

## miRNA AS A DIAGNOSTIC MARKER FOR CELL DIFFERENTIATION AND PROLIFERATION AND ALTERED GENE EXPRESSION

Natalija Arsovska

Faculty of medical sciences, University “Goce Delcev”- Shtip, Republic of North Macedonia  
[natalija.211367@student.ugd.edu.mk](mailto:natalija.211367@student.ugd.edu.mk)

Nevenka Velickova

Faculty of medical sciences, University “Goce Delcev”- Shtip, Republic of North Macedonia  
[nevenka.velickova@ugd.edu.mk](mailto:nevenka.velickova@ugd.edu.mk)

**Abstract:** Micro RNAs (miRNA) are short non-coding RNA molecules that have an important regulatory role in mRNA translation. More than 1000 different miRNA molecules have been detected in humans, which are necessary for many cellular processes. Different expressions of miRNAs are specific to individual tissues and are associated with a variety of pathological diseases. These properties make miRNA a potential and non-invasive diagnostic research biomarker. **Aims of the study:** To emphasize the improvement and needs of expression analysis of miRNA as a potential non-invasive diagnostic and prognostic biomarkers. **Material and methods:** In this review article is explain all the procedure, the advantages and disadvantages of the most common miRNA detection methods, and highlights the lack of standardization in all steps of miRNA detection. **Results and discussions:** We compare and explain main findings of different studies about the involvement of miRNAs in diseases that affect a large part of the human population. **Conclusions:** As a consequence, and previously study’s findings human miRNAs are likely to be very useful as biomarkers, especially for future cancer diagnostics, and are rapidly emerging as attractive targets for disease intervention.

**Keywords:** Micro RNA, molecular diagnostics, biomarkers, pathogenic diseases, micro RNA detection

## miRNA KAKO DIJAGNOSTIČKI MARKER ZA KLETOČNA DIFERENCIJACIJA I PROLIFERACIJA I PROMENETA GENSKA EKSPRESIJA

Наталија Арсовска

Факултет за медицински науки “Универзитет Гоце Делчев”- Штип, Република Северна Македонија, [natalija.211367@student.ugd.edu.mk](mailto:natalija.211367@student.ugd.edu.mk)

Невенка Величкова

Факултет за медицински науки “Универзитет Гоце Делчев”- Штип, Република Северна Македонија, [nevenka.velickova@ugd.edu.mk](mailto:nevenka.velickova@ugd.edu.mk)

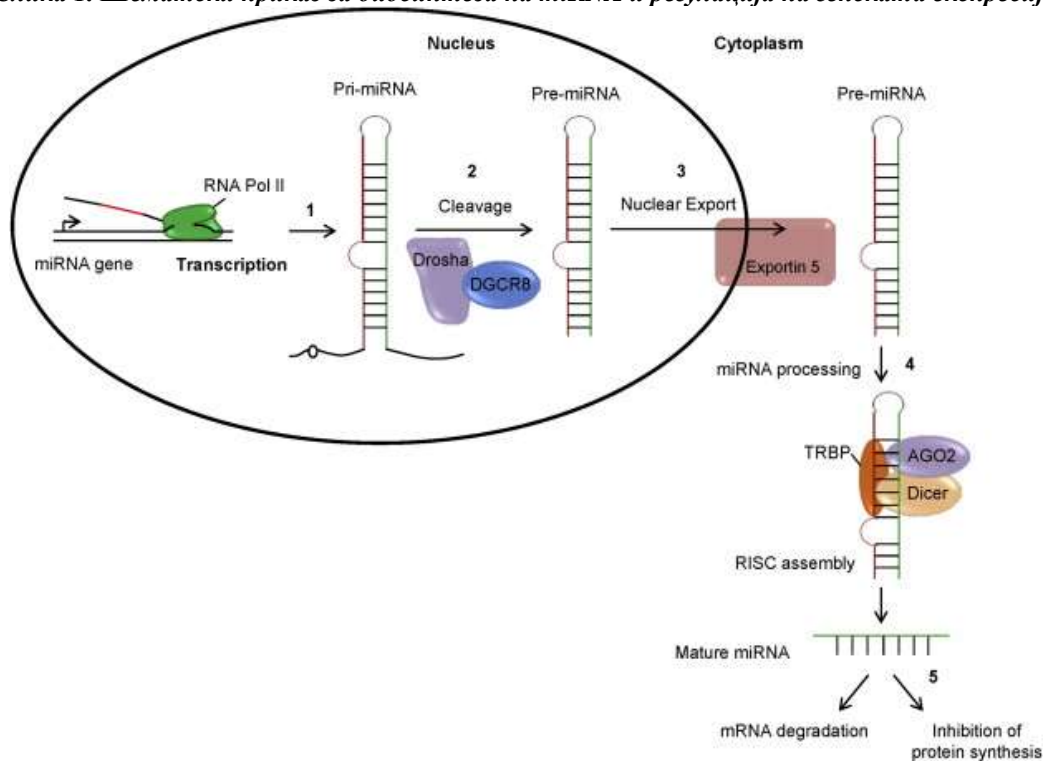
**Апстракт: Вовед:** Микро РНК (miRNA) се кратки некодирачки молекули на RNA кои имаат важна регулаторна улога во транслацијата на информационата или месинџер RNA (mRNA). Повеќе од 1000 различни молекули на miRNA се потврдени во хуманата популација. Имајќи во предвид дека истите се директно вклучени во голем број на физиолошки процеси на клетката, различни молекули на miRNA се специфични показатели или индикатори за различни патолошки заболувања. Токму ваквата улога на miRNA ја прави и потврдува како потенцијален и неинвазивен биомаркер во раната дијагностика на голем број на заболувања. **Цели на трудот:** Да се нагласи потребата и примената од експресивна молекуларна анализа на miRNA како потенцијален неинвазивен дијагностички и прогностички биомаркер во делот на раната лабораториска дијагностика, да се прецизираат предностите и ризиците при изведување на тестот за детекција и скрининг на miRNA. **Материјал и методи:** Во овој ревијален труд е објаснет целиот принцип и процедура на оваа метода, воедно и најчестите методи за детекција на miRNA и е нагласена потребата од стандардизацијата целата постапка. **Резултати и дискусија:** Направен е литературен преглед на различни студии и истражувања во кои е анализирана содржината на miRNA. Заклучоците од сите нив потврдуваат дека miRNA може да послужи како идеален биомаркер на променета клеточна пролиферација и зголемена генска експесија а со тоа да укажува на одредена патологија. **Заклучоци:** Најновите истражувања и студии укажуваат дека miRNA претставува посебно користен биомаркер во дијагностиката на канцер, како и во лекувањето и третманот на одредени болести.

**Клучни зборови:** miRNA, молекуларна дијагностика, биомаркери, патогени болести, детекција на miRNA

## 1. ВОВЕД

Билошките молекули, како што се нуклеинските киселини и протеините, претставуваат идеални неинвазивни алатки или биомаркери од причина што можат лесно да се изолираат од различни телесни течности (крв, урина, ликвор) или ткива од биопсија и истите се релативно стабилни и апликативни во делот на молекуларната дијагностика. Во последните години, се повеќе се користат примероци од DNA или RNA како потенцијални неинвазивни биомаркери кои се користат во делот на раната молекуларна дијагностика на различни заболувања во организмот. miRNA или микроRNA (микро рибонуклеинска киселина) е мала некодирачка молекула на RNA која за прв пат е откриена во 1993 година од Амброс и соработниците, истата е изградена од 21-25 нуклеотиди, кои учествуваат во посттранскрипциската регулација на експресијата на гени, односно процесот на клеточната диференцијација и хомеостаза во организмот. 92% од гените кај човекот се под контрола на повеќе од 1000 молекули на miRNA. Кај најголемиот дел од клетките во организмот, miRNA се наоѓа внатре во самите клетки, додека кај видоизменети или апоптични клетки истата се исфрла како циркулирачка miRNA во различни телесни течности како што е крв, лимфа, или цереброспинална течност. Токму таа циркулирачка содржина на miRNA укажува на степенот на клеточна пролиферација, апоптоза или инфламација во организмот.

Слика 1. Шематски приказ за биосинтеза на miRNA и регулација на генската експресија

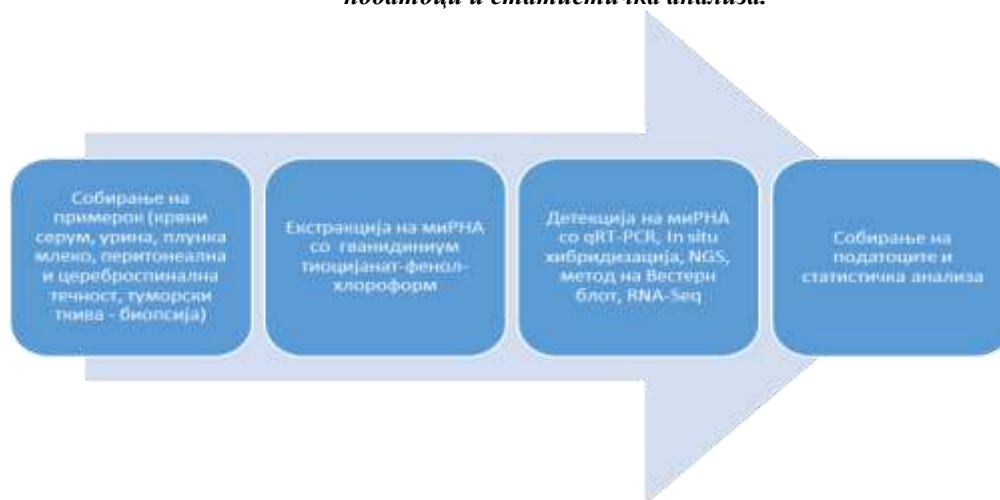


## 2. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

Со овој труд сакаме да ја потенцираме важноста и значењето на miRNA како потенцијален и дијагностички биомаркер за одредени патофизиолошки состојби во организмот. Исто така ќе ја објасниме примената на овие методи во дијагностицирање на различни видови на клеточна пролиферација, принципот на работа и изведувањето на методите за изолација и квантификација на miRNA, предностите на оваа метода и валидација на резултатите.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

*Слика 2. Шематски приказ на главните чекори за користење на miRNA во молекуларната дијагностика: собирање примероци, екстракција на miRNA, детекција на miRNA, интерпретација на податоци и статистичка анализа.*



#### 3.1 Квантитативна полимеразна верижна реакција во реално време

Квантитативната полимеразна верижна реакција во реално време (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR или qRT-PCR) претставува широко користен метод во молекуларната дијагностика. Меѓутоа, прецизното мерење на miRNA со користење на qRT-PCR бара висококвалитетен примерок, особено поради ниската концентрација на miRNA која се наоѓа во плазмата. Имајќи во предвид дека при користење на qRT-PCR, miRNA нивоата во плазмата се ниски, односно 10 - 100 пати помали од концентрациите во клетките и ткивата, qRT-PCR најчесто се користи за анализа на циркуирачките нивоа на miRNA во биолошките течности. За веродостојна qRT-PCR анализа, неопходно е да се минимизираат сите фактори кои пречат користејќи пристап на екстракција за мерење на miRNA во клетките, плазмата, серумот и ткивата. Утврдено е дека многу често интерференцијата на qRT-PCR анализата е предизвикана од различни компоненти присутни во матрицата на примерокот. Во qRT-PCR методата, бројот на молекули на целната секвенца треба да се удвои во текот на секој циклус на репликација, што одговара на 100% ефикасност на амплификација на одредениот сегмент на RNA. Во праксата qRT-PCR методата е најмногу користена метода за анализа на DNA или RNA секвенци.

#### 3.2 In situ хибридизација

In situ хибридизацијата вклучува откривање на miRNA со означување на комплементарни miRNA проби. Станува збор за метода која се користи за откривање на нуклеотидни секвенци во клетките, делови од ткивото, па дури и во целото ткиво. Овој метод се заснова на комплементарно врзување на нуклеотидна сонда за одредена целна секвенца на DNA или RNA. Главната предност кај оваа метода е можноста следење на дистрибуцијата на miRNA, што е од голема значајност кај малигните тумори со интратуморна хетерогеност што укажува на појава на субпопулација на туморски клетки кои значително се разликуваат и го отежнуваат третманот.

#### 3.3 Секвенционирањето на новите генерации (NGS, од Eng. Next-Generation Sequencing)

овозможува анализирање на сите miRNA присутни во примерокот. Истата метода, дава можност детално да се истражи примерокот за анализа и во моментот претставува најдобар метод за откривање на miRNA. Секвенционирањето на DNA со помош на NGS нуди можност за секвенционирање на RNA и секвенционирањето на miRNA која има посебни карактеристики. Moldovan et al. во 2014 год. во нивната студија детално ги имаат разработено сите предности и недостатоци на оваа метода што ги вклучува високата цена за рутинска употреба и потребата од дигитална инфраструктура за анализа и интерпретација на добиените резултати.

#### 3.4 Методот на Western blot

Bohm-Hostatter et al. (2010) ја истакнуваат неговата главна предност што овозможува истовремено откривање на зрели miRNA и нејзините прекурзори. Основниот принцип на овој метод опфаќа: примерокот од RNA се дигестира со помош на рестриktivна ендонуклеаза, одделен со агарозен гел електрофореза, денатуриран и префрлен во најлонска мембрана или нитроцелулозен филм според позицијата во гелот и

фиксиран со изотоп или друг маркер сонда. По миењето на слободната сонда, miRNA може да се детектираат со автордиографски или други соодветни техники и методи. Единствените недостатоци на оваа метода е што претставува полу-квантитативна метода, ниско пропусна, одзема време и предизвикува лесна деградација на RNA.

#### 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Имајќи во предвид дека овој ревијален труд се базира на преглед на веќе објавени резултати и заклучоци ќе направиме целосна анализа на истите како и компарација на клеточната пролиферација при дадени заболувања со содржината на miRNA.

Во студијата на Ramy A. Younan, et al. (2017) направена во Ain Shams University Hospital, Chest Department, and Abassia Chest Hospital во Египет, опфатени се 50 пациенти поделени во две групи. Првата група вклучува 25 пациенти со рак на белите дробови и втората група вклучува 25 пациенти без малигни заболувања. Направена е анализа на miR-204 како дијагностички маркер за карцином на белите дробови преку споредување на неговата вредност од примероци во серумот и бронхијално ткиво. Исто така направена е компарација на генетската експресија на генот miR-204-5p и во туморското ткиво и во серумот на не-ситноклеточен белодробен карцином со примероците кај пациентите без малигнитет. Добиените резултати потврдуваат дека нивото на генска експресија на miR-204-5p е значително намален (за два пати) кај пациенти со не-ситно клеточниот белодробен карцином во споредба со пациентите без малигнитет ( $P < 0,01$ ).

Во студијата на Lukas van de Sand et al. (2022) е во Универзитетската болница Есен, Германија од почетокот на 2020 година до април 2022, е истражуван miRNA-200c како потенцијален маркер за предвидување на сериозноста на COVID-19. Студијата опфаќа 113 пациенти од кои се собрани примероци во две временски рамки (почеток - време на хоспитализација). Групата на пациенти се состоела од 39 жени и 72 мажи (средната возраст е 64 години). Сите пациенти страдале од миокарден инфаркт ( $n = 13$ ), хронично белодробно заболување ( $n = 18$ ) и дијабетес ( $n = 18$ ) пред да бидат хоспитализирани поради COVID-19.

Во оваа студија, се истражувала експресијата на miRNA-200c кај тешки пациенти со COVID-19 по хоспитализација со помош на qRT-PCR. Користена е плазма од пациенти во времето на хоспитализација (почеток) и за време на нивниот престој во болница на 7-ми ден. Резултатите од оваа студија потврдуваат дека целокупната група покажала значително зголемување на содржината на miRNA-200c помеѓу почетокот и седмиот ден ( $p = 0,004$ ) од студијата, кога се анализирале вкупните примероци. Во просек, нивото на генска експресија бил зголемен за 6,9 пати. Интересно е што пациентите кои починале по седумдневен третман на интензивна нега имале во просек 5,8 пати повисоки нивоа на miRNA-200c од пациентите кои закрепнале од COVID-19 ( $p = 0,047$ ).

Во истражувањето на Inda Mandac Rogulj et al. (2020), направено во Одделот за хематологија на Болницата Меркур во Загреб од 2015 до 2019 година, биле опфатени 41 пациент со миелодиспластичен синдром (МДС), каде што е анализирана содржината на избраните miRNA како дијагностички биомаркери кај пациенти со МДС. Анализирани се miRNA (125a, 125b, 126, 99b, let-7a) во примероци на плазма. Заклучоците од студијата потврдуваат покачено ниво на генска експресија на miR-125a кај пациентите со МДС во однос на генетската експресија кај здрави испитаници.

#### 5. ЗАКЛУЧОК

Постои широк спектар на примена на miRNA во делот на молекуларната лабораториска дијагностика. Станува збор за неинвазивна, високоспецифична и сензитивна метода за изолација и квантификација на miRNA. Најновите публикации потврдуваат дека променентата генска експресија на miRNA претставува идеален дијагностички биомаркер кој дава информации за динамиката на клеточниот циклус и пролиферацијата на клетките. Од тие причини, примената на miRNA како алатка од страна на лаборантите и останатиот медицински персонал во голем број на лаборатории и институти, ќе помогне во раната дијагностика, лекување и третман на голем број на заболувања. Во иднината сигурно ќе се донесат нови идеи и ќе се потигне голем напредок во оваа област со што ќе биде реализиран потенцијалот обезбеден од молекулите на miRNA кон подобрување на јавното здравје.

#### ЛИТЕРАТУРА

Biswas, S., Haleyurgirisetty, M., Lee, S., Hewlett, I., & Devadas, K. (2019). Development and validation of plasma miRNA biomarker signature panel for the detection of early HIV-1 infection. *EBioMedicine*. 42: 307–316.

- Cao, Z., Zhang, N., Lou, T., Jin, Y., Wu, Y., Ye, Z., & Pan, J. (2014). microRNA-183 down-regulates the expression of BKCa $\beta$ 1 protein that is related to the severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Hippokratia* 2014, 18, 328–332.
- Dong, E., Du, H., & Gardner, L. (2020). An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect. Dis.* 2020, 20, 533–534
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., & Pillai, R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology.* 15(3):331-341.
- Han, J. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development.* 18(24):3016-3027.
- Hanna, J.A., Wimberly, H., Kumar, S., Slack, F., Agarwal, S., & Rimm, D.L. (2017). Quantitative analysis of microRNAs in tissue microarrays by in situ hybridization. *Biotechniques.* 52: 235-245.
- Hashimoto, T., Perlot, T., Rehman, A., Trichereau, J., Ishiguro, H., Paolino, M., Sigl, V., Hanada, T., Hanada, R., Lipinski, S., et al. (2012). ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature* 2012, 487, 477–481.
- Imai, Y., Kuba, K., & Penninger, J.M. (2008). The discovery of angiotensin-converting enzyme 2 and its role in acute lung injury in mice. *Exp. Physiol.* 2008, 93, 543–548.
- Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., et al. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 2005, 436, 112–116.
- Inda Mandac Rongulj et al. (2020). SVEUČILIŠTE U ZAGREBU – MEDICINSKI FAKULTET.
- Jiang, Z., Tao, J.H., Zuo, T., Li, X.M., Wang, G.S., Fang, X., Xu, X.L., & Li, X.P. (2017). The correlation between miR-200c and the severity of interstitial lung disease associated with different connective tissue diseases. *Scand. J. Rheumatol.* 2017, 46, 122–129.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75(5):843-854.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K., Lee, S., Baek, S.H., & Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23(20):4051-4060.
- Li, J. J., Huang, M. J., Li, Z., Li, W., Wang, F., Wang L., Li, X.L., Zheng, X., & Zou, Y. (2018). Identification of potential whole blood MicroRNA biomarkers for the blood stage of adult imported falciparum malaria through integrated mRNA and miRNA expression profiling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 506: 471–477.
- Lindner, K., Haier, J., Wang, D.I., Watson, D.J., Hussey, R. (2015). Circulating microRNAs: Emerging biomarkers for diagnosis and prognostic in patients with gastrointestinal cancers. *Clin. Sci.* 2015, 28, 1–15.
- Liu, Q., Du, J., Yu, X., Xu, J., Huang, F., Li, X., Zhang, C., Li, X., Chang, J., Shang, D., et al. (2017). miRNA-200c-3p is crucial in acute respiratory distress syndrome. *Cell Discov.* 2017, 17021.
- Lukas van de Sand , Peer Braß , Jonas Gregorius , Kevin Pattberg , Andrea Engler , Ulf Dittmer, Christian Taube , Stephan Brock , Marc Moritz Berger , Thorsten Brenner , Oliver Witzke, and Adalbert Krawczyk,(2022), Upregulation of miRNA-200c during Disease Progression in COVID-19 Patients/Journal of clinical medicine
- Lyu L., Zhang X., Li C., Yang T., Wang J., Pan L., Jia H., Li Z., Sun Q., Yue L., Chen F., Zhang Z. (2019): Small RNA Profiles of Serum Exosomes Derived From Individuals With Latent and Active Tuberculosis. *Front. Microbiol.* 10: 1174.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogossova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 10513–10518.
- Ramy, A., Korraaa, Y.E., Elsayeda, M. A., Abdelkadera, M.A., El-khazragyb, N. (2022), Role of miRNA-204 as a putative diagnostic marker in non-small-cell lung cancer/ *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis* 71(3):363
- Ruvkun, G. (2001). MOLECULAR BIOLOGY: Glimpses of a Tiny RNA World. 294(5543):797-799.
- Sodagar, H., Alipour, S., Hasani, S., Gholizadeh-Ghaleh Aziz, S., Khadem Ansari, M.H., & Asghari, R. (2022). The role of microRNAs in COVID-19 with a focus on miR-200c. *J. Circ. Biomark.* 2022, 11, 14–23
- Van Rooij, E., & Olson, E.N. (2007). MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J. Clin. Invest.* 117(9):2369-2376.
- Ye, J. et al. (2019). *Journal of Pharmaceutical Analysis* 9, 217e226
- Yi, R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development.* 17(24):3011-3016.