

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.3; 577.113.8
DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-2-232-244

Поступила в редакцию 13.12.2017
Received 13.12.2017

В. М. Абашкин, О. Г. Дмитрук, Д. Г. Щербин

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК:
БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

Аннотация. Малые некодирующие РНК (мнРНК) – короткие РНК, участвующие в регуляции экспрессии генов, иммунитете клетки и посттранскрипционных модификациях РНК. Среди всего разнообразия мнРНК наибольший интерес в плане биомедицинского применения представляют три класса малых РНК: малые интерферирующие РНК (миРНК), микроРНК и piwi-interacting РНК (пиРНК).

МиРНК и микроРНК схожи по функциям и механизму действия: их главной задачей является сайленсинг генов на посттранскрипционном этапе. В отличие от них, пиРНК обеспечивает, главным образом, стабильность генома эмбриона путем блокирования активности мобильных элементов ДНК.

Дисрегуляция мнРНК наблюдается при различных заболеваниях. Установлено, что нарушения экспрессии мнРНК возникают при развитии онкологических, неврологических, сердечно-сосудистых заболеваний, диабете. МнРНК могут выступать в качестве диагностических биомаркеров заболеваний и как компонент генно-терапевтических препаратов. Использование мнРНК как биомаркеров в медицине весьма перспективно, а существующие ограничения связаны со сложностью выявления мнРНК, различающихся одним или несколькими нуклеотидами. Весьма многообещающим является использование мнРНК в генной терапии, поскольку с их помощью гипотетически возможно отключить любой белковый компонент, не изменяя геном, что гораздо безопаснее других предлагаемых методов генной терапии. Главной задачей для клинического использования миРНК и микроРНК на сегодняшний день является создание эффективных систем доставки в клетки-мишени, поскольку несвязанные мнРНК не способны проникать через мембраны и разрушаются под действием ряда ферментов крови и тканей.

Таким образом, несмотря на ряд имеющихся проблем, мнРНК являются перспективными агентами для диагностики и терапии целого спектра заболеваний.

Ключевые слова: миРНК, микроРНК, пиРНК, генная терапия, терапия рака

Для цитирования: Абашкин, В. М. Малые некодирующие РНК: биологическая роль и биомедицинское применение / В. М. Абашкин, О. Г. Дмитрук, Д. Г. Щербин // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2018. – Т. 63, № 2. – С. 232–244. DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-2-232-244

V. Abashkin, V. Dzmitruk, D. Shcharbin

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

SMALL NON-CODING RNA: BIOLOGICAL FUNCTIONS AND BIOMEDICAL APPLICATION

Abstract. Small non-coding RNAs (sncRNA) are short RNA molecules that are involved in gene expression, posttranscriptional modifications and cell immunity regulation. The most studied and the most interesting for the medical application classes are small interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA) and piwi-interacting RNA (piRNA).

SncRNAs have a wide range of functions. Primary function of siRNA and miRNA is silencing of gene expression by binding or/and degradation of messenger RNA. PiRNA also have this function but its principal function is control of genome stability on the basis of blocking the activity of transposons.

Many diseases, such as cancer, diabetes, neurological, and cardiovascular diseases are accompanied by distortion of sncRNA expression. Abnormal sncRNA expression profile can be used as a hallmark to determine certain type of cancer. In all types of cancer were discovered deviations in the sncRNA pool.

From the medical point of view sncRNA can be used as disease marker or as a component of gene therapeutic drugs. In the case of markers usage sncRNAs deserve attention as universal and relatively stable samples. But frequently sncRNAs differ just by few nucleotides, which can create difficulties in their distinguishing. In the frame of gene therapy sncRNAs are able to silence theoretically any gene expression. As sncRNA affects mRNA but not DNA it allows avoiding accidental changes in the genome. In this case delivery systems for RNAs are highly needed, because sncRNAs are unable to penetrate the cell membrane and can be degraded by blood enzymes.

Despite of existing problems, sncRNAs are promising compounds for the diagnosis and therapy of wide range of diseases.

Keywords: ncRNA, siRNA, miRNA, piRNA, gene therapy, cancer treatment

For citation: Abashkin V., Dzmitruk V., Shcharbin D. Small non-coding RNA: biological functions and biomedical application. *Vestsi Natsyonal'най akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 2, pp. 232–244 (in Russian). DOI: 10.29235/1029-8940-2018-63-2-232-244

Введение. С каждым годом растет научное понимание механизмов функционирования клетки: обнаруживаются все новые пути и системы регуляции клеточных процессов, исследуются их функции. С момента открытия структуры и функции ДНК в середине прошлого века многие данные о структуре клетки были переосмыслены. Так, выяснилось, что одной из функций регионов ДНК, не участвующих в процессе кодирования белка, является кодирование различных регуляторных РНК.

В конце прошлого века был открыт ряд малых некодирующих РНК (мнРНК), не участвующих напрямую в синтезе белка, но играющих важную роль в регуляции экспрессии генов на разных уровнях [1, 2]. МнРНК обнаружены во всех типах организмов, включая даже вирусы и бактерии. Непосредственно в клетке мнРНК обычно локализованы в ядре и цитоплазме, реже – в ДНК-содержащих органеллах (митохондриях и пластидах), где и происходит их синтез [3–7].

На сегодняшний день не существует четкой классификации мнРНК, которая есть, например, для белков. Основным фактором разграничения мнРНК по классам является их распространенность в конкретных типах организмов, клеточная локализация и взаимодействие с сопровождающими белковыми комплексами. В рамках данной статьи рассмотрим три наиболее распространенных и изученных класса мнРНК, участвующих непосредственно в посттранскрипционной регуляции генов и представляющих особый интерес для биомедицинских исследований.

Биологическая роль и механизмы действия малых некодирующих РНК. *Малые интерферирующие РНК (миРНК, siРНК)* – класс некодирующих двухцепочечных РНК длиной примерно 20–25 п. н., участвующих в механизме РНК-интерференции. Первоначально их регуляторное действие было показано на клетках растений с помощью искусственных миРНК [8]. Следует отметить, что термин миРНК поначалу применяли только к синтетическим мнРНК. Позднее в клетках растений и животных были обнаружены эндогенные миРНК, работающие по такому же механизму, что и синтезированные РНК [9, 10].

Процессинг миРНК (рис. 1) в растительной и животной клетке несколько различается. В растительной клетке в качестве предшественников миРНК могут выступать длинные дцРНК или шпилечные первичные миРНК (шпилечные при-миРНК) [11]. В животных клетках шпилечные при-миРНК могут вызвать реакцию иммунной системы (так называемый интерфероновый ответ), поэтому принято считать, что основным предшественником миРНК в данном типе клеток является дцРНК [12, 13]. При-миРНК переносятся экспортом в цитоплазму [14], где предшественники связываются с белковым комплексом Dicer, который генерирует короткие зрелые последовательности миРНК. В процессе такого созревания из одной цепи дцРНК могут выделяться до нескольких десятков гомологов зрелой миРНК [15].

Главной функцией миРНК является подавление экспрессии (сайленсинг, или замалчивание) генов. Попадая в цитозоль клетки, миРНК связывается со сложным белковым комплексом RISC (RNA-induced silencing complex), состоящим из белка класса AGO семейства Argonaute и ряда других вспомогательных белков [16]. В составе комплекса RISC миРНК комплементарно связывается с таргетной матричной РНК с последующей деградацией мРНК комплексом RISC в месте комплементарного связывания. Таким образом осуществляется ингибирование процесса трансляции таргетного белка [17, 18].

Кроме основной функции, связанной с сайленсингом генов, обнаружена также способность ряда синтетических миРНК повышать экспрессию генов [19]. Повышение экспрессии может

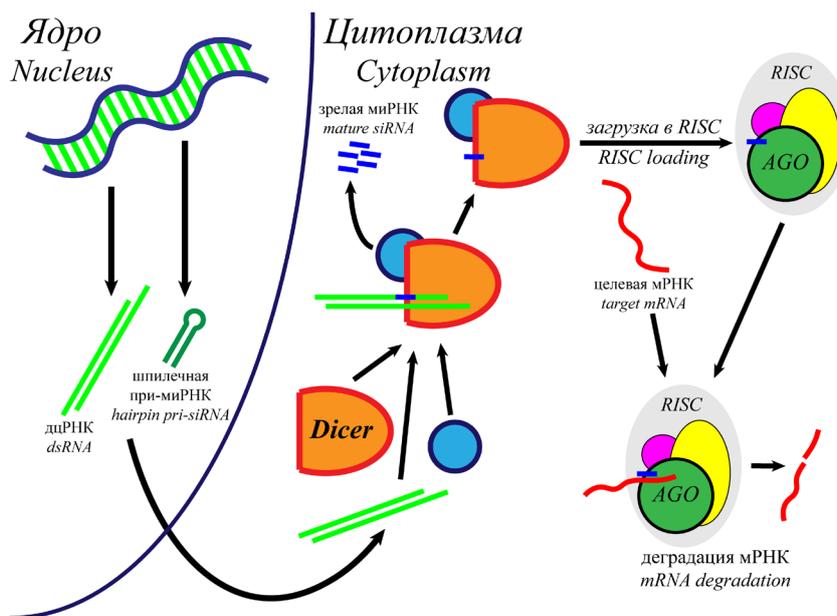


Рис. 1. Схема процессинга миРНК [12–15]

Fig. 1. SiRNA processing scheme [12–15]

осуществляться за счет введения миРНК, которая комплементарно связывает и ингибирует действие антигенных РНК (agРНК), метилирующих промоторы (последовательность нуклеотидов, отвечающая за узнавание РНК-полимеразой места начала транскрипции) в ДНК, блокируя транскрипцию [20].

Учитывая тот факт, что миРНК могут передаваться между клетками различных типов, изменение экспрессии генов может быть осуществлено посредством миРНК, перенесенных из других клеток [21].

МикроРНК – класс малых некодирующих молекул РНК длиной 19–25 нуклеотидов, основной функцией которых является подавление активности экспрессии генов. МикроРНК близки по структуре и функциям к миРНК, однако, в отличие от миРНК, могут связываться с мРНК-мишенью с ошибками комплементарности. Это обеспечивает меньшую специфичность к мРНК-мишеням, определяя несколько мРНК-мишеней для одной микроРНК. Ошибки комплементарности микроРНК характерны для животных клеток. В растительной клетке микроРНК, как правило, полностью комплементарны мРНК-мишени аналогично миРНК, но сайленсинг идет по иному пути, чем у миРНК [22]. МикроРНК, связываясь с мРНК, может приводить не к деградации мРНК-мишени, а лишь к репрессии трансляции. В остальном процесс сайленсинга генов при участии микроРНК аналогичен таковому у миРНК [2, 16].

Большинство микроРНК кодируются в интронах, и, вероятно, процессинг микроРНК предшествует сплайсингу [23]. Транскрибируется данный тип мРНК РНК-полимеразой II или РНК-полимеразой III [24, 25]. В результате транскрипции образуется длинная нить первичной микроРНК (при-микроРНК) в форме шпильки. Размер шпильки может варьироваться от сотен до десятков тысяч пар нуклеотидов. Несмотря на схожесть со шпилечной при-миРНК, при-микроРНК не вызывает иммунного ответа в животной клетке за счет включения в последовательности ошибок комплементарности в шпилечке при-микроРНК. Внутри ядра при-микроРНК обрезается в области перехода между одноцепочечной и двухцепочечной РНК, после чего образуется шпилечка предшественника микроРНК (пре-микроРНК) длиной около 70 п. н. [26]. Пре-микроРНК транспортируется в цитоплазму, где происходит созревание до функционально активной формы микроРНК по аналогичному с миРНК механизму (рис. 2).

ПиРНК (*piРНК* – *piwi-interacting РНК*) – наиболее многочисленный класс малых некодирующих РНК длиной 23–35 нуклеотидов, экспрессируемых исключительно в животных клетках.

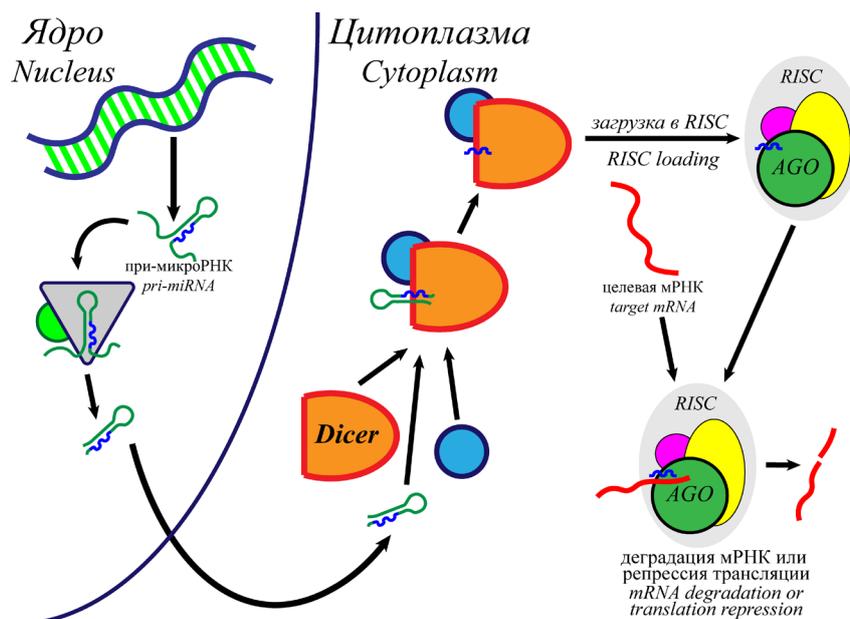


Рис. 2. Схема процессинга микроРНК [23, 26]

Fig. 2. MicroRNA processing scheme [23, 26]

В отличие от микро- и миРНК, насчитывающих, по разным оценкам, от сотен до тысяч различных последовательностей на организм, пиРНК весьма разнообразны: на один организм может приходиться сотни тысяч уникальных последовательностей. Как правило, нуклеотидные последовательности пиРНК не имеют специфических последовательностей и существенно различаются между собой, за исключением уридина в первом положении [27]. ПиРНК играют важную роль в поддержании стабильности генома стволовых клеток, блокируя активность транспозонов – мобильных элементов ДНК – в зародышевых линиях [28]. Аналогично миРНК и микроРНК, пиРНК участвуют в процессах подавления экспрессии генов, но взаимодействуют в комплексе с белками класса Piwi семейства Argonaute [29]. Также пиРНК могут блокировать перенос чужеродных мобильных элементов генома. Механизм такого переноса еще до конца не изучен [30].

До сих пор многие механизмы в процессинге пиРНК до конца не ясны (рис. 3). Гены, кодирующие пиРНК, обнаружены преимущественно в областях генома, названных пиРНК-кластерами. Исследования показали, что эндорибонуклеаза Zucchini, обнаруженная у дрозофил, и ее мышинный ортолог MitoPLD, вероятнее всего, являются факторами, которые вызывают укорачивание длинных транскриптов-предшественников до пиРНК-подобных структур [31]. Установлено, что Zucchini расположен на внешней мембране митохондрий, а активный центр белка может включать одноцепочечную последовательность предшественника пиРНК [32]. Zucchini формирует из первичной пиРНК последовательность длиной примерно 26 нуклеотидов, а его ортолог MitoPLD – цепь длиной 30–40 нуклеотидов [33]. В результате разрезания цепи на 5'-конце формируется фосфатная группа с уридином, характерная только для пиРНК. Далее предшественник связывается с белками Piwi и 3'-конец подвергается действию неизвестной нуклеазы [34]. После этого происходит 2'-О-метилирование нуклеотидной цепи с помощью белкового комплекса HEN1 и, таким образом, образуется зрелая пиРНК [35].

Перспективы применения малых некодирующих РНК в биомедицинских исследованиях.

Как показали результаты исследований, нарушение экспрессии мнРНК в опухолевых клетках по сравнению со здоровыми – распространенное явление [18, 36, 37]. Так, например, установлено, что в раковых клетках отклонения экспрессии наблюдаются почти у половины пула всех микроРНК [24]. При этом отмечают как подавление экспрессии микроРНК с супрессорной активностью по сравнению с нормальными тканями, так и гиперэкспрессию микроРНК противоположной направленности [38, 39]. Аномальная экспрессия некоторых микроРНК является достаточно универсальным показателем возникновения онкологических процессов. Так, гиперэкспрессия

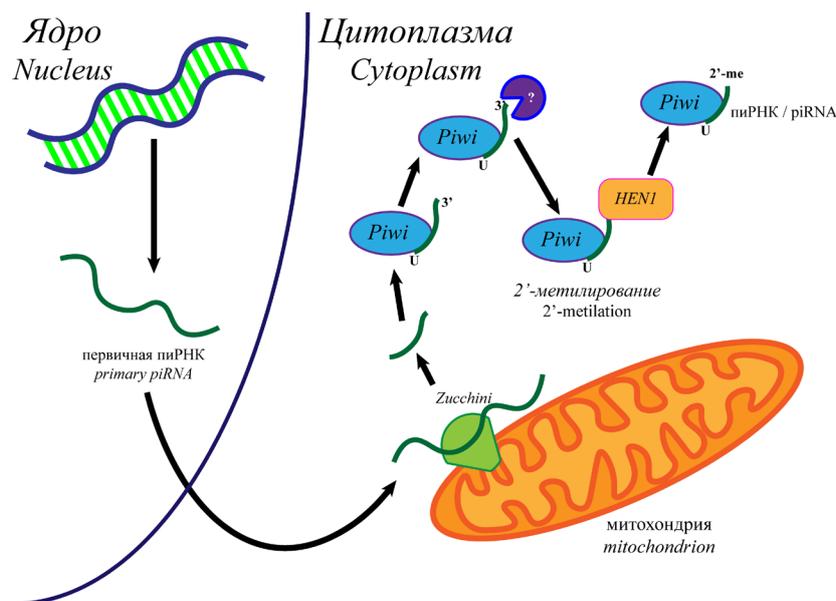


Рис. 3. Схема процессинга пиРНК [31–35]

Fig. 3. PiRNA processing scheme [31–35]

miR-21 характерна для многих видов опухолей [40]. При онкологических процессах может наблюдаться также изменение профиля экспрессии пиРНК. Аномальная экспрессия пиРНК в клетках отмечается, например, при раке желудка, раке печени и других типах опухолей [41].

Нарушение профиля экспрессии мРНК может быть обусловлено расположением их генов в хрупких областях хромосом. Другим механизмом, который способен привести к аномальной экспрессии мРНК и развитию рака, является изменение экспрессии и/или функционирование ферментов, участвующих в биогенезе ми- и микроРНК, таких как Droscha и Dicer. Сниженный уровень экспрессии белков Droscha и Dicer был обнаружен у 39 % пациентов, страдающих раком яичников [42].

МнРНК играют важную роль не только в развитии опухолевых процессов. Их дисрегуляция выявлена при ряде неврологических (болезнь Паркинсона, Альцгеймера), сердечно-сосудистых заболеваниях и диабете [43–46].

Изложенные выше данные дают основание предположить, что применение мнРНК возможно в двух основных областях: диагностике и терапии заболеваний. Изменение профиля экспрессии мнРНК в норме и при патологии легло в основу их использования в качестве биомаркеров. К преимуществам мнРНК в данном случае относят универсальность детекции и стабильность исследуемых образцов по сравнению, например, с образцами мРНК. Это связано с наличием у мнРНК метилированных групп [47]. Основными методами диагностики в этом случае выступают полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) и маркирование выделенных эндогенных мнРНК флуоресцентными зондами [48]. Точность анализа биомаркеров при применении данных методов осложняют низкая дифференциация РНК, отличающихся зачастую одним или несколькими нуклеотидами, а также значительные отличия уровня экспрессии в различных тканях, зависящего от множества параметров. Тем не менее, в ряде исследований демонстрируется перспективность этого направления. Например, с помощью ПЦР-РВ были определены профили микроРНК, отличающие различные формы опухолей молочной железы [49].

Другим аспектом применения мнРНК является их использование в терапии заболеваний. Все три типа мнРНК, перечисленные выше, исследуются в качестве основы для генетических препаратов, способных восстанавливать нарушенные метаболические процессы в клетках. В контексте генной терапии, применяемой для лечения рака, малые интерферирующие РНК действуют по правилам стратегии отключения, т. е. способны ингибировать практически любой белковый компонент независимо от локализации мишени непосредственно внутри клетки. Это и определяет их преимущество по сравнению с антителами или специфическими низкомолекулярными

ингибиторами ферментов, которые связываются непосредственно с поверхностью соответствующих антигенов или белков. Благодаря отсутствию прямого влияния на внутриядерную ДНК воздействие миРНК, как и микро- и пиРНК, не приводит к изменениям в геноме клетки-хозяина, что является гораздо более безопасным подходом генной терапии по сравнению с действием ДНК-плазмид. Несмотря на все преимущества миРНК, существует ряд факторов, ограничивающих их применение в клинических целях. При введении в клетки экзогенной миРНК, а также ее предшественников возможна конкуренция с эндогенными микроРНК за внутриклеточные белковые комплексы, отвечающие за процессинг и РНК-интерференцию. Таким образом, может наблюдаться насыщение путей клеточного механизма, реализующего естественную регуляцию с участием микроРНК. Последнее, в свою очередь, может приводить к токсичности за счет блокировки или торможения процессинга нативных микроРНК [50].

Предшественники миРНК способны вызывать врожденные иммунные реакции. Определенные GU-последовательности (например, 5'-GUCCUCAA-3') приводят к секреции воспалительных цитокинов. Относительно длинные двухцепочечные миРНК (более 30 нуклеотидов) могут быстро индуцировать интерфероны путем активации эволюционно консервативных механизмов, направленных на борьбу с инвазивными вирусными патогенами. В то же время миРНК, содержащие менее 30 нуклеотидов в цепи, не вызывают такой реакции [51]. Иммунный ответ на введение синтетической миРНК может быть полностью устранен селективным включением 2'-О-метилуридина или гуанозин-нуклеозидов в одну из нитей миРНК [52].

МикроРНК имеет ряд отличий по сравнению с миРНК. Как отмечалось ранее, микроРНК зачастую связываются с мРНК-мишенью с ошибками комплементарности. Это позволяет одному гомологу микроРНК связываться с несколькими таргетными мРНК, т. е. один гомолог может блокировать сразу несколько генов. Такая меньшая специфичность позволяет разрабатывать с помощью компьютерного моделирования мультитаргетные микроРНК, блокирующие сразу несколько целевых мРНК, что дает возможность эффективнее подавлять онкомаркеры [53]. Важно иметь в виду, что мультитаргетность может иметь и негативный эффект, если одна или несколько схожих мРНК-мишеней не являются целевыми для проведения терапии.

Потенциальные терапевтические стратегии с применением микроРНК делятся на две категории: искусственное повышение уровня противораковых микроРНК, которые экспрессируются раковыми клетками в недостаточных количествах, или же арест эндогенных микроРНК с высокой экспрессией в раковых клетках. Первый метод, как и в случае миРНК, основан на непосредственном введении в клетки синтетических мимиков микроРНК или их предшественников [54]. Подавление экспрессии микроРНК обычно осуществляется с помощью антагонистов микроРНК (antimiR) – модифицированных олигонуклеотидов, полностью комплементарных последовательности таргетной микроРНК. Такие олигонуклеотиды, как правило, не блокируют активность онкогенных микроРНК, а формируют с ними необратимые дуплексы и, как следствие, ингибируют функции гиперэкспрессированных онкогенных микроРНК [55, 56].

МикроРНК рассматриваются также как потенциальные терапевтические агенты в лечении гипертензии и других сердечно-сосудистых заболеваний. Показана связь низкой экспрессии miR-204 в клетках гладких мышц легочной артерии с гипертензией, что делает данную микроРНК потенциальным терапевтическим агентом [57]. Известно также, что miR-155 является регулятором экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота. Последний играет важную роль в поддержании сердечно-сосудистого гомеостаза, и снижение его концентрации в крови может быть одной из причин возникновения гипертензии, а впоследствии и эндотелиальной дисфункции. Таким образом, ингибирование miR-155 может служить новым терапевтическим подходом в устранении эндотелиальной дисфункции при развитии сердечно-сосудистых заболеваний [58].

ПиРНК пока не находят столь широкого применения в диагностике и терапии различных заболеваний, что обусловлено в первую очередь сложностью их идентификации ввиду огромного разнообразия ПиРНК в клетке. Тем не менее, исследования последних лет свидетельствуют о том, что изменение экспрессии пиРНК в норме и при патологии может применяться также в диагностике и терапии рака. С одной стороны, установлено, что piR-651 аномально экспрессируется в клетках рака желудка человека, что делает его потенциальным маркером данного

заболевания [41]. С другой стороны, пиРНК могут служить вспомогательным маркером в диагностике и терапии, так как, согласно ряду данных, профили микро- и пиРНК в отдельности в различных типах опухолей могут быть примерно одного характера, в то время как совместный профиль микро- и пиРНК является более специфичным для конкретного типа рака [59]. Кроме того, расширить диагностические возможности позволит тот факт, что экспрессия пиРНК в клетках слизистой оболочки желудка в норме подавляется при прилегании здоровых тканей к раковым [37].

Важным и, пожалуй, самым главным ограничением в использовании мнРНК в качестве терапевтических препаратов является их неспособность проникать в клетки через клеточную мембрану, а также их разрушение под действием ферментов при введении в кровь. Поэтому на сегодняшний момент особо остро стоит вопрос разработки эффективного метода доставки мнРНК внутрь клетки. Одним из путей решения этой проблемы является создание различных типов химической модификации мнРНК для их стабилизации во внутренней среде организма. Так, учитывая естественную структуру пиРНК, можно сделать вывод, что дополнительные концевые группы, содержащие уридин, могут резко повышать устойчивость пиРНК к деградации [47]. Однако большинство исследований на сегодняшний день посвящены разработке биосовместимых систем доставки мнРНК посредством вирусных и невирусных носителей. Вирусные системы доставки являются наиболее эффективными, но высокая канцерогенность и иммуногенность их носителей, конечная стоимость обуславливают необходимость разработки синтетических векторов. Весьма перспективны на сегодняшний день носители, представляющие собой наноструктуры различной природы: полимеры, липосомы, дендримеры, квантовые точки, металлические наночастицы [60–62]. Следует отметить, что большинство данных структур тканево неспецифичны при парентеральном введении. Особо сложной является доставка препарата при неонкологических заболеваниях, так как в данном случае аномальные клетки могут не иметь ярко выраженных отличий по сравнению со здоровыми. «Заставить» вектор высвобождать препарат в условиях, характерных только для нездоровых клеток (например, измененных рН или обедненных кислородом), невозможно. В некоторых случаях возможно использование таргетного лиганда, способного специфически взаимодействовать с клетками-мишенями.

В Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси авторами проведены исследования механизмов формирования комплексов между карбосилановыми дендримерами и антивирусными (анти-ВИЧ) миРНК. Установлено, что электростатические взаимодействия между катионными дендримерами и анионными миРНК приводят к формированию их комплексов, устойчивых в присутствии альбумина. При трансфекции в Т-лимфоциты линии МТ-2 и в мононуклеарные клетки периферической крови человека антивирусных миРНК с помощью дендримеров наблюдается существенное снижение выхода белка р24, что свидетельствует о подавлении размножения вируса ВИЧ в этих клетках [63, 64].

Одним из современных направлений генетической инженерии для лечения злокачественных опухолей является подавление механизмов малигнизации (злокачественной трансформации) нормальных клеток. При малигнизации нормальные клетки начинают бесконтрольно размножаться, теряя способность к апоптозу. Регуляция апоптоза в клетках осуществляется семейством белков Bcl-2, среди которых различают про- и антиапоптотические белки. К группе белков – ингибиторов апоптоза принадлежат белки Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A-1, Bcl-2o и Mcl-1. Нами проведен комплексный анализ взаимодействия полиамидаминных и карбосилановых дендримеров с проапоптотическими миРНК, направленными против антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1. Исследованы механизмы формирования комплексов, установлены их характеристики. Показана высокая стабильность комплексов в присутствии РНКаз и альбумина. Обнаружено, что комплексы на основе дендримера и трех миРНК (так называемый «3 миРНК-коктейль») являются более эффективными для индуцирования процессов гибели злокачественных клеток линий HeLa и HL-60, чем одиночные миРНК в тех же концентрациях [65–67]. На основе полученных данных синтезирован новый тип фосфорного дендримера – катионный фосфорный АЕЗ дендример, отличающийся способностью эффективно доставлять антираковые миРНК в злокачественные клетки и индуцировать значительный цитотоксический эффект в этих клетках. На данный дендример подана заявка на международный патент [67].

Заклучение. Со времени открытия малых некодирующих РНК их механизмы и функции так до конца и не определены. Тем не менее, уже сейчас можно утверждать, что данный класс биомолекул представляет собой перспективное средство в борьбе с разного рода заболеваниями как в качестве диагностических маркеров, так и непосредственно в составе фармакологического препарата.

На декабрь 2017 г. ни один терапевтический препарат на основе мнРНК не прошел все стадии клинических испытаний [68]. Согласно прогнозам, препараты на основе ми- и микроРНК могут появиться на рынке в ближайшее десятилетие, при этом их стоимость может быть гораздо ниже существующих генетических препаратов. В целом пока существует не так много генетических препаратов, одобренных к использованию в разных странах. Среди них Gendicine (Китай, 2003), Glybera (Нидерланды, 2012), Strimvelis (Великобритания, 2016), Kymriah (США, 2017) [69–72]. Стоимость терапии с использованием данных препаратов может превышать 1 млн долларов.

В ходе дальнейших исследований важно не только найти строго специфичные маркеры различных заболеваний, сконструировать высокоспецифичные терапевтические РНК, но и найти эффективный способ их доставки. Вероятно, эффективная доставка малых терапевтических РНК будет заключаться как в сочетании модификации самих мнРНК, так и в использовании таргетных невирусных векторов.

В Республике Беларусь исследования в области применения малых некодирующих РНК и их доставки проводятся в лаборатории протеомики Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Исследования сосредоточены в первую очередь на эффективной доставке ми- и микроРНК посредством наночастиц (дендримеров, дендронов, металлических наночастиц). Тесное сотрудничество с зарубежными коллегами из Франции, Польши и России позволяет постепенно решать поставленные задачи [63–66].

Благодарности. Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (гранты B15PM-60, B16-071, M15CO-041).

Acknowledgements. This work was supported by grants Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (B15RM-60, B16-071, M15CO-041).

Список использованных источников

1. Cech, T. R. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones / T. R. Cech, J. A. Steitz // *Cell*. – 2014. – Vol. 157, N 1. – P. 77–94.
2. Aravin, A. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing / A. Aravin, T. Tuschl // *FEBS Letters*. – 2005. – Vol. 579, N 26. – P. 5830–5840.
3. Systematic analysis of small RNAs associated with human mitochondria by deep sequencing: detailed analysis of mitochondrial associated miRNA / L. Spirada [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N 9. – P. e44873.
4. Comparative analysis of the small RNA transcriptomes of *Pinus contorta* and *Oryza sativa* / R. D. Morin [et al.] // *Genome Research*. – 2008. – Vol. 18, N 4. – P. 571–584.
5. A small chloroplast RNA may be required for trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii* / M. Goldschmidt-Clermont [et al.] // *Cell*. – 1991. – Vol. 65, N 1. – P. 135–143.
6. Majdalani, N. Bacterial small RNA regulators / N. Majdalani, C. K. Vanderpool, S. Gottesman // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 40, N 2. – P. 93–113.
7. Hussain, M. MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells / M. Hussain, S. Asgari // *Proc. of the Nat. Acad. of Sciences*. – 2014. – Vol. 111, N 7. – P. 2746–2751.
8. Hamilton, A. J. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants / A. J. Hamilton, D. Baulcombe // *Science*. – 1999. – Vol. 286, N 5441. – P. 950–952.
9. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes / T. Watanabe [et al.] // *Nature*. – 2008. – Vol. 453, N 7194. – P. 539–543.
10. Yang, N. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells / N. Yang, H. H. Kazazian // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 13, N 9. – P. 763–771.
11. Mello, C. C. Revealing the world of RNA interference / C. C. Mello, D. Conte // *Nature*. – 2004. – Vol. 431, N 7006. – P. 338–342.
12. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells / M. Ghildiyal [et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 320, N 5879. – P. 1077–1081.
13. DNA constructs designed to produce short hairpin, interfering RNAs in transgenic mice sometimes show early lethality and an interferon response / W. Cao [et al.] // *J. of Applied Genetics*. – 2005. – Vol. 46, N 2. – P. 217–225.
14. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs / R. Yi [et al.] // *Genes and Development*. – 2003. – Vol. 17, N 24. – P. 3011–3016.
15. Saito, K. Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals / K. Saito, M. C. Siomi // *Developmental Cell*. – 2010. – Vol. 19, N 5. – P. 687–697.

16. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex / H. W. Wang [et al.] // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 16, N 11. – P. 1148–1153.
17. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference / E. Bernstein [et al.] // *Nature*. – 2001. – Vol. 409, N 6818. – P. 363–366.
18. Brummelkamp, T. R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells / T. R. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami // *Science*. – 2002. – Vol. 296, N 5567. – P. 550–553.
19. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs / B. A. Janowski [et al.] // *Nature Chemical Biology*. – 2007. – Vol. 3, N 3. – P. 166–173.
20. Inhibiting gene expression at transcription start sites in chromosomal DNA with antigene RNAs / B. A. Janowski [et al.] // *Nature Chemical Biology*. – 2005. – Vol. 1, N 4. – P. 216–222.
21. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells / M. L. Squadrito [et al.] // *Cell Reports*. – 2014. – Vol. 8, N 5. – P. 1432–1446.
22. Wienholds, E. MicroRNA function in animal development / E. Wienholds, R. H. A. Plasterk // *FEBS Letters*. – 2005. – Vol. 579, N 26. – P. 5911–5922.
23. Kim, Y. K. Processing of intronic microRNAs / Y. K. Kim, V. N. Kim // *EMBO Journal*. – 2007. – Vol. 26, N 3. – P. 775–783.
24. Cai, X. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs / X. Cai, C. H. Hagedorn, B. R. Cullen // *RNA*. – 2004. – Vol. 10, N 12. – P. 1957–1966.
25. Borchert, G. M. RNA polymerase III transcribes human microRNAs / G. M. Borchert, W. Lanier, B. L. Davidson // *Nature Structural and Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 13, N 12. – P. 1097–1101.
26. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex / J. Han [et al.] // *Cell*. – 2006. – Vol. 125, N 5. – P. 887–901.
27. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila* / J. Brennecke [et al.] // *Cell*. – 2007. – Vol. 128, N 6. – P. 1089–1103.
28. Juliano, C. Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms / C. Juliano, J. Wang, H. Lin // *Annu. Rev. of Genetics*. – 2011. – Vol. 45, N 1. – P. 447–469.
29. Hartig, J. V. piRNAs – the ancient hunters of genome invaders / J. V. Hartig, Y. Tomari, K. Förstemann // *Genes and Development*. – 2007. – Vol. 21, N 14. – P. 1707–1713.
30. Ishizu, H. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines / H. Ishizu, H. Siomi, M. C. Siomi // *Genes and Development*. – 2012. – Vol. 26, N 21. – P. 2361–2373.
31. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation and piRNA biogenesis in the mouse germline / T. Watanabe [et al.] // *Developmental Cell*. – 2011. – Vol. 20, N 3. – P. 364–375.
32. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis / H. Nishimasu [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 491, N 7423. – P. 284–287.
33. Mohn, F. piRNA-guided slicing specifies transcripts for Zucchini-dependent, phased piRNA biogenesis / F. Mohn, D. Handler, J. Brennecke // *Science*. – 2015. – Vol. 348, N 6236. – P. 812–817.
34. Identification and functional analysis of the pre-piRNA 3' Trimmer in silkworms / N. Izumi [et al.] // *Cell*. – 2016. – Vol. 164, N 5. – P. 962–973.
35. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends / K. Saito [et al.] // *Genes and Development*. – 2007. – Vol. 21, N 13. – P. 1603–1608.
36. Федянин, М. Ю. Роль микро-РНК при солидных опухолях / М. Ю. Федянин, Е. О. Игнатова, С. А. Тюляндин // *Злокачеств. опухоли*. – 2013. – № 1 (5). – С. 3–14.
37. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates *in vitro* and *in vivo* tumor suppressive activity in human gastric cancer cells / J. Cheng [et al.] // *Cancer Letters*. – 2012. – Vol. 315, N 1. – P. 12–17.
38. Suppression of microRNA-96 expression inhibits the invasion of hepatocellular carcinoma cells / R. X. Chen [et al.] // *Molecular Medicine Reports*. – 2012. – Vol. 5, N 3. – P. 800–804.
39. Moon, J. Inhibition of microRNA-181 reduces forebrain ischemia-induced neuronal loss / J. Moon, L. Xu, R. G. Giffard // *J. of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2013. – Vol. 33, N 12. – P. 1976–1982.
40. Krichevsky, A. M. miR-21: a small multi-faceted RNA / A. M. Krichevsky, G. Gabriely // *J. of Cellular and Molecular Medicine*. – 2009. – Vol. 13, N 1. – P. 39–53.
41. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells / J. Cheng [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2011. – Vol. 412, N 17–18. – P. 1621–1625.
42. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer / W. M. Merritt [et al.] // *New England J. of Medicine*. – 2008. – Vol. 359, N 25. – P. 2641–2650.
43. Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration / S. S. Hébert [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2010. – Vol. 19, N 20. – P. 3959–3969.
44. miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease / S. Haramati [et al.] // *Proc. of the Nat. Acad. of Sciences*. – 2010. – Vol. 107, N 29. – P. 13111–13116.
45. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium *in vivo* and *in vitro* / Y. Fang [et al.] // *Proc. of the Nat. Acad. of Sciences*. – 2010. – Vol. 107, N 30. – P. 13450–13455.
46. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study / L. Kong [et al.] // *Acta Diabetologica*. – 2011. – Vol. 48, N 1. – P. 61–69.
47. Ji, L. Regulation of small RNA stability: methylation and beyond / L. Ji, X. Chen // *Cell Research*. – 2012. – Vol. 22, N 4. – P. 624–636.

48. Davies, B. P. A fluorescence probe for assaying micro RNA maturation / B. P. Davies, C. Arenz // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 16, N 1. – P. 49–55.
49. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies / M. D. Mattie [et al.] // *Molecular Cancer*. – 2006. – Vol. 5, N 1. – 14 p.
50. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways / D. Grimm [et al.] // *Nature*. – 2006. – Vol. 441, N 7092. – P. 537–541.
51. Aagaard, L. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges / L. Aagaard, J. J. Rossi // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2007. – Vol. 59, N 2–3. – P. 75–86.
52. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing *in vivo* / A. D. Judge [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2006. – Vol. 13, N 3. – P. 494–505.
53. miR-Synth: a computational resource for the design of multi-site multi-target synthetic miRNAs / A. Laganà [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42, N 9. – P. 5416–5425.
54. Bader, A. G. The promise of microRNA replacement therapy / A. G. Bader, D. Brown, M. Winkler // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70, N 18. – P. 7027–7030.
55. Ishida, M. miRNA-based therapeutic strategies / M. Ishida, F. M. Selaru // *Current Pathobiology Reports*. – 2013. – Vol. 1, N 1. – P. 63–70.
56. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs / J. Krützfeldt [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2007. – Vol. 35, N 9. – P. 2885–2892.
57. Epigenetics: novel mechanism of pulmonary hypertension / J. B. Huang [et al.] // *Lung*. – 2013. – Vol. 191, N 6. – P. 601–610.
58. Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase / H. X. Sun [et al.] // *Hypertension*. – 2012. – Vol. 60, N 6. – P. 1407–1414.
59. Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps / M. Esteller // *Nature Reviews Genetics*. – 2007. – Vol. 8, N 4. – P. 286–298.
60. Whitehead, K. A. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery / K. A. Whitehead, R. Langer, D. G. Anderson // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2009. – Vol. 8, N 2. – P. 129–138.
61. Gary, D. J. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery / D. J. Gary, N. Puri, Y. Y. Won // *J. of Controlled Release*. – 2007. – Vol. 121, N 1. – P. 64–73.
62. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics / D. M. Pereira [et al.] // *Drug Discovery Today*. – 2013. – Vol. 18, N 5–6. – P. 282–289.
63. Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes / N. Weber [et al.] // *J. of Controlled Release*. – 2008. – Vol. 132, N 1. – P. 55–64.
64. Dendrimers complexed with HIV-1 peptides interact with liposomes and lipid monolayers / M. Ionov [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 2015. – Vol. 1848, N 4. – P. 907–915.
65. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Mechanisms of interaction / M. Ionov [et al.] // *Intern. J. of Pharmaceutics*. – 2015. – Vol. 485, N 1–2. – P. 261–269.
66. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action / V. Dzimtruk [et al.] // *Intern. J. of Pharmaceutics*. – 2015. – Vol. 485, N 1–2. – P. 288–294.
67. Multi-target inhibition of cancer cell growth by siRNA cocktails and 5-fluorouracil using effective piperidine-terminated phosphorus dendrimers / A. Ihnatsyev-Kachan [et al.] // *Colloids and Interfaces*. – 2017. – Vol. 1, N 1. – 18 P.
68. Titze-de-Almeida, R. The race of 10 synthetic RNAi-based drugs to the pharmaceutical market / R. Titze-de-Almeida, C. David, S. S. Titze-de-Almeida // *Pharmaceutical Research*. – 2017. – Vol. 34, N 7. – P. 1339–1363.
69. Pearson, S. China approves first gene therapy / S. Pearson, H. Jia, K. Kandachi // *Nature Biotechnology*. – 2004. – Vol. 22. – P. 3–4.
70. Valdmanis, P. N. rAAV-mediated tumorigenesis: still unresolved after an AAV assault / P. N. Valdmanis, L. Lisowski, M. A. Kay // *Molecular Therapy*. – 2012. – Vol. 20, N 11. – P. 2014–2017.
71. Booth, C. Treating immunodeficiency through HSC gene therapy / C. Booth, H. B. Gaspar, A. J. Thrasher // *Trends in Molecular Medicine*. – 2016. – Vol. 22, N 4. – P. 317–327.
72. FDA approval brings first gene therapy to the United States. CAR T-cell therapy approved to treat certain children and young adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia [Electronic resource] // U.S. Food and Drug Administration. – Mode of access: <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm574058.htm>. – Date of access: 13.12.2017.

References

1. Cech T. R., Steitz J. A. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*, 2014, vol. 157, no. 1, pp. 77–94. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.008
2. Aravin A., Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Letters*, 2005, vol. 579, no. 26, pp. 5830–5840. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.08.009
3. Sripada L., Tomar D., Prajapati P., Singh R., Singh A. K., Singh R. Systematic analysis of small RNAs associated with human mitochondria by deep sequencing: detailed analysis of mitochondrial associated miRNA. *PloS One*, 2012, vol. 7, no. 9, pp. e44873. DOI: 10.1371/journal.pone.0044873
4. Morin R. D., Aksay G., Dolgosheina E., Ebhardt H. A., Magrini V., Mardis E. R., Sahinalp S. C., Unrau P. J. Comparative analysis of the small RNA transcriptomes of *Pinus contorta* and *Oryza sativa*. *Genome Research*, 2008, vol. 18, no. 4, pp. 571–584. DOI: 10.1101/gr.6897308

5. Goldschmidt-Clermont M., Choquet Y., Girard-Bascou J., Michel F., Schirmer-Rahire M., Rochaix J. D. A small chloroplast RNA may be required for trans-splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell*, 1991, vol. 65, no. 1, pp. 135–143. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90415-u
6. Majdalani N., Vanderpool C. K., Gottesman S. Bacterial small RNA regulators. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, vol. 40, no. 2, pp. 93–113. DOI: 10.1080/10409230590918702
7. Hussain M., Asgari S. MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, vol. 111, no. 7, pp. 2746–2751. DOI: 10.1073/pnas.1320123111
8. Hamilton A. J., Baulcombe D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 1999, vol. 286, no. 5441, pp. 950–952. DOI: 10.1126/science.286.5441.950
9. Watanabe T., Totoki Y., Toyoda A., Kaneda M., Kuramochi-Miyagawa S., Obata Y., Chiba H., Kohara Y., Kono T., Nakano T., Surani M. A., Sakaki Y., Sasaki H. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 2008, vol. 453, no. 7194, pp. 539–543. DOI: 10.1038/nature06908
10. Yang N., Kazazian H. H. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, vol. 13, no. 9, pp. 763–771. DOI: 10.1038/nsmb1141
11. Mello C. C., Conte D. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 2004, vol. 431, no. 7006, pp. 338–342. DOI: 10.1038/nature02872
12. Ghildiyal M., Seitz H., Horwich M. D., Li C., Du T., Lee S., Xu J., Kittler E. L. W., Zapp M. L., Weng Z., Zamore P. D. Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*, 2008, vol. 320, no. 5879, pp. 1077–1081. DOI: 10.1126/science.1157396
13. Cao W., Hunter R., Strnatka D., McQueen C. A., Erickson R. P. DNA constructs designed to produce short hairpin, interfering RNAs in transgenic mice sometimes show early lethality and an interferon response. *Journal of Applied Genetics*, 2005, vol. 46, no. 2, pp. 217–225.
14. Yi R., Qin Y., Macara I. G., Cullen B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, 2003, vol. 17, no. 24, pp. 3011–3016. DOI: 10.1101/gad.1158803
15. Saito K., Siomi M. C. Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. *Developmental Cell*, 2010, vol. 19, no. 5, pp. 687–697. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.10.011
16. Wang H. W., Noland C., Siridechadilok B., Taylor D. W., Ma E., Felderer K., Doudna J. A., Nogales E. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2009, vol. 16, no. 11, pp. 1148–1153. DOI: 10.1038/nsmb.1673
17. Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, vol. 409, no. 6818, pp. 363–366. DOI: 10.1038/35053110
18. Brummelkamp T. R., Bernards R., Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, vol. 296, no. 5567, pp. 550–553. DOI: 10.1126/science.1068999
19. Janowski B. A., Younger S. T., Hardy D. B., Ram R., Huffman K. E., Corey D. R. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nature Chemical Biology*, 2007, vol. 3, no. 3, pp. 166–173. DOI: 10.1038/nchembio860
20. Janowski B. A., Huffman K. E., Schwartz J. C., Ram R., Hardy D., Shames D. S., Minna J. D., Corey D. R. Inhibiting gene expression at transcription start sites in chromosomal DNA with antigene RNAs. *Nature Chemical Biology*, 2005, vol. 1, no. 4, p. 216–222. DOI: 10.1038/nchembio725
21. Squadrito M. L., Baer C., Burdet F., Maderna C., Gilfillan G. D., Lyle R., Ibberson M., De Palma M. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Reports*, 2014, vol. 8, no. 5, pp. 1432–1446. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.07.035
22. Wienholds E., Plasterk R. H. A. MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters*, 2005, vol. 579, no. 26, pp. 5911–5922. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.07.070
23. Kim Y. K., Kim V. N. Processing of intronic microRNAs. *EMBO Journal*, 2007, vol. 26, no. 3, pp. 775–783. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601512
24. Cai X., Hagedorn C. H., Cullen B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 2004, vol. 10, no. 12, pp. 1957–1966. DOI: 10.1261/rna.7135204
25. Borchert G. M., Lanier W., Davidson B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2006, vol. 13, no. 12, pp. 1097–1101. DOI: 10.1038/nsmb1167
26. Han J., Lee Y., Yeom K. H., Nam J. W., Heo I., Rhee J. K., Sohn S. Y., Cho Y., Zhang B. T., Kim V. N. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 2006, vol. 125, no. 5, pp. 887–901. DOI: 10.1016/j.cell.2006.03.043
27. Brennecke J., Aravin A. A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R., Hannon G. J. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 2007, vol. 128, no. 6, pp. 1089–1103. DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.043
28. Juliano C., Wang J., Lin H. Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms. *Annual Review of Genetics*, 2011, vol. 45, no. 1, pp. 447–469. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132541
29. Hartig J. V., Tomari Y., Förstemann K. piRNAs – the ancient hunters of genome invaders. *Genes and Development*, 2007, vol. 21, no. 14, pp. 1707–1713. DOI: 10.1101/gad.1567007
30. Ishizu H., Siomi M. C. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes and Development*, 2012, vol. 26, no. 21, pp. 2361–2373. DOI: 10.1101/gad.203786.112
31. Watanabe T., Chuma S., Yamamoto Y., Kuramochi-Miyagawa S., Totoki Y., Toyoda A., Hoki Y., Fujiyama A., Shibata T., Sado T., Noce T., Nakano T., Nakatsuji N., Lin H., Sasaki H. MITOPLD is a mitochondrial protein essential for nuage formation

and piRNA biogenesis in the mouse germline. *Developmental Cell*, 2011, vol. 20, no. 3, pp. 364–375. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.01.005

32. Nishimasu H., Ishizu H., Saito K., Fukuhara S., Kamatani M. K., Bonnefond L., Matsumoto N., Nishizawa T., Nakanaga K., Aoki J., Ishitani R., Siomi H., Siomi M. C., Nureki O. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature*, 2012, vol. 491, no. 7423, pp. 284–287. DOI: 10.1038/nature11509

33. Mohn F., Handler D., Brennecke J. piRNA-guided slicing specifies transcripts for Zucchini-dependent, phased piRNA biogenesis. *Science*, 2015, vol. 348, no. 6236, pp. 812–817. DOI: 10.1126/science.aaa1039

34. Izumi N., Shoji K., Sakaguchi Y., Honda S., Kirino Y., Suzuki T., Katsuma S., Tomari, Y. Identification and functional analysis of the pre-piRNA 3' Trimmer in silkworms. *Cell*, 2016, vol. 164, no. 5, pp. 962–973. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.008

35. Saito K., Sakaguchi Y., Suzuki T., Suzuki T., Siomi H., Siomi M. C. Pimet, the Drosophila homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes and Development*, 2007, vol. 21, no. 13, pp. 1603–1608. DOI: 10.1101/gad.1563607

36. Fedyanin M. Yu., Ignatova E. O., Tyulyandin S. A. MicroRNA role in solid tumors. *Zlokachestvennye opukholi* [Malignant Tumours], 2013, no. 1 (5), pp. 3–14 (in Russian).

37. Cheng J., Deng H., Xiao B., Zhou H., Zhou F., Shen Z., Guo J. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates *in vitro* and *in vivo* tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. *Cancer Letters*, 2012, vol. 315, no. 1, pp. 12–17. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.10.004

38. Chen R. X., Xia Y. H., Xue T. C., Ye S. L. Suppression of microRNA-96 expression inhibits the invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 2012, vol. 5, no. 3, pp. 800–804. DOI: 10.3892/mmr.2011.695

39. Moon J., Xu L., Giffard R. G. Inhibition of microRNA-181 reduces forebrain ischemia-induced neuronal loss. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2013, vol. 33, no. 12, pp. 1976–1982. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.157

40. Krichevsky A. M., Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2009, vol. 13, no. 1, pp. 39–53. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x

41. Cheng J., Guo J. M., Xiao B. X., Miao Y., Jiang Z., Zhou H., Li Q. N. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clinica Chimica Acta*, 2011, vol. 412, no. 17–18, pp. 1621–1625. DOI: 10.1016/j.cca.2011.05.015

42. Merritt W. M., Lin Y. G., Han L. Y., Kamat A. A., Spannuth W. A., Schmandt R., Urbauer D., Pennacchio L. A., Cheng J. F., Nick A. M., Deavers M. T., Mourad-Zeidan A., Wang H., Mueller P., Lenburg M. E., Gray J. W., Mok S., Birrer M. J., Lopez-Berestein G., Coleman R. L., Bar-Eli M., Sood A. K. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, 2008, vol. 359, no. 25, pp. 2641–2650. DOI: 10.1056/nejmoa0803785

43. Hébert S. S., Papadopoulou A. S., Smith P., Galas M. C., Planel E., Silahatoglu A. N., Sergeant N., Buée L., De Strooper B. Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, 2010, vol. 19, no. 20, pp. 3959–3969. DOI: 10.1093/hmg/ddq311

44. Haramati S., Chapnik E., Sztainberg Y., Eilam R., Zwang R., Gershoni N., McGlinn E., Heiser P. W., Wills A. M., Wirguin I., Rubin L. L., Misawa H., Tabin C. J., Brown Jr. R., Chen A., Hornstein E. miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, vol. 107, no. 29, pp. 13111–13116. DOI: 10.1073/pnas.1006151107

45. Fang Y., Shi C., Manduchi E., Civelek M., Davies P. F. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium *in vivo* and *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, vol. 107, no. 30, pp. 13450–13455. DOI: 10.1073/pnas.1002120107

46. Kong L., Zhu J., Han W., Jiang X., Xu M., Zhao Y., Dong Q., Pang Z., Guan Q., Gao L., Zhao J., Zhao L. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetologica*, 2011, vol. 48, no. 1, pp. 61–69. DOI: 10.1007/s00592-010-0226-0

47. Ji L., Chen X. Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. *Cell Research*, 2012, vol. 22, no. 4, pp. 624–636. DOI: 10.1038/cr.2012.36

48. Davies B. P., Arenz C. A fluorescence probe for assaying micro RNA maturation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2008, vol. 16, no. 1, pp. 49–55. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.04.055

49. Mattie M. D., Benz C. C., Bowers J., Sensinger K., Wong L., Scott G. K., Fedele V., Ginzinger D., Getts R., Haqq C. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Molecular Cancer*, 2006, vol. 5, no. 1. 14 p. DOI: 10.1186/1476-4598-5-24

50. Grimm D., Stretz K. L., Jopling C. L., Storm T. A., Pandey K., Davis C. R., Marion P., Salazar F., Kay M. A. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 2006, vol. 441, no. 7092, pp. 537–541. DOI: 10.1038/nature04791

51. Aagaard L., Rossi J. J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, vol. 59, no. 2–3, pp. 75–86. DOI: 10.1016/j.addr.2007.03.005

52. Judge A. D., Bola G., Lee A. C., MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing *in vivo*. *Molecular Therapy*, 2006, vol. 13, no. 3, pp. 494–505. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.11.002

53. Laganà A., Acunzo M., Romano G., Pulvirenti A., Veneziano D., Cascione L., Giugno R., Gasparini P., Shasha D., Ferro A., Croce C. M. miR-Synth: a computational resource for the design of multi-site multi-target synthetic miRNAs. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, no. 9, pp. 5416–5425. DOI: 10.1093/nar/gku202

54. Bader A. G., Brown D., Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Research*, 2010, vol. 70, no. 18, pp. 7027–7030. DOI: 10.1158/0008-5472.can-10-2010

55. Ishida M., Selaru F. M. miRNA-based therapeutic strategies. *Current Pathobiology Reports*, 2013, vol. 1, no. 1, pp. 63–70. DOI: 10.1007/s40139-012-0004-5

56. Krützfeldt J., Kuwajima S., Braich R., Rajeev K. G., Pena J., Tuschl T., Manoharan M., Stoffel M. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. *Nucleic Acids Research*, 2007, vol. 35, no. 9, pp. 2885–2892. DOI: 10.1093/nar/gkm024
57. Huang J. B., Liang J., Zhao X. F., Wu W. S., Zhang F. Epigenetics: novel mechanism of pulmonary hypertension. *Lung*, 2013, vol. 191, no. 6, pp. 601–610. DOI: 10.1007/s00408-013-9505-1
58. Sun H. X., Zeng D. Y., Li R. T., Pang R. P., Yang H., Hu Y. L., Zhang Q., Jiang Y., Huang L. Y., Tang Y. B., Yan G. J., Zhou J. G. Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*, 2012, vol. 60, no. 6, pp. 1407–1414. DOI: 10.1161/hypertensionaha.112.197301
59. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, 2007, vol. 8, no. 4, pp. 286–298. DOI: 10.1038/nrg2005
60. Whitehead K. A., Langer R., Anderson D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009, vol. 8, no. 2, pp. 129–138. DOI: 10.1038/nrd2742
61. Gary D. J., Puri N., Won Y. Y. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 2007, vol. 121, no. 1, pp. 64–73. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.05.021
62. Pereira D. M., Rodrigues P. M., Borralho P. M., Rodrigues C. M. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. *Drug Discovery Today*, 2013, vol. 18, no. 5–6, pp. 282–289. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.10.002
63. Weber N., Ortega P., Clemente M. I., Shcharbin D., Bryszewska M., de la Mata F. J., Gómez R., Muñoz-Fernández M. A. Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. *Journal of Controlled Release*, 2008, vol. 132, no. 1, pp. 55–64. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.07.035
64. Ionov M., Ciepluch K., Garaiova Z., Melikishvili S., Michlewska S., Balcerzak Ł., Glińska S., Miłowska K., Gomez-Ramirez R., de la Mata F. J., Shcharbin D., Waczulikova I., Bryszewska M., Hianik T. Dendrimers complexed with HIV-1 peptides interact with liposomes and lipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2015, vol. 1848, no. 4, pp. 907–915. DOI: 10.1016/j.bbame.2014.12.025
65. Ionov M., Lazniewska J., Dzmirutuk V., Halets I., Loznikova S., Novopashina D., Apartsin E., Krasheninina O., Venyaminova A., Miłowska K., Nowacka O., Gomez-Ramirez R., de la Mata F. J., Majoral J. P., Shcharbin D., Bryszewska M. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (A). Mechanisms of interaction. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, vol. 485, no. 1–2, pp. 261–269. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.03.024
66. Dzmirutuk V., Szulc A., Shcharbin D., Janaszewska A., Shcharbina N., Lazniewska J., Novopashina D., Buyanova M., Ionov M., Klajnert-Maculewicz B., Gómez-Ramirez R., Mignani S., Majoral J. P., Muñoz-Fernández M. A., Bryszewska M. Anticancer siRNA cocktails as a novel tool to treat cancer cells. Part (B). Efficiency of pharmacological action. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, vol. 485, no. 1–2, pp. 288–294. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.03.034
67. Ihnatsyeu-Kachan A., Dzmirutuk V., Apartsin E., Krasheninina O., Ionov M., Loznikova S., Venyaminova A., Miłowska K., Shcharbin D., Mignani S., Muñoz-Fernández M. A., Majoral J. P., Bryszewska M. Multi-target inhibition of cancer cell growth by siRNA cocktails and 5-fluorouracil using effective piperidine-terminated phosphorus dendrimers. *Colloids and Interfaces*, 2017, vol. 1, no. 1. 18 p. DOI: 10.3390/colloids1010006
68. Titze-de-Almeida R., David C., Titze-de-Almeida S. S. The Race of 10 Synthetic RNAi-based drugs to the pharmaceutical market. *Pharmaceutical Research*, 2017, vol. 34, no. 7, pp. 1339–1363. DOI: 10.1007/s11095-017-2134-2
69. Pearson S., Jia H., Kandachi K. China approves first gene therapy. *Nature Biotechnology*, 2004, vol. 22, pp. 3–4. DOI: 10.1038/nbt0104-3
70. Valdmanis P. N., Lisowski L., Kay M. A. rAAV-mediated tumorigenesis: still unresolved after an AAV assault. *Molecular Therapy*, 2012, vol. 20, no. 11, pp. 2014–2017. DOI: 10.1038/mt.2012.220
71. Booth C., Gaspar H. B., Thrasher A. J. Treating immunodeficiency through HSC gene therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 2016, vol. 22, no. 4, pp. 317–327. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.02.002
72. FDA approval brings first gene therapy to the United States. CAR T-cell therapy approved to treat certain children and young adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *U. S. Food and Drug Administration*. Available at: <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm574058.htm> (accessed 13.12.2017).

Информация об авторах

Абашкин Виктор Михайлович – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: victor.abashkin@yandex.by.

Дмитрук Ольга Геннадьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dmitruk.olga@gmail.com.

Шербин Дмитрий Григорьевич – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: d.shcharbin@gmail.com.

Information about the authors

Viktar M. Abashkin – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: victor.abashkin@yandex.by.

Volha G. Dzmirutuk – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dmitruk.olga@gmail.com.

Dzmitry G. Shcharbin – D. Sc. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: d.shcharbin@gmail.com.