

УДК 576.385

Изменения экспрессии микроРНК в эритроцитах, лимфоцитах и моноцитах при тяжелом течении COVID-19

А. А. Артамонов¹, Ю. В. Никитин¹, А. А. Вельмискина^{2,3}, С. В. Мосенко^{2,3}, В. С. Шиманский^{2,3}, А. Ю. Асиновская^{2,3}, С. В. Апалько^{2,3}, Н. Н. Сушенцева², А. М. Иванов¹, С. Г. Щербак^{2,3}, К. А. Кондратов^{1,2,3*}

¹Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044 Россия

²Городская больница № 40, Санкт-Петербург, 197706 Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: kondratovk.kirill@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.01.2025

Принята к печати 02.02.2026

DOI: 10.32607/actanaturae.27610

РЕФЕРАТ Существенная часть летальных исходов при тяжелом течении COVID-19 обусловлена неконтролируемой гиперактивацией иммунной системы – цитокиновым штормом. При инфекции SARS-CoV-2 в плазме крови изменяются также уровни одного из классов микроРНК – коротких регуляторных РНК. Однако недостаточно хорошо изучено изменение уровней этих молекул в различных клетках крови при тяжелом течении COVID-19. В представленной работе сравнивали уровни микроРНК в эритроцитах, моноцитах и лимфоцитах в норме и у пациентов с тяжелым COVID-19. Эритроциты и моноциты (пять здоровых доноров и пять пациентов с тяжелым COVID-19), а также лимфоциты (четыре здоровых донора и четыре пациента с тяжелым COVID-19) были получены методом FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией). Из полученных клеток выделяли РНК и проводили высокопроизводительное секвенирование малых РНК. Были проанализированы и идентифицированы как известные, так и новые микроРНК, экспрессия которых достоверно изменялась при тяжелом COVID-19. В эритроцитах обнаружено изменение экспрессии семи микроРНК (снижение пяти и повышение – двух); в лимфоцитах найдено 13 микроРНК, уровни экспрессии которых достоверно изменялись, причем у всех они были повышены, в моноцитах экспрессия 11 микроРНК была подавлена, а трех активирована. Анализ новых (ранее неизвестных) микроРНК показал снижение экспрессии трех ранее неизвестных микроРНК в лимфоцитах и повышение одной. В моноцитах и эритроцитах новые дифференциально экспрессируемые микроРНК не обнаружены. Дополнительно анализировали сигнальные пути, микроРНК с измененной экспрессией, используя с этой целью анализ обогащения микроРНК (miEAA) и базы данных мишеней микроРНК Gene Ontology (miRTarBase). В лимфоцитах выявили четыре достоверно обогащенных пути (Q-value < 0.05) и 339 обедненных, тогда как в моноцитах 118 путей были обогащены, а шесть обеднены. В эритроцитах достоверно измененных сигнальных путей не обнаружено.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА микроРНК, тяжелое течение COVID-19, эритроциты, моноциты, лимфоциты, малые РНК, NGS.

ВВЕДЕНИЕ

COVID-19 – это сложное заболевание, при котором изменяется профиль экспрессии многих молекул в клетках крови [1]. В подавляющем большинстве исследований сравнивают профили экспрессии генов, кодирующих белки. Ранее было показано, что некодирующие РНК (длинные некодирующие РНК, лнкРНК [2]) и особенно микроРНК играют ключевую регуляторную роль. В частности, микроРНК являются ключевыми регуляторами иммунного ответа, влияющими на процессы созревания, пролиферации, дифференцировки и активации иммунных клеток, продукцию антител и высвобождение воспалительных медиаторов [3]. Изменения уровней микроРНК обычно определяют в плазме и сыворотке крови. Целый спектр этих молекул признан

являются ключевыми регуляторами иммунного ответа, влияющими на процессы созревания, пролиферации, дифференцировки и активации иммунных клеток, продукцию антител и высвобождение воспалительных медиаторов [3]. Изменения уровней микроРНК обычно определяют в плазме и сыворотке крови. Целый спектр этих молекул признан

Таблица 1. Клинические данные пациентов с тяжелым течением COVID-19

| Пациент | Пол | Возраст, г. | Интерлейкин-6, пг/мл | С-реактивный белок, мг/л | Состояние на момент забора крови |
|---------|---------|-------------|----------------------|--------------------------|----------------------------------|
| 1 | Мужской | 53 | 34 | 106.7 | Тяжелое |
| 2 | Мужской | 57 | 204 | 45.1 | Тяжелое |
| 3 | Мужской | 73 | 62 | 105.7 | Тяжелое |
| 4 | Женский | 75 | 24 | 58.9 | Средней тяжести |
| 5 | Мужской | 76 | 2398 | 10.2 | Средней тяжести |

маркерами тяжелого течения COVID-19 [4]. Однако неясно, микроРНК каких клеток попадают в плазму. Также особое значение имеют изменения внутриклеточных сигнальных процессов, происходящих под влиянием некодирующих РНК. Ранее были показаны изменения уровней длинных некодирующих РНК в моноцитах и лимфоцитах при COVID-19 [5, 6]. При этом уровни микроРНК в плазме крови меняются не только под влиянием нормальных, обладающих ядром, рибосомами и митохондриями, клеток, но и лишенных этих структур эритроцитов. Известно, что профили микроРНК в эритроцитах изменяются при серповидно-клеточной анемии [7], пароксизмальной ночной гемоглобинурии [8], а также при болезни Паркинсона [9]. Кроме того, эритроциты секретируют внеклеточные везикулы, несущие многочисленные микроРНК, модулирующие иммунный ответ [10]. В нашей работе сравнивали профили экспрессии микроРНК в эритроцитах, лимфоцитах и моноцитах, полученных от контрольных доноров и пациентов с тяжелым течением COVID-19, а также оценивали изменения сигнальных путей в этих клетках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты, забор крови и сортировка клеток

Кровь забирали из срединной локтевой вены пяти контрольных доноров (четверо мужчин и одна женщина, возраст 29–73 г.) и пяти пациентов с тяжелым течением COVID-19 (четверо мужчин и одна женщина, возраст 53–76 лет). Клинические данные пациентов с тяжелым COVID-19 представлены в *табл. 1* и в *дополнительных материалах*. От всех участников исследования получено письменное информированное согласие. Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и одобрено этическим комитетом больницы № 40 (Сестрорецк, Санкт-Петербург) 18 мая 2020 г., протокол № 171.

Клетки сортировали на клеточном сортере MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter). Для сортировки эритроцитов 2 мкл цельной крови растворяли в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) и окрашивали антителами к CD235, CD45, CD41. После окрашива-

ния сортировали 5 млн событий (клеток) CD235+. Осадок замораживали на сухом льду. Для сортировки лимфоцитов и моноцитов 100 мкл цельной крови обрабатывали 1 мл раствора VersaLyse и окрашивали антителами. Подробное описание процедуры сортировки и гейтинга описано в работе [2]. После сортировки суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 2000 g.

Выделение РНК и NGS-секвенирование

К клеткам, замороженным на сухом льду, добавляли 900 мкл реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) и выделяли РНК согласно протоколу. Концентрацию РНК определяли с использованием реагента QuantiFluor RNA System (Promega, США). Качество РНК лейкоцитов определяли на приборе TapeStation (Agilent, США). Использовали только образцы с RIN > 7. Библиотеки готовили с использованием набора MGIEasy Small RNA Library Prep Kit V2.0 (BGI-940-000196-00), очищали с помощью электрофореза в 6% ПААГ, вырезая полосу 100–130 п.н., соответствующую длине транскрипта 17–47 нуклеотидов. Секвенирование проводили на приборе DNB-SEQ-G400 (BGI) с использованием набора DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set (Small RNA FCL SE50) (BGI-1000016998).

Биоинформатическая и статистическая обработка

От каждого образца был получен файл размером 700–1200 мегабайт (11–20 млн ридов на файл, Q30 (%) 93–97). Тримминг адаптера, аннотацию микроРНК и поиск новых микроРНК выполняли в веб-сервисе Mirmaster 2.0 [11]. Аннотацию известных микроРНК проводили с использованием MirBase [12] версии 22.1. Необработанные данные представлены в *дополнительных материалах*. Названия новым микроРНК присваивали с использованием встроенного алгоритма веб-сервиса Mirmaster 2.0. Графики строили в Rstudio версии 2023.09.1 + 494. Достоверность различий в уровнях как известных, так и вновь предсказанных микроРНК анализировали с использованием критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Профили микроРНК анализировали с использованием инструмента miRNA Enrichment

Analysis and Annotation Tool (miEAA 2.1) [13]. Для анализа наших данных в miEAA использовали отношение Fold change-p-value со следующей формулой: $-\log_{10}P \cdot \text{sign}(\log_2(\text{FoldChange}))$. Сигнальные пути аннотировали с использованием miRtarBase (Release 9.0 beta) [14]. Анализировали только сигнальные пути и мишени с Q-value < 0.05. Предсказание мишеней новых микроРНК выполняли с использованием сервиса miRBD [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В начале работы анализировали экспрессию микроРНК отсортированных клеток крови каждого типа (эритроцитов, лимфоцитов и моноцитов). При анализе дифференциальной экспрессии микроРНК в эритроцитах обнаружили повышение уровня двух из них и снижение пяти (рис. 1, табл. 2). Уровень всех 13 статистически значимых микроРНК в лимфоцитах оказался повышенным (рис. 1, табл. 2). Моноциты характеризовались более разнообразной картиной активации и подавления микроРНК: экспрессия трех была активирована, а 11 подавлена (рис. 1, табл. 2).

Оценка сигнальных путей, измененных под действием микроРНК в эритроцитах, лимфоцитах и моноцитах

Возможные изменения (статистическое обогащение или обеднение) сигнальных путей при тяжелом течении COVID-19 изучали с использованием анализа обогащения микроРНК (miEAA) и MirTarBase (Gene Ontology). Список путей с наименьшими Q-val показаны на рис. 2. Полный список путей (Q-value < 0.05) приведен в дополнительных материалах. Применение этих алгоритмов не выявило сигнальных путей, профиль которых статистически значимо изменяется в эритроцитах при COVID-19. Однако установлено, что микроРНК влияют на различные сигнальные пути в моноцитах и лимфоцитах.

Идентификация репертуара новых, предсказанных микроРНК, экспрессия которых изменяется при тяжелом течении COVID-19

Поиск новых микроРНК в трех клеточных популяциях (эритроциты, лимфоциты и моноциты) выявил только четыре таких микроРНК и только в моноцитах. В других типах клеток достоверных изменений уровней таких микроРНК не обнаружено (рис. 3). Последовательности этих микроРНК и их предшественников приведены в табл. 3.

Для оценки возможного влияния этих микроРНК на передачу сигналов в клетках мы попытались найти их потенциальные гены-мишени и исполь-

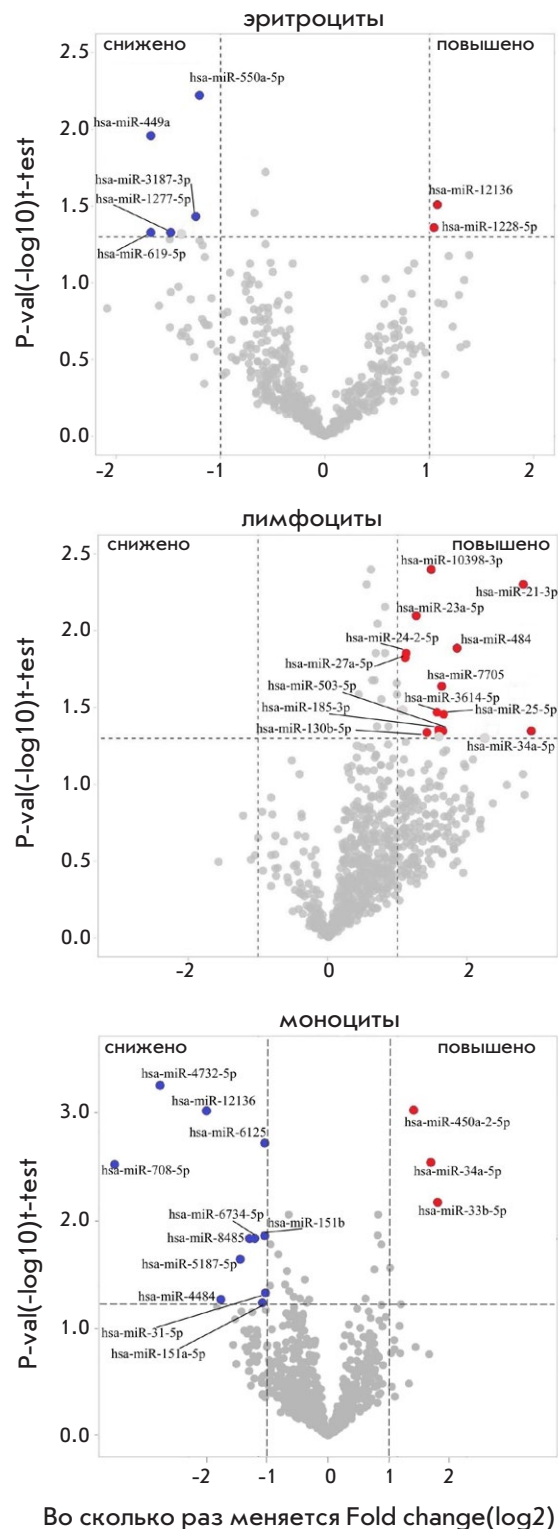


Рис. 1. Дифференциальная экспрессия микроРНК в эритроцитах, лимфоцитах и моноцитах. Из полученных данных составлены списки микроРНК, нормализованный уровень экспрессии которых достоверно изменился. Эти списки представлены в табл. 2. Fold change – кратность

Таблица 2. Дифференциальная экспрессия микроРНК в эритроцитах, лимфоцитах и моноцитах при тяжелом течении COVID-19

| микроРНК | Изменение, разы | P-val, критерий Уилкоксона–Манна–Уитни | Экспрессия |
|-------------------|-----------------|--|------------|
| Эритроциты | | | |
| hsa-miR-550a-5p | 2.25 | 0.016 | Снижена |
| hsa-miR-12136 | 2.60 | 0.016 | Повышена |
| hsa-miR-449a | 3.18 | 0.02 | Снижена |
| hsa-miR-619-5p | 3.18 | 0.021 | Снижена |
| hsa-miR-1277-5p | 2.36 | 0.032 | Снижена |
| hsa-miR-1228-5p | 2.11 | 0.032 | Повышена |
| hsa-miR-3187-3p | 2.30 | 0.036 | Снижена |
| Лимфоциты | | | |
| hsa-miR-21-3p | 6.99 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-23a-5p | 3.62 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-27a-5p | 2.18 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-24-2-5p | 2.16 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-25-5p | 3.11 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-484 | 3.17 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-34a-5p | 7.58 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-185-3p | 2.69 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-503-5p | 2.72 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-3614-5p | 3.08 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-130b-5p | 2.47 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-10398-3p | 2.80 | 0.029 | Повышена |
| hsa-miR-7705 | 2.42 | 0.029 | Повышена |
| Моноциты | | | |
| hsa-miR-4732-5p | 6.89 | 0.008 | Снижена |
| hsa-miR-12136 | 3.98 | 0.008 | Снижена |
| hsa-miR-450a-2-3p | 2.67 | 0.008 | Повышена |
| hsa-miR-708-5p | 11.62 | 0.008 | Снижена |
| hsa-miR-34a-5p | 3.21 | 0.008 | Повышена |
| hsa-miR-6734-5p | 2.34 | 0.008 | Снижена |
| hsa-miR-8485 | 2.43 | 0.008 | Снижена |
| hsa-miR-6125 | 2.07 | 0.012 | Снижена |
| hsa-miR-33b-5p | 3.52 | 0.016 | Повышена |
| hsa-miR-151b | 2.07 | 0.016 | Снижена |
| hsa-miR-4484 | 3.42 | 0.032 | Снижена |
| hsa-miR-31-5p | 2.12 | 0.032 | Снижена |
| hsa-miR-151a-5p | 2.01 | 0.032 | Снижена |
| hsa-miR-5187-5p | 2.39 | 0.036 | Снижена |

зовали с этой целью сервис miRBD [15]. Наиболее вероятные (score > 95) гены-мишени представлены в табл. 4. Полный список возможных мишеней (score > 50) приведен в дополнительных материалах. Для hsa-miR-3-3p не найдено высокооцененных мишеней (score > 95).

ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде чем обсуждать достоверность результатов, следует сделать несколько важных замечаний. Большинство изменений профилей экспрессии, скорее всего, не связаны с эффектами гипоксии, поскольку сатурация O₂ у всех пациентов с тяжелым течением COVID-19 превышала 93%, что не позволяет говорить о каком-либо воздействии на клетки крови. Эти изменения не связаны с серьезными сопутствующими заболеваниями, поскольку пациенты с такими патологиями в нашу выборку не вошли. Кроме того, следует отметить, что для оценки достоверности изменений концентраций микроРНК проведено повторное секвенирование. В результате показали, что уровни экспрессии менее 10 ридов плохо воспроизводимы при таком секвенировании. Таким образом, мы считали значимыми изменения уровней только тех микроРНК, медианные уровни которых хотя бы в одной группе (контроль или COVID-19) были выше 10 ридов. Все микроРНК, указанные нами как имеющие достоверные различия, соответствовали заявленному критерию.

Механизм изменения профиля микроРНК в эритроцитах до конца не изучен. Зрелые эритроциты лишены ядер [16] и, следовательно, не способны синтезировать пре-микроРНК. Поэтому регуляция экспрессии должна осуществляться либо на стадии вырезания пре-микроРНК, либо на стадии вырезания микроРНК. Также возможна регуляция профиля экспрессии на стадии незрелого эритроцита, обладающего ядром. Однако последний механизм маловероятен, поскольку цитокиновый шторм, индуцированный COVID-19, развивается быстро, до существенного обновления эритроцитов периферической крови. Учитывая, что средняя продолжительность жизни эритроцита составляет 120 дней [17], при тяжелом течении COVID-19 вероятно ее сокращение из-за быстрого гемолиза и обновления эритроцитов. До сих пор не совсем ясно, как быстро обновляются эти клетки при инфекции SARS-CoV-2. Известны физиологические условия, при которых изменяется профиль микроРНК в эритроцитах. Подобные изменения обычно связаны с хроническими заболеваниями или другими долгосрочными воздействиями на организм. Показано изменение паттерна экспрессии микроРНК при серповидно-клеточной анемии [7], пароксизмальной ночной гемоглобинурии [8], а также при болезни Паркинсона [9]. Кроме того, у жителей высокогорных регионов также наблюдаются изменения экспрессии микроРНК в эритроцитах [18]. микроРНК, содержащиеся в эритроцитах, не могут влиять на синтетическую способность этих клеток, поскольку эритроциты лишены рибосом, а следо-

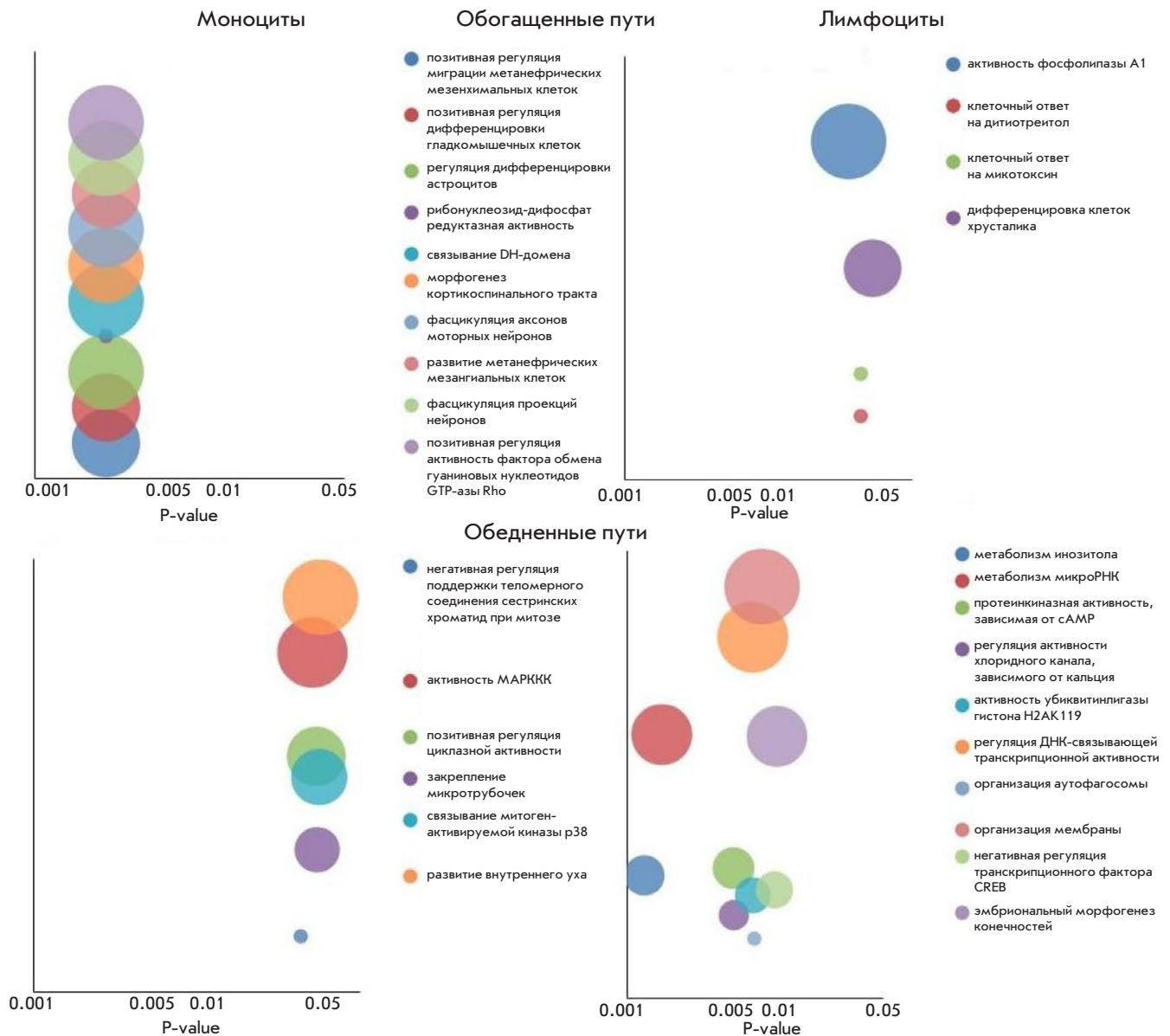


Рис. 2. Оценка основных сигнальных путей, достоверно ($Q\text{-value} < 0.05$) изменяемых микроРНК в моноцитах и лимфоцитах

вательно, трансляции и микроРНК-опосредованного сайленсинга. Однако показано, что эритроциты могут выделять везикулы, которые циркулируют в крови. Содержимое этих везикул, в том числе и микроРНК, может попадать в другую клетку, где микроРНК будет изменять экспрессию генов в этой клетке.

Сравнение изменений уровней микроРНК эритроцитов выявило активацию только двух микроРНК – miR-1228-5p и hsa-miR-12136. В различных исследованиях, связанных с COVID-19, обе эти микроРНК идентифицированы как дифференциально экспрессируемые. В частности, miR-1228-5p

входит в число 246 микроРНК, дифференциально экспрессируемых в экзосомах плазмы пациентов с COVID-19, что указывает на ее потенциальную вовлеченность в процессы цитокинового шторма [19]. hsa-miR-12136 вошла в топ-10 микроРНК, дифференциально экспрессируемых и активированных у пациентов с COVID-19. Кроме того, ROC-анализ показал, что уровни экспрессии hsa-miR-12136 наряду с другими микроРНК позволяют с высокой эффективностью отличить госпитализированных пациентов с COVID-19 от здоровых лиц контрольной группы [20]. Это совпадает с нашими наблюдениями, согласно которым величина повышения

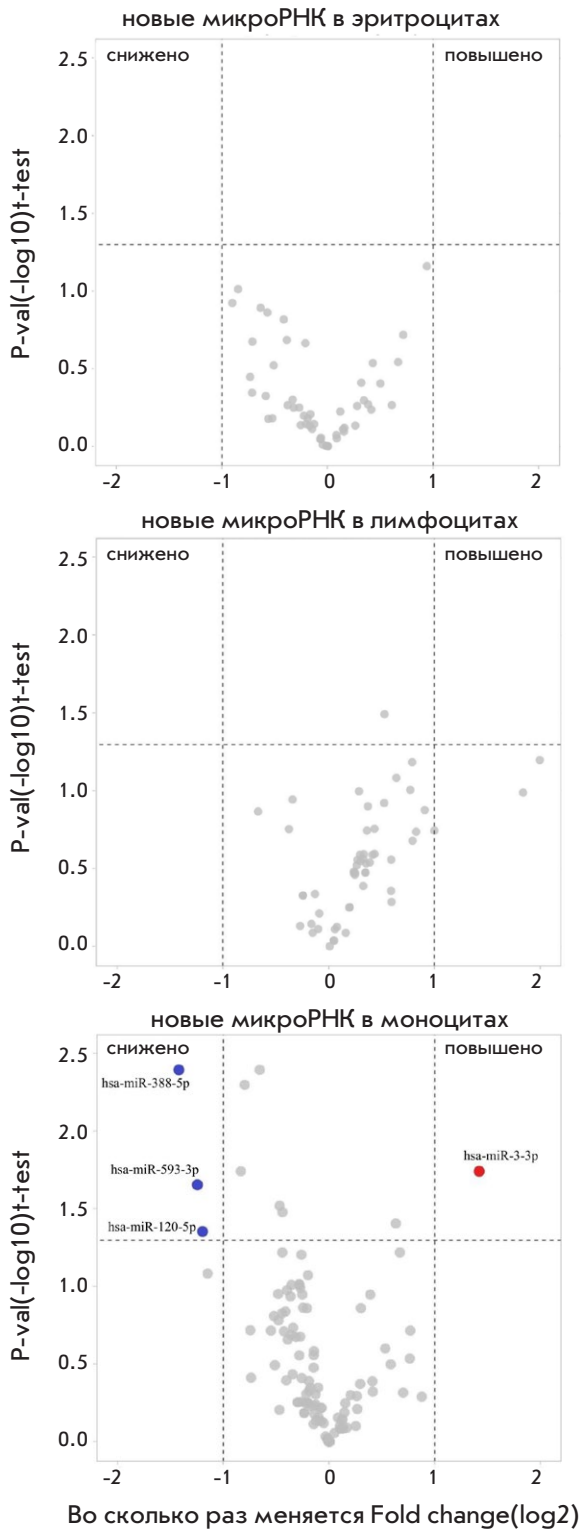


Рис. 3. Дифференциальная экспрессия новых микроРНК в эритроцитах, лимфоцитах, моноцитах

уровня hsa-miR-12136 является второй среди семи других дифференциально экспрессируемых микроРНК эритроцитов. С другой стороны, показано значительное снижение экспрессии hsa-miR-449a. Эта микроРНК идентифицирована как опухолевый супрессор при различных видах рака, включая нейробластому и рак эндометрия [21]. Известно, что hsa-miR-449a ингибирует пролиферацию опухолевых клеток, индуцируя дифференцировку клеток и вызывая остановку клеточного цикла. Например, сверхэкспрессия hsa-miR-449a при нейробластоме приводит к дифференцировке опухолевых клеток и подавлению ключевых регуляторов клеточного цикла, таких как CDK6 и LEF1 [22].

Обнаружено повышение экспрессии ряда микроРНК в лимфоцитах. Одной из них, оказалась hsa-miR-21-3p. Ранее было показано, что шесть микроРНК, включая miR-21-3p, могут непосредственно связываться с РНК вирусного генома всех коронавируса человека, включая SARS-CoV-2, и регулировать экспрессию их генов. Самый высокий уровень связывания с геномом коронавируса человека был у miR-21-3p [23]. Полученные в нашей работе данные совпадают с результатами [24], которые указывают на то, что hsa-miR-21-3p активируется при инфекции SARS-CoV-2. Эта активация связана с замедленным иммунным ответом, что может способствовать выживанию и репликации вируса. В частности, hsa-miR-21-3p взаимодействует с мРНК вирусного полипротеина 1a, что является консервативной особенностью всех коронавирусов человека [24, 25]. Другая значимо повышенная микроРНК – hsa-miR-9-5p – идентифицирована как микроРНК, способная нацеливаться на 3'-нетранслируемую область (3'UTR) гена ACE2. Белок ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент 2) необходим для проникновения SARS-CoV-2 в клетки хозяина. Регулируя ACE2, hsa-miR-9-5p потенциально может влиять на восприимчивость к инфекции и тяжесть симптомов COVID-19 [26]. Также в исследовании Haldar A. и соавт. отмечено, что hsa-miR-23a-5p ассоциирована с генами белков хозяина SARS-CoV-2, в частности с *SERPING1* [27]. Ген *SERPING1* кодирует C1-ингибитор (C1-INH), который является важным членом суперсемейства ингибиторов сериновых протеаз (serpin) [28]. C1-INH помогает контролировать воспаление, ингибируя плазменный калликреин и фактор XIIa, которые участвуют в продукции брадикинина – пептида, повышающего проницаемость кровеносных сосудов и способствующего развитию воспалительного ответа [29]. Связываясь с этими белками, C1-INH предотвращает чрезмерную продукцию брадикинина, тем самым регулируя транспорт жидкости в ткани

Таблица 3. Предсказанные новые микроРНК, экспрессия которых изменяется в моноцитах при тяжелом течении COVID-19

| микроРНК | Кратность изменений, разы | p-value критерий Уилкоксона–Манна–Уитни | Экспрессия | микроРНК, нуклеотидная последовательность | Пре-микроРНК, нуклеотидная последовательность |
|----------------|---------------------------|---|------------|---|---|
| hsa-miR-3-3p | 2.67 | 0.032 | Повышена | GGGUGCGGGCCG-GCGGGGUCCU | GACCUCGCGGCCGCCCCGCGCCUUCUGCGUCGC-GGGUGCGGGCCGCGGGGUCCU |
| hsa-miR-120-5p | 2.29 | 0.01 | Снижена | UGGGGGAGGAG-GAAGAGGAGA | UGGGGGAGGAGGAAGAG-GAGAUGGGGGAGGCAGGU-GAGCCUGACCAAGCAGCC-UGCUCUUUCUCCCUCCUCCUCCCUCCU |
| hsa-miR-593-3p | 2.37 | 0.032 | Снижена | UUUGGGGAUUC-UAAGAGGAAG | AACUCUUAGAAUCCCCA-AAGCAUUCUGUGAAGUG-GUUUGGGGAUUCUAAG-AGGAAG |
| hsa-miR-388-5p | 2.67 | 0.008 | Снижена | GUCCAGCAACUC-AGGAGGCUAAGG | GUCCAGCAACUCAGGAGGCUAAGGUGGGAGGAUCACUUGAGCCAGGAG-UUCUGGGGUCU |

во время воспалительных реакций [30]. Следует отметить, что для объяснения сердечно-сосудистых осложнений, возникающих при тяжелом течении COVID-19, теория активации брадикинина является одной из самых популярных [31]. Полученные нами данные об участии hsa-miR-23a-5p в патогенезе тяжелого COVID-19 согласуются с упомянутыми работами [27].

Среди трех активированных микроРНК моноцитов стоит отметить hsa-miR-33b-5p. Известно, что miR-33b влияет на различные функции клеток, связанные с иммунным ответом и воспалением. Она вовлечена в регуляцию продукции провоспалительных цитокинов и поляризацию макрофагов. Например, показано, что miR-33b может модулировать экспрессию генов, участвующих в воспалительных путях, тем самым влияя на выживаемость и функцию моноцитов во время воспалительных реакций [32, 33]. Кроме того, установлено, что другая микроРНК hsa-miR-151a-5p (обнаружена в нашем исследовании моноцитов) связывается непосредственно с РНК-транскриптами SARS-CoV-2 [26], в частности, нацеливаясь на ген S-белка [34]. Показано, что hsa-miR-151a-5p участвует в модуляции воспалительного ответа при инфекции SARS-CoV-2 [35]. Считается, что типичная дисрегуляция иммунного ответа, которую мы наблюдаем при COVID-19, может быть связана с изменениями уровней экспрессии ряда микроРНК, в число которых входит и hsa-miR-151a-5p [35, 36].

В дополнение к изучению дифференциальной экспрессии микроРНК в эритроцитах, лимфоцитах

и моноцитах мы подвергли наши наборы микроРНК анализу обогащения микроРНК (miEAA), что позволило проанализировать различные пути, в которые вовлечены микроРНК (рис. 2). Алгоритм miEAA работает с сигнальными путями базы GeneOntology (GO term) [37]. В ходе поиска по этой базе в эритроцитах не найдены статистически значимые обогащенные и обедненные пути. Такой результат связан с тем, что зрелый эритроцит не имеет ни мощной системы передачи сигналов, ни серьезной транскрипционной активности. Следует отметить, что в исследовании 2020 года сигнальных путей, регулируемых микроРНК, было показано, что miR-4732-3p нацелена на компоненты сигнального пути TGF-β (SMAD2 и SMAD4) [38], которые участвуют в эритропоэзе и способствуют пролиферации клеток во время эритроидной дифференцировки. Изучение регуляции гемопоэза, проведенное в 2024 году, показало, каким образом miR-7145 усиливает эритропоэз, одновременно ингибируя дифференцировку миелоидных клеток-предшественников через сигнальный путь JAK1/STAT3 [39]. Экспрессия miR-7145 коррелирует с экспрессией фактора транскрипции GATA1, ключевого для развития эритроцитов. Тем не менее упомянутые микроРНК участвуют на стадиях предшественников эритроцитов, что позволяет предположить, что обнаружение упомянутых микроРНК в зрелых эритроцитах, скорее всего, является свидетельством процессов, происходящих во время эритропоэза. Таким образом, отсутствие сигнальных путей в зрелых эритроцитах, которое мы наблюдали, можно

Таблица 4. Потенциально важные гены-мишени предсказанных микроРНК

| Предсказанная микроРНК | Ген-мишень, условная достоверность предсказания, у.е. | Ген-мишень, символ | Белок, кодируемый геном-мишенью |
|------------------------|---|--------------------|---|
| hsa-miR-120-5p | 100 | MECP2 | Метил-СpG-связывающий белок 2 |
| | 100 | PPP1R9B | Регуляторная субъединица 9B протеинфосфатазы 1 |
| | 99 | SLC6A17 | 17-й член семейства 6 переносчиков растворенных веществ |
| | 99 | WIZ | Цинковый палец WIZ |
| | 98 | NFIX | Ядерный фактор I X |
| | 98 | CASTOR2 | Цитозольный сенсор аргинина для субъединицы 2 mTORC1 |
| | 98 | NR1D1 | Первый член подсемейства D-ядерных рецепторов |
| | 97 | NLGN2 | Нейролигин 2 |
| | 97 | ELK1 | ELK1, транскрипционный фактор ETS |
| | 97 | SHISAL1 | Shisa-подобный белок 1 |
| | 96 | CAMK1D | Кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа 1D |
| | 96 | ACTB | Бета-актин |
| | 96 | HEYL | Нес-родственный фактор транскрипции семейства bHLH с последовательностью, подобной YRPW |
| | 96 | SRF | Фактор ответа на сыворотку |
| hsa-miR-593-3p | 96 | EPB41L1 | Мембранный белок полосы 4.1 эритроцитов, подобный белку 1 |
| | 98 | CEP135 | Белок centrosom 135 |
| | 98 | ELK1 | ELK1, транскрипционный фактор ETS |
| | 98 | ZNF629 | Белок с цинковым пальцем 629 |
| | 97 | SUSD2 | Белок 2 с Sushi-доменом |
| | 97 | ARGFX | Пятиарининовый гомеобокс |
| | 97 | IGF2 | Инсулиноподобный фактор роста 2 |
| | 97 | ZDHHC8 | Белок с цинковым пальцем DHHC типа 8 |
| | 97 | BCAM | Основная молекула клеточной адгезии (Лютеранская группа крови) |
| | 96 | GDF11 | Дифференцировочный фактор роста 11 |
| | 96 | TAB3 | Белок 3, связывающий киназу 1 (MAP3K7), активируемую TGF-beta |
| hsa-miR-388-5p | 96 | PKNOX2 | Белок PBX с узлом 1 и гомеобоксом 2 |
| | 96 | ZBTB39 | Белок с цинковым пальцем и ZBTB-доменом 39 |
| | 99 | STK4 | Серин/треониновая киназа 4 |
| | 98 | FOXK1 | Белок K1 с forkhead-боксом |
| | 98 | PCBP1 | Поли(rC)-связывающий белок 1 |
| | 97 | BSDC1 | Белок 1 с доменом BSD |
| | 97 | LRTOMT | Белок с трансмембранным доменом, обогащенным лейцином, и доменом O-метилтрансферазы |
| | 96 | KIAA0930 | KIAA0930 |
| | 96 | TUB | Транскрипционный фактор Tubby, состоящий из двух частей |
| 96 | NRP1 | Нейропилин 1 | |
| 96 | CRP | C-реактивный белок | |

расценивать как подтверждение низкой синтетической активности эритроцитов или ее отсутствия. Если же рассматривать статистически значимые обогащенные пути в моноцитах, то одним из наиболее заметных оказался путь позитивной регуляции миграции метанефральных мезенхимальных клеток. Некоторые микроРНК были идентифицированы как позитивные регуляторы миграции клеток.

Например, известно, что члены семейства miR-200 влияют на эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) – процесс, имеющий отношение к миграции мезенхимальных клеток [40]. Учитывая, что тяжелое течение COVID-19 приводит к иммунной гиперактивации и иммунологическому сбою [41], необходимо предположить, что обогащение, которое мы наблюдаем в этом пути, обусловлено упомяну-

тыми процессами. Другой сигнальный путь – позитивная регуляция дифференцировки гладкомышечных клеток, ассоциированных с сосудами (VSMC), важен для развития и ремоделирования сосудов. К микроРНК, вовлеченным в VSMC, относятся miR-143/145. Этот кластер микроРНК имеет решающее значение для дифференцировки VSMC. Он способствует экспрессии сократительных белков, одновременно ингибируя пути, ведущие к дедифференцировке и пролиферации. Потеря miR-143/145 приводит к нарушению дифференцировки VSMC и способствует сосудистым патологиям. Кроме того, эти микроРНК позитивно регулируются фактором ответа сыворотки (SRF) и миокардином, которые критически важны для продвижения дифференцировки VSMC путем подавления факторов, ингибирующих этот процесс [42]. Регуляция дифференцировки астроцитов (другой обнаруженный нами путь) важна для развития центральной нервной системы (ЦНС). Ключевые регуляторные факторы включают: RNF20 [43] – E3-убиквитинлигазу, TAZ (WW domain-containing transcription regulator 1) и YAP (Yes-associated protein) – транскрипционные коактиваторы, участвующие в сигнальном пути Hippo [44], и фактор транскрипции PITX1 [45], который направляет дифференцировку астроцитов, регулируя экспрессию SOX9. Участие микроРНК в этом процессе ранее не было показано. Также следует отметить, что недавние исследования подчеркнули регуляторную роль микроРНК в модуляции активности рибонуклеозиддифосфатредуктазы (RNR), в частности через регуляцию ее субъединицы RRM2. Оказалось, что hsa-miR-125b-5p и hsa-miR-30a-5p отрицательно коррелируют с экспрессией RRM2 в различных типах опухолей. Их регуляция предполагает, что эти микроРНК могут играть роль в поддержании соответствующих уровней dNTP путем модуляции активности RNR [46]. Связывание DN-домена оказалось еще одним обогащенным путем. Известно, что микроРНК взаимодействуют с РНК-связывающими белками (RBP), содержащими специфические домены, такие как DN. Модулируя уровни и активность микроРНК, RBP могут влиять на экспрессию генов-мишеней, воздействуя на такие клеточные функции, как пролиферация, дифференцировка и ответ на стресс. Показано, что перенос микроРНК во внеклеточные везикулы опосредован специфическими RBP, следовательно, этот процесс играет важную роль в межклеточной сигнализации и взаимодействиях в тканях [47]. Морфогенез кортикального тракта (CST) – еще один процесс, который, как показано ранее, регулируется микроРНК. Известно, что микроРНК часто работают совместно с РНК-связывающими

белками (RBP), которые облегчают их загрузку в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC). Показано, что микроРНК miR34/449 участвуют в тонкой настройке экспрессии генов, важных для развития спинальных интернейронов. В исследованиях на мутантных мышах, лишенных miR34/449, выявлено заметное нарушение генетических профилей нейронов спинного мозга. По-видимому, эти микроРНК необходимы для правильного формирования цепей, важных для контроля движений [48]. Также следует отметить, что микроРНК являются ключевыми регуляторными молекулами в фасцикуляции аксонов мотонейронов [49]. В мотонейронах микроРНК вовлечены в несколько процессов развития. Например, модификация экспрессии miR-9 влияет на спецификацию подтипов мотонейронов и развитие спинного мозга. Кроме того, miR-17-3p регулирует стабильность мРНК фактора транскрипции Olig2, важного для дифференцировки спинальных мотонейронов [50]. Также микроРНК играют решающую роль на ранних стадиях развития почек, особенно в дифференцировке клеток-предшественников нефрона, которые дают начало гломерулярным структурам. Показано, что специфические микроРНК, такие как члены семейства miR-30, нацелены на ключевые факторы транскрипции, такие как Lhx1, которые жизненно важны для нефрогенеза [51, 52]. Кроме того, фасцикуляция нейронов значительно зависит от микроРНК. Выявлена вовлеченность нескольких специфических микроРНК в процесс фасцикуляции. В частности, показано, что miR-8 регулирует экспрессию молекул клеточной адгезии, критических для формирования синапсов, а также может играть роль в определении направления роста аксонов во время синаптогенеза у *Drosophila* [53].

Участие микроРНК в позитивной регуляции RhoGEF особенно важно в биологии рака. Изменения экспрессии специфических микроРНК могут приводить к повышению активности RhoGEF, способствуя миграции и инвазии опухолевых клеток. Подобные процессы наблюдали при различных типах опухолей, где дисрегулированные профили микроРНК коррелируют с повышенным метастатическим потенциалом из-за измененных сигнальных путей Rho GTPазы [54].

Одним из наиболее заметных сигнальных путей в моноцитах оказался путь «развитие внутреннего уха». Следует отметить, что кластер miR-183/96/182 – это одна из групп микроРНК, функции и экспрессия которых наиболее хорошо изучены при развитии внутреннего уха. Исследования на животных моделях показали, что отключение этих микроРНК вызывает серьез-

ные дефекты в развитии волосковых клеток и потерю слуха [55, 56]. Кроме того, в моноцитах идентифицировано несколько микроРНК, регулирующих сигнальный путь MAPK. В частности, miR-203 регулирует уровни BCR-ABL, а также ингибирует пролиферацию клеток при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) путем сайленсинга мРНК компонентов пути MAPK [57]. Также известно, что miR-155 участвует в регуляции белков SOS и KRAS, влияя на активность пути MAPK/ERK. Кроме того, miR-19a регулирует RAF1 и другие компоненты каскада MAPK, влияя на общую динамику передачи сигналов этого пути. При этом miR-128 влияет на сигнализацию c-Met/PI3K/AKT, которая связана с путями MAPK, особенно при раке легких [58].

Известно, что некоторые микроРНК могут непосредственно нацеливаться на мРНК, кодирующие циклазы, приводя к их деградации или подавлению трансляции. Например, miR-282 идентифицирована как регулятор аденилатциклазы в нервной системе, что предполагает модуляцию путей, связанных с сигналами cAMP, важными для работы нейронов [59].

Наборы микроРНК в лимфоцитах не столь вовлечены в сигнальные пути GO, однако их участие, по-видимому, более специфично. В число обогащенных GO-путей входит фосфолипаза A1 (PLA1) – фермент, который гидролизует фосфолипиды, играя решающую роль в метаболизме липидов и клеточной сигнализации в лимфоцитах. Регуляция активности PLA1 тесно связана с функцией некоторых микроРНК. Например, кластер miR-17~92 регулирует выживание В-клеток, воздействуя на мРНК проапоптотических факторов, таких как BIM [60]. МикроРНК имеют решающее значение для созревания Т- и В-клеток, обеспечивая элиминацию аутореактивных клеток во время развития, для предотвращения аутоиммунитета [60]. Во время активации Т-клеток специфические микроРНК, такие как miR-155, активируются, усиливая такие эффекторные функции, как продукция цитокинов. И наоборот, другие микроРНК могут подавлять активацию для поддержания гомеостаза [61, 62]. Упомянутые микроРНК, вероятно, служат медиаторами при им-

мунологическом сбое, который происходит во время цитокинового шторма, индуцированного тяжелым течением COVID-19 [41]. Другим сигнальным каскадом, связанным с микроРНК и обнаруженным в нашем исследовании, является клеточный ответ на дитиотреитол (DTT). Ранее было показано, что miR-101 регулирует экспрессию SEL1L, который участвует в ответах на стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР). В условиях стресса ЭПР, например, индуцированного DTT, регуляция SEL1L посредством miR-101 может влиять на пути гибели нейрональных клеток [63, 64].

Особый интерес вызывают возможные гены-мишени, контролируемые предсказанными микроРНК в моноцитах (табл. 4). Так, hsa-miR-388-5p предположительно контролирует синтез С-реактивного белка – одного из белков острой фазы воспаления (табл. 4). Этот белок синтезируется клетками печени. Однако возможно, что моноциты секретируют эту микроРНК во внеклеточных везикулах с целью передачи сигнала клеткам печени. В исследованной нами системе уровень hsa-miR-388-5p в моноцитах при тяжелом течении COVID-19 снижен по сравнению со здоровыми донорами. Это может дополнительно быть фактором, вызывающим повышение уровня СРБ в крови пациентов с тяжелым течением COVID-19.

Подводя итоги нашей работы, необходимо подчеркнуть, что ее главным результатом является определение спектра микроРНК, изменяющихся в моноцитах, эритроцитах и лимфоцитах при тяжелом течении COVID-19. Этот спектр может быть использован для поиска возможных предикторов тяжелого течения COVID-19. Кроме того, наша работа поможет прояснить изменения молекулярных механизмов в клетках крови не только при цитокиновом шторме, индуцированном COVID-19, но и при других вирусных инфекциях. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта
СПбГУ ID: 95412780.*

*Приложения доступны на сайте
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.27610>*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Artamonov AA, Kondratov KA, Bystritsky EA, et al. Changes in the Repertoire of tRNA-Derived Fragments in Different Blood Cell Populations. *Life (Basel)*. 2024;14(10):1294. doi: 10.3390/life14101294
2. Kondratov KA, Artamonov AA, Nikitin YV, et al. Revealing differential expression patterns of piRNA in FACS blood cells of SARS-CoV-2 infected patients. *BMC Med Genomics*. 2024;17(1):212. doi: 10.1186/s12920-024-01982-9
3. Baulina NM, Kulakova OG, Favorova OO. MicroRNAs: The Role in Autoimmune Inflammation. *Acta Naturae*. 2016;8(1):21-33. doi: 10.32607/20758251-2016-8-1-21-33
4. Iqbal N, Kumar P. Integrated COVID-19 Predictor: Differential expression analysis to reveal potential biomarkers and prediction of coronavirus using RNA-Seq profile data. *Comput Biol Med*. 2022;147:105684. doi: 10.1016/j.complbiomed.2022.105684
5. Aznaourova M, Schmerer N, Janga H, et al. Single-cell RNA

- sequencing uncovers the nuclear decoy lincRNA PIRAT as a regulator of systemic monocyte immunity during COVID-19. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022;119(36):e2120680119. doi: 10.1073/pnas.2120680119
6. Chattopadhyay P, Mehta P, Soni J, Tardalkar K, Joshi M, Pandey R. Cell-specific housekeeping role of lncRNAs in COVID-19-infected and recovered patients. *NAR Genom Bioinform*. 2024;6(1):lqae023. doi: 10.1093/nargab/lqae023
 7. Chen SY, Wang Y, Telen MJ, Chi JT. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One*. 2008;3(6):e2360. doi: 10.1371/journal.pone.0002360
 8. Chi J-TA, Sangokoya C, de Castro C.M. MicroRNA Expression in Red Blood Cells from Patients with PNH. *Blood*. 2007;110(11):3675.
 9. Shaheen N, Shaheen A, Osama M, Nashwan AJ, Bharmauria V, Flouty O. microRNAs regulation in Parkinson's disease, and their potential role as diagnostic and therapeutic targets. *NPJ Parkinsons Dis*. 2024;10(1):186. doi: 10.1038/s41531-024-00791-2
 10. Wu Y, Leyk S, Torabi H, et al. Plasmodium falciparum infection reshapes the human microRNA profiles of red blood cells and their extracellular vesicles. *iScience*. 2023;26(7):107119. doi: 10.1016/j.isci.2023.107119
 11. Fehlmann T, Kern F, Laham O, et al. miRMaster 2.0: multi-species non-coding RNA sequencing analyses at scale. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W397-W408. doi: 10.1093/nar/gkab268
 12. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D155-D162. doi: 10.1093/nar/gky1141
 13. Backes C, Khaleeq QT, Meese E, Keller A. miEAA: microRNA enrichment analysis and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W110-W116. doi: 10.1093/nar/gkw345.
 14. Huang HY, Lin YC, Cui S, et al. miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D222-D230. doi: 10.1093/nar/gkab1079.
 15. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D127-D131. doi: 10.1093/nar/gkz757
 16. Zhang ZW, Cheng J, Xu F, et al. Red blood cell extrudes nucleus and mitochondria against oxidative stress. *IUBMB Life*. 2011;63(7):560-565. doi: 10.1002/iub.490
 17. Thiagarajan P, Parker CJ, Prchal JT. How Do Red Blood Cells Die? *Front Physiol*. 2021;12:655393. doi: 10.3389/fphys.2021.655393
 18. Sun L, Fan F, Li R, et al. Different Erythrocyte MicroRNA Profiles in Low- and High-Altitude Individuals. *Front Physiol*. 2018;9:1099. doi: 10.3389/fphys.2018.01099
 19. Chen XM, Yao DN, Wang MJ, et al. Deep Sequencing of Plasma Exosomal microRNA Level in Psoriasis Vulgaris Patients. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:895564. doi: 10.3389/fmed.2022.895564
 20. Franco S, Mateu L, Pluvinet R, et al. Altered Plasma microRNA Signature in Hospitalized COVID-19 Patients Requiring Oxygen Support. *Microorganisms*. 2024;12(3):440. doi: 10.3390/microorganisms12030440
 21. Zhao Z, Ma X, Sung D, et al. microRNA-449a functions as a tumor suppressor in neuroblastoma through inducing cell differentiation and cell cycle arrest. *RNA Biol*. 2015;12(5):538-554. doi: 10.1080/15476286.2015.1023495
 22. Ye W, Xue J, Zhang Q, et al. miR-449a functions as a tumor suppressor in endometrial cancer by targeting CDC25A. *Oncol Rep*. 2014;32(3):1193-1199. doi: 10.3892/or.2014.3303
 23. Nersisyan S, Engibaryan N, Gorbonos A, Kirdey K, Makhonin A, Tonevitsky A. Potential role of cellular miRNAs in coronavirus-host interplay. *Peer J*. 2020;8:e9994. doi: 10.7717/peerj.9994
 24. Arghiani N, Nissan T, Matin MM. Role of microRNAs in COVID-19 with implications for therapeutics. *Biomed Pharmacother*. 2021;144:112247. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112247
 25. Zhang WC, Skiados N, Aftab F, et al. microRNA-21 guide and passenger strand regulation of adenylosuccinate lyase-mediated purine metabolism promotes transition to an EGFR-TKI-tolerant persister state. *Cancer Gene Ther*. 2022;29(12):1878-1894. doi: 10.1038/s41417-022-00504-y
 26. Yang CY, Chen YH, Liu PJ, et al. The emerging role of miRNAs in the pathogenesis of COVID-19: Protective effects of nutraceutical polyphenolic compounds against SARS-CoV-2 infection. *Int J Med Sci*. 2022;19(8):1340-1356. doi: 10.1150/ijms.76168.
 27. Haldar A, Yadav KK, Singh S, Yadav PK, Singh AK. In silico analysis highlighting the prevalence of BCL2L1 gene and its correlation to miRNA in human coronavirus (HCoV) genetic makeup. *Infect Genet Evol*. 2022;99:105260. doi: 10.1016/j.meegid.2022.105260
 28. Gösswein T, Kocot A, Emmert G, et al. Mutational spectrum of the C1INH (SERPING1) gene in patients with hereditary angioedema. *Cytogenet Genome Res*. 2008;121(3-4):181-188. doi: 10.1159/000138883
 29. Wouters D, Wagenaar-Bos I, van Ham M, Zeerleder S. C1 inhibitor: just a serine protease inhibitor? New and old considerations on therapeutic applications of C1 inhibitor. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(8):1225-1240. doi: 10.1517/14712598.8.8.1225
 30. Drouet C, López-Lera A, Ghannam A, et al. SERPING1 Variants and C1-INH Biological Function: A Close Relationship With C1-INH-HAE. *Front Allergy*. 2022;3:835503. doi: 10.3389/falgy.2022.835503
 31. Wilczynski SA, Wenceslau CF, McCarthy CG, Webb RC. A Cytokine/Bradykinin Storm Comparison: What Is the Relationship Between Hypertension and COVID-19? *Am J Hypertens*. 2021;34(4):304-306. doi: 10.1093/ajh/hpaa217
 32. Sampath P, Periyasamy KM, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte and Macrophage miRNA: Potent Biomarker and Target for Host-Directed Therapy for Tuberculosis. *Front Immunol*. 2021;12:667206. doi: 10.3389/fimmu.2021.667206
 33. Ubilla CG, Prado Y, Angulo J, et al. microRNA-33b is a Potential Non-Invasive Biomarker for Response to Atorvastatin Treatment in Chilean Subjects With Hypercholesterolemia: A Pilot Study. *Front Pharmacol*. 2021;12:674252. doi: 10.3389/fphar.2021.674252
 34. Sardar R, Satish D, Birla S, Gupta D. Integrative analyses of SARS-CoV-2 genomes from different geographical locations reveal unique features potentially consequential to host-virus interaction, pathogenesis and clues for novel therapies. *Heliyon*. 2020;6(9):e04658. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04658
 35. Liang Y, Fang D, Gao X, et al. Circulating microRNAs as emerging regulators of COVID-19. *Theranostics*. 2023;13(1):125-147. doi: 10.7150/thno.78164
 36. Garnier N, Pollet K, Fourcot M, et al. Altered microRNA expression in severe COVID-19: Potential prognostic and pathophysiological role. *Clin Transl Med*. 2022;12(6):e899. doi: 10.1002/ctm2.899
 37. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology

- Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-29. doi: 10.1038/75556
38. Sun L, Yu Y, Niu B, Wang D. Red Blood Cells as Potential Repositories of MicroRNAs in the Circulatory System. *Front Genet.* 2020;11:442. doi: 10.3389/fgene.2020.00442
39. Xu Y, Guo R, Huang T, Guo C. miRNA-7145-cuedc2 axis controls hematopoiesis through JAK1/STAT3 signaling pathway. *Cell Death Discov.* 2024;10(1):209. doi: 10.1038/s41420-024-01977-6
40. Nalbant E, Akkaya-Ulum YZ. Exploring regulatory mechanisms on miRNAs and their implications in inflammation-related diseases. *Clin Exp Med.* 2024;24(1):142. doi: 10.1007/s10238-024-01334-y
41. Lucas C, Wong P, Klein J, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature.* 2020;584(7821):463-469. doi: 10.1038/s41586-020-2588-y
42. Wang G, Jacquet L, Karamariti E, Xu Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol.* 2015;593(14):3013-3030. doi: 10.1113/JP270033
43. Liang Q, Xia W, Li W, Jiao J. RNF20 controls astrocytic differentiation through epigenetic regulation of STAT3 in the developing brain. *Cell Death Differ.* 2018;25(2):294-306. doi: 10.1038/cdd.2017.157
44. Chen J, Tsai YH, Linden AK, Kessler JA, Peng CY. YAP and TAZ differentially regulate postnatal cortical progenitor proliferation and astrocyte differentiation. *J Cell Sci.* 2024;137(10):jcs261516. doi: 10.1242/jcs.261516
45. Byun JS, Oh M, Lee S, et al. The transcription factor PITX1 drives astrocyte differentiation by regulating the SOX9 gene. *J Biol Chem.* 2020;295(39):13677-13690. doi: 10.1074/jbc.RA120.013352
46. Wu L, Yin L, Ma L, et al. Comprehensive bioinformatics analysis of ribonucleoside diphosphate reductase subunit M2(RRM2) gene correlates with prognosis and tumor immunotherapy in pan-cancer. *Aging (Albany NY).* 2022;14(19):7890-7905. doi: 10.18632/aging.204315
47. Hobor F, Dallmann A, Ball NJ, et al. A cryptic RNA-binding domain mediates Syncrip recognition and exosomal partitioning of miRNA targets. *Nat Commun.* 2018;9(1):831. doi: 10.1038/s41467-018-03182-3
48. Chang SH, Su YC, Chang M, Chen JA. MicroRNAs mediate precise control of spinal interneuron populations to exert delicate sensory-to-motor outputs. *Elife.* 2021;10:e63768. doi: 10.7554/eLife.63768
49. Iyer AN, Bellon A, Baudet ML. microRNAs in axon guidance. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:78. doi: 10.3389/fncel.2014.00078
50. Kye MJ, Gonçalves I do CG. The role of miRNA in motor neuron disease. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:15. doi: 10.3389/fncel.2014.00015
51. Trionfini P, Benigni A. MicroRNAs as Master Regulators of Glomerular Function in Health and Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(6):1686-1696. doi: 10.1681/ASN.2016101117
52. Marciano DK. Mesangial Cells: The Tuft Guys of Glomerular Development. *J Am Soc Nephrol.* 2019;30(9):1551-1553. doi: 10.1681/ASN.2019070724
53. Lu CS, Zhai B, Mauss A, Landgraf M, Gygi S, van Vactor D. microRNA-8 promotes robust motor axon targeting by coordinate regulation of cell adhesion molecules during synapse development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1652):20130517. doi: 10.1098/rstb.2013.0517
54. Humphries BA, Wang Z, Yang C. microRNA Regulation of the Small Rho GTPase Regulators-Complexities and Opportunities in Targeting Cancer Metastasis. *Cancers (Basel).* 2020;12(5):1092. doi: 10.3390/cancers12051092
55. Mittal R, Liu G, Polineni SP, Bencie N, Yan D, Liu XZ. Role of microRNAs in inner ear development and hearing loss. *Gene.* 2019;686:49-55. doi: 10.1016/j.gene.2018.10.075
56. Geng R, Furness DN, Muraleedharan CK, et al. The microRNA-183/96/182 Cluster is Essential for Stereociliary Bundle Formation and Function of Cochlear Sensory Hair Cells. *Sci Rep.* 2018;8(1):18022. doi: 10.1038/s41598-018-36894-z
57. Chakraborty C, Sharma AR, Patra BC, Bhattacharya M, Sharma G, Lee SS. microRNAs mediated regulation of MAPK signaling pathways in chronic myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2016;7(27):42683-42697. doi: 10.18632/oncotarget.7977
58. Maharati A, Zanguei AS, Khalili-Tanha G, Moghbeli M. microRNAs as the critical regulators of tyrosine kinase inhibitors resistance in lung tumor cells. *Cell Commun Signal.* 2022;20(1):27. doi: 10.1186/s12964-022-00840-4
59. Wu P, Jiang X, Guo X, Li L, Chen T. Genome-Wide Analysis of Differentially Expressed microRNA in Bombyx mori Infected with Nucleopolyhedrosis Virus. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165865. doi: 10.1371/journal.pone.0165865
60. Simpson LJ, Ansel KM. microRNA regulation of lymphocyte tolerance and autoimmunity. *J Clin Invest.* 2015;125(6):2242-2249. doi: 10.1172/JCI78090
61. Rodríguez-Galán A, Fernández-Messina L, Sánchez-Madrid F. Control of Immunoregulatory Molecules by miRNAs in T Cell Activation. *Front Immunol.* 2018;9:2148. doi: 10.3389/fimmu.2018.02148
62. Podshivalova K, Salomon DR. microRNA regulation of T-lymphocyte immunity: modulation of molecular networks responsible for T-cell activation, differentiation, and development. *Crit Rev Immunol.* 2013;33(5):435-476. doi: 10.1615/critrevimmunol.2013006858
63. Omura T, Nomura L, Watanabe R, et al. microRNA-101 Regulates 6-Hydroxydopamine-Induced Cell Death by Targeting Suppressor/Enhancer Lin-12-Like in SH-SY5Y Cells. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:748026. doi: 10.3389/fnmol.2021.748026
64. Belkoshayev A, Niyazova R, Kamal MA, Ivashchenko A, Sharipov K, Wilson CM. Differential microRNA expression in the SH-SY5Y human cell model as potential biomarkers for Huntington's disease. *Front Cell Neurosci.* 2024;18:1399742. doi: 10.3389/fncel.2024.1399742