

Perspectives of microRNA as potential biomarkers in the diagnostic puzzle of pulmonary arterial hypertension

Perspektívy microRNA ako potenciálnych biomarkerov v diagnostickej skladačke pľúcnej artériovej hypertenzie

Vysočanský S¹, Klimas J², Luknár M¹, Gonçalvesová E¹

¹Kardiologická klinika LF UK a NÚSCH, a. s., Bratislava, Slovenská republika

Vysocansky S, Klimas J, Luknar M, Goncalvesova E. **Perspectives of microRNA as potential biomarkers in the diagnostic puzzle of pulmonary arterial hypertension.** Cardiology Lett. 2021;30(5–6):267–276

Abstract. Pulmonary arterial hypertension is a rare disease with complex and still not completely understood etiopathogenesis which affects pulmonary circulation. Proliferative vasculopathy results in the increase of the right ventricular afterload during the course of the disease and finally to its failure. Diagnostic process is extremely comprehensive, based on the evaluation of clinical symptoms, echocardiographic findings and central hemodynamic parameters obtained by right heart catheterization. Natriuretic peptides are still the best diagnostic tool, also useful in the monitoring of the disease progression. New pathophysiologic mechanisms have been discovered in recent years. Among them, epigenetics is at the centre of interest, particularly a large group of small, non – coding RNA transcripts – microRNAs (miRNAs). These molecules are able to post-transcriptionally regulate gene expression and they are responsible for affecting several mechanisms in the PAH. The potential of miRNAs seems to be much broader than just to serve as biomarkers in the diagnostic process. Because of their regulatory function, targeted changes in different pathways may become a new therapeutic approach focused, not just on affecting their consequences, but mainly on the causes. Despite the new perspectives mentioned above, there are still many questions which need to be answered prior to getting miRNAs from bench to bedside. In this review we discuss the current knowledge about miRNA in the context of PAH, including an overview of the most frequently investigated molecules associated with these diseases. Fig. 3, Ref. 64, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Key words: pulmonary arterial hypertension – microRNA – biomarker – epigenetics

Vysočanský S, Klimas J, Luknár M, Gonçalvesová E. **Perspektívy microRNA ako potenciálnych biomarkerov v diagnostickej skladačke pľúcnej artériovej hypertenzie.** Cardiology Lett. 2021;30(5–6):267–276

Abstrakt. Pľúcna artériová hypertenzia (PAH) je vzácné ochorenie s komplexnou a nie úplne pochopenou etiopatogenezou, ktoré postihuje pľúcne cievne riečisko. V dôsledku proliferatívnej vaskulopatie dochádza v priebehu ochorenia k zvyšovaniu afterloadu pravej komory, čo v konečnom dôsledku vedie k jej zlyhaniu. Diagnostický proces je mimoriadne komplexný, pozostáva zo zhodnotenia klinických prejavov, echokardiografického nálezu, parametrov centrálnej hemodynamiky získaných pri pravostrannej srdcovej katetrizácii. Nezastupiteľnú úlohu zohrávajú nátriuretické peptidy, ktoré predstavujú „stálicu“ v diagnostike a monitorovaní priebehu ochorenia. V ostatných rokoch dochádza k postupnému odkryvaniu zložitých patofyziologických mechanizmov, do popredia sa dostáva epigenetika, predovšetkým rozsiahla skupina malých, nekódujúcich transkriptov RNA – microRNA (miRNA). Tie dokážu posttranskripčne regulovať génovú expresiu a v patogenéze PAH ovplyvňujú niekoľko procesov. Potenciál miRNA sa zdá byť obrovský, nielen na poli diagnostiky, kde

Z ¹Kardiologickej kliniky LF UK a NÚSCH, a. s., Bratislava a ²Farmaceutickej fakulty UK, Bratislava, Slovenská republika
Do redakcie došlo dňa 21. novembra 2021; prijaté dňa 30. novembra 2021

Adresa pre korešpondenciu: MUDr. Samuel Vysočanský, Oddelenie zlyhávania a transplantácie srdca NÚSCH, a. s. a Kardiologická klinika LF UK a NÚSCH, a. s., Bratislava, Pod Krásnou hôrkou 1, 833 48 Bratislava 37, Slovenská republika, e-mail: samuel.vysocansky@gmail.com

môžu poslužiť ako biomarkery. Vzhľadom na ich regulačnú funkciu, môže prípadné terapeutické ovplyvnenie jednotlivých dráh predstavovať nový liečebný prístup, ktorý sa bude namiesto ovplyvňovania dôsledkov jednotlivých patomechanizmov zameriavať na ich príčinu. Napriek perspektívnym vyhladkam existuje stále množstvo otázok, ktoré bránia tomu, aby sa miRNA presunuli z výskumných laboratórií k lôžkam pacientov. V článku podávame prehľad o súčasných poznatkoch týkajúcich sa miRNA v kontexte PAH a o najčastejšie skúmaných molekulách asociovaných s týmto ochorením. Obr. 3, Lit. 64, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

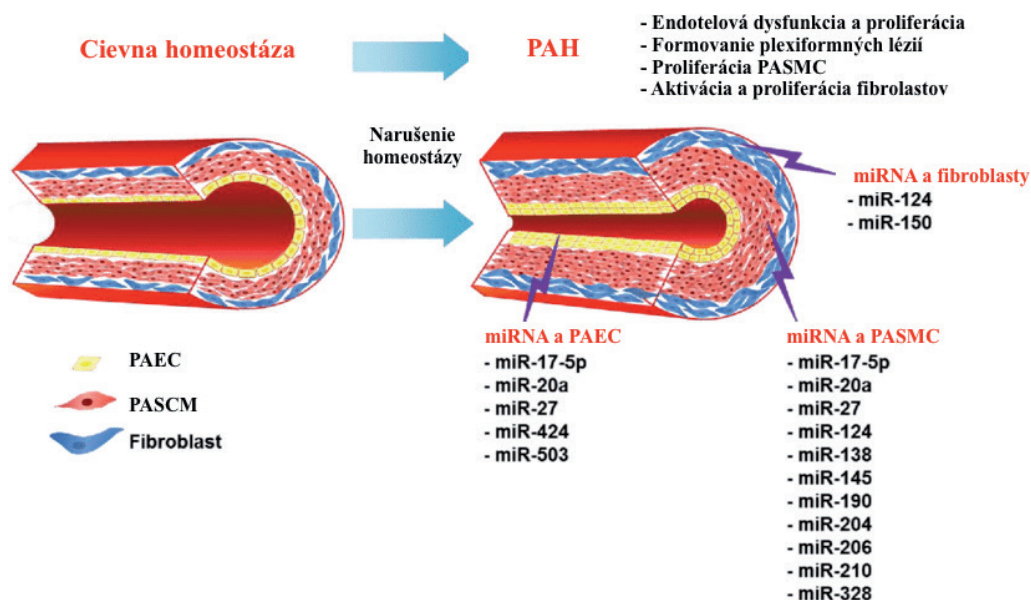
Kľúčové slová: pľúcna artériová hypertenzia – microRNA – biomarker – epigenetika

Pľúcna artériová hypertenzia – kľúčové patomechanizmy

Etiopatogenéza PAH je multifaktorálna a nedostatočne objasnená. Navyše PAH nie je jednotná nozologická entita. Jestvuje viacero podskupín PAH s unikátnymi etiologickými faktormi (1). Všetky z nich však spájajú spoločné patologické prejavy. Primárne postihnutým orgánom sú pľúca, konkrétne artérie a arterioly, pričom zmeny vykazujú všetky vrstvy cievnej steny (**obrázok 1**). Dochádza k proliferácii PAEC (“pulmonary artery endothelial cells”), hypertrofii *tunica media* na podklade bujnenia PASMC (“pulmonary artery smooth muscle cells”), aktivácia a migrácia fibroblastov vedie k hrubnutiu a fibrotizácii *tunica adventitia*. Na všetky tieto procesy nadväzuje aktivácia zápalových buniek, predovšetkým makrofágov. Aktiváciou uvedených činiteľov dochádza k nadprodukcii extracelulárnej matrix a narušeniu krehkej rovnováhy medzi metaloproteinázami, ktoré ju degradujú a ich inhibítormi (2). Histopatologické zmeny v mnohom pripomínajú zmeny patognomické

pre vaskulopatiu štepu po transplantácii srdca (3). Dochádza k postupnému poklesu poddajnosti ciev. Výsledkom vyššie uvedených štrukturálnych zmien pľúcnej vaskulatury je zvýšenie pľúcnej vaskulárnej rezistencie s dopadom nielen na funkciu pravej komory, ale aj na systémovú cirkuláciu.

Okrem cievnej remodelácie zohráva úlohu aj nepomer vazokonstrikčných a vazodilatačných endogénnych substancií, v neprospech vazodilatátorov. Existujú štyri preskúmané molekulové dráhy, na princípe ovplyvnenia ktorých stojí súčasná špecifická farmakoterapia PAH – cyklický guanozín monofosfát (cGMP) asociovaný s oxidom dusnatým, endotelínová dráha, cyklický adenosín monofosfat asociovaný s prostacyklínmi a v menšej miere aj vápnikové kanály typu L (4). Spoločným menovateľom jednotlivých tried PAH terapie je ovplyvnenie nadmernej vazokonstrikcie, ktorá však predstavuje dominantný patomechanizmus len u približne 10 % pacientov (5). Žiadne zo 14 liečiv doteraz aplikovaných na liečbu PAH však nie je schopné navodiť reverznú remodeláciu obliterovaných a nepoddajných ciev a ovplyvniť



Obrázok 1 Asociácia jednotlivých miRNA s cievnu remodeláciou

PAH – pľúcna artériová hypertenzia, PAEC – pulmonary artery endothelial cells, PASMC – pulmonary artery smooth muscle cells, miR – microRNA

primárne spúšťače patologickej kaskády – genetické a epigenetické faktory vedúce k zmenám na úrovni buniek.

Na základe familiárneho výskytu PAH v niektorých prípadoch bola už v minulosti vyslovená hypotéza o genetickom komponente ochorenia. Kľúčovú úlohu z tohto pohľadu predstavuje v roku 2000 popísaný BMPR2 (“*bone morphogenic receptor protein 2*”), člen rodiny TGF- β (“*transforming growth factor β* ”), ktorého mutácia bola preukázaná vo viac ako 75 % prípadov hereditárnej PAH a viac ako 25 % prípadov idiopatickej PAH (6). Koncentrácie BMPR2 proteínu sú redukované o 75 % v pľúcnom tkanive a endotelových bunkách pacientov s PAH (7). Nato, aby sa ochorenie fenotypovo prejavilo, je však zrejme potrebná súhra ďalších genetických a environmentálnych faktorov.

Narušenie signálnych dráh asociovaných s proteínom BMPR2 má za následok akcelerovanú proliferáciu, zápalovú reaktivitu endotelu a iniciuje dysfunkciu na úrovni mitochondrií. Tá sa zakladá na presmerovaní metabolizmu od oxidácie glukózy k excesívnej aeróbnej glykolýze, mechanizme, ktorým Warburg opísal fungovanie rakovinových buniek. V zdravých bunkách je pyruvát vyprodukovaný v procese glykolýzy transportovaný do mitochondrií a následne je dehydrogenázou (PDH) konvertovaný na acetyl-CoA, ktorý vstupuje do Krebsovho cyklu. Pri PAH sa v endoteli pľúcnych arteriol zistila zvýšená expresia PDH-kinázy, ktorá fosforyluje a inhibuje PDH, čím sa do popredia dostáva energeticky nevýhodná cesta získavania ATP – glykolýza. S týmto javom úzko súvisí priekopnícky pokus o terapeutické ovplyvnenie metabolických dejov precipitujúcich na rozvoji PAH, ktorý sa zakladal na podávaní inhibítora PDH-kinázy – dichlóracetátu, konkomitantne so špecifickou liečbou PAH. V zvieracom modeli indukovanej PAH (laboratórne navodená nadmerná expresia sérotonínového transportéra u myši) u responderov došlo k poklesu mPAP a PVR (8). Priaznivá odpoveď na liečbu bola podmienená genetickou variabilitou proteínov SIRT3 (“*sirtuin 3*”) a UCP2 (“*mitochondrial uncoupling protein 2*”). Warburgov efekt bol opísaný pri PASMC. Neskôr sa zistilo, že podobné metabolické črty vykazujú aj PAEC a fibroblasty v *tunica adventitia*. Aktuálne bol tento fenotyp identifikovaný aj v kardiomyocytoch vykazujúcich redukovanú kontraktilitu, izolovaných z pravej komory pacientov s PAH, či zvieracích modelov PAH.

Warburgova teória metabolických zmien nádorových buniek, aplikovateľná na bunky podieľajúce sa na rozvoji PAH, nie je jediným spoločným menovateľom tohto ochorenia a procesmi karcinogenézy. Oba typy buniek spája ich schopnosť odolávať apoptóze. Pôsobením iníciačných vplyvov, akými sú zápal, hypoxia, “*shear stress*” a mnoho ďalších, dochádza k zániku buniek endotelu. Následne prebieha tzv. hyperproliferatívny proces, ktorého výsledkom sú klonny buniek nevstupujúce do prirodzeného procesu apoptózy (9). Postulát z roku 2008, prirovnávajúci závažnú PAH k onkologickým ochoreniam, sa zdá byť čoraz aktuálnejší, hoci existujú isté

diskrepancie (PAH nie je ochorenie schopné metastázovať, bunky vykultivované z pľúc pacientov s PAH nevykazujú schopnosť nekontrolovateľného rastu). Takýto uhol pohľadu na patomechanizmy podieľajúce sa na rozvoji PAH prináša množstvo terapeutických perspektív. Experimentálne podávanie nízkych dávok takrolimu u prísne selektovaných pacientov v terminálnej fáze ochorenia viedlo k zlepšeniu funkcie pravej komory a zníženiu hospitalizácií pre kardiálnu dekompenzáciu (10). V súvislosti s užívaním ďalšieho lieku známeho z onkológie – rituximabu, prebieha multicentrická, dvojito zaslepená štúdia u pacientov s PAH asociovanou so systémovou sklerodermiou (11).

Ako už bolo spomenuté, genetika zohráva významnú úlohu v patogenéze PAH. Úzko sú s ňou späté epigenetické procesy, ktoré sú definované ako procesy ovplyvňujúce expresiu génov bez toho, aby došlo k zmenám v sekvenciách genomikkej DNA. Jedným z nich je hypermetylácia DNA potlačujúca gén kódujúci superoxid dismutázu 2 – mitochondriálny enzým, ktorý metaboličuje superoxid na hydroxid vodíka. Ten spôsobuje aktiváciu faktora HIF-1 α (“*hypoxia induced factor 1 α* ”) zodpovedného za aktiváciu Warburgovho efektu, proliferáciu PASMC a zmeny na úrovni iónových kanálov vedúce k vazokonstrikcii (12). Detailným skúmaním tkaniva pľúc a pravej komory tak u zvieracích modelov, ako aj na vzorkách pacientov s idiopatickou PAH boli zistené zvýšené hladiny histónových deacetyláz (13). Ich zvýšená akumulácia v jadrách buniek vedie k downregulácii génov zodpovedných za udržanie integrity a homeostázy pľúcnej vaskulatúry – skupina konexínov, KLF2 (“*Kruppel – like factor 2*”) (14). Špeciálna pozornosť bude v nasledujúcej časti venovaná ďalším epigenetickým činiteľom – microRNA.

MicroRNA a PAH

Väčšina nášho genómu nie je priamo zapojená do syntézy proteínov, zúčastňuje sa jej nepriamo, produkciou nekódujúcich RNA s regulačnou funkciou. Takýmito molekulami sú microRNA (miRNA) – malé transkripty RNA, pozostávajúce z približne 22 nukleotidov, ktoré ovplyvňujú činnosť takmer 50 % *messengerových* RNA (mRNA). Jedna molekula miRNA dokáže regulovať niekoľko stoviek mRNA (tzv. divergencia) a na druhej strane, jedna mRNA môže byť ovplyvňovaná veľkým množstvom miRNA. Zároveň môžu rôzne miRNA ovplyvniť proteosyntézu v akomkoľvek jej stupni (tzv. konvergencia) (15). Týmto spôsobom sa nepriamo podieľajú na bunkovom raste, proliferácii a diferenciácii buniek.

Biogenéza miRNA môže prebiehať dvoma spôsobmi – kanonicky a nekanonicky. Kanonický spôsob je dominantný, transkripciou génov kódujúcich miRNA vznikajú primárne miRNA za účasti polymerázy II, ktoré sa v jadre buniek štiepia na prekursorové miRNA pomocou komplexu pozostávajúceho z RNAázy III Drosha a jej kofaktora DGCR8

(“*DiGeorge Syndrome critical region*”). Prekurzorové miRNA sa transportujú do cytoplazmy, kde do celého procesu zasahuje RNAáza II – Dicer (16). Výsledkom je dvojzávitnicové vlákno miRNA, ktoré sa skladá z rýchlo degradovaného komplementárneho vlákna a zrelého vlákna. Zrelé vlákno miRNA a jemu prislúchajúce proteíny AGO (“*argonaut*”) tvoria RISC (“*RNA induced silencing complex*”). RISC po zhode s komplementárnou mRNA spôsobuje downreguláciu proteínu kódovaného príslušnou mRNA, najčastejšie na princípe degradácie samotnej mRNA (17).

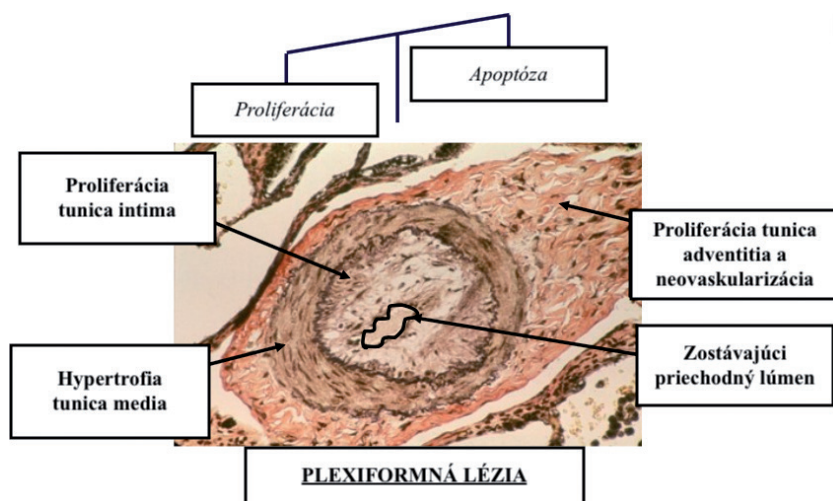
Po syntéze sa miRNA vyplavujú do cirkulácie, pravdepodobne aktívnym procesom, nadviazané na rôzne druhy endogénnych nosičov. Princípom tohto transportného systému je ich ochrana pred degradáciou (18). Táto vlastnosť podmieňuje ich stabilitu a schopnosť odolávať extrémnym zmenám vonkajšieho prostredia, akými sú významné výkyvy pH, vysoké teploty, opakované cykly zmrazovania, dlhodobé skladovanie *in vitro* (19). Zároveň ich odlišuje od exogénnych miRNA, ktoré nie sú schopné odolat pôsobeniu ribonukleáz v krvnom riečisku.

miRNA pomaly nachádzajú uplatnenie vo viacerých medicínskych odvetviach. Výnimku nepredstavuje ani kardiológia, kde sa ich význam študuje takmer vo všetkých oblastiach. Ich využitie sa skúma v oblasti vrodených vývojových chýb srdca (20), hypertenzie (21), akútnych koronárnych syndrómov (22), srdcového zlyhávania (23) a v neposlednom rade pľúcnej hypertenzie. Stanovovanie miRNA však napriek moderným technologickým postupom predstavuje výzvu. V praxi využívané metódy zahŕňajú *Northern blotting*, RT-qPCR, *microarray*-e, RNA sekvenovanie. Napriek neschopnosti kvantitatívne stanoviť miRNA sa pre súčasné potreby najviac využíva metóda *microarray*-ov. Ich najväčšou výhodou je možnosť porovnávať dve vzorky (patológia vs. kontrolná

vzorka), preddefinovaných miRNA. Na skríningové účely postačujú, no vzhľadom na nízku špecifitu je optimálna ich verifikácia inými postupmi (24).

Zvieracie modely – Achillova päta skúmania PAH

V procese odkrývania nových patofyziologických poznatkov o PAH a hľadania inovatívnych terapeutických možností predstavujú významnú úlohu zvieracie modely. Všetky majú za cieľ imitovať podmienky, pri ktorých dochádza k zvyšovaniu afterloadu a postupnému zlyhávaniu pravej komory. Mechanizmy, ktorými dokážeme tento stav navodiť, sú však rôzne. Aj táto skutočnosť predstavuje prekážku pri štandardizácii postupov, ktoré by v budúcnosti mohli viesť k uplatneniu miRNA ako diagnostických biomarkerov PAH (25). V praxi najčastejšie využívanými modelmi sú monokrotalínový a hypoxický model. Monokrotalín je toxický alkaloid, ktorý sa aplikuje potkanom subkutánne. K jeho aktivácii dochádza po metabolizácii cytochrómom P-450 v pečeni. Aktívny metabolit následne poškodzuje cievny endotel a vyvoláva silnú zápalovú reakciu. Zápalové bunky – makrofágy, mastocyty, dendritické bunky infiltrujú predovšetkým adventíciu. S dominantným obrazom aktivácie zápalových procesov sa stretávame u pacientov s idiopatickou PAH. Poškodenie pľúc v histopatologickom obraze pripomína zmeny, ktoré sa pozorujú pri ARDS (26). Potkany s takto navodeným poškodením pľúc však nevykazujú všetky zmeny typické pre PAH, často vyčítanou skutočnosťou je, že absentujú plexiformné lézie (**obrázok 2**) charakteristické pre pokročilé štádiá PAH (27). Podobný nedostatok pozorujeme aj pri hypoxickom modeli. V tomto prípade chronická perzistentná hypoxia vedie k prestavbe na úrovni všetkých troch vrstiev cievnej steny, najmarkantnejším nálezom je



Obrázok 2 Zmeny vrstiev cievnej steny formujúce plexiformné lézie pri PAH

hypertrofia hladkých svalových buniek, zápalové zmeny sú v porovnaní s monokrotalínovým modelom vyjadrené minimálne. Absencia obštrukcie na podklade fibrózy cievnej intimy však tento model predurčuje skôr k simulácii menej závažných typov pľúcnej hypertenzie (skúmaný je v súvislosti s 3. skupinou PH – ochorenia pľúc asociované s alveolárnou hypoxiou) (28). V ostatných rokoch sa do popredia dostáva kombinácia uvedených modelov. Najviac vierohodnou kópiou PAH umelo indukovanou u zvierat je tzv. Su/Hx/Nx model. V prvom kroku sa využíva antagonist receptoru endotelového rastového faktora – Sugen 5416, nasleduje perióda prolongovanej hypoxie a v konečnej fáze je navodená normoxia. Pri takomto poradí environmentálnych vplyvov dochádza k začiatočnému poškodeniu endotelových buniek s následnou proliferáciou buniek schopných odolávať apoptóze. Reštitúcia normoxie má za následok tvorbu neointimálnych lézií, ktoré v mnohom pripomínajú plexiformnú vaskulopatiu pri PAH. Pri tomto modeli dochádza ku kombinácii zápalových a obliteračných mechanizmov (29). Hoci je tento model najviac podobný ľudskému modelu PAH, absolútna väčšina prác zaoberajúcich sa problematikou miRNA vychádzala z monokrotalínového a hypoxického modelu. Rôznorodosť použitých metodík sa pravdepodobne odrazí na neschopnosti jednotne reprodukovat výsledky doteraz publikovaných prác a je jednoznačným dôkazom potreby vypracovania jednotných postupov, bez ktorých bude význam miRNA v reálnych klinických podmienkach spochybiteľný.

Prehľad miRNA asociovaných s PAH

Jednou z najviac skúmaných miRNA v hypoxických podmienkach je *miRNA-21*. Výsledky pozorovaní sú rozporuplné, v niektorých prácach boli jej hodnoty výrazne znížené (30), zatiaľ čo v iných chronická hypoxia viedla na zvieracích modeloch k jej upregulácii (31). Napriek nejednotnosti v záveroch však možno na základe signifikantných výkyvov jednoznačne tvrdiť, že podiel *miRNA-21* na rozvoji PAH je pravdepodobný. V podmienkach nadmernej expresie *miRNA-21* boli pozorované fenotypové zmeny PASMC, konkrétne ich prechod do fázy aktívnej proliferácie. Cieľovými štruktúrami tejto molekuly sú prevažne tumor supresorové gény – proteín programovanej bunkovej smrti 4 (PDCD4), Sprouty 2 (SPRY2), PPARα, ktoré bez jej inhibičnej aktivity podporujú delenie a inhibujú apoptózu buniek. Yang vo svojej publikácii preukázal, že tak v hypoxických podmienkach u myši, ako aj v ľudských PASMC vystavených hypoxii, vedie upregulácia *miRNA-21* k downregulácii BMPR2. V ostatnom čase sa táto miRNA skúmala na vzorkách ciev vykazujúcich znaky pokročilej plexiformnej vaskulopatie, čím Bockmeyer et al. dokázali, že jej upregulácia nie je spätá len s iniciálnymi fázami rozvoja PAH, ale má podiel aj na samotnej progresii ochorenia (32). *MiRNA-21* okrem iného súvisí aj so zvýšeným

šmykovým napätím v cievach či procesmi fibrogenézy (33), čo dotvára jej potenciálnu úlohu v procese rozvoja PAH.

Klaster *miRNA-17-92* predstavuje skupinu miRNA detailne študovanú v rámci procesov onkogenézy. Pozostáva zo šiestich miRNA (*miRNA-17*, *miRNA-18a*, *miRNA-19a*, *miRNA-20a*, *miRNA-19b-1*, *miRNA-92-1*), pričom každá z nich sa podieľa na vývoji buniek, ich proliferácii, či na apoptotických dejoch. Vplyv na bunky pľúcneho parenchýmu sa začal skúmať po pokusoch, pri ktorých “knockout” génu pre tento klaster viedol u myšacích embryí k hypoplázii pľúc (34). Ďalšie práce s *miRNA-17-92* poukazujú na jej vzťah s ochoreniami postihujúcimi koronárne riečisko (35). Súvislosť medzi schopnosťou navodiť zmeny na úrovni ciev a pľúc sa premietla do snahy poukázať na spojenosť medzi týmto klastrom a PAH. Zistilo sa, že dané miRNA indukujú rast PAEC a PASMC. Pullamsetti et al. poukázali na to, že inhibícia *miRNA-17* v experimentálnom modeli PAH viedla k zlepšeniu funkcie pravej komory a k zmenám pľúcnej vaskulatury na podklade zvrátenia ich remodelácie (36). Jednoznačný podiel na rozvoji PAH bol potvrdený aj experimentom, pri ktorom “knockout” génu pre *miRNA-17-92* viedol k regresii hypoxiou indukovanej PAH u myši (37). V recentnej publikácii sa Li et al. venovali *miRNA-17* ako súčasťou klastru a porovnávali jej hladiny u 35 pacientov s PAH (12 z nich malo idiopatickú PAH, 18 PAH asociovanú s vrodenými vývojovými chybami srdca a 5 PAH asociovanú so systémovým ochorením spojiva) s kontrolnými vzorkami od zdravých jedincov. Zloženie podľa veku, pohlavia, BMI a komorbidít bolo zamerané čo najpodobnejšie, s cieľom eliminovať vplyv týchto faktorov na cirkulujúce hladiny *miRNA-17*. V tejto práci sa celému tímu podarilo preukázať, že hladiny *miRNA-17* boli významne vyššie u pacientov s PAH. Rozdiel v hladinách bolo možné pozorovať aj v rámci samotnej skupiny PAH, vyššie cirkulujúce hladiny mali pacienti v horšej funkčnej triede (NYHA III – IV vs. NYHA I – II). *MiRNA-17* pozitívne korelovalo s niektorými parametrami centrálnej hemodynamiky (stredný tlak v pľúcnici, tlak v pravej predsieni), vzťah nepriamej úmery sa pozoroval medzi jej hladinami a vzdialenosťou, ktorú pacienti s PAH prešli pri šesťminútovom teste chôdzou. Tieto výsledky svedčia nielen o prediktívnom, ale dokonca aj prognostickom potenciáli *miRNA-17* (38).

Santos-Ferreira et al. (39) vo svojej práci s využitím *mikroarrays* skúmali vzorky pacientov s PAH a porovnávali ich s korešpondujúcimi vzorkami tkanív kontrolnej skupiny. Detekcia miRNA prebiehala na rôznych typoch tkanív – endotelových progenitorových bunkách, tkanive pľúc, PASMC a v periférnej krvi cirkulujúcich mononukleárných bunkách. Sledovali pozitívne či negatívne výkyvy v expresii jednotlivých miRNA pri PAH. Napriek jednotlivými tkanivami bola ich expresia vo väčšine prípadov značne nesúrodá, diskrepancia bola zjavná aj pri porovnaní totožných miRNA skúmaných na zvieracích modeloch PAH, čo podporuje teóriu rôznorodosti miRNA dependentných mechanizmov,

ktoré sa podieľali na rozvoji ochorenia v experimentálnych podmienkach a v ľudskom organizme. Jednou zo štyroch molekúl vykazujúcich konštantnosť bola *miRNA-29*. Táto patrí medzi proapoptotické *miRNA*, ktorých cieľovou bunkou je MCL1 (“*myeloid cell leukemia 1*”). Priamo ovplyvňuje viac ako 16 extracelulárnych génov a jej primárnou funkciou je účasť na antifibrotických procesoch rôznych orgánov, medzi ktoré patrí aj srdce a pľúca (40). Santos-Ferreira et al. poukázali na najvýznamnejšie zmeny expresie tejto *miRNA* v tkanive pľúc, kde bola detekovaná jej výrazná upregulácia, hladkosvalové bunky pľúcnych artérií u pacientov s PAH javili tendenciu k jej downregulácii. Prognostický potenciál *miRNA-29* načrtli Kameny et al. na pokuse, pri ktorom zavedením aortopulmonálneho shuntu u jahniat simulovali podmienky porovnateľné s PAH asociovanou s vrodenou vývojovou chybou srdca. Vyššie hladiny *miRNA-29* boli prítomné u jahniat vykazujúcich kompenzačnú koncentrickú hypertrofiu pravej komory, naopak nižšie u tých s excentrickou hypertrofiou, čo odhaľuje jej potenciál predikovať riziko zlyhania pravej komory (41). Touto mRNA u pacientov s hereditárnou PAH sa zaoberali vo svojej publikácii aj Chen et al. (42). Okrem zvýšenej expresie *miRNA-29* v pľúcnom tkanive sa im podarilo poukázať na súvislosť PAH s metabolizmom estrogénu. V experimentálnom modeli viedli zvýšené hladiny metabolitov estrogénu k upregulácii *miRNA-29* u myši s mutáciou BMPR2, známou práve u hereditárnej PAH. Toto pozorovanie viedlo k hypotéze, že v podmienkach genetickej predispozície môže aktivácia niektorých signálnych dráh sprostredkovaných ženskými pohlavnými hormónmi viesť k fenotypovej manifestácii ochorenia (42).

Efekt *miRNA-124* v kontexte PAH sa zakladá na supresii proliferácie buniek. V hypoxických podmienkach dochádza k jej downregulácii v PSMC a tiež v bunkách fibroblastov. Pri normálnych podmienkach *miRNA-124* bráni aktivácii NFAT (“*nuclear factor of activated T-cells*”) a tým inhibuje proliferáciu PSMC. Okrem antiproliferatívnych dejov reguluje expresiu génov, ktoré sa podieľajú na diferenciácii cieľových buniek (43). Okrem fibroblastov sa downregulácia tejto *miRNA* skúmala aj na endotelových bunkách pľúcnych artérií izolovaných od pacientov s PAH, kde viedla k preprogramovaniu metabolizmu z pôvodne dominantnej oxidatívnej fosforylácie na aeróbnou glykolýzu (44). Wang et al. dospeli k podobnému záveru, keď inkorporovali analóg *miRNA-124* do fibroblastov, čo malo za následok okrem spomalenia samotnej proliferácie buniek aj zastavenie migrácie a aktivácie zápalových buniek (45).

V rámci postihnutia ciev pri rôznych kardiovaskulárnych ochoreniach sa veľká pozornosť venuje klastru *miRNA143/145*. Za expresiu týchto *miRNA* sú zodpovedné predovšetkým hladkosvalové bunky cievnej steny a väčšina dostupných zdrojov sa tejto problematike venuje najmä v súvislosti s akútnym koronárnym syndrómom (46). Vzhľadom na účasť PSMC na rozvoji PAH sa začal tento klastor detailnejšie skúmať aj pri tomto ochorení. Caruso et al. preukázali na myšiach

a neskôr aj na vzorkách ciev pľúcneho riečiska od pacientov s idiopatickou a hereditárnou PAH upreguláciu *miRNA-145* (47). Súvislosť tejto *miRNA* a PAH sa kauzálnie preukázala aj genetickými pokusmi na myšiach, pri ktorých mal “*knockout*” príslušného génu za následok vývoj fenotypu protektívneho proti rozvoju PAH (48). *miRNA-143* do výraznej miery reguluje migráciu a apoptózu PSMC. Práve výskum tejto molekuly preukázal schopnosť interakcie medzi PSMC a PAEC cez malé lipidové transportéry – exozómy, ktoré sú vylučované PSMC a ktorých súčasťou je v prípade PAH aj *miRNA-143*. PAEC sú schopné vychytávať tieto častice, čo v konečnom dôsledku vedie k zmenám na úrovni migrácie buniek a angiogenézy (49). Expresia *miRNA-143/145* sa porovnávala medzi koncentrickými a plexiformnými cievnymi léziami, pričom vyššie hodnoty zodpovedali koncentrickému postihnutiu. Na základe týchto pozorovaní možno vysloviť hypotézu, že upregulácia daného klastra má za následok hyperpláziu PSMC, kým relatívna downregulácia skôr zodpovedá zvýšenej proliferácii PAEC s výsledným angioproliferatívnym fenotypom typickým pre plexiformnú vaskulopatiu. V oboch prípadoch je spoločným menovateľom redukcia lúmenu typická pre PAH.

Molekule *miRNA-140* sa extenzívne vo svojej práci venovali Rothman et al. (49) Táto *miRNA* patrí do skupiny tumor-supresorových nekódujúcich RNA, ktoré regulujú proliferáciu a migráciu buniek. Nízke cirkulujúce hladiny sa pozorovali u onkologických pacientov (hepatocelulárny karcinóm, karcinóm pľúc či prsníka). Rothman et al. porovnávali hladiny cirkulujúcich *miRNA* u troch skupín pacientov s PH (idiopatická PAH, PAH asociovaná so systémovým ochorením spojiva, chronická tromboembolická PH), u pacientov so systémovým ochorením spojiva s fyziologickými parametrami centrálnej hemodynamiky a u zdravých jedincov, ktorí tvorili kontrolnú vzorku. Medzi *miRNA*, ktorých expresia bola najvýraznejšie downregulovaná u všetkých pacientov s PH (oba typy PAH a tiež CTEPH), patrila *miRNA-140*. V snahe dokázať jej možný podiel na rozvoji PAH aplikovali syntetický inhibítor tejto *miRNA* na izolované ľudské PSMC, čo viedlo k následnej proliferácii a migrácii. Podobne aj na experimentálnych modeloch PAH – monokrotalínovom a Su/Hx/Nx boli preukázané konzistentné výsledky, čo sa týka downregulácie *miRNA-140*. V ďalšej časti sa Rothman et al. zamerali izolovane na pacientov s idiopatickou PAH. 20 pacientov porovnávali so 16 kontrolnými vzorkami, opäť so zhodným výsledkom. Mimo toho, že nízke hladiny *miRNA-140* prevažne korelovali so stanovenou diagnózou, do značnej miery odzrkadľovali aj prognózu pacientov na základe prognostických premenných využívaných v klinickej praxi. Nižšie cirkulujúce hladiny boli asociované s horšou funkčnou triedou, zníženou fyzickou výkonnosťou, vyšším tlakom v pravej predsieni a nižším cardiac indexom (49). Okrem vplyvu na PSMC je pravdepodobné, že *miRNA-140* ovplyvňuje aj schopnosť pravej komory adaptovať sa na vysoký afterload v podmienkach PAH. Joshi et al. na to

poukázali na experimentálnom modeli Su/Hx/Nx pri určovaní tkanivovo špecifických miRNA. Jej expresia sa zvýšila, ak došlo k hypertrofii pravej komory. Prípadný rozvoj dysfunkcie pravej komory sa viazal na downreguláciu cieľového proteínu miRNA-140 – mitofusín 1 (50).

Ďalšou molekulou s nielen diagnostickým, ale aj prognostickým potenciálom je *miRNA-150*. Bolo preukázané, že v plazme pacientov s idiopatickou PAH sú jej cirkulujúce hladiny výrazne redukované. Zároveň predstavuje nezávislý prediktor horšej prognózy (51). Mechanizmus, ktorý by vysvetľoval možný protektívny účinok tejto molekuly proti endotelovej dysfunkcii pozorovanej pri PAH však bol publikovaný až recentne. Russomanno et al. na experimentálnom modeli Su/Hx/Nx pozorovali efekt podanej miRNA-150 nadviazanej na lipidový nosič. V porovnaní s kontrolnou vzorkou boli po podaní molekuly v relatívne krátkom časovom intervale pozorované signifikantne nižšie hodnoty systolického tlaku v pravej komore, významne menej bola tiež vyjadrená hypertrofia pravej komory (52). Na molekulovej úrovni je downregulácia miRNA-150 pravdepodobne vyvolaná tumor-supresorovým génom TP53, ktorý je výrazne exprimovaný v endotelových bunkách pacientov s PAH a ktorý inhibuje jej samotnú transkripciu (53). Hypoxia a genetické mutácie BMPR2 sa pravdepodobne ako kofaktory podieľajú na celej patologickej kaskáde. Metódou sekvenovania bol ako cieľový gén molekuly miRNA-150 stanovený PTPMT1, lokalizovaný na vnútornej membráne mitochondrií. Jeho protektívny efekt na endotelové bunky súvisí prevažne so správnou biosyntézou kardiolipínu, ktorý je nevyhnutný na zachovanie integrity membránového systému mitochondrií a produkciu ATP. Práve dostatočné zásoby energie sú dôležité pre adaptáciu pravej komory a pľúc na stresové podmienky, ktoré v prípade PAH predstavuje zvýšený afterload, hypoxia a zápal (54). Ďalší benefit súvisiaci so suplementáciou miRNA-150 spočíva v redukcii expresie profibrotických a pro-zápalových génov. V uvedenej práci sa však u myší, ktorým bola podávaná táto molekula, pozoroval mierny hepatotoxický efekt. Nie je však jasné, či je zaň zodpovedný použitý lipidový nosič, alebo je hepatotoxicita možným nežiaducim účinkom molekuly, podmienená doposiaľ detailne nepreskúmanými pleiotropnými vlastnosťami na rôzne tkanivá.

Medzi prvé miRNA súvisiace s remodeláciou pľúcnych artérií a arteriol patrí *miRNA-204*. Jej hladiny boli downregulované tak v pľúcach pacientov s PAH, ako aj v pľúcach zvieracích modelov PAH. Courboulín et al. preukázali, že miera downregulácie súvisí so stupňom závažnosti ochorenia (55). Za primárny patofyziologický mechanizmus procesu považovali zmenu fenotypu PSMC, ktoré v podmienkach nerovnováhy hladín tejto molekuly nadobudli proliferatívne a antiapoptické vlastnosti. Zmeny v expresii molekuly pozorovali na biopických vzorkách pľúc pacientov s idiopatickou PAH a tiež na zvieracích modeloch PAH využívajúcich monokrotalínový a hypoxický model. S cieľom dokázať tkanivovú špecifitu tejto miRNA sledovali jej hladiny tri týždne po injekcii monokro-

talínu u potkanov, pričom zmeny v zmysle downregulácie boli minimálne, pričom prítomné boli iba v pľúcach a pľúcnych cievach v porovnaní s aortou, obličkami, srdcom a pečeňou, kde nedošlo k žiadnym výkyvom v expresii. Pozadím vyššie uvedeného je zrejme spojenie medzi downreguláciou miRNA-204 a pôsobením endogénnych látok kľúčových pre rozvoj PAH – PDGF (*“platelet derived growth factor”*), endotelín-1, angiotenzín II. Ich spoločným menovateľom je zapojenie do signálnych kaskád sprostredkovaných prevažne STAT3 (*“signal transducer and activator of transcription 3”*). Tieto postupnosti viedli k objaveniu vzťahu nepriamej úmernosti medzi samotným STAT3 a miRNA-204 – čím je aktivita STAT3 vyššia, tým je downregulácia miRNA-204 výraznejšia. Situácia je však v skutočnosti výrazne zložitejšia a do celého priebehu zasahuje viac činiteľov – NFAT (*“nuclear factor of activated T-cells”*), TRPM3 (*“transient receptor potential cation channel subfamily M member 3”*) a mnoho iných (56). Courboulín et al. sa okrem dôkazu dysregulácie miRNA-204 pokúsili preukázať jej kauzálnu súvislosť s PAH pomocou priameho terapeutického ovplyvnenia. Potkanom, ktoré po monokrotalíne rozvinuli ireverzibilnú PAH, podávali cestou endotracheálnej nebulizácie syntetický analóg miRNA-204, čo viedlo k redukcii stupňa PAH. Zaujímavou konsekvenciou aplikácie miRNA-204 bola tiež signifikantná redukcia hrúbky tunica media malých a stredných pľúcnych arteriol.

Schopnosť *miRNA-206* regulovať proliferáciu buniek bola podrobne opísaná v súvislosti s viacerými typmi rakoviny. Jej zvýšená expresia ovplyvňuje v negatívnom zmysle expresiu proteínu Notch3 (*“neurogenic local protein”*), ktorý je úzko spätý cez viaceré signálne dráhy s cieľovými génmi BMPR2 (57). Práve táto súvislosť viedla Jalaliho et al. k skúmaniu tejto molekuly na zvieracom hypoxickom modeli PAH. V porovnaní s kontrolnou vzorkou preukázali významnú downreguláciu miRNA-206 u myší vystavených chronickej hypoxii. V rámci svojej práce zároveň pracovali s vykultivovanými PSMC, pričom dospeli k záveru, že arteficiálne vystupňovaná expresia miRNA-206 inhibovala proliferáciu PSMC a bunky mali tendenciu vstupovať do procesov apoptózy vo včasných štádiách. Naopak, jej redukcia viedla k prechodu PSMC do tzv. hyperproliferatívneho stavu. MiRNA-206 je tiež schopná indukovať diferenciáciu PSMC, čo sa preukázalo na základe zvýšenia expresie diferenciačných markerov – kalponínu a SMAa (*“smooth muscle actin a”*) (58).

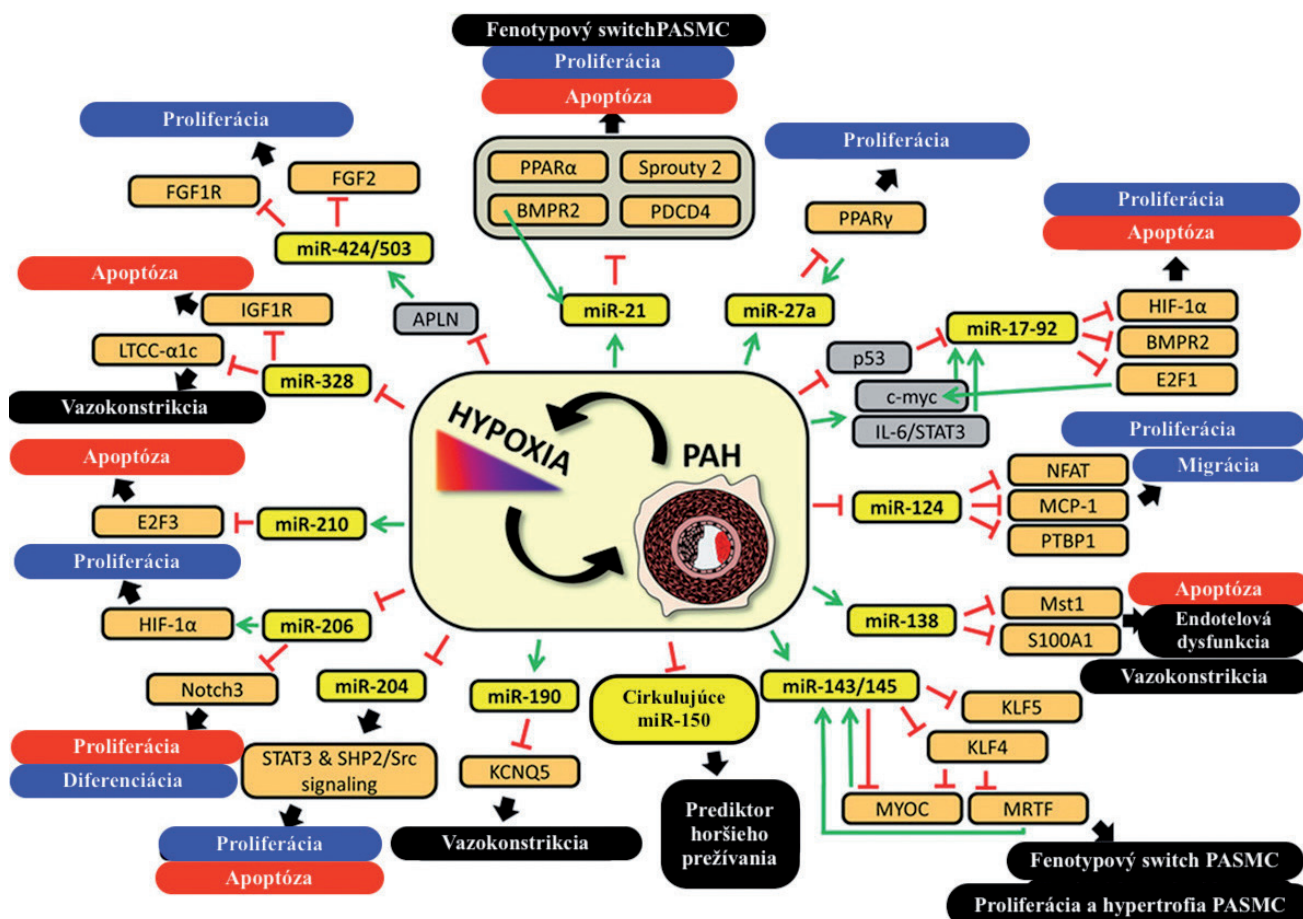
Možnosti diagnostického a terapeutického uplatnenia miRNA v klinickej praxi

Možnosť jednoduchého stanovenia a schopnosť reflektovať patofyziologické mechanizmy podieľajúce sa na rozvoji daného ochorenia sú hlavnými parametrami určujúcimi diagnostický potenciál biomarkerov (59). Jedným z problémov, ktorý bráni využitiu miRNA v diagnostike PAH je komplexnosť och-

renia. Neexistujú publikácie, ktoré by definovali konkrétnu miRNA ideálne odzrkadľujúcu jeho zložitú podstatu. Väčšina z citovaných prác skúma dané miRNA dominantne na simplifikovaných zvieracích modeloch PAH. Ďalšou prekážkou brániacou rutinnému stanovovaniu miRNA je častá polymorbidita pacientov. Okrem kardiovaskulárnych ochorení nie sú u nich ojedinelé ani systémové choroby spojiva, rôzne druhy rakoviny a v neposlednom rade môže profil miRNA podstatne ovplyvňovať aj užívaná farmakoterapia (60). S „izolovanou“ PAH sa v praxi stretávame výnimočne. V neposlednom rade chýbajú štandardizované metodické postupy na stanovovanie miRNA a štúdie na väčších počtoch pacientov. Spôsoby detekcie miRNA sa medzi jednotlivými laboratóriami výrazne odlišujú, čo sťažuje možnosť porovnávať ich výsledky a vymedziť, aké hodnoty sú fyziologické a pri akých je potrebné dôsledne pátrať po PAH (61).

Absencia liečiv, ktoré by dokázali zvrátiť procesy vedúce k manifestácii PAH, vedie k pátraniu po nových terapeutických

možnostiach. Prvotné nádeje vkladane do miRNA na základe pozitívnych výsledkov na experimentálnych modeloch však so sebou tiež prinášajú viacero úskalí (62). Všeobecne existujú dva postupy využívajúce miRNA na liečebné účely: Elevácia vopred stanovených miRNA navodená aplikáciou tzv. *miRNA-mimetík* alebo supresia navodená *antagomiR*-mi (63). Podobne ako na poli diagnostiky, chýbajú komplexné zvieracie modely, na ktorých by bolo možné otestovať bezpečnosť inovatívnych liečiv. Stabilita podmienená chemickou štruktúrou, schopnosť koncentrovať sa v cieľových tkanivách a prípadné vedľajšie účinky na bunky, ktoré nie sú terapeutickým cieľom, predstavujú hlavné limitácie liečiv zasahujúcich do regulácie miRNA (56). Prioritou v budúcnosti bude definovanie konkrétnych miRNA, ktorých ovplyvnenie dokáže modifikovať vývoj ochorenia. Práve pleiotropné, zatiaľ nepredikovateľné účinky týchto molekúl, vďaka ktorým upútali pozornosť medicíny, sú dôvodom, prečo je ich využitie v rutínnej praxi doposiaľ vzdialené (64) (obrázok 3).



Obrázok 3 Prehľad miRNA (žlté polia) zasahujúcich do patomechanizmov PAH. Modrou farbou sú zvýraznené potencionálne mechanizmy, červenou inhibované. Zelené šípky označujú molekuly, pri ktorých dochádza pri rozvoji PAH k upregulácii, červené T označujú molekuly, ktorých expresia je downregulovaná. V oranžových políčkach sú cieľové molekuly daných miRNA (Upravené podľa 35)

Literatúra

1. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2019; Jan 24;53:1801913.
2. Boucherat O, Potus F, Bonnet S. MicroRNA and pulmonary hypertension. *MicroRNA* 2015;888:237-252.
3. Fishman AP. Changing concepts of the pulmonary plexiform lesion. *Physiol Res* 2000; 49:4854-4892.
4. Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013; Dec 24; 62(25 Suppl):D4-12.
5. Thenappan T, Shah SJ, Rich S, et al. A USA-based registry for pulmonary arterial hypertension: 1982-2006. *Eur Respir J*. 2007; Dec; 30:1103-1110.
6. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, et al. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation*. 2002; Apr 9; 105:1672-1678.
7. Aldred MA, Vijayakrishnan J, James V, et al. BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*. 2006; Feb; 27:212-213.
8. Guignabert C, Tu L, Izikki M, et al. Dichloroacetate treatment partially regresses established pulmonary hypertension in mice with SM22alpha-targeted overexpression of the serotonin transporter. *FASEB J*. 2009 Dec; 23:4135-4147.
9. Rai PR, Cool CD, King JA, et al. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:558-564.
10. Spiekerkoetter E, Sung YK, Sudheendra D, et al. Low-dose FK506 (Tacrolimus) in end-stage pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:254-257.
11. Nicolls M, Badesch D, Chung L, et al. Safety and efficacy of B-cell depletion with rituximab for the treatment of systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension in a multi-center NIH clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021;Jul 15:209-211.
12. Maresca A, Zaffagnini M, Caporali L, et al. DNA methyltransferase 1 mutations and mitochondrial pathology: is mtDNA methylated? *Front Genet* 2015; March 12; | <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00090>
13. Zhao L, Chen CN, Hajji N, et al. Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid. *Circulation*. 2012; Jul 24; 126:455-467.
14. Kim J, Hwangbo C, Hu X, et al. Restoration of impaired endothelial myocyte enhancer factor 2 function rescues pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2015;131:190-199.
15. Silva DCPD, Carneiro FD, Almeida KC. Role of miRNAs on the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Arq Bras Cardiol*. 2018;111:738-746.
16. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:402.
17. Romaine SP, Tomaszewski M, Condorelli G, et al. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart*. 2015;101:921-928.
18. Diehl P, Fricke A, Sander L, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res*. 2012; Mar 15; 4:633-644.
19. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29; 105:10513-10518.
20. Smith T, Rajakaruna C, Caputo M, Emanuelli C. MicroRNAs in congenital heart disease. *Ann Transl Med*. 2015; Dec; 3:333.
21. Bátkai S, Thum T. MicroRNAs in hypertension: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Hypertens Rep*. 2012; Feb; 14:79-87.
22. Coskunpinar E, Cakmak HA, Kalkan AK, et al. Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction. *Gene*. 2016; Oct 10; 591:90-96.
23. Schulte C, Westermann D, Blankenberg S, et al. World J. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in heart failure with preserved and reduced ejection fraction. *Cardiol*. 2015; Dec 26; 7:843-860.
24. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;13:358-369.
25. Schlosser K, Taha M, Deng Y, et al. Discordant regulation of microRNA between multiple experimental models and human pulmonary hypertension. *Chest*. 2015;148:481-490.
26. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol. Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297:L1013-L1032.
27. Abe K, Toba M, Alzoubi A, et al. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010;121:2747-2754.
28. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ. Res*. 2006;99:675-691.
29. Bátkai S, Bär C, Thum T. MicroRNAs in right ventricular remodeling. *Cardiovasc Res*. 2017;113:1433-1440.
30. Caruso P, MacLean MR, Khanin R, et al. Dynamic changes in lung microRNA profiles during the development of pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:716-723.
31. Yang S, Banerjee S, Freitas A, et al. miR-21 regulates chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012;302:L521-529.
32. Bockmeyer CL, Maegel L, Janciauskiene S, et al. Plexiform vasculopathy of severe pulmonary arterial hypertension and micro-RNA expression. *J Heart Lung Transplant* 2012;31:764-772.
33. Patel V, Noureddine L. MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21:410-416.
34. Ventura A, Young AG, Winslow MM, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 2008; Mar 7; 132:875-886.
35. Bienertova-Vasku J, Novak J, Vasku A. MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension: pathogenesis, diagnosis and treatment. *J Am Soc Hypertens*. 2015; Mar; 9:221-234.
36. Pullamsetti SS, Doebele C, Fischer A, et al. Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; Feb 15; 185:409-419.

37. Li W, Dunmore BJ, Morrell NW. Bone morphogenetic protein type II receptor mutations causing protein misfolding in heritable pulmonary arterial hypertension. *Proc Am Thorac Soc*. 2010; Nov; 7:395-398.
38. Haiwen Li, Zhiming Yang, Fen Gao, et al. MicroRNA-17 as a potential diagnostic biomarker in pulmonary arterial hypertension. *J Int Med Res*. 2020; Jun; 48: 300060520920430.
39. Santos-Ferreira CA, Abreu MT, Marques CI, et al. Micro-RNA Analysis in Pulmonary Arterial Hypertension: Current Knowledge and Challenges. *JACC Basic Transl Sci*. 2020; Nov; 5:1149-1162.
40. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, et al. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics*. 2012;44:237-244.
41. Kameny RJ, He Y, Zhu T. Analysis of the microRNA signature driving adaptive right ventricular hypertrophy in an ovine model of congenital heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315:H847-H854.
42. Chen X, Talati M, Fessel JP. Estrogen metabolite 16 α -hydroxysterone exacerbates bone morphogenetic protein receptor type II-associated pulmonary arterial hypertension through microRNA-29-mediated modulation of cellular metabolism. *Circulation*. 2016;133:82-97.
43. Kang K, Peng X, Zhang X, et al. MicroRNA-124 suppresses the transactivation of nuclear factor of activated T cells by targeting multiple genes and inhibits the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2013;288:25414-25427.
44. Caruso P, Dunmore BJ, Schlosser K. Identification of microRNA-124 as a major regulator of enhanced endothelial cell glycolysis in pulmonary arterial hypertension via PTBP1 (polypyrimidine tract binding protein) and pyruvate kinase M2. *Circulation*. 2017;136:2451-2467.
45. Wang D, Zhang H, Li M, et al. MicroRNA-124 controls the proliferative, migratory, and inflammatory phenotype of pulmonary vascular fibroblasts. *Circ Res*. 2014;114:67-78.
46. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2010; Sep 3; 107:677-684.
47. Caruso P, Dempsey Y, Stevens HC, et al. A role for miR-145 in pulmonary arterial hypertension: evidence from mouse models and patient samples. *Circ Res*. 2012; Jul 20; 111:290-300.
48. Deng L, Blanco FJ, Stevens H, et al. miR-143 Activation regulates smooth muscle and endothelial cell crosstalk in pulmonary arterial hypertension. *Baker Circ Res*. 2015; Oct 23; 117:870-883.
49. Rothman AM, Arnold ND, Pickworth JA. MicroRNA-140-5p and SMURF1 regulate pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*. 2016;126:2495-2508.
50. Joshi SR, Dhagia V, Gairhe S, et al. MicroRNA-140 is elevated and mitofusin-1 is downregulated in the right ventricle of the Sugen5416/hypoxia/normoxia model of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311.
51. Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, et al. National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group on Cellular and Molecular Mechanisms of Right Heart Failure Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation*. 2006;114:1883-1891.
52. Russomanno G, Jo KB, Abdul-Salam VB, et al. miR-150-PTPMT1-cardiolipin signaling in pulmonary arterial hypertension. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;23:142-153. Published 2020 Nov 4. doi:10.1016/j.omtn.2020.10.042.
53. Ghose J, Bhattacharyya NP. Transcriptional regulation of microRNA-100, -146a, and -150 genes by p53 and NF κ B p65/RelA in mouse striatal STHdh^{Q7}/Hdh^{Q7} cells and human cervical carcinoma HeLa cells. *RNA Biol*. 2015;12:457-477.
54. Ryan JJ, Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*. 2014;115:176-188.
55. Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, et al. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med*. 2011;208:535-548.
56. Archer S, Rich S. Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation*. 2000; Nov 28; 102:2781-2791.
57. Li X, Zhang X, Leathers R, et al. Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat Med*. 2009; Nov; 15:1289-1297.
58. Jalali S, Ramanathan GK, Parthasarathy PT, et al. Mir-206 regulates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and differentiation. *PLoS One*. 2012;7:e46808.
59. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx*. 2004;1:182-188.
60. Navickas R, Gal D, Laucevičius A, et al. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovasc Res*. 2016;111:322-337.
61. Schulte C, Karakas M, Zeller T. MicroRNAs in cardiovascular disease - clinical application. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:687-704.
62. Bonneau E, Neveu B, Kostantin E, et al. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC*. 2019;30:114-127.
63. Schulte C, Karakas M, Zeller T. MicroRNAs in cardiovascular disease - clinical application. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:687-704.
64. Negi V, Chan SY. Discerning functional hierarchies of microRNAs in pulmonary hypertension. *JCI Insight*. 2017;2.