітин DF-1. Крім того, було виявлено, що мікроРНК-221 діє як пухлиногенний агент, націлюючись на модифікуючий фактор В-клітинної лімфоми 2 у пухлинах печінки курей.

2.5.1 Важливі мікроРНК біомаркери при хворобах худоби

Незважаючи на те, що кожне розглянуте захворювання має власні специфічні механізми, спільною рисою була роль асоційованих мікроРНК в імунній відповіді господаря. МікроРНК є важливими гравцями у вроджених імунних і запальних реакціях. Кілька відомих мікроРНК, які відіграють роль у регуляції вродженого імунітету, пов'язані з трьома або більше хворобами худоби, включаючи мікроРНК-146, мікроРНК-223 та мікроРНК-21 тощо [37].

У людей miR-146 відомий як ключовий модулятор імунної відповіді при раку. MiR-146 асоціювався з більшістю проаналізованих захворювань, таких як мастит великої рогатої худоби, туберкульоз, хвороба Джона, свинячий грип, пташиний грип. MiR-223 є важливою мікроРНК при інфекції та запаленні, а також відіграє важливу роль у маститі великої рогатої худоби та свинячому грипі. MiR-21 є мікроРНК, яка відіграє різноманітну роль у захворюваннях людини, а також бере участь у багатьох захворюваннях у різних видів худоби. Наприклад, miR-21 модулює експресію протизапальних цитокінів у відповідь на інфекцію грипу А у свиней та відіграє важливу роль у розвитку та модуляції лімфоцитів у легенях курей. Окрім спільної ролі цих мікроРНК у пов'язаних захворюваннях, деякі мікроРНК є унікальними для однієї хвороби чи збудника. Наприклад, деякі мікроРНК можуть реагувати на інфекції *E. coli*, але не реагувати на мастит, спричинений іншими патогенами. У захворюваннях, пов'язаних з вірусами, також відомо, що мікроРНК важливі для контролю реплікації вірусу, і в цьому випадку вони можуть або порушувати реплікацію вірусу (наприклад, miR-130b), або полегшувати (miR-30c). Для бактеріальних інфекцій мікроРНК можуть сприяти відповіді господаря на інфекцію через широкий спектр шляхів і клітин господаря. МіРНК унікально пов'язані з певним збудником хвороби або стадією патогенезу, є потенційними мішенями для розробки біомаркерів з прогностичною, діагностичною і терапевтичною метою для лікування хвороб тварин [37].

Висновок до розділу 2

Було застосовано літературний аналіз сучасних джерел, що дозволив зібрати та систематизувати актуальні дані про функціонування мікроРНК, механізми взаємодії мікроРНК із мішеневими мРНК та іншими ендогенними РНК, які можуть виступати як природні губки, впливаючи на експресію генів. МікроРНК виявляють високу специфічність до клітинних мішеней, діючи як інгібітори або модифікатори експресії генів, і беруть участь у складних регуляторних мережах клітини.

МікроРНК має діагностичне значення. Вони довели свою ефективність як чутливі та специфічні неінвазивні біомаркери для раннього виявлення ряду захворювань, зокрема онкологічних, серцево-судинних, неврологічних та метаболічних.

Було продемонстрована прогностична цінність мікроРНК. Рівень експресії окремих мікроРНК може корелювати з перебігом захворювання, відповіддю на терапію та ризиком рецидиву, що робить їх корисними для формування індивідуальних планів лікування.

МікроРНК має терапевтичний потенціал. Ці некодуєчі РНК розглядаються як новий клас терапевтичних агентів. Антагоністи та мімікри мікроРНК можуть змінювати патологічну експресію генів, відкриваючи можливості для лікування раку, вірусних інфекцій, фіброзу та нейродегенеративних хвороб.

Основним бар'єром для терапії на основі мікроРНК є ефективна доставка до клітин-мішеней через нестабільність молекул, їхню розщеплюваність РНКазами та труднощі в подоланні клітинних мембран.

Розробляються нові технології доставки. Вже є кілька підходів до доставки мікроРНК: вірус-асоційовані системи, наночастинки, ліпосоми та кон'югати з лігандами — всі вони мають переваги й обмеження, що активно вивчаються у доклінічних та клінічних дослідженнях. Незважаючи на прогрес, широке клінічне застосування мікроРНК потребує

подальших досліджень, зокрема уніфікації методик виявлення, стандартизації терапевтичних підходів та розширення баз клінічних випробувань.

Щодо сільського господарства мікроРНК беруть участь у численних біологічних процесах, включаючи клітинну диференціацію, розвиток органів, фазовий перехід, та регулювання фітогормонів, що дозволяє тонко налаштовувати ріст і продуктивність культур.

Ці молекули активуються або пригнічуються у відповідь на стресові фактори: посуху, холод, сіль, теплові коливання або атаки патогенів. Це робить їх ключовими елементами у селекції стійких сортів. У рису, кукурудзі, пшениці, ячмені та інших культурах виявлено унікальні набори мікроРНК, які регулюють важливі агрономічні характеристики, як-от розмір зерна, розвиток кореневої системи, стійкість до хвороб та врожайність. Застосування технологій трансгенезу та редагування геному дозволяє цілеспрямовано змінювати експресію певних мікроРНК для покращення ознак культури, наприклад — раннє цвітіння, збільшення врожаю, або стійкість до фітопатогенів.

Завдяки секвенуванню нового покоління та аналізу деградоми з'явилась можливість виявляти нові мікроРНК та їх цільові гени, що дозволяє створювати точні моделі регуляції метаболізму та стійкості до стресів. Виявлено мікроРНК, які контролюють як формування кореневої системи, так і процеси цвітіння, плодоутворення та накопичення вторинних метаболітів — від харчової цінності до фармакологічних властивостей.

МікроРНК становлять основу для розробки новітніх агробіотехнологічних стратегій, зокрема для створення культур нового покоління з покращеними властивостями без застосування агресивної хімії.

Таким чином, мікроРНК постають як багатofункціональні молекули з широким спектром дії — від регуляції генетичних процесів до потенційного застосування в діагностиці, прогнозуванні та лікуванні захворювань. Подальші дослідження та вдосконалення методів їх аналізу, доставки й впливу

на мішені є ключем до розкриття повного потенціалу мікроРНК у медичній практиці майбутнього.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Загальна схема застосування мікроРНК

Проаналізувавши наукові джерела щодо загальних властивостей мікроРНК та їх використання в різних галузях медицини, фармації, біотехнології та сільського господарства склали загальну схему застосування мікроРНК.

Схема застосування мікроРНК

I. БІОГЕНЕЗ мікроРНК:



1. *Транскрипція*: РНК-полімераза II → pri-miRNA
2. *Первинна обробка в ядрі*: Drosha-DGCR8 → pre-miRNA
3. *Транспорт у цитоплазму*: Exportin-5
4. *Дозрівання у цитоплазмі*: Dicer → зріла miRNA
5. *Формування активного комплексу*: RISC-комплекс (Argonaute); мішенева дія на мРНК



II. ВИДІЛЕННЯ мікроРНК

1. Вибір біологічного матеріалу:

- Кров (плазма, сироватка)
- Тканини (свіжі, заморожені, формалін-фіксовані)
- Клітинні лінії
- Екзосоми (з рідин або клітин)

2. Методи екстракції:

- Органічна екстракція (TRIzol, фенол-хлороформ)
- Столпчикові набори (column-based kits)
- Магнітні частинки (magnetic beads)

3. Контроль якості та кількості:

- Спектрофотометрія (NanoDrop, Qubit)
- Капілярний електрофорез (Agilent Bioanalyzer / TapeStation)
- qRT-PCR для стабільних референсних miRNA



Профілювання

Мета:

визначити модель експресії (які мікроРНК активні/неактивні).
Виявити диференційно експресовані мікроРНК між здоровими та хворими станами.

Основні методи:

1. кількісна зворотна транскрипція-ПЛР;
2. мікрочипи з зондами до відомих мікроРНК;
3. секвенування нового покоління.

III. ПРОФІЛЮВАННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ мікроРНК

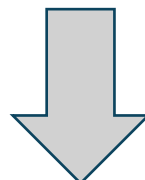
Ідентифікація

Мета:

з'ясувати яку саме мікроРНК ми досліджуємо.
Пов'язати мікроРНК з певними генами-мішенями.

Методи:

1. NGS + біоінформатика (наприклад, використання miRDeep, miRBase).
2. Northern blot, in situ гібридизація — для підтвердження локалізації та експресії.





Висновок до розділу 3

Нами була розроблена загальна схема застосування мікроРНК та складена таблиця застосування мікроРНК у медицині: діагностика та терапія.

ВИСНОВКИ

На сьогоднішній день мікроРНК є ключовим класом некодуючих РНК, що здійснюють посттранскрипційну регуляцію експресії генів та беруть участь у складних внутрішньоклітинних регуляторних мережах. Вивчено процеси біогенезу мікроРНК, методи їх виділення з біологічних зразків, а також перспективи функціонального аналізу.

Проведений оглядовий аналіз продемонстрував величезний потенціал мікроРНК для найрізноманітніших прикладних аспектів.

У медицині мікроРНК демонструють високий потенціал як неінвазивні біомаркери для ранньої діагностики онкологічних, серцево-судинних, метаболічних та неврологічних захворювань. Крім того, окремі мікроРНК можуть слугувати прогностичними маркерами та мішенями для терапії. Було окреслено перспективи створення терапевтичних стратегій на основі мікроРНК, попри наявні бар'єри, пов'язані з доставкою в клітини-мішені.

У біології мікроРНК виступають як універсальні регулятори основних клітинних процесів — проліферації, апоптозу, диференціації та відповіді на стрес, що робить їх цінним інструментом у фундаментальних дослідженнях функціональної геноміки.

У сільському господарстві встановлено, що мікроРНК беруть участь у формуванні стійкості до абіотичних і біотичних факторів, регулюють ріст, розвиток, цвітіння, врожайність та фітогормональний баланс. Виявлення та редагування мікроРНК відкриває шлях до створення трансгенних культур нового покоління з підвищеною адаптивністю та продуктивністю.

Отримані результати підкреслюють багатofункціональність мікроРНК та підтверджують їхню перспективність як у фундаментальних, так і в прикладних біотехнологіях. Подальші дослідження в цій галузі сприятимуть розвитку персоналізованої медицини, агробіотехнологій та молекулярної біології в цілому.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Нобелівську премію з фізіології чи медицини присудили за відкриття мікроРНК та її ролі у регулюванні генів. URL: <https://nauka.ua/news/nobelivsku-premiyu-z-fiziologiyi-chi-medicini-prisudili-za-> (дата звернення: 10.03.2025).
2. Нобелівські мікроРНК у складі екзосом Ехохе: світове відкриття. URL: <https://salo.li/4c50986> (дата звернення: 10.03.2025).
3. Matsuyama H., Suzuki H. I. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 21(1). P. 132. DOI:10.3390/ijms21010132.
4. Kim T., Croce C. M. MicroRNA: trends in clinical trials of cancer diagnosis and therapy strategies. *Exp Mol Med*. 2023. Vol. 55. P. 1314–1321. DOI: 10.1038/s12276-023-01050-9.
5. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation / J. O'Brien et al. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018. Vol. 9. P. 402. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.
6. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA–target interaction database / H. Y. Huang et al. *Nucleic Acids Res*. 2020. Vol. 48. P. D148–D154. DOI: 10.1093/nar/gkz896.
7. MirGeneDB 2.0: the metazoan microRNA complement / B. Fromm et al. *Nucleic Acids Res*. 2020. Vol. 48. P. D132–D141. DOI: 10.1093/nar/gkz885.
8. Alkan A. H., Akgül B. Endogenous miRNA Sponges. *Methods Mol Biol*. 2022. Vol. 2257. P. 91-104. DOI: 10.1007/978-1-0716-1170-8_5.
9. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues / T. Thomou et al. *Nature*. 2017. Vol. 542. P. 450-455. DOI: 10.1038/nature21365.
10. Iacomino G., Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity-related diseases. *Genes Nutr*. 2017. Vol. 12. P. 23. DOI: 10.1186/s12263-017-0577-z.
11. Iacomino G. miRNAs: The Road from Bench to Bedside. *Genes*. 2023. Vol. 14(2). P. 314. DOI: 10.3390/genes14020314.

12. 4.6: МікроРНК (miRNA) генні підписи. URL: <http://surl.li/gsybx1>. (дата звернення: 10.03.2025).
13. Lu T. X., Rothenberg M. E. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2018. Vol. 141(4). P. 1202–1207. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.08.034.
14. Treiber T., Treiber N., Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019. Vol. 20(1). P. 5–20. DOI: 10.1038/s41580-018-0059-1.
15. MicroRNAs: crucial regulators of placental development / H. Hayder et al. *Reproduction*. 2018. Vol. 155(6). P. R259-R271. DOI: 10.1530/REP-17-0603.
16. Post-transcriptional gene silencing mediated by microRNAs is controlled by nucleoplasmic Sfpq / S. Bottini et al. *Nat Commun*. 2017. Vol. 8(1). P. 1189. DOI: 10.1038/s41467-017-01126-x
17. Alternative Polyadenylation Directs Tissue-Specific miRNA Targeting in *Caenorhabditis elegans* Somatic Tissues / S. M. Blazie et al. *Genetics*. 2017. Vol. 206(2). P. 757–74. DOI: 10.1534/genetics.116.196774.
18. Lai X., Wolkenhauer O., Vera J. Understanding microRNA-mediated gene regulatory networks through mathematical modelling. *Nucleic Acids Res*. 2016. Vol. 44. P. 6019–35. DOI: 10.1093/nar/gkw550.
19. Impact of MicroRNA Levels, Target-Site Complementarity, and Cooperativity on Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression / R. Denzler et al. *Mol Cell*. 2016. Vol. 64. P. 565–79. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.09.027.
20. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions / C. H. Chou et al. *Nucleic Acids Res*. 2018. Vol. 46. P. D296–D302. DOI: 10.1093/nar/gkx1067.
21. Ho P. T. B., Clark I. M., Le L. T. T. MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23(13). P. 7167. DOI: 10.3390/ijms23137167.
22. The Progress and Promise of RNA Medicine—An Arsenal of Targeted Treatments / J. M. Sasso et al. *J. Med. Chem*. 2022. Vol. 65(10). P. 6975–7015. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.2c00024.

23. Wang N., Chen M., Wang T. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: From basics to clinical immunization. *J. Control Release*. 2019. Vol. 303. P. 130–150. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.04.025.
24. Clinical Applications of Short Non-Coding RNA-Based Therapies in the Era of Precision Medicine / E. S. Smith et al. *Cancers*. 2022. Vol. 14. P. 1588. DOI: 10.3390/cancers14061588.
25. Desterro J., Bak-Gordon P., Carmo-Fonseca M. Targeting mRNA processing as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2020. Vol. 19(2). P. 112–129. DOI:10.1038/s41573-019-0042-3.
26. Seyhan A. A. Circulating microRNAs as Potential Biomarkers in Pancreatic Cancer-Advances and Challenges. *Int. J. Mol. Sci*. 2023. Vol. 24. P. 13340. DOI:10.3390/ijms241713340.
27. MicroRNA as an Important Target for Anticancer Drug Development. / Z. Fu et al. *Front. Pharmacol*. 2021. Vol. 12. P. 736323. DOI: 10.3389/fphar.2021.736323.
28. Seyhan A. A. Trials and Tribulations of MicroRNA Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25(3). P. 1469. DOI: 10.3390/ijms25031469.
29. Functional Roles of microRNAs in Agronomically Important Plants—Potential as Targets for Crop Improvement and Protection / A. T. Djami-Tchatchou et al. *Front Plant Sci*. 2017. Vol. 8. P. 378. DOI: 10.3389/fpls.2017.00378.
30. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis / C. E. Condrat et al. *Cells*. 2020. Vol. 9. P. 276. DOI: 10.3390/cells9020276.
31. Taylor C. R. Predictive Biomarkers in Oncology. *Introduction to predictive biomarkers: Definitions and characteristics*. Berlin : Springer, 2019. P. 3–18.
32. Fu Y., Chen J., Huang Z. Recent progress in microRNA-based delivery systems for the treatment of human disease. *ExRNA*. 2019. Vol. 1. P. 1–14. DOI: 10.1186/s41544-019-0024-y.
33. Clinical role of miRNA 29a and miRNA 335 on breast cancer management: Their relevance to MMP2 protein level / E. A. Ahmed et al. *Arch*.

Physiol. Biochem. 2020. Vol. 128(4). P. 1058–1065. DOI: 10.1080/13813455.2020.1749085.

34. Detection of microRNA in cattle serum and their potential use to diagnose severity of Johne's disease / S. K. Gupta et al. *J. Dairy Sci.* 2018. Vol. 101. P. 10259–10270. DOI: 10.3168/jds.2018-14785.

35. PSVI-15 Transcriptome analysis of ileal lymph nodes identifies key microRNAs affecting disease progression in Holstein cows with subclinical Johne's disease / M. Wang et al. *J. Anim. Sci.* 2019. Vol. 97. P. 207–208. DOI: 10.1093/jas/skz258.426.

36. Identification of microRNAs in bovine faeces and their potential as biomarkers of Johne's Disease / R. G. Shaughnessy et al. *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10. P. 1–9. DOI: 10.1038/s41598-020-62843-w.

37. miRNA Regulatory Functions in Farm Animal Diseases, and Biomarker Potentials for Effective Therapies / D. N. Do et al. *MDPI Journals*. 2021. Vol. 22(6). P. 3080. DOI: 10.3390/ijms22063080.

ДОДАТОК

Публікації за темою роботи





МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ДИПЛОМ

III СТУПЕНЯ

нагороджується

ОЛЬХОВСЬКА Катерина

у секційному засіданні студентського наукового
товариства кафедри
біотехнології

XXXI Міжнародна науково-практична конференція
молодих вчених та студентів

**«Актуальні питання створення нових
лікарських засобів»**

В.о. ректора
Національного фармацевтичного
університету



Алла КОТВИЦЬКА

23-25 квітня 2025 р.
м. Харків

