

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ микроРНК В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ВИРУСОМ ГРИППА И ОБРАБОТКЕ РНКазой



И.А. Байчурина, М.И. Маркелова, Р. Шах Махмуд

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

Резюме. Вирус гриппа способен вызывать острую респираторную инфекцию, которая ежегодно затрагивает от 5 до 20% человеческой популяции. Распространение эпидемии вируса гриппа происходит за короткое время из-за высокого уровня контагиозности. Помимо этого, ежегодная циркуляция вируса среди домашнего скота и водоплавающих птиц увеличивает риск зоонозной передачи новых штаммов в человеческую популяцию, у которой ранее не был сформирован иммунитет. Кроме того, в прошлом появилось несколько пандемических штаммов с высокой вирулентностью, и постоянно присутствует угроза возникновения нового пандемического штамма. Идентификация физиологических и молекулярных аспектов гриппа А может помочь в разработке терапевтических подходов для снижения побочных эффектов, связанных с заболеванием, вызванным этим вирусом. Профиль РНК в клетках человека изменяется после воздействия вируса гриппа. В настоящее время ученые все чаще уделяют внимание исследованию молекул микроРНК, которые способны регулировать экспрессию генов. Таким образом, микроРНК способны играть решающую роль в широком спектре биологических процессов, и ранее было показано, что они являются важными эффекторами в сложных сетях взаимодействия «хозяин–патоген». Изучение количественного и качественного состава микроРНК является важным инструментом для диагностики и лечения различных заболеваний на ранней стадии. Целью работы является анализ профиля микроРНК для изучения воздействия вируса гриппа А (H1N1) на эпителиальные клетки аденокарциномы легких человека. Фракция микроРНК была получена с помощью фенол-хлороформной экстракции и проанализирована с помощью высокопроизводительного секвенирования на платформе SOLiD 550xl wildfire и биоинформатических методов. В работе было исследовано 129 зрелых микроРНК из неинфицированных клеток, обработанных РНКазой *Bacillus pumilus* и клеток, инфицированных вирусом гриппа А (H1N1). Установлено, что в неинфицированных клетках, обработанных РНКазой, присутствует в 2 раза больше различных микроРНК, которые могут участвовать в подавлении канцерогенеза. Наибольшая экспрессия в клетках, инфицированных вирусом гриппа, наблюдается для miR-6884-5p. Для клеток,

Адрес для переписки:

Байчурина Ирина Алексеевна
420008, Россия, г. Казань, ул. Кремлевская, 18,
ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет.
Тел.: 8 950 327-70-39.
E-mail: letovaira1995@mail.ru

Contacts:

Irina A. Baichurina
420008, Russian Federation, Kazan, Kremlevskaya str., 18,
Kazan (Volga Region) Federal University.
Phone: +7 950 327-70-39.
E-mail: letovaira1995@mail.ru

Для цитирования:

Байчурина И.А., Маркелова М.И., Шах Махмуд Р. Сравнительный анализ экспрессии микроРНК в эпителиальных клетках легких человека при заражении вирусом гриппа и обработке РНКазой // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 2. С. 263–270. doi: 10.15789/2220-7619-ACA-1454

Citation:

Baichurina I.A., Markelova M.I., Shah Mahmud R. A comparative analysis of miRNA expression in human lung epithelial cells during infection with influenza virus and RNase treatment // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 2, pp. 263–270. doi: 10.15789/2220-7619-ACA-1454

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности 0671-2020-0058. Часть работы выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030). Исследование проводилось на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования ресурсов Казанского федерального университета.

This work was funded by the subsidy allocated to Kazan Federal University for the state assignment in the sphere of scientific activities 0671-2020-0058. This paper has been supported by the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030). The research was performed using the equipment of the Interdisciplinary Center for Shared Use of the Kazan Federal University.

обработанных РНКазой, наибольшая экспрессия наблюдается для miR-3923, практически в 400 раз больше, чем в клетках, зараженных вирусом гриппа. Мы предполагаем, что интактные вирусы или их внутриклеточные компоненты способны изменять клеточный метаболизм в сторону снижения устойчивости к процессам канцерогенеза.

Ключевые слова: микроРНК, клетки эукариот, вирус гриппа, рак, биомаркер, секвенирование.

A COMPARATIVE ANALYSIS OF miRNA EXPRESSION IN HUMAN LUNG EPITHELIAL CELLS DURING INFECTION WITH INFLUENZA VIRUS AND RNase TREATMENT

Baichurina I.A., Markelova M.I., Shah Mahmud R.

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation

Abstract. The influenza virus is capable of causing an acute respiratory infection that affects 5 to 20% of the human population annually. The spread of the influenza virus epidemic occurs within a short period of time due to its high contagiousness. In addition, the annual circulation of the virus among livestock and waterfowl increases for new strains a risk of zoonotic transmission to human populations with unestablished yet immunity. In addition, several high virulence pandemic strains have emerged in the past, and the threat of a new pandemic strain is constantly present. The identification of the physiological and molecular aspects related to influenza A can help developing therapeutic approaches to lower side effects associated with the disease caused by this virus. The RNA profile in human cells changes after exposure to influenza virus. Currently, scientists have been increasingly paying attention to study of microRNAs capable of regulating gene expression. Thus, microRNAs may play a critical role in a wide range of biological processes and have been previously shown to be important effectors in multilayered host-pathogen interplay. The study of the quantitative and qualitative miRNA composition is an important tool for diagnosing and treating various diseases at an early stage. The aim of this work is to analyze the microRNA profile for investigating an effect of influenza A (H1N1) virus on human lung epithelial adenocarcinoma cells. The microRNA fraction was isolated by using phenol-chloroform extraction and analyzed with high-throughput sequencing on the SOLiD 550xl wildfire platform using bioinformatic methods. The study examined 129 mature microRNAs from uninfected cells treated with *Bacillus pumilus* RNase as well as cells infected with the influenza A (H1N1) virus. It was found that uninfected cells treated with RNase contained 2-fold more different microRNAs that can participate in suppressing carcinogenesis. The peak expression in influenza virus-infected cells is observed for miR-6884-5p. For cells treated with RNase, the peak expression is observed for miR-3923 that was higher by 400-fold than in cells infected with the influenza virus. We hypothesize that intact viruses or their intracellular components are able to alter cellular metabolism by skewing it to decreased resistance to carcinogenesis processes.

Key words: microRNA, eukaryotic cells, influenza virus, cancer, biomarker, sequencing.

Введение

Последние 20 лет малые некодирующие РНК (нкРНК) находятся в центре внимания многих исследований. Некодирующие РНК относятся к транскриптам, которые не подвергаются дальнейшей трансляции. В настоящее время участие малых нкРНК в различных заболеваниях человека широко изучено [23]. Анализ малых нкРНК имеет большое значение, так как многие из них играют решающую роль в различных биологических процессах [6]. Одним из классов нкРНК является микроРНК — класс коротких консервативных 5'-фосфорилированных РНК, длина которых составляет 19–24 нуклеотида. Главной функцией микроРНК является посттранскрипционная регуляция экспрессии генов. Пострегуляция транскрипции мРНК играет важную роль для поддержания оптимального баланса белков в клетках, что необходимо для нормального функционирования организма [21].

Молекулы микроРНК рассматривают в качестве биомаркеров благодаря их стабильности и специфичности. Анализ микроРНК как биомаркера является неинвазивным, чувствительным и специфичным к заболеваниям, позволяет определить болезнь на ранних этапах, чувствителен к течению болезни и терапии [8].

На сегодняшний день нет полного понимания молекулярных механизмов, запускаемых с помощью микроРНК в клетках, которые инфицированы вирусом гриппа А. Ранее в исследованиях были получены противоречивые результаты: с одной стороны, внутриклеточные микроРНК могут ингибировать репликацию вирусов, а с другой, у некоторых вирусов, включая IAV, появились механизмы, которые позволяют избегать ингибирующего действия микроРНК хозяина [30]. Lin и соавт. изучили механизм микроРНК-индуцированной репрессии иммунного ответа, в реакции с белком вируса птичьего гриппа А (H9N2) [18]. МикроРНК miR-

674 и miR-155 влияют на активацию дендритных клеток иммунной системы в ответ на белок вируса А (H9N2). Авторами установлено, что ингибирование miR-674 или miR-155 значительно повышало репликацию вируса H9N2. Избыточная экспрессия miR-674 или miR-155 ингибировала репликацию вируса птичьего гриппа [18]. МикроРНК играют важную роль в регуляции клеточного цикла (miR-34c, miR-138, miR-139b), отвечают за индукцию врожденного иммунитета (let-4f, miR-146b, miR-192, miR-223, miR-451), участвуют в развитии В- и Т-лимфоцитов (miR-34c, miR-181a). Известно, что miR-323, miR-491, miR-654 и miR-let-7c могут подавлять экспрессию вирусных генов и ингибировать репликацию вируса H1N1 *in vitro* [22].

При раке часто нарушается экспрессия микроРНК. МикроРНК подразделяются на онкогенные (онкомикроРНК), способствующие развитию рака, и супрессорные, подавляющие онкологический процесс. Некоторые микроРНК могут играть двойную роль и оказывать онкогенный эффект при одном типе опухолей и супрессирующий — при другом типе рака [20]. Было установлено, что miR-3923 может негативно регулировать экспрессию протоонкогена KRAS и соответствующих белков. Ингибирование miR-3923 активирует онкогенный KRAS-путь. При раке поджелудочной железы наблюдается снижение miR-3923. Сверхэкспрессия miR-3923 ингибирует рост опухоли и метастазы в печени *in vivo*. Известно, что экспрессия miR-3923 значительно снижается в тканях рака поджелудочной железы и рака молочной железы [16, 29]. Сверхэкспрессия miR-3923 снижает инвазивную способность клеток рака [29]. Ранее было установлено, что РНКазы *B. pumilus* взаимодействует с эндогенным KRAS. После обработки РНКазой лейкозных клеток было отмечено увеличение экспрессии 62 генов, связанных с апоптозом. РНКазы *B. pumilus* ингибировала пролиферацию RAS трансформированных фибробластов. О.Н. Ильинская и соавт. предположили, что апоптоз в опухолевых клетках может происходить вследствие взаимодействия между биназой и KRAS [10]. Изучение функций микроРНК в регуляции иммунитета при раке играет важную роль для последующего выяснения механизмов, которые приведут к открытию новых методов лечения онкологических заболеваний [11].

Ранее была выдвинута гипотеза о том, что иммунитет и иммунная память против антигенов, ассоциированных с опухолью, не появляются *de novo* на опухолевых клетках или предраковых областях, а образуются в более раннем возрасте в ответ на вирусные и другие инфекции [9]. Несколько крупных эпидемиологических исследований показали, что у лиц с фебрильными детскими инфекциями в анамнезе снижался

риск различных видов рака в течение жизни. Механизмы, лежащие в основе этой защитной функции, неизвестны [9]. В работе И. Кузнецовой и соавт. [14] было показано, что мыши, которые перенесли инфекции, вызванные двумя разными вирусами гриппа, лучше контролируют рост перевиваемых опухолей легких.

Актуальным направлением в противораковой терапии является разработка онколитических вирусов. Онколитические вирусы избирательно размножаются в опухолевой ткани и уничтожают ее, не вызывая повреждения здоровых тканей [24]. В работе И. Кузнецовой и соавт. [14] был разработан онколитический вирус на основе аттенуированного вируса гриппа А (IAV). Авторы работы исследовали способность созданного онколитического вируса реплицироваться в опухолевых клетках и оказывать онколитический эффект *in vivo*. В результате внутриопухолевого применения сгенерированного вируса оказывало положительный терапевтический эффект [14]. Исследователи создают онколитические вирусы на основе аденовирусов [31]. Авторы ожидают, что синтезированный вирус, который получил название dl355, будет избирательно реплицироваться в раковых клетках. В исследовании был сделан вывод о том, что способность репликации в dl355 в раковых клетках заметно увеличена по сравнению с нормальными клетками [31].

Заболеемость и смертность у детей, получающих терапию от рака, могут быть обусловлены гриппом [12]. У детей с онкологическими заболеваниями, которые заболели гриппом, по сравнению со здоровыми людьми, наблюдалось увеличение длительности и тяжести заболевания [5]. Несмотря на то, что заболевание гриппом у детей с раком явление редкое, оно требует повышенного внимания [26]. Грипп у онкобольных детей может приводить к респираторным осложнениям в виде пневмоний и сепсису. При наличии инфекции вируса гриппа могут возникать противопоказания к использованию противораковой терапии [26].

Биназа — это бактериальная экзогенная рибонуклеаза из бактерии *Bacillus pumilus*. Ранее было показано, что биназа обладает противовирусной активностью и снижает титр вируса гриппа А (H1N1) pdm09 в клетках линии A549 при нетоксичных концентрациях [27]. Внеклеточные бактериальные рибонуклеазы, в том числе биназа, обладают противоопухолевой активностью при определенных концентрациях. Биназа обладает большим потенциалом в качестве и противоопухолевого, и противовирусного препарата [19].

Целью работы было изучение профиля микроРНК при воздействии вируса гриппа А (H1N1) или РНКазы на эпителиальные клетки легких человека с диагнозом аденокарцинома.

Материалы и методы

Подготовка клеточной культуры. В работе были использованы эпителиальные клетки легких человека с диагнозом аденокарцинома легких линии A549. Использовали клетки, которые заражали пандемическим вирусом гриппа A/Hamburg/04/09 (H1N1pdm) (Av), и неинфицированные клетки, обработанные противовирусным препаратом РНКазой (Ad). Заражение проводили после двукратного отмывания клеток фосфатным буфером (Sigma Aldrich, США) содержащим 1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 Ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина. Добавляли 0,5 мл суспензии с вирусом на клетки с последующим инкубированием в темноте при комнатной температуре. Через 1 ч суспензию с вирусом гриппа удаляли с добавлением свежей среды [25]. Обработанные РНКазой и зараженные вирусом гриппа клетки выращивали в 6-луночной планшете, содержащем среду Игла с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (РАА, Австрия), 100 Ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина (P/S) (Gibco, США). Клетки инкубировали в течение 12 ч при температуре 37°C, 5% CO₂ и 95% атмосферы.

Выделение тотальной РНК. Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью реагента TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США), клетки в количестве 10⁶ растворяли в 1 мл реагента. Затем выделяли тотальную РНК по методу Хомчинского [7] в соответствии с инструкцией производителя TRIzol Reagent. В пробирку, содержащую тотальную РНК клеток, добавляли по 50 мкл воды без РНКаз (Life Technologies, США) [1].

Выделение микроРНК из фракции тотальной РНК. Для выделения малых РНК из тотальной РНК клеток, использовали магнитные частицы

Agencourt AMPure XP Reagent beads (Beckman Coulter, США). В пробирку добавили образец тотальной РНК и инкубировали при 70°C в течение 2 мин. Затем добавили 0,5 объема магнитных частиц в горячий образец. Устанавливали пробирку в магнитный штатив, переносили прозрачный раствор в новую пробирку. Далее очищали с помощью 0,5 мл изопропанола, центрифугировали в течение 30 мин при 4°C, 20 000g. Аккуратно удаляли надосадочную жидкость, добавляли 1 мл свежеприготовленного 75% этанола и центрифугировали в течение 60 мин при 20 000g и 4°C. Удаляли супернатант и оставляли сушиться пробирки на столе с открытой крышкой в течение 15 мин, затем растворяли РНК в 50 мкл воды без РНКаз.

Подготовка библиотеки для секвенирования. Для приготовления библиотеки малых РНК с последующим секвенированием использовали SOLiD Total RNA-Seq Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Провели реакции гибридизации и лигирования адаптеров с выделенными матрицами микроРНК с помощью компонентов набора SOLiD Total RNA-Seq Kit. Осуществили реакцию обратной транскрипции со смесью после лигирования, используя компоненты набора для секвенирования. Выполнили реакцию амплификации, используя компоненты набора SOLiD Total RNA-Seq Kit, чтобы увеличить количество кДНК и ДНК необходимого размера. Провели очистку полученной ДНК от ПЦР-продуктов с помощью коммерческого набора PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, США), после чего — реакцию конверсии. Секвенирование выполняли на приборе SOLiD 5500xl wildfire next generation sequencer (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ количества и состава фракций РНК в образцах. Количественный анализ РНК, выделенной из эпителиальных клеток легких че-

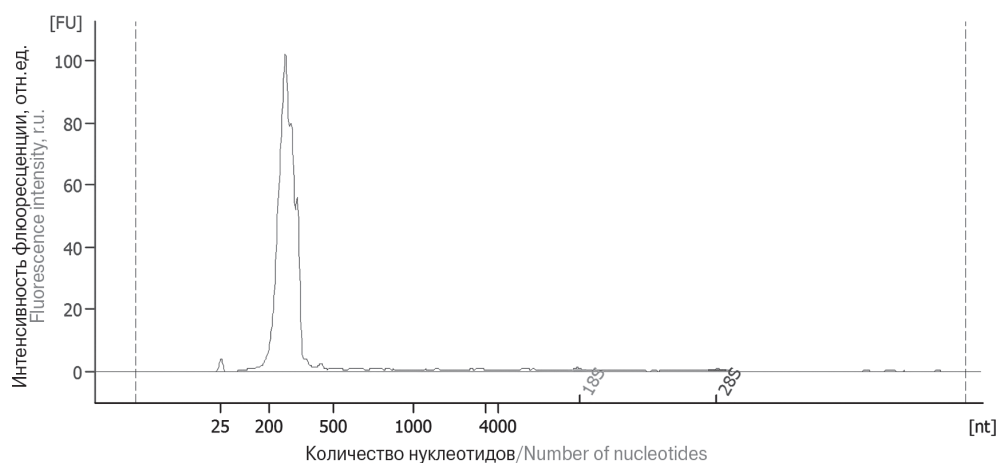


Рисунок 1. Анализ размера РНК эпителиальных клеток легких человека, полученных с использованием магнитных частиц и последующей термообработкой

Figure 1. RNA size analysis of human lung epithelial cells obtained by using magnetic particles and subsequent heat treatment

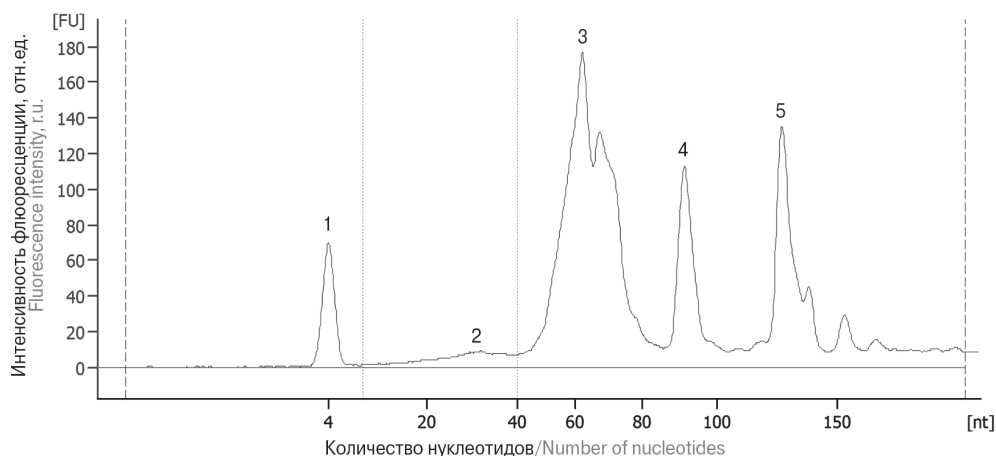


Рисунок 2. Анализ размера выделенных малых РНК с использованием магнитных частиц с последующей термообработкой

Figure 2. Size analysis of isolated small RNAs by using magnetic particles followed by heat treatment

Примечание. 1 — маркер, 2 — микроРНК, 3 — тРНК, 4 — 5S рРНК, 5 — 5.8S рРНК.

Note. 1 — (size) marker, 2 — microRNA, 3 — tRNA, 4 — 5S rRNA, 5 — 5.8S rRNA.

ловека, проводили с помощью флуориметрического метода на приборе Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Для анализа размера тотальной РНК использовали реагенты Agilent RNA 6000 Pico/Nano Kit (Agilent Technologies, США). Состав микроРНК изучали с применением набора реагентов Agilent Small RNA Kit (Agilent Technologies, США). Для анализа качества полученной библиотеки для секвенирования использовали Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США). Измерения проводили на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) по инструкции производителя.

Биоинформатический и статистический анализ. Полученные прочтения были картированы на референсную базу данных микроРНК miRBase v. 21 [13] с помощью программы Bowtie [15]. Подсчет количества картированных ридов на каждую микроРНК был произведен с помощью featureCounts [17], дифференциальная экспрессия считалась в среде R с помощью пакета DESeq [3].

Результаты

В работе была получена фракция микроРНК с помощью отбора по размерам с использованием магнитных частиц. Этот метод является эффективным для получения малых РНК (до 400 нуклеотидов) из внутриклеточной тотальной РНК (рис. 1).

На рис. 2 показана фракция малых некодирующих РНК размером до 150 нуклеотидов. В этот диапазон размеров входят различные классы малых РНК, в том числе и микроРНК.

В работе установлено, что в клетках, зараженных вирусом гриппа А (H1N1), наибольшую экспрессию имеет miR-6884-5p (рис. 3). На се-

годняшний день для miR-6884-5p мишени еще не обнаружены, поэтому функции данной микроРНК остаются неизвестными.

Обсуждение

Известно, что в клетках до 30% генов регулируются с помощью микроРНК [2]. Можно выстроить цепь воздействия микроРНК на организм человека: организм реагирует на внешние изменения регуляцией экспрессии микроРНК, затем микроРНК воздействует на мРНК-мишень, которая участвует в трансляции белков, которые в свою очередь оказывают влияние на адаптацию организма к меняющимся условиям. В работе было обнаружено 62 и 67 зрелых микроРНК клеток после обработки препаратом и в клетках после заражения вирусом гриппа

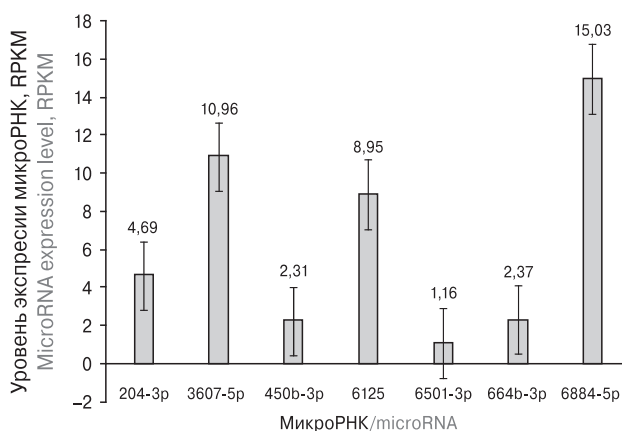


Рисунок 3. Экспрессия различных микроРНК в клетках, зараженных вирусом гриппа

Figure 3. Expression of various miRNAs in cells infected with influenza virus

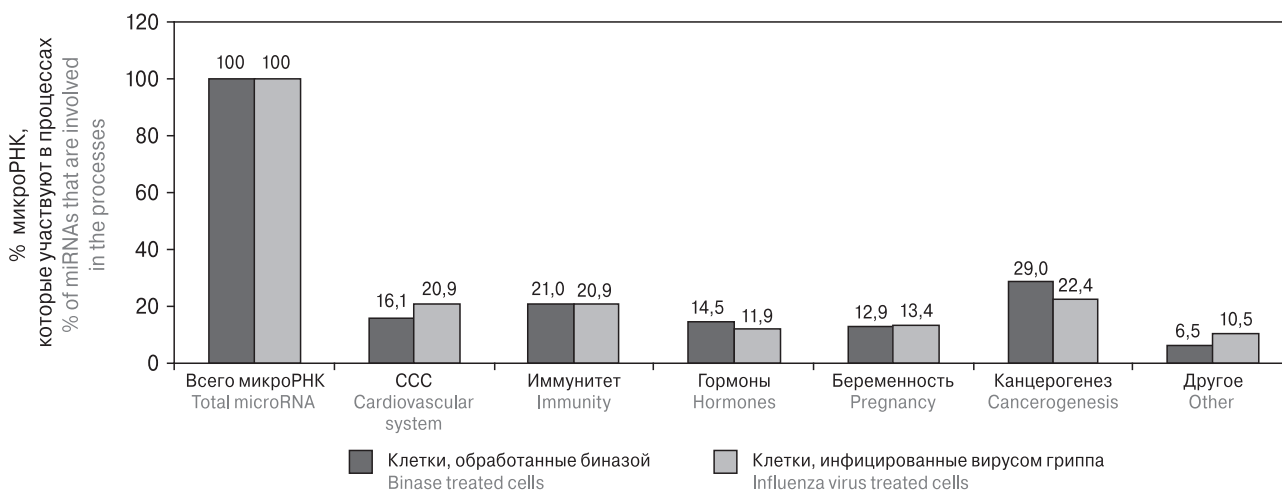


Рисунок 4. Количественное распределение различных видов микроРНК в организме человека
 Figure 4. The quantitative distribution of various types of miRNAs in the human body

соответственно. На рис. 4 показано количественное распределение зрелых микроРНК, которые принимают участие в различных процессах в организме человека, данные получены с помощью баз данных mirBase, mirDB и NCBI. Наибольшую долю всех обнаруженных микроРНК занимают микроРНК, которые участвуют в канцерогенезе. На их долю приходится 29 и 22,4% в клетках, обработанных биназой, и в клетках, инфицированных вирусом гриппа, соответственно (рис. 4).

Известно, что нарушения экспрессии микроРНК могут приводить к развитию онкологических заболеваний [21]. Было установлено, что количество разных зрелых микроРНК, которые функционируют как репрессоры канцерогене-

за, в 2 раза увеличивается в неинфицированных клетках, обработанных препаратом, по сравнению с вирус-зараженными клетками (рис. 5). В клетках, зараженных вирусом гриппа, увеличивается количество онкогенных микроРНК. Установлено, что эти микроРНК участвуют в развитии рака молочной железы и рака легких. Ранее было установлено [4, 28], что в поджелудочной железе количество онкомаркеров снижается в связи с тем, что в поджелудочной железе присутствует панкреатическая рибонуклеаза, которая подавляет канцерогенез. В нашей работе рибонуклеаза бактериального происхождения, подавляя определенные микроРНК, репрессирует образование рака, однако механизм ее действия еще предстоит изучить.

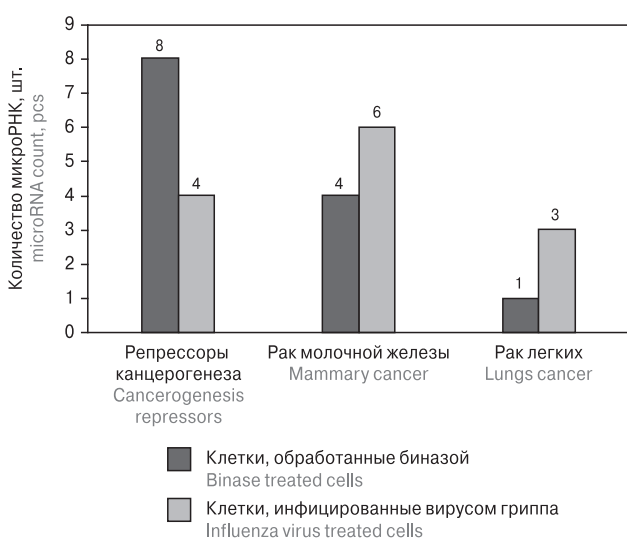


Рисунок 5. Количественный анализ микроРНК, участвующих в канцерогенезе
 Figure 5. Quantitative analysis of microRNAs involved in carcinogenesis

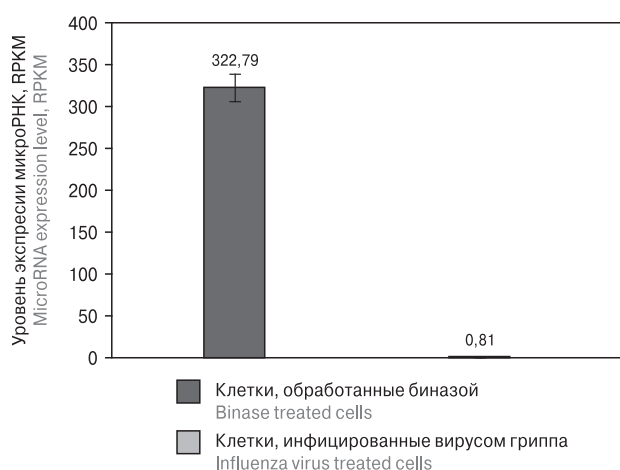


Рисунок 6. Экспрессия miR-3923 в клетках, обработанных биназой, и в клетках, зараженных вирусом
 Figure 6. The expression of miR-3923 in cells binase-treated and virus-infected cells bolites influence on dermal human fibroblasts viability

Наибольшая экспрессия в клетках, обработанных препаратом биназы, обнаружена для miR-3923 (рис. 6). У данной микроРНК (miR-3923) 215 мишеней, в том числе гены, которые отвечают за развитие аденокарциномы легкого, острого миелоидного лейкоза и колоректальной карциномы, также miR-3923 экспрессируется в инфицированных вирусом клетках. Количество miR-3923 в клетках, зараженных вирусом гриппа, практически в 400 раз меньше, чем в неинфицированных клетках, обработанных РНКазой. Из литературных данных [16, 29] известно, что сверхэкспрессия miR-3923 ингибирует рост опухоли и метастазирование различных типов рака. Так как наблюдалось снижение экспрессии микроРНК miR-3923, мы выдвигаем предположение, что клетки, зараженные вирусом гриппа, обладают меньшей устойчивостью к канцерогенезу.

Заключение

1. Установлено, что в клетках линии A549, зараженных вирусом гриппа, увеличивается количество микроРНК, мишенями которых могут выступать онкогенные белки. При обработке клеток аденокарциномы легких человека РНКазой количество микроРНК, мишенями которых являются мРНК с функцией подавления канцерогенеза, увеличивается.

2. В клетках, инфицированных вирусом гриппа А (H1N1), наибольшая экспрессия наблюдается для miR-6884-5p. В клетках, обработанных РНКазой, экспрессия микроРНК miR-3923 почти в 400 раз выше, чем в клетках, инфицированных вирусом гриппа, одной из мишеней данной микроРНК является белок, который участвует в сдерживании процессов канцерогенеза.

Список литературы/References

- Летова И.А., Мадумаров С.А., Сыроева М.А., Шах Махмуд Р.З. Ускоренный и эффективный метод выделения микроРНК из плазмы крови человека // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2019. Т. 9, № 1. С. 53–59. [Letova I.A., Madumarov S.A., Sysoyeva M.A., Shah Mahmud R.Z. Accelerated and efficient method for isolating microRNA from human blood plasma. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 53–59. (In Russ.)] doi: 10.21285/2227-2925-2019-9-1-53-59
- Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. Некодирующие РНК // Биохимия. 2007. Т. 72, № 11. С. 1427–1448. [Makarova Yu.A., Kramerov D.A. Non-coding RNA. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2007, vol. 72, no. 11, pp. 1427–1448. (In Russ.)]
- Anders S., Huber W. Differential expression of RNA-Seq data at the gene level — the DESeq package. *Heidelberg: European Molecular Biology Laboratory (EMBL)*, 2012, p. 24.
- Boudouresque F., Siret C., Dobric A., Silvy F., Soubeyran P., Iovanna J., Lombardo D., Berthois Y. Ribonuclease MCPiPI contributes to the loss of micro-RNA-200 family members in pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, 2018, vol. 9, no. 89, pp. 35941–35961. doi: 10.18632/oncotarget.26310
- Carr S.B., Adderson E.E., Hakim H., Xiong X.P., Yan X.W., Caniza M. Clinical and demographic characteristics of seasonal influenza in pediatric patients with cancer. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2012, vol. 31, no. 11, pp. 202–207. doi: 10.1097/INF.0b013e318267f7d9
- Chen C.J., Heard E. Small RNAs derived from structural non-coding RNAs. *Methods*, 2013, vol. 63, no. 1, pp. 76–84. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.05.001
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 162, no. 1, pp. 156–159. doi: 10.1016/0003-2697(87)90021-2
- Correia C.N., Nalpas N.C., McLoughlin K.E., Browne J.A., Gordon S.V., MacHugh D.E., Shaughnessy R.G. Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8: 118. doi: 10.3389/fimmu.2017.00118
- Iheagwara U.K., Beatty P.L., Van P.T., Ross T.M., Minden J.S., Finn O.J. Influenza virus infection elicits protective antibodies and T cells specific for host cell antigens also expressed as tumor associated antigens: a new view of cancer immunosurveillance. *Cancer Immunol. Res.*, 2014, vol. 2, no. 3, pp. 263–273. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0125
- Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, vol. 1863, pp. 1559–1567. doi: 10.1016/j.bbamer.2016.04.005
- Jadideslam G., Ansarin K., Sakhinia E., Babaloo Z., Abhari A., Ghahremanzadeh K., Khalili M., Radmehr R., Kabbazi A. Diagnostic biomarker and therapeutic target applications of miR-326 in cancers: a systematic review. *J. Cell. Physiol.*, 2019, vol. 234, no. 12, pp. 21560–21574. doi: 10.1002/jcp.28782
- Kotecha R.S., Wadia U.D., Jacoby P., Ryan A.L., Blyth C.C., Keil A.D., Gottardo N.G., Cole C.H., Barr I.G., Richmond P.C. Immunogenicity and clinical effectiveness of the trivalent inactivated influenza vaccine in immunocompromised children undergoing treatment for cancer. *Cancer Med.*, 2016, vol. 5, no. 2, pp. 285–293. doi: 10.1002/cam4.596
- Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 2014, vol. 42, no. D1, pp. 68–73. doi: 10.1093/nar/gkt1181
- Kuznetsova I., Arnold T., Aschacher T., Schwager C., Hegedus B., Garay T., Stukova M., Pisareva M., Pleschka S., Bergmann M., Egorov A. Targeting an oncolytic influenza A virus to tumor tissue by elastase. *Mol. Ther. Oncolytics*, 2017, vol. 7, pp. 37–44. doi: 10.1016/j.omto.2017.09.002
- Langmead B. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr. Protoc. Bioinform.*, 2010, vol. 11: 11.7. doi: 10.1002/0471250953.bi1107s32
- Li X., Deng S.J., Zhu S., Jin Y., Cui S.P., Chen J.Y., Xiang C., Li Q.Y., He C., Zhao S.F., Chen H.Y., Niu Y., Liu Y., Deng S.C., Wang C.Y., Zhao G. Hypoxia-induced lncRNA-NUTF2P3-001 contributes to tumorigenesis of pancreatic cancer by derepressing the miR-3923/KRAS pathway. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, pp. 6000–6014. doi: 10.18632/oncotarget.6830

17. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. Feature counts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 7, pp. 923–930. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656
18. Lin J., Chen Y. T., Xia J., Yang Q. MiR674 inhibits the neuraminidase-stimulated immune response on dendritic cells via down-regulated Mbnl3. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, no. 31, pp. 48978–48994. doi: 10.18632/oncotarget.9832
19. Makeeva A., Rodriguez-Montesinos J., Zelenikhin P., Nesmelov A., Preissner K.T., Cabrera-Fuentes H.A., Ilinskaya O.N. Antitumor macrophage response to *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Mediators Inflamm.*, 2017, vol. 2017: 4029641. doi: 10.1155/2017/4029641
20. Monteleone N.J., Lutz C.S. miR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 41, pp. 71292–71316. doi: 10.18632/oncotarget.19772
21. Ortiz-Quintero B. Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Proliferation*, 2016, vol. 49, no. 3, pp. 281–303. doi: 10.1111/cpr.12262
22. Rivera A., Barr T., Rais M., Engelmann F., Messaoudi I. MicroRNAs regulate host immune response and pathogenesis during influenza infection in rhesus macaques. *Viral Immunol.*, 2016, vol. 29, no. 4, pp. 212–217. doi: 10.1089/vim.2015.0074
23. Romano G., Veneziano D., Acunzo M., Croce C.M. Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*, 2017, vol. 38, no. 5, pp. 485–491. doi: 10.1093/carcin/bgx026
24. Russell S.J., Peng K.W. Viruses as anticancer drugs. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2007, vol. 28, no. 7, pp. 326–333. doi: 10.1016/j.tips.2007.05.005
25. Shah Mahmud R., Mostafa A., Müller C., Kanrai P., Ulyanova V., Sokurenko Y., Dzieciolowski J., Kuznetsova I., Ilinskaya O., Pleschka S. Bacterial ribonuclease binase exerts an intra-cellular anti-viral mode of action targeting viral RNAs in influenza a virus infected MDCK-II cells. *Virology*, 2018, vol. 15, no. 1: 5. doi: 10.1186/s12985-017-0915-1
26. Tasian S.K., Park J.R., Martin E.T., Englund J.A. Influenza-associated morbidity in children with cancer. *Pediatr. Blood Cancer*, 2008, vol. 50, no. 5, pp. 983–987. doi: 10.1002/pbc.21472
27. Ulyanova V., Shah Mahmud R., Dudkina E., Vershinina V., Domann E., Ilinskaya O. Phylogenetic distribution of extracellular guanyl-preferring ribonucleases renews taxonomic status of two *Bacillus* strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2016, vol. 62, no. 4, pp. 181–188. doi: 10.2323/jgam.2016.02.005
28. Vert A., Castro J., Ribó M., Benito A., Vilanova M. A nuclear-directed human pancreatic ribonuclease (PE5) targets the metabolic phenotype of cancer cells. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, no. 14, pp. 18309–18324. doi: 10.18632/oncotarget.7579
29. Wang B., Li J.D., Sun M., Sun L.H., Zhang X.Y. MiRNA Expression in breast cancer varies with lymph node metastasis and other clinicopathologic features. *IUBMB life*, 2014, vol. 66, no. 5, pp. 371–377. doi: 10.1002/iub.1273
30. Wang R., Zhang Y.-Y., Lu J.-S., Xia B.-H., Yang Z.-X., Zh X.-D., Zhou X.-W., Huang P.-T. The highly pathogenic H5N1 influenza A virus down-regulated several cellular MicroRNAs which target viral genome. *J. Cell Mol. Medicine*, 2017, vol. 21, no. 11, pp. 3076–3086. doi: 10.1111/jcmm.13219
31. Yanagawa-Matsuda A., Mikawa Y., Habiba U., Kitamura T., Yasuda M., Towfik-Alam M., Kitagawa Y., Minowa K., Shindoh M., Higashino F. Oncolytic potential of an E4-deficient adenovirus that can recognize the stabilization of AU-rich element containing mRNA in cancer cells. *Oncol. Rep.*, 2019, vol. 41, no. 2, pp. 954–960. doi: 10.3892/or.2018.6865

Авторы:

Байчурина И.А., младший научный сотрудник института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;
Маркелова М.И., аспирант, научный сотрудник института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;
Шах Махмуд Р., к.б.н., доцент, старший научный сотрудник института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

Authors:

Baichurina I.A., Junior Researcher, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation;
Markelova M.I., PhD Student, Researcher, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation;
Shah Mahmud R., PhD (Biology), Associate Professor, Senior Researcher, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Kazan, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.04.2020
 Отправлена на доработку 05.11.2021
 Принята к печати 25.12.2021

Received 10.04.2020
 Revision received 05.11.2021
 Accepted 25.12.2021