

УДК 616-006.6-085:577.212

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-1-160-171>

МикроРНК и малые интерферирующие РНК как инструменты направленной регуляции клеточных процессов для терапии онкологических заболеваний

Комина А.В.^{1,2}, Лаврентьев С.Н.³, Рукша Т.Г.³

¹ Красноярский научный центр (КНЦ) Сибирского отделения Российской академии наук (СО РАН)
Россия, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 50

² Национальный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) гематологии
Россия, 660036, г. Красноярск, ул. Академгородок, 15А

³ Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого)
Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

РЕЗЮМЕ

МикроРНК и малые интерферирующие РНК (миРНК) относятся к обширному классу малых некодирующих РНК и играют важную роль в регуляции экспрессии генов в клетках. Показано, что изменения в количестве или эффективности воздействия этих молекул могут сопровождать развитие различных заболеваний, включая онкологические. Это позволило рассматривать их как перспективные диагностические и прогностические маркеры, а также инструменты для направленной регуляции синтеза белков в клетке и мишени для терапии. В данном обзоре суммированы основные знания о биогенезе, распространении и механизмах воздействия микроРНК и миРНК, а также способы направленного влияния на экспрессию генов с их помощью, используемые в настоящее время. Рассмотрены возможные варианты доставки молекул в клетку *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: малые некодирующие РНК, регуляция экспрессии генов, направленная терапия, онкологические заболевания.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Публикация подготовлена при поддержке гранта Российского научного фонда (соглашение № 19-15-00110).

Для цитирования: Комина А.В., Лаврентьев С.Н., Рукша Т.Г. МикроРНК и малые интерферирующие РНК как инструменты направленной регуляции клеточных процессов для терапии онкологических заболеваний. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (1): 160–171. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-1-160-171>.

MicroRNAs and small interfering RNAs as tools for the directed regulation of cellular processes for cancer therapy

Komina A.V.^{1,2}, Lavrentiev S.N.³, Ruksha T.G.³

¹ Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch the Russian Academy of Sciences
50, Akademgorodok Str., Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation

✉ Комина Анна Владимировна, e-mail: komivlann@yandex.ru.

² National Research Medical Center of Gematology
15a, Akademgorodok Str., Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation

³ Krasnoyarsk State Medical University n.a. prof. V.F. Voyno-Yasenetsky
1, P. Zheleznyaka Str., 660022, Russian Federation

ABSTRACT

MicroRNAs and small interfering RNAs (siRNAs) belong to an extensive class of small non-coding RNAs and play an important role in gene expression regulation in cells. It is shown that changes in the amount or activity of these molecules may lead to the development of various diseases, including cancer. This made it possible to consider them as promising diagnostic and prognostic markers, as well as tools for the directed regulation of protein synthesis in the cell and targets for therapy. This review summarizes the basic knowledge about the biogenesis, distribution and the mechanisms of action of microRNA and siRNA, as well as currently used ways of target genes expression management with their help. Possible methods of these molecules delivery into the cell *in vitro* and *in vivo* are considered.

Key words: small non-coding RNA, gene expression regulation, target therapy, cancer.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The publication was prepared with the support of a grant from the Russian Science Foundation (agreement No. 19-15-00110).

For citation: Komina A.V., Lavrentiev S.N., Ruksha T.G. MicroRNAs and small interfering RNAs as tools for the directed regulation of cellular processes for cancer therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (1): 160–171. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-1-160-171>.

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК (microRNAs) и малые интерферирующие РНК (миРНК, small interfering RNAs, siRNAs) относятся к большому и гетерогенному классу малых некодирующих РНК, важной функцией которых является регуляция экспрессии генов в клетке. История изучения некодирующих РНК началась в 1993 г. с опубликования Виктором Амбросом и коллегами данных об открытии коротких молекул РНК, влияющих на трансляцию белка lin-14 нематоды *Caenorhabditis elegans* [1]. С этих пор исследования малых некодирующих РНК идут очень интенсивно. Но именно микроРНК и миРНК привлекли наибольшее внимание и были исследованы более тщательно. Накопленные знания позволяют использовать данные молекулы для воздействия на живые клетки и направленной регуляции клеточных процессов. Они получили применение как в научно-исследовательских работах, так и при разработке лекарственных препаратов в практической медицине. Особенно актуально это при терапии злокачественных новообразований, где трансформация клетки в опухолевую сопровождается существенным сдвигом экспрессии генов.

МикроРНК И МИРНК

МикроРНК – класс некодирующих белок молекул РНК длиной 18–24 нуклеотида. Они являются важными участниками процесса экспрессии генов, регулируя его интенсивность. На сегодняшний день известно несколько тысяч различных микроРНК, каждая из которых способна контролировать синтез от одного до нескольких сотен белков. В результате более 60% генов человека экспрессируются при участии микроРНК.

Изменение уровня или активности микроРНК способно вызвать нарушения в процессах синтеза тех или иных белков, что может привести к развитию заболевания. Показано, что целый ряд заболеваний сопровождается отклонениями в работе различных микроРНК. Подробное изучение взаимосвязи между работой отдельных микроРНК и патофизиологией заболеваний позволяет предположить возможность их использования в качестве молекулярных маркеров диагностики и прогноза течения заболевания, а также мишеней для направленной терапии.

МиРНК во многом сходны с микроРНК. Это молекулы размером 21–23 нуклеотида, имеющие

сходный путь созревания с микроРНК и аналогичный принцип действия, но в то же время обладающие рядом особенностей, выделяющих их в

отдельный класс [2]. В общем виде отличия микроРНК и миРНК представлены в табл. 1, а более подробно описаны ниже.

Таблица 1

Различия микроРНК и миРНК

Характеристика	МикроРНК	МиРНК
Размер молекулы	18–24 нуклеотида	21–23 нуклеотида
Структура	Одноцепочечные	Двухцепочечные
Начало биогенеза	Из интронов или отдельных участков собственной ДНК (эндогенный путь)	Из РНК вирусов или бактериальных плазмид, привнесенных в клетку, искусственных векторов и др. (экзогенный путь)
Иммуногенность	Собственные молекулы, но искусственно синтезированные микроРНК способны вызвать иммунный ответ	Могут вызывать иммунный ответ
Комплементарность мишени	Частичная комплементарность (наличие ключевого «seed»-региона)	Полная комплементарность
Мишени	ДНК, мРНК	мРНК
Специфичность	Одна молекула микроРНК регулирует множество молекул ДНК/РНК, одна молекула ДНК/РНК может быть мишенью для нескольких микроРНК	Высокоспецифичны, одна молекула миРНК связывает один участок мРНК, блокируя синтез одного белка
Результат активности	Активация или репрессия трансляции или транскрипции, возможна деградация мРНК	Деградация мРНК, «замолкание» гена
Места активности	Цитоплазма, ядро	Цитоплазма

БИОГЕНЕЗ микроРНК И МИРНК

Понимание биогенеза микроРНК и миРНК очень важно для возможности влияния на него. Согласно каноническому представлению (рис. 1), молекулы микроРНК транскрибируются в ядре РНК-полимеразой II с участков ДНК, которые могут находиться как внутри генов, кодирующих белки (в интронах), так и на обособленных участках генома под собственным промотором. Полученный РНК транскрипт называется первичной микроРНК (при-микроРНК, pri-miRNA) и формирует вторичную структуру «стебель – петля» с присутствием на 5'-конце молекул 7-метилгуанозина, а на 3'-конце поли(А)-«хвоста». После взаимодействия с ферментным комплексом, состоящим из РНКазы III (Drosha) и ее спутника DGCR8 (Pasha), при-микроРНК преобразуется в предшественник микроРНК (пре-микроРНК, pre-miRNA), состоящий только из структуры «стебель – петля». Пре-микроРНК при помощи экспортина-5 транспортируется из ядра в цитоплазму, где петельный участок отщепляется другой РНКазой III – Dicer, оставляя микроРНК-дуплекс, состоящий из двух полностью или частично комплементарных цепочек РНК размером 18–24 нуклеотида. Впоследствии одна из цепей дуплекса (ведущая) формирует комплекс с белками, называемый РНК-индуцируемым комплексом замолкания генов (RNA induced silencing complex,

RISC), тогда как другая («пассажирская» цепь), как правило, разрушается.

МиРНК в процессе созревания проходят путь, сходный с микроРНК. И хотя, в отличие от последних, синтез миРНК в клетках млекопитающих начинается не из собственного генома, а с векторных молекул, привнесенных в клетку извне (бактериями, вирусами или искусственно), в ее биогенезе участвуют те же белки (Dicer), а созревание завершается формированием RISC-комплекса. Кроме того, миРНК может сформироваться в клетке в результате расщепления в клетке человека РНК вируса. Зрелая молекула миРНК сохраняет структуру дуплекса.

ТРАНСПОРТ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ микроРНК В ОРГАНИЗМЕ

После созревания молекулы микроРНК могут быть перенесены в различные участки клетки или за ее пределы (рис. 2). Часть из них остается в цитоплазме, где взаимодействует с матричной РНК на различных этапах трансляции, регулируя синтез белка. Другая часть молекул транспортируется в межклеточное пространство и циркулирует в организме свободно в виде рибонуклеопротеиновых комплексов или в экзосомах [3, 4]. Экзосомы экскретируются клеткой и разносятся по всему организму, обнаруживаясь в межклеточном пространстве (внеклеточный

матрикс), плазме крови, синовиальной жидкости, ликворе, слюне, моче и других жидких средах и перенося микроРНК из клетки в клетку. Экзосомальные микроРНК могут выступать в роли маркеров для диагностики или прогнозирования течения злокачественных новообразований [5]. Еще одно направление перемещения зрелых микроРНК – обратный транспорт в ядро. По-

казано, что большинство микроРНК способны к такому обратному переносу и выявляются как в ядре, так и в ядрышках [6]. Кроме того, в ядре также осуществляется регуляция экспрессии генов с участием RISC-комплекса, для чего белки, участвующие в данном процессе (AGO, TRPV, Dicer, TRNC6A), свободно переносятся из цитоплазмы в ядро [7].

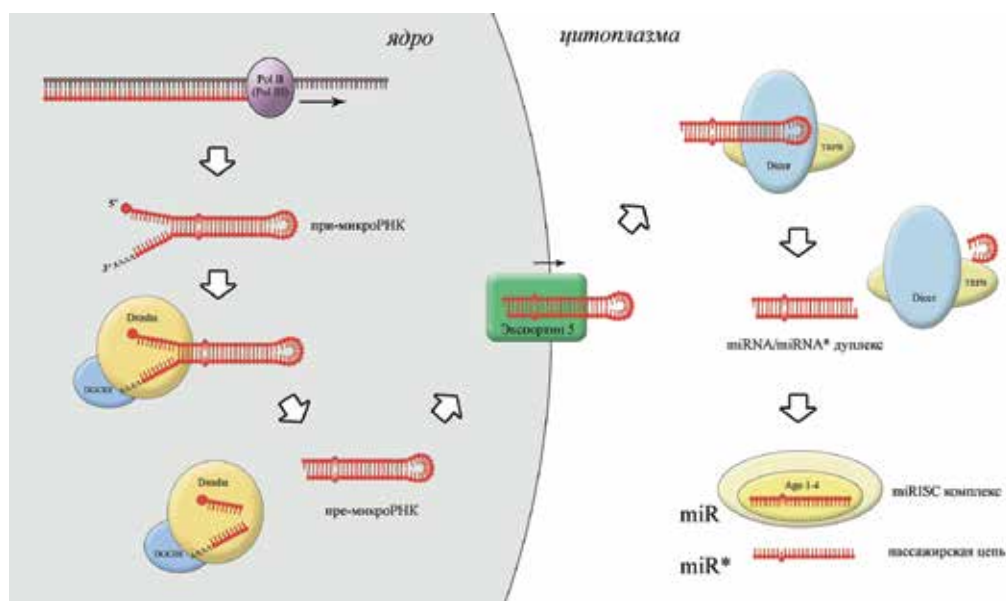


Рис. 1. Каноническая схема биогенеза микроРНК

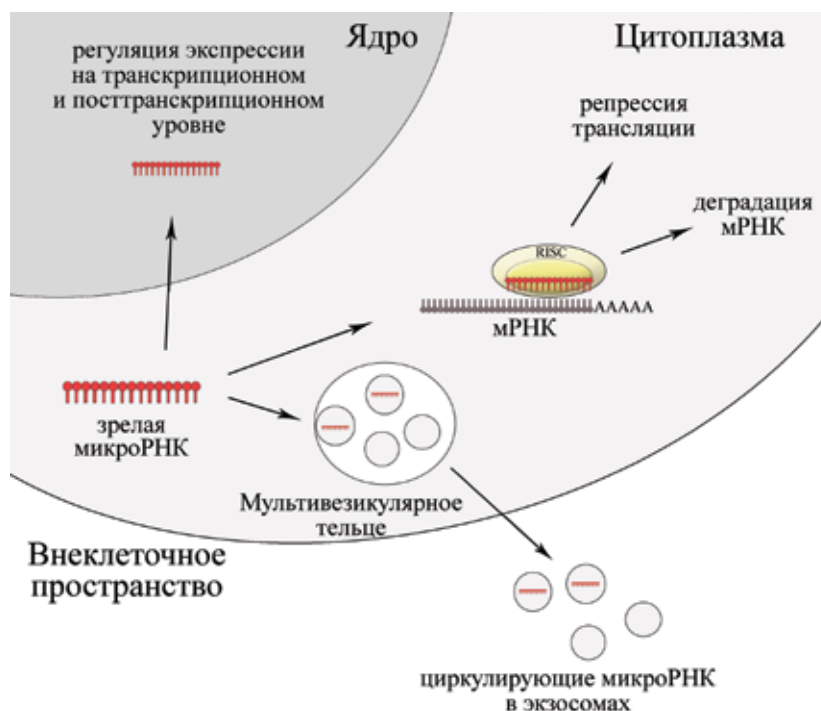


Рис. 2. Транспорт зрелой микроРНК в организме

МиРНК при попадании или образовании в клетке, как правило, сохраняются в цитоплазме, осуществляя регуляцию посредством взаимодействия с мРНК. В 2004 г. Н. Kawasaki и К. Taiga было показано, что миРНК способны индуцировать метилирование ДНК клетки посредством взаимодействия с CpG островками в промоторной части гена, однако свободное проникновение и постоянное присутствие миРНК в клеточном ядре при этом доказаны не были [8]. Механизм доставки миРНК к геномной ДНК до сих пор остается до конца не ясным.

ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ С УЧАСТИЕМ микроРНК

Наиболее изученным способом регуляции синтеза белка является взаимодействие микроРНК с матричной РНК в цитоплазме клетки. МикроРНК связываются с мРНК в специфических комплементарных участках (мишеневых сайтах, target sites). Наиболее часто эти сайты встречаются в 3'-нетранслируемом регионе мРНК (3'-untranslated region, 3'-UTR), но, в целом, обнаруживаются и в кодирующей части (coding sequence, CDS), и даже в 5'-UTR [9]. Как правило, сайт связывания на молекуле мРНК обладает высокой консервативностью, чтобы случайные мутации или полиморфизмы не нарушали синтез белка. При этом одна мРНК может быть мишенью для множества микроРНК, и их совместное участие определяет степень подавления синтеза белка.

В отличие от растений, у животных полная комплементарность микроРНК гену-мишени практически не встречается, но доказано, что в этом случае для эффективного связывания RISC-комплекса достаточно комплементарности мишени молекуле лишь участка со второго по восьмой нуклеотид на 5'-конце молекулы микроРНК, названного ключевым («seed») регионом. Хотя существуют микроРНК, осуществляющие регуляцию иным способом: доказано, что miR-24 принимает участие в регуляции клеточных процессов посредством воздействия на гены-мишени, не содержащие участка, комплементарного ее «seed»-региону [10]. В любом случае, результатом присоединения микроРНК является воздействие белковой части комплекса RISC на мишеневую мРНК.

Основным белком RISC-комплекса у человека является фермент семейства Argonaute AGO2, который представляет собой структурный аналог РНКазы H, и потому обладает способностью напрямую расщеплять молекулы мРНК на участках, определяемых микроРНК. Благодаря его действию возможна деградация молекулы мРНК по-

сле встречи с микроРНК. Однако показано, что это происходит лишь в 29% случаев, тогда как примерно в половине случаев (48%) взаимодействие с микроРНК приводит к репрессии трансляции без разрушения матрицы, а в 23% отмечается одновременное протекание двух этих процессов [11]. Предполагается, что способ регуляции может зависеть от места посадки микроРНК. Связывание микроРНК с мРНК в 3'-некодирующей области (3'-UTR) с большей вероятностью приведет к деградации мишени РНК за счет деадезилации поли(А)-«хвоста» и, как следствие, дестабилизации и быстрой деградации молекулы [12–14]. Посадка на кодирующую часть гена более вероятно вызывает подавление синтеза полипептида на рибосоме [15]. А при связывании с 5'-некодирующим регионом (5'-UTR) матричной РНК исходом может стать как деградация мРНК за счет предварительного декэпирования 5'-конца [16], так и активация трансляции [17]. Переключение микроРНК-белкового комплекса с функции ингибирования на активацию трансляции может зависеть как от действия особых факторов (например, eIF4E), так от состояния клетки или фазы ее клеточного цикла [18]. Например, miR-206 ингибирует синтез белка KLF4 в пролиферирующих эпителиальных клетках, но активирует в иммортализованных эпителиальных клетках линии MCF10A [19]. Подобно репрессии, активация может проявляться в диапазоне от легких стимулирующих эффектов до значительного усиления синтеза полипептида.

Ядерные микроРНК способны влиять на экспрессию генов на посттранскрипционном или транскрипционном уровнях. Таким образом, они способны контролировать синтез или вызывать деградацию других микроРНК или длинных некодирующих РНК [20]. Способность микроРНК связываться с одно- или даже с двухцепочечной ДНК приводит к ингибированию [21] или активации [22] транскрипции генов. Примечательно, что в ядре микроРНК также действует в комплексе с белком Argonaute, а также другими компонентами RISC-комплекса.

РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ ПОМОЩИ МИРНК

Связыванием РНК с мишениевой молекулой мРНК является основным ее отличием от микроРНК. Молекула миРНК не имеет «seed»-региона, а обладает полной комплементарностью молекуле мРНК. По этой причине ее действие очень специфично распространяется на синтез только одного белка. Результатом ее связывания является расщепление мишени белками RISC-комплекса

на участке между 10- и 11-м нуклеотидами мРНК и полное прекращение трансляции [23].

НАРУШЕНИЯ РАБОТЫ микроРНК ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Нарушения, ассоциированные с развитием злокачественных новообразований, могут возникать на этапах биогенеза или работы микроРНК. Это могут быть мутации генов, кодирующих сами

микроРНК или важные для их синтеза белки. Несмотря на общую консервативность, возможны полиморфизмы и в мРНК на участках связывания с микроРНК. Также развитие злокачественного новообразования может быть ассоциировано с изменением уровней тех или иных микроРНК в клетке. В табл. 2 представлены примеры различных отклонений, связанных с биогенезом и действием микроРНК в клетке.

Таблица 2

Различные формы нарушений в работе микроРНК при злокачественных новообразованиях		
Вид нарушения	Заболевания	Источник
Полиморфизмы и мутации в генах белков, ассоциированных с биогенезом и действием микроРНК	Dicer1-синдром: наличие мутаций в гене <i>Dicer1</i> приводит к изменению структуры и функций белка и, как следствие, к нарушению синтеза различных микроРНК. Результатом становятся злокачественные новообразования: плевропульмональная бластома, опухоль клеток Сертоли – Лейдига, нейробластома, рабдомиосаркома и др.	[24–26]
Изменение или утрата гена, кодирующего микроРНК при хромосомных перестройках	Делеция фрагмента хромосомы 13q14 при хроническом В-клеточном лимфобластном лейкозе приводит к утрате участков, кодирующих микроРНК miR-15 и miR-16, которые являются негативными регуляторами синтеза белка BCL2. Результатом становится снижение способности клеток к апоптозу	[27, 28]
Мутации и полиморфизмы в гене, кодирующем микроРНК	Однонуклеотидная замена G>C (rs2910164) в гене, кодирующем miR-146a, приводит к изменению продукции данной микроРНК и ассоциирована с повышенным риском развития почечноклеточной карциномы, глиомы, раннего проявления семейного рака молочной железы или яичников	[29–31]
Мутации и полиморфизмы в мРНК на участках взаимодействия с микроРНК	Полиморфизм гена <i>HIF1A</i> на участке вблизи связывания «seed»-региона miR-199a приводит к повышенному синтезу белка, что ассоциировано с плохим прогнозом при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы. Однонуклеотидная замена в 3'-некодирующем регионе гена <i>SET8</i> нарушает сайт связывания с miR-502, что повышает риск раннего развития рака молочной железы	[32, 33]
Сниженное количество микроРНК	miR-143 и miR-145 имеют сниженный уровень в клетках рака желудочно-кишечного тракта и проявляют онкосупрессорные свойства при эндогенном введении	[34]
Повышенное количество микроРНК	МикроРНК miR-21 имеет относительно высокий уровень в шести видах солидных опухолей (рак молочной железы, легких, простаты, желудка, поджелудочной железы и прямой кишки), а также глиобластоме	[35, 36]

Для коррекции молекулярных процессов в клетке при помощи микроРНК возможно регулировать как количество регуляторных молекул, так и качество регуляции посредством управления способностью RISC комплекса связываться именно с мишеневым участком.

ПУТИ НАПРАВЛЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Имитаторы (мимики) микроРНК. Для искусственного повышения уровня заданной микроРНК в клетке, в нее вводят синтетические копии этой молекулы – имитаторы, или мимики (заместительная терапия). Это могут быть зрелые молекулы – прямые копии микроРНК, обладающие теми же свойствами связывать молекулы, что и их прототип, либо ее предшественники, и даже

кодирующие ее гены. Введение зрелой микроРНК является более удобным и быстрым методом воздействия. В силу небольшого размера, молекула достаточно легко проникает через клеточную мембрану в составе РНК-липидных комплексов (липидная трансфекция, или липофекция). С использованием зрелых мимиков продемонстрирована, например, возможность подавления пролиферации клеток рака желудка и колоректального рака при помощи miR-375 *in vitro* [37, 38]. Однако в случае использования мимика микроРНК для усиления эффекта репрессии синтеза белка важно помнить, что для активной работы микроРНК она должна сформировать рибонуклеопротеиновый комплекс RISC. Показано, что введение в клетку отдельно взятых молекул микроРНК, как правило, встречает ограниченный белковый

пул, и для формирования рибонуклеопротеинового комплекса они вынуждены конкурировать с эндогенными микроРНК клетки за белковые компоненты комплекса RISC и могут истощить их запасы. В результате это может привести не только к незначительному эффекту подавления трансляции мишени мРНК, но и к усилению трансляции других белков за счет нарушения регуляторных функций собственных микроРНК клетки [39]. В то же время при введении в клетку даже малых количеств экзогенной микроРНК совместно с плазидами, экспрессирующими AGO2, приводит к значительному эффекту от ее активности [40].

Введение предшественников микроРНК позволяет хотя бы частично решить проблему с формированием комплекса RISC: синтез и созревание молекулы в клетке более вероятно приведут к ее естественной встрече с AGO2. Показано даже, что введение микроРНК-дуплекса, состоящего из ведущей и пассажирской цепей, с большей вероятностью приводит к образованию активной молекулы микроРНК, чем введение зрелой одноцепочечной молекулы [41]. Также описаны возможности введения в клетку пре-микроРНК или при-микроРНК.

В целом использование имитаторов открывает широкие возможности заместительной терапии для борьбы со злокачественными новообразованиями. Так, усиление активности микроРНК miR-4779 за счет использования мимика привело к подавлению опухолевого роста, блокировке клеточного цикла и стимуляции апоптоза раковых клеток при раке прямой кишки [42]. В другом исследовании направленное введение имитатора miR-29b позволило достичь эффекта подавления развития острого миелолейкоза [43].

Ингибиторы микроРНК. Антисмысловый ингибитор представляет собой олигонуклеотид РНК, комплементарный мишени микроРНК. При их связывании образуется достаточно прочный дуплекс, что препятствует посадке микроРНК на мРНК и тем самым снимает запрет на трансляцию. Одним из естественных регуляторов активности микроРНК в организме выступают конкурентные эндогенные РНК (competitive endogenous RNA, ceRNA), включающие длинные некодирующие молекулы РНК (длинные нкРНК, long non-coding RNA, lncRNA) [44], кольцевые РНК [45], псевдогены. Благодаря присутствию в их последовательности нуклеотидов участков посадки микроРНК, эти молекулы способны выступать в роли так называемой молекулярной губки, принимающей на себя атаку микроРНК и тем

самым снимающей блок с настоящей матричной РНК [46]. При помощи такой «губки» было достигнуто почти полное удаление из клетки активных miR-221/222, что повлекло за собой усиление апоптоза клеток плоскоклеточного рака ротовой полости [47].

Экзогенные ингибиторы также показывают эффективное подавление активности мишеневых микроРНК. Но при этом возникает необходимость доставки молекулы в клетку через мембрану и сохранения ее стабильности в цитоплазме, поскольку не имеющая защиты экзогенная молекула РНК может быть быстро разрушена РНКазами. Эти проблемы частично разрешаются одним из последних поколений ингибиторов микроРНК, созданных на основе «закрытых» («запертых») нуклеиновых кислот, или LNA-ингибиторами (от англ. locked nucleic acid – закрытые нуклеиновые кислоты). Они представляют собой олигомеры длиной 12–14 нуклеотидов, имеющие в части нуклеотидов метиленовый мостик между 2'-О и 4'-С рибозного кольца. В результате такая LNA-молекула обладает более высокой устойчивостью к действию эндонуклеаз, образует более прочный дуплекс с РНК или ДНК-мишенью, а также легче проникает через клеточную мембрану (в силу малого размера) [48], и не показывает значимой токсичности для организма в экспериментах на мышах [49]. Все это делает LNA-ингибиторы перспективными для разработки лекарственных препаратов на основе принципа подавления активности микроРНК. Именно с их помощью удалось произвести деградацию miR-21 и тем самым достичь усиления апоптоза и подавления пролиферации клеток гепатоцеллюлярной карциномы [50].

СИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ

Иногда при исследовании или для разработки способа терапии заболевания возникает необходимость воздействия на определенные участки матричной РНК, не имеющие естественного сайта посадки регуляторной молекулы. Например, при возникновении онкогенной мутации гена, приводящей к изменению структуры белка, удобно было бы заблокировать синтез мутантной формы протеина, сохранив при этом работу нормального белка. Для этого требуется регуляция с распознаванием мутации в матричной РНК. В этом случае на помощь приходят искусственные молекулы микроРНК. В 2017 г. М. Acunzo и коллеги наглядно продемонстрировали возможность и преимущества создания искусственной микроРНК для направленного

ингибирования трансляции гена *KRAS*, содержащего точечную мутацию G12S для повышения чувствительности клеток рака легкого (клеточная линия A549) к лечению гефитинибом. Было продемонстрировано, что даже однонуклеотидная замена изменяет регуляторный эффект [51]. Однако, поскольку микроРНК способна оказывать влияние на несколько мРНК одновременно, это может привести к возникновению нежелательных побочных эффектов и затруднит ее использование для одной цели. Более специфичным вариантом становится использование молекулы миРНК. Но полная комплементарность миРНК делает ее менее чувствительной к полиморфизмам и мутациям. Кроме того, активность миРНК *in vivo* может быть ограничена возникновением иммунного ответа. Например, при исследовании влияния миРНК на рост клеток, несущих мутацию V617F гена *JAK2*, показано значительное снижение эффекта ингибирования под действием цитокинов [52].

Еще один вид синтетических ингибиторов микроРНК – пептидные нуклеиновые кислоты (ПНК, PNA, от англ. peptide nucleic acids). Это химические соединения, представляющие собой линейные полимерные молекулы, аналогичные ДНК, но имеющие в основе вместо сахара N-(2-аминоэтил) глицин. Преимуществом ПНК является их устойчивость к деградации нуклеазами и протеазами, а также независимость гибридизации с ДНК или РНК от концентрации солей в среде [53]. Еще одно важное свойство ПНК – чувствительность к некоплементарным основаниям. Даже один несовпадающий нуклеотид способен изменить температуру плавления дуплекса ПНК-ДНК до 15 °С, что делает их перспективными молекулами для избирательного ингибирования мишеней, содержащих однонуклеотидные мутации [54]. Кроме того, показана возможность модификации ПНК таким образом, чтобы их проникновение в клетку обеспечивалось без участия дополнительного реагента для трансфекции [55]. На сегодняшний день данный тип молекул был успешно применен для ингибирования микроРНК *in vivo* [56].

Правильный дизайн и оптимизация условий применения искусственных молекул позволяют добиться желаемого эффекта снижения или выключения синтеза белка в клетке, снизить неспецифическое воздействие, избежать токсичности или иммуногенности вводимого вещества. Это делает данные молекулы перспективными терапевтическими агентами в медицине в целом и онкологии в частности.

ДОСТАВКА МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В КЛЕТКИ

Доставка микроРНК и миРНК в клетку *in vitro* и *in vivo* до сих пор представляет затруднения и является сферой активных разработок. Во-первых, свободные молекулы РНК без какой-либо защиты или модификации легко разрушаются нуклеазами, а в животном организме также выводятся почками и печенью [57] или задерживаются в немишеневых органах. Во-вторых, на пути к опухолевой клетке в организме, как правило, возникают другие ткани и структуры (стенки кровеносных сосудов, соединительные ткани, опухолевое микроокружение), обладающие различной проницаемостью, что может существенно затруднить доставку. В-третьих, чужеродные молекулы РНК способны инициировать иммунный ответ и вызвать нежелательные побочные эффекты [58]. В-четвертых, даже в культуре *in vitro*, где достижение цели возможно введением молекул в питательную среду, для проникновения в клетку требуется преодолеть мембранный барьер. Наконец, попавшая в клетку молекула может быть лишена доступа к мишени в результате включения в эндосому [57, 59] или неспецифического взаимодействия с некоплементарными или частично комплементарными молекулами РНК.

В настоящее время разрабатываются различные методы доставки молекул РНК к опухолевым клеткам: химические, физические, биологические. К химическим методам относится использование полимерных комплексов (полиэтиленимин), липидных наночастиц (липосомы), дендримеров, неорганических соединений (оксид железа, золотые, силикатные наночастицы) [60, 61] и др. Полагается, что химические методы доставки исходно имеют невысокую эффективность трансфекции в сравнении с биологическими. Отчасти это связано с небольшой продолжительностью жизни молекул *in vivo*, их способностью связываться с сывороточными белками в крови. Однако модификации химических соединений позволяют преодолевать эти трудности, создавая устойчивые конструкции, обеспечивающие более специфичную доставку микроРНК к клеткам. Примерами являются наноструктурные липидные переносчики, имеющие на поверхности билипидного слоя положительный заряд, или молекулы, распознаваемые клеточными рецепторами, которые были успешно применены для доставки микроРНК в клеточные культуры и *in vivo* на мышинных моделях [62, 63]. К химическим методам доставки можно также отнести модификации

самих РНК, повышающие устойчивость молекул, снижающие их токсичность и (или) облегчающие проникновение в клетку (LNA, PNA). Химические методы эффективно применяются в исследованиях *in vivo*.

Физические методы доставки подходят для культур *in vitro* и включают магнитофекцию, биобалистику, электропорацию, сонопорацию, лазерную иррадиацию и др. Наиболее распространенным методом является электропорация, позволяющая при помощи электрического импульса пробить брешь в мембране, обеспечивая тем самым прямое проникновение нуклеиновых кислот в цитоплазму клетки, либо помещение нужной молекулы в экзосому для последующей доставки к клеткам. Использование экзосом повышает стабильность молекул и облегчает способ доставки *in vivo* [64], тогда как прямая доставка в клетки *in vitro* при помощи электропорации высоко ценится за простоту и эффективность [65].

Химические и физические методы доставки обеспечивают, как правило, транзистентный характер экспрессии генов, имея относительно невысокий период жизни вводимых молекул. Для более длительного эффекта используются биологические методы, а именно доставка в составе вирусных векторов (трансдукция). В качестве вектора могут быть использованы ДНК аденовирусов, ретровирусов, лентивирусов.

Аденовирусные векторы представляют собой двухцепочечные молекулы ДНК, отличаются относительной простотой использования и успешно применяются для быстрого и кратковременного введения молекул, поскольку не способны внедрять нужный ген в геномную ДНК эукариотической клетки и обеспечивать постоянный синтез заданной РНК. Однако еще одним важным их преимуществом является способность привносить в клетку чужеродные фрагменты ДНК размером до 38 кб. В отличие от них, ретровирусные РНК векторы вмещают в себя не более 8 кб чужеродной нуклеотидной последовательности, однако при этом вводят ее в геном клетки-хозяина на этапе митотического деления. Лентивирусные векторы подобны ретровирусным, но отличаются способностью вводить чужеродную последовательность в геном как делящейся, так и неделящейся клетки, находящейся в постмитотическом периоде или на стадии терминальной дифференцировки. Ретровирусные и лентивирусные векторы используются для стабильной трансфекции делящихся клеток *in vitro* и *in vivo*, демонстрируя высокую эффективность введения как мимиков, так и ингибиторов микроРНК [66]. Недостатком вирус-

ных векторов является высокая иммуногенность и потенциальная токсичность молекул, а также нестабильность вирусного генома и вероятность реверсии вируса к «дикому» типу с потерей интересующей вставки [67]. Последние разработки нацелены на модификацию конструкций для снижения или устранения негативных эффектов этих векторов [68], что открывает широкие возможности их использования в науке и клинической практике для терапии заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение регуляторных молекул микроРНК и миРНК для управления экспрессией генов в клетке представляется мощной технологией как для изучения клеточных процессов в норме и патологии, так и для терапии заболеваний, в частности злокачественных новообразований. Уже сегодня зарегистрированы патенты и проходят регистрацию ряд препаратов на основе микроРНК или миРНК для терапии заболеваний, включая хронический лимфолейкоз (регуляция гена *BCL-2*), рак печени (регуляция экспрессии *VEGF* и *KSP*), другие солидные опухоли, включая более поздние стадии прогрессии [69]. Терапии за счет направленной регуляции экспрессии генов при помощи микроРНК и миРНК прогнозируют большое будущее, называя данные препараты лекарственными средствами нового поколения. Однако многое в механизмах такой регуляции остается не до конца исследованным, и мир регуляторных молекул еще требует глубокого и многостороннего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75 (5): 843–854. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
2. Lam J.K., Chow M.Y., Zhang Y., Leung S.W. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2015; 4: e252. DOI: 10.1038/mtna.2015.23.
3. Willms E., Johansson H.J., Mäger I., Lee Y., Blomberg K.E., Sadik M., Alaarg A., Smith C.I., Lehtij J., El Andaloussi S., Wood M.J., Vader P. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci. Rep.* 2016; 6: 22519. DOI: 10.1038/srep22519.
4. Li M., Zerlinger E., Barta T., Schageman J., Cheng A., Vlassov A.V. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2014; 369 (1652): 20130502. DOI: 10.1098/rstb.2013.0502.
5. Roberson C.D., Atay S., Gercel-Taylor C., Taylor D.D. Tumor derived exosomes as mediators of disease and

- potential diagnostic biomarkers. *Cancer Biomark.* 2010–2011; 8 (4–5): 281–291. DOI: 10.3233/CBM-2011-0211.
6. Liao J.-Y., Ma L.-M., Guo Y.-H., Zhang Y.-C., Zhou H., Shao P., Chen Y.-Q., Qu L.-H. Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers. *PLoS One.* 2010; 5 (5): e10563. DOI: 10.1371/journal.pone.0010563.
 7. Gagnon K.T., Li L., Chu Y., Janowski B.A., Corey D.R. RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell Rep.* 2014; 6 (1): 211–221. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.12.013.
 8. Kawasaki H., Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature.* 2004; 431 (7005): 211–217. DOI: 10.1038/nature02889.
 9. Miranda K.C., Huynh T., Tay Y., Ang Y.S., Tam W.L., Thomson A.M., Lim B., Rigoutsos I. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell.* 2006; 126 (6): 1203–1217. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.031.
 10. Lal A., Navarro F., Maher C.A., Maliszewski L.E., Yan N., O'Day E., Chowdhury D., Dykxhoorn D.M., Tsai P., Hofmann O., Becker K.G., Gorospe M., Hide W., Lieberman J. miR-24 inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to “seedless” 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol. Cell.* 2009; 35 (5): 610–625. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.08.020.
 11. Jin H.Y., Xiao C. MicroRNA mechanisms of action: What have we learned from mice? *Front Genet.* 2015; 6: 328. DOI: 10.3389/fgene.2015.00328.
 12. Hausser J., Syed A.P., Bilén B., Zavolan M. Analysis of CDS-located miRNA target sites suggests that they can effectively inhibit translation. *Genome Res.* 2013; 23 (4): 604–615. DOI: 10.1101/gr.139758.112.
 13. Takimoto K., Wakiyama M., Yokoyama S. Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA.* 2009; 15 (6): 1078–1089. DOI: 10.1261/rna.1363109.
 14. Yi H., Park J., Ha M., Lim J., Chang H., Kim V.N. PABP Cooperates with the CCR4-NOT complex to promote mRNA deadenylation and block precocious decay. *Mol. Cell.* 2018; 70 (6): 1081–1088. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.05.009.
 15. Lytle J.R., Yario T.A., Steitz J.A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2007; 104 (23): 9667–9672. DOI: 10.1073/pnas.0703820104.
 16. Nishihara T., Zekri L., Braun J.E., Izaurre E. miRISC recruits decapping factors to miRNA targets to enhance their degradation. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41 (18): 8692–8705. DOI: 10.1093/nar/gkt619.
 17. Ørom U.A., Nielsen F.C., Lund A.H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell.* 2008; 30 (4): 460–471. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.05.001.
 18. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007; 318 (5858): 1931–1934. DOI: 10.1126/science.1149460.
 19. Lin C.C., Liu L.Z., Addison J.B., Wonderlin W.F., Ivanov A.V., Ruppert J.M. A KLF4-miRNA-206 autoregulatory feedback loop can promote or inhibit protein translation depending upon cell context. *Mol. Cell Biol.* 2011; 31 (12): 2513–2527. DOI: 10.1128/MCB.01189-10.
 20. Leucci E., Patella F., Waage J., Holmström K., Lindow M., Porse B., Kauppinen S., Lund A.H. MicroRNA-9 targets the long non-coding RNA MALAT1 for degradation in the nucleus. *Sci. Rep.* 2013; 3: 2535. DOI: 10.1038/srep02535.
 21. Zheng L., Chen Y., Ye L., Jiao W., Song H., Mei H., Li D., Yang F., Li H., Huang K., Tong Q. MiRNA-584-3p inhibits gastric cancer progression by repressing Yin Yang 1-facilitated MMP-14 expression. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 8967. DOI: 10.1038/s41598-017-09271-5.
 22. Zhang Y., Zhang H. RNAa induced by TATA box-targeting microRNAs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017; 983: 91–111. DOI: 10.1007/978-981-10-4310-9_7.
 23. Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 2001; 15 (2): 188–200.
 24. Hill D.A., Ivanovich J., Priest J.R., Gurnett C.A., Dehner L.P., Desruisseau D., Jarzembowski J.A., Wikenheiser-Brokamp K.A., Suarez B.K., Whelan A.J., Williams G., Bracamontes D., Messinger Y., Goodfellow P.J. DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science.* 2009; 325 (5943): 965. DOI: 10.1126/science.1174334.
 25. De Kock L., Terzic T., McCluggage W.G., Stewart C.J.R., Shaw P., Foulkes W.D., Clarke B.A. DICER1 mutations are consistently present in moderately and poorly differentiated Sertoli-Leydig cell tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 2017; 41 (9): 1178–1187. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000895.
 26. Robertson J.C., Jorcyk C.L., Oxford J.T. DICER1 syndrome: DICER1 mutations in rare cancers. *Cancers (Basel).* 2018; 10 (5): e143. DOI: 10.3390/cancers10050143.
 27. Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., Iorio M.V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S.E., Aqeilan R.I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.G., Kipps T.J., Negrini M., Croce C.M. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005; 102 (39): 13944–13949. DOI: 10.1073/pnas.0506654102.
 28. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002; 99 (24): 15524–15529. DOI: 10.1073/pnas.242606799.

29. Shen J., Ambrosone C.B., DiCioccio R.A., Odunsi K., Lele S.B., Zhao H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis*. 2008; 29 (10): 1963–1966. DOI: 10.1093/carcin/bgn172.
30. Xu T., Zhu Y., Wei Q.K., Yuan Y., Zhou F., Ge Y.Y., Yang J.R., Su H., Zhuang S.M. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2008; 29 (11): 2126–2131. DOI: 10.1093/carcin/bgn195.
31. Permuth-Wey J., Thompson R.C., Burton Nabors L., Olson J.J., Browning J.E., Madden M.H., Ann Chen Y., Egan K.M. A functional polymorphism in the pre-miR-146a gene is associated with risk and prognosis in adult glioma. *J. Neurooncol.* 2011; 105 (3): 639–646. DOI: 10.1007/s11060-011-0634-1.
32. Wang X., Ren H., Zhao T., Ma W., Dong J., Zhang S., Xin W., Yang S., Jia L., Hao J. Single nucleotide polymorphism in the microRNA-199a binding site of HIF1A gene is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma risk and worse clinical outcomes. *Oncotarget*. 2016; 7 (12): 1371–13729. DOI: 10.18632/oncotarget.7263.
33. Song F., Zheng H., Liu B., Wei S., Dai H., Zhang L., Calin G.A., Hao X., Wei Q., Zhang W., Chen K. An miR-502-binding site single-nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the SET8 gene is associated with early age of breast cancer onset. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15 (19): 6292–6300. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0826.
34. Takagi T., Iio A., Nakagawa Y., Naoe T., Tanigawa N., Akao Y. Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers. *Oncology*. 2009; 77 (1): 12–21. DOI: 10.1159/000218166.
35. Volinia S., Calin G.A., Liu C.G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., Visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M., Prueitt R.L., Yanaihara N., Lanza G., Scarpa A., Vecchiarelli A., Negrini M., Harris C.C., Croce C.M. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2006; 103 (7): 2257–2261. DOI: 10.1073/pnas.0510565103.
36. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65 (14): 6029–6033. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0137.
37. Wei R., Yang Q., Han B., Li Y., Yao K., Yang X., Chen Z., Yang S., Zhou J., Li M., Yu H., Yu M., Cui Q. MicroRNA-375 inhibits colorectal cancer cells proliferation by downregulating JAK2/STAT3 and MAP3K8/ERK signaling pathways. *Oncotarget*. 2017; 8 (10): 1663–16641. DOI: 10.18632/oncotarget.15114.
38. Shen Z.Y., Zhang Z.Z., Liu H., Zhao E.H., Cao H. MiR-375 inhibits the proliferation of gastric cancer cells by repressing ERBB2 expression. *Exp. Ther. Med.* 2014; 7 (6): 1757–1761. DOI: 10.3892/etm.2014.1627.
39. Khan A.A., Betel D., Miller M.L., Sander C., Leslie C.S., Marks D.S. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat. Biotechnol.* 2009; 27 (6): 549–555. DOI: 10.1038/nbt.1543.
40. Riley K.J., Yario T.A., Steitz J.A. Association of Argonaute proteins and microRNAs can occur after cell lysis. *RNA*. 2012; 18 (9): 1581–1585. DOI: 10.1261/rna.034934.112.
41. Bader A.G., Brown D., Stoudemire J., Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther.* 2011; 18 (12): 1121–1126. DOI: 10.1038/gt.2011.79.
42. Koo K.H., Kwon H. MicroRNA miR-4779 suppresses tumor growth by inducing apoptosis and cell cycle arrest through direct targeting of PAK2 and CCND3. *Cell Death Dis.* 2018; 9 (2): 77. DOI: 10.1038/s41419-017-0100-x.
43. Huang X., Schwind S., Yu B., Santhanam R., Wang H., Hoellerbauer P., Mims A., Klisovic R., Walker A.R., Chan K.K., Blum W., Perrotti D., Byrd J.C., Bloomfield C.D., Caligiuri M.A., Lee R.J., Garzon R., Muthusamy N., Lee L.J., Marcucci G. Targeted delivery of microRNA-29b by transferrin-conjugated anionic lipopolyplex nanoparticles: a novel therapeutic strategy in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19 (9): 2355–2367. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3191.
44. Wilusz J.E., Sunwoo H., Spector D.L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 2009; 23 (13): 1494–1504. DOI: 10.1101/gad.1800909.
45. Hansen T.B., Jensen T.I., Clausen B.H., Bramsen J.B., Finsen B., Damgaard C.K., Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 2013; 495 (7441): 384–388. DOI: 10.1038/nature11993.
46. Ebert M.S., Neilson J.R., Sharp P.A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods*. 2007; 4 (9): 721–726. DOI: 10.1038/nmeth1079.
47. Zhou L., Jiang F., Chen X., Liu Z., Ouyang Y., Zhao W., Yu D. Downregulation of miR-221/222 by a microRNA sponge promotes apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells through upregulation of PTEN. *Oncol. Lett.* 2016; 12 (6): 4419–4426. DOI: 10.3892/ol.2016.5250.
48. Grünweller A., Hartmann R.K. Locked nucleic acid oligonucleotides: the next generation of antisense agents? *BioDrugs*. 2007; 21 (4): 235–243. DOI: 10.2165/00063030-200721040-00004.
49. Палкина Н.В., Комина А.В., Аксененко М.Б., Белоногов Р.Н., Лаврентьев С.Н., Рукша Т.Г. Жизнеспособность клеток меланомы В16 *in vitro* и токсичность ингибитора miR-204-5p (LNATM) *in vivo* при модуляции экспрессии miR-204-5p мышей. *Цитология*. 2018; 60 (3): 180–187. DOI: 10.31116/tsitol.2018.03.04.
50. Najafi Z., Sharifi M., Javadi G. Degradation of miR-21 induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2015; 22 (11): 530–535. DOI: 10.1038/cgt.2015.51.
51. Acunzo M., Romano G., Nigita G., Veneziano D., Fattore L., Lagana A., Zanesi N., Fadda P., Fassan M., Rizzotto L., Kladney R., Coppola V., Croce C.M. Selective

- targeting of point-mutated KRAS through artificial microRNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2017; 114 (21): e4203–4212. DOI: 10.1073/pnas.1620562114.
52. Jedidi A., Marty C., Oligo C., Jeanson-Leh L., Ribeil J.A., Casadevall N., Galy A., Vainchenker W., Villeval J.L. Selective reduction of JAK2V617F-dependent cell growth by siRNA/shRNA and its reversal by cytokines. *Blood*. 2009; 114 (9): 1842–1851. DOI: 10.1182/blood-2008-09-176875.
 53. Brown P.N., Yin H. PNA-based microRNA inhibitors elicit anti-inflammatory effects in microglia cells. *Chem. Commun. (Camb.)*. 2012; 49 (39): 4415–4417. DOI: 10.1039/c2cc36540e.
 54. Giesen U., Kleider W., Berding C., Geiger A., Orum H., Nielsen P.E. A formula for thermal stability (Tm) prediction of PNA/DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26 (21): 5004–5006. DOI: 10.1093/nar/26.21.5004.
 55. Oh S.Y., Ju Y., Kim S., Park H. PNA-based antisense oligonucleotides for microRNAs inhibition in the absence of a transfection reagent. *Oligonucleotides*. 2010; 20 (5): 225–230. DOI: 10.1089/oli.2010.0238.
 56. Fabani M.M., Abreu-Goodger C., Williams D., Lyons P.A., Torres A.G., Smith K.G.C., Enright A.J., Gait M.J., Vigorito E. Efficient inhibition of miR-155 function *in vivo* by peptide nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38 (13): 4466–4475. DOI: 10.1093/nar/gkq160.
 57. White P.J., Anastasopoulos F., Pouton C.W., Boyd B.J. Overcoming biological barriers to *in vivo* efficacy of antisense oligonucleotides. *Expert Rev. Mol. Med.* 2009; 11: e10. DOI: 10.1017/S1462399409001021.
 58. Judge A.D., Sood V., Shaw J.R., Fang D., McClintock K., MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* 2005; 23 (4): 457–462. DOI: 10.1038/nbt1081.
 59. Cheng C.J., Saltzman W.M., Slack F.J. Canonical and non-canonical barriers facing anti-miR cancer therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 2013; 20 (29): 3582–3593. DOI: 10.2174/0929867311320290004.
 60. Ben-Shushan D., Markovsky E., Gibori H., Tiram G., Scomparin A., Satchi-Fainaro R. Overcoming obstacles in microRNA delivery towards improved cancer therapy. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2014; 4 (1): 38–49. DOI: 10.1007/s13346-013-0160-0.
 61. Fernandez-Piceiro I., Badiola I., Sanchez A. Nanocarriers for microRNA delivery in cancer medicine. *Biotechnol. Adv.* 2017; 35 (3): 350–360. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.002.
 62. Pramanik D., Campbell N.R., Karikari C., Chivukula R., Kent O.A., Mendell J.T., Maitra A. Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Mol. Cancer Ther.* 2011; 10 (8): 1470–1480. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0152.
 63. Chen Y., Zhu X., Zhang X., Liu B., Huang L. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Mol. Ther.* 2010 Sept.; 18 (9): 1650–1656. DOI: 10.1038/mt.2010.136.
 64. Zhang D., Lee H., Zhu Z., Minhas J.K., Jin Y. Enrichment of selective miRNAs in exosomes and delivery of exosomal miRNAs *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2016; 312 (1): L110–121. DOI: 10.1152/ajplung.00423.2016.
 65. Montoya M.M., Ansel K.M. Small RNA transfection in primary human Th17 cells by next generation electroporation. *J. Vis. Exp.* 2017 Apr.; 122. DOI: 10.3791/55546.
 66. Yang N. An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA. *Int. J. Pharm. Investig.* 2015; 5 (4): 179–181. DOI: 10.4103/2230-973X.167646.
 67. Шахбазов А.В., Космачева С.М., Картель Н.А., Потапнев М.П. Генная терапия на основе мезенхимальных стволовых клеток человека: стратегии и методы. *Цитология и генетика*. 2010; 1: 76–82.
 68. Herrera-Carrillo E., Liu Y.P., Berkhout B. Improving miRNA delivery by optimizing miRNA expression cassettes in diverse virus vectors. *Hum. Gene Ther. Methods*. 2017; 28 (4): 177–190. DOI: 10.1089/hgtb.2017.036.
 69. Chakraborty C., Sharma A.R., Sharma G., Doss C.G.P., Lee S.S. Therapeutic miRNA and siRNA: moving from bench to clinic as next generation medicine. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2017; 8: 132–143. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.06.005.

Сведения об авторах

Комина Анна Владимировна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, КНЦ СО РАН; НМИЦ гематологии, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-2269-0298.

Лаврентьев Семен Николаевич, аспирант, КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0002-2214-1336.

Рукша Татьяна Геннадьевна, д-р мед. наук, профессор, проректор по научной работе КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск. ORCID 0000-0001-8142-4283.

(✉) Комина Анна Владимировна, e-mail: komivlann@yandex.ru.

Поступила в редакцию 16.05.2019

Подписана в печать 25.12.2019