

Nekoduojančiųjų RNR reikšmė astmos patogenezei

NON-CODING RNA IN ASTHMA PATHOGENESIS

EGLĖ JURKEVIČIŪTĖ¹, ANDRIUS JANUŠKEVIČIUS¹, KĘSTUTIS MALAKAUSKAS^{1,2}

¹LSMU MA Pulmonologijos klinika Pulmonologijos laboratorija, ²LSMU MA Pulmonologijos klinika

Santrauka. Astma serga daugiau nei 300 milijonų žmonių visame pasaulyje ir 250 000 kasmet jų miršta, o ligos patogenezė vis dar nėra pakankamai iširta. Tai itin heterogeninė, lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga, kuriai būdingi dusulio, švokštimo, kosulio epizodai, pasireiškiantys dėl kvėpavimo takų obstrukcijos ir hiperreaktyvumo. Astmos uždegiminis atsakas apima daugybę skirtingų specializuotų imuninių ląstelių, iš kurių svarbiausi yra eozinofilai. Šios ląstelės patenka į kvėpavimo takus per kraują bei išskiria katijoninius baltymus, citokinus, chemokinus ir lipidų mediatorius, esančius jų citoplazminėse granulėse. Taip pat nustatyta, kad eozinofilai į aplinką gali išskirti ir nekoduojančiąsias ribonukleorūgštis (nkRNR) tarpląstelių nanopūslelių–egzosomų pagalba. Eozinofilų egzosomose yra supakuojami dideli kiekiai nkRNR, taip šios ribonukleorūgštys (RNR) pernešamos kitoms ląstelėms. Visos RNR, kurių seka nėra tiesiogiai transliuojama į baltymo seką, yra vadinamos nkRNR. Remiantis grandinės nukleotidų skaičiumi, nkRNR skirstomos į trumpąsias ir ilgąsias. Svarbiausios trumposios nkRNR yra mažosios mikro RNR (miRNR), su Piwi baltymais susijusios RNR (piRNR) bei interferuojančios RNR (siRNR), kurios skirtingais keliais, tačiau visos slopina informacinės RNR (iRNR) transliaciją į baltymus. Ilgosios nekoduojančiosios RNR (inkRNR) yra kita nkRNR rūšis, kuriai taip pat tenka svarbus vaidmuo reguliuojant genų raišką. Be to, pastebėta, kad miRNR ir inkRNR gali sąveikauti tarpusavyje ir netiesiogiai kitų mediatorių pagalba reguliuoti viena kitos raišką. Žinoma, kad nkRNR turi skirtingą raiškos profilį, priklausomai nuo ląstelės tipo ir ligos būklės. Įrodyta, kad nkRNR yra susijusios su eozinofilinės astmos patogeneze, o jų raiškos spektras gali suteikti naudingos informacijos apie šios ligos egzistavimą. Kadangi nkRNR kiekis serume yra stabilus ir atsparus kraujyje esančioms ribonukleazėms, ši molekulė gali tapti itin naudingu biožymeniu astmai ir jos fenotipams bei endotipams nustatyti. Šioje apžvalgoje pristatomos nkRNR, didžiausią dėmesį sutelkiant į šiuo metu daugiausia tyrinėjamas miRNR bei inkRNR, jų reguliuojamų genų įtaką astmos patogenezei, įvertinamas šių molekulių tinkamumas ligos diagnostikai.

Reikšminiai žodžiai: miRNR, inkRNR, astma, eozinofilai, egzosomos.

Summary. Asthma affects more than 300 million people worldwide, and 250,000 of them die each year; however, the pathogenesis of the disease has not been thoroughly investigated. Asthma is heterogeneous, chronic inflammatory airway disease characterized by episodes of dyspnea, wheezing, coughing due to airway obstruction and hyperreactivity. The inflammatory response of asthma involves many different specialized immune cells, but the most important are eosinophils. These cells are recruited to the actual site of inflammation and secrete cationic proteins, cytokines, chemokines, and lipid mediators contained in their cytoplasmic granules. It has also been found that eosinophils can release non-coding RNA (ncRNA) into the environment via their exosomes. Large quantities of ncRNA are packed in eosinophil exosomes, thereby transferring these RNAs to other cells. All RNAs that are not directly translated into the protein sequence are called ncRNAs. ncRNAs are classified as short or long, based on the number of nucleotides in their strand. The most important of the short ncRNAs are microRNA (miRNA), Piwi protein-related RNA (piRNA), and small interfering RNA (siRNA) that all inhibit the messenger RNAs translation into proteins. Long non-coding RNA (lncRNA) is another type of ncRNA that is also closely involved in the regulation of gene expression. Moreover, miRNAs and lncRNAs can interact with each other and indirectly regulate their own expression via other mediators. ncRNAs have different expression profiles depending on the cell type and disease state. One study found ncRNA is related to the eosinophilic asthma pathogenesis, and their expression spectrum can provide useful insights to the existence of the disease. Serum ncRNA levels are stable and resistant to circulating ribonucleases. Therefore, this molecule could be a beneficial biomarker for asthma and its phenotypes and endotypes. This review present ncRNAs, focusing on the current miRNAs and lncRNAs studies, the influence of its regulated genes in asthma pathogenesis, and the relevance of these molecules for disease diagnosis.

Keywords: miRNA, lncRNA, asthma, eosinophils, exosomes.

IVADAS

Astma – tai lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga. Astmos uždegiminis atsakas apima daugybę skirtingų specializuotų imuninių ląstelių (putliąsias ląsteles, eozinofilus, neutrofilus, T limfocitus, makrofagus) bei kvėpavimo takų struktūrines ląsteles (kvėpavimo takų

epitelines, fibroblastų bei bronchų lygiųjų raumenų ląsteles). Jų tarpusavio sąveika sukelia padidėjusią gleivių gamybą, lygiųjų raumenų susitraukimą, kvėpavimo takų sienelių remodeliaciją ir kvėpavimo takų susiaurėjimą [1]. Astma serga apie 4 proc. žmonių visame pasaulyje, tačiau ligos patogenezė nėra pakankamai iširta.

Moksliniai darbai ir apžvalgos

Eozinofilai yra diferencijuoti granulocitai, kurie itin svarbūs astmos patogenezėi. Šios ląstelės iš kaulų čiulpių per kraują patenka į kvėpavimo takus, kur išskiria įvairias molekules, paveikiančias kitas ląsteles ir pačius eozinofilus [2]. Taip pat nustatyta, kad eozinofilai į aplinką gali išskirti nekoduojančiąsias ribonukleorūgštis (nkRNR) egzosomų pagalba [3]. nkRNR skirstomos į ilgąsias nekoduojančiąsias RNR (inkRNR) ir trumpąsias RNR (mikro RNR (miRNR)), su Piwi baltymais susijusias RNR (piRNR) bei interferuojančias RNR (siRNR)). nkRNR reguluoja genų raišką ir pasižymi skirtingu raiškos profiliu, priklausomai nuo ląstelės tipo ir ligos sunkumo. Įrodyta, kad nkRNR gali padėti diagnozuoti eozinofilinę astmą bei prisidėti prie šios ligos vystymosi. Taip pat nustatyta, jog nkRNR kiekis serume yra stabilus ir atsparus kraujyje esančioms ribonukleazėms [4], todėl ši molekulė yra potencialus biožymuo, norint nustatyti esminius ląstelių pokyčius sergantiesiems astma.

Tyrimų, susijusių su nkRNR įtaka astmos patogenezėi, įskaitant pagrindines uždegimines ląsteles – eozinofilus, yra itin nedaug. Manoma, kad ši sritis, siekiant geriau suprasti astmos patogenezę bei diagnostinę nkRNR vertę, pritaikant individualizuotą astmos gydymą, yra nepakankamai įvertinta. Šia moksline apžvalga siekiama pristatyti nekoduojančiąsias miRNR ir inkRNR, jų reguliuojamų genų įtaką astmos patogenezėi bei įvertinti šių molekulių tinkamumą ligos diagnostikai.

METODAI

Mokslinėje apžvalgoje pateikiama informacija, gauta iš laisvai prieinamų užsienyje leidžiamų periodinių mokslo leidinių, turinčių cituojamumo rodiklį (angl. *Impact Factor*) Clarivate Analytics Web of Science, Scopus ir Springerlink duomenų bazėse. Informacija buvo renkama naudojantis National Center for Biotechnology Information (NCBI) PubMed ir PMC, Google Scholar ir Wiley Online Library paieškos sistemomis. Informacijai surinkti buvo taikyti raktiniai žodžiai (angliški atitikmenys) – nekoduojančioji RNR, mikroRNR, ilgosios nekoduojančiosios RNR, nkRNR, miRNR, inkRNR, astma, astmos fenotipai, nkRNR ir astma, nkRNR reikšmė astmos patogenezėi, eozinofilai, eozinofilų egzosomos, nkRNR ir egzosomos, eozinofilų išskiriamos nkRNR, diagnostinė nkRNR vertė.

NEKODUOJANČIOSIOS RNR

Visos RNR, kurių seka nėra tiesiogiai transliuojama į baltymo seką, t. y. visos, išskyrus iRNR, vadinamos nkRNR. Didžiąją dalį žmogaus genomo nkRNR galima suskirstyti į ribosomines RNR (rRNR), interferencijos procesus reguliuojančias inkRNR ir mažąsias RNR (mnkRNR). inkRNR sudaro ilgesnės nei 200 nukleotidų (nt) sekos ilgio RNR, skirstomos į ilgąsias

intergenines nekoduojančiąsias RNR, antiprasmines RNR, žiedines RNR ir pseudogenus [5]. Mažas nkRNR sudaro trumpesnės nei 200 nt sekos RNR, joms priskiriamos miRNR, siRNR, piRNR, mažosios branduolio (mbRNR) bei transportinės (tRNR).

Mažosios nekoduojančiosios RNR

Kaip minėta, šiai grupei priklauso miRNR, piRNR, siRNR, mbRNR bei tRNR. tRNR nekoduoja baltymų sekų, o dalyvauja baltymų sintezės procesuose, atnešdamos aminorūgštis į ribosomas. mbRNR atsakingos už RNR sekos iškirpimą iš polimerinės struktūros grandinės (splainingą) [6]. Šios dvi RNR priskiriamos mnkRNR tik pagal ilgį, tuo tarpu likusios trys eukariotų mnkRNR klasės pasižymi panašiu 20–30 nt ilgiu, visos rišasi su pagrindiniais RNR nutildymo procese dalyvaujančiais Argonautų (AGO) šeimos baltymais (angl. *argonaute protein family*), taip sudarydamos RNR indukuotus nutildymo kompleksus (angl. *RNA-induced silencing complex*, RISC), kurių pagalba vykdo potranskripcinius genų-taikinių nutildymo procesus [7].

Mažosios genų raišką reguliuojančiosios nkRNR molekulės užtildo tikslines iRNR specifiniu sekų nutildymo būdu. Pagrindinės mažosios RNR yra miRNR, piRNR ir siRNR. siRNR aptinkamos tik keletoje ląstelių rūšių, jos slopina genų raišką, sukarpydamos tikslines RNR [8]. piRNR būna ilgesnės nei siRNR arba miRNR ir rišasi su Piwi pošeimio AGO baltymais, taip pat piRNR susiformavimui nereikia specifinių endonukleazių veikimo, karpančių nesubrendusias nt grandines, kurios būtinos siRNR ir miRNR biosintezei. Tai rodo šių molekulių skirtingas veikimo vietas – piRNR daugiausia palaiko genomo vientisumą, piRNR, kaip ir siRNR, gali dalyvauti transpozonų nutildymo mechanizmuose [9].

Skirtingai nei siRNR, miRNR gyvūnuose nutildo tikslinę iRNR, nekirdama RNR sekos. miRNR atsiranda iš plaukų segtuko formos pirminio transkripto (pri-miRNR). Jo kilpa ir laisvi nesuporuoti galai nukerjami, taip susidarant kreipiančiosios ir lydinčiosios miRNR grandinės dupleksui (miRNR/miRNR*). Plaukų segtuko struktūra pašalinama ląstelės branduolyje dalyvaujant heterodimeriniam Drosha ir Di Džordžo sindromo chromosominio regiono 8 (angl. *DiGeorge syndrome chromosomal region 8 (DGCR8)*) baltymų kompleksui (Drosha-DGCR8) – pagrindiniams komponentams, atsakingiems už miRNR brendimą, o citoplazmoje specifinė endonukleazė Dicer suskaido pri-miRNR, sukurdamą miRNR/miRNR* dupleksą. Vėliau miRNR grandinė, kuri yra komplementari savo tikslinei iRNR, rišasi su AGO pošeimio baltymais, o miRNR* dažniausiai suyra [8]. miRNR nomenklatūra remiasi jos atradimo laiku – visos naujai identifikuotos miRNR yra žymimos iš eilės. Jeigu miRNR sutampa tarp skirtingų organizmų, pavadinimo priekyje žy-

mimas lotyniškas tos organizmo rūšies sutrumpinimas. Jeigu ta pati miRNR gali susiformuoti iš skirtingų pirminių RNR, tokiu atveju pavadinimo gale yra pridama papildoma numeracija.

Ilgosios nekoduojančiosios RNR

inkRNR neturi arba turi ribotą baltymų kodavimo potencialą. Ši RNR yra tiek branduolyje, tiek citoplazmoje ir gali sąveikauti su deoksiribonukleorūgštimi (DNR), RNR arba baltymais, taip koreguojant genų transkripciją, baltymų raišką ir epigenetinį reguliavimą [10]. inkRNR daugelyje audinių kontroliuoja įvairius procesus, įskaitant genų nuskaitymą iš abiejų tėvų perduoto genomo, alternatyvųjį splaisingą, chromatinio modifikaciją, ląstelių diferenciaciją ir organogenezę. Šios RNR panašios į iRNR, tačiau skiriasi tuo, kad yra trumpesnės, turi mažiau, bet ilgesnius egzonus ir labiau specifiškos audinių ląstelėms. Svarbu, kad inkRNR gali būti konkuruojanti endogeninė RNR, kuri modifikuoja miRNR taikinių genų raišką. Be to, pastebėta, kad miRNR ir inkRNR gali sąveikauti tarpusavyje ir netiesiogiai kitų mediatorių pagalba reguliuoti viena kitos raišką [11]. inkRNR nomenklatura yra griežtai reglamentuota ir paremta pagal žinomą jų produktų funkciją.

MIKRO IR ILGŪJŲ NEKODUOJANČIŪJŲ RNR VAIDMUO ORGANIZME

miRNR yra trumpa nekoduojanti viengrandinė RNR, turinti vidutiniškai 22 nt ir dalyvauja genų raiškos reguliacijoje po transkripcijos. Ši molekulė sintetinama pagal nt komplementarumo principą DNR matricoje. miRNR yra dominuojanti klasė somatinėse ląstelėse, todėl yra geriausiai ištirta. miRBase duomenimis (2018), šių molekulių žinoma daugiau nei 38 000. Manoma, kad iki 60 proc. baltymus koduojančiųjų genų gali būti reguliuojami nuo miRNR priklausomais keliais, todėl ji yra viena didžiausių genus reguliuojančiųjų molekulių klasių [12]. Taip pat miRNR gali būti išskiriama į ląstelių aplinką, todėl užląstelinė miRNR plačiai žinoma kaip įvairių ligų biožymuo bei yra naujų molekulių gydymo priemonių taikiny. miRNR veikia kaip signalinė molekulė, tarpininkaujanti ląstelių tarpusavio signalų perdavime. Taip pat miRNR yra labai svarbi normaliam organizmo vystymuisi. Ji dalyvauja biologiniuose procesuose, tokiuose kaip ląstelės augimas, proliferacija, diferenciacija ir apoptozė, imuninė reakcija, signalo perdavimas, organų vystymasis, hematopoetinės linijos diferenciacija, metabolizmas ir homeostazė [13]. Sutrikusi miRNR raiška yra susijusi su daugybe žmonių ligų, tokių kaip cukrinis diabetas, neurodegeneracinės, širdies, kraujagyslių, inkstų ligos bei storosios žarnos, skrandžio, plaučių, krūtinės, prostatos ir skydliaukės vėžys [14].



1 pav. miRNR reguliavimas: A – viena miRNR gali reguliuoti keletą skirtingų mRNR; B – keletas skirtingų miRNR gali reguliuoti vieną mRNR [16]

Žinoma, kad viena miRNR gali reguliuoti kelias iRNR, o atskira iRNR gali būti tiesiogiai reguliuojama kelių miRNR (1 pav.). Tai labai priklauso nuo ląstelių tipo, audinio ar net ląstelės būklės [15].

Žmogaus genomas susideda iš daugiau nei 51 000 inkRNR, kurios gali sąveikauti su kitomis molekulėmis, tokiomis kaip DNR, RNR, baltymai arba metalo jonai [10]. Tai rodo didelę žmogaus genomo įvairovę. Dėl sutrikusio inkRNR reguliavimo gali atsirasti daugybė ligų, įskaitant vėžį, širdies ir kraujagyslių ligas, cukrinį diabetą, kitus kompleksinius sutrikimus ir astmą (lentelė) [17]. Skirtinga inkRNR raiška gali paveikti T ląstelių vystymąsi ir diferenciaciją [18], dendritinių ląstelių vystymąsi [19] bei CD4+ T ląstelių aktyvaciją [20]. inkRNR gebėjimą reguliuoti genų raišką transkripciniu arba potranskripciniu būdu galima paaiškinti konkuruojančios endogeninės RNR teorija. Ji teigia, jog inkRNR gali veikti kaip endogeninė RNR, konkurencingai prisijungdama atitinkamas miRNR bazių komplementarumo principu, taip slopindama šių miRNR jungimąsi su jų tikslinėmis iRNR ir netiesiogiai sukeldama šių genų raiškos pokyčius [21].

NEKODUOJANČIŪJŲ RNR VAIDMUO ASTMOS PATOGENEZĖJE

Nekoduojančiosios RNR, sergant astma

Astma yra heterogeninė liga, kuriai būdinga kintamoji kvėpavimo takų obstrukcija ir padidėjęs bronchų jautrumas, todėl jos gydymui ieškoma įvairių potencialių terapinių taikinių. Atliktuose tyrimuose įrodytas miRNR funkcionalumas astmos patogenezėje (lentelė). Viename pirmųjų tyrimų miR-19a buvo nustatyta CD4+ T ląstelėse kaip 2-ojo tipo citokino interleukino (IL) 13 išskyrimo stimulatorius [15]. Ankstesni miR-17-92 grupės, kuriai priklauso miR-19a, tyrimai parodė, kad ji skatina CD4+ T ląstelių išgyvenamumą ir proliferaciją [22]. Taip pat miR-17-92 grupė turėjo svarbų funkcinį poveikį 2-ojo tipo įgimtoms limfoidinėms ląstelėms (angl. *type 2 innate lymphoid cells*, ILC2), nes, esant šios miRNR grupės trūkumui, sumažėjo ILC2 išskiriamų citokinių gamyba ir kvėpavimo takų hiperreaktyvumas, gleivinės hipersekrecija bei eozinofilinų infiltracija į kvėpavimo takus. Pažymėtina, kad ILC2 ir 2-ojo tipo T limfocitų pagalbininkų (angl. *T-helper cell type 2*, Th2) ląstelėse miR-19a kontroliuojamo IL-13 gamyba reguliuojama per bendruosius

Moksliniai darbai ir apžvalgos

Lentelė. nkRNR reikšmė astmos patogenezei

nkRNR	Funkcija	Literatūros šaltinis
miRNR		
miR-19a	CD4+ T ląstelėse 2-ojo tipo citokino IL-13 išskyrimo stimulatorius	[15]
miR17-92 grupė	Skatina CD4+ T ląstelių išgyvenamumą ir proliferaciją Sumažėjus miRNR raiškai, sumažėja ILC2 citokinių gamyba ir kvėpavimo takų hiperreaktyvumas, gleivinės hipersekrecija bei eozinofilų infiltracija į kvėpavimo takus	[23]
miR-27 ir miR-24	Slopina IL-4 gamybą CD4+ T ląstelėse, o miRNR pašalinimas skatina nuo Th2 priklausomą atsaką <i>in vivo</i>	[24]
miR-371a-5p	miRNR raiškos sutrikimai prisideda prie bronchiolito, astmos ir lėtinės obstrukcinės plaučių ligos vystymosi	[25]
miR-126	Padidėjusi raiška netiesiogiai didina transkripcijos veiksnio GATA-3 raišką T ląstelėse, o tai gali skatinti Th2 limfocitus išskirti citokinus IL-5 bei IL-13, kurie aktyvina eozinofilus	[26]
miR-16	miRNR raiška padidėja kvėpavimo takuose pelių modelyje, peles veikiant namų dulkių erkių alergenais	[27]
miR-145 ir miR-106a	miRNR slopinimas sumažino namų dulkių erkių alergenų sukeltą alerginį uždegimą kvėpavimo takuose	[28]
miR-570	Suriša ir reguliuoja HuR baltymo, dalyvaujančio kvėpavimo takų lėtiniame uždegime, raišką	[29]
miR-485-3p	Padidėja astma sergančių vaikų kraujyje, palyginus su sveikais asmenimis	[30]
miR-221	Padidėja astma sergančių vaikų kraujyje, palyginus su sveikais asmenimis Reguliuoja BLR ląstelių augimą ir IL-6 gamybą	[30, 34]
miR-155	Padidėjusi raiška astma sergančiųjų bronchų epitelinėse ląstelėse, palyginus su sveikais asmenimis	[31]
miR-1	miRNR sumažėjimas gali būti siejamas su BLR ląstelių hipertrofija	[32]
miR-26a	Gali perduoti hipertrofinį signalą, nuslopindamas glikogeno sintazės kinazės-3β (GSK-3β) iRNR molekulę	[33]
miR-200 šeima	Kontroliuoja kvėpavimo takų epitelinį-mezenchiminį perėjimą remodeliacijos metu	[35]
Let-7 šeimos miRNR ir miR-98	Rodo ligos sunkumą (sergant lengva astma, aptikta maža miRNR raiška; didžiausia raiška pastebėta sergant sunkia astma)	[38]
miR-155 ir miR-21	miRNR raiška skiriasi priklausomai nuo eozinofilų kiekio: didžiausia raiška nustatoma sergant eozinofiline astma, mažiausia – neeozinofiline astma	[38]
miR-146	miRNR raiška sumažėja CD8+ bei CD4+ T ląstelėse sunkios astmos pacientams, kuriems skiriamas gydymas gliukokortikoidais	[39]
miR-223	Reguliuoja eozinofilų progenitorinių ląstelių proliferaciją Esant stygiui, eozinofilų progenitorinės ląstelės turi hiperproliferacinį pajėgumą	[40]
miR-21	Yra vienas pagrindinių pusiausvyros tarp 1-ojo tipo T limfocitų pagalbininkų (Th1) ir Th2 reakcijų į alergenus reguliatorius, atsirandantis dėl padidėjusio kvėpavimo takų jautrumo ir alerginio uždegimo miRNR raiška yra padidėjusi astma sergančių pacientų kvėpavimo takų uždegimo vietoje Gali reguliuoti eozinofilų išgyvenamumo veiksnių – GM-CSF	[41, 42]
miR-203, miR-130 ir miR-125b	Sergant astma, miRNR raiška yra mažesnė, lyginant su sveikais asmenimis	[43]
inRNR		
LINC00882, LINC00883 ir PVT1	Diferencijuotai ekspresuojamas BLR ląstelėse, esant skirtingiems astmos fenotipams	[44]
PVT1	Sumažėja pacientams, sergantiems lengva astma, kuri jautri gliukokortikoidams, tačiau padidėja pacientams, sergantiems sunkia astma, kuri silpnai reaguoja į gliukokortikoidų gydymą	[45]
GAS5	Veikia kaip gliukokortikoidų receptoriaus Sumažinus šios inRNR, sumažėja kvėpavimo takų hiperreaktyvumas Reguliuoja BLR ląstelių proliferaciją per miR-10a	[21, 46]
BCYRN1	Padidina BLR ląstelių proliferaciją bei migraciją, taip skatinamas remodeliacijos vystymasis	[47]
LNC_000127	inRNR raiška padidėja CD4+ T ląstelėse, sergant eozinofiline astma, tačiau, taikant gydymą, šios molekulės raiška sumažėja, įrodant jos dalyvavimą reguliuojant Th2 uždegiminį atsaką	[48]
MEG3	Reguliuoja miR-17 kaip endogeninį RNR, netiesiogiai paveikdama transkripcijos veiksnį Foxp3 ir RORγt raiškas, o tai galiausiai lemia Treg/Th17 ląstelių pusiausvyros sutrikimą	[36]

taikinius, todėl mokslininkai pasiūlė, kad miR-19a galėtų būti tinkamas terapinis taikynys, gydant 2-ojo tipo kvėpavimo takų uždegimą [23]. Tačiau yra įrodymų, jog kelios miRNR slopina Th2 ląstelių aktyvumą, pvz., miR-24 ir miR-27 slopina IL-4 gamybą CD4+ T ląstelėse, o šių miRNR pašalinimas paskatino nuo Th2 priklausomą atsaką *in vivo* [24].

miRNR yra susijusi su plaučių ligų vystymusi. miR-371a-5p raiškos sutrikimai prisideda prie bronchiolito, astmos ir lėtinės obstrukcinės plaučių ligos vystymosi [25]. Taip pat žinoma, kad miR-126 raiška padidėja pacientams, sergantiems alerginiu rinitu ir astma – ji netiesiogiai didina transkripcijos veiksnio GATA-3 (angl. *GATA binding protein 3*) raišką T ląstelėse, o tai gali skatinti Th2 limfocitus išskirti citokinus IL-5 bei IL-13, kurie aktyvina eozinofilus [26]. Taip pat pastebėtas miR-16 raiškos padidėjimas kvėpavimo takuose pelių modelyje, jas veikiant namų dulkių erkių alergenais [27], tačiau miR-145 ir miR-106a slopinimas sumažino namų dulkių erkių alergenų sukeltą alerginį uždegimą kvėpavimo takuose [28]. Papildomai nustatyta, jog miR-570 suriša ir reguliuoja HuR (angl. *human RNA-binding protein*) baltymo raišką, kuris dalyvauja kvėpavimo takų lėtiniame uždegime astmos metu [29]. Kiti atlikti tyrimai nustatė miR-485-3p ir miR-221 padidėjimą astma sergančių vaikų kraujyje, palyginus su sveikais asmenimis [30]. Be to, padidėjusi miR-155 raiška buvo pastebėta astma sergančiųjų bronchų epitelinėse ląstelėse, palyginus su sveikais asmenimis [31].

Vertinant astmos patofiziologiją, ypatingas dėmesys skiriamas bronchų lygiesiems raumenims (BLR) ir jų struktūriniais pokyčiais (padidėjusi masė dėl audinio hiperplazijos ir hipertrofijos), kurie įvardijami kaip pagrindiniai, simptomus sukeliantys veiksniai, sergant astma. Yra įrodymų, jog miR-1 sumažėjimas gali būti siejamas su BLR ląstelių hipertrofija, sergant astma [32]. Be to, miR-26a gali perduoti hipertrofinį signalą, nuslopindamas glikogeno sintazės kinazės-3β (GSK-3β) iRNR molekulę [33]. Taip pat pastebėta, kad miR-221 reguliuoja BLR ląstelių augimą ir IL-6 gamybą [34], o miR-200 šeima kontroliuoja kvėpavimo takų epitelinį-mezenchiminį perėjimą remodeliacijos metu, sergant astma [35]. miRNR tyrimai yra perspektyvūs, nustatant tikruosius ląstelių pokyčius, sergant įvairiomis

ligomis, tačiau, siekiant personalizuoto astmos gydymo, pasitelkiant miRNR, reikia išsamesnių veikimo mechanizmo tyrimų.

Apie inkrNR poveikį astmos patogenezei duomenų itin stinga. Daugiausia tyrimų yra apie jų sąsajas su miRNR. Astmos patogenezėje inkrNR-MEG3 reguliuoja miR-17 kaip endogeninė RNR, netiesiogiai paveikdama transkripcijos veiksnio Foxp3 (angl. *forkhead box P3*) (jo stygius lemia nepakankamą CD4+ ląstelių diferenciaciją į reguliacinio tipo T (Trego) ląsteles) ir RORγt (angl. *retinoic acid receptor-related orphan receptor-γt*) (reguliuoja CD4+ T ląstelių diferenciaciją į 17-ojo tipo T limfocitų pagalbininkų (Th17) ląsteles) raiškas, o tai galiausiai lemia Trego/Th17 ląstelių pusiausvyros sutrikimą [36]. Th17 ląstelės išskiria citokiną IL-17, skatindamos uždegiminį atsaką, įtraukiant neutrofilus. CD4+CD25+ Trego ląstelės reguliuoja imuninį atsaką, slopinant Th ląsteles iki tinkamo raiškos lygio, norint išvengti žalos organizmui, tačiau jų pusiausvyros sutrikimas lemia stiprų kvėpavimo takų uždegimą [37].

nkRNR pokyčiai, esant skirtingiems astmos fenotipams

Identifikuoti astmos fenotipai tarpusavyje skiriasi klinikiniais duomenimis, ligos anamneze, eozinofilų kiekiu kraujyje ir medikamentų poreikiu ligos kontrolei pasiekti [49]. Klaidinga astmos diagnozė pasitaiko iki 30 proc. atvejų, todėl svarbu rasti efektyvų būdą tiksliai nustatyti astmos fenotipą ir pritaikyti veiksmingą gydymą. Konkretūs ligos biožymenys leistų geriau identifikuoti astmos fenotipus, padėtų geriau parinkti tinkamą gydymą, numatyti jo rezultatus ir suteiktų papildomos informacijos, kokie imuniniai keliai yra įtraukti konkrečiu atveju.

Tarp astmos grupių buvo nustatytos konkrečios miRNR, susijusios su padidėjusiu astmos sunkumu ir eozinofilija. Let-7 šeimos miRNR ir miR-98 raiška pasirodė tiksliausiai rodanti astmos sunkumą. Mažiausia šių miRNR raiška buvo aptikta lengva astma sergantiems pacientams, didesnė raiška pastebėta, sergant vidutinio sunkumo astma, o didžiausia raiška užfiksuota, sergant sunkia astma. Kalbant apie specifinę eozinofilus identifikuojančią miRNR, nepriklausomai nuo astmos sunkumo, nustatytos dvi miRNR:

<p>Lengva astma</p> <ul style="list-style-type: none"> Mažiausias eozinofilų kiekis kraujyje Mažos įkvėpamųjų gliukokortikoidų dozės 	<p>Vidutinio sunkumo astma</p> <ul style="list-style-type: none"> Vidutinis arba didesnis eozinofilų kiekis kraujyje 	<p>Sunki astma</p> <ul style="list-style-type: none"> Didžiausias eozinofilų kiekis kraujyje Dažniau serga moterys Nutukimas 	<p>Sunki astma</p> <ul style="list-style-type: none"> Vidutinis eozinofilų kiekis kraujyje
<p>Mažai Let-7, miR-98 Mažai miR-21, -155 Daug miR-1, -330-5p, -570-3p</p>	<p>Mažai Let-7, miR-98 Daug miR-21, -155 Mažai miR-1, -330-5p, -570-3p</p>	<p>Daug Let-7, miR-98 Daug miR-21, -155 Mažai miR-1, -330-5p, -570-3p</p>	<p>Daug Let-7, miR-98 Vidutinis kiekis miR-21, -155 Daug miR-1, -330-5p, -570-3p</p>

2 pav. Klinikinės astmos fenotipų charakteristikos ir potencialūs miRNR biožymenys

Moksliniai darbai ir apžvalgos

miR-155 ir miR-21. Šių miRNR raiška buvo išreikšta skirtingai, priklausomai nuo eozinofilų kiekio: didžiausia raiška pastebėta, sergant eozinofiline astma, mažiausia – sergant neeozinofiline astma [38] (2 pav.). Taip pat nustatyta, jog, sergant sunkia astma ir skiriant gydymą gliukokortikoidais, miR-146 raiška sumažėja CD8+ bei CD4+ T ląstelėse [39].

Nustatant skirtingą inkRNR raišką, sergant eozinofiline ir neutrofiline astma, eozinofilinės astmos atveju buvo rasta 190 specifinių inkRNR ir 166 specifinės inkRNR, esant neutrofilinei astmai. Kai kurios iš šių diferencijuotai išreikštų inkRNR gali dalyvauti naviko nekrozės faktoriaus (angl. *tumor necrosis factor*, TNF), chemokinių, B ląstelių receptorių signalo perdavime bei citokino-citokino receptorių sąveikoje. Įrodyta, kad inkRNR LNC_000127 raiška padidėja CD4+ T ląstelėse, sergant eozinofiline astma, tačiau, taikant gydymą, šios inkRNR raiška sumažėja. Tai rodo, kad ji dalyvauja reguliuojant Th2 uždegiminį atsaką [48]. Taip pat įrodyta, kad BCYRN1 didina BLR ląstelių proliferaciją bei migraciją, taip skatinamas remodeliacijos vystymasis [47]. Be to, nustatyta, kad, gydant steroidams atsparią astmą, inkRNR GAS5 veikia kaip gliukokortikoidų receptorių, o prouždegiminiai mediatoriai didina GAS5 kiekį tiek BLR ląstelėse, tiek kvėpavimo takų epitelyje [46]. Taip pat įrodyta, kad, sumažinus GAS5 raišką, sumažėjo kvėpavimo takų hiperreaktyvumas. Tuo pačiu tyrimu nustatyta, kad GAS5 reguliuoja BLR ląstelių proliferaciją per miR-10a [21]. Ankstesniuose tyrimuose nustatyta, kad inkRNR LINC00882, LINC00883 ir PVT1 yra diferencijuotai ekspresuojamos BLR ląstelėse, esant skirtingiems astmos fenotipams [44], pvz., PVT1 raiška sumažėja pacientams, sergantiems lengva astma, kuri jautri gliukokortikoidams, tačiau padidėja pacientams, sergantiems sunkia astma, kuri silpnai reaguoja į gydymą gliukokortikoidais [45]. Tai tik nedaugelis tyrimų, padedančių geriau suvokti ligos patogenezės kelius, tačiau kol kas stinga tikslesnių duomenų apie inkRNR, sergant astma. Tai yra gana nauja tyrimų sritis.

NEKODUOJANČIOSIOS RNR IR EOZINOFILAI

miRNR reikšmė eozinofilų brendimui

Didelis eozinofilų skaičius atsiranda dėl padidėjusio jų brendimo kaulų čiulpuose, aktyvacijos ir išgyvenamumo. Eozinofilai vystosi kaulų čiulpuose iš CD34+ progenitorinių ląstelių, kontroliuojant IL-5, IL-3 ir granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančiam veiksmui (angl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF). Eozinofilai yra daugiafunkcinės efektorinės ląstelės, susijusios su įvairiomis ligomis, įskaitant astmą. Nustatyta, kad miRNR yra reikšminga, kontroliuojant imuninių ląstelių vystymąsi bei imuninį atsaką. Taip pat įrodyta, kad miR-223 reguliuoja eozinofilų progenitorinių ląstelių proliferaciją [40].

Įvairių tyrimų duomenimis, miRNR reguliuoja hematopoetinių ląstelių diferenciaciją ir funkcijas, priklausomai nuo jų linijos. Kuriant naują alerginio uždegimo molekulinį gydymą, buvo atlikti tyrimai su miR-21. Pranešta, kad miR-21 yra vienas pagrindinių pusiausvyros tarp Th1 ir Th2 reakcijų į alergenus reguliatorius, atsirandantis dėl padidėjusio jautrumo ir alerginio uždegimo [41]. miR-21 raiška yra padidėjusi astma sergančių pacientų kvėpavimo takų uždegimo vietoje. Nustatyta, kad ši molekulė gali reguliuoti eozinofilų išgyvenamumo veiksnį GM-CSF [42]. Taip pat svarbu, kad miR-223 stygiuimi pasižymintios eozinofilų progenitorinės ląstelės turėjo hiperproliferacinį pajėgumą [40]. Taigi, matyti, kad suderintas miRNR tinklo veikimas gali tiesiogiai reguliuoti eozinofilų vystymąsi, paveikdamas eozinofilų progenitorinių ląstelių dauginimąsi ir diferenciaciją.

Eozinofilų egzosominė nkRNR

Eozinofilai prisideda prie astmos patofiziologijos, išskirdami katijoninius baltymus, chemokinus, citokinus, augimo veiksmus ir lipidų mediatorius. Šios molekulės yra supakuojamos ir saugomos eozinofilų viduląstelinėse granulėse ir gali būti greitai išskiriamos į aplinką bei veikti kitas ląsteles arba pačios save [2]. Kai kurios iš granuliu, kol yra saugojamos eozinofilų viduje, yra vadinamos endosomomis. Jos po susilietimo su eozinofilų plazmine membrana yra išleidžiamos į aplinką egzosomų pavidalu [3]. Eozinofilai išskiria apie 162 nm dydžio egzosomas, kurios susideda iš CD63, CD9 bei ALIX baltymų, o tai rodo endosominę šių pūslelių kilmę. Ląstelės į egzosomas supakuoja nukleorūgštis (DNR, RNR), baltymus ir lipidų mediatorius, bet eozinofilų egzosomos taip pat turi didijį bazinį baltymą bei eozinofilų peroksidazę, kurie gali sukelti audinių pažeidimus ir astmos paūmėjimus. Kūno skysčiuose, įskaitant kraują, ašaras, šlapimą, seiles ir pieną, randami itin dideli kiekiai egzosomų. Be to, egzosomų sekrecija yra žymiai didesnė astma sergančių žmonių eozinofiluose, lyginant su sveikais asmenimis [3]. Eozinofilų egzosomose esantys mediatoriai sukelia reaktyvių deguonies formų bei azoto oksido gamybos padidėjimą, padidina eozinofilų migraciją, jų adheziją ir adhezijos molekulių raišką, taip darydamos žalą kvėpavimo takų epiteliui ir skatindamos astmos paūmėjimą. Tyrimai rodo, kad egzosominės miRNR ir inkRNR atlieka svarbias funkcijas plaučių ligų progresavimui, įskaitant astmą, lėtinę obstrukcinę plaučių ligą ir tuberkuliozę [43].

miRNR buvimas kūno sekretų egzosomose yra patvirtintas tyrimais, kuriuose bronchoalveoliniame skystyje nustatytos 24 miRNR. Šių identifikuočių miRNR raiškos profiliai tirtose pacientų grupėse labai siejosi su plaučių funkcija (forsuotu iškvėpimo tūriu per pirmąją sekundę, angl. *forced expiratory volume in*

one second, FEV₁). Kelios iš tirtų miRNR turėjo poveikį citokinų kiekiui, įskaitant IL-6, IL-13, IL-10 ir IL-8. Taip pat įrodyta, kad šių RNR raiška labai skiriasi tarp sergančiųjų lengva astma ir sveikų žmonių mėginių: ryškiausi skirtumai pastebėti Let-7 šeimos RNR ir miR-200 profiliuose. Be to, nustatyta, kad miR-203, miR-130 bei miR-125b raiška yra mažesnė, sergant astma [43].

Ilgosios nekoduojančiosios RNR taip pat gali būti supakuotos į egzosomas ir dalyvauti ląstelių tarpusavio sąveikoje [10]. Įdomu tai, kad kai kuriose egzosomose yra labai daug inkRNR, o kai kuriose labai mažai, o tai rodo, jog šios molekulės yra atrankiai paskirstomos į konkrečias egzosomas. Taip pat yra keli specifiniai inkRNR pernašos baltymai, kurie kontroliuoja šių molekulių patekimą į egzosomas, tačiau tikslūs mechanizmai nėra iki galo iširti. Kraujyje esančios inkRNR daugiausia randamos egzosomose, todėl molekulės nėra paveikiamos ribonukleazų. Remiantis naujausiais duomenimis, dėl integrino CD47 raiškos egzosomų paviršiuje, šios pūslelės yra apsaugotos nuo monocitų ir makrofagų fagocitozės [50]. Taip pat inkRNR yra stabili kituose kūno skysčiuose, įskaitant šlapimą, seiles, bronchoalveolinį skystį [4]. Kaip ir miRNR, taip ir inkRNR raiška skiriasi tarp sergančių plaučių ligomis ir sveikų žmonių, tačiau stinga duomenų apie egzosominės inkRNR dalyvavimą astmos patogenezėje.

IŠVADOS

Tik nedidelėje žmogaus genomo dalyje yra baltymus koduojančiosios informacijos. Genominė analizė parodė, kad 75 proc. žmogaus genomo yra perrašomi į RNR ir tik 1 proc. jų koduoja baltymus, todėl įsitikinimas, kad nekoduojančiosios RNR yra „transkripcijos triukšmas“, per pastaruosius dešimtmečius pasikeitė ir šiuo metu nkRNR yra pagrindinis biologinių procesų reguliatorius. Didžiausią nkRNR grupę sudaro inkRNR ir miRNR, kurios reguliuoja platų ląstelių funkcijų spektrą, įskaitant genomo organizavimą, stabilumą bei genų raišką, atlikdamos potranskripcinį reguliavimą.

Didėjantis sergamumas astma bei mirštamumas, ypač nuo sunkesnės jos formos, pabrėžia poreikį gilinti žinias apie šios ligos patogenezę. Todėl labai svarbu rasti naujus biožymenis, kurie galėtų geriau apibūdinti astmos fenotipus, kad gydymas būtų kiek įmanoma tikslesnis, individualizuotas kiekvienam pacientui. Nors eozinofilija pasireiškia daugeliu astmos atvejų, o eozinofilų egzosomų pagalba į mikroaplinką išskirta nkRNR gali turėti didelę įtaką ligos vystymuisi, tyrimų šioje srityje atliekama nepakankamai. Atsižvelgiant į biologines savybes ir dalyvavimą beveik visuose molekulinuose mechanizmuose, sergant astma, nkRNR atrodo tinkami naujos kartos biožymenys. Taip pat susidomėjimas nkRNR tyrimais ir jų rezultatų aktualumas nuolat auga, todėl tikėtina, kad per kelerius metus tai padės geriau suprasti astmos patogenezę.

Norint apibrėžti, kurie epigenetiniai pokyčiai yra priežastys, o kurie – ligos padariniai, reikia išsamesnių tyrimų. Taip pat reikia patvirtinti identifikuojamų pagrindinių inkRNR ir miRNR raiškos pokyčius didesnių tiriamųjų imčių tyrimuose ir toliau tirti svarbią šių molekulių biologinę reikšmę, siekiant suprasti patofiziologiją ir atrasti naujus vaistų taikinius šiai ligai gydyti. Eozinofilų išskirtos inkRNR ir miRNR poveikis bei tarpusavio sąveika astmos patogenezėje tik pradėdama tyrinėti, tačiau panašu, kad tai bus daug žadanti perspektyva.

Gauta 2020 03 15

Priimta 2020 03 25

LITERATŪRA

1. **Lambrecht BN, Hammad H.** The immunology of asthma. *Nat Immunol.* 2015; 16(1):45.
2. **Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS.** Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(1):9-22.
3. **Mazzeo C, Canas JA, Zafra MP, Rojas Marco A, Fernandez-Nieto M, Sanz V, et al.** Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 135(6):1603-13.
4. **Boukouris S, Mathivanan S.** Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteom Clin Appl.* 2015; 9(3-4):358-67.
5. **Laurent GS, Wahlestedt C, Kapranov P.** The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet.* 2015; 31(5):239-51.
6. **Bohnsack MT, Sloan KE.** Modifications in small nuclear RNAs and their roles in spliceosome assembly and function. *Biol Chem.* 2018; 399(11):1265-76.
7. **Arif M, Islam SU, Adnan M, Anwar M, Ali H, Wu Z.** Recent progress on gene silencing/suppression by virus-derived small interfering RNAs in rice viruses especially Rice grassy stunt virus. *Microb Pathog.* 2018; 125:210-8.
8. **Carthew RW, Sontheimer EJ.** Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009; 136(4):642-55.
9. **Rojas-Ríos P, Simonelig M.** piRNAs and PIWI proteins: regulators of gene expression in development and stem cells. *Development.* 2018; 145(17):dev161786.
10. **Quinn JJ, Chang HY.** Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet.* 2016; 17(1):47-62.
11. **Yamamura S, Imai-Sumida M, Tanaka Y, Dahiya R.** Interaction and cross-talk between non-coding RNAs. *Cell Mol Life Sci.* 2018; 75(3):467-84.
12. **Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP.** Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009; 19(1):92-105.
13. **Wang J, Chen J, Sen S.** MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *J Cell Physiol.* 2016; 231(1):25-30.
14. **Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, et al.** Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol.* 2018; 233(3):2007-18.
15. **Simpson LJ, Patel S, Bhakta NR, Choy DF, Brightbill HD, Ren X, et al.** A microRNA upregulated in asthma airway T cells promotes TH2 cytokine production. *Nat Immunol.* 2014; 15(12):1162-70.
16. **Johansson K.** ILC2s and miRNA regulation in allergy and asthma. 2018. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/ILC2s-and-miRNA-regulation-in-allergy-and-asthma-Johansson/536f7656b702199c7934a586145691cb77c69b93>
17. **Shan K, Liu C, Liu B-H, Chen X, Dong R, Liu X, et al.** Circular noncoding RNA HIPK3 mediates retinal vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation.* 2017; 136(17):1629-42.
18. **Kanduri K, Tripathi S, Larjo A, Mannerström H, Ullah U, Lund R, et al.** Identification of global regulators of T-helper cell lineage specification. *Genome Med.* 2015; 7(1):122.
19. **Wang P, Xue Y, Han Y, Lin L, Wu C, Xu S, et al.** The STAT3-

Moksliniai darbai ir apžvalgos

- binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science*. 2014; 344(6181):310-3.
20. Xia F, Dong F, Yang Y, Huang A, Chen S, Sun D, et al. Dynamic transcription of long non-coding RNA genes during CD4+ T cell development and activation. *PLoS One*. 2014; 9(7):e101588.
 21. Zhang X-Y, Tang X-Y, Li N, Zhao L-M, Guo Y-L, Li X-S, et al. GAS5 promotes airway smooth muscle cell proliferation in asthma via controlling miR-10a/BDNF signaling pathway. *Life Sci*. 2018; 212:93-101.
 22. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*. 2008; 9(4):405-14.
 23. Singh PB, Pua HH, Happ HC, Schneider C, von Moltke J, Locksley RM, et al. MicroRNA regulation of type 2 innate lymphoid cell homeostasis and function in allergic inflammation. *J Exp Med*. 2017; 214(12):3627-43.
 24. Pua HH, Steiner DF, Patel S, Gonzalez JR, Ortiz-Carpena JF, Kageyama R, et al. MicroRNAs 24 and 27 suppress allergic inflammation and target a network of regulators of T helper 2 cell-associated cytokine production. *Immunity*. 2016; 44(4):821-32.
 25. Brown JN, Brewer HM, Nicora CD, Weitz KK, Morris MJ, Skabelund AJ, et al. Protein and microRNA biomarkers from lavage, urine, and serum in military personnel evaluated for dyspnea. *BMC Med Genomics*. 2014; 7(1):58.
 26. Brusselle GG, Maes T, Bracke KR. Eosinophils in the spotlight: eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nat Med*. 2013; 19(8):977-9.
 27. Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, Chinchilli VM, Craig TJ, August A, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 137(5):1423-32.
 28. Sharma A, Kumar M, Ahmad T, Mabalirajan U, Aich J, Agrawal A, et al. Antagonism of mmu-mir-106a attenuates asthma features in allergic murine model. *J Appl Physiol*. 2012; 113(3):459-64.
 29. Roff AN, Craig TJ, August A, Stellato C, Ishmael FT. MicroRNA-570-3p regulates HuR and cytokine expression in airway epithelial cells. *Am J Clin Exp Immunol*. 2014; 3(2):68-83.
 30. Liu F, Qin H-B, Xu B, Zhou H, Zhao D-Y. Profiling of miRNAs in pediatric asthma: upregulation of miRNA-221 and miRNA-485-3p. *Mol Med Report*. 2012; 6(5):1178-82.
 31. Jardim MJ, Dailey L, Silbajoris R, Diaz-Sanchez D. Distinct microRNA expression in human airway cells of asthmatic donors identifies a novel asthma-associated gene. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012; 47(4):536-42.
 32. McCarthy JJ, Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*. 2007; 102(1):306-13.
 33. Mohamed JS, Lopez MA, Boriek AM. Mechanical stretch upregulates microRNA-26a and induces human airway smooth muscle hypertrophy by suppressing glycogen synthase kinase-3 β . *J Biol Chem*. 2010; 285(38):29336-47.
 34. Perry MM, Baker JE, Gibeon DS, Adcock IM, Chung KF. Airway smooth muscle hyperproliferation is regulated by microRNA-221 in severe asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014; 50(1):7-17.
 35. Hackett T-L. Epithelial-mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012; 12(1):53-9.
 36. Qiu Y-y, Wu Y, Lin M-j, Bian T, Xiao Y-l, Qin C. LncRNA-MEG3 functions as a competing endogenous RNA to regulate Treg/Th17 balance in patients with asthma by targeting microRNA-17/ROR γ t. *Biomed Pharmacother*. 2019; 111:386-94.
 37. Liang P, Peng S, Zhang M, Ma Y, Zhen X, Li H. Huai Qi Huang corrects the balance of Th1/Th2 and Treg/Th17 in an ovalbumin-induced asthma mouse model. *Biosci Rep*. 2017; 37(6): BSR20171071.
 38. Zhang S, Laryea Z, Panganiban R, Lambert K, Hsu D, Ishmael FT. Plasma microRNA profiles identify distinct clinical phenotypes in human asthmatics. *J Transl Genet Genom*. 2018; 2:18.
 39. Tsitsiou E, Williams AE, Moschos SA, Patel K, Rossios C, Jiang X, et al. Transcriptome analysis shows activation of circulating CD8+ T cells in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 129(1):95-103.
 40. Lu TX, Lim E-J, Besse JA, Itskovich S, Plassard AJ, Fulkerson PC, et al. MiR-223 deficiency increases eosinophil progenitor proliferation. *J Immunol*. 2013; 190(4):1576-82.
 41. Lu TX, Hartner J, Lim E-J, Fabry V, Mingler MK, Cole ET, et al. MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN- γ pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity. *J Immunol*. 2011; 187(6):3362-73.
 42. Wong CK, Lau KM, Chan IHS, Hu S, Lam YYO, Choi AOK, et al. MicroRNA-21* regulates the prosurvival effect of GM-CSF on human eosinophils. *Immunobiology*. 2013; 218(2):255-62.
 43. Levänen B, Bhakta NR, Paredes PT, Barbeau R, Hiltbrunner S, Pollack JL, et al. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 131(3):894-903. e8.
 44. Perry MM, Tsitsiou E, Austin PJ, Lindsay MA, Gibeon DS, Adcock IM, et al. Role of non-coding RNAs in maintaining primary airway smooth muscle cells. *Respir Res*. 2014; 15(1):58.
 45. Austin PJ, Tsitsiou E, Boardman C, Jones SW, Lindsay MA, Adcock IM, et al. Transcriptional profiling identifies the long noncoding RNA plasmacytoma variant translocation (PVT1) as a novel regulator of the asthmatic phenotype in human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol*. 2017; 139(3):780-9.
 46. Keenan CR, Schuliga MJ, Stewart AG. Pro-inflammatory mediators increase levels of the noncoding RNA GAS5 in airway smooth muscle and epithelial cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015; 93(3):203-6.
 47. Zhang X-Y, Zhang L-X, Tian C-J, Tang X-Y, Zhao L-M, Guo Y-L, et al. LncRNAs BCYRN1 promoted the proliferation and migration of rat airway smooth muscle cells in asthma via upregulating the expression of transient receptor potential 1. *Am J Transl Res*. 2016; 8(8):3409-18.
 48. Zhu Y, Mao D, Gao W, Han G, Hu H. Analysis of lncRNA expression in patients with eosinophilic and neutrophilic asthma focusing on LNC_000127. *Front Genet*. 2019; 10:141.
 49. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 181(4):315-23.
 50. Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Morishita M, Charoenviriyakul C, et al. Role of phosphatidylserine-derived negative surface charges in the recognition and uptake of intravenously injected B16BL6-derived exosomes by macrophages. *J Pharm Sci*. 2017; 106(1):168-75.