

**SMAD-СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ –
ОБЪЕКТ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ микроРНК,
АССОЦИИРОВАННЫХ С ФИБРОЗОМ МИОКАРДА:
in silico АНАЛИЗ СЕТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ**

© 2022 М.В. Писклова^{1,2*}, Г.Ж. Осьмак^{1,2}, О.О. Фаворова^{1,2}

¹ ФГБУ НМИЦ Кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России,
121552 Москва, Россия; электронная почта: pisklova_maria@mail.ru

² РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 03.06.2022

После доработки 07.06.2022

Принята к публикации 07.06.2022

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – наследственная патология сердца, обусловленная мутациями в генах саркомеров, которая сопровождается фиброзом миокарда в сочетании с прогрессирующей сердечной недостаточностью и аритмиями. Исследования последних лет позволяют предполагать, что в развитие ГКМП вовлечены также нарушения в механизмах регуляции экспрессии генов. МикроРНК – короткие некодирующие РНК – относятся к одному из типов таких регуляторов. Как правило, одна молекула микроРНК регулирует на посттранскрипционном уровне множество генов-мишеней, кодирующих различные белки, в связи с чем установление роли той или иной микроРНК в патогенезе заболевания затруднено. В представленной работе мы отобрали в базе данных PubMed 15 микроРНК, экспрессия которых ассоциирована с фиброзом миокарда – одним из ключевых патологических процессов при ГКМП. При помощи разработанного нами ранее алгоритма проведён *in silico* поиск сигнальных путей, регулируемых этими микроРНК. Оказалось, что 10 микроРНК из их числа вовлечены в регуляцию TGF- β /SMAD-сигнального пути. При этом среди генов SMAD-сигнального пути мишенью большинства рассматриваемых микроРНК служит ген *MYC*, который вовлечён в развитие фиброза в некоторых тканях. Вывод о регуляции того же TGF- β /SMAD-сигнального пути набором других микроРНК, ассоциированных с гипертрофией миокарда при ГКМП, был сделан в нашем предшествующем исследовании. Совпадение результатов двух независимых биоинформатических исследований свидетельствует о том, что SMAD-сигнальный путь действительно служит ключевым объектом регуляции патологических процессов при ГКМП. Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание патологических процессов, лежащих в основе развития ГКМП.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фиброз, микроРНК, гипертрофическая кардиомиопатия, ГКМП, *in silico* анализ, сети взаимодействия генов, TGF- β /SMAD-сигнальный путь.

DOI: 10.31857/S0320972522070016, **EDN:** AUYNOL

ВВЕДЕНИЕ

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – одна из самых распространённых форм наследственных кардиомиопатий. Замещение ткани сердца соединительной тканью – фиброз миокарда – ведущий патогенетический механизм в развитии сердечной недостаточности, аритмий или внезапной сердечной

смерти, которые неизбежно возникают при прогрессировании ГКМП [1]. Сложившееся представление о ГКМП как о заболевании, возникающем вследствие мутаций в генах белков саркомеров [2], претерпело за последние годы существенные изменения. Среди пациентов с ГКМП только в 60% случаев обнаруживаются подобные мутации, что позволяет выдвинуть предположение о вовлечённости в патогенез заболевания механизмов регуляции экспрессии генов на различных уровнях, в том числе на уровне регуляторных микроРНК [3, 4].

МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие РНК (средняя длина 22 нуклео-

Принятые сокращения: ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия; ЛСС – самая большая компонента связности (The Largest Connected Component).

* Адресат для корреспонденции.

тида), которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне [5]. По данным 22-го релиза курируемой базы miRBase, в организме человека обнаружено 2654 зрелых микроРНК [6]. Показано, что при различных сердечно-сосудистых заболеваниях, и в частности при кардиомиопатиях, уровни отдельных микроРНК могут изменяться и в плазме крови, и в миокарде [3, 7, 8]. При этом каждая микроРНК имеет большое количество генов-мишеней, что затрудняет поиск и интерпретацию функций и роли в патогенезе даже тех микроРНК, для которых уже была показана ассоциация с заболеванием. Ранее мы предложили алгоритм для предсказания регуляторной функции отдельно взятых микроРНК, основанный на *in silico* анализе структуры сети их генов-мишеней [9]; впоследствии он получил обобщение для предсказания функции совокупности нескольких микроРНК [10]. В представляемой работе проведён отбор и последующий *in silico* анализ функций микроРНК, связанных с фиброзом миокарда, как ключевым патогенетическим процессом при ГКМП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор микроРНК, ассоциированных с фиброзом миокарда. В базе данных PubMed проведён поиск публикаций, содержащих индексируемые в MeSH-базе термины «cardiomyopathies», «miRNA» и «fibrosis», в период с 2008 г. до февраля 2022 г., и составлен перечень обнаруженных микроРНК.

Дальнейший отбор микроРНК из числа упомянутых в этих работах проводили следующим образом. Среди публикаций выбирали те, в которых для микроРНК была показана ассоциация и/или корреляция с фиброзом миокарда и проведены эксперименты с изменением уровня микроРНК (подавление и сверхэкспрессия микроРНК). Если в работе изучали лишь однонаправленное изменение уровня микроРНК, среди таких публикаций мы отбирали те, в которых были проведены дополнительные эксперименты по изучению роли микроРНК, такие как поиск потенциальных мишеней микроРНК, оценка связывания микроРНК с мишенью, изучение влияния взаимодействия микроРНК с мишенью на различные показатели фиброза. Работы, посвящённые изучению циркулирующих микроРНК, были исключены из рассмотрения, так как уровни микроРНК в плазме крови могут не отражать их уровни в тканях. В случае, когда исследование было проведено на клетках мышей или крыс, отби-

рали микроРНК, которые либо идентичны по нуклеотидному составу микроРНК человека, либо выполняют у человека сходные функции.

В некоторых публикациях не было указано, какую зрелую микроРНК брали для исследования. В таких случаях, используя базу miRBase, мы выбирали те зрелые микроРНК, для которых наименование в графе «Previous IDs» совпадало с наименованием в рассматриваемой статье.

Анализ возможной функции микроРНК. Для предсказания функций микроРНК использовали обобщённый алгоритм, подробно описанный в работах Osmaк et al. [9, 10]. Программный код, которым проведён анализ отобранных микроРНК, доступен по ссылке (онлайн-репозиторий, https://github.com/GJOsmaк/miRNET_fibrosis).

Вкратце, сначала мы строим отдельную сеть взаимодействий продуктов генов-мишеней каждой из отобранных микроРНК, которые экспрессируются в ткани сердца. Узлы сети представлены белковыми продуктами этих генов. Любая пара узлов имеет связь, если «минимальная необходимая оценка взаимодействия» по базе данных STRING (база данных белок-белковых взаимодействий, <https://string-db.org/>, по состоянию на 18 декабря 2020 г.) оценивается не менее 0,9 с настройками по умолчанию. Из каждой построенной сети извлекается самая большая компонента связности (The Largest Connected Component, LCC). Для каждого узла в LCC рассчитывается нормализованная степенная центральность и центральность по посредничеству. Далее мы удаляем узлы из каждой LCC один за другим в порядке от наибольшей суммы обеих центральностей к наименьшей. По мере удаления узлов LCC постепенно распадается на отдельные связанные компоненты, а её мощность (количество входящих в неё узлов) падает. В тот момент, когда LCC перестаёт активно распадаться, а мощность LCC выходит на плато, мы останавливаем процесс и рассматриваем все удалённые узлы как ключевые гены, необходимые для связности построенной сети. (Более подробное описание можно найти в статье Osmaк et al. [9].) Далее, используя два набора, «микроРНК» и «сигнальные пути» онлайн-базы данных биологических путей Reactome (далее — сигнальные пути Reactome), связанные через отобранные ключевые гены, получаем инъективную функцию: «ключевые гены микроРНК → сигнальные пути Reactome». Рассматривая наборы «микроРНК» и «сигнальные пути Reactome» в качестве узлов сети, а набор сопоставлений

«ключевые гены микроРНК → сигнальные пути Reactome» в качестве рёбер, мы строим двудольный неориентированный граф, или сеть «микроРНК–сигнальные пути Reactome». Если построенная сеть содержит не менее двух связанных микроРНК (т.е. микроРНК, соединённых друг с другом через последовательность рёбер и других узлов), ищем минимальное количество узлов из набора «сигнальных путей Reactome», связанных с наибольшим количеством микроРНК, используя жадный алгоритм (greedy algorithm), подробное описание которого дано в статье Osmak et al. [10].

Оценку статистической значимости извлекаемых модулей проводили, исходя из биномиального распределения степеней узлов, соответственно, *p*-value задавалось как вероятность того, что выбранный узел-ген (или группа узлов-генов) будет иметь такое или большее число связей с узлами-микроРНК. Поправку на множественные сравнения вводили по Бонферрони, как это описано ранее [10].

Далее для получения конкретных генов-мишеней строили двудольный граф микроРНК и их генов-мишеней, которые относятся к отобранным сигнальным путям. Гены-мишени с наибольшей входящей степенью узла считали главными акцепторами регуляторных эффектов микроРНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате поиска в базе данных PubMed по запросам, приведённым в разделе «Материалы и методы», найдено 58 публикаций. Из составленного перечня обнаруженных в этих публикациях микроРНК, согласно критериям, описанным в разделе «Материалы и методы», было выбрано 15 микроРНК, ассоциированных с фиброзом миокарда. Из них для девяти — hsa-miR-24-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-203-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-325, hsa-miR-891a-3p, hsa-let-7d-5p — описано антифибротическое действие; а для шести — hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-145-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-223-3p — профибротическое действие (таблица).

Построение сетей взаимодействия генов-мишеней и извлечение из них ключевых генов оказалось невозможным для всех 15 выбранных микроРНК; из их числа пришлось исключить hsa-miR-325, hsa-miR-145-3p и hsa-miR-891a-3p в связи с недостатком надёжных данных о взаимодействии белковых продуктов их генов-мишеней.

Для поиска сигнальных путей Reactome, связанных с большинством из оставшихся 12 микроРНК через их ключевые гены, мы, как и ранее [10], использовали жадный алгоритм (рис. 1, а).

На первой итерации алгоритма мы определили SMAD-модуль, показанный на рис. 1, б, который содержит участок SMAD-сигнального пути (в сигнальных путях Reactome он обозначен как SMAD2/SMAD3:SMAD4-гетеротример). Он перепредставлен ключевыми генами-мишенями 10 микроРНК, а именно: hsa-miR-21-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-29-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-203a-3p и hsa-let-7d-5p. Для случайного набора из 12 микроРНК вероятность получения такого модуля, содержащего не менее 10 микроРНК, нацеленных на этот путь, составляет $9,41 \times 10^{-5}$ с поправкой на множественные сравнения по

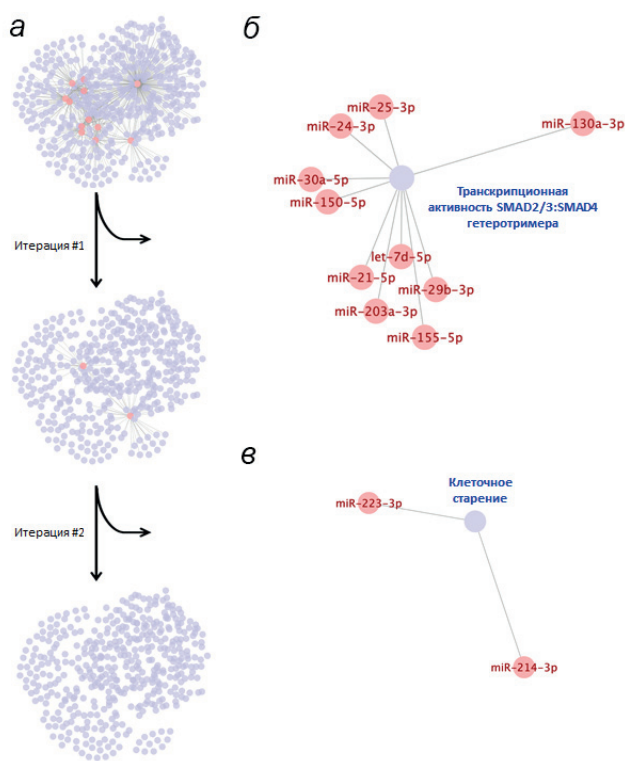


Рис. 1. Предсказание функции отобранных микроРНК при помощи жадного алгоритма. Каждая сеть представляет собой двудольный граф, содержащий два набора узлов: набор микроРНК (отмечены красным) и набор сигнальных путей Reactome. Узлы из набора микроРНК и набора сигнальных путей Reactome соединяются ребром, если ключевые гены-мишени микроРНК перепредставлены в наборе сигнальных путей Reactome. а – Две итерации жадного поиска сигнальных путей Reactome, связанных с выбранными микроРНК в исходной сети. б – Модуль, выявленный после первой итерации жадного алгоритма, который содержит участок SMAD-сигнального пути и связанные с ним 10 микроРНК. в – Модуль, выявленный после второй итерации, содержащий один сигнальный путь «Клеточное старение», связанный с двумя микроРНК.

Выбранные для анализа сетей взаимодействий генов-мишеней микроРНК, которые, по данным литературы, ассоциированы с фибротическим процессом в тканях миокарда, культурах кардиомиоцитов или фибробластов

микроРНК	Объект исследования	Наблюдаемый эффект	Ссылка
Антифибротические микроРНК			
miR-24	миокард мыши; культура фибробластов сердца крысы	снижает уровни экспрессии коллагена I и III типов, α -SMA и фибронектина; улучшает гистологическую картину фиброза миокарда; подавляет миграцию и пролиферацию фибробластов	[11]
miR-29b	миокард мыши; культура фибробластов сердца мыши	подавляет экспрессию коллагена I типа и α -SMA; замедляет фиброз миокарда	[12]
miR-30a-5p	миокард крысы; культура фибробластов сердца крысы	подавляет накопление коллагена и пролиферацию фибробластов	[13]
miR-150-5p	миокард мыши; культура фибробластов сердца мыши	ингибирует пролиферацию и миграцию фибробластов, регулирует их дифференцировку в миофибробласты; понижает уровни коллагена I типа и α -SMA; нокаут miR-150-3p резко усугубляет гистологическую картину фиброза	[14]
miR-203-3p	миокард мыши; культура кардиомиоцитов мыши	улучшает гистологическую картину фиброза миокарда; снижает уровни экспрессии коллагенов I и III типов	[15]
miR-214-3p	миокард мыши; культура миофибробластов мыши	улучшает гистологическую картину фиброза миокарда; подавляет экспрессию коллагенов I и III типов, α -SMA	[16]
miR-325-3p	миокард крысы, миокард мыши; культура фибробластов сердца крысы	подавляет экспрессию коллагена I и III типов, α -SMA, фибронектина, пролиферацию и миграцию фибробластов	[17]
miR-891a-3p	культура фетальных фибробластов сердца крысы	подавляет рост фибробластов и экспрессию коллагена I типа и CTGF	[18]
Let-7d	миокард мыши; культура фибробластов сердца мыши	подавляет фиброгенез, снижает уровни α -SMA, фибронектина, CTGF, коллагенов I и III типов и отложение коллагена в миокарде; подавляет пролиферацию фибробластов, а также переход фибробластов в миофибробласты	[19]
Профибротические микроРНК			
miR-21	миокард мыши, человека; культура фибробластов сердца крысы	подавление miR-21 уменьшает проявления фиброза миокарда и содержание коллагена; способствует пролиферации фибробластов	[20, 21]
miR-25-3p	миокард мыши, миокард человека; культура фибробластов сердца мыши	повышает уровни экспрессии генов коллагенов I и III типов, α -SMA	[22]
miR-130a-3p	миокард мыши, миокард человека; культура фибробластов сердца крысы	регулирует уровни коллагенов I и III типов, α -SMA, CTGF, фибронектина, матриксной металлопротеиназы 9, а также переход фибробластов в миофибробласты	[23]
miR-145-3p	культура фетальных фибробластов сердца крысы	стимулирует рост фибробластов и экспрессию коллагена I типа, CTGF и α -SMA	[18]
miR-155	культура эмбриональных кардиомиоцитов крысы	повышает уровни экспрессии коллагена I типа и α -SMA	[24]
miR-223	миокард крысы; культура эмбриональных кардиомиоцитов крысы	регулирует уровни экспрессии коллагенов I и III типов; ингибирование miR-223 улучшает гистологическую картину фиброза миокарда	[25]

Примечание. CTGF – фактор роста соединительной ткани; α -SMA – α -актин гладких миоцитов.

Бонферрони. На второй итерации работы алгоритма был извлечён модуль, содержащий сигнальный путь «Клеточное старение» («Cellular Senescence»), и две связанных с ним микроРНК, hsa-miR-223-3p и miR-214-3p (показаны на рис. 1, в), однако вероятность извлечения модуля такой структуры мала; она оценивается нами в 0,62 с поправкой на множественные сравнения по Бонферрони (расчёты см. в онлайн-репозитории по ссылке https://github.com/GJOsmak/miRNET_fibrosis). По этой причине второй модуль мы относим к статистическому шуму и далее не рассматриваем.

Для выяснения конкретных механизмов, лежащих в основе микроРНК-опосредованной регуляции экспрессии генов выявленного SMAD-модуля, по данным базы валидированных мишеней miRTarBase, мы проанализировали взаимодействия между входящими в него микроРНК с их ключевыми мРНК-мишенями (рис. 2). Анализ показал, что miR-24-3p связывается с мРНК наибольшего количества генов: MYC, SP1, UBC, TFDP2, RBL1, NEDD4 и HDAC1. При этом мРНК гена MYC имеет в своей последовательности сайты связывания для наибольшего числа микроРНК среди проанализированных нами: let-7d-5p, miR-25-3p, miR-29b-3p, miR-21-5p, miR-130a-3p, miR-24-3p и miR-155-5p.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе мы провели проверку состоятельности предсказаний функций микроРНК, основанных на применении ранее предложенного нами алгоритма, который обобщает имеющиеся в открытом доступе данные по экспериментально валидированным мишеням микроРНК [9, 10]. Для такой проверки мы использовали набор микроРНК, для которых, согласно данным литературы, имеются экспериментальные свидетельства их вовлечённости в регуляцию процессов фиброза — одного из ключевых звеньев патогенеза ГКМП.

Исходя из данных научных статей, индексируемых в базе NCBI PubMed за 2008—2022 гг., мы отобрали 15 микроРНК, предположительно, вовлечённых в развитие фиброза миокарда (таблица). Однако для генов-мишеней трёх микроРНК (hsa-miR-325, hsa-miR-145-3p и hsa-miR-891a-3p) из-за недостатка данных не удалось построить сети взаимодействия, и эти микроРНК были исключены из рассмотрения. Анализ возможной функции остальных 12 микроРНК по предложенному нами алгоритму показал, что 10 из них, а именно:

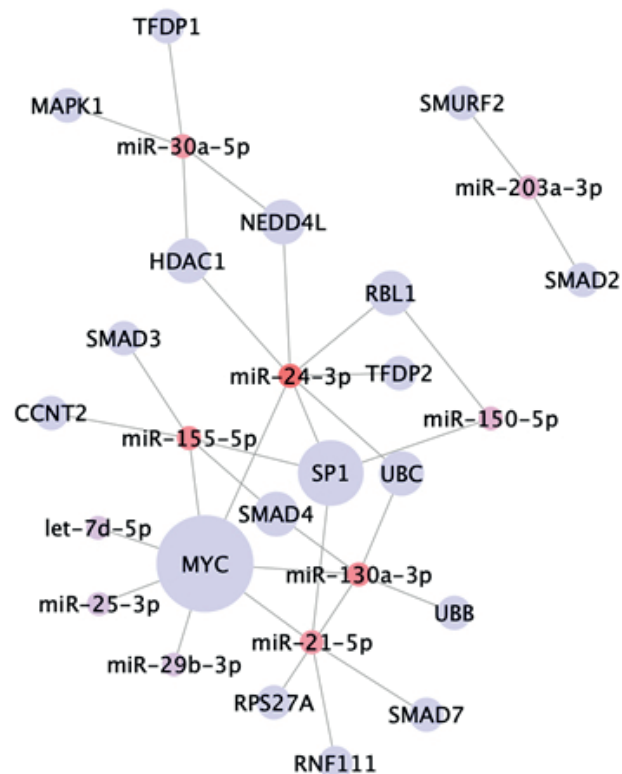


Рис. 2. Двудольный граф микроРНК и их ключевых генов-мишеней, перепредставленных среди генов SMAD-сигнального пути. Размер узла гена-мишени отображает входящую степень узла (число микроРНК, с которыми он связан), градиент от синего к красному — исходящую степень узла (количество генов-мишеней, с которыми связана микроРНК)

hsa-miR-21-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-29-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-203a-3p и hsa-let-7d-5p, вероятно, вовлечены в регуляцию экспрессии генов SMAD-сигнального пути, кодирующих белки семейства SMAD — основных передатчиков сигналов для рецепторов суперсемейства TGF- β (трансформирующих факторов роста бета), которые критически важны для регуляции развития и роста клеток. При этом выявленные микроРНК регулируют SMAD-модуль, содержащий гены для трёх формирующих гетеротример белков (SMAD2, SMAD3 и SMAD4) из 8-членного семейства SMAD. Белки SMAD2 и SMAD3 непосредственно передают сигналы от TGF- β -рецепторного комплекса, а SMAD4 выполняет вспомогательную роль. Связываясь с двумя молекулами SMAD (SMAD2 и/или SMAD3), SMAD4 формирует гетеротример, который направляется в ядро для регуляции экспрессии генов [26].

Обобщение экспериментальных данных, которое было достигнуто с помощью нашего алгоритма, хорошо согласуется с представле-

ниями, согласно которым TGF- β -сигналинг занимает центральное место в развитии таких патологий сердца, как сердечная недостаточность, гипертрофия и фиброз миокарда, ремоделирование камер сердца [27]. Действительно, было показано, что активация TGF- β -рецепторного комплекса и последующая передача сигналов посредством SMAD2/SMAD3 регулирует экспрессию генов, связанных с фиброзом – генов металлопротеиназ, коллагенов, протеогликанов, интегринов и фактора роста соединительной ткани (CTGF) [27]. SMAD2 отвечает за подавление экспрессии этих генов, а SMAD3 – за их активацию [27].

В результате детализации возможных регуляторных механизмов, достигнутой при анализе сети взаимодействий молекул микроРНК с их экспериментально валидированными генами-мишенями, мы установили, что miR-24-3p регулирует наибольшее число генов, относящихся к обнаруженному нами SMAD-модулю; с другой стороны, мРНК гена *MYC* из этого модуля имеет наибольшее количество сайтов связывания разных микроРНК. Эти данные хорошо согласуются с представлениями о плейотропности и вырожденности регуляции посредством микроРНК. При этом miR-24-3p имеет сайты связывания не только на мРНК гена *MYC*, но и на мРНК других генов выявленного нами SMAD-модуля, в частности, *SP1*, *UBC*, *TFDP2*, *RBL1*, *NEDD4l* и *HDAC1* (рис. 2). Это наблюдение хорошо согласуется с данными о разнонаправленной регуляции посредством этой микроРНК TGF- β /SMAD-сигнального пути в процессах, связанных с фиброзом и дифференцировкой клеток [28–31]. При этом мы обнаружили, что ген *MYC* регулируется наибольшим числом рассматриваемых микроРНК. Этот ген относится к семейству регуляторных онкогенов, кодирующих транскрипционные факторы; возрастание его экспрессии ассоциировано с опухолевыми заболеваниями, поскольку при этом повышается экспрессия генов, участвующих в пролиферации клеток (база данных NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17869>). Известно также, что *MYC* контролирует транскрипцию генов при поляризации резидентных макрофагов в макрофаги типа M2 [32], которые запускают и поддерживают репарационные процессы, связанные с накоплением коллагена – главного компонента внеклеточного матрикса соединительной ткани [33–35]. Описано, что сверхэкспрессия *MYC* провоцирует фиброз печени [36] и TGF- β -опосре-

дованный фиброз почек [37, 38]. Кроме того, показано, что экспрессия гена *MYC* повышена при гипертрофии миокарда, в частности, при гипертрофической кардиомиопатии ещё до появления основных симптомов заболевания [39–41]. Таким образом, выявленная нами роль *MYC* как ключевого гена-мишени микроРНК, ассоциированных с фиброзом миокарда, хорошо согласуется с описанными свойствами этого гена.

Ранее [10] мы показали, что набор микроРНК, участвующих в гипертрофии миокарда, регулирует гены SMAD-сигнального пути и предположили, что это может вносить свой вклад в прогрессирование ремоделирования миокарда при ГКМП. Среди 12 микроРНК, анализируемых в цитируемой работе, только три оказались общими с теми микроРНК, которые были отобраны как ассоциированные с фиброзом для настоящего исследования – hsa-miR-21-5p, hsa-miR-29-3p и hsa-miR-155-5p. Тот факт, что выводы о регуляции TGF- β /SMAD-сигнального пути двумя различными, мало пересекающимися наборами микроРНК, из которых один ассоциирован с гипертрофией миокарда, а другой – с фиброзом, были сделаны нами в двух независимых биоинформатических исследованиях, свидетельствует о том, что SMAD-сигнальный путь действительно служит ключевым объектом микроРНК-опосредованной регуляции патологических процессов при ГКМП. Полученные нами данные, после их экспериментального подтверждения, могли бы лечь в основу разработки новых терапевтических подходов для ГКМП.

Вклад авторов. О.О. Фаворова, Г.Ж. Осьмак – концепция и руководство работой; Г.Ж. Осьмак, М.В. Писклова – проведение анализа; О.О. Фаворова, Г.Ж. Осьмак, М.В. Писклова – обсуждение результатов исследования; Г.Ж. Осьмак, М.В. Писклова – написание текста; О.О. Фаворова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00353).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Angelopoulos, A., Oikonomou, E., Vogiatzi, G., Antonopoulos, A., Tsalamandris, S., et al. (2021) MicroRNAs as biomarkers in hypertrophic cardiomyopathy: current state of the art, *Curr. Med. Chem.*, **28**, 7400-7412, doi: 10.2174/0929867328666210405122703.
- Marian, A. J., Salek, L., and Lutucuta, S. (2001) Molecular genetics and pathogenesis of hypertrophic cardiomyopathy, *Minerva Med.*, **92**, 435-451.
- Chiti, E., Di Paolo, M., Turillazzi, E., and Rocchi, A. (2021) MicroRNAs in hypertrophic, arrhythmogenic and dilated cardiomyopathy, *Diagnostics*, **11**, 1720, doi: 10.3390/diagnostics11091720.
- Maron, B. J., Maron, M. S., Maron, B. A., and Loscalzo, J. (2019) Moving beyond the sarcomere to explain heterogeneity in hypertrophic cardiomyopathy: JACC review topic of the week, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **73**, 1978-1986, doi: 10.1016/j.jacc.2019.01.061.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., and Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 102-114, doi: 10.1038/nrg2290.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019) miRBase: from microRNA sequences to function, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D155-D162, doi: 10.1093/nar/gky1141.
- Scolari, F. L., Faganello, L. S., Garbin, H. I., Mattos, B. P. E., and Biolo, A. (2021) A systematic review of microRNAs in patients with hypertrophic cardiomyopathy, *Int. J. Cardiol.*, **327**, 146-154, doi: 10.1016/j.ijcard.2020.11.004.
- Romaine, S. P. R., Tomaszewski, M., Condorelli, G., and Samani, N. J. (2015) MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians, *Heart*, **101**, 921-928, doi: 10.1136/heartjnl-2013-305402.
- Osmak, G., Kiselev, I., Baulina, N., and Favorova, O. (2020) From miRNA target gene network to miRNA function: miR-375 might regulate apoptosis and actin dynamics in the heart muscle via Rho-GTPases-dependent pathways, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, e9670, doi: 10.3390/ijms21249670.
- Osmak, G., Baulina, N., Kiselev, I., and Favorova, O. (2021) MiRNA-regulated pathways for hypertrophic cardiomyopathy: network-based approach to insight into pathogenesis, *Genes (Basel)*, **12**, e2016, doi: 10.3390/genes12122016.
- Wang, J., Huang, W., Xu, R., Nie, Y., Cao, X., et al. (2012) MicroRNA-24 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction, *J. Cell. Mol. Med.*, **16**, 2150-2160.
- Zhang, Y., Huang, X. R., Wei, L. H., Chung, A. C., Yu, C. M., et al. (2014) miR-29b as a therapeutic agent for angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting TGF- β /Smad3 signaling, *Mol. Ther.*, **22**, 974-985.
- Yang, X. X., and Zhao, Z. Y. (2022) miR-30a-5p inhibits the proliferation and collagen formation of cardiac fibroblasts in diabetic cardiomyopathy, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **100**, 167-175, doi: 10.1139/cjpp-2021-0280.
- Deng, P., Chen, L., Liu, Z., Ye, P., Wang, S., et al. (2016) MicroRNA-150 inhibits the activation of cardiac fibroblasts by regulating c-Myb, *Cell. Physiol. Biochem.*, **38**, 2103-2122, doi: 10.1159/000445568.
- Yang, X., Li, X., Lin, Q., and Xu, Q. (2019) Up-regulation of microRNA-203 inhibits myocardial fibrosis and oxidative stress in mice with diabetic cardiomyopathy through the inhibition of PI3K/Akt signaling pathway via PIK3CA, *Gene*, **715**, e143995.
- Zhu, W. S., Tang, C. M., Xiao, Z., Zhu, J. N., Lin, Q. X., et al. (2016) Targeting EZH1 and EZH2 contributes to the suppression of fibrosis-associated genes by miR-214-3p in cardiac myofibroblasts, *Oncotarget*, **7**, 78331-78342, doi: 10.18632/oncotarget.13048.
- Wang, C. C., Shang, B. B., Yang, C. W., Liu, Y. F., Li, X. D., et al. (2018) MicroRNA-325 alleviates myocardial fibrosis after myocardial infarction via downregulating GLI1, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **22**, 5339-5346, doi: 10.26355/eurrev_201808_15735.
- Verjans, R., Derks, W. J. A., and Korn, K. (2019) Functional screening identifies microRNAs as multi-cellular regulators of heart failure, *Sci. Rep.*, **9**, e6055, doi: 10.1038/s41598-019-41491-9.
- Liang, H., Pan, Z., Zhao, X., Liu, L., Sun, J., et al. (2018) LncRNA PFL contributes to cardiac fibrosis by acting as a competing endogenous RNA of let-7d, *Theranostics*, **8**, 1180-1194.
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., et al. (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts, *Nature*, **456**, 980-984, doi: 10.1038/nature07511.
- Liu, S., Li, W., Xu, M., Huang, H., Wang, J., et al. (2014) Micro-RNA 21 Targets dual specific phosphatase 8 to promote collagen synthesis in high glucose-treated primary cardiac fibroblasts, *Can. J. Cardiol.*, **30**, 1689-1699.
- Zeng, N., Wen, Y. H., Pan, R., Yang, J., Yan, Y. M., et al. (2021) Dickkopf 3: a novel target gene of miR-25-3p in promoting fibrosis-related gene expression in myocardial fibrosis, *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **14**, 1051-1062, doi: 10.1007/s12265-021-10116-w.
- Li, L., Bounds, K. R., Chatterjee, P., and Gupta, S. (2017) MicroRNA-130a, a potential antifibrotic target in cardiac fibrosis, *J. Am. Heart Assoc.*, **6**, e006763, doi: 10.1161/JAHA.117.006763.
- Li, Y., Duan, J. Z., He, Q., and Wang, C. Q. (2020) miR155 modulates high glucose-induced cardiac fibrosis via the Nrf2/HO-1 signaling pathway, *Mol. Med. Rep.*, **22**, 4003-4016, doi: 10.3892/mmr.2020.11495.
- Xu, D., Zhang, X., Chen, X., Yang, S., and Chen, H. (2020) Inhibition of miR-223 attenuates the NLRP3 inflammasome activation, fibrosis, and apoptosis in diabetic cardiomyopathy, *Life Sci.*, **256**, e117980, doi: 10.1016/j.lfs.2020.117980.
- Massagué, J. (1998) TGF-beta signal transduction, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 753-791, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.
- Saadat, S., Noureddini, M., Mahjoubin-Tehran, M., Nazemi, S., Shojaie, L., et al. (2021) Pivotal role of TGF- β /Smad signaling in cardiac fibrosis: non-coding

- RNAs as effectual players, *Front. Cardiovasc. Med.*, **7**, e588347, doi: 10.3389/fcvm.2020.588347.
28. Ono, K. (2017) *Translating MicroRNAs to the Clinic* (Laurence, J., ed.) Acad. Press, pp. 259-281.
 29. Chen, Z., Lu, S., Xu, M., Liu, P., Ren, R., et al. (2017) Role of miR-24, furin, and transforming growth factor- β 1 signal pathway in fibrosis after cardiac infarction, *Med. Sci. Monit.*, **23**, 65-70.
 30. Sun, Y., Wang, H., Li, Y., Liu, S., Chen, J., et al. (2018) miR-24 and miR-122 negatively regulate the transforming growth factor- β /Smad signaling pathway in skeletal muscle fibrosis, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **11**, 528-537, doi: 10.1016/j.omtn.2018.04.005.
 31. Roy, L., Bikorimana, E., Lapid, D., Choi, H., Nguyen, T., et al. (2015) MiR-24 is required for hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells, *PLoS Genet.*, **11**, e1004959, doi: 10.1371/journal.pgen.1004959.
 32. Pello, O. M., De Pizzol, M., Mirolo, M., Soucek, L., Zammataro, L., et al. (2012) Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology, *Blood*, **119**, 411-421, doi: 10.1182/blood-2011-02-339911.
 33. Wermuth, P. J., and Jimenez, S. A. (2015) The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases, *Clin. Transl. Med.*, **4**, e2, doi: 10.1186/s40169-015-0047-4.
 34. Zhang, S. M., Wei, C. Y., Wang, Q., Wang, L., Lu, L., et al. (2021) M2-polarized macrophages mediate wound healing by regulating connective tissue growth factor via AKT, ERK1/2, and STAT3 signaling pathways, *Mol. Biol. Rep.*, **48**, 6443-6456, doi: 10.1007/s11033-021-06646-w.
 35. Wynn, T. A., and Vannella, K. M. (2016) Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis, *Immunity*, **44**, 450-462, doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
 36. Nevzorova, Y. A., Hu, W., Cubero, F. J., Haas, U., Freimuth, J., et al. (2013) Overexpression of c-myc in hepatocytes promotes activation of hepatic stellate cells and facilitates the onset of liver fibrosis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**, 1765-1775, doi: 10.1016/j.bbadis.2013.06.001.
 37. Shen, Y., Miao, N., Wang, B., Xu, J., Gan, X., et al. (2017) c-Myc promotes renal fibrosis by inducing integrin α -mediated transforming growth factor- β signaling, *Kidney Int.*, **92**, 888-899, doi: 10.1016/j.kint.2017.03.006.
 38. Zhou, Z., Ni, J., Li, J., Huo, C., Miao, N., et al. (2020) RIG-I aggravates interstitial fibrosis via c-Myc-mediated fibroblast activation in UUO mice, *J. Mol. Med. (Berl.)*, **98**, 527-540, doi: 10.1007/s00109-020-01879-x.
 39. Wolfram, J. A., Lesnefsky, E. J., Hoit, B. D., Smith, M. A., and Lee, H. G. (2011) Therapeutic potential of c-Myc inhibition in the treatment of hypertrophic cardiomyopathy, *Ther. Adv. Chronic Dis.*, **2**, 133-144, doi: 10.1177/2040622310393059.
 40. Teare, D. (1958) Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults, *Heart*, **20**, 1-8, doi: 10.1136/hrt.20.1.1.
 41. Zhong, W., Mao, S., Tobis, S., Angelis, E., Jordan, M. C., et al. (2006) Hypertrophic growth in cardiac myocytes is mediated by Myc through a Cyclin D2-dependent pathway, *EMBO J.*, **25**, 3869-3879, doi: 10.1038/sj.emboj.7601252.

REGULATION OF SMAD SIGNALING PATHWAY BY miRNAs ASSOCIATED WITH MYOCARDIAL FIBROSIS: *In silico* ANALYSIS OF TARGET GENE NETWORKS

M. Pisklova^{1,2*}, G. Osmak^{1,2}, and O. Favorova^{1,2}

¹ E. I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology,
121552 Moscow, Russia; e-mail: pisklova_maria@mail.ru

² Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a hereditary heart disease caused by mutations in sarcomere genes, which is accompanied by myocardial fibrosis in combination with progressive heart failure and arrhythmias. Recent studies suggest that disturbances in the mechanisms of regulation of gene expression are also involved in the development of HCM. MiRNAs, short non-coding RNAs, belong to one of the types of such regulators. Usually, one miRNA regulates at the post-transcriptional level many target genes encoding various proteins, and therefore it is difficult to determine the role of particular miRNA in the disease pathogenesis. In this study, using the PubMed database, we selected 15 miRNAs whose expression is associated with myocardial fibrosis, one of the critical pathological processes in HCM. We then used an earlier developed algorithm to search *in silico* for the signaling pathways regulated by these miRNAs and found that 10 of them participate in the regulation of the TGF- β /SMAD signaling pathway. At the same time, among the genes of the SMAD signaling pathway, the target of most of the microRNAs under consideration is the *MYC* gene, which is involved in the development of fibrosis in some tissues. The conclusion about the regulation of the same TGF- β /SMAD signaling pathway by a set of other microRNAs associated with myocardial hypertrophy in HCM was made in our previous study. The coincidence of the results of two independent bioinformatic studies indicates that the SMAD signaling pathway is indeed a key object of the regulation of pathological processes in HCM. The results obtained make a substantial contribution to understanding the pathological processes underlying the development of HCM.

Keywords: fibrosis, miRNA, hypertrophic cardiomyopathy, HCM, *in silico* analysis, gene interaction network, TGF- β /SMAD signaling pathway