

ОБЗОРИ
REVIEWS

МикроРНК – НОВИ БИОМАРКЕРИ ПРИ АВТОИМУННИТЕ РЕВМАТИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Р. Шумналиева, Р. Рашков и Зл. Коларов

Клиника по ревматология, МУ – София

Резюме. Микрорибонуклеиновите киселини (микроРНК) са нов клас некодирани, къси, ендогенни нуклеотидни РНК последователности, с дължина 19-25 нуклеотида. Въпреки че на този етап са открити стотици микроРНК, тяхната функция все още е слабо проучена. Установено е, че регулират експресията на някои гени, които предопределят синтеза на цитокини (напр. тумор-некротизиращ фактор), влияят върху централни сигнални пътища (напр. интерферонов път тип I) и върху различни имунорегулаторни клетки (регулаторни Т-клетки и др.). Тези качества определят микроРНК като ключови молекули при различни физиологични процеси и в патогенезата на някои малигнени, ревматични и други заболявания. Значителната устойчивост и резистентност на микроРНК, възможността да бъдат доказани в различни материали (тъкани, кръв и други телесни течности) и тяхната специфичност при различни заболявания ги прави потенциални биомаркери за поставяне на диагноза, оценка на активността, тежестта и прогнозата на съответната болест.

Ключови думи: микроРНК, биомаркери, тумор-некротизис фактор, интерферонов път тип I, имунорегулаторни клетки

R. Shumnalieva, R. Rashkov and Zl. Kolarov. MicroRNA – NEW BIOMARKERS IN AUTOIMMUNE RHEUMATIC DISEASES

Summary. Microribonucleic acids (miRNA) are a new class, noncoding, short, endogenous RNA sequences with a length of 19-25 nucleotides. Although at this stage hundreds of miRNA are found, their function is still poorly understood. It is found that they regulate the expression of some genes that determine the production of cytokines (eg. tumor necrosis factor-alpha), affect central signal pathways (eg. type I interferon pathway) and different immunoregulatory cells (such as regulatory T-cells and other). These qualities define miRNA as key molecules in various physiological processes and in the pathogenesis of some malignant, rheumatic and other diseases. The significant stability and resistance of miRNA, the opportunity to be proven in different materials (tissues, blood and other body fluids) and their specificity for various diseases make them potential biomarkers for diagnose, assessment of activity, severity and prognosis of a disease.

Key words: miRNA, biomarkers, tumor necrosis factor, type I interferon pathway, immunoregulatory cells

Увод

Реализирането на наследствената информация чрез биосинтез на рибонуклеинови киселини (РНК) и белтъци и процесите транскрипция и транслация се означават като генна експресия. Тя се регулира по различни механизми.

При прокариотите се реализира на транскрипционно ниво. Основна единица за регулация на генната експресия е оперонът. Той съдържа набор от структурни гени и регулаторен участък (промотор), който регулира експресията на тези гени.

При еукариотите гените не са организирани в оперони. При тях всеки ген, кодиращ полипептидна верига, има свой промотор. Регулацията на генната експресия се предопределя от различни фактори и се реализира на различни нива:

На нивото на дезоксирибонуклеиновата киселина (ДНК) чрез промяна в достъпността на ДНК, химична модификация на базите, отпада-

не, умножаване (амплификация) и пренареждане на гени.

На нивото на транскрипцията генната експресия се регулира по време на сплайсинга на РНК, чрез участъци за полиаденилиране, повлияване стабилността на информационната РНК (иРНК) при транспорта на РНК от ядрото към цитоплазмата, посттранскрипционно редактиране на иРНК и други механизми.

На нивото на транслацията функционират допълнителни регулаторни механизми в цитоплазмата. Известна е и посттранслационна регулация чрез контролиране на протеолитичното разграждане на белтъците. Даден ген може да бъде регулиран едновременно на няколко нива.

Цел

Целта на обзора е да се очертае клиничнолабораторната характеристика на микрорибонуклеиновите киселини (микроРНК) и тяхната роля

в патогенезата на някои ревматични заболявания.

Микрорибонуклеиновите киселини са нов клас некодиращи, къси (19–25 нуклеотида) РНК, които регулират генната експресия и синтеза на ключови за развитието на организмите протеини. До този момент са открити голям брой микроРНК при различни видове животни, растения, вируси и над 900 микроРНК в човешкия геном, които контролират над една трета от протеин-кодиращите гени. Доказано е, че микроРНК регулират генната експресия на посттранслационно ниво, като повлияват експресията на таргетната мРНК (матрична, информационна РНК), потискайки транслацията ѝ, или директно, чрез прекъсване на мРНК последователности. Най-често микроРНК действат върху няколко транскрипта, а не върху един ген. Изследвания през последното десетилетие установяват, че микроРНК играят важна роля в редица физиологични процеси, като клетъчното развитие, пролиферацията, диференциацията, метаболизма и апоптозата. Дисрегулацията на синтеза им чрез мутации, делеции и промени в нивото на експресия на някои микроРНК гени причинява тежки нарушения в развитието и регулацията на имунната система. Това дава основание да се търси връзката между микроРНК и патогенезата на автоимунните заболявания. Над 50% от микроРНК гените са локализирани в тумор-асоциирани области от генома и играят роля на онкогени или промотори на туморното развитие. Свърхекспресията им при определени злокачествени заболявания вероятно се проявява като пусков механизъм за канцерогенеза, резултат от потискане на тумор-супресорните гени и/или гените, контролиращи клетъчната диференциация или апоптоза. По време на стадите на диференциация различните тъкани и туморни клетки имат специфичен профил на микроРНК експресия. Това прави микроРНК експресията подходящ маркер за диагноза и прогноза при някои неоплазми при човека. Предполага се, че дисрегулацията на определени микроРНК има отношение към патогенезата на някои ревматични автоимунни заболявания, като ревматоиден артрит (РА), системен лупус еритематозус (СЛЕ) и синдром на Sjögren [1, 15, 16, 19, 47, 49].

История

Двойноверижна РНК е описана през 1960 г. при изучаване на вирусни инфекции. Дотогава се е смятало, че генетичната информация се съхранява за дълъг период от време в двойно-

рижната ДНК, а за къс период – в едноверижната РНК, а двойноверижната РНК играе роля само при репликацията на вируси [2, 16].

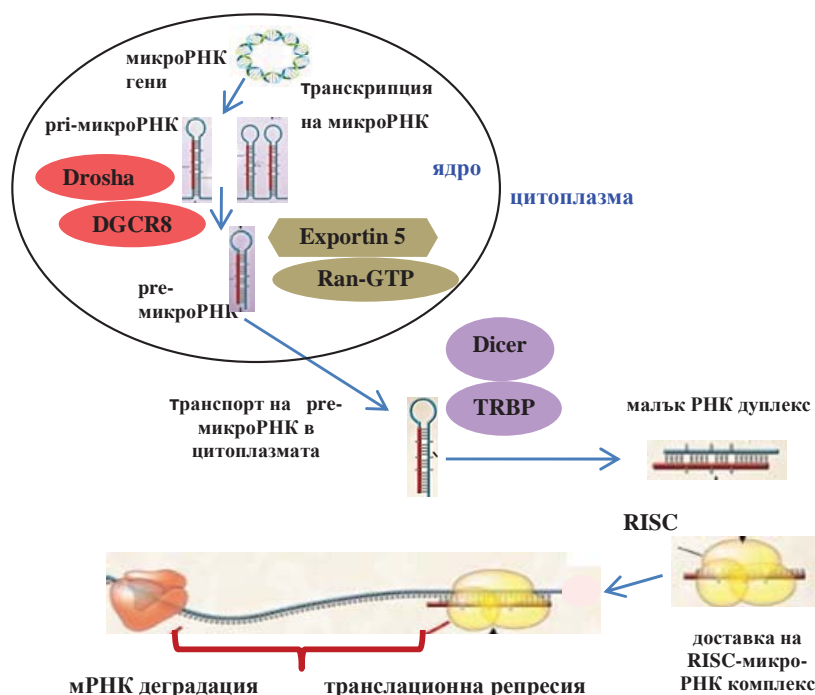
Доказателството, че двойноверижни РНК регулират основни биологични процеси, идва три десетилетия по-късно през 1993 г., когато R. Lee и сътр. описват първата микроРНК при опитите им с лабораторния кръгъл червей *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). *C. elegans* преминава през 4 различни ларвни стадия на развитие, които се контролират от няколко генни каскади. *Lin-4* и *lin-14* са хетерохронични гени, необходими за нормалния контрол на процесите на постембрионалното развитие на *C. elegans*. Мутациите им предопределят продължителността на биологичните процеси, като преждевременно или забавено развитие. Доказано е, че *lin-4* потиска *lin-14* чрез контролираните от него некодиращи, къси РНК. Тези РНК съответстват на повтори в т.нар. 3'-нетранслиран регион – three prime untranslated region (3'UTR) на *lin-14* мРНК. Предполага се, че тези малки *lin-4* РНК регулират транслацията на *lin-14* чрез РНК-РНК взаимодействие. Комплементарните последователности в региона 3' UTR на *lin-14* са отговорни за потискащата функция на *lin-4*. Потискането на *lin-14* намалява синтеза на *lin-14* протеин. Това доказва ролята на късите (микро) *lin-4* РНК в потискането на транслацията, като част от регулаторния път, отговорен за преминаването на *C. elegans* от един в друг стадий на развитие [2, 15, 16].

През 2000 г. е описана втора малка РНК, *let-7*, която също влияе върху процеса на развитие на червея чрез потискане експресията на *lin-41*, *lin-14*, *lin-28*, *lin-42*, и *daf-12*. Дотогава се е приемало, че новооткритите РНК се срещат само в организми като *C. elegans*.

По-късно малки РНК са описани не само при червеи, но и при метазои, мишки и човешки клетки. През 2001 г. са наречени микроРНК. Според някои биоинформационни програми броят на изолираните микроРНК в човешкия геном надхвърля 1000 [15, 16, 35].

МИКРОРНК – БИОСИНТЕЗ, УЗРЯВАНЕ И МЕТОДИ ЗА ДОКАЗВАНЕ

Синтезът на микроРНК преминава през етап на първоначално преписване на генетичната информация чрез РНК полимераза II в първичен РНК (pri-микроРНК) транскрипт (фиг. 1). Узряването на микроРНК при животните се осъществява в два последващи процеса с участието на два ензима – рибонуклеази III (RNase III) – Drosha и Dicer.



Фиг. 1. Синтез на микроРНК

Съвместно с кофакторен протеин DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region 8) Drosha превръща ядрената pri-микроРНК в молекула, дълга около 70 нуклеотида – pre-микроРНК. Тя се изнася от ядрото в цитоплазмата чрез Exportin5/RanGTP, който разпознава специфично структурата ѝ.

Под въздействие на Dicer и кофакторен TRBP протеин (Trans-activator RNA Binding Protein) pre-микроРНК се превръща в цитоплазмата в 21 нуклеотиден микроРНК дуплекс, едната верига на който участва в образуване на РНК-индуциран потискащ комплекс (RISC – RNA-Induced Silencing Complex). След включването си в RISC микроРНК се свързва с таргетната мРНК в участъка 3'UTR. Съответствието между микроРНК и мРНК е ключов фактор на описания регулаторен механизъм. Резултатът от взаимодействието между микроРНК и мРНК е прекъсване или потискане на транслацията на мРНК. Реализира се чрез няколко механизма: разпадане на котранслационни протеини, потискане на удължаването на веригата, преждевременно прекъсване на транслацията и потискане инициацията на транслацията [31, 42].

Описан и е алтернативен, Drosha-независим път на съзряване на микроРНК. Той е с относително по-малко значение за синтеза на микроРНК при животни [12, 21].

За разлика от мРНК методите за детекция на микроРНК се основават на откриване на къси (около 22) нуклеотидни последователности и способност за диференциране на различните микроРНК по един единствен нуклеотид. Стандарт за доказване на експресията на микроРНК е използването на технологията Northern Blot. Основният недостатък на този метод, използващ традиционни ДНК олигонуклеотидни проби, е ниската сензитивност и дългото време за изпълнение. За повишаване на чувствителността му са разработени няколко модификации на метода.

Другите методи за детекция на микроРНК включват използването на олигонуклеотидни микрочипове, технологии на основата на луминесценция, електрохимични методи, in situ хибридизация на парафинови блокчета, фиксирани във формалин, количествена полимеразно-верижна реакция в реално време (PCR – polymerase chain reaction), ДНК микрочипове и др. Общият брой експресирани микроРНК се открива чрез микроРНК микрочипове, а за откриването на определена микроРНК се препоръчва използването на количествена PCR [5, 28, 36, 37, 43].

БИОЛОГИЧНА ФУНКЦИЯ НА МИКРОРНК

Гените на микроРНК са 1-2% от генома на еукариотите. Една микроРНК се свързва с около

200 таргетни гена с различна функция, следователно микроРНК контролира потенциално експресията на около 1/3 от човешките мРНК [17]. Като генетични дисрегулатори микроРНК участват в тъканната морфогенеза и в различни клетъчни процеси – клетъчен растеж, диференциация, пролиферация и апоптоза, и във функционирането на основните сигнални пътища. Съществуват доказателства и за участието им във *физиологични процеси* като узряването на ембрионалните стволови клетки, хематопоеза, неврогенеза, развитието на сърдечния и скелетните мускули, развитието на панкреаса, кожата морфогенеза, развитието, хомеостазата и функцията на вродения и придобития имунитет.

МикроРНК се свързват и с патогенезата на *различни заболявания*. Голям брой от злокачествените болести са асоциирани с нарушена експресия на микроРНК. Немалигнени болести, свързвани с дисрегулация на микроРНК, са болестта на Alzheimer, някои невропсихични заболявания и вирусни инфекции (хепатит, СПИН), първична билиарна цироза, ревматични болести (РА, СЛЕ, синдром на Sjögren) [2, 11, 12, 13, 49].

МИКРОРНК ВЪВ ФИЗИОЛОГИЧНИ ПРОЦЕСИ

Повлиявайки генната експресия, микроРНК регулират редица физиологични процеси, като развитието на имунната система, имунния отговор и толеранса към собствените антигени, аутоимунните реакции и други. Доказана е ролята им на ключови регулатори на имунните реакции и клетъчното развитие. Те участват в гранулопоезата, Т- и В-клетъчното развитие и съзряването, вродения и адаптивния имунен отговор. Идентифицирането на таргетните им гени показва, че микроРНК регулират антигенното представяне, toll-like рецепторната сигнална каскада и цитокиновата продукция, превключването на имуноглобулиновия синтез в В-клетките и предаването на сигнала през Т-клетъчния рецептор [18, 22, 39, 50].

МИКРОРНК И ВРОДЕН ИМУНЕН ОТГОВОР

Вроденият имунен отговор защитава организма от чужди патогени. Задвижва се от микробни продукти, които се разпознават от рецептори, означени като toll-like рецептори. Най-добре изучен е toll-like рецептор-4. Той е отговорен за разпознаването на липополизахариди от Gram-негативни бактерии. В В-клетките и макрофагите сигналите от липополизахаридно-задвижения toll-like рецептор-4 активират *NF-κB*

(нуклеарен транскрипторен фактор–каппа В) и трите класа *MAP* кинази (*ERK*, *p38 MAPK* и *JNK*). Тези пътища повлияват различни функционални гени, кодиращи протеини, като цитокините *IFN-β*, *IFN-γ* и *TNF-α*. За *NF-κB* е доказано, че е ключов регулатор на възпалителната реакция, тъй като регулира експресията на инфламаторни цитокини (*TNF* и *IL-1*) и секрецията на *IL-2*, *IL-12* и *IFN* от Th1 клетките, които активират макрофагите. В отговор на стимулирането на toll-like рецептора клетката синтезира проинфламаторни цитокини за елиминиране на патогена [22].

През периода на вродения имунен отговор се наблюдава повишена експресия на определени микроРНК. Ендотоксин-липополизахариди, които действат чрез toll-like рецептор-4, повишават експресията на микроРНК-146, микроРНК-132, микроРНК-155 в човешките моноцити. Експресията на микроРНК-146 се повишава и при третиране на моноцитите с други бактериални антигени, като пептидогликани и флагелин, като експресията на микроРНК-146 се индуцира само от сигнали към повърхностните (*TLR2*, *TLR4*, *TLR5*), а не от сигнали през вътреклетъчните toll-like рецептори (*TLR3*, *TLR7*, *TLR9*). Това дава основание да се предположи, че микроРНК-146 играе роля в регулацията на вродения имунен отговор към бактериални, но не и към вирусни патогени. Въпреки тези първоначални данни, при опити с миши макрофаги е установено, че експресията на микроРНК-146 се индуцира и от вирусни антигени [22, 27, 39].

Индукцията на микроРНК-146 се реализира чрез *NF-κB*-зависим път. Открити са два таргетни гена за микроРНК-146: *IRAK1* (*IL-1* рецептор-асоциирана киназа 1) и *TRAF6* (*TNF* рецептор-асоцииран фактор 6), които са ключови компоненти на toll-like рецептор-4 сигналния път. По този начин бактериалните компоненти индуцират *NF-κB*, който повишава микроРНК-146 и понижава *IRAK1* и *TRAF6* и блокира възпалителната реакция [39].

Повишената експресия на микроРНК-146 в човешки алвеоларни епителни клетки потиска освобождаването на проинфламаторни цитокини, като *IL-8* и *RANTES*. Тези данни показват, че микроРНК-146 потиска възпалителната реакция към бактериални антигени [33].

Чрез повлияване на *TRAF6*, *IRAK1* и *IRAK2* микроРНК-146 регулира негативно и *RIG-I* (ретиноева киселина-индуцируем ген 1) сигналния път, който е отговорен за вродения имунен отговор при вирусни инфекции. В резултат на това се нарушава *RIG-I* сигналното предаване и се потиска *RIG-I* зависимата тип I интерферонова продукция [8, 27].

Epstein-Barr вирусен латентен мембранен протеин LMP-1 индуцира микроРНК-146. При инфекция със същия вирус се наблюдава повишена експресия и на други микроРНК (микроРНК-155, микроРНК-21) [8, 48].

МикроРНК-155 изпълнява съществена роля при осъществяването на вродения и адаптивния имунен отговор. Експресията ѝ се индуцира от стимулацията с вирусни или бактериални липополизахаридни лиганди и от проинфламаторни цитокини (IFN- β , IFN- γ , TNF). Установени са някои таргетни места на микроРНК-155. По-важни са: транскрипторни фактори, въввлечени в хемопоезата и кръвните малигнени заболявания (напр. Bach-1-транскрипторен регулаторен протеин BACH-1 и транскрипторен фактор PU.1); кинази, като I κ B киназа (IKK), рецептор-взаимодействаща серин-треонин протеин киназа 1 (Ripk1); проапоптозни протеини, като Fas-асоцииран домейн (FADD) и туморен протеин р53 [8, 27, 28].

Чрез директно повлияване на TAB2 протеин в TLR/IL-1 сигналната каскада микроРНК-155 модулира IL-1 сигналния път в човешките дендритни клетки. Тази микроРНК осъществява негативна обратна връзка при контрола на IL-1 β и други проинфламаторни цитокини, синтезирани след активиране на дендритните клетки от липополизахариди. За някои клетки е установено, че микроРНК-155 регулира синтеза на TNF- α на транскрипторно и посттранскрипторно ниво, като повишава стабилността на транскрипта и улеснява транслацията. С това се обясняват високите нива на TNF- α при повишена експресия на микроРНК-155 [8].

МИКРОРНК И ХЕМОПОЕЗА

Чрез повлияване на специфични мРНК микроРНК блокират диференциацията на хемопоетичните клетки на различни етапи от тяхното развитие и клетките остават недиференцирани.

Основните регулатори на хемопоезата, с експресия предимно в костния мозък, слезката и тимуса, са микроРНК-181, -223, -142. Профилът на експресия на различните микроРНК по време на В-клетъчното развитие и антиген-специфичната Т-клетъчна диференциация се променя динамично между нативни, ефекторни и паметови клетъчни подкласове. Различията в експресията на микроРНК са специфични за определен стадий на клетъчно развитие [7, 18, 42].

В тимуса протичат процеси на позитивна и негативна селекция на тимоцити. Оцеляват клетките, експресиращи антигенни рецептори за чужди, но не и за собствени антигени. Тимусната селекция зависи от силата на сигнала, протичащ през комплекса Т-клетъчен рецептор (ТКР) – лиганд. Една от първите описани микроРНК, свързани с процеса на диференциация на тимоцитите, е микроРНК-181. Експресията ѝ е висока в тимуса и ниска в сърцето, лимфните възли и костния мозък. При клетъчната диференциация нивата на микроРНК-181 се променят динамично, модулирайки Т-клетъчното развитие. Това става чрез посттранслационното модулиране на сензитивността и специфичността на Т-клетъчния рецептор, посредством различни таргетни гени, кодиращи главно фосфатази, като SHP2, RPTN22, DUSP5, DUSP6. Изброените фосфатази действат като регулатори на Т-клетъчната активация в отговор на антигени чрез негативно повлияване на сигналните каскадни пътища, задвижени от свързването на различни растежни фактори с тирозин-киназни рецептори. Повишените нива на микроРНК-181 усилват сигнала през ТКР и повишават Т-клетъчната сензитивност към антигени, и обратно: ниската експресия понижава Т-клетъчната сензитивност към антигени. Тези данни показват, че микроРНК-181 играе ключова роля за тимусната селекция, развитието, толеранса и имунните отговори на Т-клетките в периферията [7, 18].

В костния мозък микроРНК-181 е експресирана в по-висока степен в B220+ клетки, отколкото в CD3+ Т-клетки. Доказателствата, че микроРНК-181 участва в процеса на В-клетъчно диференциране в костния мозък, се базират на данните, че експресията ѝ намалява по време на преминаване от про-В- в пре-В-клетъчен стадий и отново се повишава при преминаване от пре-В-клетъчен стадий в стадий на зрели В-клетки [12, 50].

МикроРНК-181 играе роля и в регулиране на лимфоцитното развитие. Ектопичната експресия на микроРНК-181 в хемопоетични стволови клетки и прогениторни клетки повишава CD19+ В-клетки и намалява CD8+ Т-клетки, т.е. микроРНК-181 е позитивен регулатор на В-клетъчното развитие. МикроРНК-181 регулира и процеса на превключване синтеза на различни имуноглобулинови класове от В-клетките [20].

МикроРНК-223 се експресира изключително в костния мозък. Тази микроРНК повлиява два

протеина, които са ключови регулатори на миелопоезата: NF1-A (ядрен фактор I/A) и Mef2c. Изследванията *in vitro* показват, че микроРНК-223 модулира гранулоцитната диференциация. Липсата ѝ повишава синтеза, диференциацията и активацията на гранулоцитните прогенитори с резултат – тъканно-възпалителна реакция и увреда. Някои микроРНК, като микроРНК-223 и микроРНК-146, са свръхекспресирани в Т-клетъчните регулатори, но не и в активираните Т-клетки. Това показва, че Т-регулаторите имат уникален микроРНК фенотип. Също така микроРНК-146 е негативен регулатор на ТКР-NFκB сигналния път в отговор на бактериални антигени [7, 34].

МикроРНК-150 играе роля на негативен регулатор на В-клетъчната диференциация. Експресира се главно в слезката и лимфните възли. Действа на таргетния протеин С-Myb, който е експресиран в лимфоцитните прогенитори и липсва в зрелите, почиващи В-клетки. Експресията ѝ се модулира чрез стимулация на В-клетките с IgM-специфични антитела и липополизахариди. МикроРНК-150 е свръхекспресирана в зрелите, неактивни Т- и В-клетки. Това показва, че участва в процеса на лимфопоезата. Ектопичната ѝ експресия в хемопоетичните стволови клетки прогенитори спира В-клетъчната диференциация на етап про-В-клетъчен/пре-В-клетъчен стадий и повишава в лека степен Т-клетъчната лимфопоеза и миелопоеза от хемопоетичните стволови и прогениторни клетки [50].

МикроРНК-155 е мултифункционален регулатор. Тя е свръхекспресирана в Т-клетъчните регулатори. Повишава чувствителността на Т-клетките към основния им растежен фактор (IL-2) и участва в хомеостазата им чрез повлияване на SOCS1-негативен регулатор на IL-2R сигналния път. За разлика от микроРНК-181, която повлиява позитивно В-клетъчната диференциация, микроРНК-155 контролира други важни аспекти от В-клетъчната биология, като развитието на герминативен център, изотипното превключване за синтез, на високоспецифични IgG1 антитела в плазмени клетки и синтеза на В-клетки на имунната памет. МикроРНК-155 регулира и Т-клетъчния хелперен отговор [39, 50].

Роля в автоимунитета

Участието на микроРНК в началния и адаптивния имунен отговор, Т- и В-клетъчната функ-

ция и хемопоезата предполага участие на различни микроРНК в патогенезата на злокачествените и автоимунните заболявания.

Роля на микроРНК като биомаркер при ревматичните заболявания

Биомаркерите са биологични показатели за оценка на нормалните и патологичните процеси, за необходимостта от специфично лечение и отговора от приложената терапия. Необходимо условие даден показател да се използва като биомаркер е да има висока специфичност и сензитивност. Като биомаркери се използват лабораторни (генетични, протеомни, метаболитни, хистологични, цитоморфологични) и клинични показатели.

Биомаркерите имат прогностична или предиктивна стойност. Първите оценяват риска и биологичната прогресия, а вторите – избора и ефекта от лечението [4].

В ревматологичната практика широко се използват различни биомаркери за диагноза, прогноза, избор и ефект от лечението. Така например генетичните маркери се използват за оценка на риска за развитие на дадена болест. Наблюдава се корелация между носителство на HLA B27 и анкилозиращия спондилит (K. de Vlam и сътр., 2010) [44]; генетичен полиморфизъм на PTNP22 ген и РА (G. Orozco и сътр., 2005) [30]. С диагностична стойност са различни автоантитела, специфични за дадена болест – напр. автоантитела срещу двойноверижна ДНК при СЛЕ, антитела срещу циклични цитрулинирани пептиди при РА – аССР (S. Vas и сътр., 2003). Като високосензитивни, но неспецифични лабораторни показатели за оценка на възпалителната или имунологичната активност широко се използват маркери като скорост на утаяване на еритроцитите, С-реактивен протеин, нива на комплемента и др. [6].

Предимствата на микроРНК като биомаркери са: стабилност и относителна резистентност на нуклеазите; тъканна специфичност; участие в патогенетичните механизми на болестите; широка достъпност на методите за изследване. Поради малките си размери могат да се изолират и измерят в различни биологични материали, като кръвни клетки, плазмени микровезикули, биологични течности, замразени или фиксирани във формалин парафинови тъканни срезове. Ограничен брой микроРНК могат да се из-

ползват като биомаркери, тъй като една микроРНК контролира транслацията на множество гени. Освен това профилът на експресия на микроРНК се установява със специални чипове за микроРНК, а специфичните микроРНК се откриват чрез PCR в реално време или хибридизация *in situ* [14, 46].

РОЛЯ НА МИКРОРНК ПРИ РАЗЛИЧНИТЕ РЕВМАТИЧНИ БОЛЕСТИ

Ревматоиден артрит

РА е хронично, автоимунно, възпалително заболяване с неизяснена етиология. Предполага се етиопатогенетичното участие на някои инфекции. Централна роля в патогенезата на РА заемат фибробласто-подобните синовиоцити. При активирането си те отделят проинфламаторни медиатори, като цитокините IL-6, TNF- α , IL-1 β , които участват във възникването и поддържането на възпалителната реакция; ангиогенни фактори, отговорни за синовиалната неоваскуларизация, и фактори, стимулиращи хрущялната и костната резорбция, като RANK лиганд, който индуцира диференциацията и активацията на остеокластите. Блокирането на проинфламаторните цитокини овладява активността на болестта [24].

T. Nakasa и сътр. (2008 г.) и J. Li и сътр. (2010 г.) установяват дисрегулация в експресията на различни микроРНК при болни от РА [19, 26].

МикроРНК-124a е с ниски нива в синовиални фибробласти на болни от РА. Свъръхекспресията ѝ при РА потиска *in vitro* пролиферацията на фибробласто-подобните синовиоцити и задържа клетъчния им цикъл във фаза G1 [19, 26].

Изследвания с хибридизация *in situ* откриват микроРНК-146, -155 и -203, свъръхекспресирани в синовиалната тъкан при болни от РА.

МикроРНК-146 се открива в клетки от повърхностните и дълбоките слоеве на *синовиалната мембрана*, като синовиални фибробласти, макрофаги, Т- и В-клетки. Нивата ѝ са по-високи в синовиални фибробласти на болни от РА, сравнени с болни от остеоартроза. Експресията ѝ се индуцира от проинфламаторните цитокини TNF и IL-1 β и е в позитивна връзка с нивата на TNF в синовиалната течност и периферната кръв. Чрез хибридизацията *in situ* се установява най-висока експресия в CD68+ макрофаги, CD3+ Т-клетки и CD79a+ В-клетки [19, 26].

Свъръхекспресията на *микроРНК-155* в синовиалната тъкан при РА е свързана с намалена

конституционална експресия на матриксни металопротеинази 1 и 3 (ММП-1 и -3) и с блокиране индукцията на ММП-1 и -3 от цитокини и TLR-рецепторни лиганди. Това вероятно е свързано с протективната роля на микроРНК-155 в патогенезата на болестта чрез негативно повлияване на протеолитични ензими и с последващо намаляване и на тъканната увреда.

Изследванията на мононуклеарни клетки от *периферна кръв* при болни от РА установяват повишени нива на експресия на микроРНК-132, -146, -155 и -16, като нивата микро-146 и -16 са по-високи при болните с активна, в сравнение с неактивна болест. Тези данни дават основание да се предположи, че нивата на микроРНК-146 и -16 предопределят активността на болестта, определена чрез DAS28. Намерена е и повишена експресия на микроРНК-146 в периферни мононуклеарни клетки при болни от РА, както и в синовиална тъкан с хиперплазия и висока експресия на IL-17 при болни с висока активност на болестта [25, 29, 32].

Експресията на микроРНК-155 е по-висока в плазмата и в периферните мононуклеарни клетки на болни от РА, в сравнение със здрави контроли. Мононуклеарните клетки от синовиална течност при болни от РА са с по-висока експресия на микроРНК-155 в сравнение с моноцитите от периферната кръв [38].

Тези данни дават основание да се дискутира възможността измерването на експресията на микроРНК в клетки от периферна кръв при болните от РА да се използва като биомаркер за определяне на активността на болестта и на отговора към провежданото лечение.

Системен лупус еритематозус

СЛЕ е системно, автоимунно, възпалително заболяване с различни клинични прояви, вариращи от кожни обриви до животозастрашаващи органични увреди. Подробно е проучена патогенетичната роля на промените на хуморалния имунитет – наличието в серума на специфични и неспецифични автоантитела към собствени антигени.

Малък е броят на проучванията върху експресията на микроРНК при болни от СЛЕ. През 2007 г. Y. Dai и сътр. изследват профила на експресията на микроРНК в мононуклеарни клетки от периферна кръв на 23 лупусно болни, 10 болни от идиопатична тромбоцитопенична пурпура и 10 здрави контроли. 16 микроРНК (от тествани 331 микроРНК) са с различна регулация при лупусно болните, от които 7 miRNA

(miR-196a, miR-17-5p, miR-409-3p, miR-141, miR-383, miR-112, и miR-184) са с ниска експресия и 9 miRNA (miR-189, miR-61, miR-78, miR-21, miR-142-3p, miR-342, miR-299-3p, miR-198, и miR-298) с повишена експресия спрямо здравите контроли. При сравнение на болните с различна активност 8 микроРНК са с понижена експресия в групата с по-висока болестна активност и нито една микроРНК не е с повишена експресия в групата с активен СЛЕ [10].

През 2009 г. същите автори съобщават за различна експресия на микроРНК при болни с лупусен нефрит. Чрез количествена PCR в реално време те изследват профила на експресията на микроРНК при болни с лупусен нефрит клас II по СЗО спрямо здрави контроли. Те намират 66 микроРНК с различна експресия (36 свръхекспресирани и 30 с понижена експресия) в групата с лупусен нефрит. Тези данни насочват към ролята на микроРНК като патогенетични фактори за развитието на болестта и използването им като диагностични маркери [9].

J. Те и сътр. (2010) изследват експресията на микроРНК в мононуклеарни клетки от периферна кръв и Epstein-Barr-трансформирани клетъчни линии от болни с лупусен нефрит и здрави контроли чрез микрочипове и PCR. От откритите микроРНК 18 са с различна експресия в двете групи. Пет микроРНК са с различна експресия при болните със СЛЕ (hsa-miR-371-5P, hsa-miR-423-5P, hsa-miR-638, hsa-miR-1224-3P и hsa-miR-663). При двете групи с лупусен нефрит авторите установяват 29 и 50 различно експресирани микроРНК, съответно при болните от африкански и европейски произход. В това проучване за първи път hsa-miR-371-5P, hsa-miR-1224-3P и hsa-miR-423-5P се свързват с лупусен нефрит [41].

При изследване на профила на експресия на микроРНК, изолирани от мононуклеарни клетки от периферна кръв на 52 болни с активен и неактивен СЛЕ и 29 здрави контроли, J. Tang и сътр. съобщават за понижено ниво на *микроРНК-146* при болните от СЛЕ. МикроРНК-146 корелира негативно с болестната активност, оценена чрез SLEDAI, и интерферновите нива при болните от СЛЕ. Свръхекспресията на микроРНК-146 потиска индукцията на IFN тип I в мононуклеарните клетки чрез директно повлияване на сигналния му път. Този процес се реализира на молекулно ниво чрез повлияване на IFN регулаторен фактор 5 и STAT-1, както и медиаторите на IFN сигналния път – IRAK1 и TRAF6. Тези данни дават основание да се обсъжда липсата на микроРНК-146 като фактор

за абнормалната активация на IFN тип I при СЛЕ [40].

През 2010 г. G. Wang и сътр. изследват нивата на микроРНК-146 и -155 в серума и урината на 40 пациенти със СЛЕ и 30 здрави контроли и установяват, че нивата им са по-ниски в серума, а нивото на микроРНК-146 в урината е по-високо при болните в сравнение със здравите. Съществува корелация между нивата на микроРНК и гломерулната филтрация. Серумните нива на микроРНК-146 корелират негативно с протеинурията и SLEDAI, а серумните нива на микроРНК-146 и -155 – с броя на еритроцитите, тромбоцитите и лимфоцитите. Тези данни показват патогенетичната роля на микроРНК-146 и -155 при СЛЕ и възможността за използването им като биомаркери за оценка на болестната активност и отговора към приложено-то лечение [45].

Синдром на Sjögren

Синдромът на Sjögren е системна, първична или вторична, автоимунна екзокринопатия с неизвестна етиология. Подозира се участието на сиалотропни вируси като отключващ заболяването фактор. Предполага се поликлонална В-клетъчна активация с образуване на специфични и/или неспецифични автоантитела, атакуващи различни компоненти на жлезите. Патоморфологично се характеризира с хроничен паренхиматозен сиаладенит, който може да доведе до атрофия и/или малигнена дегенерация на жлезите.

През 2010 г. I. Alevizos и G. Illei проучват биопсичен материал от малки слюнчени жлези на болни със синдром на Sjögren с ниска и висока фокална активност и здрави контроли и установяват, че експресията на микроРНК може да диференцира болните от здравите, а в групата на болните – тези с ниска от тези с висока възпалителна активност. Авторите изследват наличието на микроРНК в *ексосоми* от слюнката от паротидните и субмандибуларните жлези на болни от синдром на Sjögren. Эксосомите са малки везикули, които се секретират от различни хемопоеични, епителни и други клетки. Съдържат специфични повърхностни и вътрешни протеини, в които се откриват мРНК и микроРНК. МикроРНК в ексосомите от паротидните жлези на болни със Sjögren се различават от тези на здравите контроли. Резултатите демонстрират възможността за получаване на патогенетична информация от този таргетен за болестта орган чрез изследване на микроРНК по неинвазивен метод [3, 23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. МикроРНК участват в основни физиологични процеси и изпълняват водеща роля в модулирането на имунния отговор.

2. При голям брой патологични процеси се установява дисрегулация на експресията на микроРНК.

3. МикроРНК са устойчиви и резистентни на въздействието на нуклеазите. Това дава възможност да бъдат доказани в различни материали (тъкани, кръв, урина и други телесни течности).

4. Различни малигнени и ревматични заболявания имат специфичен профил на експресия на микроРНК. Това дава възможност микроРНК да се използват като биомаркери за диагнозата, активността, тежестта и прогнозата на съответната болест.

Бъдещи проучвания върху механизма на действие на микроРНК, идентифицирането на техните таргетни молекули и разкриването на връзката им с други медиаторни полипептидни агенти е основа на създаване на генна терапия при автоимунните болести, базирана на повлияване на експресията на микроРНК.

Библиография

- Abbott, A. L. et al. The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. – *Dev. Cell.*, **9**, 2005, № 3, 403-414.
- Alevisosa, I. et G. G. Illei. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic disease. – *Nat. Rev. Rheum.*, **6**, 2010, № 7, 391-398.
- Alevisosa, I. et G. G. Illei. MicroRNAs in Sjögren's syndrome as a prototypic autoimmune disease. – *Autoimmun. Rev.* **9**, 2010, № 9, 618-621.
- Atkinson, A. J. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. – *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69**, 2001, № 3, 89-95.
- Barad, O. et al. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: System establishment and expression profiling in human tissues. – *Genome Res.*, **14**, 2004, № 12, 2486-2494.
- Bas, S. et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, IgM and IgA rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. – *Rheumatology (Oxford)*, **42**, 2003, № 5, 677-680.
- Chen, C. Z. et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. – *Science*, **303**, 2004, № 5654, 83-86.
- Chen, D. F. et al. MicroRNA155 is induced in activated CD4(+) T cells of TNBS-induced colitis in mice. – *World J. Gastroenterol.*, **16**, 2010, № 7, 854-861.
- Dai, Y. et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. – *Rheumatol. Int.*, **29**, 2009, № 7, 749-754.
- Dai, Y. et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. – *Lupus*, **16**, 2007, № 12, 939-946.
- Esquela-Kerscher, A. et F. J. Slack. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. – *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 2006, № 4, 259-269.
- Furer, V. et al. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. – *Clin. Immunol.*, **136**, 2010, № 1, 1-15.
- Huber, L. C. et al. Epigenetics in inflammatory rheumatic diseases. – *Arthritis Rheum.*, **56**, 2007, № 11, 3523-3531.
- Hunter, M. P. et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. – *PLoS One*, **3**, 2008, № 11, 3694.
- Kundu, S. T. et F. J. Slack. Robust and specific inhibition of microRNAs in *Caenorhabditis elegans*. – *J. Biol.*, **9**, 2010, № 3, 20.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum et V. Ambros. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-1*. – *Cell*, **75**, 1993, № 5, 843-854.
- Lewis, B. P., C. B. Burge et D. P. Bartel. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. – *Cell*, **120**, 2005, № 1, 15-20.
- Li, Q. J. et al. MiR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. – *Cell*, **129**, 2007, № 1, 147-161.
- Li, J. et al. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4⁺ T cells from patients with rheumatoid arthritis. – *Arthritis Res. Ther.*, **12**, 2010, № 3, 81.
- Lodish, H. F. et al. Micromanagement of the immune system by microRNAs. – *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 2008, № 2, 120-130.
- Luo, X. et al. Evidence for microRNA-mediated regulation in rheumatic diseases. – *Ann. Rheum. Dis.*, **69**, 2010, № 1, 30-36.
- Marok, R. et al. Activation of the transcription factor nuclear factor- κ B in human inflamed synovial tissue. – *Arthritis Rheum.*, **39**, 1996, № 4, 583-591.
- Michael, A. et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. – *Oral Dis.*, **16**, 2010, № 1, 34-38.
- Mor, A., S. B. Abramson et M. H. Pillinger. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. – *Clin. Immunol.*, **115**, 2005, № 2, 118-128.
- Murata, K. et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. – *Arthritis. Res. Ther.*, **12**, 2010, № 3, 86.
- Nakasa, T. et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. – *Arthritis Rheum.*, **58**, 2008, № 5, 1284-1292.
- Neilson, J. R. et al. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. – *Genes Dev.*, **21**, 2007, № 5, 578-589.
- Nelson, P. T. et al. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. – *Nat. Methods*, **1**, 2004, № 2, 155-161.
- Niimoto, T. et al. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. – *BMC Musculoskelet Disord.*, **11**, 2010, 209.
- Orozco, G. et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein

- phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. – *Arthritis Rheum.*, 52, 2005, № 1, 219-224.
31. Pauley, K. M., S. Chaa et E. K. Chanb. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. – *J. Autoimmun.*, 32, 2009, № 3-4, 189-194.
32. Pauley, K. M. et al. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. – *Arthr. Res. Ther.*, 10, 2008, № 4, 101.
33. Perry, M. M. et al. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. – *J. Immunol.*, 180, 2008, № 8, 5689-5698.
34. Pulikkan, J. A. et al. Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. – *Blood*, 115, 2010, № 9, 1768-1778.
35. Sheedy, F. J. et L. A. J. O'Neill. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. – *Ann. Rheum. Dis.*, 67, 2008, № 3, 50-55.
36. Shi, R. et V. L. Chiang. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. – *Biotechniques*, 39, 2005, № 4, 519-525.
37. Sioud, M. et O. Rosok. Profiling microRNA expression using sensitive cDNA probes and filter arrays. – *Biotechniques*, 37, 2004, № 4, 578-580.
38. Stanczyk, J. et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. – *Arthritis Rheum.*, 58, 2008, № 4, 1001-1009.
39. Taganov, K. et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 2006, № 33, 12481-12486.
40. Tang, Y. et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. – *Arthritis Rheum.*, 60, 2009, № 4, 1065-1075.
41. Te, J. L. et al. Identification of unique microRNA signature associated with lupus nephritis. – *PLoS One*, 5, 2010, № 5, 10344.
42. Tili, E. et al. MicroRNAs, the immune system and rheumatic disease. – *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 4, 2008, № 10, 534-541.
43. Válczi, A. et al. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. – *Nucleic. Acids. Res.*, 32, 2004, № 22, 175.
44. Vlam, K. Soluble and tissue biomarkers in ankylosing spondylitis. – *Best Pract. Res. Clin. Rheum.*, 24, 2010, № 5, 671-682.
45. Wang, G. et al. Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus. – *J. Rheumatol.*, 37, 2010, № 12, 2516-2522.
46. Wang, Z. et B. Yang. MicroRNA expression Detection Methods, Springer-Verlag, 2010, 37-53.
47. Wightman, B., I. Ha et G. Ruvkun. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. Elegans*. – *Cell*, 75, 1993, № 5, 855-862.
48. Wu, H. et al. MiRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. – *PLoS ONE*, 2, 2007, № 10, 1020.
49. Zhang, B. et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. – *Dev. Biol.*, 302, 2007, № 1, 1-12.
50. Zhou, B. et al. MiR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 2007, 7080-7085.

Постъпил за печат на 14 февруари 2011 г.

✉ Адрес за кореспонденция:

Д-р Р. Шумналиева
Клиника по ревматология
Медицински университет
ул. "Урвич" № 13
1612 София

✉ Address for correspondence:

R. Shumnaliev, M. D.
Clinic of Rheumatology
Medical University
13, Urvitch Str.
Bulgaria – 1612 Sofia