

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ТЕРАПИИ
И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ –
ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Чуркина Мария Игоревна

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ P53-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МИКРОРНК
MIR-34A, MIR-34B/C, MIR-129-2 И MIR-203 ПРИ ДИФфуЗНОЙ
В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЕ**

3.1.28. Гематология и переливание крови

1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Поспелова Татьяна Ивановна

доктор медицинских наук

Воропаева Елена Николаевна

Новосибирск – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	16
1.1 Современные данные о диффузной В-крупноклеточной лимфоме.	16
1.1.1 Краткие сведения об эпидемиологической, морфологической и клинической характеристике диффузной В-крупноклеточной лимфомы.	16
1.1.2 Современные подходы к диагностике диффузной В-крупноклеточной лимфомы.	19
1.1.3 Молекулярные подтипы диффузной В-крупноклеточной лимфомы.	20
1.1.4 Подходы к терапии диффузной В-крупноклеточной лимфомы.	23
1.1.5 Факторы прогноза диффузной В-крупноклеточной лимфомы.	27
1.2 Значение p53-чувствительных микроРНК.	29
1.2.1 Краткие сведения о гене <i>TP53</i> и белке p53.	30
1.2.2 Характеристика мутаций в гене <i>TP53</i>	32
1.2.3 Номенклатура и биогенез микроРНК.	35
1.2.4 МикроРНК и онкогенез.	37
1.2.5 Механизмы дерегуляции уровня микроРНК.	38
1.2.6. Механизмы регуляции экспрессии микроРНК белком p53.	41
1.2.7 МикроРНК как потенциальные терапевтические мишени при опухолях	44
1.3 Метилирование p53-чувствительных микроРНК и онкогенез.	46
1.3.1 Метилирование генов микроРНК семейства <i>miR-34</i> при опухолях.	46
1.3.2 Метилирование гена <i>MIR-203</i> и онкогенез	51
1.3.3 Метилирование микроРНК семейства <i>miR-129</i> при опухолях.	54
Резюме.	57
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	61
2.1 Общая характеристика группы обследованных больных.	61
2.2 Методы клинического, лабораторного и инструментального обследования.	67
2.3 Специальные методы исследования.	70

2.3.1 Подготовка образцов ДНК для исследования.	70
2.3.2 Бисульфитная конверсия образцов ДНК.	71
2.3.3 Оценка статуса метилирования генов семейства <i>MIR-34</i>	72
2.3.4 Оценка статуса метилирования генов <i>MIR-203</i> и <i>MIR-129-2</i>	75
2.3.5 Оценка полноты бисульфитной конверсии.	77
2.3.6 Оценка aberrаций в гене <i>TP53</i>	79
2.3.7 Статистическая обработка материала.	80
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	82
3.1 Частота метилирования генов микроРНК <i>mir-34a</i> , <i>miR-34b/c</i> , <i>miR-129</i> и <i>miR-203</i> в опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.	82
3.2 Клиническое значение метилирования изучаемых генов микроРНК при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.	84
3.2.1 Ассоциация метилирования генов семейства микроРНК <i>mir-34</i> с особенностями клинического течения заболевания у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.	84
3.2.2 Анализ ассоциации метилирования генов <i>MIR-203</i> и <i>MIR-129-2</i> с особенностями клинического течения заболевания у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.	86
3.3 Ассоциация метилирования генов микроРНК <i>mir-34a</i> , <i>miR-34b/c</i> , <i>miR-129</i> и <i>miR-203</i> с данными лабораторно-инструментального обследования больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.	87
3.3.1 Ассоциация метилирования изучаемых генов микроРНК с иммуногистохимическими характеристиками диффузной В-крупноклеточной лимфомы.	87
3.3.2 Ассоциация метилирования изучаемых генов микроРНК с лабораторными параметрами больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.	90
3.4 Прогностическое значение метилирования изучаемых генов микроРНК. .	92
3.5 Оценка сочетанности метилирования генов <i>MIR-203</i> , <i>MIR-129-2</i> ,	

<i>MIR-34A</i> и <i>MIR-34B/C</i> в опухолевой ткани диффузной В-крупноклеточной лимфомы.	96
3.6 Мутационный статус гена <i>TP53</i> в группе исследования.	99
3.7 Оценка сочетанности метилирования изучаемых генов микроРНК и мутаций в гене <i>TP53</i> у больных с диффузной В-крупноклеточной лимфомой. .	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	106
ВЫВОДЫ.	120
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	126
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.	164

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДВККЛ) – один из наиболее распространенных видов неходжкинских лимфом, отличающихся клинической и биологической гетерогенностью. В ходе недавних исследований ДВККЛ на основании различий в профиле экспрессии генов [77]; спектре генных мутаций и хромосомных нарушений [25]; а также мутационных профилей, изменения копияности и структурных генных перестроек [78] были описаны молекулярные подтипы опухоли с различными исходами при применении иммунохимиотерапии.

Ожидалось, что понимание идентифицированных генетических поломок, возникающих в опухолевых клетках, значительно изменит лечение ДВККЛ. Однако, терапия первой линии ДВККЛ для большинства больных долгие годы оставалась неизменной и предусматривала применение схемы R-CHOP (ритуксимаб в комбинации с циклофосфаном, доксорубицином, винкристином и преднизолоном) [2]. Различные стратегии, включающие изменение комбинаций препаратов, интенсификацию доз, лучевое воздействие и трансплантацию стволовых кроветворных клеток, не могли обеспечить значимого улучшения выживаемости больных [315], что свидетельствует о необходимости дальнейшего прогресса в понимании механизмов возникновения и опухолевой прогрессии лимфомы, а также поиска новых подходов ее лечения.

В настоящее время в стратификации пациентов с ДВККЛ на группы риска общепринятой считается модель Международного прогностического индекса (МПИ), включающая такие клинические параметры, как возраст, стадия заболевания, оценка общесоматического статуса (ОСС) по шкале ECOG, число экстранодальных поражений и уровень ЛДГ, связь которых с биологическими особенностями лимфомы также еще предстоит определить [2].

Ген *TP53* признан хранителем генома. В норме кодируемый им белок управляет основными внутриклеточными защитными механизмами против роста

опухоли и способствует репарации ДНК, запуску апоптоза, остановке клеточного цикла и старению, тогда как мутантный p53 приводит к нарушению регуляции клеточного цикла, нестабильности генома и потере контроля над пролиферацией. Регулируя множество нижестоящих генов-мишеней, он управляет также процессами аутофагии, передачи внутриклеточных сигналов, транскрипции, иммунными, воспалительными реакциями и метаболизмом. Таким образом, считается, что для развития злокачественного новообразования нормальное функционирование самого гена *TP53* и/или молекулярных путей выше и/или ниже белка p53 должны быть тем или иным образом нарушены [172].

Известно, что дисфункция гена *TP53* играет важную роль в развитии ДВККЛ. Аберрации *TP53* и нарушение регуляции p53-сигнального пути играют ключевую роль в формировании резистентности лимфомы к терапии [150].

Известно, что микроРНК являются важными компонентами транскрипционной сети *TP53*. Активация белком p53 большого числа онкосупрессорных микроРНК, в том числе miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129 и miR-203, а также существование сложных петель положительных связей между этими молекулами и p53 свидетельствуют о значительном вкладе p53-чувствительных микроРНК в реализацию программы подавления злокачественного роста и ответа на лечение опухоли [242].

Регуляторные участки для связывания с белком p53 были обнаружены в генах микроРНК с онкосупрессорными функциями, таких как *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *LET-7*, *MIR-16-2*, *MIR-29B*, *MIR-129* и *MIR-145*, связывание с которыми белка p53 индуцирует их транскрипцию. В регуляции экспрессии других онкосупрессорных микроРНК (miR-16-1, miR-203 и miR-143) p53 участвует, ускоряя их процессинг [260].

Профилирование микроРНК показало значительные изменения в экспрессии данных молекул в опухолевых клетках с сохранной функцией *TP53* и *TP53*-дефицитных клетках [53]. Однако *TP53* подвергается мутациям, примерно, у 20 % пациентов с ДВККЛ, что не объясняет все случаи снижения уровня p53-чувствительных онкосупрессорных микроРНК в опухолевой ткани больных

лимфомами [222], что свидетельствует о существовании других механизмов нарушения их экспрессии.

В настоящее время раскрыты несколько причин, лежащих в основе изменения уровня микроРНК при онкозаболеваниях: хромосомные делеции/амплификации, мутации, генетический полиморфизм, нарушение процессинга, эпигенетические модификации [240].

В последние годы по данным литературных источников встречается все больше данных, свидетельствующих о связи метилирования ДНК и нарушения экспрессии микроРНК. Кодирующие их гены в большинстве случаев располагаются в районах генома, обогащенных CpG-островками [42]. В настоящее время показано, что гены микроРНК подвергаются патологическому метилированию в пять-десять раз чаще, чем белок-кодирующие гены [56].

В отличие от злокачественных новообразований эпителиальной природы, данные о статусе метилирования генов p53-чувствительных микроРНК при лимфомах представлены единичными публикациями [288].

Вместе с тем, считается, что углубленное понимание спектра и частоты aberrаций ключевых участников p53-сигнального пути при данной опухоли может способствовать не только лучшей диагностике и прогнозированию заболевания, но и терапии лимфомы [223]. Так, многообещающие результаты показывает применение терапевтических подходов на основе микроРНК в экспериментах на клеточных линиях лимфомы и в доклинических исследованиях ДВККЛ [315].

Степень разработанности темы диссертации

В литературе описано снижение при лимфомах уровня таких p53-чувствительных микроРНК, как miR-203 [55], mir-129 [92], miR-34a, miR-34b и miR-34c [73]. Все они имеют онкосупрессорные свойства и взаимодействуют с мРНК-мишенями, важными для лимфомагенеза. При этом механизмы нарушения их экспрессии, их клиническое значение и ценность в качестве терапевтических мишеней нуждаются в уточнении.

Метилирование генов *MIR-203* и *MIR-129-2* при ДВККЛ было изучено ранее на смешанных группах пациентов с неходжкинскими лимфомами, которые представляют собой биологически и генетически гетерогенную группу заболеваний. Каждое из исследований включало лишь несколько больных ДВККЛ (2 и 15 соответственно) [55, 92]. Для уточнения частоты встречаемости метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2* при ДВККЛ необходимо проведение анализа на большей группе образцов.

Во всех опубликованных работах в качестве контроля использовалась периферическая кровь доноров или нормальный костный мозг, но не ткань лимфатических узлов. Следовательно, неизвестен статус метилирования генов p53-чувствительных микроРНК *miR-203*, *miR-129*, *miR-34a*, *miR-34b*, *miR-34c*, в лимфоидной ткани больных реактивными лимфаденопатиями.

Смешанный состав и небольшой размер выборки в проведенных ранее исследованиях затруднял идентификацию клинической значимости метилирования *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* при лимфомах [81]. Оценка частоты и ассоциации метилирования изучаемых генов онкосупрессорных микроРНК с клиническими параметрами позволит охарактеризовать их ценность в качестве биологических маркеров и молекулярных терапевтических мишеней при ДВККЛ [60]. До настоящего времени было неясно, является ли метилирование отдельных генов микроРНК при лимфомах комбинированным явлением, или это независимые события.

Одновременный анализ метилирования генов микроРНК семейства *miR34*, *MIR-203* и *MIR-129-2* и аббераций в главном онкосупрессорном гене *TP53* на единой крупной выборке образцов пациентов с ДВККЛ ранее не выполнялся. Кроме того, остается неясным, встречается ли метилирование генов изучаемых микроРНК, чувствительных к p53, в сочетании с мутациями в гене *TP53* при лимфомах и насколько оно опухоль-специфично.

Цель исследования

В опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой изучить частоту, сочетанность и клиническое значение метилирования генов микроРНК *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C*, а также определить его связь с абберациями в гене *TP53*.

Задачи исследования

1. Проанализировать опухоль-специфичность метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в ткани пораженных лимфоузлов у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.
2. В опухолевой ткани пораженных лимфоузлов у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой определить частоту метилирования *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C*.
3. Выявить ассоциацию метилирования изучаемых генов р53-чувствительных микроРНК с особенностями клинического течения и эффективностью терапии диффузной В-крупноклеточной лимфомы.
4. Установить сочетанность метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* и его связь с функционально-значимыми нарушениями в гене *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.

Научная новизна

Представленная работа является первым в России комплексным исследованием метилирования панели генов р53-чувствительных микроРНК и аббераций в гене *TP53* при ДВККЛ. Впервые показано, что выявляемое в ткани пораженных лимфоузлов больных ДВККЛ метилирование *MIR-129-2* и *MIR-203*, а также генов микроРНК семейства *mir-34* является опухоль-специфичным.

В проведенном исследовании получены данные о выраженной ассоциации метилирования гена *MIR-34A* с группами неблагоприятного прогноза, согласно Международному прогностическому индексу (МПИ), а также сведения о меньшей

частоте достижения ремиссии после первой линии терапии ДВККЛ по протоколу R-CHOP.

Впервые установлена связь метилирования *MIR-34B/C* и *MIR-203* с более высоким уровнем экспрессии Ki-67 в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, а также выявлена большая частота aberrантного метилирования *MIR-34A* в старшей возрастной группе больных лимфомами в отечественной популяции.

Установлена частота метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в опухолевой ткани больных ДВККЛ, впервые показано, что при данной лимфоме статус метилирования анализируемых генов достоверно коррелирует друг с другом. Результаты комплексного анализа установили независимый характер aberrаций в гене *TP53* и метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203*. Впервые доказано, что метилирование изученных генов может быть одним из важных и независимых от мутаций в гене *TP53* механизмов нарушения экспрессии микроРНК miR-203, miR-129, miR-34a, miR-34b и miR-34c при ДВККЛ.

В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что aberrантное метилирование генов p53-чувствительных микроРНК – частое и сочетанное явление при ДВККЛ, которое может быть связано с более агрессивным течением опухоли, обладает дифференциально-диагностической ценностью и потенциально может служить мишенью для разработки препаратов таргетного воздействия при лечении ДВККЛ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в диссертационном исследовании данные уточняют существующие представления о механизмах нарушения функционирования глобальной p53-регуляторной сети при ДВККЛ и, таким образом, расширяют фундаментальные знания о биологии данной опухоли.

Установлено, что метилированный статус *MIR-129-2* и *MIR-203*, а также генов семейства miR-34 потенциально может быть дополнительным биомаркером для дифференциальной диагностики ДВККЛ и реактивных лимфаденопатий.

Метилирование *MIR-34A* в клинической практике может помочь в стратификации пациентов на группы риска неэффективности стандартного лечения ДВККЛ.

Полученные данные свидетельствуют о потенциале дальнейших исследований, направленных на разработку таргетных подходов терапии, способствующих снятию гиперметилирования генов p53-чувствительных микроРНК.

Диссертационное исследование было поддержано Грантом Российского научного фонда № 22-25-000222 в 2022–2023 гг. на тему: «Метилирование генов p53-респонсивных онкосупрессорных микроРНК при неходжкинских лимфомах».

Методология и методы диссертационного исследования

Работа имеет дизайн ретроспективного исследования (2007–2022 гг.). Объект исследования – больные ДВККЛ. Предмет исследования: клинические характеристики, данные лабораторно-инструментальных методов исследования, спектр метилирования панели генов p53-чувствительных микроРНК и aberrации в гене *TP53*.

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с принципами доказательной медицины с применением общенаучных (количественное и качественное описание), общелогических (анализ и синтез), а также статистических методов, соответствующих поставленным цели и задачам.

В работе применялись современные молекулярно-генетические методы исследования: выделение ДНК с применением фенол–хлороформного метода, прямое капиллярное секвенирование по Сенгеру, обработка ДНК бисульфитом натрия, метил-специфичная ПЦР, метил-чувствительный анализ кривых плавления высокого разрешения, ПЦР с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, статистический анализ и биоинформационная обработка полученных данных.

Положения, выносимые на защиту

1. В ткани пораженных лимфоузлов больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой метилирование генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* является опухоль-специфичным, частым, сочетанным и независимым от aberrаций в гене *TP53* явлением.
2. Опухолевый субстрат больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой с метилированием генов *MIR-34B/C* и/или *MIR-203* характеризуется более высоким пролиферативным потенциалом.
3. Выявление метилирования гена *MIR-34A* в опухолевой ткани пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой ассоциировано с неблагоприятным прогнозом, согласно международному прогностическому индексу, и снижением показателей эффективности первой линии терапии по протоколу R-CHOP.

Степень достоверности

Достоверность результатов, полученных в данном диссертационном исследовании, обеспечена обоснованностью исходных теоретических позиций. Дизайн исследования разрабатывался в соответствии с критериями доказательной медицины и включал в себя комплекс клинических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследования, соответствующих цели и задачам работы. Методы статистической обработки полученной информации также соответствовали общепринятым подходам.

Исследование выполнено на одной из самых крупных отечественных выборок больных ДВККЛ, включающей 136 пациентов, что обеспечивает репрезентативный объем клинических наблюдений.

Диагноз ДВККЛ был установлен на основании действующей Классификации опухолей гемопоэтической и лимфоидной ткани Всемирной организации здравоохранения 2022 года. Все биопсийные материалы были подвергнуты иммуногистохимическому исследованию с применением панели моноклональных антител к кластерам дифференцировки опухолевых клеток.

В качестве контроля была сформирована группа со случайной выборкой пациентов ЛОР-отделений городских клинических больниц г. Новосибирска. В нее входили больные с патоморфологически подтвержденной реактивной фолликулярной В-клеточной гиперплазией лимфоузлов.

В диссертационном исследовании применялись методики обследования, стандартизованные для каждого участника. Лабораторно-инструментальные методы проводились с использованием сертифицированных наборов реагентов и приборов. Компьютерные программы для анализа и обработки полученных данных соответствовали актуальной версии. Статистические данные обрабатывались с применением современных методов биоинформационного и статистического анализа и подвергались детальному анализу.

Полученные материалы статистической обработки и первичная документация были проверены и признаны достоверными (протокол № 6 от 19.03.2024).

Апробация работы

Основные материалы диссертационного исследования были представлены и обсуждены на European Human Genetics Conference (Вена, 2022); Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology Conference (Новосибирск, 2022); Внеочередном 12-м Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии им. Н. Н. Трапезникова, посвященном 25-летию АДИОР (Москва, 2021); Российских конференциях с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Москва, 2021, 2023); 6-й Международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» (Санкт-Петербург, 2021); Международной конференции, посвященной Дню ДНК-2019 (Санкт-Петербург, 2019); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии» (Киров, 2021); Российских конкурс-конференциях студентов и молодых ученых «Авиценна» (Новосибирск, 2022, 2023), а также были отмечены стипендией European Human Genetics Conference (Вена, 2022), дипломом Победителя секции «Онкология» Конгресса «Актуальные вопросы функциональной и клинической медицины»

(Томск, 2022) и дипломом «Лучшая научная работа молодого ученого» Российской конкурс-конференции студентов и молодых ученых «Авиценна» (Новосибирск, 2023).

Апробация работы состоялась на заседании проблемной комиссии «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; на заседании межлабораторного семинара в Научно-исследовательском институте терапии и профилактической медицины – филиале ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск, 2024).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России по теме: «Клинико-морфологические, молекулярно-биологические и эпигенетические основы диагностики и лечения заболеваний внутренних органов и коморбидных состояний в терапевтической клинике», номер государственной регистрации 121061700029-5.

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты внедрены в методические пособия и учебный процесс кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППВ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, а также практику отделения гематологии Городского гематологического центра г. Новосибирска ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 2», отделения гематологии ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница» и лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ИЦиГ СО РАН.

Сведения о публикациях

По теме диссертации опубликованы 18 печатных работ, в том числе 8 статей в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 4 статьи в журналах категории К1 и 1 статья в журнале категории К2, входящих в список изданий, распределённых по категориям К1, К2, К3, в том числе 5 статей в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и CA(pt).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 167 страницах машинописного текста, построена по классическому типу и содержит введение, четыре главы (обзор литературы, материал и методы, результаты диссертационного исследования, заключение), выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы и список иллюстративного материала. Список цитируемой литературы представлен 326 источниками, из которых 305 в зарубежных изданиях. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 17 таблицами.

Личный вклад

Автор лично занимался разработкой дизайна исследования, внес личный вклад в постановку цели и формулировку задач исследования, самостоятельно выполнял все этапы работы: анализ данных литературных источников, отбор биологического материала и сбор клинических данных, проведение генотипирования, определение статуса метилирования генов изучаемых микроРНК, спектра мутаций, разрушения сигнала полиаденилирования гена *TP53*, статистическую обработку полученных результатов, обобщение, интерпретацию данных, обсуждение результатов исследования и формулирование выводов. Является соавтором всех печатных работ в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК, Scopus и Web of Science, в которых отражены полученные результаты.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные данные о диффузной В-крупноклеточной лимфоме

За последнее десятилетие было выявлено множество молекулярных изменений в опухолевой ткани ДВККЛ, часть из которых специфичны для В-клеточных лимфом, в то время как другие могут наблюдаться при иных типах злокачественных новообразований. Эти аберрации приводят к изменению функционирования широкого спектра сигнальных путей, отвечающих за пролиферацию, дифференцировку В-клеток, передачу сигналов рецепторов В-клеток, активацию пути NF-κB, апоптоз и эпигенетическую регуляцию.

Установлено, что диффузная В-крупноклеточная лимфома представляет собой высоко гетерогенное лимфоидное новообразование с различными профилями экспрессии генов и генетических изменений, которые приводят к существенным отличиям в клиническом течении и ответе заболевания на терапию.

Дальнейшее изучение молекулярно-генетического профиля лимфомы не только улучшит наше понимание патогенеза заболевания, но и может обеспечить доказательные основы для прогнозирования данного заболевания и разработки новых подходов к его классификации и таргетной терапии. В данной главе будут кратко обобщены имеющиеся современные данные о ДВККЛ.

1.1.1 Краткие сведения об эпидемиологической, морфологической и клинической характеристике диффузной В-крупноклеточной лимфомы

На долю ДВККЛ приходится около 30–40 % всех неходжкинских лимфом, что делает ДВККЛ одним из наиболее распространенных гематологических злокачественных В-клеточных новообразований во многих западных странах [229].

Учитывая, что в формах годовой отчетности по злокачественным новообразованиям в России не предусмотрено рассмотрение отдельных вариантов лимфом, детальная оценка эпидемиологии ДВККЛ в нашей стране затруднена [20].

Согласно зарубежным данным, ежегодно в мире диагностируется более 120 тысяч новых случаев ДВККЛ, в среднем, показатели заболеваемости составляют, 4-5 на 100 000 населения [319]. Средний возраст пациентов – около 60–70 лет, среди заболевших характерно незначительное преобладание мужчин. У детей частота этого варианта В-НХЛ может достигать 8–10 % [7].

Этиология ДВККЛ остается до конца неясной. Показано, что у пожилых лиц риск развития опухоли увеличивается. Он значительно выше у пожилых лиц, пациентов с иммуносупрессией, ожирением и аутоиммунными заболеваниями, а также после воздействия ионизирующего излучения или при инфицировании вирусом гепатита С, вирусом Эпштейна – Барра, вирусом иммунодефицита человека [14, 169].

Морфология лимфомы характеризуется появлением в пораженных тканях диффузных инфильтратов неопластических клеток среднего и большого размера, которые в 80 % случаев имеют вид центробластов. Иммунобластный вариант составляет 8–10 %. При редком анапластическом варианте (3 % случаев) опухолевые клетки отличаются более выраженным полиморфизмом и имеют большие размеры. Иногда опухолевые лимфоциты могут формировать очаговые скопления или быть разбросанными на фоне нормальных зрелых В- или Т-лимфоцитов [319].

Опухоль чаще возникает *de novo*, но может также быть результатом трансформации из лимфомы низкой степени злокачественности (из хронического лимфолейкоза или лимфомы из малых лимфоцитов, фолликулярной лимфомы), а также лимфомы из клеток маргинальной зоны [2].

Поражаться могут практически любые ткани и органы. Клинически у большинства пациентов наблюдается быстрый рост опухоли в пределах лимфатической системы и/или в экстралимфатических участках поражения, которые могут иметь до 40 % больных. Вне лимфатической системы чаще всего

опухолевые поражения обнаруживаются в органах желудочно-кишечного тракта, костном мозге, плевре и центральной нервной системе (ЦНС). Частота вовлечения костного мозга составляет около 10–20 % [221].

Каждый третий больной ДВККЛ имеет В-симптомы, к которым относятся лихорадка выше 38° С, снижение веса, ночные профузные поты. Характерным является также повышение уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и бета-2-микроглобулина в сыворотке крови.

Ниже представлена характеристика поражений при ДВККЛ на различных стадиях в соответствии с классификацией Ann Arbor [2].

Стадия I – поражение одной лимфатической зоны, локализованное поражение одного экстралимфатического органа или ткани в пределах одного сегмента.

Стадия II – поражение двух и более лимфатических зон по одну сторону диафрагмы, локализованное в пределах одного сегмента поражение одного экстралимфатического органа или ткани и его регионарных лимфатических узлов с поражением или без поражения иных лимфатических областей по ту же сторону диафрагмы.

Стадия III – поражение лимфатических узлов или структур по обе стороны диафрагмы, локализованное в пределах одного сегмента нелимфоидного органа или ткани, их регионарных лимфоузлов с распространением в иные лимфатические области с обеих сторон от диафрагмы.

Стадия IV – распространенное (многофокусное) поражение одного или нескольких нелимфоидных органов, с поражением или без поражения лимфоузлов, либо изолированное метастазирование в экстралимфатический орган с поражением отдаленных (не регионарных) лимфатических узлов, с вовлечением печени и/или костного мозга.

В связи с быстро прогрессирующим течением опухоли, часто на момент установления точного диагноза, пациент уже имеет III/IV стадию лимфомы.

1.1.2 Современные подходы к диагностике диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Помимо стандартных лабораторно-инструментальных методов исследования, при первичном обследовании пациента с лимфомой во всех случаях проводится гистологическое исследование биопсийного материала опухолевого очага. Золотым стандартом для определения распространенности опухолевого процесса (стадии) является также гистологическое исследование трепанобиоптата костного мозга.

Иммунофенотипическое подтверждение диагноза ДВККЛ может быть выполнено путем иммуногистохимического исследования либо при использовании проточной цитометрии. Опухолевые клетки при ДВККЛ экспрессируют пан-В-клеточные антигены, такие как CD19, CD20 и CD22, а также факторы транскрипции В-клеток, включая PAX5 и OCT2. Более чем в половине случаев при ДВККЛ встречается положительная реакция на поверхностный или цитоплазматический иммуноглобулин, в большинстве случаев – IgM, реже IgG или IgA. Положительная реакция на CD30 встречается в 10–15 % случаев лимфомы, а 20–25 % образцов являются положительными на PD-L1 и PD-L2 [2, 235].

В связи с тем, что в обычной клинической практике нативная опухолевая ткань для проведения традиционного цитогенетического исследования часто недоступна, для оценки перестроек *BCL6*, *BCL2* и *MYC* в фиксированных и пропитанных парафином тканевых срезах применяется метод FISH. Сочетанное выявление *MYC/BCL2* характерно для double expressor лимфомы (DEL) и свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. Методом FISH так же может определяться двойная (DH) или тройная (TH) перестройка генов *MYC*, *BCL2* и/или *BCL6*, которые являются индикаторами агрессивной ДВККЛ высокой степени злокачественности (HGBL). Такие пациенты плохо отвечают на режим R-CHOP и нуждаются в более интенсивной терапии, например по схеме R-DA-EPOCH

с поправкой на дозу (этопозид, преднизолон, винкристин, циклофосфамид и доксорубицин с ритуксимабом) [2, 7].

Современным инструментом для точного определения стадии лимфомы является ПЭТ-КТ, которая объединяет в себе сканирование с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и рентгеновской компьютерной томографии (КТ), что позволяет проводить функциональную визуализацию пространственного распределения метаболической или биохимической активности в организме, соотнесенную с анатомической локализацией.

Многообещающим методом диагностики при ДВККЛ является циркулирующая внеклеточная ДНК (цДНК), которая непрерывно высвобождается в жидкие среды организма (например, кровь и ликвор) опухолевыми клетками. Этот факт важен для диагностики ДВККЛ с локализацией очагов опухолевого поражения в различных отделах центральной нервной системы (ЦНС). Циркулирующая опухолевая ДНК в спинномозговой жидкости, получаемая при люмбальной пункции, может быть использована, например, для обнаружения мутации *MYD88*p.L265P, частота выявления которой при ДВККЛ ЦНС достигает 85 % [227].

Кроме того, способность опухолевой цДНК обнаруживать ранний рецидив на несколько месяцев раньше клинических проявлений, в настоящее время подтверждена рядом исследовательских групп, в том числе на выборках пациентов, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических клеток, и больных, получающих CART-терапию.

1.1.3 Молекулярные подтипы диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Использование современных методов генетических исследований не только позволило лучше понять молекулярные механизмы, лежащие в основе развития ДВККЛ, но также выявило ряд прогностически различных подгрупп заболевания.

В соответствии с Российскими клиническими рекомендациями по лечению агрессивных нефоликулярных лимфом – диффузной В-крупноклеточной

лимфомы, первичной медиастинальной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта 2020 г. – в практике гематопатолога в настоящее время используется определение двух молекулярных подтипов ДВККЛ с применением трех основных маркеров (CD10, BCL-6 и IRF4/MUM1) в соответствии с алгоритмом Hans: из В-клеток герминальных центров фолликулов (GCB-подтип) и из активированных В-клеток (non-GCB, ABC-like подтип) [2].

Вместе с тем в зарубежной литературе описан ряд других вариантов классификации ДВККЛ с использованием различных молекулярно-генетических подходов. Так, согласно данным анализа полногеномного профилирования экспрессии генов, ДВККЛ можно разделить, по крайней мере, на три разных варианта.

1) GCB подтип (germinal center B-cell), который происходит из клеток зародышевого центра, имеющих морфологию центробластов. Он составляет 40–50 % случаев заболевания и имеет значительно лучшую выживаемость по сравнению с другими подтипами. Случаи GCB-подтипа опухоли чаще имеют аберрации *BCL6*, генов системы метилирования и ацетилирования гистонов (*EZH2*, *EP300*, *CREBBP*, *KMT2D*), генов В-клеточного химинга (*GNA13*, *GNAI2*, *SIPR2*) и сигнальных путей PI3K, JAK/STAT.

2) Прогностически неблагоприятный ABC-подтип (activated B-cell), из активированных В-клеток, имеющих морфологию плазмобластов. Для данного варианта характерна активация BCR/NF-κB сигнального каскада за счет мутаций в генах *MYD88* (20 %), *CD79A/B* (20 %), *CARD11* (10 %) и других.

3) Первичная В-клеточная крупноклеточная лимфома средостения, предположительно возникает из В-клеток тимуса и составляет до 7 % ДВККЛ. Данный вариант наблюдается преимущественно у молодых женщин (средний возраст на момент постановки диагноза 35 лет). В патогенезе заболевания основное значение имеет нарушение регуляции JAK-STAT и NF-κB сигнальных путей, а также амплификация области 9p24.1 [146]. Около 10–30 % ДВККЛ не могут быть отнесены ни к одной из вышеперечисленных подгрупп.

Применение технологий высокопроизводительного секвенирования в изучении лимфом в последние годы еще больше расширило наше понимание молекулярной сложности ДВККЛ. Например, основываясь на данных полноэкзомного секвенирования 304 первичных ДВККЛ, Charu et al. [216] выделили пять вариантов опухоли C1 и C2 внутри ABC-подтипа и C3 и C4 внутри GCB-подтипа. Варианты C1 имели более благоприятное течение и имели мутации *NOTCH2* и транслокации *BCL6*. Варианты C5, напротив, характеризовались агрессивным течением опухоли и имели мутации *MYD88*, *CD79B* и *PIM1*.

Среди C4 варианта ДВККЛ были обнаружены мутации, активирующие RAS/JAK/STAT сигнальный каскад (гены *BRAF*, *STAT3*) и путь передачи сигналов через сигнальный путь BCR/Pi3K (гены *RHOA*, *GNA13* и *SGK1*), а также мутации, обеспечивающие уклонение от иммунного надзора (гены *CD83*, *CD58*, и *CD70*). Вариант C3 характеризовался перестройками *BCL2*, инактивацией *PTEN* и мутациями генов модификации хроматина (*KMT2D*, *CREBBP* и *EZH2*) и факторов транскрипции В-клеток (*MEF2B*, *IRF8*) [263].

Случаи ДВККЛ, отнесенные авторами к варианту C2, характеризовались геномной нестабильностью, двух-аллельной инактивацией *TP53* и потерей функции *CDKN2A* [34].

Похожие результаты показало исследование Schmitz R. et al, основанное на анализе 574 случаев ДВККЛ. С применением секвенирования экзома и транскриптома, анализа числа копий ДНК и таргетного повторного секвенирования, авторами были выявлены гены с рекуррентными абберациями и идентифицированы четыре основных генетических варианта опухоли: MCD (с возникновением сочетанных мутаций *MYD88* p.L265P и *CD79B*), BN2 (с транслокациями *BCL6* и абберациями гена *NOTCH2*), N1 (с мутациями в гене *NOTCH1*) и EZB (мутации *EZH2* и транслокации гена *BCL2*) [113]. Выделенные подтипы имели различный ответ на иммунохимиотерапию, а именно: хорошую выживаемость при вариантах BN2 и EZB и крайне плохие результаты терапии при вариантах MCD и N1.

Особенности микроокружения опухоли в настоящее время считаются еще одним важным аспектом в определении характера течения ДВККЛ [128, 171]. Так, наиболее агрессивные случаи ДВККЛ характеризуются наличием в опухолевой ткани повышенного количества незрелых сосудов [313]. Например, плотность расположения сосудов выше в CD5 (+) по сравнению с CD5 (–) ДВККЛ [89].

Полногеномное профилирование экспрессии изучаемых генов в биопсийных материалах опухолевой ткани ДВККЛ позволило описать два варианта лимфомы по особенностям состава стромы, а именно «стромальный-1» и «стромальной-2», которые с высокой долей вероятности успешно предсказывали выживаемость пациентов, получавших СНОР и R-СНОР терапию. Прогностически благоприятная сигнатура варианта «стромальный-1» свидетельствовала об отложении внеклеточного матрикса и гистиоцитарной инфильтрацию опухоли. Напротив, прогностически неблагоприятная сигнатура варианта «стромальной-2» отражала наличие в опухолевой ткани большого количества кровеносных сосудов опухоли [75].

1.1.4 Подходы к терапии диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Пациенты с ДВККЛ в зависимости от стадии заболевания, согласно Российским клиническим рекомендациям по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний 2018 г., получают 4–6 циклов химио-иммунотерапии [13]. В настоящее время по завершению лечения проводится оценка объема опухолевой массы с помощью ПЭТ-КТ.

Режим СНОР (циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизон) более 40 лет использовался в терапии ДВККЛ вплоть до 2006 года, когда препарат моноклональных анти-CD20 антител ритуксимаб был одобрен для использования в качестве комбинированного лечения пациентов с В-клеточными лимфомами. С этого момента режим R-СНОР стал «золотым стандартом» терапии пациентов с впервые диагностированной ДВККЛ по всему миру [118]. В сравнении

с протоколом CHOP, R-CHOP значительно увеличивает частоту достижения полной ремиссии с минимальным увеличением токсичности [2].

Однако у части больных (до 40 %) наблюдаются неудовлетворительные результаты лечения по протоколу R-CHOP – первично-рефрактерное течение или рецидивы заболевания [269]. Эффективность применения высокодозной полихимиотерапии и последующей аутологичной трансплантацией стволовых гемопоэтических клеток в качестве терапии ДВККЛ первой линии была оценена в нескольких научных исследованиях. Было показано значительное преимущество данного терапевтического подхода в лечении у больных с распространенными стадиями заболевания [303]. Однако высокая токсичность данного подхода значительно ограничивает его применение, особенно у пожилых и соматически ослабленных больных.

В связи с этим продолжается поиск схем лечения ДВККЛ, которые показали бы большую эффективность, чем стандартный протокол R-CHOP, без значительного увеличения частоты развития и тяжести побочных эффектов. Кроме того, ведется разработка новых подходов к прогнозированию ответа лимфомы на терапию и поиск более совершенных таргетных препаратов для лечения первичных пациентов с ДВККЛ и пациентов с рефрактерными и/или рецидивирующими формами заболевания [143].

Ингибиторы тирозинкиназы Брутона способствуют прерыванию патологически активированного сигнального механизма, опосредованного рецептором В-клеток и направленного на пролиферацию и выживание лимфоцитов. Так ибрутиниб продемонстрировал значительную активность при рецидивирующих/рефрактерных случаях ДВККЛ ABC-подтипа [30]. Предполагается, что ингибиторы тирозинкиназы Брутона второго и третьего поколений с более благоприятным профилем токсичности способны улучшить показатели эффективности терапии лимфомы во всех возрастных группах ДВККЛ [141].

Поскольку молекулярные поломки при ДВККЛ приводят к нарушениям в PI3K сигнальном пути, отвечающем за гомеостаз В-клеток и участвующем во

взаимодействии клона лимфомы с микроокружением, большие надежды возлагаются на ингибиторы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). В настоящее время данные об эффективности лечения ДВККЛ препаратами данного класса только накапливаются. Известно, например, что копанлисиб более эффективен при ABC-подтипе ДВККЛ и, возможно, в будущем он будет применяться в лечении этой подгруппы заболевания [272].

Экспортин 1 (XPO1) является одним из восьми ядерно-цитоплазматических челночных белков, участвующих в экспорте белка из ядра в цитоплазму. Его гиперэкспрессия при ДВККЛ коррелирует с плохим прогнозом заболевания [320]. Селинексор – пероральный селективный ингибитор XPO1-опосредованного экспорта в ядре, уже одобрен FDA для лечения прогрессирующей множественной миеломы в комбинации с дексаметазоном, кроме того, демонстрирующий активность при различных лимфопролиферативных заболеваниях [262]. Исследование фазы I продемонстрировало частичный общий ответ на данный препарат в 32 % рецидивирующих/рефрактерных случаях ДВККЛ с частотой полной ремиссии 10 % [87]. Основываясь на результатах исследований, FDA в июне 2020 г. предоставило ускоренное одобрение селинексора для лечения пациентов с рецидивирующими/рефрактерными ДВККЛ у взрослых, по меньшей мере, с двумя неэффективными линиями терапии.

Иммуномодулирующий препарат леналидомид также обладает высокой активностью при рецидивирующих/рефрактерных агрессивных В-клеточных лимфомах [142]. Его безопасность и эффективность в сочетании с R-CHOP показана при нелеченой ДВККЛ [119]. В доклинических исследованиях препарат продемонстрировал противоопухолевую активность как при ABC-, так и при GCB-подтипах лимфомы [253].

Тафаситамаб представляет собой Fc-гуманизированное антитело против CD19. Данный препарат в комбинации с леналидомидом был одобрен FDA для лечения пациентов с рецидивирующей/рефрактерной ДВККЛ, не подходящих для трансплантации аутологичных стволовых клеток.

Конъюгаты антител с лекарственным препаратом способны с высокой специфичностью доставлять терапевтические агенты к опухолевым клеткам. Так, полатузумаб ведотин является одобренным иммуноконъюгатом, нацеленным на CD79b опухолевых клеток. После связывания с мишенью, полатузумаб интернализуется и расщепляется лизосомальными протеазами клетки с высвобождением лекарственного вещества, которое связывается с микротрубочками, препятствует делению клеток и приводит к апоптозу. За рубежом препарат используется для рецидивирующей/рефрактерной ДВККЛ, не подходящей для трансплантации аутологичных стволовых клеток, в комбинации с анти-CD20 (ритуксимаб или обинутумаб) и бендамустином на основании результатов исследования фазы Ib/II [243, 244]. В Российской Федерации данный препарат уже одобрен в качестве 1-й линии терапии взрослых пациентов с ДВККЛ, ранее не получавших лечение.

Активно разрабатывается клеточная терапия ДВККЛ с применением моноспецифических или биспецифических CAR-T-клеток, которая стала возможна благодаря развитию технологии, позволяющей переносить химерные антигенные рецепторы (CAR) в Т-клетки [88]. CAR представляет собой трансмембранный белок, состоящий из трех частей: одноцепочечного вариабельного фрагмента иммуноглобулина (scFv), нацеленного на выбранный антиген; трансмембранного шарнира; внутриклеточного сигнального домена, включающего костимулирующие молекулы. Благодаря своей структуре, такой рецептор обладает преимуществами: он полностью независим от презентации антигенов опухоли через HLA, а костимулирующие молекулы улучшают пролиферацию Т-клеток и выработку ими цитокинов. Основные проблемы безопасности CAR-T-клеток связаны с быстрой экспансией Т-клеток и последующим цитокиновым штормом [27, 28, 57].

Следует отметить и ограничения данного подхода. Не все пациенты с ДВККЛ отвечают на терапию CAR-T-клетками, а у ряда больных возникает рецидив после первоначального ответа. Среди известных механизмов ускользания от CAR-T-терапии описана потеря экспрессии антигена-мишени CD19 [280].

Одним из очевидных способов преодоления проблемы потери антигена после терапии CAR-T-клетками является нацеливание на более чем один антиген.

В то время как моноспецифические CAR-T-клетки уже доступны для клинической практики, имеются лишь доклинические данные в поддержку использования двойного нацеливания CAR-T-терапии при злокачественных новообразованиях В-клеток [166, 239].

1.1.5 Факторы прогноза диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Добавление ритуксимаба к схеме СНОР потребовало пересмотра установленных ранее прогностических факторов. Появление новых препаратов для лечения пациентов с ДВККЛ подчеркивает необходимость установления их прогностической значимости для пациентов, получавших современные терапевтические методы.

Международный прогностический индекс (МПИ) многие годы является наиболее надежным клиническим прогностическим инструментом для пациентов с ДВККЛ. При его расчете каждому фактору риска (возраст пациентов более 60 лет, поздняя (III/IV стадия) заболевания, повышенный уровень ЛДГ в сыворотке крови, общесоматический статус ECOG ≥ 2 , наличие 1 и более экстранодальных очагов поражения) присваивается по одному баллу. Сумма полученных баллов соответствует следующим группам риска: низкий риск (0–1 балл, 5-летняя выживаемость 73 %), промежуточный/низкий риск (2 балла, 5-летняя выживаемость 51 %), промежуточный/высокий риск (3 балла, 5-летняя выживаемость 43 %), высокий риск (4–5 баллов, 5-летняя выживаемость 26 %) [2].

В целях оценки индивидуального риска раннего прогрессирования используется скорректированный по возрасту международный прогностический индекс aaIPI (у пациентов ≤ 60 лет), который включает по одному баллу за III-IV стадию, повышение ЛДГ, общесоматический статус ECOG ≥ 2 и, соответственно, имеет также 4 группы риска: 0 факторов – низкий риск (5-летняя выживаемость 82 %), 1 фактор – низкий/промежуточный риск (5-летняя

выживаемость 69 %), 2 фактора – высокий/промежуточный риск (5-летняя выживаемость 45 %), 3 фактора – высокий риск (5-летняя выживаемость 32 %).

Однако даже среди пациентов, входящих в одну и ту же группу риска по МПИ, существует высокая вариабельность результатов стандартного лечения [148]. Это является отражением генетической и молекулярной гетерогенности ДВККЛ, упомянутой ранее. Многие исследования в настоящее время сосредоточены на выявлении биомаркеров, которые могли бы служить объяснением значительной гетерогенности лимфомы и уточнить имеющиеся подходы к прогнозированию течения и ответа на терапию ДВККЛ [137].

Идентифицированные в последние годы биомаркеры, ассоциированные с особенностями клинического течения и частотой ответа на терапию ДВККЛ, могут быть отнесены к различным классам клеточных молекул, таким как белки внутриклеточных сигнальных каскадов, регуляторы транскрипции, контролирующие клеточный цикл белки, регуляторы репарации ДНК/РНК, а также иммунные сигнальные молекулы и др. [140].

Так, до 12 % случаев ДВККЛ относятся к группе double-hit (с двойным ударом) или triple-hit (с тройным ударом) лимфом, которые считаются наиболее агрессивными и прогностически неблагоприятными вариантами опухоли. Их морфология варьирует от плеоморфных крупных до средних клеток (морфологически сходных с лимфомой Беркитта). В данных случаях обязательным для постановки окончательного диагноза считается анализ методом FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*), который позволяет выявить перестройку гена *MYC* в ассоциации с перестройками генов *BCL2* и/или *BCL6* [275]. В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности (HGBL) включает случаи с неопластическими В-клетками, имеющими бластоидную морфологию, либо гистопатологические промежуточные признаки между ДВККЛ и лимфомой Беркитта, которые не связаны с ДН/ТН соответствующих генов. Кроме того, данные подтипы В-клеточных крупноклеточных лимфом (HGBL ДН/ТН и HGBL неспецифицированная) представляют собой отдельные варианты заболевания и, в соответствии с международными классификациями, требуют

выделения в отдельный класс, что также оказывает влияние на выбор алгоритма терапии для данной группы пациентов [4].

Известно, что экспрессия CD5, наблюдаемая в 10 % случаев ДВККЛ, обычно ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и часто связана с такими неблагоприятными клиническими прогностическими характеристиками, как пожилой возраст, экстранодальные поражения и поздние стадии заболевания [62, 89].

Гиперэкспрессия ядерного антигена и маркера пролиферативной активности клетки Ki-67 при ДВККЛ сильно варьирует (от 20 до 80 %) и иногда достигает 100 %, что коррелирует с более низкими показателями общей (ОВ) и бессобытийной (БСВ) выживаемости и неблагоприятным прогнозом у пациентов, получающих R-СНОР [99, 151].

Экспрессия трансмембранного гликопротеина CD43 у пациентов с ДВККЛ может наблюдаться в каждом пятом случае заболевания и связана с более низкой частотой достижения полного ответа, ухудшением показателей ОВ и БСВ [50, 51].

До четверти пациентов с ДВККЛ имеет мутации в гене *TP53*, ассоциированные с резистентностью к стандартной и противорецидивной терапии. Эта группа больных представляет собой наиболее сложную клиническую проблему и крайне неблагоприятные показатели выживаемости [222].

1.2 Значение p53-чувствительных микроРНК

Накапливаются данные о том, что не все мутации *TP53* приводят к одинаковым клиническим последствиям, в то же время при отсутствии мутаций в данном гене, может наблюдаться резистентность лимфомы к терапии. В связи с этим актуальным направлением изучения ДВККЛ является поиск механизмов резистентности лимфомы к терапии, опосредованных нарушениями в других участниках сигнальной цепи p53.

Противоопухолевые эффекты *TP53* во многом опосредуются за счет микроРНК, экспрессию которых он индуцирует или ингибирует на уровне

транскрипции или регулирует на посттранскрипционном уровне путем влияния на процессинг данных молекул. Изучение p53-чувствительных микроРНК может создать перспективы разработки таргетных препаратов, направленных на сигнальные пути p53 и преодоление резистентности многих злокачественных опухолей. Предполагается, что нарушение уровня микроРНК, связанных с нижележащими сигнальными путями p53, является потенциально полезным молекулярным биомаркером в диагностике и прогнозе течения опухолей [24].

1.2.1 Краткие сведения о гене *TP53* и белке p53

В локусе 17p13.1 располагается ген *TP53*, кодирующий белок p53 длиной 393 аминокислоты. Канонический мРНК транскрипт имеет длину 2 586 п. н., и состоит из одиннадцати экзонов и 3'- и 5'-нетранслируемых областей (UTR). Кодируемый геном *TP53* белок p53 является ключевым участником молекулярной сети поддержания постоянства генома, которая контролирует регуляцию клеточного цикла, апоптоз и репарацию ДНК. Его активация приводит к усилению генов, участвующих во внутреннем (*PUMA*, *BAX*) и внешнем (*TNFRSF10B*, *FAS*) путях апоптоза, следовательно, *TP53* считается геном-супрессором опухолей [231].

После экспериментальной демонстрации способности p53 ингибировать опухолевый рост и онкогенную трансформацию в культурах клеток, он был отнесен к числу главных онкосупрессорных молекул [314].

Одновременно с этим было показано, что соматические мутации *TP53* часто идентифицируются в опухолях, а мутации *TP53* зародышевой линии ответственны за развитие синдрома Ли – Фраумени – наследственного синдрома предрасположенности к раку [285].

Опухолевые клетки со сниженной функцией или лишенные функционально активного p53 имеют выраженную генетическую нестабильность. В норме белок p53 способствует постоянному удалению из организма клеток с высоким уровнем

онкогенного потенциала путем индукции различных форм клеточной смерти или старения, что, в конечном итоге, ограничивает развитие опухоли [276].

Белок p53 также может индуцировать обратимую остановку клеточного цикла, позволяя клеткам возобновить пролиферацию после устранения повреждения ДНК и купирования негенотоксического стрессового воздействия [132]. Опухолевые клетки при многих типах опухолей экспрессируют высокие уровни мутантного белка p53, который является результатом точечных замен в последовательности гена [172].

В белке p53 различают различные функциональные домены, в том числе N-концевой домен трансаактивации (аминокислоты 1–61, TAD), центральный домен для связывания с p53-зависимыми ДНК (аминокислоты 94–290, DBD), домен олигомеризации (аминокислоты 325–356, OD) и C-концевой домен (аминокислоты 357–393, CTD). В то время как домен трансаактивации взаимодействует с компонентами системы транскрипции, домены олигомеризации и связывания с ДНК необходимы для образования функционального тетрамера белка, который взаимодействует со специфическими последовательностями – мишенями ДНК, называемыми p53-чувствительными элементами. Последние состоят из двух вырожденных декамерных последовательностей [Pu (Пурин)-Pu-Pu-C-A/T-AT-G-Py (Пиримидин)-Py-Py], разделенных переменной нуклеотидной последовательностью [120].

Недавно были описаны различные изоформы белка p53, возникающие в результате использования альтернативных промоторов и сайтов сплайсинга или альтернативных сайтов инициации трансляции [39].

В первую очередь p53 является фактором транскрипции, который может индуцироваться эндогенными и экзогенными стрессами (например, онкогенами и ультрафиолетовым излучением). Эти стрессы активируют сигналы, которые действуют посредством посттрансляционных модификаций белка (например, фосфорилирования, ацетилирования) и вызывают высвобождение p53 от связи с белком MDM2, способствующим его деградации. В конечном итоге все это приводит к активации p53 [277]. Затем белок p53 может проникать в ядро, где он

индуцирует экспрессию множества целевых генов [232]. Однако все больше наблюдений сообщают о целом ряде «нетранскрипционных функций» p53, которые также могут способствовать подавлению активности опухолевого роста [132].

1.2.2 Характеристика мутаций в гене *TP53*

В отличие от других онкосупрессоров, ген *TP53*, в основном, повреждается за счет миссенс-мутаций, в подавляющем числе случаев расположенных в домене, предназначенном для связывания белка p53 с ДНК. В пределах этого региона восемь аминокислотных замен (т. е. p.R175H, p.G245S, p.R248Q, p.R248W, p.R249S, p.R273H, p.R273S и p.R282W), называемых мутациями «горячих» точек, составляют около 27 % всех мутантных вариантов, идентифицированных при опухолях человека. Однако спектр миссенс-мутаций чрезвычайно широк и варьирует в зависимости от различных типов опухолей [245].

Мутантные белки p53, в основном, могут быть классифицированы как «контактные» или «структурные», в зависимости от того, была ли замещенная аминокислота непосредственно вовлечена во взаимодействие с ДНК (например, R273H) или оказала влияние на структуру белка (например, p.R175H) [286].

За последние 25 лет было получено большое количество экспериментальных данных о функциональном эффекте различных мутаций *TP53*. Одной из наиболее популярных эукариотических моделей для исследования функционального эффекта аминокислотных замен в p53 является *S. cerevisiae*. На ее основе была проверена функциональность более 2 000 различных мутантных форм данного белка [26]. Эта работа, наряду с работами других авторов, привела к появлению новой классификации мутаций *TP53* на основе их влияния на функцию p53 [218].

По функциональному эффекту мутации p53 можно разделить на следующие категории:

- 1) мутации, приводящие к потере функции белка;

- 2) мутации, приводящие к синтезу белка с частичной функциональной активностью и/или чувствительностью к температуре;
- 3) супер-трансактивирующие мутации;
- 4) мутации, приводящие к появлению белка с измененной специфичностью (т. е. активного или частично активного на одних мишенях, но неактивного на других);
- 5) доминантно-отрицательные мутации, когда мутантный белок способен ингибировать белок дикого типа.

Другой подход к классификации мутаций *TP53* предусматривает появление мутантных белков p53, которые могут быть классифицированы также как мутации, приводящие к приобретению новых онкогенных активностей, не присущих белку дикого типа. Последнее свойство базируется на способности мутантного белка p53 взаимодействовать с нетипичными транскрипционными факторами или с комплексами, модифицирующими хроматин, что изменяет транскрипционный профиль клетки [241].

TP53, ген, кодирующий белок p53, который является одним из важнейших регуляторов клеточного цикла от рождения до смерти клетки, и одновременно считается наиболее часто мутирующим геном при раке человека. При злокачественных новообразованиях человека практически в половине всех случаев имеют место абберрации в двух аллелях гена *TP53*. Их частота может колебаться в зависимости от типа опухоли: от 10 % при злокачественных новообразованиях кроветворной системы до 50–70 % при карциномах головы, шеи, яичников, а также колоректальном раке [290]. Мутации *TP53* могут возникать в соматических или зародышевых клетках. У лиц, которые наследуют мутантный аллель *TP53*, развивается синдром Ли – Фраумени, который характеризуется ранним возникновением различных злокачественных новообразований, быстрым их прогрессированием и практически 100 % летальностью [285].

К основным функциям p53, кроме контроля клеточного цикла, апоптоза и репарации ДНК, относятся подавление развития опухоли, путем регуляции

метаболических процессов, дифференцировки, антиоксидантной защиты и противоопухолевого иммунного надзора [126]. Все эти эффекты реализуются через регуляцию белком p53 экспрессии генов-мишеней, главным образом, путем прямого связывания со специфическими последовательностями ДНК, называемыми p53-чувствительными элементами, расположенными в промоторах-мишенях.

Несмотря на то, что нетранслируемые области не несут информации о последовательности белка, они относятся к высококонсервативным участкам генов [284]. Аберрации в данных областях *TP53* могут иметь прямой биологический эффект на дифференцировку В-клеток и приводить к лимфомогенезу [256]. По данным литературных источников, мутации в 3'-НТП гена *TP53* часто наблюдаются при новообразованиях. Одна из них – rs78378222 – приводит к изменению нормальной сигнальной последовательности полиаденилирования и может считаться одной из возможных причин, провоцирующих развитие разных типов злокачественных новообразований [305].

Вариант нуклеотидной последовательности rs78378222 в популяции подвергается отрицательному естественному отбору за счет развития опухолей. По данным полногеномных ассоциативных исследований данный вариант является фактором риска развития рака предстательной железы и пищевода, глиомы, базальноклеточной карциномы и колоректальной аденомы. Аллель, связанный с риском, представляет собой замену А на С, в результате чего сигнал альтернативного полиаденилирования (ААТАСА) заменяет сигнал канонического полиаденилирования (ААТААА). В экспериментах *in vitro* установлено, что аллель С rs78378222 приводит к значимому снижению уровня м-РНК *TP53* и p53, а также снижению уровня апоптоза под действием генотоксических факторов в сравнении с аллелем А [96, 299].

1.2.3 Номенклатура и биогенез микроРНК

МикроРНК представляют собой класс небольших эндогенных некодирующих РНК длиной 21–25 нуклеотидов, которые имеют высококонсервативные последовательности и являются негативными регуляторами экспрессии генов у млекопитающих. По данным оценок с привлечением биоинформационных методов микроРНК могут участвовать в регуляции экспрессии более 90 % белок-кодирующих генов [191].

Номенклатура микроРНК имеет свои особенности, и со временем она все больше детализуется и уточняется. Так, например, частица «miR» свидетельствует о том, что описываемая последовательность является молекулой-предшественницей, в то время как частица «miR» обозначает уже зрелые микроРНК. Полностью идентичным или с высокой степенью гомологии микроРНК присваивается один и тот же номер с добавлением букв или цифр. Поэтому первое число в названии – это номер семейства, который присваивался по мере его открытия и описания. К последовательностям, отличающимся по нескольким нуклеотидам, добавляются буквы (a, b, c и т. д.), а к идентичным последовательностям, закодированным в различных регионах генома, добавляются цифры (1, 2, 3 и т. д.) [180].

В соответствии с выполняемыми функциями, микроРНК могут быть отнесены к классу онкосупрессоров или проонкогенов [43]. Уровень экспрессии первых в процессе неопластической трансформации клетки может снижаться, уровень вторых, соответственно, повышаться. Хорошо изучены микроРНК с онкогенным потенциалом – miR-17–92. Примером онкосупрессорных микроРНК являются молекулы кластера miR-34 [53].

Гены микроРНК могут располагаться группами и транскрибироваться полицистроны. Зрелые молекулы образуются в результате последовательного созревания (процессинга). Транскрибируемая на первом этапе длинная (около 200 п. н.) при-микроРНК (pri-microRNA) под действием комплекса белков с участием ядерной РНКазы III Drosha укорачивается до пре-микроРНК

(pre-microRNA) длиной около 60–70 п. н. Белком экспортином-5 последняя из ядра доставляется в цитоплазму. Там с помощью фермента Dicer она укорачивается до 20–25 п. н. и превращается в зрелую двухцепочечную микроРНК. После разрезания «доминирующая» 5'-цепь при помощи белка Ago (Argonaute) включается в состав РНК-индуцируемого комплекса выключения гена RISC (RNA-induced silencing complex), в то время как 3'-цепь чаще всего разрушается.

В составе комплекса RISC микроРНК могут связываться с комплементарными им MRE (microRNA response elements) на 3'-нетранслируемой области м-РНК генов-мишеней и вызывать их деградацию или репрессию трансляции. Так, комплекс RISC может нарушать начало трансляции, замедлять элонгацию аминокислотной цепи, вызывать быстрое отделение рибосомы или протеолиз образующегося белка [177].

Последовательность микроРНК со 2-го по 8-й нуклеотид называют «ключевой», поскольку именно она важна для комплементарного распознавания мишени. Полная или частичная комплементарность между 3'-нетранслируемой области м-РНК и ключевой последовательностью микроРНК делает возможным посадку комплекса RISC. Следует отметить, что мутации и однонуклеотидный полиморфизм в 3'-нетранслируемых последовательностях генов-мишеней могут нарушать взаимодействие с микроРНК [22].

Показано, что некоторые микроРНК работают как буферы случайных изменений экспрессии, возникающих из-за стохастических событий в транскрипции, трансляции и стабильности белка [129]. Эволюционно старые и наиболее консервативные микроРНК экспрессируются на более высоких уровнях, а изменения в их экспрессии с большей вероятностью приведут к патологическим фенотипам [64].

Идентификация мишеней микроРНК и их регуляторных петель в настоящее время остается одной из самых важных задач в клеточной биологии, поскольку они могут быть контекстно-зависимыми, то есть различаться в клетках различного типа [153].

1.2.4 МикроРНК и онкогенез

Роль микроРНК в развитии опухолей в последние десятилетия активно изучается, поскольку они участвуют практически во всех клеточных процессах, которые модулируют злокачественную трансформацию клеток, включая, но не ограничиваясь, контроль клеточного цикла, ответ на повреждение ДНК, дифференцировку, пролиферацию, апоптоз, старение, обмен веществ и метастазирование [35, 123]. Получены данные, свидетельствующие о том, что микроРНК не только действуют как внутриклеточные мессенджеры, но также могут секретироваться вне клетки и циркулировать в крови как часть апоптотических тел, микровезикул и экзосом [103, 106, 295].

Известно, что точная регуляция содержания микроРНК в гемопоэтических клетках необходима для правильного протекания процессов кроветворения. Так, например, существуют белки, участвующие в гемопоэзе (такие как PUM1, PTEN, MYB и другие), дозировка экспрессии которых должна очень четко регулироваться в клетке с помощью микроРНК, а ее нарушение приводит к различным патологическим состояниям, в том числе, развитию злокачественных новообразований [220].

МикроРНК имеют важнейшую регуляторную функцию и в работе иммунной системы, начиная от поддержания пула стволовых клеток и заканчивая созреванием и функционированием Т- и В-лимфоцитов. Они не только влияют на направление развития клетки, но также могут играть более тонкую роль в придании клетке устойчивости или чувствительности к важнейшим биологическим процессам – апоптозу, пролиферации, дифференцировке и т. д. [211].

Участие микроРНК в лимфоогенезе подтверждено в моделях на трансгенных мышах. Аберрантная экспрессия микроРНК не только приводит к развитию лимфопролиферативных заболеваний, но и способствует увеличению темпов их опухолевой прогрессии. Впервые значение дерегуляции микроРНК в биологии гемобластозов получило оценку, когда было показано, что в локусе

13q14, который часто подвергается делеции при хроническом лимфолейкозе, расположены гены онкосупрессорных микроРНК miR-15a и miR-16-1 [125].

В настоящее время аберрантная экспрессия микроРНК описана при различных вариантах неходжкинских лимфом, в том числе, при ДВККЛ. Так, например, показано повышение экспрессии онкогенных микроРНК miR-17-92b при хроническом лимфоцитарном лейкозе/лимфоме из малых лимфоцитов и miR-21 при лимфоме с поражением MALT-ткани, а также снижение экспрессии онкосупрессорных miR-34a при MALT-лимфоме желудка, miR-150 при фолликулярной лимфоме и miR-29 при множественной миеломе [125, 201, 205, 236, 247, 289].

Сравнение экспрессии микроРНК в опухолевой ткани больных ДВККЛ и нормальной лимфоидной ткани выявили наибольшее снижение miR-10a, miR-95, miR-99a, miR-139, miR-143, miR-145, miR-149, miR-150, miR-151, miR-320, miR-328, let-7e и повышение уровня miR-17, miR-106a, miR-155 и miR-210 в лимфомных клетках [317]. Показана возможность разделения ДВККЛ на подгруппы герминального и негерминального происхождения на основе спектра экспрессии микроРНК [247, 288].

1.2.5 Механизмы дерегуляции уровней микроРНК

Исследования по профилированию экспрессии генов и биоинформационный анализ показывают, что дерегуляция микроРНК является распространенным событием при новообразованиях. Опухоль имеет свой, отличный от нормальных клеток, спектр экспрессии данных молекул [83], а аберрантная экспрессия микроРНК может возникать посредством ряда различных механизмов.

Одной из причин дерегуляции уровня микроРНК при злокачественных новообразованиях являются хромосомные аномалии, такие как делеции, амплификации, транслокации и т. д. Анализ *in silico* показал, что значительная часть микроРНК картирована в хрупких участках хромосом или геномных областях, часто

вовлекающихся при опухолевом росте в хромосомные aberrации [48]. Так, по данным результатов с применением метода сравнительной геномной гибридизации во многих опухолевых образцах уровни микроРНК коррелируют с изменениями числа копий, кодирующих их генов [34, 37, 133, 279].

Многие онкогены или опухолевые супрессоры являются факторами транскрипции, влияющими на экспрессию микроРНК тканеспецифическим образом и в зависимости от уровня дифференцировки клетки [178].

Помимо скорости транскрипции при-микроРНК, экспрессия микроРНК определяется эффективностью процессинга ее предшественников и стабильностью зрелой молекулы [46, 214, 121, 256, 267]. Так, несколько микроРНК одного кластера обычно процессируются из общей при-микроРНК, однако уровни зрелых микроРНК не обязательно скоординированы [167, 193], а сравнение микрочипов данных экспрессии мРНК и микроРНК показало, что уменьшение уровня онкосупрессорных микроРНК при раке плохо коррелирует со снижением экспрессии «гена-хозяина» [157].

Известно, что экспрессия и функция генов, кодирующих белки, нарушается из-за точечных мутаций. Теоретически тот же механизм активации/инактивации может работать и в отношении микроРНК. Тем не менее, изменение в последовательности зрелой микроРНК считается очень редким событием [33, 170]. Предположительно, это связано с небольшим размером молекулы. Кроме того, считается, что микроРНК более толерантны к точечным мутациям или к мутации типа вставка/делеция одного нуклеотида, чем гены, кодирующие белок. Напротив, большее значение в развитии опухоли придается изменениям последовательностей сайтов MRE м-РНК мишеней [108]. Считается, что именно они в большей мере влияют на взаимодействие микроРНК с мРНК и вовлечены в фенотип болезней [59, 63, 321].

Эпигенетические факторы могут оказывать влияние на экспрессию микроРНК. Нарушение гомеостаза метилирования ДНК – центральное звено в эволюции опухолей. Основной чертой генома злокачественной клетки является его глобальное деметилирование, приводящее к генетической нестабильности.

С другой стороны, при опухолях происходит аномальное гиперметилование ДНК в промоторных регионах генов-онкосупрессоров [80], причем такое патологическое метилирование является ранним событием в эволюции опухолей и способствует дальнейшей прогрессии заболевания [84].

Метилирование ДНК включает добавление метильной группы к 5-му атому углерода цитозинового кольца в динуклеотиде CpG, превращение цитозина в метилцитозин осуществляет фермент ДНК-метилтрансфераза [42]. Однако процесс этот потенциально обратим. В экспериментах получено восстановление экспрессии метилированных генов при воздействии на клетки таких препаратов, как деметилирующие агенты [23] и ингибиторы амингистондеацетилазы [130], а также в случаях появления в них мутаций в генах ДНК-метилтрансфераз [134].

Поскольку большинство кодирующих микроРНК генов обнаружено в CpG-богатых регионах, было высказано предположение, что метилирование ДНК может иметь важное значение в нарушении их транскрипции [42]. Позднее было показано, что промоторы генов микроРНК подвергаются метилированию в пять-десять раз чаще, чем промоторы белок-кодирующих генов, и их патологическое метилирование – один из наиболее значимых механизмов снижения экспрессии микроРНК при опухолях [164, 287, 323, 301]. Многие гены микроРНК находятся в интронах белок-кодирующих генов, и, следовательно, изначально экспрессия микроРНК зависит от уровня транскрипции «гена-хозяина». Однако часть из внутригенных, а также межгенно-расположенных микроРНК имеют свои собственные промоторы и CpG-островки [65].

В настоящее время выявлено около 200 генов микроРНК, которые регулируются путем метилирования ДНК при множестве типов неоплазий [250]. Было показано, что 45,5 % этих генов патологически метилированы, по меньшей мере при двух типах онкологических нозологий. Так, например, гиперметилование генов *MIR-34B*, *MIR-34C* и *MIR-34A* было показано в 24, 21 и 17 видах злокачественных новообразований соответственно. Снижение экспрессии других онкосупрессорных микроРНК, таких как *miR-203*, *miR-124-1* и *miR-129-2* при опухолях, в том числе системы крови, также происходит путем

метиляции. Ряд микроРНК считаются специфично метилированными при отдельных типах рака, однако, предполагается, что этот феномен отчасти связан с малой изученностью вопроса и может измениться при исследовании метилирования этих генов при расширенном спектре опухолей [68].

Предполагается, что метилирование генов микроРНК при опухолях – потенциально полезный молекулярный биомаркер как в диагностике, так и в прогнозе опухоли и разработке стратегии таргетной терапии злокачественных новообразований [322].

1.2.6 Механизмы регуляции экспрессии микроРНК белком p53

В физиологических условиях через микроРНК опосредуются противоопухолевые эффекты белка p53. Так реализация ответа на генотоксический клеточный стресс во многом осуществляется за счет изменения спектра экспрессии p53-чувствительных микроРНК, а именно: активации онкосупрессорных и подавления онкогенных молекул, что возможно как напрямую через транскрипционно-зависимые механизмы, так и косвенно.

Важно отметить, что вариабельность картины экспрессии p53-регулируемых микроРНК и их генов-мишеней зависит от типа клеток, природы стресса и причины повреждения ДНК. При этом регулируемые p53 микроРНК вовлечены в комплекс обратных и прямых петель связей с p53, что способствует совместному контролю, усилению и настройке сигналов в ответ на стресс [172].

Так, в генах ряда онкосупрессорных микроРНК, например, let-7, miR-16-2, miR-29b, miR-34a, miR-34b/c, miR-107, miR-145 и других, были выявлены p53-чувствительные элементы, связываясь с которыми, данный белок индуцирует их транскрипцию [163, 264]. Экспрессия других микроРНК, таких как miR-107, miR-122, miR-182, miR-200, miR-205, miR-605 и miR-1204, также потенциально может регулироваться за счет прямого связывания p53 с промоторами

соответствующих генов, однако необходимы экспериментальные подтверждения такого взаимодействия [234, 264].

Помимо прямой регуляции транскрипции возможно участие белка p53 в регуляции экспрессии микроРНК на посттранскрипционном уровне путем влияния на процессинг данных молекул, механизм которых приведен на рисунке 1. Показано, например, что p53 усиливает посттранскрипционный процессинг онкосупрессорных микроРНК miR-16-1, miR-143, miR-145 и других в ответ на повреждение ДНК как на уровне связывания с белковым комплексом с Drosha, так и на уровне связывания с белковым комплексом Dicer [97].

Большинство мутаций в гене *TP53*, ответственном за синтез p53, при злокачественных новообразованиях человека находятся в ДНК-связывающем домене, который имеет ряд функций. Давно известно, что ДНК-связывающий домен белка p53 не только контактирует с ДНК и позволяет активировать гены-мишени (включая гены микроРНК) для индуцирования апоптоза или остановки клеточного цикла, но и стимулирует запуск программируемой клеточной смерти через взаимодействие с белками семейства BCL2 в митохондриях [281].

В экспериментах на мышах были получены убедительные доказательства того, что некоторые мутантные варианты p53 не просто утрачивают нормальные онкосупрессорные функции белка, но и приобретают стимулирующие опухолевый рост активности, например, путем изменения спектра регулируемых p53 генов [66].

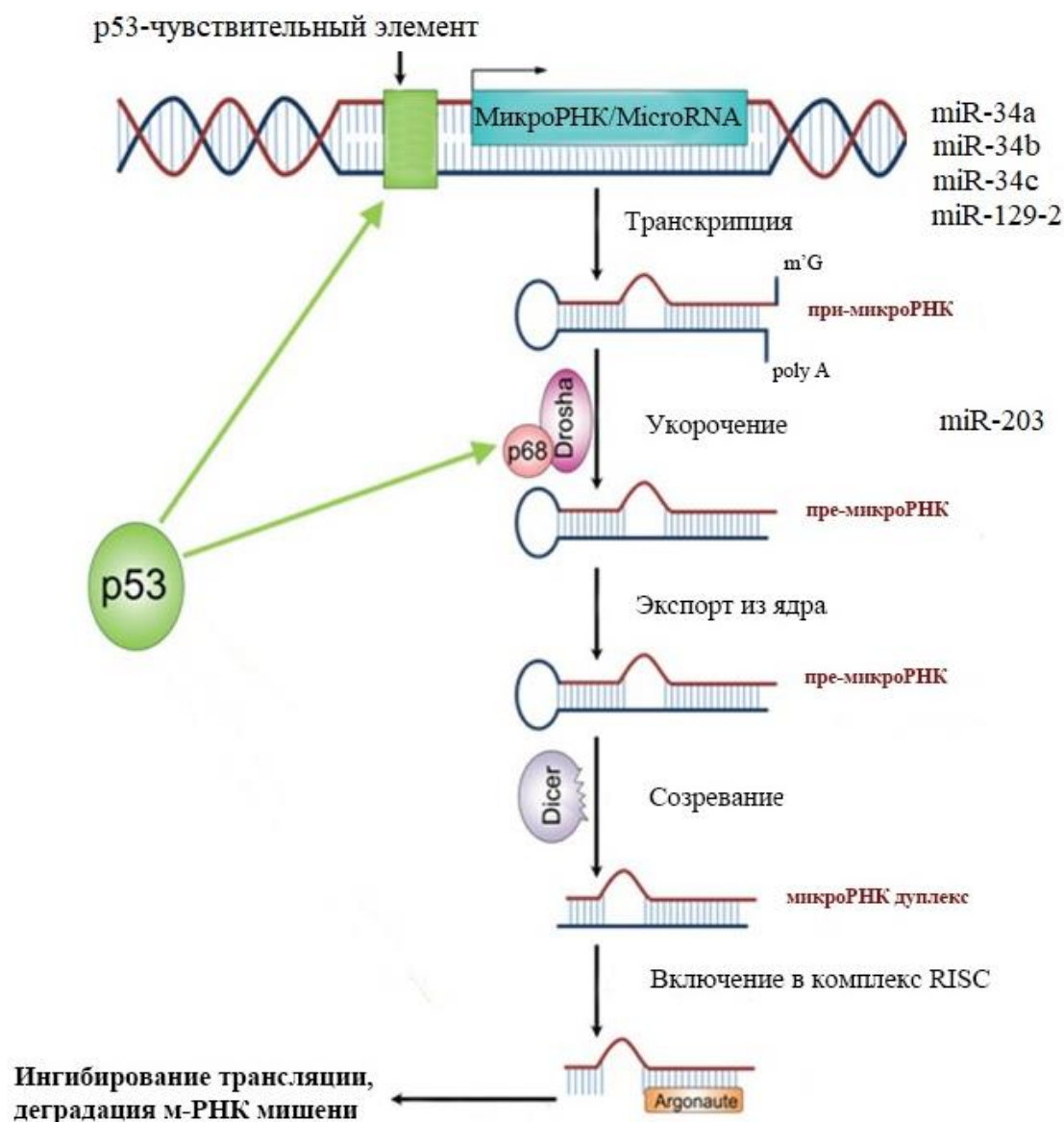


Рисунок 1 – Регуляция экспрессии микроРНК miR-129-2 и семейства miR-34 белком p53 на уровне транскрипции и miR-203 на уровне созревания

Позднее появились данные о том, что транскрипционно-неактивные мутанты p53 препятствуют функциональной сборке комплекса с Drosha, что приводит к ослаблению активности процессинга микроРНК. В частности, мутации в «горячих» точках p.R175H и p.R273H коррелируют с более низкой активностью Drosha, в то время как мутантный p.C135Y p53, который редко встречается при опухолях, не имеет такого влияния на Drosha [304]. Эти данные свидетельствуют о том, что транскрипционно-независимая модуляция биогенеза

микроРНК является еще одним из аспектов противоопухолевой активности белка p53 [38, 307].

1.2.7 МикроРНК как потенциальные терапевтические мишени при опухолях

Предполагают, что микроРНК могут быть полезны для терапии злокачественных новообразований, поскольку вовлечены в пути чувствительности клеток к лекарственным препаратам [144, 213]. Активацию или угнетение экспрессии микроРНК можно сочетать с химиотерапевтическим воздействием или другой цитотоксической терапией. Одним из примеров является ингибирование miR-21 вместе с секретируемой формой лиганда, индуцирующего апоптоз, связанного с фактором некроза опухоли S-TRAIL, что приводит к полному уничтожению клеток глиобластомы [188].

Экспериментальные данные показывают, что микроРНК влияют на пролиферацию и дифференцировку нормальных и опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*. На основании этих данных предпринимаются попытки контроля роста злокачественных новообразований путем манипуляции микроРНК. Повышение или ингибирование экспрессии данных молекул может быть достигнуто несколькими способами.

Класс веществ – синтетических имитаторов микроРНК, включающих в себя siRNA-подобный олигорибонуклеотидный дуплекс [266] или химически модифицированный олигорибонуклеотид [257], приводят к замещению биологических эффектов «выключенных» микроРНК. Напротив, ингибирование микроРНК может быть достигнуто введением различных модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов [44].

Особый интерес как первый успешный инструмент для нокдауна микроРНК *in vivo* представляют антагонисты микроРНК (антагомиры) – синтетические молекулы, комплиментарные определенной микроРНК и способные инактивировать ее. Антагомиры могут быть доставлены во все органы мышей,

кроме ткани мозга, после инъекции их в хвостовую вену. Терапевтическая ценность антагомира может быть значительно увеличена за счет технических усовершенствований для селективной доставки, специфичной для опухоли или типа ткани [302].

Синтетические олигонуклеотиды эффективны после введения *in vivo* не более двух недель [41, 45], однако микроРНК стабильно экспрессируются в клетках посредством транскрипции шпилечной РНК плазмидного вектора [112].

Недавно также было показано, что эктопическая сверхэкспрессия м-РНК мишени ингибирует функцию микроРНК [111, 258]. Таким образом, возможно применение таких конкурентных ингибиторов для долгосрочной секвестрации микроРНК в клетках.

Модулирование одновременно нескольких микроРНК может быть гораздо более эффективным для терапии, чем стратегии, направленные на регулирование одной молекулы данного класса. Изменение экспрессии различных микроРНК может происходить под действием химических соединений [268]. В связи с этим, чрезвычайно актуальной задачей становится поиск препаратов, которые могут нормализовать профиль микроРНК в злокачественных клетках, а клетки 60 раковых линий Национального института рака (NCI-60) служат платформой для такого скрининга [138, 237].

Переносу результатов фундаментальных исследований в реальную практику должен предшествовать этап оценки эффективности и продолжительности экспрессии/ингибирования микроРНК, а также неспецифических побочных эффектов такой терапии. Лишь немногие миметики или ингибиторы данных молекул достаточно специфичны. Однако перекрестная реактивность между микроРНК со сходной последовательностью в большинстве случаев пока неизбежна при высоких дозах антагонистов или агонистов [182, 239].

Другой возможный побочный эффект заключается в том, что высокая экспрессия миметиков может мешать действию эндогенных микроРНК, насыщая клеточный аппарат их процессинга. Это может привести к изменению экспрессии других молекул и неконтролируемому эффекту, вплоть до фатальных

последствий [309]. Требуется достижение большой точности введения или нокдауна микроРНК. Альтернативный подход к повышению специфичности – нацеливание на пре-микроРНК с помощью антисмысловых или siRNA стратегий [316, 326].

С целью улучшения эффективности и снижения частоты и выраженности побочных эффектов лечения злокачественных новообразований с применением микроРНК *in vivo* необходимы обширные доклинические и трансляционные исследования. Параллельно необходимо расширение знаний о влиянии широкого круга микроРНК на программы экспрессии генов, а также понимание того, как эти программы изменяются при онкогенезе.

1.3 Метилирование p53-чувствительных микроРНК и онкогенез

В последнее десятилетие возрос интерес к изучению метилирования генов микроРНК при гемобластозах. Активно изучается его значение в нормальной дифференцировке и функционировании кроветворных клеток и их дерегуляции в развитии опухолей. Несмотря на то, что общие знания о значении дисбаланса микроРНК в развитии злокачественных новообразований системы крови накапливаются быстрыми темпами [114, 173, 179, 261], данные по частоте и спектру метилирования генов микроРНК, роли метилирования онкосупрессорных микроРНК в прогрессии опухоли, его прогностической, предиктивной и диагностической ценности при гемобластозах немногочисленны [288].

В таблице 1 описаны имеющиеся данные о роли регулируемых p53 онкосупрессорных микроРНК и частоте метилирования кодируемых ими генов при злокачественных новообразованиях.

1.3.1 Метилирование генов микроРНК семейства miR-34 при опухолях

Семейство miR-34 включает в себя три онкосупрессорных микроРНК: miR-34a, miR-34b и miR-34c, для которых характерна высокая степень (более

80 %) гомологичности последовательности. Однако точная гомология соблюдается в районе их 5'-концов в области расположения ключевой последовательности, необходимой для связывания с м-РНК мишенями [324].

«Геном-хозяином» *MIR-34A* является ген *EF570048*, а *MIR-34B/C* – ген *BC021736*. При этом показано, что регуляция транскрипции *miR34b/c* может осуществляться и с промотора не только хозяйского гена, но и промотора противоположно ориентированного гена *BTG4* [95]. Промотор и сайт начала транскрипции *MIR-34A* был картирован более чем в 30 тысячах пар нуклеотидов от последовательности, кодирующей зрелую микроРНК [283].

Ген *MIR-34A* находится на 1-й хромосоме в регионе 1p36.22, тогда как ген *MIR-34B/C* – на хромосоме 11 в регионе 11q23.1. Последний отвечает за последовательность бицистронного транскрипта, с которого в последующем образуются две зрелые микроРНК *miR-34b* и *miR-34c*. *MIR-34A* и *MIR-34B/C* были первыми генами микроРНК, для которых была показана прямая индукция транскрипции белком p53 [38].

Таблица 1 – Краткие сведения об описанных р53-чувствительных онкосупрессорных микроРНК

МикроРНК	Ген	Расположение	Локализация	Биологический процесс	Снижение экспрессии микроРНК	Метилирование гена микроРНК
miR-129	<i>MIR-129-1</i>	Внутригенное, ген-«хозяин» <i>EST</i>	7q32.1	регуляция пролиферации, апоптоза, адгезии, миграции и инвазии клеток, множественной лекарственной резистентности опухолей	ДВККЛ, НХЛ, ММ, ХЛЛ	НХЛ, ММ, ХЛЛ
	<i>MIR-129-2</i>		11p11.2			
miR-34a	<i>MIR-34A</i>	Внутригенное, ген-«хозяин» <i>EF570048</i>	1p36.22	контроль клеточного цикла, репарация ДНК, апоптоз, эпителиально-мезенхимальный	ХЛЛ, ДВККЛ, ЛБ, ЛХ	ДВККЛ, НК/Т-клеточная лимфома, ЛХ
miR-34b/c	<i>MIR-34B/C</i>	Внутригенное, ген-«хозяин» <i>BC021736</i>	11q23.1	переход, противоопухолевый иммунный ответ, неоангиогенез	ХЛЛ, ММ, ДВККЛ	ХЛЛ, ДВККЛ
miR-203	<i>MIR-203</i>	Межгенное	14q32.33	дифференцировка клеток, пролиферация и клеточный рост, апоптоз, репарация ДНК, радиационная чувствительность, неоангиогенез	ММ, ХМЛ, ЛХ	Т-НХЛ, ОМЛ, ХЛЛ, В-НХЛ, ММ, ХМЛ, ЛХ

Примечание: ОМЛ – острый миелобластный лейкоз, ДВККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома, НХЛ – неходжкинские лимфомы, ММ – множественная миелома, ЛБ – лимфома Беркитта, ЛХ – лимфома Ходжкина, ХЛЛ – хронический лимфоидный лейкоз, ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз, Т-НХЛ – Т-клеточные неходжкинские лимфомы, В-НХЛ – В-клеточные неходжкинские лимфомы.

Важно отметить, что при повреждении ДНК p53 индуцирует экспрессию miR-34a, которая, в свою очередь, подавляет деацетилазу SIRT1, негативно регулирующую активность белка p53 путем деацетилирования, что замыкает петлю положительной обратной связи [53].

Другими индукторами их экспрессии являются транскрипционные факторы ELK1 и FOXO3A, которые связываются с промоторными областями *MIR-34A* и *MIR-34B/C* соответственно [230, 292].

С применением биоинформационного анализа и в экспериментальных исследованиях было показано, что микроРНК семейства miR-34 имеют большое число общих мишеней, а именно м-РНК регуляторов репарации повреждений ДНК и программированной клеточной смерти, эпителиально-мезенхимального перехода, миграции, противоопухолевого иммунного ответа и неоангиогенеза [101, 208]. Соответственно, уменьшение экспрессии miR-34a и miR-34b/c способствует злокачественному росту и может наблюдаться при различных опухолях.

Нормальный клеточный цикл включает в себя четыре последовательно сменяющие друг друга фазы: пресинтетическую (G1), синтетическую (S), постсинтетическую (G2) и фазу митоза (M). В опухолевых клетках, в отличие от здоровых, строгий контроль данного процесса нарушается, что приводит к неконтролируемой пролиферации злокачественных клеток. Несколько протоонкогенов – позитивных регуляторов клеточного цикла – являются мишенями микроРНК семейства miR-34. Установлено, что данные молекулы ингибируют деление лимфомных клеток путем репрессии MAP2K1 (mitogen-activated protein kinase 1) [190]. Кроме того, сообщалось, что эктопическая экспрессия членов семейства miR-34 в различных линиях раковых клеток вызывает остановку клеточного цикла путем репрессии циклинов D1 и E2 и циклин-зависимых киназ CDK4 и CDK6, которые регулируют переход от G1-к S-фазе [154, 158].

Метилирование промоторных областей генов семейства miR-34 является причиной снижения их экспрессии при широком круге злокачественных

новообразований, например, при раке толстого кишечника, поджелудочной железы, молочных желез, яичников, почек, саркомах мягких тканей и других [42, 255, 270]. Промоторы генов *MIR-34A* и *MIR-34B/C* содержат CpG-островки, гиперметилирование которых приводит к нарушению транскрипции кодируемых ими микроРНК. Другой причиной снижения их экспрессии при злокачественных новообразованиях могут быть хромосомные делеции [189].

В отличие от солидных опухолей, микроРНК семейства *miR-34* при гемобластозах менее изучены, за исключением хронического лимфолейкоза, при котором причины и неблагоприятное прогностическое значение снижения экспрессии *miR-34a*, *miR-34b* и *miR-34c* были подтверждены в нескольких исследованиях [91, 207, 210].

В клетках острого миелоидного лейкоза экспрессия *miR-34a* и *miR-34c* была значительно ниже, чем в нормальных клетках [102]. Снижение экспрессии *miR-34a* отмечали при трансформации лимфом желудка MALT-типа в ДВККЛ [225]. Важно отметить, что в экспериментах на опухолевых клеточных линиях и на мышах достигали восстановления функции микроРНК семейства *miR-34* путем введения микроРНК миметиков, что приводило к ингибированию роста и индукции апоптоза клеток ДВККЛ *in vitro* и *in vivo* [206]. В одном из исследований, посвященных лимфоме Беркитта было высказано предположение, что низкий уровень *miR-34b/c* является более распространенным механизмом, приводящим к гиперэкспрессии *c-MYC*, чем транслокация *IGH/MYC* [224].

Изучение роли метилирования генов кластера *miR-34* при опухолях системы крови показало следующее: в небольшой группе образцов первичных пациентов и в клеточных линиях ДВККЛ метилирование *MIR-34A* и *MIR-34B/C* было выявлено в 28 % и 78 % случаев соответственно, с высокой степенью корреляции между генами. При этом в нормальных Т- и В-клетках и ткани реактивных лимфоузлов метилирования генов микроРНК семейства *miR-34* отмечено не было [288].

При множественной миеломе нарушение экспрессии микроРНК кластера miR-34 также зачастую связано с патологическим метилированием [217, 294]. При этом Chim C. S. et al. (2010) показали, что *MIR-34A* не метилирован в нормальных клетках крови в отличие от клеточных линий множественной миеломы, ЛХ и нехождкинских лимфом [93]. Согласно данным Roman-Gomez J. et al. (2009) метилирование *MIR-34B/C* было выявлено в трети (34 %) случаев ОЛЛ [94].

Таким образом, гены кластера miR-34 часто гиперметилированы при лимфопролиферативных заболеваниях опухоль-специфичным образом.

1.3.2 Метилирование гена *MIR-203* и онкогенез

Ген *MIR-203* расположен в межгенном участке хромосомного локуса 14q32.33, который часто подвергается делеции при опухолях [47]. МикроРНК miR-203 впервые была идентифицирована в коже, где она способствует дифференцировке клеток эпидермиса и ограничивает их пролиферативный потенциал [29]. В недавнем исследовании показано, что преходящее воздействие этой микроРНК улучшает дифференцировочную способность мышечных и человеческих плюрипотентных стволовых клеток [156].

MiR-203 является одной из наиболее часто упоминаемых в литературных источниках микроРНК. Обзорные работы показывают, что аберрантная экспрессия miR-203 имеет место при множестве злокачественных новообразований, в том числе при раке желудка, аденокарциноме поджелудочной железы, раке толстой кишки и других, саркомах, глиоме и гематологических опухолях. Известно также, что данная молекула играет важную роль в процессах клеточного роста, пролиферации, апоптоза, репарации ДНК и инвазии клеток [32, 202, 203].

Было отмечено, что повышение экспрессии miR-203 происходит при активации p53 [185]. В основе этого явления лежит ускорение созревания miR-203 путем усиления ее Drosha-опосредованного процессинга под действием данного белка [55, 212]. Сообщалось также, что miR-203 нацелена на эволюционно

консервативную последовательность в 3'-нетранслируемой области м-РНК BCL-W, которая имеет антиапоптотическую активность. Так усиленная экспрессия BCL-W делает лимфоидные и миелоидные клетки рефрактерными к цитотоксическим воздействиям [187]. Однако индукция miR-203 приводит к снижению экспрессии BCL-W и антиапоптотическому эффекту только в клетках с сохраненной функцией p53 [149, 186].

Биоинформатический анализ показывает, что miR-203 может повышать радиационную чувствительность и миграционную способность клеток за счет посттранскрипционного контроля PI3K/AKT, SRC, Ras/MAPK и JAK/STAT3 сигнальных путей, а именно за счет нацеливания на следующие мишени: ATM, RAD51, SRC, PLD2, FGF2, PI3K-AKT, JAK-STAT3, VEGF, HIF-1 α и MMP2 и многие другие [124, 204]. Другими доказанными мишенями miR-203 являются ДНК-метилтрансфераза DNMT3b [259] и CREB1, которая участвует в пролиферации и выживании лейкозных клеток [86].

Bueno et al. заметили, что у мыши, человека и других позвоночных в 3'-нетранслируемой области гена *ABL1* существуют последовательности для связывания с miR-203 и предположили, что данная микроРНК может контролировать уровень белка ABL1 в различных организмах [165]. Вслед за этим было установлено, что микроРНК miR-203 регулирует экспрессию химерного гена *BCR-ABL1* и таким образом подавляет клеточную пролиферацию при лейкозах [40]. В одном из недавних исследований было показано, что иматиниб вызывает деметилирование промоторной области miR-203, что приводит к остановке пролиферации лейкозных миелоидных клеток [139].

Нарушение регуляции miR-203 при злокачественных новообразованиях было впервые выявлено в исследованиях, изучающих ломкие сайты хромосом. Показано, что на хромосоме 14q32 имеется область размером 7 миллионов пар нуклеотидов, которая содержит большое число генов микроРНК и часто утрачивается при злокачественных опухолях из Т-клеток человека. Гомологичная область также теряется в индуцированной облучением модели Т-клеточных лимфом у мышей. Интересно, что, когда одна копия гена *MIR-203* подвергается

делеции, экспрессия miR-203 может быть совсем утрачена или резко снижена за счет эпигенетического молчания второго аллеля. В образцах мышинной Т-клеточной лимфомы и в ряде линий человеческих Т-клеточных опухолевых клеток locus miR-203 резко гиперметилован [54].

MIR-203 имеет CpG островок протяженностью 804 п. н. [298]. Метилирование его как причина снижения экспрессии miR-203 была показана на гинекологических злокачественных новообразованиях, меланоме, карциномах почек, печени и пищевода, раке мочевого пузыря, гортани и глотки [82, 100, 175, 215].

При лимфопролиферативных заболеваниях впервые метилирование гена *MIR-203* было показано при Т-клеточных лимфомах [54]. Частота данного события при ОЛЛ составляла 27 % образцов первичных опухолей [122].

Позднее в исследовании Chim C. S. et al. (2011) изучили экспрессию и метилирование *MIR-203* в смешанной выборке онкогематологических больных (n = 150). Метилирование обнаруживалось в образцах ОМЛ с частотой 10,0 %, ХЛЛ – 42,0 % и НХЛ – 38,8 % (включая 60,0 % при лимфомах из НК-клеток, 40,9 % – В-клеточного и 23,5 % – Т-клеточного происхождения). В нормальных клетках крови и костного мозга метилирование *MIR-203* выявлено не было, что согласуется с идеей об опухоль-специфичном паттерне метилирования гена данной микроРНК [55].

Результаты работ, направленных на изучение статуса метилирования гена *MIR-203* при ХМЛ, плохо согласуются. Так, в изученных Chim C. S. et al. образцах от больных ХМЛ и в линии бластных клеток Ph-позитивного ХМЛ K-562 метилирование промотора данного гена отсутствовало, тогда как по данным опубликованных ранее экспериментов имело место преимущественное гиперметилование *MIR-203* при Ph-позитивных лейкозах (с экспрессией BCR-ABL) и редкое его обнаружение при Ph-негативных острых лейкозах или хронических миелопротиферативных заболеваниях [56]. Это свидетельствует о необходимости дальнейших валидирующих исследований.

Сопоставление частот выявления патологического метилирования *MIR-203* при моноклональных гаммапатиях неясного генеза, впервые диагностированной

множественной миеломе и в рецидиве заболевания позволяет предположить, что гиперметилирование данного гена является ранним событием в генезе заболевания, а не приобретает на этапах прогрессирования опухоли [86].

На клеточных линиях клеток лимфомы Ходжкина, неходжкинских лимфом и множественной миеломы была показана обратимость метилирования промотора *MIR-203* под действием обработки 5-Аза-2'-дезоксцитидином, что приводило к восстановлению экспрессии *miR-203*. Нормализация уровня микроРНК в клетках ингибировала клеточную пролиферацию или индуцировала гибель опухолевых клеток, что подтверждало данные об ее онкосупрессорной роли при лимфоидных новообразованиях [47, 55, 86, 288].

1.3.3 Метилирование микроРНК семейства *mir-129* при опухолях

Семейство генов микроРНК *mir-129* включает в себя два члена: *MIR-129-1*, картированный на хромосомном локусе 7q32.1, и *MIR-129-2*, расположенный внутригенно на 11p11.2 (геном-«хозяином» является ген *EST*) [70]. Связь микроРНК данного семейства и белка p53 была доказана совсем недавно. На примере ретинобластомы было показано, что с экспрессией *mir-129* положительно коррелирует экспрессия p53 и отрицательно – MDM2 и MDM4. Далее последовало биоинформационное предсказание и экспериментальная проверка нацеленности *mir-129* на м-РНК MDM2 и MDM4, а также наличия p53-чувствительного элемента в промоторной области генов *MIR-129-1/2*. Поскольку MDM2 и MDM4 являются негативными регуляторами уровня белка p53, было предположено существование регуляторной петли, состоящей из p53, *mir-129* и MDM2/4, которая может модулировать пролиферацию и апоптоз в клетках [307].

Ключевая последовательность *mir-129* может одновременно регулировать несколько м-РНК с разными функциями [184]. Частичная или полная комплементарность приводит к репрессии трансляции и деградации мишени соответственно. Именно поэтому считается, что *mir-129* может играть двойную

роль в онкогенезе, но при большинстве злокачественных новообразований данная микроРНК считается супрессором опухолевого роста [160, 162, 200, 296].

Большое значение данные микроРНК имеют в регуляции пролиферации, апоптоза, адгезии, миграции и инвазии клеток, а также множественной лекарственной резистентности опухолей [195]. Так, показано, что повышение экспрессии *mir-129* в культуре клеток аденокарциномы легкого приводит к остановке клеточного цикла с последующей гибелью клеток [199].

Мишенями *mir-129* являются м-РНК ряда онкогенов, наиболее изученными из которых являются CDK6, PDGFRA, FOXP1, HMGB1 и транскрипционные факторы стволовых (в том числе, гемопоэтических) клеток SOX4, EIF2C3 и SAMTA1 [183, 196, 198]. Так, CDK6 в сотрудничестве с циклином D1 приводит к переходу клеточного цикла из фазы G1 в S-фазу. SOX4 (транскрипционный фактор В-клеток) регулирует ряд генов, в том числе и генов микроРНК, ответственных за пролиферацию, выживаемость и ингибирование апоптоза в опухолях, а PDGFRA, HMGB1 и FOXP1 важны для мезенхимально-эндотелиального перехода – важного этапа метастазирования опухолей [131, 318].

Недавно было описано, что мишенями *mir-129* являются ко-активаторы транскрипционных факторов TEAD семейства YAP и TAZ, которые необходимы для транскрипции ряда онкогенов, в том числе *C-MYC* [278].

Первые сообщения о сниженной экспрессии *mir-129* при опухолях (медуллобластоме, недифференцированном раке желудка, колоректальной карциноме и аденокарциноме легких) появились в начале 2000-х годов [192]. Тогда же было показано, что подавление экспрессии микроРНК семейства *mir-129* может происходить путем эпигенетических механизмов, а именно метилирования *MIR-129-2* [79, 135, 136, 248]. CpG островки присутствуют в непосредственной близости от промотора именно данного гена, но не гена *MIR-129-1* [61]. Последний располагается в области расположения одного из ломких сайтов 7-й хромосомы и часто утрачивается при опухолях. В экспериментах на культурах клеток карцином толстого кишечника и молочной железы применение 5-азацитидина приводило к восстановлению экспрессии *mir-129* и замедлению

роста клеток опухолей, что является еще одним показателем онкосупрессорной функции данного семейства микроРНК и важности эпигенетической регуляции его транскрипции [71].

Koens L. et al. сообщали о том, что экспрессия *mir-129* снижена при ДВККЛ *leg-type*. При этом особо выраженное ее снижение наблюдалось при подтипе опухоли из активированных В-клеток в сравнении с подтипом из клеток зародышевого центра [181].

При гемобластозах низкая экспрессия *miR-129*, так же, как и при солидных новообразованиях, часто связана с метилированием *MIR-129-2*, что является более характерным для лимфоидных, но не миелоидных опухолей [92]. В нормальных гемопоэтических клетках метилирование гена *MIR-129-2* не описано [288].

Эпигенетическая инактивация *MIR-129-2* изучалась на клеточных линиях множественной миеломы (ММ) и неходжкинских лимфом, а также в клетках от пациентов с острыми и хроническими лейкозами, лимфомами и моноклональными гаммапатиями. Все пять клеточных линий лимфом и семь из восьми клеточных линий ММ имели метилированный ген. В первичных опухолевых образцах метилирование *MIR-129-2* отсутствовало при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) и хроническом миелолейкозе (ХМЛ), но обнаруживалось в 38,0–45,9 % случаев хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), 49,5 % случаев множественной миеломы и 59,1 % случаев неходжкинских лимфом (НХЛ). Частота выявления метилирования гена была сравнима при опухолях В-, Т- и НК-клеточного происхождения. Предполагается, что метилирование *MIR-129-2* является важным событием, связанным с трансформацией моноклональной гаммапатии неясного генеза в симптоматическую множественную миелому [52].

При этом метилирование *MIR-129-2* было связано с метилированием гена *MIR-203*, а обработка клеточных линий лимфомы зоны мантии деметилирующими агентами приводила к восстановлению уровня зрелой микроРНК, а также ингибировала клеточную пролиферацию и усиливала гибель клеток [107, 288].

Резюме

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома представляет собой агрессивное новообразование, состоящее из В-клеток среднего или крупного размера с диффузным характером роста и различными профилями экспрессии генов. В настоящее время появились данные, свидетельствующие, что данная нозологическая единица охватывает группу лимфоидных новообразований с различными биологическими и клиническими характеристиками.

Несколько клинических исследований III фазы, проведенные за последние два десятилетия, установили, что режим R-CHOP в качестве стандартной терапии ДВККЛ способен излечить лишь 50–70 % пациентов. Остальные больные либо не отвечают на подобную терапию, либо имеют рецидив заболевания. И только 10 % пациентов с рефрактерным или рецидивирующим течением лимфомы можно излечить с применением высокодозного лечения и последующей трансплантацией аутологичных стволовых гемопоэтических клеток, в то время как остальные 90 % будут иметь неблагоприятный исход заболевания, что свидетельствует о серьезной неудовлетворенности эффективностью имеющихся терапевтических подходов [168].

Для выявления пациентов, которые с высокой долей вероятности не получают стойкой и продолжительной ремиссии при применении R-CHOP, и разработки альтернативных путей таргетной терапии ДВККЛ требуется глубокое понимание биологии данной опухоли. Важным направлением исследований ДВККЛ стало изучение экзома, транскриптома и протеома опухоли с целью идентификации биологически отличных и имеющих различные клинические исходы подтипов лимфомы. Изменение экспрессии генов является основным молекулярным механизмом, ответственным за развитие опухоли.

Белок p53 функционирует как транскрипционный фактор. Нарушение его функции имеет важное значение в развитии различных типов опухолей у человека [172]. Нормальное функционирование p53 не только подавляет онкогенез, но и опосредует эффект противоопухолевых препаратов путем запуска апоптоза. При этом установлено, что до трети случаев ДВККЛ имеют абберрации *TP53*,

ассоциированные с неблагоприятным прогнозом, распространенными формами опухоли и с ее устойчивостью к стандартной и противорецидивной терапии. В то же время при отсутствии мутаций в данном гене может наблюдаться резистентность ДВККЛ к лечению, опосредованная нижележащими и вышележащими *TP53*-связанными механизмами.

Реализация функциональных эффектов *p53* во многом обеспечивается микроРНК семейства *mir-34*, *miR-129* и *miR-203*, нарушение экспрессии которых имеет место при ДВККЛ. Общими мишенями для них является ряд проонкогенов, приведенных в таблице 2, в том числе: транскрипционные факторы *BCL6* и *C-MYC*, циклинкиназы, являющиеся позитивными регуляторами клеточного цикла в контрольной точке перехода *G1/S* фаз, антиапоптотические белки *BCL2* и *MCL1*, метилтрансферазы. Семейства *mir-34*, *miR-129* и *miR-203* участвуют в подавлении экспрессии генов на посттранскрипционном уровне путем связывания с 3'-нетранслируемой последовательностью целевой м-РНК [219].

Участие микроРНК в лимфогенезе подтверждено в моделях на трансгенных мышах. Аберрантная их экспрессия не только приводит к развитию лимфопролиферативных заболеваний, но и способствует увеличению темпов опухолевой прогрессии. Диффузная В-крупноклеточная лимфома имеет свой, отличный от нормальных клеток спектр экспрессии данных молекул [85]. Так, показана возможность разделения ДВККЛ на классификационные подгруппы герминального и негерминального происхождения на основе спектра экспрессии микроРНК [253].

Таблица 2 – Общие значимые для развития гемобластозов мишени *p53*-чувствительных онкосупрессорных микроРНК

Мишень	miR-34a	miR-34b/c	miR-203	miR-129
C-MYC	+	+	—	—
CDK4/6	+	+	—	+
MDM2/4	—	—	—	+
BCL2/MCL1	+	+	—	+

Продолжение таблицы 2

Мишень	miR-34a	miR-34b/c	miR-203	miR-129
DNMT3A/B	—	—	+	—
K-RAS	—	—	—	—
FOXP1	+	—	—	—
NOTCH1/2	+	+	—	—
VEGFA	+	—	+	—
STAT3	—	—	+	—
SOX2/4/9	—	—	—	+
Примечание: знаком «+» отмечены молекулярные мишени микроРНК.				

Показано снижение уровня микроРНК семейства miR-34, miR-129 и miR-203 при широком круге злокачественных новообразований, в том числе системы крови. При этом молекулярные механизмы, лежащие в основе нарушения регуляции экспрессии онкосупрессорных микроРНК при злокачественных новообразованиях, были раскрыты относительно недавно. К ним относятся хромосомные делеции, метилирование геномных локусов и нарушения в первичной последовательности ДНК.

По данным литературы в настоящее время статус метилирования промоторов генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* изучен лишь на небольших смешанных выборках онкогематологических больных. При этом предполагается, что метилирование генов p53-чувствительных микроРНК может быть ткане- и/или опухоль-специфичным, что, безусловно, требует изучения метилирования данных генов при отдельных вариантах гемобластозов, в том числе ДВККЛ.

На клеточных линиях лимфомы Ходжкина и неходжкинских лимфом была показана обратимость патологического метилирования промотора данных генов под действием обработки 5-Аза-2'-дезоксцитидином, что приводило к восстановлению экспрессии кодируемых ими микроРНК. В экспериментах же нормализация уровня микроРНК в клетках зачастую ингибировала клеточную

пролиферацию или индуцировала гибель опухолевых линий, что подтверждает данные об их онкосупрессорной роли при лимфоидных новообразованиях.

В совокупности приведенные выше данные позволяют предположить, что метилирование генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203*, кодирующих микроРНК семейства *mir-34*, *miR-129* и *miR-203*, может быть потенциально полезным молекулярным биомаркером как в диагностике, так и в прогнозе опухоли и разработке стратегии таргетной терапии лимфом.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Описание больных группы исследования

Для участия в диссертационном исследовании была отобрана группа, состоящая из 136 человек, находившихся на лечении в Городском гематологическом центре г. Новосибирска в период 2007–2022 гг. Всем пациентам на основании данных патоморфологического исследования и последующей иммуногистохимической окраски на базе лаборатории Регионального центра высоких медицинских технологий (г. Новосибирск) был верифицирован диагноз ДВККЛ. Полные клинические данные были доступны для 73 человек.

Работа носит характер ретроспективного исследования. Дизайн представлен на рисунке 2.

В качестве критериев включения были приняты следующие параметры:

- наличие информированного согласия на участие в исследовании;
- возраст от 18 до 80 лет (включительно);
- диагноз ДВККЛ, верифицированный в соответствии с действующими на момент диагностики критериями ВОЗ.

Критериями исключения являлись:

- отсутствие информированного согласия;
- возраст до 18 лет.

Исследование было одобрено на заседании локального этического комитета ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (выписка из протокола № 129 от 30.11.2020) До включения в исследование все больные подписывали информированное добровольное согласие.



Рисунок 2 – Дизайн исследования

Средний возраст пациентов составил ($54,3 \pm 16,1$) года (25–92 лет). Распределение по возрасту в обследуемой группе больных отображено на рисунке 3. Из графика следует, что диагноз ДВККЛ был выставлен в 54 / 73 (73,9 %) случаев пациентам, возраст которых превышал 40 лет.

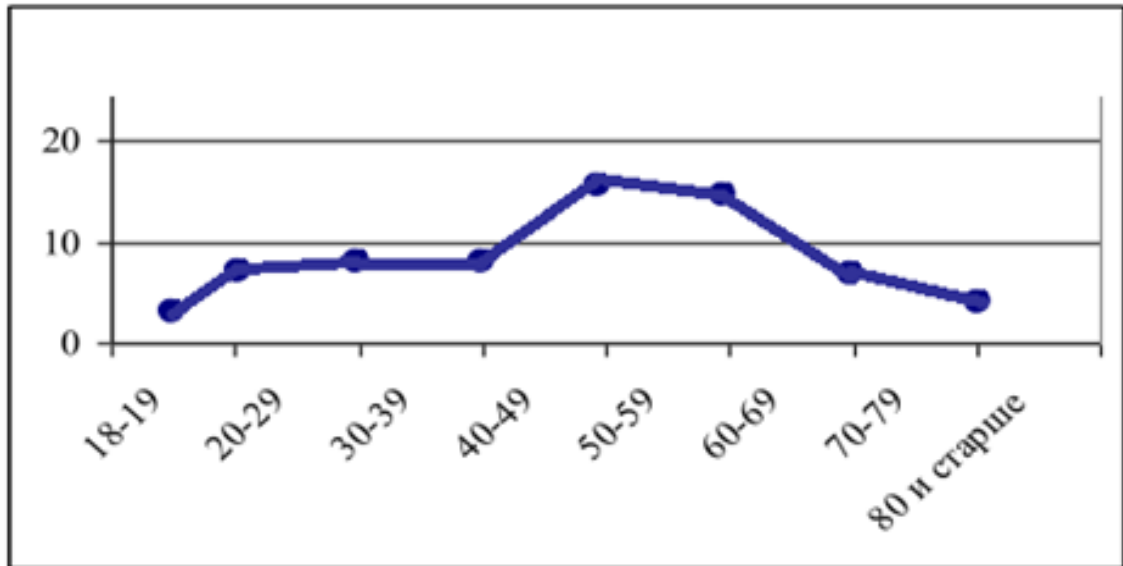


Рисунок 3 – Возрастное распределение пациентов группы исследования

Распределение больных по полу было следующим: 71 / 136 (52,2 %) – мужчины, 65 / 136 (47,8 %) – женщины.

Иммуногистохимический подтип опухоли был определен у 54 пациентов с использованием алгоритма Ханса [12]. Из 54 образцов 35 имели non-GCB-like и 19 – GCB-like подтип. Отмечено увеличение частоты выявления метилирования гена *MIR-34A* в группе GCB-like подтипа, а именно 8 / 19 (42,1 %) в сравнении с группой подтипа ABC-like 6 / 35 (17,1 %, $p = 0,047$).

Характеристика данных клинического обследования пациентов группы исследования приведена в таблице 3. Оценка факторов риска, согласно МПИ [7], показала, что 4 / 73 (5,5 %) обследованных относились к группе низкого, 24 / 73 (32,9 %) – к группе низкого промежуточного, 29 / 73 (39,7 %) – к группе промежуточного высокого и 16 / 73 (21,9 %) – к группе высокого риска.

Большая часть пациентов на момент проведения обследования имели III/IV стадию заболевания – 68 / 73 (93,2 %), у 42 / 73 (57,5 %) больных наблюдались симптомы опухолевой интоксикации.

Более чем в половине случаев 48 / 73 (65,8 %), были зарегистрированы очаги экстранодальных опухолевых поражений, при этом наиболее частыми локализациями были легкие, плевра, кости скелета, мягкие ткани, а также поражение органов желудочно-кишечного тракта.

Опухолевое поражение печени имели 5 / 73 (6,8 %). Спленомегалия оценивалась по площади косо́го среза селезенки (ПС) на основании ультразвукового исследования. Спленомегалия встречалась у 45 / 73 (61,6 %) пациентов, при этом она носила незначительный характер (ПС 21–40 см²) в 33 / 73 (45,2 %), умеренный (ПС 41–60 см²) – в 9 / 73 (12,3 %), выраженный (с ПС > 60 см²) – в 3 / 73 (4,1 %) случаев.

Общий соматический статус (ОСС) пациентов оценивался по шкале Восточной кооперативной онкологической группы Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) [7]. По данным этой шкалы пациенты с незначительными ограничениями активности или без них (0 или 1 балл) составляли 35 / 73 (47,9 %) обследованных; больные, активные более 50 % времени бодрствования, но периодически нуждающиеся в отдыхе (2 балла) – 14 / 73 (19,1 %); пациенты, проводящие в постели или в кресле более половины времени бодрствования, и не способные к самообслуживанию, прикованные к креслу или к постели (3 и 4 балла соответственно), составляли 21 / 73 (31,5 %) и 2 / 73 (2,7 %).

При оценке тяжести состояния больных, кроме течения самого опухолевого процесса, учитывалось наличие сопутствующих заболеваний. Коморбидный фон складывался из заболеваний сердечно-сосудистой системы (ишемическая болезнь сердца и гипертоническая болезнь) – 16 / 73 (20,8 %); органов пищеварения (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, хронический панкреатит) – 10 / 73 (12,4 %); эндокринологических патологий и заболеваний почек по 3 / 73 (4,1 %) соответственно (Таблица 3). Злокачественные

новообразования в анамнезе, не относящееся к гематологическому профилю, встречались у 1 / 73 больных (1,3 %).

Больные получали в качестве лечения первой линии от 6 до 8 курсов иммунохимиотерапии по схеме R-CHOP.

Таблица 3 – Клиническая характеристика пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы обследования

Показатель		Абсолютное количество пациентов	Частота, %
Прогностические группы по шкале МПИ	Низкий риск	4	5,5
	Промежуточный низкий риск	24	32,9
	Промежуточный высокий риск	29	39,7
	Высокий риск	16	21,9
В-симптомы	Выявлены	42	57,5
	Не выявлены	31	42,5
	Ночная профузная потливость	27	36,9
	Подъем температуры тела выше 38 °С	22	30,1
	Потеря массы тела	27	36,9
Стадия заболевания	I	1	1,3
	II	4	5,5
	III	11	15,1
	IV	57	78,1
Экстранодальные очаги		48	65,8
Локализация экстранодального поражения	Яичники	1	1,3
	Кости скелета	9	12,3
	Легкие и плевра	8	10,9
	Мягкие ткани	7	9,5
	Желудок	8	10,9

Продолжение таблицы 3

Показатель		Абсолютное количество пациентов	Частота, %
Локализация экстранодального поражения	ЦНС	6	8,2
	Почки	2	2,6
	Поджелудочная железа	3	4,1
	Молочные железы	1	1,3
	Сальник	2	2,6
	Надпочечники	1	1,3
Поражение печени		5	6,8
Увеличение селезенки	Всего	45	61,6
	$S < 40 \text{ см}^2$	33	45,2
	$S 40\text{--}60 \text{ см}^2$	9	12,3
	$S > 60 \text{ см}^2$	3	4,1
Поражение костного мозга		65	32,2
Общесоматический статус по шкале ECOG	0-1 балл	34	46,5
	2 балла	14	19,1
	3 балла	23	31,5
	4 балла	2	2,7
Тяжелая сопутствующая соматическая патология		70	34,7
Коморбидные состояния	Сердечно-сосудистый профиль (гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца)	16	21,9
	Органов пищеварения (язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки и желудка, панкреатит)	10	13,7
	Желчевыводящих органов	1	1,3
	Органов мочевого выделения	3	4,1
	Органов внутренней секреции	3	4,1
	Аутоиммунный тиреоидит	2	2,7

2.2 Методы клинического, лабораторного и инструментального обследования

Согласно Российским клиническим рекомендациям, обследование пациентов, включенных в группу исследования, включало сбор жалоб и анамнеза. Всем больным был проведен объективный осмотр, лабораторные методы обследования: общий и биохимический анализ крови (общий белок, АЛТ, АСТ, ЛДГ, фибриноген (ФГ), щелочная фосфатаза (ЩФ), протромбиновый индекс (ПТИ), тимоловая проба (ТП), уровень С-реактивного белка (СРБ), общий анализ мочи.

Всем больным проводилось рентгенологическое исследование (компьютерная томография брюшной и грудной полости, органов малого таза, забрюшинного пространства), ультразвуковое исследование органов брюшной полости, а также стерильная пункция и исследование пунктата костного мозга с дифференцированным подсчетом миелограммы, гистологическое исследование трепанобиоптата [13].

По данным общего анализа крови у пациентов из группы исследования были обнаружены следующие изменения (Таблица 4): медиана (Me) содержания гемоглобина (Hb) составила 131 г/л, 25 квартиль (Q25) – 111 г/л, 75 квартиль – (Q75) 142 г/л. Диагноз анемии был установлен у 18 / 73 (24,6 %) больных. При этом наблюдалось следующее распределение по степени тяжести анемии: при легкой степени (Hb = 110–90 г/л) Me содержания гемоглобина (Hb) 104 г/л, Q25 – 101,3 г/л, Q75 – 108,8 г/л у 12 / 73 (16,4 %) больных; при средней степени (Hb = 89–70 г/л) Me содержания гемоглобина (Hb) 81 г/л, Q25 – 81 г/л, Q75 – 84 г/л у 4 / 73 (5,5%) больных; при тяжелой степени (Hb = менее 70 г/л) Me содержания гемоглобина (Hb) 62 г/л, Q25 – 62 г/л, Q75 – 62 г/л у 2 / 73 (2,7%) пациентов. Все анемии носили норохромный характер.

Средний уровень тромбоцитов (Tr) в группе больных составил Me $246 \times 10^9/\text{л}$, Q25 – $174 \times 10^9/\text{л}$, Q75 – $325 \times 10^9/\text{л}$. Тромбоцитоз (повышение количества Tr более $450 \times 10^9/\text{л}$) с медианой уровня Tr $610 \times 10^9/\text{л}$,

Q25 – $521 \times 10^9/\text{л}$, Q75 – $751 \times 10^9/\text{л}$ имели 11 / 73 (15,1 %) пациентов, тромбоцитопению (снижение уровня Тр менее $100 \times 10^9/\text{л}$) выявили у 8 / 73 (10,1%) больных, Ме у этой категории пациентов составила $81 \times 10^9/\text{л}$, Q25 – $47 \times 10^9/\text{л}$, Q75 – $95 \times 10^9/\text{л}$.

Медиана уровня лейкоцитов (L) у исследованных пациентов составила $6 \times 10^9/\text{л}$, Q25 – $4,4 \times 10^9/\text{л}$, Q75 – $9,6 \times 10^9/\text{л}$. Лейкопения (количество L менее $4 \times 10^9/\text{л}$) Ме лейкоцитов $3,3 \times 10^9/\text{л}$, Q25 – $2,6 \times 10^9/\text{л}$, Q75 – $3,7 \times 10^9/\text{л}$ определялась у 11 / 73 (15,1 %) пациентов, а лейкоцитоз (количество L $9\text{--}30 \times 10^9/\text{л}$) Ме количества лейкоцитов $10,1 \times 10^9/\text{л}$, Q25 – $9,5 \times 10^9/\text{л}$, Q75 – $13,2 \times 10^9/\text{л}$ – у 25 / 73 (34,2 %) больных.

Медиана содержания лимфоцитов в периферической крови составила 18 %, Q25 – 8 %, Q75 – 25 %.

В целом по группе больные ДВККЛ имели медиану значения СОЭ 24 мм/ч, Q25 – 15 мм/ч, Q75 – 37 мм/ч, при этом у большинства – 56 / 73 (76,7 %) – больных в группе обследования отмечалось повышение СОЭ.

Помимо ОАК были проанализированы острофазовые показатели биохимического анализа крови (Таблица 5). У большинства пациентов из группы исследования было выявлено повышение уровня фибриногена (Ме – 4 г/л, Q25 – 3 г/л, Q75 – 6,2 г/л), СРБ (Ме – 6 г/л, Q25 – 3 г/л, Q75 – 12 г/л) и ЛДГ (Ме – 534 МЕ/л, Q25 – 335 МЕ/л, Q75 – 783,5 МЕ/л) по сравнению с референсными значениями. Повышение уровня фибриногена было обнаружено меньше чем в половине случаев 33 / 73 (45,2 %). Повышенное содержание ЛДГ более 450 МЕ/л отмечалось у 42 / 73 (57,3 %), СБР – у 46 / 73 (63,0 %) и ЩФ – у 48 / 73 (65,8 %) больных.

Относительно высокая частота выявления в группе исследования ускоренной СОЭ и повышение острофазовых показателей по данным биохимического анализа крови может свидетельствовать о высокой пролиферативной активности и распространенности опухолевого поражения у больных ДВККЛ. При этом низкая частота выявления анемии тяжелой степени

тяжести и выраженной тромбоцитопении может объясняться низкой частотой лейкомизации ДВККЛ.

Таблица 4 – Данные общего анализа крови у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы обследования до начала терапии

Показатель гемограммы	Медиана	Q25	Q75	Абсолютное значение
Гемоглобин, г/л	131	111	142	73
Анемия легкой степени (Hb = 110–90 г/л)	104	101,3	108,8	12
Анемия средней степени (Hb = 89–70 г/л)	81	81	84	4
Анемия тяжелой степени (Hb = менее 70 г/л)	62	62	62	2
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	246	174	325	73
Тромбоцитоз (Тр более $450 \times 10^9/\text{л}$)	610	521	751	11
Тромбоцитопения (Тр менее $100 \times 10^9/\text{л}$)	81	47	95	8
СОЭ, мм/час	24	15	37	73
Повышение СОЭ (более 15 мм/ч)	30	20	43	56
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	6	4,4	9,6	73
Лейкопения (L менее $4 \times 10^9/\text{л}$)	3,3	2,6	3,7	11
Лейкоцитоз (L = $(9-30) \times 10^9/\text{л}$)	10,1	9,5	13,2	25
Лимфоциты, %	18	8	25	73

Таблица 5 – Результаты биохимического анализа крови пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы обследования

Показатель	Медиана	Q25	Q75	Абсолютное значение
Фибриноген, г/л	4	3	6,2	73
Гиперфибриногенемия (более 4 г/л)	6,6	4,6	9,7	33
С-реактивный белок (СРБ), г/л	6	3	12	73
Повышение уровня СРБ (более 4 г/л)	12	8	34	46
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), МЕ/л	534	335	783,5	73
Повышение уровня ЛДГ (более 450 МЕ/л)	740	606	1083	42
Щелочная фосфатаза (ЩФ), ЕД/л	192	152	331	73
Повышение уровня ЩФ (более 270 ЕД/л)	418	317	997	22

2.3 Специальные методы исследования

Весь объем работ по генотипированию был проведен на базе лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ИЦиГ СО РАН (заведующий лабораторией – д-р мед. наук, профессор В. Н. Максимов).

2.3.1 Подготовка образцов ДНК для исследования

Для работы отбирались блоки с диагностическим биоматериалом – фиксированными формалином и парафинизированными биоптатами опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ (n = 136). Для оценки специфичности выявляемого

метилирования при опухолевом процессе использовалась ДНК из блоков фиксированных формалином и парафинизированных биоптатов реактивных лимфоузлов с явлениями поликлональной В-клеточной пролиферации ($n = 11$).

С блоков было взято 3–4 среза толщиной 10–12 мкм. Содержание опухолевых лимфоцитов в образце превышало 50 %. Для выделения ДНК применялся фенол-хлороформный метод с гуанидином [58].

Для очистки от парафина срезы были помещены в термостат. Для лизиса клеток проводилась обработка 600 мкл 5 М гуанидина в термостате в течение 12 часов. На 100 мл 5 М гуанидина приходилось: 50,2 г гуанидина; 5 мл 5 М NaCl; 5 мл 0,5 М ЭДТА; 2,5 мл 20 % SDS с доведением до полного объема 0,1 М трис-HCl.

На следующий день проводилась обработка фенол-хлороформом для экстракции и осаждения ДНК. В эппендорф с пробой добавляли смесь из 600 мкл фенола в соотношении 1 : 1 с хлороформом с дальнейшим встряхиванием и центрифугированием. После разделения фаз в чистую пробирку отбиралась верхняя фаза для повторной обработки фенол-хлороформом и 5 М NaCl. Осаждение ДНК проходило при минус 40° С, проводили центрифугирование на максимальных оборотах, двукратную промывку спиртом и подсушивание ДНК до полного испарения примесей. Осадки растворяли в би-дистиллированной воде (объем воды колебался от 30 до 50 мкл в зависимости от объема полученной ДНК). Дальнейшее хранение до выполнения методик проходило при минус 20° С.

Оценка концентрации и чистоты выделенных нуклеиновых кислот путем определения отношения спектрофотометрического поглощения образца при длинах волн 260 и 280 нм (A_{260}/A_{280}) выполнялась на аппарате Epoch («BioTek», США).

2.3.2 Бисульфитная конверсия образцов ДНК

Бисульфитная конверсия 500 нг каждого из образцов ДНК проводилась с применением наборов EZ DNA Methylation Kit, в соответствии с протоколом производителя («Zymo research», США), и элюции бидистиллированной водой

в конечном объеме 20 мкл. В качестве отрицательного и положительного контроля и контроля полноты конверсии применялся набор контрольных ДНК Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit («Zymo research», США).

2.3.3 Оценка статуса метилирования генов семейства *MIR-34*

Анализ метилирования генов *MIR-34A* и *MIR-34B/C* проводился методом метил-чувствительного анализа кривых плавления с высоким разрешением (Methylation-Sensitive High-Resolution-Melting – MS-HRM) на аппаратах StepOnePlus («Applied Biosystems», США) в двух повторах. Статус метилирования определяли по профилю плавления каждого образца (Рисунок 4).

Метод основан на постепенном повышении температуры в образце после этапа амплификации, в ходе которого происходит разрушение комплементарных водородных связей между цепочками наработанного фрагмента и их диссоциация. Процесс плавления регистрируют при помощи специальных интеркалирующих красителей.

По разнице во флуоресценции можно различить даже однонуклеотидные различия в образцах. При этом метод MS-HRM не дает сведений о локализации метилированных CpG-динуклеотидов (не изменившихся в процессе обработки бисульфитом натрия), однако предоставляет точную информацию об их количестве на амплифицированном участке [217].

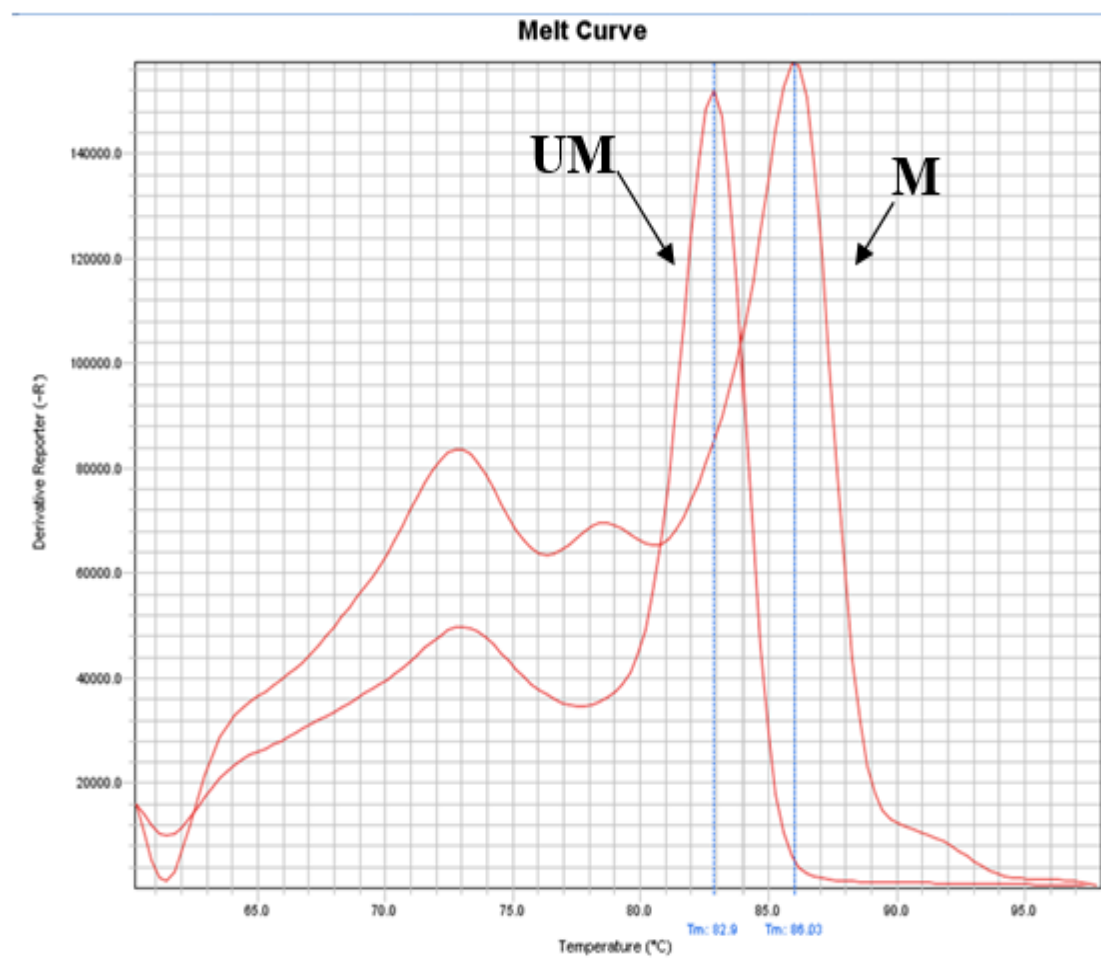


Рисунок 4 – Метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM) для выявления метилирования ДНК:

UM – неметилированная последовательность, M – метилированная последовательность, Tm – температура плавления

Последовательности праймеров указаны в таблице 6. Они фланкировали CpG-динуклеотиды и были комплементарны как неметилированной, так и метилированной последовательности. Для *MIR-34A* амплифицированный регион перекрывался с мотивом связывания p53 и включал 14 CpG-динуклеотидов, локализованных в сайте инициации транскрипции. Для *MIR-34B/C* амплифицированная область включала 10 сайтов 5'-конца CpG-островка, расположенного в промоторе гена.

Таблица 6 – Последовательности праймеров и длина продукта реакции

Метод	Ген	Последовательность праймеров	Tm (°C)	Длина продукта
MS-HRM	MIR-34A	F 5'-tttttttaggtggaggagatgt-3'	64	155
		R 5'-ccaacaacccaacaaaac-3'		
	MIR-34B/C	F 5'-ttgtattaaaataaggtatagtagt-3'	56	99
		R 5'-cgcttctcaaacatcttctct-3'		
MS-PCR	MIR-203	MF 5'-gagtattttcggttagacgagac-3'	60	287
		MR 5'-cctttatacgcgcgaaccg-3'		
		UMF 5'-tttgagtattttggttagatgagat-3'		
		UMR 5'-aacacctttatacaacacaacca-3'		
	MIR-129-2	MF 5'-gagttgggggatcgcgac-3'	62	189
		MR 5'-atataccgacttctcgattcgccg-3'		
		UMF 5'-gagttgggggattgtggat-3'	60	188
		UMR 5'-aatataccaacttctcaattcacca-3'		
Примечание: MS-HRM – метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением, MS-PCR – метил-специфическая ПЦР, UM – неметилованная последовательность, M – метилированная последовательность, Tm – температура плавления, F – прямой праймер, R – обратный праймер.				

Для *MIR-34A* каждую реакцию проводили в конечном объеме 20 мкл, содержащем БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) (Биолабмикс, Россия), 3 mM MgCl₂, 500 нМ каждого праймера и 10 нг модифицированной бисульфитом натрия ДНК. Протокол проведения MS-HRM-анализа был следующим: 1 цикл 95° С в течение 10 минут; 40 циклов 95° С – 15 секунд, 64° С – 20 секунд и 72° С – 15 секунд, далее 65° С в течение 1 минуты с последующей фазой плавления от 65° С до 95° С с повышением температуры на 0,02° С/сек.

Для *MIR-34B/C* каждую реакцию проводили в конечном объеме 20 мкл, содержащем БиоМастер HS-qPCR Hi-ROX SYBR (2×) (Биолабмикс, Россия), 2 mM MgCl₂, 300 нМ каждого праймера и 5 нг модифицированной бисульфитом натрия ДНК. Протокол проведения MS-HRM-анализа был следующим: 1 цикл 95° С в течение 10 минут; 35 циклов 95° С – 35 секунд, 56° С – 20 секунд

и 72° С – 15 секунд; далее 65° С в течение 1 минуты с последующей фазой плавления от 65° С до 95° С с повышением температуры на 0,02° С/сек.

2.3.4 Оценка статуса метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2*

Для определения статуса метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2* выполнялась МС-ПЦР в двух пробирках: с комплементарными к метилированному и неметилированному аллелю праймерами (Таблица 6).

В состав реакционной смеси (объемом 25 мкл) для *MIR-203* входили: ПЦР-микс (2,5×) («Синтол», Россия); MgCl₂ 10 мМ 3,0 мкл, смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов 10 мМ 0,5 мкл, 1 ЕА SynTaq ДНК-полимеразы («Синтол», Россия); 1 мкл каждого 10 мМ праймера и 10 нг модифицированной бисульфитом натрия ДНК.

Протокол амплификации был следующим: 1 цикл 95° С в течение 5 минут; 35 циклов 95° С – 30 секунд, 60° С – 30 секунд и 72° С – 30 секунд; далее этап постэлонгации 72° С в течение 5 минут.

Ожидаемый размер ампликона – 287 п. н. оценивали путем электрофореза в 5 % полиакриламином геле, на который было нанесено по 7 мкл каждого образца, применялся маркер молекулярной массы 100 п. н. (в объеме 3,0 мкл). Результаты распределения бэндов на электрофореграмме приведены на рисунке 5.

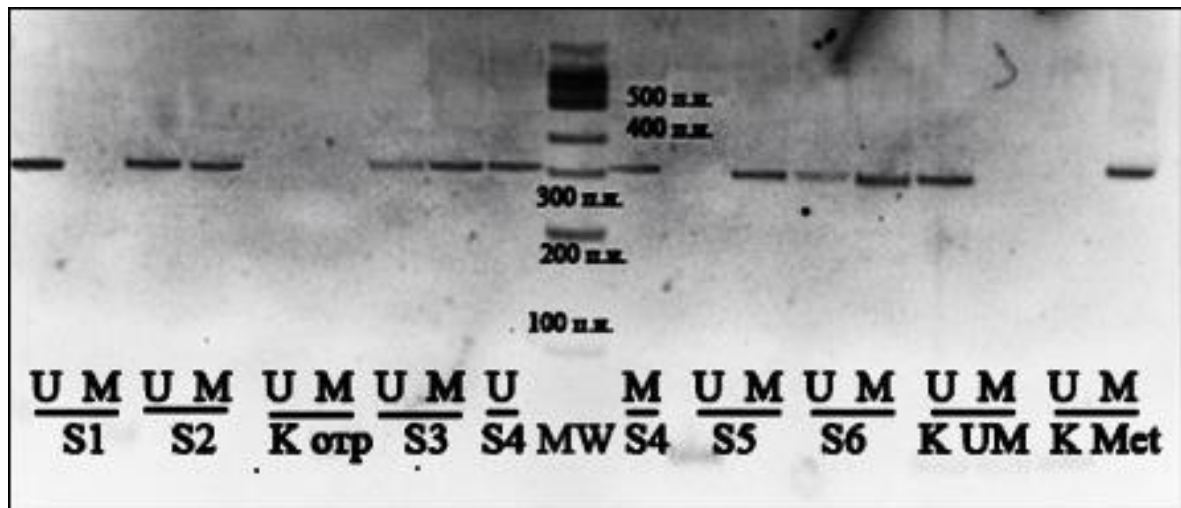


Рисунок 5 – Результаты метил-специфической ПЦР для определения статуса метилирования гена *MIR-203* (электрофорез в 5 % полиакриламидном геле, М – ПЦР с праймерами, специфичными к метилированному аллелю, UM – ПЦР с праймерами, специфичными к неметилированному аллелю): К Met – контрольная метилированная ДНК, К UM – контрольная неметилированная ДНК, К отриц – отрицательный контроль, S1-S6 – образцы пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой, MW – маркер молекулярной массы 100 п. н.

Для *MIR-129-2* в состав реакционной смеси (объемом 25 мкл) входили: ПЦР-микс (2,5×) (Синтол, Россия); $MgCl_2$ 10 mM 3,5 мкл, смесь деоксинуклеотидтрифосфатов 10 mM 0,5 мкл, 1 ЕА SynTaq ДНК-полимеразы (Синтол, Россия); 1,5 мкл каждого 10 mM праймера и 8 нг модифицированной бисульфитом натрия ДНК.

Протокол амплификации был следующим: 1 цикл 95 °C в течение 5 минут; 35 циклов 95 °C – 30 секунд, T °C отжига праймеров – 30 секунд и 72 °C – 20 секунд; далее этап постэлонгации 72 °C в течение 5 минут. T °C отжига праймеров на неметилированную последовательность составляла 60 °C, на метилированную – 62 °C, а ожидаемые размеры ампликона – 188 и 189 п. н. соответственно.

Далее выполнялся электрофорез продуктов ПЦР в 5 %-м полиакриламидном геле, на который наносили по 7 мкл каждого образца, применялся маркер

молекулярной массы 100 п. н. (объемом 3,0 мкл). Результаты распределения бэндов на электрофореграмме приведены на рисунке 6.

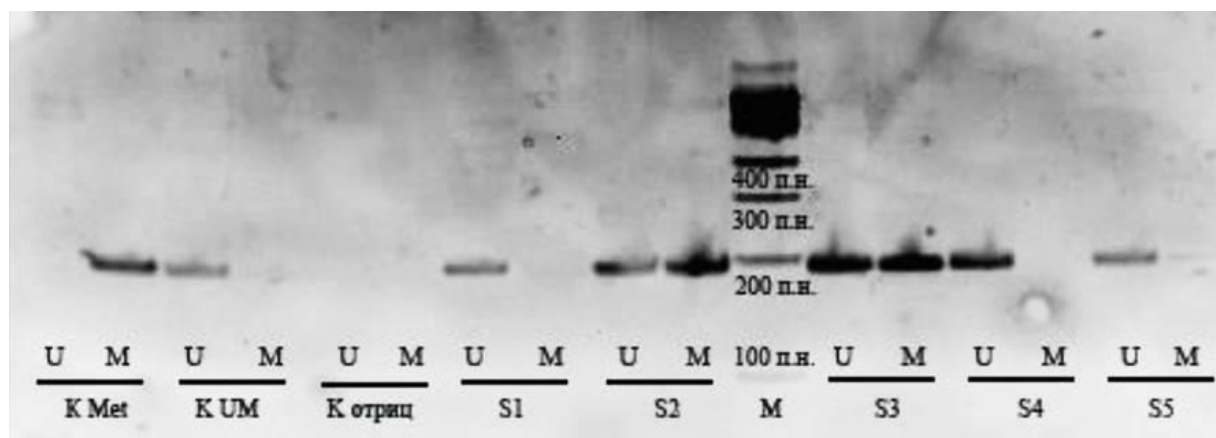


Рисунок 6 – Результаты метил-специфической ПЦР для определения статуса метилирования гена *MIR-129-2* (электрофорез в 5 % полиакриламидном геле, М – ПЦР с праймерами, специфичными к метилированному аллелю, UM – ПЦР с праймерами, специфичными к неметилированному аллелю): К Met – контрольная метилированная ДНК, К UM – контрольная неметилированная ДНК, К отриц – отрицательный контроль, S1-S6 – образцы пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой, М – маркер молекулярной массы 100 п. н.

2.3.5 Оценка полноты бисульфитной конверсии

Полноту конверсии неметилированных цитозинов проверяли методом бисульфитного секвенирования (Рисунки 7, 8 и 9). Для этого ампликоны, полученные в результате ПЦР с контролями полностью метилированной и неметилированной ДНК подвергали очистке от солей, остаточных праймеров и дезоксинуклеотидтрифосфатов с помощью микроколонок с Sephadex™ G-50 medium (США).

Прямое секвенирование образцов было проведено с использованием наборов BigDye® Terminator v1.3 (Applied Biosystems, США) методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems, США). Использовали полимер POP-7 (Applied Biosystems, США). Анализ результатов секвенирования и выравнивание фрагментов осуществляли с применением программы Chromas.

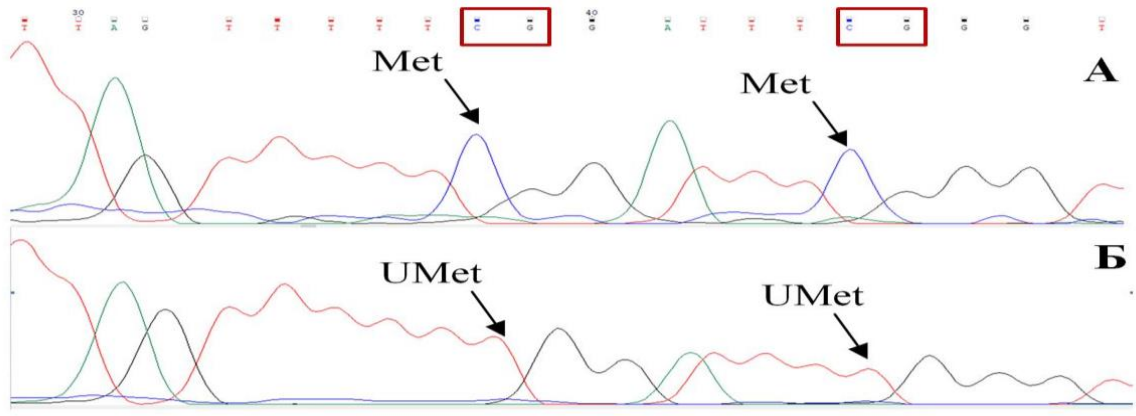


Рисунок 7 – Фрагмент хроматограммы бисульфитного сиквенса CpG-островка гена *MIR-34A*: А – метилированная ДНК, Б – неметилированная ДНК, Met – цитозин в метилированном состоянии, UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии, красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды

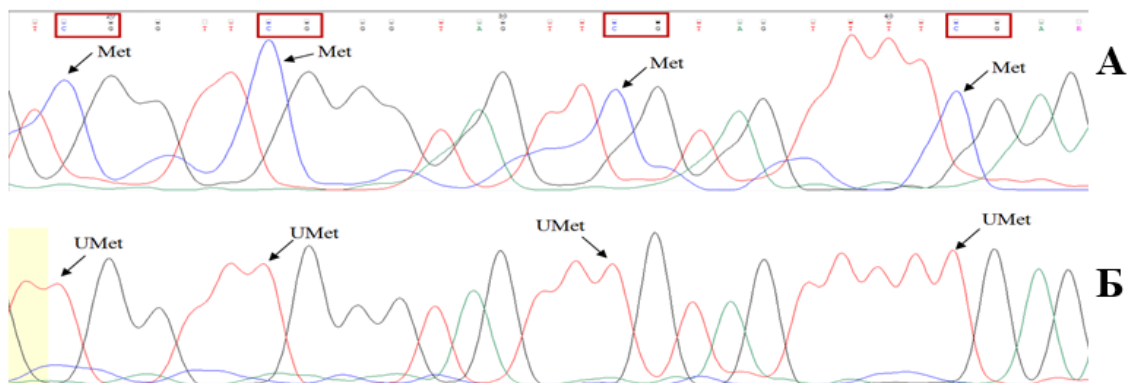


Рисунок 8 – Фрагмент хроматограммы бисульфитного сиквенса CpG-островка гена *MIR-129-2*: А – метилированная ДНК, Б – неметилированная ДНК, Met – цитозин в метилированном состоянии, UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии, красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды

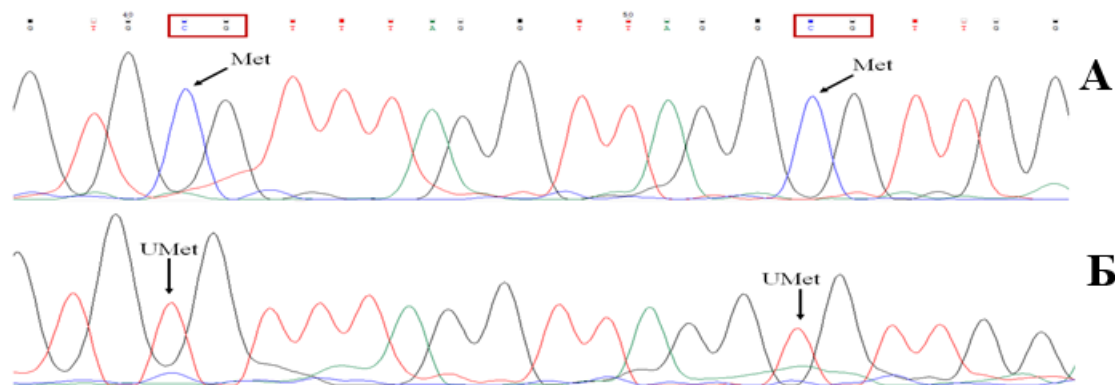


Рисунок 9 – Фрагмент хроматограммы бисульфитного сиквенса CpG-островка гена *MIR-203*: А – метилированная ДНК, Б – неметилированная ДНК, Met – цитозин в метилированном состоянии, UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии, красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды

2.3.6 Оценка aberrаций в гене *TP53*

В опухолевых образцах описанным ранее методом полимеразной цепной реакции с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) с использованием эндонуклеазы рестрикции *HindIII* проводилась оценка rs78378222, приводящего к разрушению сигнала полиаденилирования гена *TP53* [271]. На рисунке 10 представлены результаты генотипирования.

Методом прямого секвенирования по Сэнгеру была определена нуклеотидная последовательность гена *TP53* (экзоны 5–10) в соответствии с IARC protocol [60].

Анализ был осуществлен методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) с применением набора BigDye® Terminator v1.3 и полимера POP-7. Для этого полученные ампликоны были очищены от солей, остаточных праймеров и дезоксинуклеозидтрифосфатов с использованием микроколонок с Sephadex G-50. Результаты секвенирования были проанализированы с применением программ SeqScape и Chromas. В качестве референсной была принята последовательность гена *TP53* NG_017013.

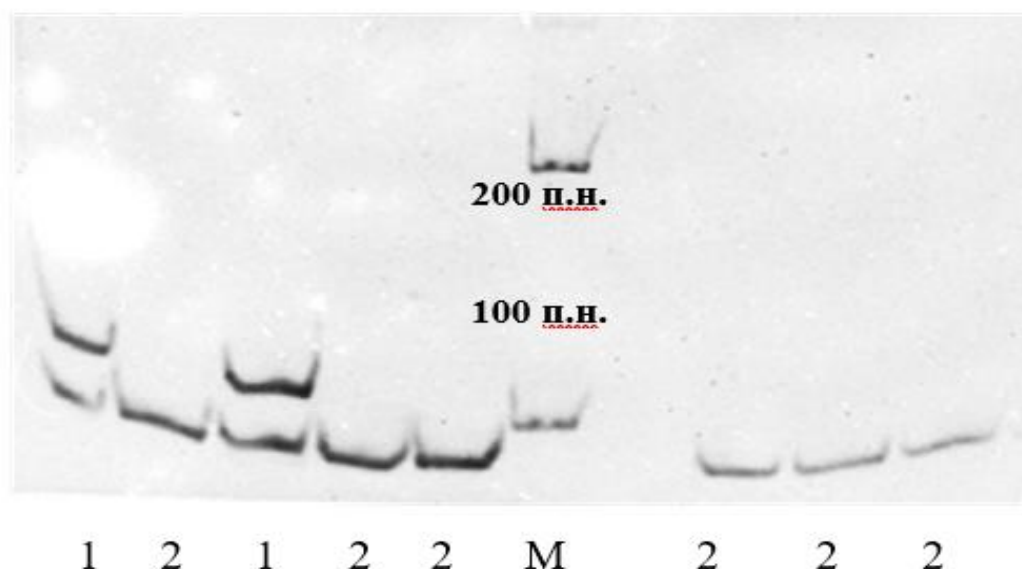


Рисунок 10 – Результаты полимеразной цепной реакции с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) rs78378222 гена *TP53*:

1 – (106 + 84) п.н. (генотип A/C); 2 – 84 п. н. (генотип A/A); М – маркер с молекулярной массой 100 п. н.

Анализ биологической значимости выявленных мутаций был выполнен на основании результатов, полученных при использовании баз данных и инструментов IARC *TP53* mutation Database, The *TP53* UMD mutation database in human cancer и Human Gene Mutation Database [147]. Дополнительно производился биоинформационный анализ миссенс-мутаций с применением предикторных программ (SIFT, PolyPhen2, LRT, MutationAssessor) [31].

2.3.7 Статистическая обработка материала

Статистический анализ проводился в SPSS 16.0 для Windows (SPSS Inc.). Любые различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для переменных, не подчиняющихся нормальному распределению, использованы значения медианы (Me), 25-го и 75-го процентиля (Q25, Q75) и тест Манна – Уитни.

Различия в частотах признаков оценивали с помощью расчета хи-квадрат Пирсона (χ^2) или точного критерия Фишера (F-критерий). Проводился расчет отношения шансов (ОШ) с 95 %-м доверительным интервалом (ДИ).

Выживаемость больных оценивалась с использованием метода Каплана – Мейера и лог-рангового теста (Log-rank test). Общая выживаемость (ОВ) измерялась с даты постановки диагноза до даты последнего наблюдения или смерти.

Количественный анализ сочетанного выявления метилирования изученных генов проводился путем вычисления Log2 отношения шансов (Log2 Odds Ratio) и точного критерия Фишера (p-value) с поправкой на множественность сравнений с помощью процедуры Бенджамини – Хохберга (q-value).

Чувствительность определялась как вероятность того, что результат теста будет положительным при наличии заболевания, специфичность – как вероятность того, что результат теста будет отрицательным при отсутствии заболевания.

С помощью онлайн-сервиса OncoPrinter [36] была получена картина сочетанного выявления изучаемых аберраций.

Мутационный спектр гена *TP53* был визуализирован в формате графика «леденец на палочке» с помощью программы Lollipops [251].

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Частота метилирования генов микроРНК *mir-34a*, *miR-34b/c*, *miR-129* и *miR-203* в опухолевой ткани пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Результаты определения статуса метилирования генов *MIR-129-2* и *MIR-203* в опухолевой ткани больных ДВККЛ ($n = 136$) и контрольных образцах с реактивной поликлональной В-клеточной пролиферацией методом метил-специфической ПЦР представлены в таблице 7. Частота метилирования гена *MIR-129-2* составила 89 / 136 (65,4 %) случаев, гена *MIR-203* – 90 / 136 (66,2 %).

Таблица 7 – Частота метилирования генов микроРНК *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой и лимфоидной ткани пациентов с реактивными лимфаденопатиями

Ген	Статус метилирования	Частота Абс. (%)		p
		ДВККЛ (n = 136)	реактивные лимфоузлы (n = 11)	
MIR-203	М	90 (66,1)	0 (0)	< 0,001
	НМ	46 (33,9)	11 (100,0)	
MIR-129-2	М	89 (65,4)	0 (0)	< 0,001
	НМ	47 (34,6)	11 (100,0)	
MIR-34A	М	31 (22,8)	0 (0)	0,075
	НМ	105 (77,2)	11 (100,0)	
MIR-34B/C	М	75 (55,1)	0 (0)	< 0,001
	НМ	61 (45,3)	11 (100,0)	
Примечание: М – метилированный, НМ – неметилированный.				

Анализ метилирования генов семейства miR-34 проводился методом метил-чувствительного анализа кривых плавления с высоким разрешением, результаты которого приведены на рисунке 11. Частота метилирования генов *MIR-34B/C* и *MIR-34A* составила 75 / 136 (55,1 %) и 31 / 136 (22,8 %) соответственно, $p < 0,001$.

В ходе проведения работ по анализу статуса метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* отрицательный контроль и реакции с ДНК из набора Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit (Zymo Research, США) показали соответствующие результаты.

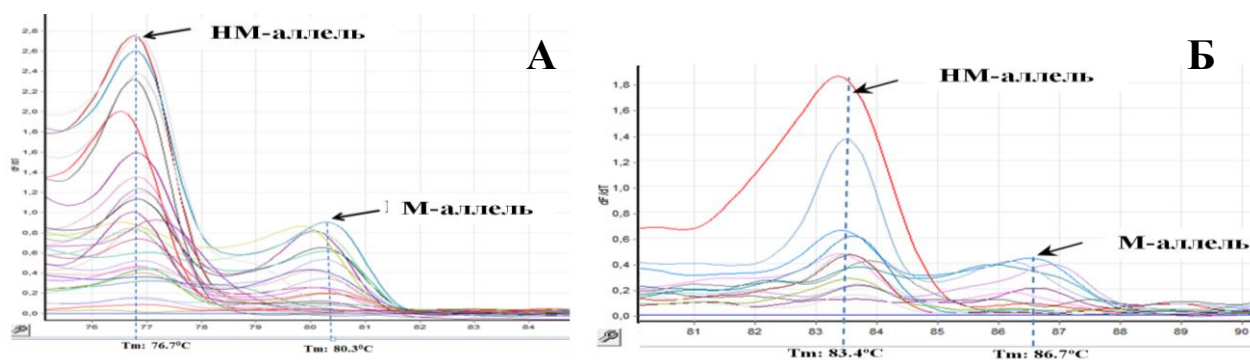


Рисунок 11 – Результаты анализа статуса метилирования генов *MIR-34B/C* (А) и *MIR-34A* (Б) методом метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения: Tm – температура плавления, НМ-аллель – неметилированный аллель, М-аллель – метилированный аллель

В целях оценки опухоль-специфичности выявляемого метилирования было проанализировано 11 образцов лимфоузлов с реактивными изменениями, при этом ни в одном случае метилирование изучаемых генов не было обнаружено.

Анализ метилирования всех 4-х генов позволял отличить опухолевые образцы лимфоузлов от реактивных в со специфичностью 100 % и чувствительностью 89 % ($p < 0,001$).

3.2 Клиническое значение метилирования изучаемых генов микроРНК при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

3.2.1 Ассоциация метилирования генов семейства микроРНК miR-34 с особенностями клинического течения заболевания у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

На основании историй болезни и данных амбулаторных карт пациентов была проведена оценка ассоциации метилирования изучаемых генов с особенностями клинического течения заболевания. Результаты анализа представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Сравнение клинических характеристик пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой при условии наличия и отсутствия метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*

Клинические характеристики	Вся группа (n = 73) Абс. (%)	<i>MIR-34A</i> Абс. (%)		<i>MIR-34B/C</i> Абс. (%)	
		М (n = 20)	НМ (n = 53)	М (n = 45)	НМ (n = 28)
Пол	—	p = 0,100		p = 0,698	
М	36 (49,3)	13 (65,0)	23 (43,4)	23 (51,1)	13 (46,4)
Ж	37 (50,7)	7 (35,0)	22 (56,6)	22 (48,9)	15 (53,6)
Возраст (лет)	—	p = 0,051		p = 0,241	
≤ 60	46 (63,0)	9 (45,0)	37 (69,8)	26 (57,8)	20 (71,4)
> 60	27 (37,0)	11 (55,0)	16 (30,2)	19 (42,2)	8 (28,6)
ОСС по шкале ECOG	—	p = 0,758		p = 0,064	
≤ 1	35 (47,9)	9 (45,0)	26 (49,1)	26 (57,8)	9 (32,1)
≥ 2	38 (52,1)	11 (55,0)	27 (50,9)	19 (42,2)	19 (67,9)
Стадия	—	p = 0,513		p = 0,068	
I	1 (1,3)	1 (5,0)	0 (0)	1 (2,2)	0 (0)
II	4 (5,8)	1 (5,0)	3 (5,6)	4 (8,8)	0 (0)
III	11 (15,1)	2 (10,0)	9 (16,9)	9 (20,0)	2 (7,1)
IV	57 (77,8)	16 (80,0)	41 (77,5)	31 (69,0)	26 (92,9)

Продолжение таблицы 8

Клинические характеристики	Вся группа (n = 73) Абс. (%)	MIR-34A Абс. (%)		MIR-34B/C Абс. (%)	
		М (n = 20)	НМ (n = 53)	М (n = 45)	НМ (n = 28)
Экстранодальное поражение	—	p = 0,279		p = 0,509	
≥ 2 областей	14 (19,1)	5 (25,0)	9 (16,9)	9 (20,0)	5 (17,9)
Поражение костного мозга	—	p = 0,832		p = 0,785	
есть	17 (23,3)	5 (25,0)	12 (22,6)	10 (22,2)	7 (25,0)
МПИ (баллов)	—	p = 0,002		p = 0,667	
0–2	29 (39,7)	2 (10,0)	27 (53,6)	17 (37,8)	12 (42,9)
3–5	44 (60,3)	18 (90,0)	26 (46,4)	28 (62,2)	16 (57,1)
Примечание: М – метилированный, НМ – неметилированный, ОСС – общий соматический статус, ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group, МПИ – международный прогностический индекс, ЛДГ – лактатдегидрогеназа					

Полученные данные показали наличие значимой тенденции ($p = 0,051$) к большей частоте выявления метилирования *MIR-34A* у пациентов с ДВККЛ пожилого и старческого возраста. Так в подгруппе пациентов в возрасте 60 лет и старше метилирование было обнаружено в 2 раза чаще в сравнении с группой более молодых пациентов: 11 / 27 (40,7 %) против 9 / 46 (19,6 %).

Также среди больных с метилированием *MIR-34A* высокую или промежуточную высокую группу риска, согласно Международному прогностическому индексу (МПИ), имели 90 % (18 / 20, $p = 0,002$), против 46,4 %, (26 / 53) в подгруппе больных без метилирования данного гена.

Различия между подгруппами пациентов с метилированным и неметилированным геном *MIR-34A* по таким параметрам, как половая принадлежность ($p = 0,100$); стадия заболевания ($p = 0,513$); наличие двух и более участков экстранодального поражения ($p = 0,279$); частота поражения костного мозга ($p = 0,279$); общесоматический статус по ECOG ($p = 0,758$) не выявлены.

Распределение обследованных по полу и возрасту ($p = 0,698$ и $p = 0,241$ соответственно), общесоматическому статусу ($p = 0,064$), распространенности

опухоли ($p = 0,068$), частоте множественных экстранодальных поражений и вовлечения костного мозга ($p = 0,509$ и $p = 0,785$, соответственно), группам риска по МПИ ($p = 0,667$) в подгруппах пациентов с метилированным и неметилированным статусом гена *MIR-34B/C* не различалось.

3.2.2 Анализ ассоциации метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2* с особенностями клинического течения заболевания у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Результаты оценки ассоциации метилирования *MIR-203* и *MIR-129-2* с особенностями клинического течения заболевания у больных ДВККЛ представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Сравнение клинических характеристик пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой с метилированием и без метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2*

Клинические характеристики	<i>MIR-203</i> Абс. (%)		<i>MIR-129-2</i> Абс. (%)	
	М (n = 48)	НМ (n = 25)	М (n = 49)	НМ (n = 24)
Пол	$p = 0,101$		$p = 0,100$	
М	27 (56,3)	9 (36,0)	23 (46,9)	13 (54,2)
Ж	21 (43,7)	16 (64,0)	26 (53,1)	11 (45,8)
Возраст (лет)	$p = 0,900$		$p = 0,950$	
≤ 60	30 (62,5)	16 (64,0)	31 (63,3)	15 (62,5)
> 60	18 (37,5)	9 (36,0)	18 (36,7)	9 (37,5)
ОСС	$p = 0,617$		$p = 0,457$	
≤ 1	22 (55,8)	13 (52,0)	22 (44,9)	13 (54,2)
≥ 2	26 (44,2)	12 (48,0)	27 (55,1)	11 (45,8)
Стадия	0,095		$p = 0,105$	
I	1 (2,0)	0 (0)	1(2,0)	0 (0)
II	4 (8,3)	0 (0)	4 (8,2)	0 (0)
III	9 (18,8)	2 (8,0)	8 (1,6)	3 (12,5)
IV	34 (70,9)	23 (92,0)	36 (88,2)	21 (87,5)

Продолжение таблицы 9

Клинические характеристики	MIR-203 Абс. (%)		MIR-129-2 Абс. (%)	
	М (n = 48)	НМ (n = 25)	М (n = 49)	НМ (n = 24)
Экстранодальное поражение	p = 0,898		p = 0,703	
≥ 2 областей	9 (18,8)	5 (20,0)	10 (20,4)	4 (16,7)
Поражение костного мозга	p = 0,492		p = 0,156	
есть	10 (20,8)	7 (28,0)	9 (18,4)	8 (33,3)
МПИ (баллов)	p = 0,639		p = 0,435	
0–2	20 (41,7)	9 (36,0)	21 (42,9)	8 (33,3)
3–5	28 (58,3)	16 (64,0)	28 (57,1)	16 (66,7)
Примечание: М – метилированный, НМ – неметилированный, ОСС – общий соматический статус, МПИ – международный прогностический индекс, ЛДГ – лактатдегидрогеназа.				

Как видно, не было получено достоверных различий по половому ($p = 0,101$ и $p = 0,100$), возрастному составу ($p = 0,900$; $p = 0,950$), соматической отягощенности ($p = 0,617$; $p = 0,457$), стадии заболевания ($p = 0,095$; $p = 0,105$), числу экстранодальных поражений ($p = 0,509$; $p = 0,703$), частоте вовлечения в опухолевый процесс костного мозга ($p = 0,492$; $p = 0,156$) и группам прогноза ($p = 0,639$; $p = 0,435$) согласно МПИ у больных ДВККЛ с метилированным и неметилированным статусом генов *MIR-203* и *MIR-129-2* соответственно.

3.3 Ассоциация метилирования генов микроРНК *mir-34a*, *miR-34b/c*, *miR-129* и *miR-203* с данными лабораторно-инструментального обследования больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

3.3.1 Ассоциация метилирования изучаемых генов микроРНК с иммуногистохимическими характеристиками диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Из 54 образцов, для которых был определен иммуногистохимический вариант ДВККЛ, 35 были отнесены к GCB-like и 19 – к nonGCB-like подтипу. При

этом метилирование *MIR-34A* чаще выявлялось в подгруппе GCB-like: 8 / 19 (42,1 %) против 6 / 35 (17,1 %, $p = 0,046$) в подгруппе nonGCB-like подтипа соответственно.

Ассоциация метилирования генов микроРНК *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* с пролиферативной активностью опухолевых клеток больных ДВККЛ была оценена в 81 образце. Показано, что в анализируемой выборке Ki-67 экспрессировался в широком диапазоне значений от 8 до 100 %.

В подгруппах больных с метилированным статусом генов *MIR-203*, *MIR-129-2* и *MIR-34B/C* в сравнении с подгруппами без метилирования данных генов экспрессию Ki-67 45 % опухолевых клеток и более имели 71,6 % против 42,9 % ($p = 0,011$), 70 % против 38,1 % ($p = 0,013$) и 72,5 % против 43,3 % ($p = 0,010$) образцов соответственно.

При этом в случаях с сочетанным метилированием *MIR-34B/C* и *MIR-203* уровень экспрессии Ki-67 70 % опухолевых клеток и более встречался в 1,8 раза чаще, чем в случаях с отсутствием метилирования *MIR-34B/C* и *MIR-203* (28,8 % против 15,8 %, $p = 0,023$ соответственно) (Таблица 10).

Достоверной зависимости иммуногистохимического варианта ДВККЛ от статуса метилирования генов *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2*, а также уровня экспрессии Ki-67 от статуса метилирования *MIR-34A* обнаружено не было (Таблица 10).

Таблица 10 – Иммуногистохимические показатели образцов диффузной В-крупноклеточной лимфомы в зависимости от статуса метилирования изучаемых генов микроРНК

Параметры	<i>MIR-34B/C</i> и <i>MIR-203</i>		<i>MIR-34A</i>		<i>MIR-34B/C</i>		<i>MIR-203</i>		<i>MIR-129-2</i>	
	М	НМ	М	НМ	М	НМ	М	НМ	М	НМ
ИГХ Ki67	p < 0,001		p = 0,783		p = 0,010		p = 0,011		p = 0,013	
≥ 45 % клеток Абс. (%)	32 / 54 (59,3)	6/38 (15,8)	16 / 25 (64,0)	34,56 (60,7)	37 / 51 (72,5)	13 / 30 (43,3)	38 / 53 (71,6)	12 / 28 (42,9)	42 / 60 (70,0)	8 / 21 (38,1)
ИГХ Ki67	p = 0,023		p = 0,111		p = 0,018		p = 0,183		p = 0,110	
≥ 70 % клеток Абс. (%)	21 / 54 (28,8)	6 / 38 (15,8)	10 / 25 (40,0)	33 / 56 (58,9)	30 / 51 (58,8)	13 / 30 (43,3)	31 / 53 (58,5)	12 / 28 (42,8)	35 / 60 (58,3)	8 / 21 (38,1)
Подтип	—		p = 0,046		p = 0,541		p = 0,851		p = 0,851	
Non-GCB-like Абс. (%)	—	—	6 / 35 (17,1)	29 / 35 (82,9)	21 / 35 (60)	14 / 35 (40,0)	23 / 35 (65,7)	12 / 35 (34,3)	23 / 35 (65,7)	12 / 35 (34,3)
GCB-like Абс. (%)	—	—	8 / 19 (42,1)	11 / 19 (57,9)	13 / 19 (68,4)	6 / 19 (31,6)	12 / 19 (63,2)	7 / 19 (36,8)	12 / 19 (63,1)	7 / 19 (36,8)

3.3.2 Ассоциация метилирования изучаемых генов микроРНК с лабораторными параметрами больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

При анализе острофазовых реакций была выявлена ассоциация увеличения уровня СРБ с метилированным статусом *MIR-203*. Так, у больных ДВККЛ с метилированием гена *MIR-203* содержание в сыворотке крови СРБ, превышающие нормальный уровень, было обнаружено у 33 / 48 (68,7 %) против 7 / 25 (28 %, $p < 0,001$) в подгруппе пациентов без метилирования.

У пациентов ДВККЛ с метилированием гена *MIR-34B/C* чаще регистрировалось повышение СОЭ в сравнении с больными без метилирования данного гена: 36 / 45 (80 %) против 16 / 28 (57,1 %, $p = 0,036$) соответственно.

В то же время отмечалась тенденция к более частому выявлению увеличения концентрации ЛДГ по данным биохимического анализа крови у больных с метилированием гена *MIR-34A* 75 % (15 / 20, $p = 0,064$) против 50,9 % (27 / 53) у пациентов без метилирования.

По результатам лабораторных методов исследования у пациентов в подгруппе с метилированием *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* не было выявлено значимых отличий в сравнении с группой без метилирования данного гена (Таблица 11) частоты регистрации анемии ($p = 0,338$, $p = 0,346$, $p = 0,774$, $p = 0,441$), тромбоцитопении ($p = 0,458$, $p = 0,563$, $p = 0,094$, $p = 0,941$), а также среднему уровню фибриногена ($p = 0,220$, $p = 0,884$, $p = 0,488$, $p = 0,802$), СРБ ($p = 0,235$, $p = 0,541$,) и щелочной фосфатазы ($p = 0,350$, $p = 0,725$, $p = 0,331$, $p = 0,282$) соответственно.

Таблица 11 – Сравнение лабораторных показателей у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой с метилированием и без метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*

Клинические характеристики	<i>MIR-34A</i> Абс. (%)		<i>MIR-34B/C</i> Абс. (%)	
	М (n = 20)	НМ (n = 53)	М (n = 45)	НМ (n = 28)
Гемоглобин	p = 0,338		p = 0,346	
< 120 г/л	8 (40)	15 (28,3)	16 (35,6)	7 (25)
Тромбоциты	p = 0,458		p = 0,563	
Тр < 100 × 10 ⁹ /л	2 (10,0)	5 (9,4)	5 (11,1)	3 (10,7)
СОЭ	p = 0,111		p = 0,036	
> 15 мм/ч	17 (85,0)	35 (66,0)	36 (80,0)	16 (57,1)
Фибриноген	p = 0,220		p = 0,884	
> 4 г/л	6 (30,0)	9 (17,0)	9 (20,0)	6 (21,4)
С-реактивный белок	p = 0,235		p = 0,541	
> 4 г/л	9 (45,0)	16 (30,1)	17 (37,8)	8 (28,6)
ЛДГ	p = 0,064		p = 0,305	
> 450 Ед/л	15 (75,0)	27 (50,9)	28 (62,2)	14 (50,0)
Щелочная фосфатаза	p = 0,350		p = 0,725	
> 270 ЕД/л	13 (65,0)	28 (52,8)	26 (57,8)	15 (53,6)
Примечание: М – метилированный, НМ – неметилированный, СОЭ – скорость оседания эритроцитов.				

Таблица 12 – Сравнение лабораторных показателей у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой с метилированием и без метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2*

Клинические характеристики	<i>MIR-203</i> Абс. (%)		<i>MIR-129-2</i> Абс. (%)	
	М (n = 48)	НМ (n = 25)	М (n = 49)	НМ (n = 24)
Гемоглобин	p = 0,774		p = 0,441	
< 120 г/л	15 (31,3)	7 (28,0)	14 (28,6)	9 (37,5)
Тромбоциты	p = 0,094		p = 0,941	
Тр < 100 × 10 ⁹ /л	3 (6,3)	4 (16)	4 (8,2)	3 (12,5)

Продолжение таблицы 12

Клинические характеристики	MIR-203 Абс. (%)		MIR-129-2 Абс. (%)	
	М (n = 48)	НМ (n = 25)	М (n = 49)	НМ (n = 24)
СОЭ	p = 0,525		p = 0,669	
> 15 мм/ч	36 (75,0)	17 (68,0)	37 (75,5)	17 (70,8)
Фибриноген	p = 0,488		p = 0,802	
> 4 г/л	37 (77,0)	21 (84,0)	40 (81,6)	19 (79,2)
С-реактивный белок	p < 0,001		p = 0,686	
> 4 г/л	33 (68,8)	7 (28,0)	33 (67,3)	15 (62,5)
ЛДГ	p = 0,202		p = 0,270	
> 450 Ед/л	23 (47,9)	19 (36,0)	26 (57,1)	16 (66,7)
Щелочная фосфатаза	p = 0,331		p = 0,282	
> 270 ЕД/л	23(47,9)	9 (36,0)	20 (40,8,0)	13 (54,2)
Примечание: М – метилированный, НМ – неметилированный, СОЭ – скорость оседания эритроцитов.				

3.4 Прогностическое значение метилирования изучаемых генов микроРНК

Выше была описана ассоциация метилирования генов *MIR-34A* с неблагоприятными группами прогноза по МПИ, а также метилирования генов *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* с уровнем экспрессии Ki-67 более 45 % и 70 % опухолевых клеток больных ДВККЛ. Для каждой из ассоциаций производился расчёт ОШ с 95 %-м ДИ (Рисунок 12).

Было показано, что у пациентов с метилированием *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* в сравнении с больными без метилирования данных генов вероятность выявления экспрессии Ki-67 45 % и более опухолевых клеток была в 2,8 (ОШ = 2,846, 95 %-й ДИ (1,339; 8,923); 5,3 (ОШ = 5,250, 95 %-й ДИ (1,341; 10,722) и 3,2 (ОШ = 3,167, 95 %-й ДИ (1,296; 8,803) раза выше соответственно.

В подгруппе больных с сочетанным метилированием *MIR-34B/C* и *MIR-203* вероятность выявления экспрессии Ki-67 45 % и более опухолевых клеток была выше, чем в подгруппе лиц без метилирования данных генов, в 5,3 раза (ОШ = 5,333, 95 %-й ДИ (2,777; 21,667), тогда как экспрессии Ki-67 70 % и более

опухолевых клеток – в 3,5 раза (ОШ = 3,500, 95 %-й ДИ (1,212; 9,501)).

В то же время вероятность попадания больных в группу промежуточного/высокого или высокого риска по МПИ была в 8,0 раз выше у пациентов с метилированием гена *MIR-34A* в сравнении с пациентами без такового (ОШ = 8,036, 95 %-й ДИ (1,693; 38,136)).

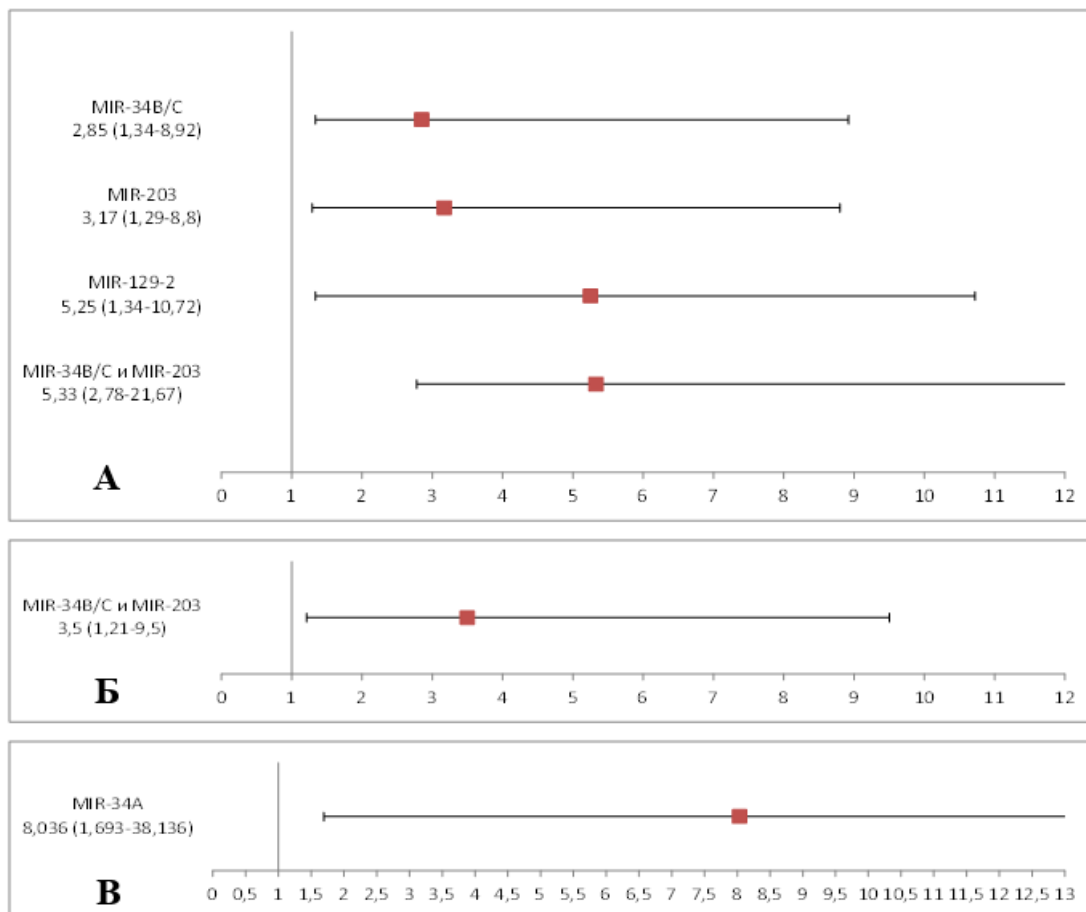


Рисунок 12 – Вероятность выявления у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой экспрессии Ki67 45 % и более опухолевых клеток (А), Ki67 70 % и более опухолевых клеток (Б), и неблагоприятного прогноза по МПИ (В) в зависимости от статуса метилирования генов анализируемых микроРНК

Далее была проанализирована ассоциация метилирования изучаемых генов микроРНК с частотой достижения ремиссии и показателями общей выживаемости больных ДВККЛ группы исследования (Таблица 13).

Таблица 13 – Результаты анализа эффективности терапии в группе больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Параметры	МПИ, баллы			MIR-34A			MIR-34B/C			MIR-203			MIR-129-2		
	0–2	3–5	p	М	НМ	p	М	НМ	p	М	НМ	p	М	НМ	p
ЧР Абс. (%)	24 / 29 (82,8)	28 / 44 (63,5)	0,078	11 / 20 (55,0)	41 / 53 (77,4)	0,060	33 / 45 (73,3)	19 / 28 (67,8)	0,616	35 / 48 (72,9)	17 / 25 (68,0)	0,660	36 / 49 (73,5)	16 / 24 (66,7)	0,547
5-летняя ОВ Мес.	65,5	43,2	0,043	40	56,6	0,162	53,3	50,0	0,699	54,2	48,0	0,590	57,1	41,7	0,269
Примечание: ЧР – Частота достижения ремиссии, ОВ – общая выживаемость, М – метилированный, НМ – неметилированный, МПИ – международный прогностический индекс.															

Было показано, что больные ДВККЛ с метилированием *MIR-34A* в сравнении с больными с неметилированным статусом гена демонстрировали выраженную тенденцию к снижению частоты достижения ремиссии после первой линии терапии: 55 % (11 / 20) против 77,4 % (41/53, $p = 0,060$).

Также отмечалась тенденция к ухудшению показателей 5-летней общей выживаемости больных с метилированием *MIR-34A* ($p = 0,162$), она составила 40 % против 56,6 % для больных с отсутствием метилирования данного гена (Рисунок 13). В то же время общая выживаемость пациентов не зависела от статуса метилирования других изучаемых генов микроРНК.

Статус метилирования генов *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* не имел связи с эффективностью терапии ($p = 0,616$, $p = 0,660$ и $p = 0,540$ соответственно).

В свою очередь, в анализируемой выборке пациентов с ДВККЛ наибольшее влияние на непосредственные и отдаленные результаты терапии оказывала принадлежность больных к той или иной группе прогноза по МПИ. Так, частота ремиссий после терапии по протоколу R-CHOP в подгруппах низкого и промежуточного/низкого риска составила 82,8 % (24 / 29) против 63,6 % (28 / 44, $p = 0,078$). В группе низкого и промежуточного/низкого риска по МПИ ОВ составила 65,5 %, а в группе промежуточного/высокого, высокого риска МПИ – 43,2 % ($p = 0,043$).

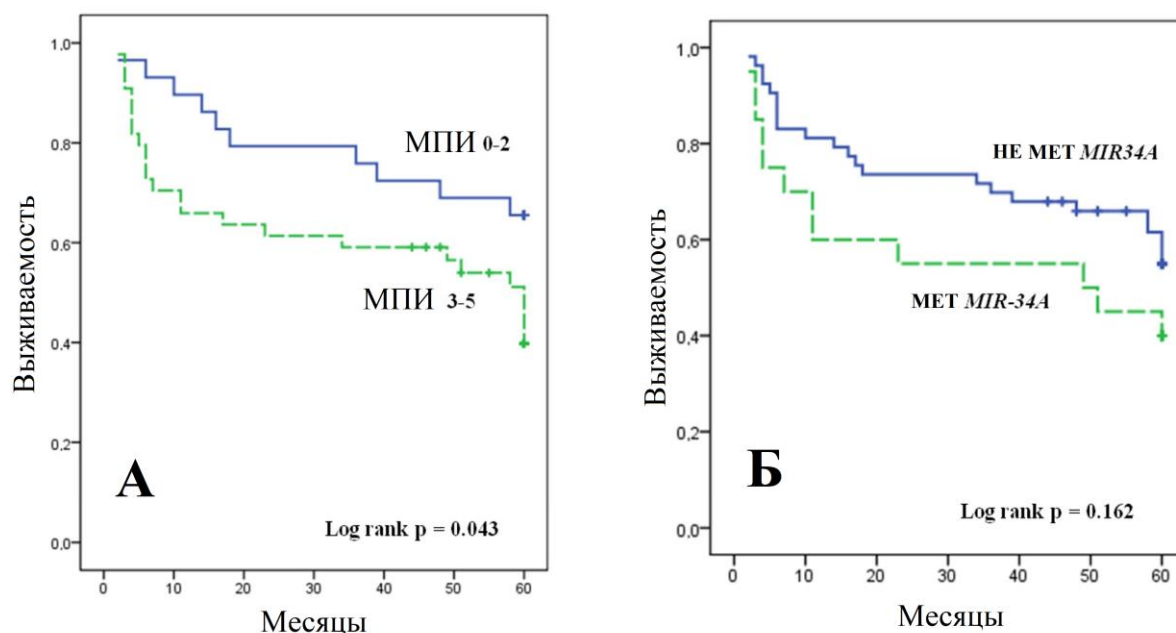


Рисунок 13 –Пятилетняя общая выживаемость пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой: А – МПИ 0–2 балла, МПИ 3–5 баллов, Б – Мет – с метилированием, Не мет – без метилирования *MIR34A*

3.5 Оценка сочетанности метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в опухолевой ткани диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Дальнейший анализ был направлен на выявление наличия ассоциации между метилированием изучаемых генов микроРНК.

На рисунке 14 представлено метилирование изучаемых генов для каждого изученного образца ДВККЛ. Как видно, отсутствие метилирования хотя бы одного из изученных генов имеет место лишь в 15 / 136 (11,0 %) случаях лимфомы, в подавляющем же большинстве случаев метилирование носило сочетанный характер.

Так, в 15 / 136 (11,1 %) случаев имело место метилирование всех 4, а в 60 / 136 (44,1 %) – 3 и в 33 / 136 (24,3 %) – 2 из проанализированных генов.

Результаты количественного анализа сочетанного метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в опухолевой ткани ДВККЛ

представлены в таблице 14. Было показано наличие достоверной связи между метилированием пар генов *MIR-203* и *MIR-129-2* ($p < 0,001$, $q = 0,002$), *MIR-34B/C* и *MIR-203* ($p = 0,006$, $q = 0,009$), *MIR-34B/C* и *MIR-129-2* ($p = 0,001$, $q = 0,002$), а также пары *MIR-34B/C* и *MIR-34A* ($p < 0,001$, $q = 0,001$).

Таблица 14 – Анализ сочетанного метилирования изученных генов микроРНК

Ген 1	Ген 2	Частота сочетанного метилирования Абс. (%)	Log2 ОШ	p	q	Связь
<i>MIR-34A</i>	<i>MIR-34B/C</i>	26 / 136 (19,1)	2,571	< 0,001	0,001	сочетание
<i>MIR-129-2</i>	<i>MIR-203</i>	68 / 136 (50,0)	1,880	< 0,001	0,002	сочетание
<i>MIR-34B/C</i>	<i>MIR-129-2</i>	58 / 136 (42,6)	1,723	0,001	0,002	сочетание
<i>MIR-34B/C</i>	<i>MIR-203</i>	57 / 136 (41,9)	1,426	0,006	0,009	сочетание
<i>MIR-34A</i>	<i>MIR-203</i>	22 / 136 (16,2)	0,411	0,339	0,407	сочетание
<i>MIR-34A</i>	<i>MIR-129-2</i>	21 / 136 (15,4)	0,192	0,468	0,468	сочетание

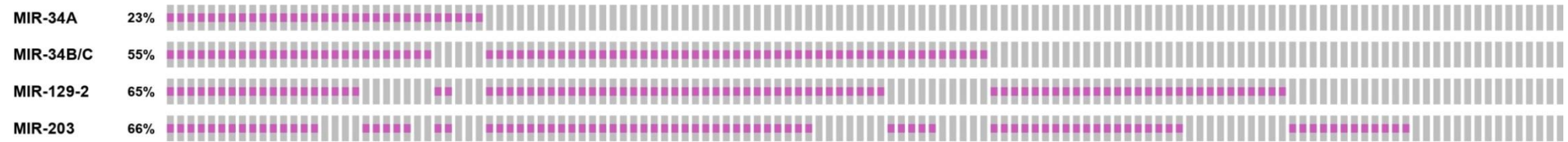


Рисунок 14 – Графическое изображение статуса метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в образцах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы исследования

3.6 Мутационный статус гена *TP53* в группе исследования

При анализе спектра мутаций в гене *TP53* было обнаружено 35 типов мутаций, расположенных в кодирующей последовательности 5–10 экзонов и прилежащих участков интронов: 21 – в кодирующей и 12 – в интронных последовательностях гена *TP53* (Таблица 15), а также нарушения в 3'-нетранслируемой области. Суммарное число находок – 53.

У 10 / 136 (7,4 %) человек были выявлены множественные aberrации.

Неоднократно в группе исследования отмечены: миссенс замены p.W146R, p.T155I и p.V273C, а также нонсенс мутация p.R213X* и c.1175T>G замена, приводящая к нарушению полиаденилирования. Все мутации кроме p.A189Pfs (98,1 %) являлись однонуклеотидными заменами.

Распределение мутаций по типам было следующее: разрушение сигнала полиаденилирования – 9 / 53 (17,0 %); 12 / 53 (22,6 %) – интронных с неизвестным эффектом; 21 / 53 (39,6 %) – миссенс; 7 / 53 (13,2 %) – сэймсенс; 2 / 53 (3,8 %) – нонсенс мутации и по 1 / 53 (1,9 %) – мутации, приводящие к нарушению сплайсинга молекулы РНК и к сдвигу рамки считывания в гене *TP53*.

Распределение мутаций по последовательности *TP53* представлено на рисунке 15. Практически все миссенс замены в кодирующей части гена располагались в ДНК-связывающем домене.

Биоинформационный анализ с применением предикторных программ показал, что около 80 % из них являлись возможно/вероятно патогенными (Таблица 16) и ранее были описаны при злокачественных новообразованиях (Таблица 17).

Таблица 15 – Характеристика результатов секвенирования гена *TP53*

Тип мутаций мутации						
3'-НТО	интронные		кодирующей последовательности			
	с неизвестным эффектом	влияние на плайсинг	нонсенс	сдвиг рамки считывания	миссенс	синонимичные
c.1175T > G#	IVS4-30T > C* IVS5 + 43G > T IVS5-17T > C IVS7 + 31G > C* IVS8 + 10C > A* IVS8 + 20A > G IVS8 + 37A > G IVS9 + 12T > C*	IVS6-36G > C	p.R213X*	p.A189Pfs	p.L130F p.W146R* p.T155I* p.R156C p.M160V p.V173L p.H178D p.R196Q p.R197G p.T211S p.V218A p.G244S p.R249S p.V272E p.V273C* p.A276V p.E285Q p.G293R	p.V157V p.S166S p.H179H p.L252L p.V272V p.G302G p.A307A

Примечание: НТО – не транслируемая область; * – звездочкой отмечены мутации, встреченные в группе исследования дважды; # – отмечена мутация, встречающаяся в группе исследования 9 раз.

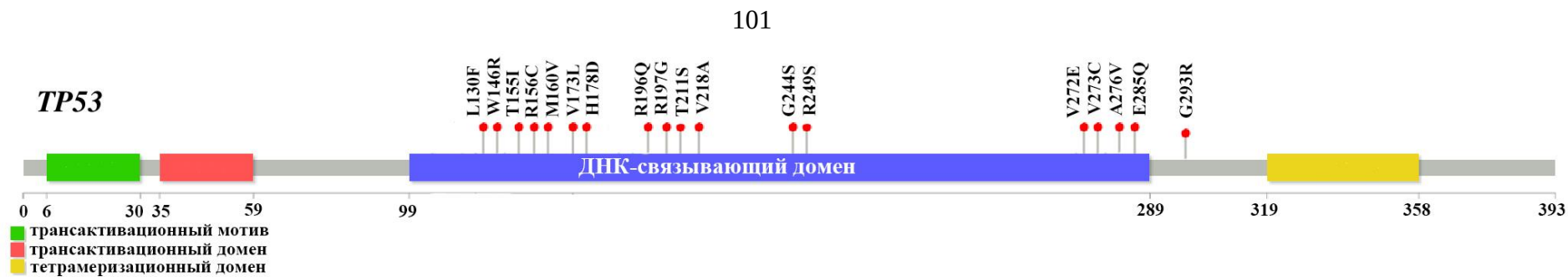


Рисунок 15 – Распределение миссенс мутаций в гене *TP53*, выявленных в группе исследования

Таблица 16 – Анализ патогенности выявленных миссенс мутаций в гене *TP53* при помощи предикторных программ

Изменение в белке	SIFT	PolyPhen2	LRT	MutationAssessor
p.L130F	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.W146R	не патогенная	не патогенная	не патогенная	не патогенная
p.T155I	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.R156C	не патогенная	не патогенная	патогенная	не патогенная
p.M160V	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.V173L	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.H178D	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.R196Q	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.V197G	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.T211S	не патогенная	не патогенная	патогенная	не патогенная
p.V218A	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.G244S	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.R249S	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.V272E	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.R273C	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.A276V	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.E285Q	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
p.G293R	не патогенная	не патогенная	не патогенная	не патогенная

Таблица 17 – Связь мутаций, выявленных в кодирующей части гена *TP53*, со злокачественными опухолями

Мутация	Экзон	Злокачественное новообразование
p.L130F	5	Опухоли эпителиальных тканей и ЦНС
p.W146R	5	Диффузная В-крупноклеточная лимфома
p.T155I	5	Хронический лимфолейкоз, НК/Т-клеточная лимфома
p.R156C	5	Острый миелоидный лейкоз
p.M160V	5	Опухоли эпителиальных тканей
p.V173L	5	Хронический лимфолейкоз, Диффузная В-крупноклеточная лимфома
p.H178D	5	Опухоли эпителиальных тканей

Продолжение таблицы 17

Мутация	Экзон	Злокачественное новообразование
p.R196Q	6	Острый миелоидный лейкоз, аденокарцинома прямой кишки, меланома радужки, плоскоклеточная карцинома тимуса
p.V197G	6	Т-клеточная лимфома, плоскоклеточная карцинома легких, карцинома почки
p.T211S	6	Опухоли эпителиальных тканей
p.V218A	6	Опухоли эпителиальных тканей
p.G244S	7	Опухоли эпителиальных тканей
p.R249S	7	Хронический лимфолейкоз, гепатоцеллюлярная карцинома, аденокарцинома толстой кишки
p.V272E	8	Диффузная В-крупноклеточная лимфома
p.R273C	8	Опухоли ЦНС, Мантийно-клеточная лимфома, Хронический лимфолейкоз, Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома
p.A276V	8	Опухоли эпителиальных тканей
p.E285Q	8	Опухоли эпителиальных тканей, тератома яичника
p.G293R	8	Опухоли эпителиальных тканей

3.7 Оценка сочетанности метилирования изучаемых генов микроРНК и мутаций в гене *TP53* у больных с диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Дальнейший анализ был направлен на выявление связи между метилированием изучаемых генов микроРНК и мутационным статусом гена *TP53*, результаты которого представлены в таблице 18 и на рисунке 16.



Рисунок 16 – Графическое изображение статуса метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в образцах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Подавляющая часть ДВККЛ 126 / 136 (93 %) имели те или иные изменения. При этом было показано, что метилирование генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A*, *MIR-34B/C* и мутации *TP53* являются независимыми событиями, имеющими склонность к взаимному исключению.

Таблица 18 – Анализ сочетанного выявления мутации в *TP53* и метилирования генов изучаемых p53-чувствительных микроРНК

Метилирование	Мутации	Частота сочетанного выявления Абс.	Log2 ОШ	р	q	Связь
<i>MIR-34A</i>	<i>TP53</i>	5	–0,624	0,297	0,424	взаимное исключение
<i>MIR-129-2</i>	<i>TP53</i>	18	–0,269	0,412	0,458	взаимное исключение
<i>MIR-34B/C</i>	<i>TP53</i>	14	–0,507	0,264	0,424	взаимное исключение
<i>MIR-203</i>	<i>TP53</i>	17	–0,600	0,225	0,424	взаимное исключение

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диффузная В-крупноклеточная лимфома является биологически гетерогенным типом агрессивных неходжкинских лимфом. Несмотря на объединение в одну нозологическую форму, опухоль характеризуется значительным разнообразием не только морфологических, молекулярно-генетических, иммунофенотипических характеристик, клинических проявлений, но и ответа на терапию [233]. Так, около 40 % пациентов с ДВККЛ при применении в первой линии терапии ритуксимаба в комбинации с протоколом СНОР имеют неудачи лечения (отсутствие ответа, недостижение полного ответа или частичный ответ, сохраняющийся на протяжении менее 6 месяцев). Установлено также, что у пациентов с рефрактерностью к терапии по протоколу R-СНОР медиана ОВ составляет менее 12 месяцев [310].

В последнее десятилетие возросла роль биологических особенностей опухоли в прогнозировании течения ДВККЛ. Так, по профилю экспрессии генов в опухолевом субстрате больных ДВККЛ были идентифицированы три прогностически различных подгруппы данного варианта неходжкинских лимфом: из активированных В-клеток (ABC), из В-клеток зародышевого центра (GCB) и неклассифицированные варианты [77]. Расширение спектра включенных в анализ параметров (мутационного спектра и хромосомных поломок) позволило Chapuy et al. и Schmitz et al. выделить еще большее число подтипов опухоли с различным прогнозом [216]. Вместе с тем, применяемые авторами описанных выше работ молекулярно-генетические подходы, такие как профилирование экспрессии генов на микрочипах и полноэкзомное высокопроизводительное секвенирование, являются малодоступными в практическом здравоохранении как в нашей стране, так и за рубежом в силу технической сложности и дороговизны.

В связи с этим, актуальным направлением исследований в современной онкогематологии является поиск более доступных молекулярно-генетических факторов прогноза течения ДВККЛ [67].

Важным прогностическим маркером, широко изучаемым в последние

десятилетия в онкологии в целом и в онкогематологии в частности, является функциональный статус гена *TP53* [308]. Помимо контроля клеточного цикла и апоптоза, кодируемый им белок p53 подавляет развитие опухоли, регулируя дифференцировку клеток, репарацию ДНК, антиоксидантную защиту и метаболизм [311]. К другим механизмам противоопухолевой защиты p53 относятся модулирование активности сигнальных путей цитокиновых рецепторов и экспрессии на поверхности клеток молекул, необходимых для презентации эндогенных антигенов и иммунного распознавания [274].

Вместе с тем, p53 опосредует эффект на злокачественные клетки противоопухолевых агентов различной молекулярной направленности. Нарушение апоптоза при дефиците функции данного белка может способствовать развитию фенотипа лекарственной резистентности опухоли и выживанию клеток с генетическими нарушениями. Именно поэтому оценка мутационного статуса *TP53* широко используется для стратификации онкологических пациентов на прогностические подгруппы [49, 116, 222, 246]. Любой из мутантных вариантов белка может изменять его структуру, и, в конечном итоге, повышать и/или снижать определенный тип активности p53, а также возникновению у него онкогенных свойств [127, 228].

Вместе с тем, дальнейшего изучения требуют механизмы устойчивости ДВККЛ к стандартной терапии в случаях с отсутствием мутаций в *TP53*, которые могут заключаться в нарушениях работы p53-сигнальной цепи за счет повреждения нижележащих ее участников [161, 273].

Так, белок p53 является транскрипционным фактором и во многом реализует свои эффекты, регулируя экспрессию генов-мишеней, главным образом, путем прямого связывания со специфическими последовательностями ДНК, называемыми p53-чувствительными элементами и расположенными в промоторах генов.

Данные литературных источников за последние десять лет свидетельствуют, что мутантные варианты p53, помимо приобретения способности к активации генов микроРНК, имеющих онкогенные эффекты,

например, активирующих процессы метастазирования и химиорезистентность злокачественных клеток, утрачивают способность в активации транскрипции генов онкосупрессорных микроРНК [110]. Таким образом, в опухоли с мутациями в *TP53* возникает сложный дисбаланс микроРНК и формируется специфический профиль экспрессии данных молекул.

Все больше данных свидетельствуют о том, что p53 проявляет свою онкосупрессорную функцию и опосредует противоопухолевые эффекты препаратов посредством регуляции транскрипции и/или созревания miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129 и miR-203 [145, 288, 291]. Данные микроРНК вовлечены также в механизмы положительной регуляции экспрессии *TP53*, что способствует совместному усилению эффектов, контролю и настройке сигналов в ответ на генотоксический стресс. Известно, что микроРНК miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129 и miR-203 являются онкосупрессорными, и их экспрессия снижена при лимфомах [288].

При ДВККЛ мутантный статус *TP53* может быть одним из потенциальных, но не единственным механизмом нарушения экспрессии miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129 и miR-203. Косвенно об этом свидетельствует тот факт, что в опухолях с мутациями в данном гене не происходит общего снижения уровня всех регулируемых им мишеней, экспрессия одних из них нарушается в гораздо большей степени, чем других [109]. Таким образом, более глубокое понимание лежащих в основе развития ДВККЛ молекулярных нарушений, затрагивающих p53-сигнальный путь, имеет важное значение для понимания механизмов формирования, прогрессии данной опухоли и ее чувствительности к лечению [282].

В связи с этим, целью данного исследования было изучить частоту, сочетанность и клиническое значение метилирования генов микроРНК *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой, а также его связь с абберрациями в гене *TP53*.

Выбор исследования статуса метилирования анализируемых генов микроРНК связан с тем, что, согласно данным литературы, возникновение мутаций в генах микроРНК является крайне редким событием при

злокачественных новообразованиях. Кроме того, гены *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* расположены вне локусов рекуррентных хромосомных поломок, выявляемых при цитогенетическом исследовании лимфомных клеток, а нарушение гомеостаза метилирования ДНК – важный механизм эволюции лимфопролиферативных заболеваний [72, 96, 194, 325]. Вместе с тем, метилирование генов *TP53*-чувствительных онкосупрессорных микроРНК при ДВККЛ до настоящего времени является наименее изученным аспектом.

Понимание причин, лежащих в основе нарушения экспрессии *miR-34a*, *miR-34b*, *miR-34c*, *mir-129* и *miR-203* при ДВККЛ, помимо расширения фундаментальных знаний о биологии данной опухоли, может помочь в клинической практике при диагностике лимфомы, стратификации пациентов на группы риска неэффективности стандартного лечения и способствовать разработке новых терапевтических стратегий.

Для достижения указанной цели было поставлено несколько задач. Первая из них заключалась в определении частоты метилирования *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в опухолевой ткани больных ДВККЛ, которое изучалось методами метил-специфичной ПЦР и метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения.

Частота метилирования *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129* и *MIR-203* в исследуемых образцах опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ составляла 23 %, 55 %, 65 % и 66 % соответственно. Полученные результаты согласуются с данными Asmar F. et al. относительно гена *MIR-34A* (28 %), но для *MIR-34B/C* описанная в работе данных авторов частота метилирования гена была 78 %, что выше полученного в диссертационном исследовании значения [73].

Интересно, что метилирование *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в опухолевой ткани первичной лимфомы ЦНС было обнаружено с еще большей частотой, а именно 57,0 % и 95,2 %, соответственно [306]. Эти данные подчеркивают важность изучения молекулярно-генетических особенностей каждого подтипа опухоли и валидации полученных данных на различных выборках [254].

Обращал на себя внимание тот факт, что метилирование *MIR-34A* было

наименее частым. Возможным объяснением данного факта может быть реализация в опухолевой ткани ДВККЛ других механизмов нарушения экспрессии *miR-34*, например, микроделеция кодирующего ее гена. Так, по данным C-Bioportal for cancer genomics database [98], из 48 профилированных с применением микрочипов Affymetrix SNP 6.0 образцов ДВККЛ утрату локуса расположения гена *MIR-34A* на 1p36.22 хромосомы имели 21 % случаев, тогда как утрата локусов *MIR-34B/C* на 11q23.1, *MIR-129-2* на 11p11.2 и *MIR-203* на 14q32.33 встречалась лишь в 4 %, 6 % и 13 % образцов, соответственно.

В двух более ранних исследованиях анализ метилирования *MIR-203* и *MIR-129-2* проводили лишь на небольших выборках гематологических опухолей [55, 92]. Авторами было показано, что в смешанных группах образцов В-клеточных неходжкинских лимфом частота метилирования составила 68,9 % для *MIR-129-2* и 40,9 % для *MIR-203*. Однако количество проанализированных образцов ДВККЛ в данных работах было небольшим (2 и 13 образцов соответственно). Таким образом, полученные в диссертационном исследовании результаты являются первыми данными по частоте метилирования в опухолевой ткани ДВККЛ генов, кодирующих микроРНК *mir-129* и *miR-203*.

Во всех проводимых ранее исследованиях в качестве контроля использовали периферическую кровь доноров или нормальный костный мозг, но не лимфоидную ткань лимфатических узлов [55, 92], что не давало понимания, являлось ли выявляемое в лимфоидной ткани пациентов с ДВККЛ метилирование опухоль-специфичным признаком.

В связи с этим второй задачей диссертационного исследования было оценить опухоль-специфичность метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в ткани пораженных лимфоузлов больных ДВККЛ. Для этого в качестве контроля было проанализировано 11 образцов пациентов с реактивными изменениями в лимфоузлах, а именно с поликлональной В-клеточной пролиферацией.

В проведенной работе не было выявлено метилирования ни одного из анализируемых генов микроРНК в биоптатах лимфоузлов пациентов с реактивной

лимфаденопатией ($p < 0,001$ для *MIR-203*, *MIR-129-2* и *MIR-34B/C*, $p = 0,075$ для *MIR-34A*). Важно отметить, что в опухолевой ткани больных лимфомой анализируемой выборки отсутствие метилирования хотя бы одного из изучаемых генов микроРНК имело место лишь в 13 % случаев ДВККЛ.

Анализ метилирования всех 4 генов позволял отличить опухолевые образцы лимфоузлов от реактивных в со специфичностью 100 % и чувствительностью 89 % ($p < 0,001$). Следовательно, метилированный статус *MIR-129-2* и *MIR-203*, а также генов семейства *miR-34* специфичен для ДВККЛ и может служить дополнительным биомаркером для дифференциальной диагностики между данной лимфомой и реактивной поликлональной В-клеточной пролиферацией.

Третьей задачей диссертационного исследования была оценка ассоциации метилирования *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* с особенностями клинического течения и эффективностью терапии ДВККЛ.

Показано наличие значимой тенденции к большей частоте выявления метилирования *MIR-34A* у пациентов с ДВККЛ пожилого и старческого возраста. Так, в подгруппе пациентов старше 60 лет метилированный статус гена встречался в 2 раза чаще, чем у более молодых лиц: 40,7 % против 19,6 %, $p = 0,051$.

Полученные данные согласуются с результатами исследования, сравнивающего уровни метилирования 38 генов-супрессоров опухолей у молодых (до 40 лет) и пожилых (старше 60 лет) пациентов с раком пищевода, молочной железы и толстой кишки. Авторами была обнаружена более высокая доля гиперметилированных генов в образцах пожилых больных [90, 174].

Также отмечалась тенденция к более частому выявлению высокого уровня лактатдегидрогеназы в сыворотке крови у пациентов с метилированием *MIR-34A* у трех четвертей (75 %) больных, тогда как у больных без метилирования лишь в 50,9 % случаев, $p = 0,064$.

Большой интерес представляют полученные данные о выраженной статистически значимой связи метилированного статуса *MIR-34A* с высокой и промежуточной/высокой группой риска, согласно Международному

прогностическому индексу: 90 % против 46,4 % ($p = 0,002$) в подгруппе больных без метилирования данного гена.

В соответствии с этим у пациентов с метилированным статусом *MIR-34A* обнаружена тенденция к меньшей частоте достижения ремиссии после первой линии терапии по протоколу R-CHOP при ДВККЛ (55,0 % против 77,4 % у лиц без метилирования, $p = 0,060$), а также ухудшение показателей 5-летней общей выживаемости (40 % против 56,6 %, $p = 0,162$) [288].

Были получены данные о большей частоте метилирования *MIR-34A* при GCB-like подтипе ДВККЛ ($p = 0,046$). Однако следует отметить, что для разделения образцов на подтипы применялся иммуногистохимический алгоритм Hans et al. Полученные данные необходимо валидировать на большей выборке больных, в том числе, с применением методов профилирования экспрессии генов на микрочипах.

В отношении других генов микроРНК, в данной работе была обнаружена ассоциация между метилированием *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* и пролиферативной активностью опухолевых клеток больных ДВККЛ ($p = 0,010$, $p = 0,011$ и $p = 0,013$ соответственно). Аналогичные результаты были получены Zhang L. et al. (2019) при исследовании опухолей эпителиального происхождения, а именно, авторами показана статистически значимая корреляция между метилированием гена *MIR-34B/C* и экспрессией Ki-67 при раке молочной железы [209].

Следует отметить, что уровень экспрессии Ki-67 широко применяется в рутинной практике для анализа пролиферативной активности опухолей [152]. Описана совместная с другими маркерами пролиферации экспрессия Ki-67 во всех фазах клеточного цикла кроме фазы G0, что указывает на ключевую роль данного белка в делении клеток.

Большой пролиферативный потенциал ДВККЛ в случаях с метилированием *MIR-34B/C* и *MIR-203* согласуются с полученными в диссертационном исследовании данными об ассоциации метилирования данных генов с острофазовыми реакциями. Так, в подгруппе с метилированным статусом

MIR-34B/C показатели СОЭ были выше нормальных значений в подавляющем числе случаев: 80 % в сравнении с 57,1 % ($p = 0,036$) в подгруппе пациентов без метилирования. У пациентов с метилированным и неметилированным статусом гена *MIR-203* повышенный уровень СРБ имел место у 68,7 % и 28 % ($p < 0,001$) лиц соответственно. Как известно, выраженность данных острофазовых реакций коррелирует с агрессивностью опухоли и объемом опухолевой массы.

Важно отметить, что в случаях с сочетанным метилированием *MIR-34B/C* и *MIR-203* уровень экспрессии Ki-67 45 % опухолевых клеток и более имел место в 3,5 раза чаще ($p < 0,001$), а уровень экспрессии 70 % опухолевых клеток и более – в 1,8 раза чаще ($p = 0,023$), чем в случаях с отсутствием метилирования *MIR-34B/C* и *MIR-203*.

Было показано, что у лиц с сочетанным метилированием *MIR-34B/C* и *MIR-203* в сравнении с пациентами без метилирования данных генов вероятность выявления экспрессии Ki-67 70 % и более опухолевых клеток была в 3,5 (ОШ = 3,500, 95 %-й ДИ (1,212; 9,501) раза выше, что подтверждается данными литературы, описывающими общие про-онкогенные мишени у микроРНК, кодируемых генами *MIR-34B/C* и *MIR-203*, например, циклинзависимые киназы CDK4 и CDK6, участвующие в смене фаз клеточного цикла. Кроме того, для них описан ряд непересекающихся м-РНК-мишеней, способствующих повышенному пролиферативному потенциалу опухолевых клеток. Например, STAT3 для miR-203 и SOX4 для miR-129 [159, 197].

Белок STAT3 (Signal transducer and activator of transcription-3) обеспечивает ответ клеток на стимулы, поступающие через рецепторы интерлейкинов и ростовых факторов. При его активации запускается экспрессия Cyclin D1, C-MYC, BCL-XL, BCL-2, что приводит к усиленному клеточному делению и блоку апоптоза [104].

SOX4 (SRY-Box Transcription Factor 4) регулирует развитие В-клеток и необходим для их выживания и пролиферации. Повышенная экспрессия его связана с неблагоприятным прогнозом злокачественных новообразований, в том числе лимфопролиферативных опухолей [226].

Эти факты могут объяснить, почему одновременное метилирование генов *MIR-34B/C* и *MIR-203* может в большей степени отражаться на пролиферативной способности клеток.

До настоящего времени было неизвестно, является ли метилирование p53-чувствительных генов микроРНК при лимфомах комбинированным явлением, или это независимые события. В связи с этим, четвертая задача исследования заключалась в оценке сочетанности метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* и его связи с абберациями в гене *TP53* в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ.

Настоящее исследование является первым, в котором комплексно описывается метилирование генов ряда онкосупрессорных микроРНК на одной группе образцов ДВККЛ. Было показано, что в 24,3 % случаев имело место метилирование – 2, в 44,1 % – 3 и в 11,1 % всех 4 проанализированных генов. При этом в опухолевой ткани лимфомы, даже с учетом поправки на множественность сравнений, достоверно коррелировали друг с другом статусы метилирования пар генов *MIR-34B/C* и *MIR-203* ($p = 0,006$, $q = 0,009$), *MIR-34B/C* и *MIR-129-2* ($p = 0,001$, $q = 0,002$), *MIR-203* и *MIR-129-2* ($p < 0,001$, $q = 0,002$), а также *MIR-34B/C* и *MIR-34A* ($p < 0,001$, $q = 0,001$).

Биологический эффект такого сочетанного метилирования может заключаться в следующем. Согласно данным литературных источников, общими мишенями для микроРНК семейства miR-34, miR-129 и miR-203 являются м-РНК ряда прото-онкогенов (Рисунок 17), связанных не только с регуляцией клеточного цикла в контрольной точке фазового перехода G1/S и апоптозом, но и с репарацией повреждений ДНК, миграцией клеток, противоопухолевым иммунным ответом и неоангиогенезом. Для того чтобы продемонстрировать глубину имеющихся между ними взаимосвязей, необходимо отдельно остановиться на некоторых из мишеней данных молекул [60].

Циклин-D1 – это белок, который у человека кодируется геном *CCND1*. Совместно с Циклином-D2 данный белок образует комплекс с регуляторными субъединицами циклинзависимых киназ CDK4 и CDK6. В свою очередь,

комплекс циклинов с циклинзависимыми киназами активирует белок ретинобластомы Rb, что способствует переходу клеточного цикла из G1 в S-фазу. Избыточная экспрессия циклинов и циклинзависимых киназ, ускоряющая прогрессию клеточного цикла и деление клеток, часто наблюдается в различных опухолях [76].

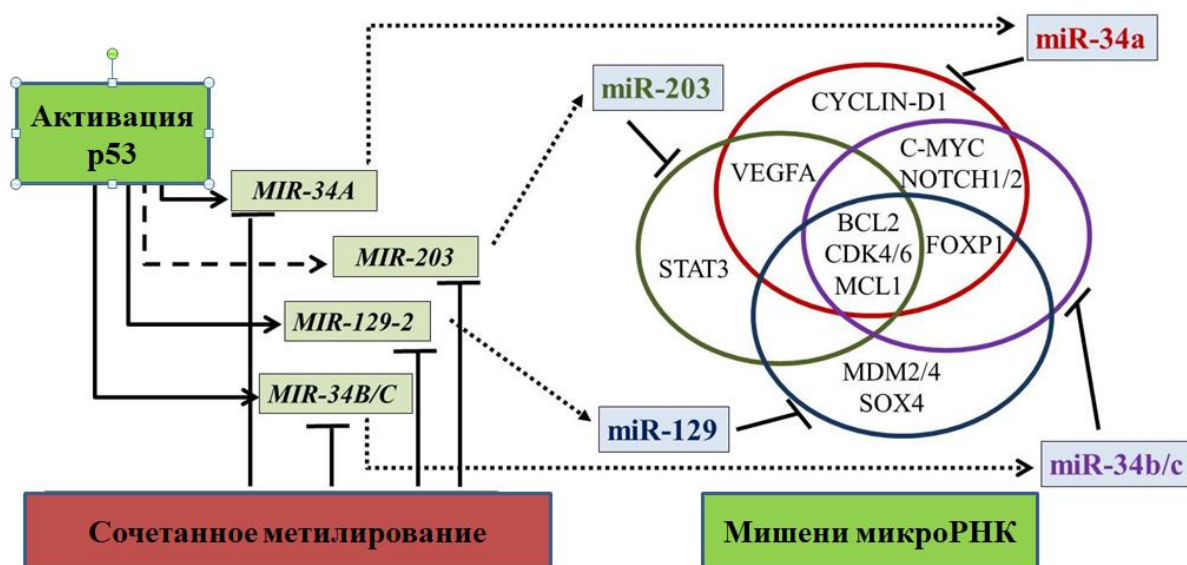


Рисунок 17 – Общие мишени генов микроРНК *MIR-34A*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-203*, значимые для развития лимфом

Транскрипционный фактор С-МЫС прямо или косвенно активирует экспрессию генов клеточного цикла, а именно *CCND2* и циклинзависимых киназ, и таким образом также обеспечивает переход клеточного цикла в контрольной точке G1/S фаз. Другим важным про-онкогенным свойством С-МЫС является то, что с его участием в клетке останавливается апоптоз, запускаемый белком p53.

BCL2 и MCL1 относятся к белкам семейства BCL, соотношение которых в клетке регулирует проницаемость митохондриальной мембраны. Они играют важную роль в выживании клеток и негативной регуляции программированной клеточной смерти, что реализуется за счет как прямого ингибирования ими проапоптотических белков, так и предотвращения активации каспазозависимого

пути апоптоза, гиперэкспрессия данных молекул в лимфоцитах в сочетании с повышением уровня С-МҮС доказанно приводит к развитию агрессивных лимфопролиферативных опухолей [252].

Другая общая мишень активируемых р53 микроРНК – MDM2, который является важным негативным регулятором белка р53. Белок MDM2 функционирует как убиквитинлигаза, способствующая деградации р53, и как ингибитор транскрипционной активации гена *TP53* [155].

Как видно из рисунка 17, общие и частично перекрывающиеся мишени изучаемых р53-чувствительных онкосупрессорных микроРНК связаны с контролем многочисленных внутриклеточных сигнальных путей, определяющих самообновление клеток, пролиферацию, репарацию повреждений ДНК, программированную клеточную смерть, метастазирование и миграцию, противоопухолевый иммунный ответ и неоангиогенез [297]. Таким образом, одновременное метилирование генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* потенциально может оказывать более выраженный биологический эффект.

Для оценки связи метилирования *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* с абберациями в гене *TP53* в ткани пораженных лимфоузлов пациентов с ДВККЛ в рамках данной работы проводилось изучение двух наиболее частых типов молекулярно-генетических повреждения, приводящих к дефициту функции данного гена: мутационного спектра и rs78378222 в 3'-НТП методами прямого секвенирования по Сенгеру и ПЦР-ПДРФ-анализа соответственно.

Выбор данных аббераций связан с тем, что rs78378222, приводит к разрушению сигнала полиаденилирования гена, а следовательно, нарушению синтеза функционального белка, тогда как мутации в ДНК-связывающем домене могут быть причиной нарушения транскрипционно-зависимых функций белка р53, а значит, нарушению экспрессии р53-чувствительных мишеней [314].

Было показано, что в целом частота анализируемых аббераций в группе исследования из 136 пациентов с ДВККЛ составила 21 %, что согласуется с литературными данными. Так, *TP53* характеризуется высокой частотой мутаций как при GCB-подтипе, так и при ABC-подтипе лимфомы генов: до 20–25 %

пациентов с ДВККЛ в дебюте заболевания имеют мутантный статус *TP53* [147, 265].

Биоинформационный анализ с применением программы Polyphen2 показал, что среди выявленных миссенс-замен в *TP53* (до 40 % всех находок) большинство являлись возможно/вероятно патогенными. К другим функционально-значимым абберациям относились в порядке убывания частоты: разрушение сигнала полиаденилирования – 17,0 %; замены нонсенс типа – 3,8 % и мутации, приводящие к нарушению сплайсинга молекулы РНК и к сдвигу рамки считывания в гене *TP53*, по 1,9 %. Все они ранее были описаны при других злокачественных новообразованиях, включая гематологические.

Следует помнить, что, в отличие от микроРНК семейства *miR-34* и *miR-129*, экспрессию которых *p53* контролирует путем связывания с *p53*-чувствительными элементами в кодирующих их генах, в основе регуляции уровня *miR-203* лежит ускорение созревания данной микроРНК путем усиления ее Drosha-опосредованного процессинга под действием данного белка [177]. В этой связи интерес представляют данные о том, что транскрипционно-неактивные мутантные варианты *p53*, в частности, выявленная в группе исследования мутация в «горячей» точке *p.R273*, препятствуют функциональной сборке белкового комплекса с Drosha [249].

Результаты комплексного анализа свидетельствуют не только о независимом характере, но и некоторой тенденции к взаимному исключению в опухолевой ткани ДВККЛ обнаружения аббераций в гене *TP53* и метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203*. Таким образом, при ДВККЛ метилирование изученных генов может быть одним из важных, независимых от мутаций в гене *TP53*, механизмов нарушения функционирования микроРНК *miR-203*, *miR-129*, *miR-34a*, *miR-34b* и *miR-34c*.

Опухоль-специфичность, частое обнаружение и сочетанность метилирования нескольких изученных генов микроРНК дает дополнительные доказательства того, что эпигенетическая нестабильность является важным событием в лимфомогенезе и свидетельствует о потенциальной ценности патологического метилирования в качестве мишени для таргетного лечения ДВККЛ.

Так, возможными направлениями персонифицированной терапии пациентов с ДВККЛ может быть воздействие на статус метилирования ДНК [238]. Снятие патологического метилирования генов микроРНК будет способствовать восстановлению их экспрессии и возобновлению функционирования p53-сигнального пути. Например, в литературе описано восстановление экспрессии miR-203 под действием 5-азацитина в культурах клеточных линий лимфомы мантийной зоны и множественной миеломы [23].

Несмотря на то, что производные 5-азацитина уже одобрены для лечения отдельных злокачественных новообразований крови, необходимо проявлять осторожность при выборе их в качестве терапевтического подхода для лечения ДВККЛ в силу неоднозначного характера вызываемых ими изменений метилирования ДНК. Так, одновременно с уменьшением уровня метилирования CpG-островков в промоторах генов-онкосупрессоров, что препятствует развитию опухоли, они вызывают дополнительное снижение уровня метилирования прото-онкогенов, что может способствовать прогрессии заболевания [42].

Более подходящими могут быть еще только разрабатываемые в настоящее время подходы эпигенетической модификации ДНК с использованием CRISPR/Cas9, а именно нацеливание на патологически метилированные гены микроРНК неактивных форм Cas9, объединенных с метилцитозин-диоксигеназами семейства TET (Ten-eleven translocation). Не внося двухцепочечных разрывов, они могут приводить к деметилированию целевых 5-метилцитозинов и восстановлению экспрессии генов [69].

В целом, полученные в диссертационной работе данные по метилированию изучаемых p53-чувствительных микроРНК значительно усложняют существующие представления о механизмах нарушения функционирования глобальной регуляторной сети гена *TP53*.

Они свидетельствуют о том, что метилирование генов онкосупрессорных p53-чувствительных микроРНК является при ДВККЛ механизмом, который потенциально может одновременно затрагивать различные пути лимфоогенеза

и дерегулировать сразу несколько функционально связанных генов, вовлеченных в отдельный путь развития опухоли.

Ценность выявленных в диссертационном исследовании ассоциаций метилирования анализируемых генов микроРНК с особенностями клинического течения заболевания связана с тем, что регуляция экспрессии микроРНК может осуществляться на различных уровнях, а сами они работают в составе сетей. Это может затруднять оценку их биологических эффектов. Доказано, например, что одна микроРНК может регулировать экспрессию более 200 генов-мишеней, а экспрессия определенных целевых мРНК также может регулироваться несколькими микроРНК [105]. Таким образом, обнаруженные ассоциации метилирования *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C*, как базового механизма регуляции экспрессии генов, с клинико-лабораторными параметрами и эффективностью терапии ДВККЛ свидетельствуют о важном его значении в патогенезе данного заболевания.

ВЫВОДЫ

1. В ткани лимфоузлов пациентов с реактивной лимфаденопатией метилирование генов микроРНК *MIR-203* ($p < 0,001$), *MIR-129-2* ($p < 0,001$), *MIR-34A* ($p = 0,075$) и *MIR-34B/C* ($p < 0,001$) не обнаружено, что свидетельствует об опухоль-специфичности выявляемого метилирования анализируемых генов в ткани пораженных лимфоузлов больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой; анализ метилирования всей панели исследуемых генов позволяет отличать опухолевые образцы от реактивных со специфичностью 100 % и чувствительностью 89 %.

2. В опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой частота метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129* и *MIR-203* составляет 23 %, 55 %, 65 % и 66 % соответственно; при этом в 78,6 % случаев имеет место метилирование 2 и более генов.

3. Метилирование генов *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* ассоциировано с высокой пролиферативной активностью опухолевых клеток больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой ($p = 0,010$, $p = 0,011$ и $p = 0,013$ соответственно), метилирование *MIR-34B/C* – с увеличением скорости оседания эритроцитов ($p = 0,036$), метилирование *MIR-203* – с повышенным уровнем С-реактивного белка ($p < 0,001$); у лиц с сочетанным метилированием *MIR-34B/C* и *MIR-203* вероятность выявления экспрессии Ki-67 ≥ 70 % опухолевых клеток была в 3,5 раза выше в сравнении с пациентами без метилирования данных генов (ОШ = 3,500; 95 %-й ДИ (1,212; 9,501)).

4. У больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой метилирование *MIR-34A* ассоциировано с неблагоприятным прогнозом, согласно международному прогностическому индексу ($p = 0,002$): в подгруппе пациентов с метилированием данного гена в сравнении с пациентами без метилирования лица старше 60 лет встречались в 1,8 раза чаще ($p = 0,051$), повышение уровня лактатдегидрогеназы в сыворотке крови – в 1,5 раза чаще ($p = 0,064$), отмечалась

тенденция к снижению частоты достижения ремиссии на первой линии терапии диффузной В-крупноклеточной лимфомы ($p = 0,060$).

5. Метилирование генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129* и *MIR-203* является сочетанным при диффузной В-крупноклеточной лимфоме: достоверно коррелирует друг с другом статус метилирования *MIR-34B/C* и *MIR-203* ($p = 0,006$, $q = 0,009$), *MIR-34B/C* и *MIR-129-2* ($p = 0,001$, $q = 0,002$), *MIR-203* и *MIR-129-2* ($p < 0,001$, $q = 0,002$), а также *MIR-34B/C* и *MIR-34A* ($p < 0,001$, $q = 0,001$).

6. При диффузной В-крупноклеточной лимфоме аберрации в гене *TP53* и метилирование анализируемых генов p53-чувствительных микроРНК являются независимыми событиями с тенденцией к взаимному исключению: *MIR-34A* ($\text{Log2 ОШ} = -0,624$, $p = 0,297$), *MIR-34B/C* ($\text{Log2 ОШ} = -0,507$, $p = 0,264$), *MIR-203* ($\text{Log2 ОШ} = -0,600$, $p = 0,225$) и *MIR-129-2* ($\text{Log2 ОШ} = -0,269$, $p = 0,412$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой при выявлении метилирования гена *MIR-34A*, независимо от мутационного статуса *TP53*, следует обсуждать возможность применения более агрессивных схем терапии первой линии.

2. Метилирование генов микроРНК *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в ткани увеличенных лимфоузлов является дополнительным биомаркером для дифференциальной диагностики диффузной В-крупноклеточной лимфомы и реактивных изменений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДВККЛ	диффузная В-крупноклеточная лимфома
ДИ	доверительный интервал
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИМТ	индекс массы тела
КТ	компьютерная томография
ЛБ	лимфома Беркитта
ЛДГ	лактатдегидрогеназа
ЛТ	лучевая терапия
ЛУ	лимфоузел
ЛХ	лимфома Ходжкина
ММ	множественная миелома
МПИ	международный прогностический индекс
НТП	нуклеозиды с тремя фосфатами
НТО	не транслируемая область
НХЛ	неходжкинскиелимфомы
ОАК	общий анализ крови
ОВ	общая выживаемость
ОМЛ	острый миелобластный лейкоз
ОШ	отношение шансов
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЭТ-КТ	позитронно-эмиссионная компьютерная томография
ПЭТ	позитронно-эмиссионная томография
РНК	рибонуклеиновая кислота
СИ	селезеночный индекс
СОЭ	скорость оседания эритроцитов
СРБ	С-реактивный белок
Т-НХЛ	Т-клеточные неходжкинскиелимфомы
Тр	тромбоциты

ХЛЛ	хронический лимфоидный лейкоз
ХМЛ	хронический миелоидный лейкоз
ЦНС	центральная нервная система
ЧР	частичная ремиссия
ЩФ	щелочная фосфатаза
ABC	activated B-cell (из активированных В-клеток)
ASCT	высокодозная химиотерапия с последующей трансплантацией аутологичных стволовых клеток
aaIPI	скорректированный по возрасту Международный прогностический индекс
В-НХЛ	В-клеточные неходжкинские лимфомы
CAR-T	himeric antigen receptor T-cell (Т-клетки с химерным антигенным рецептором)
CpG	дезоксидитидин-фосфат-дезоксигуанозин
ECOG	Eastern cooperative oncology group (шкала оценки общего состояния больного)
FISH	флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i>
F	прямой праймер
GCB	germinal center B-cell (из клеток зародышевого центра)
L	лейкоциты
Me	медиана
Met	метилированный
MS-HRM	Methylation-Sensitive High-Resolution-Melting (метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением)
MS-PCR	метил-специфическая полимеразная цепная реакция
OR	odds ratio (отношение шансов)
p	критерий Фишера
p-value	точный критерий Фишера
Q	процентиль

q-value	поправка на множественность сравнений
R	обратный праймер
R-CHOP	ритуксимаб, циклофосфан, доксорубицин, винкристин, преднизолон
SD	стандартное отклонение
T _m	температура плавления
TNF- α	фактор некроза опухоли-альфа
UMet	неметилированный

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абберрантная экспрессия и метилирование генов отдельных микроРНК при лимфопролиферативных заболеваниях: обзор литературы / Е. Н. Воропаева, О. В. Березина, М. И. Чуркина [и др.] // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2021. – № 4. – С. 108–133.
2. Агрессивные нефолликулярные лимфомы – диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, лимфома Беркитта : Клинические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Москва : Легалакт, 2020. – Текст : электронный // Легалакт – законы, кодексы и нормативно-правовые акты Российской Федерации : юридическая информационная система : [сайт]. – URL: <https://legalacts.ru/doc/klinicheskie-rekomendatsii-agressivnye-nefollikuljarnye-limfomy-diffuznaja-krupnokletochnaja-b-kletochnaja> (дата обращения: 01.08.2023).
3. Аномалии гена *TP53* у больных диффузной в-крупноклеточной лимфомой / М. И. Чуркина, Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова [и др.] // Современные биотехнологии для науки и практики : материалы 6-й Международной конференции, посвященной Дню ДНК-2019. – Санкт-Петербург, 2019. – С. 55–56.
4. Бабичева, Л. Г. Гетерогенная диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома: правильный диагноз как залог успешной терапии / Л. Г. Бабичева, И. В. Поддубная // Современная онкология. – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 168–177.
5. Воропаева, Е. Н. Сочетанное метилирование генов семейства *MIR-34* и *MIR-203* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / Е. Н. Воропаева, М. И. Чуркина, Т. И. Поспелова // Злокачественные лимфомы : тезисы постерной сессии 18-й Российской конференции с международным участием. – Москва, 2021. – С. 13.
6. Встречаемость мутаций и потери гетерозиготности в гене *TP53*

в зависимости от генотипа rs1042522 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / Е. Н. Воропаева, М. И. Чуркина, К. А. Баширзаде [и др.] // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2022. – Т. 6, № 3. – С. 72–89.

7. Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома / Г. С. Тумян [и др.] // Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению злокачественных лимфопролиферативных заболеваний / под ред. И. В. Поддубной, В. Г. Савченко. – Москва, 2018. – С. 58–68.

8. Клиническое значение метилирования генов p53-респонзивных онкосупрессорных микро-РНК и мутаций в гене *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / Н. Воропаева, Т. И. Поспелова, М. И. Чуркина [и др.] // Вестник гематологии. – 2023. – Т. XIX, № 2. – С. 72–73.

9. Комплексный анализ метилирования генов p53-респонзивных микроРНК и мутаций гена *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова, М. И. Чуркина [и др.] // Медицинская генетика. – 2022. – Т. 21, № 11. – С. 62–66.

10. Метилирование генов p53-респонзивных онкосупрессорных микроРНК при гемобластозах / Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова, О. В. Березина [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2022. – Т. 21, № 2. – С. 130–142.

11. Механизмы нарушения экспрессии генов p53-респонзивных микроРНК при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова, М. И. Чуркина [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2023. – Т. 10, № 3. – С. 76–85.

12. Поляцкин, И. Л. Пересмотренная классификация ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей, 2017 (4-е издание): опухоли лимфоидной ткани / И. Л. Поляцкин, А. С. Артемьева, Ю. А. Криволапов // Архив патологии. – 2019. – Т. 81, № 3. – С. 59–65.

13. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний 2018 г. / под ред. И. В. Поддубной, В. Г. Савченко // Российское общество онкогематологов (ROHS): [сайт]. – URL: <https://rusoncohem.ru/klinrec/klin-rekomendatsii-limfoproliferativnykh-zabolevaniy/>

(дата обращения: 01.08.2023). – Текст : электронный.

14. Титова, В. Б. Вирусный гепатит В у иммуносупрессивных пациентов с онкологическими заболеваниями: патогенез, ведение и профилактика / В. Б. Титова, Н. М. Беляева // Инфекционные болезни. – 2014. – Т. 12, № 3. – С.51–60.

15. Чуркина, М. И. Метилирование p53-зависимых генов микроРНК *MIR-129-2*, *MIR-203*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме / М. И. Чуркина, Е. Н. Воропаева, Т. И. Пospelова // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины : материалы конгресса молодых ученых. – Томск, 2022. – С. 259–261.

16. Чуркина, М. И. Значение метилирования генов онкосупрессорных микро-РНК и мутаций в гене *TP53* при диффузной в-крупноклеточной лимфоме / М. И. Чуркина // Авиценна-2023 : материалы 14-й Российской (итоговой) научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2023. – С. 158–159.

17. Чуркина, М. И. Метилирование гена *MIR-203* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / М. И. Чуркина, Е. Н. Воропаева, Т. И. Пospelова // Внеочередной 12-й съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии им. Н. Н. Трапезникова, посвященный 25-летию 1-го съезда АДИОР, 7–9 апреля 2021 г. (online) : материалы съезда / Евразийский онкологический журнал. – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 115.

18. Чуркина, М. И. Метилирование генов микро-РНК *MIR-34b/c*, *MIR-34a* и *MIR203* при диффузной в-крупноклеточной лимфоме / М. И. Чуркина, Т. И. Пospelова, Е. Н. Воропаева // Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии : материалы Международной научно-практической конференции. – Киров, 2021. – С. 182-185.

19. Чуркина, М. И. Опухоль-специфичное метилирование генов *MIR-129-2*, *MIR-203*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / М. И. Чуркина // Авиценна–2022 : материалы 13-й Российской (итоговой) научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых

ученых. – Новосибирск, 2022. – С. 127–128.

20. Эпидемиология и клинико-демографическая характеристика диффузной В-крупноклеточной лимфомы на территории г. Новосибирска / Е. Н. Воропаева, А. А. Гуражева, Т. И. Пospelова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 5–15.

21. Эпидемиология и клинико-демографическая характеристика диффузной В-крупноклеточной лимфомы на территории г. Новосибирска / Е. Н. Воропаева, А. А. Гуражева, Т. И. Пospelова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 5–15.

22. 44 Current challenges in miRNomics / B. Akgül, P. F. Stadler, L. J. Hawkins [et al.] // Methods Mol Biol. – 2022. – Vol. 2257. – P. 423–438. DOI: 10.1007/978-1-0716-1170-8_19.

23. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces a greater inflammatory change, at the molecular levels, in normoxic than hypoxic tumor microenvironment / Í. Salviano Soares de Amorim, J. A. Rodrigues, P. Nicolau [et al.] // Mol Biol Rep. – 2021. – Vol. 48 (2). – P. 1161–1169. DOI: 10.1007/s11033-020-05931-4.

24. A p53-responsive miRNA network promotes cancer cell quiescence / T. La, G. Z. Liu, M. Farrelly [et al.] // Cancer Res. – 2018. – Vol. 78 (23). – P. 6666–6679. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1886.

25. A probabilistic classification tool for genetic subtypes of diffuse large B-cell lymphoma with therapeutic implications / G. W. Wright, D. W. Huang, J. D. Phelan [et al.] // Cancer Cell. – 2020. – Vol. 37 (4). – P. 551–568. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.015.

26. A protein in the yeast *saccharomyces cerevisiae* presents DNA binding homology to the p53 checkpoint protein and tumor suppressor / K. Farooqi, M. Ghazvini, L. D. Pride [et al.] // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10 (3). – P. 417. DOI: 10.3390/biom10030417.

27. A real-world comparison of tisagenlecleucel and axicabtagene ciloleucel CAR T cells in relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma / E. Bachy, S. Le Gouill, R. Di Blasi [et al.] // Nat Med. – 2022. – Vol. 28 (10). – P. 2145–2154.

DOI: 10.1038/s41591-022-01969-y.

28. A review of two regulatory approved anti-CD19 CAR T-cell therapies in diffuse large B-cell lymphoma: why are indirect treatment comparisons not feasible? / J. Zhang, J. Li, Q. Ma [et al.] // *Adv Ther.* – 2020. – Vol. 37 (7). – P. 3040-3058. DOI: 10.1007/s12325-020-01397-9.

29. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness' / R. Yi, M. N. Poy, M. Stoffel, E. Fuchs. // *Nature.* – 2008. – Vol. 452 (7184). – P. 225–9. DOI: 10.1038/nature06642.

30. ACCEPT – combining acalabrutinib with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone (R-CHOP) for Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL): study protocol for a Phase Ib/II open-label non-randomised clinical trial / A. Davies, S. Barrans, C. Burton [et al.] // *Clinical Trial.* – 2020. – Vol. 9. – P. 941. DOI: 10.12688/f1000research.22318.1.

31. Adzhubei, I. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2 / I. Adzhubei, D. M. Jordan, S. R. Sunyaev. – DOI: 10.1002/0471142905.hg0720s76. – Text : electronic. // *Current Protocols in Human Genetics.* – 2013. – Vol. 76 (1). – P. 1–41. – URL: http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dokuwiki/_media/hg0720.pdf

32. Altan, Z. miR-203 suppresses pancreatic cancer cell proliferation and migration by modulating DUSP5 expression / Z. Altan, Y. Sahin // *Mol Cell Probes.* – 2022. – Vol. 66. – P. 101866. DOI: 10.1016/j.mcp.2022.101866.

33. Alternative polyadenylation: methods, mechanism, function, and role in cancer / Y. Zhang, L. Liu, Q. Qiu [et al.] // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2021. – Vol. 40 (1). – P. 51. DOI: 10.1186/s13046-021-01852-7.

34. An integrated analysis of miRNA and gene copy numbers in xenografts of Ewing's sarcoma / N. Mosakhani, M. Guled, G. Leen [et al.] // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2012. – Vol. 31 (1). – P. 24. DOI: 10.1186/1756-9966-31-24. PMID: 22429812; PMCID: PMC3338077.

35. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods / K. Saliminejad, H. R. Khorram Khorshid, S. Soleymani Fard,

S. H. Ghaffari // J Cell Physiol. – 2019. – Vol. 234 (5). – P. 5451–5465. DOI: 10.1002/jcp.27486.

36. Analysis and visualization of longitudinal genomic and clinical data from the AACR project GENIE biopharma collaborative in cbiportal / I. de Bruijn, R. Kundra, B. Mastrogiacono [et al.] // Cancer Res. – 2023. – Vol. 83 (23). – P. 3861–3867. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-23-0816.

37. Analysis of miRNA-gene expression-genomic profiles reveals complex mechanisms of microRNA deregulation in osteosarcoma / G. Maire, J. W. Martin, M. Yoshimoto [et al.] // Cancer Genetics. – 2011. – Vol. 204 (3). – P. 138–46. DOI: 10.1016/j.cancergen.2010.12.012.

38. Analysis of the p53/microRNA network in cancer / M. Kaller, S. Hüntgen, H. Siemens, H. Hermeking // Adv Exp Med Biol. – 2022. – Vol. 1385. – P. 187–228. DOI: 10.1007/978-3-031-08356-3_7.

39. Anbarasan, T. The emerging landscape of p53 isoforms in physiology, cancer and degenerative diseases / T. Anbarasan, J. C. Bourdon // Int J Mol Sci. – 2019. – Vol. 20 (24). – P. 6257. DOI: 10.3390/ijms20246257.

40. Antileukemic activity of hsa-miR-203a-5p by limiting glutathione metabolism in imatinib-resistant K562 cells / P. Singh, R. Yadav, M. Verma, R. Chhabra // Curr Issues Mol Biol. – 2022. – Vol. 44 (12). – P. 6428–6438. DOI: 10.3390/cimb44120438.

41. Antitumoral RNA-targeted oligonucleotide therapeutics: The third pillar after small molecule inhibitors and antibodies / H. Taniguchi, Y. Suzuki, K. Imai, Y. Adachi // Cancer Sci. – 2022. – Vol. 113 (9). – P. 2952–2961. DOI: 10.1111/cas.15461.

42. Association between TP53 genetic polymorphisms and the methylation and expression of miR-34a, 34b/c in colorectal cancer tissues / H. H. Jun, K. Kwack, K. H. Lee [et al.] // Oncol Lett. – 2019. – Vol. 17 (5). – P. 4726–4734. DOI: 10.3892/ol.2019.10092.

43. Aushev, V. N. MicroRNA: small molecules of great significance / V. N. Aushev // Clin. Oncohematology. – 2015. – Vol. 8. – P. 1–12.

44. Bajan, S. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs / S. Bajan, G. Hutvagner // *Cells*. – 2020. – Vol. 9 (1). – P. 137. DOI: 10.3390/cells9010137.
45. Baumann, V. miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents / V. Baumann, J. Winkler // *Future Med Chem*. – 2014. – Vol. 6 (17). – P. 1967–84. DOI: 10.4155/fmc.14.116.
46. Bevilacqua, P. C. Regulatory Mechanisms through RNA Conformational Switching and Dynamics / P. C. Bevilacqua, B. S. Tolbert // *J Mol Biol*. – 2022. – Vol. 434 (18). – P. 167794. DOI: 10.1016/j.jmb.2022.167794.
47. Biomarker exploration of microRNA-203 as a promising substrate for predicting poor survival outcome in colorectal cancer / Q. Peng, Y. Shen, P. Zhao [et al.] // *BMC Cancer*. – 2020. – Vol. 20 (1). – P. 1003. DOI: 10.1186/s12885-020-07512-x.
48. Calin, G. A. Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications / G. A. Calin, C. M. Croce // *J Clin Invest*. – 2007. – Vol. 117 (8). – P. 2059–66. DOI: 10.1172/JCI32577.
49. Cancer incidence, patterns, and genotype-phenotype associations in individuals with pathogenic or likely pathogenic germline TP53 variants: an observational cohort study / K. C. de Andrade, P. P. Khincha, J. N. Hatton [et al.] // *Lancet Oncol*. – 2021. – Vol. 22 (12). – P. 1787–1798. DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00580-5.
50. CD43 expression in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: CD43 is a marker of adverse prognosis / X. B. Ma, Y. Zheng, H. P. Yuan [et al.] // *Hum Pathol*. – 2015. – Vol. 46 (4). – P. 593–9. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.01.002.
51. CD5 and CD43 expression are associate with poor prognosis in DLBCL patients / H. Huang, Z. Li, C. Huang [et al.] // *Open Med (Wars)*. – 2018. – Vol. 13. – P. 605–609. DOI: 10.1515/med-2018-0089.
52. Changing paradigms in diagnosis and treatment of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM) / M. Ho, A. Patel, C. Y. Goh [et al.] // *Leukemia*. – 2020. – Vol. 34 (12). –

P. 3111–3125. DOI: 10.1038/s41375-020-01051-x.

53. Characterization of a p53/miR-34a/CSF1R/STAT3 Feedback Loop in Colorectal Cancer / X. Shi, M. Kaller, M. Rokavec [et al.] // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* – 2020. – Vol. 10 (2). – P. 391–418. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2020.04.002.

54. Chim, C. S. DNA methylation of tumor suppressor miRNA genes: a lesson from the miR-34 family / C. S. Chim, K. Y. Wong, L. Yu // *Epigenomics.* – 2011. – Vol. 3 (1). – P. 83–92. DOI: 10.2217/epi.10.74.

55. Chim, C. S. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies / C. S. Chim, K. Y. Wong. – *J. Cell. Mol. Med.* – 2011. – Vol. 15. – P. 2760–2767. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01274.x.

56. Chim, C. S. Methylation of tumor suppressor microRNAs: lessons from lymphoid malignancies // C. S. Chim, L. Q. Wang, R. Liang // *Expert Rev Mol Diagn.* – 2012. – Vol. 12 (7). – P. 755–65. DOI: 10.1586/erm.12.64.

57. Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy for people with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma / M. Ernst, A. Oeser, B. Besiroglu [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2021. – Vol. 9 (9). – P. CD013365. DOI: 10.1002/14651858.CD013365.pub2.

58. Chomczynski, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal Biochem.* – 1987. – Vol. 162 (1). – P. 156–9. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

59. circRNA-miRNA-mRNA in breast cancer / M. Zhang, X. Bai, X. Zeng [et al.] // *Clin Chim Acta.* – 2021. – Vol. 523. – P. 120–130. DOI: 10.1016/j.cca.2021.09.013.

60. Clinical aspects of TP53 gene inactivation in diffuse large B-cell lymphoma / E. N. Voropaeva, M. I. Voevoda, V. N. Maksimov [et al.] // *BMC Med Genom.* – 2019. – Vol. 12 (Suppl 2). – P. 35. DOI: 10.1186/s12920-019-0484-9.

61. Clinical significance of methylation of a group of miRNA genes in patients with ovarian cancer / N. E. Kushlinskii, D. O. Utkin, V. I. Loginov [et al.] // *Klin Lab Diagn.* – 2020. – Vol. 65 (5). – P. 321–327. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-5-321-327.

62. Clinicopathologic significance and therapeutic implication of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma / H. Tang, H. Zhou, J. Wei [et al.] // *Hematology*. – 2019. – Vol. 24 (1). – P. 446–454. DOI: 10.1080/16078454.2019.1614289.
63. Competing endogenous RNA networks and gastric cancer / L. L. Guo, C. H. Song, P. Wang [et al.] // *World J Gastroenterol*. – 2015. – Vol. 21 (41). – P. 11680–7. DOI: 10.3748/wjg.v21.i41.11680.
64. Conserved microRNA editing in mammalian evolution, development and disease / M. Warnefors, A. Liechti, J. Halbert [et al.] // *Genome Biol*. – 2014. – Vol. 15 (6). – P. 83. DOI: 10.1186/gb-2014-15-6-r83.
65. CpG island methylation of microRNAs is associated with tumor size and recurrence of non-small-cell lung cancer / K. Kitano, K. Watanabe, N. Emoto [et al.] // *Cancer Sci*. – 2011. – Vol. 102 (12). – P. 2126–31. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02101.x.
66. Creation and preliminary characterization of a Tp53 knockout rat / A. McCoy, C. L. Besch-Williford, C. L. Franklin [et al.] // *Dis Model Mech*. – 2013. – Vol. 6 (1). – P. 269–78. DOI: 10.1242/dmm.009704.
67. Crombie, J. L. Diffuse Large B-Cell Lymphoma and High-Grade B-Cell Lymphoma: Genetic Classification and Its Implications for Prognosis and Treatment / J. L. Crombie, P. Armand // *Surg Oncol Clin N Am*. – 2020. – Vol. 29 (1). – P. 115–125. DOI: 10.1016/j.soc.2019.08.009.
68. Crosstalk between miRNAs and DNA Methylation in Cancer / M. Saviana, P. Le, L. Micalo [et al.] // *Genes (Basel)*. – 2023. – Vol. 14 (5). – P. 1075. DOI: 10.3390/genes14051075.
69. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer / S. W. Wang, C Gao, Y. M. Zheng [et al.] // *Mol Cancer*. – 2022. – Vol. 21 (1). – P. 57. DOI: 10.1186/s12943-022-01518-8.
70. Deng, B. Role of microRNA-129 in cancer and non-cancerous diseases (Review) / B. Deng, X. Tang, Y. Wang // *Exp Ther Med*. – 2021. – Vol. 22 (3). – P. 918. DOI: 10.3892/etm.2021.10350.
71. Development of a 5-FU modified mir-129 mimic as a therapeutic for non-

small cell lung cancer / G. R. Hwang, J. G. Yuen, A. Fesler [et al.] // *Mol Ther Oncolytics*. – 2023. – Vol. 28. – P. 277–292. DOI: 10.1016/j.omto.2023.02.007.

72. Diagnosis and treatment of lymphomas in the era of epigenetics / A. Chebly, E. Chouery, J. Ropio [et al.] // *Blood Rev.* – 2021. – Vol. 48. – P. 100782. DOI: 10.1016/j.blre.2020.100782.

73. Diffuse large B-cell lymphoma with combined TP53 mutation and MIR34A methylation: Another «double hit» lymphoma with very poor outcome? / F. Asmar, C. Hother, G. Kulosman [et al.] // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5. – P. 1912–1925. DOI: 10.18632/oncotarget.1877.

74. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study / F. Jardin, J. P. Jais, T. J. Molina [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116 (7). – P. 1092–1094. DOI: 10.1182/blood-2009-10-247122.

75. Dissection of DLBCL microenvironment provides a gene expression-based predictor of survival applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue / S. Ciavarella, M. C. Vegliante, M. Fabbri [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2019. – Vol. 30 (12). – P. 2015. DOI: 10.1093/annonc/mdz386.

76. Distinct CDK6 complexes determine tumor cell response to CDK4/6 inhibitors and degraders / X. Wu, X. Yang, Y. Xiong [et al.] // *Nat Cancer*. – 2021. – Vol. 2 (4). – P. 429–443. DOI: 10.1038/s43018-021-00174-z.

77. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling / A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, R. E. Davis [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 403 (6769). – P. 503–511. DOI: 10.1038/35000501.

78. DNA copy number changes in diffuse large B cell lymphomas / L. Cascione, L. Aresu, M. Baudis, F. Bertoni // *Front Oncol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 584095. DOI: 10.3389/fonc.2020.584095.

79. DNA methylation biomarkers accurately detect esophageal cancer prior and post neoadjuvant chemoradiation / C. Macedo-Silva, V. Constâncio, V. MiRanda-Gonçalves [et al.] // *Cancer Med.* – 2023. – Vol. 12 (7). – P. 8777–8788. DOI: 10.1002/cam4.5623.

80. DNA Methylation in Solid Tumors: Functions and Methods of Detection / A. Martisova, J. Holcakova, N. Izadi [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22 (8). – P. 4247. DOI: 10.3390/ijms22084247.
81. DNA methylation of tumor suppressive miRNAs in Non-Hodgkin's lymphomas / R. L. Yim, Y. L. Kwong, K. Y. Wong, C. S. Chim // *Front Genet.* – 2012. – Vol. 3. – P. 233. DOI: 10.3389/fgene.2012.00233.
82. DNMT3A epigenetically regulates key microRNAs involved in epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer / M. Mancini, M. Grasso, L. Muccillo [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2021. – Vol. 42 (12). – P. 1449–1460. DOI: 10.1093/carcin/bgab101.
83. DragomiR, M. P. Classical and noncanonical functions of miRNAs in cancers / M. P. DragomiR, E. Knutsen, G. A. Calin // *Trends Genet.* – 2022 Apr;38(4):379-394. doi: 10.1016/j.tig.2021.10.002. Epub 2021 Oct 30. PMID: 34728089.
84. Dynamic changes of DNA methylation induced by benzo(a)pyrene in cancer / H. Wang, B. Liu, H. Chen [et al.] // *Genes Environ.* – 2023. – Vol. 45 (1). – P. 21. doi: 10.1186/s41021-023-00278-1.
85. Dysregulation of miRNAs in DLBCL: causative factor for pathogenesis, diagnosis and prognosis / M. Alsaadi, M. Y. Khan, M. H. Dalhat [et al.] // *Diagnostics (Basel).* – 2021. – Vol. 11 (10). – P. 1739. DOI: 10.3390/diagnostics11101739.
86. Effect of miR-203/CREB1 signaling regulation mediated by dna methylation on the proliferation and apoptosis of multiple myeloma cells / CB Xu, B Liao, HY Fu [et al.] // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2022. – Vol. 30 (3). – P. 790–796. DOI: 10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2022.03.021.
87. Effect of prior therapy and disease refractoriness on the efficacy and safety of oral selinexor in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): a post-hoc analysis of the SADAL study / M. Schuster, J. Zijlstra, R. O. Casasnovas [et al.] // *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia.* – 2022. – Vol. 22 (7). – P. 483–494. DOI: 10.1016/j.clml.2021.12.016.
88. Efficacy and safety of CD19-directed CAR-T cell therapies in patients

with relapsed/refractory aggressive B-cell lymphomas: Observations from the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND trials / J. R. Westin, M. J. Kersten, G. Salles [et al.] // *Am J Hematol.* – 2021. – Vol. 96 (10). – P. 1295–1312. DOI: 10.1002/ajh.26301.

89. Enhanced lipid metabolism confers the immunosuppressive tumor microenvironment in CD5-positive non-MYC/BCL2 double expressor lymphoma. / M. K. Liu, L. L. Cheng, H. M. Yi [et al.] // *Frontiers in Oncology.* – 2022. – Vol. 12. – P. 885011. DOI: 10.3389/fonc.2022.885011

90. Epigenetic Aging and Colorectal Cancer: State of the Art and Perspectives for Future Research / A. Maugeri, M. Barchitta, R. Magnano San Lio, [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 22 (1). – P. 200. DOI: 10.3390/ijms22010200.

91. Epigenetic inactivation of miR-34b/c in addition to miR-34a and DAPK1 in chronic lymphocytic leukemia / L. Q. Wang, Y. L. Kwong, K. F. Wong [et al.] // *J Transl Med.* – 2014. – Vol. 12. – P. 52. DOI: 10.1186/1479-5876-12-52.

92. Epigenetic inactivation of the MIR129-2 in hematological malignancies. / K.-Y. Wong, R.L.-H. Yim, Y.-L. Kwong [et al.] // *J. Hematol. Oncol.* – 2013. – Vol. 6. – P. 16. DOI: 10.1186/1756-8722-6-16.

93. Epigenetic inactivation of the miR-34a in hematological malignancies / C. S. Chim, K. Y. Wong, Y. Qi [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2010. – Vol. 31 (4). – P. 745–50. DOI: 10.1093/carcin/bgq033.

94. Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia / J. Roman-Gomez, X. Agirre, A. Jiménez-Velasco [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol. 27 (8). – P. 1316–22. DOI: 10.1200/JCO.2008.19.3441.

95. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer / M. Toyota, H. Suzuki, Y. Sasaki [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68 (11). – P. 4123–32. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0325.

96. Epigenetic silencing of miR-342-3p in B cell lymphoma and its impact on autophagy / M. Y. Zhang, G. A. Calin, K. S. Yuen [et al.] // *Clin Epigenetics.* – 2020. – Vol. 12 (1). – P. 150. DOI: 10.1186/s13148-020-00926-1.

97. Ergin, K. Regulation of microRNAs / K. Ergin, R. Çetinkaya // *Methods*

Mol Biol. – 2022. – Vol. 2257. – P. 1–32. DOI: 10.1007/978-1-0716-1170-8_1.

98. Evaluating the performance of Affymetrix SNP Array 6.0 platform with 400 Japanese individuals / N. Nishida, A. Koike, A. Tajima [et al.] // BMC Genomics. – 2008. – Vol. 9. – P. 431. DOI: 10.1186/1471-2164-9-431.

99. Evaluation of Ki-67 as a prognostic marker in diffuse large B-cell lymphoma-A single-center retrospective cohort study / F. Huber, E. Zwickl-Traxler, M. Pecherstorfer, J. Singer // Curr Oncol. – 2021. – Vol. 28 (6). – P. 4521–4529. DOI: 10.3390/curroncol28060383.

100. Evaluation of miR-203 Expression Levels and DNA Promoter Methylation Status in Serum of Patients with Endometrial Cancer / M. Benati, M. Montagnana, E. Danese [et al.] // Clin Lab. – 2017. – Vol. 63 (10). – P. 1675–1681. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2017.170421.

101. Evaluation of miR-34a Effect on CCND1 mRNA Level and Sensitization of Breast Cancer Cell Lines to Paclitaxel / S. Irani, M. Paknejad, M. Soleimani, S. Azam // Iran Biomed J. – 2020. – Vol. 24 (6). – P. 361–9. DOI: 10.29252/ibj.24.6.356.

102. Evidence of novel miR-34a-based therapeutic approaches for multiple myeloma treatment / M. R. Zarone, G. Misso, A. Grimaldi [et al.] // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7 (1). – P. 17949. DOI: 10.1038/s41598-017-18186-0.

103. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis / B. Yue, H. Yang, J. Wang [et al.] // Cell Prolif. – 2020. – Vol. 53 (7). – P. e12857. DOI: 10.1111/cpr.12857.

104. Expression and prognostic relevance of STAT3 and cyclin D1 in non-small cell lung cancer / T. Ai, Z. Wang, M. Zhang [et al.] // Int J Biol Markers. – 2012. – Vol. 27 (2). – P. e132-8. DOI: 10.5301/JBM.2012.9146.

105. Expression, regulation and mechanism of action of the miR-17-92 cluster in tumor cells (Review) / L. L. Fang, X. H. Wang, B. F. Sun [et al.] // Int J Mol Med. – 2017. – Vol. 40 (6). – P. 1624–1630. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3164.

106. Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNAs in cancer progression and therapy / B. Li, Y. Cao, M. Sun, H. Feng // FASEB J. – 2021. –

Vol. 35 (10). – P. e21916. DOI: 10.1096/fj.202100294RR. PMID: 34510546.

107. Fatema, K. Navigating the genomic instability mine field of osteosarcoma to better understand implications of non-coding RNAs / K. Fatema, Z. Larson, J. Barrott // *Biocell.* – 2022. – Vol. 46 (10). – P. 2177–2193. DOI: 10.32604/biocell.2022.020141.

108. Frequency of microRNA response elements identifies pathologically relevant signaling pathways in triple-negative breast cancer / A. A. Nair, X. Tang, K. J. Thompson [et al.] // *iScience.* – 2020. – Vol. 23 (6). – P. 101249. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101249.

109. Gain of function mutant p53 protein activates AKT through the Rac1 signaling to promote tumorigenesis / X. Yue, F. Wu, Y. Li [et al.] // *Cell Cycle.* – 2020. – Vol. 19 (11). – P. 1338–1351. DOI: 10.1080/15384101.2020.1749790.

110. Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy / C. Zhang, J. Liu, D. Xu [et al.] // *J Mol Cell Biol.* – 2020. – Vol. 12 (9). – P. 674–687. DOI: 10.1093/jmcb/mjaa040.

111. García-López, J. MicroRNA biogenesis and variability / J García-López, M. A. Brieño-Enríquez, J. Del Mazo // *Biomol Concepts.* – 2013. – Vol. 4 (4). – P. 367–80. DOI: 10.1515/bmc-2013-0015.

112. Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications / N. Sayed, P. Allawadhi, A. Khurana [et al.] // *Life Sci.* – 2022. – Vol. 294. – P. 120375. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120375.

113. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma / R. Schmitz, G. W. Wright, D. W. Huang [et al.] // *N Engl J Med.* – 2018. – Vol. 378 (15). – P. 1396–1407. DOI: 10.1056/NEJMoa1801445.

114. Genome-wide miRNA expression profiling of molecular subgroups of peripheral T-cell lymphoma / W. Lone, A. Bouska, S. Sharma [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2021. – Vol. 27 (21). – P. 6039–6053. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0573.

115. Germline and somatic genetic variants in the p53 pathway interact to affect cancer risk, progression, and drug response / P. Zhang, I. Kitchen-Smith, L. Xiong [et al.] // *Cancer Res.* – 2021. – Vol. 81 (7). – P. 1667–1680.

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0177.

116. Germline TP53 pathogenic variants and breast cancer: A narrative review / E. Blondeaux, L. Arecco, K. Punie [et al.] // *Cancer Treat Rev.* – 2023. – Vol. 114. – P. 102522. DOI: 10.1016/j.ctrv.2023.102522.

117. Global epigenetic regulation of microRNAs in multiple myeloma / W. Zhang, Y. E. Wang, Y. Zhang [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9 (10). – P. e110973. DOI: 10.1371/journal.pone.0110973.

118. GM-CSF enhanced the effect of CHOP and R-CHOP on inhibiting diffuse large B-cell lymphoma progression via influencing the macrophage polarization / Y. Zhang, J. Xiang, X. Sheng [et al.] // *Cancer Cell Int.* – 2021. – Vol. 21 (1). – P. 141. DOI:10.1186/s12935-021-01838-7

119. Goldfinger, M. Lenalidomide in DLBCL: are we past the cell of origin? / M. Goldfinger, D. L. Cooper // *Clin Adv Hematol Oncol.* – 2021. – Vol. 19 (5). – P. 320–325.

120. Golubovskaya, V. M. Targeting the p53 pathway / V. M. Golubovskaya, W. G. Cance // *Surg Oncol Clin N Am.* – 2013. – Vol. 22 (4). – P. 747–64. DOI: 10.1016/j.soc.2013.06.003.

121. Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex / R. I. Gregory, T. P. Chendrimada, R. Shiekhattar // *Methods Mol Biol.* – 2006. – Vol. 342. – P. 33–47. DOI: 10.1385/1-59745-123-1:33.

122. Guo, Y. COTI-2 induces cell apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia via upregulation of miR-203 / Y. Guo, X. Zhu, X. Sun // *Bioengineered.* – 2020. – Vol. 11 (1). – P. 201–208. DOI: 10.1080/21655979.2020.1729927.

123. Gut microbiota regulate tumor metastasis via circRNA/miRNA networks / Z. Zhu, J. Huang, X. Li [et al.] // *Gut Microbes.* – 2020. – Vol. 12 (1). – P. 1788891. DOI: 10.1080/19490976.2020.1788891.

124. Han, N. MicroRNA-203 inhibits epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of renal cell carcinoma cells via the inactivation of the PI3K/AKT signaling pathway by inhibiting CAV1 / N. Han, H. Li, H. Wang // *Cell Adh Migr.* – 2020. – Vol. 14 (1). – P. 227–241. DOI: 10.1080/19336918.2020.1827665.

125. Hanlon, K. Investigating the targets of MIR-15a and MIR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) / K. Hanlon, C. E. Rudin, L. W. Harries // PLoS One. – 2009. – Vol. 4 (9). – P. e7169. DOI: 10.1371/journal.pone.0007169.
126. Hassin, O. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets // O. Hassin, M. Oren // Nat Rev Drug Discov. – 2023. – Vol. 22 (2). – P. 127–144. DOI: 10.1038/s41573-022-00571-8.
127. Hernández Borrero, L. J. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting / L. J. Hernández Borrero, W. S. El-Deiry // Biochim Biophys Acta Rev Cancer. – 2021. – Vol. 1876 (1). – P. 188556. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188556.
128. High expression of tumor-infiltrating macrophages correlates with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma / Q. Cai, H. Liao, S. Lin [et al.] // Med. Oncol. – 2012. – Vol. 29. – P. 2317–2322.
129. Hill, M. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer / M. Hill, N. Tran // Dis Model Mech. – 2021. – Vol. 14 (4). – P. 47662. DOI: 10.1242/dmm.047662.
130. Histone deacetylase 3 (HDAC3) inhibitors as anticancer agents: A review / R. Sarkar, S. Banerjee, S. A. Amin [et al.] // Eur J Med Chem. – 2020. – Vol. 192. – P. 112171. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112171.
131. HMGB1 induced endothelial to mesenchymal transition in liver fibrosis: The key regulation of early growth response factor 1 / M. Wei, Y. Zhang, H. Zhang [et al.] // Biochim Biophys Acta Gen Subj. – 2022. – Vol. 1866 (10). – P. 130202. DOI: 10.1016/j.bbagen.2022.130202.
132. Ho, T. How the other half lives: what p53 does when it is not being a transcription factor / T. Ho, B. X. Tan, D. Lane // Int J Mol Sci. – 2019. – Vol. 21 (1). – P. 13. DOI: 10.3390/ijms21010013.
133. HPV-associated penile cancer: Impact of copy number alterations in miRNA/mRNA interactions and potential druggable targets / J. D. Silva, L. Nogueira, R. Coelho [et al.] // Cancer Biomark. – 2021. – Vol. 32 (2). – P. 147–160. DOI: 10.3233/CBM-210035.

134. Hu, C. DNA methyltransferase inhibitors combination therapy for the treatment of solid tumor: mechanism and clinical application / C. Hu, X. Liu, Y. Zeng // Clin Epigenetics. – 2021. – Vol. 13 (1). – P. 166. DOI: 10.1186/s13148-021-01154-x.

135. Hypermethylation of MIR129-2 Regulates SOX4 Transcription and Associates with Metastasis in Patients with Colorectal Cancer / A. Rezayi Soufiani, R. Dolatkah, M. Raeisi [et al.] // J Gastrointest Cancer. – 2022. – Vol. 53 (3). – P. 718–724. DOI: 10.1007/s12029-021-00708-9.

136. Identification and validation of methylated differentially expressed miRNAs and immune infiltrate profile in EBV-associated gastric cancer / M. Zhu, Q. Liang, T. Chen [et al.] // Clin Epigenetics. – 2021. – Vol. 13 (1). – P. 22. DOI: 10.1186/s13148-020-00989-0.

137. Identification of molecular subtypes and a novel prognostic model of diffuse large B-cell lymphoma based on a metabolism-associated gene signature / J. He, Z. Chen, Q. Xue [et al.] // J Transl Med. – 2022. – Vol. 20 (1). – P. 186. DOI: 10.1186/s12967-022-03393-9.

138. Identification of prognostic and chemopredictive micrnas for non-small-cell lung cancer by integrating SEER-medicare data / Q. Ye, J. Putila, R. Raese [et al.] // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22 (14). – P. 7658. DOI: 10.3390/ijms22147658.

139. Imatinib induces demethylation of miR-203 gene: an epigenetic mechanism of anti-tumor effect of imatinib / T. Shibuta, E. Honda, H. Shiotsu [et al.] // Leuk Res. – 2013. – Vol. 37 (10). – P. 1278–86. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.07.019.

140. Immune scoring model based on immune cell infiltration to predict prognosis in diffuse large B-cell lymphoma / J. Yang, L. Yu, J. Man [et al.] // Cancer. – 2023. – Vol. 129 (2). – P. 235–244. DOI: 10.1002/cncr.34519.

141. Immune targeted therapy for diffuse large B cell lymphoma / Y. Zheng, J. Si, T. Yuan [et al.] // Blood Sci. – 2021. – Vol. 3 (4). – P. 136–148. DOI: 10.1097/BS9.0000000000000095.

142. Improved efficacy of tafasitamab plus lenalidomide versus systemic therapies for relapsed/refractory DLBCL: RE-MIND2, an observational retrospective matched cohort study / G. S. Nowakowski, D. H. Yoon, A. Peters [et al.] // Clin Cancer

Res. – 2022. – Vol. 28 (18). – P. 4003–4017. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-3648.

143. Incidence of Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Including CNS Relapse in a Population-Based Cohort of 4243 Patients in Sweden / S. Harrysson, S. Eloranta, S. Ekberg [et al.] // *Blood Cancer J.* – 2021. – Vol. 11. – P. 9. DOI: 10.1038/s41408-020-00403-1.

144. Inhibition of c-FLIPL expression by miRNA-708 increases the sensitivity of renal cancer cells to anti-cancer drugs / E. A. Kim, S. W. Kim, J. Nam [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7 (22). – P. 31832–46. DOI: 10.18632/oncotarget.7149.

145. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas / L. A. Donehower, T. Soussi, A. Korkut [et al.] // *Cell Rep.* – 2019. – Vol. 28 (5). – P. 1370–1384. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.07.001.

146. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma / M. R. Green, S. Monti, S. J. Rodig [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 116 (17). – P. 3268–3277. DOI: 10.1182/blood-2010-05-282780.

147. International network of cancer genome projects / T. J. Hudson, W. Anderson, A. Artez [et al.] // *Nature.* – 2010. – Vol. 464. – P. 993–998. DOI: 10.1038/nature08987.

148. International prognostic indices in diffuse large B-cell lymphoma: a comparison of IPI, R-IPI, and NCCN-IPI / A. S. Ruppert, J. G. Dixon, G. Salles [et al.] // *Blood.* – 2020. – Vol. 135 (23). – P. 2041–2048. DOI: 10.1182/blood.2019002729.

149. ITPKA induces cell senescence, inhibits ovarian cancer tumorigenesis and can be downregulated by miR-203 / W. Shaosheng, W. Shaochuang, F. Lichun [et al.] // *Aging (Albany NY).* – 2021. – Vol. 13 (8). – P. 11822–11832. DOI: 10.18632/aging.202880.

150. Jardin, F. TP53 and outcome in DLBCL: not only the coding region / F. Jardin, B. Coiffier // *Blood.* – 2013. – Vol. 121 (22). – P. 4433–4434. DOI: 10.1182/blood-2013-04-493486.

151. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in

lymphoma subtypes: Evidence from a systematic meta-analysis / X. He, Z. Chen, T. Fu [et al.] // *BMC Cancer*. – 2014. – Vol. 14. – C. 153. DOI: 10.1186/1471-2407-14-153.

152. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker / S. S. Menon, C. Guruvayoorappan, K. M. Sakthivel, R. R. Rasmi // *Clin Chim Acta*. – 2019. – Vol. 491. – P. 39–45. DOI: 10.1016/j.cca.2019.01.011.

153. Kilikevicius, A. Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing / A. Kilikevicius, G. Meister, D. R. Corey // *Nucleic Acids Res*. – 2022. – Vol. 50 (2). – P. 617–634. DOI: 10.1093/nar/gkab1256.

154. Knockdown of MALAT1 inhibits osteosarcoma progression via regulating the miR 34a/cyclin D1 axis / G. Duan, C. Zhang, C. Xu [et al.] // *Int J Oncol*. – 2019. – Vol. 54 (1). – P. 17–28. DOI: 10.3892/ijo.2018.4600.

155. Koo, N Therapeutics Targeting p53-MDM2 Interaction to Induce Cancer Cell Death / N. Koo, A. K. Sharma, S. Narayan // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23 (9). – P. 5005. DOI: 10.3390/ijms23095005.

156. Labarrade, F. miR-203 represses keratinocyte stemness by targeting survivin / F. Labarrade, J. M. Botto, I. M. Imbert // *J Cosmet Dermatol*. – 2022. – Vol. 21 (11). – P. 6100–6108. DOI: 10.1111/jocd.15147.

157. Lee, Y. S. MicroRNAs in cancer / Y. S. Lee, A. Dutta // *Annu Rev Pathol*. – 2009. – Vol. 4. – P. 199–227. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222.

158. Li, Q. [miR-34a-5p regulates viability, invasion and apoptosis of placental trophoblastic cells via modulating CDK6 and PI3K/AKT pathway] / Q. Li, J. Xu // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. – 2020. – Vol. 40 (1). – P. 79-86. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.01.13.

159. Lin, X. M. MiR-203 regulates JAK-STAT pathway in affecting pancreatic cancer cells proliferation and apoptosis by targeting SOCS3 / X. M. Lin, H. Chen, X. L. Zhan // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. – 2019. – Vol. 23 (16). – P. 6906–6913. DOI: 10.26355/eurev_201908_18730.

160. LncRNA HOTAIR promotes breast cancer progression through regulating the miR-129-5p/FZD7 axis / D. Wu, J. Zhu, Y. Fu [et al.] // *Cancer Biomark*. – 2021. – Vol. 30 (2). – P. 203–212. DOI: 10.3233/CBM-190913.

161. LncRNA PVT1 facilitates DLBCL development via miR-34b-5p/Foxp1 pathway / S. Tao, Y. Chen, M. Hu [et al.] // *Mol Cell Biochem.* – 2022. – Vol. 477 (3). – P. 951–963. DOI: 10.1007/s11010-021-04335-7.

162. LncRNA RP11-89 facilitates tumorigenesis and ferroptosis resistance through PROM2-activated iron export by sponging miR-129-5p in bladder cancer / W. Luo, J. Wang, W. Xu [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2021. – Vol. 12 (11). – P. 1043. DOI: 10.1038/s41419-021-04296-1.

163. Loss of microRNA-143/145 disturbs cellular growth and apoptosis of human epithelial cancers by impairing the MDM2-p53 feedback loop / J. Zhang, Q. Sun, Z. Zhang [et al.] // *Oncogene.* – 2013. – Vol. 32 (1). – P. 61–9. DOI: 10.1038/onc.2012.28.

164. Lu, F. DNA methylation and nonsmall cell lung cancer / F. Lu, H. T. Zhang // *Anat Rec (Hoboken).* – 2011. – Vol. 294 (11). – P. 1787–95. DOI: 10.1002/ar.21471.

165. Lu, Y. H. Global identification of circular RNAs in imatinib (IM) resistance of chronic myeloid leukemia (CML) by modulating signaling pathways of circ_0080145/miR-203/ABL1 and circ_0051886/miR-637/ABL1 / Y. H. Lu, Z. Y. Huang // *Mol Med.* – 2021. – Vol. 27 (1). – P. 148. DOI: 10.1186/s10020-021-00395-z.

166. Lulla, P. D. CAR T cells and autologous transplantation can coexist for DLBCL / P. D. Lulla // *Blood.* – 2022. – Vol. 139 (9). – P. 1266–1267. DOI: 10.1182/blood.2021014066.

167. Macfarlane, L. A. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer / L. A. Macfarlane, P. R. Murphy // *Curr Genomics.* – 2010. – Vol. 11 (7). – P. 537–61. DOI: 10.2174/138920210793175895.

168. Major, A. DA-R-EPOCH vs R-CHOP in DLBCL: How do we choose? / A. Major, S. M. Smith // *Clin Adv Hematol Oncol.* – 2021. – Vol. 19 (11). – P. 698–709.

169. Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: Guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia / J. Styczynski, P. Reusser, H. Einsele [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2009. – Vol. 43 (10). – P. 757–770.

DOI: 10.1038/bmt.2008.386.

170. Mapping genetic variability in mature miRNAs and miRNA binding sites in prostate cancer / B. Lee, J. L. Li, J. Marchica [et al.] // *J Hum Genet.* – 2021. – Vol. 66 (11). – P. 1127–1137. DOI: 10.1038/s10038-021-00934-w.

171. Mast cell infiltration is a favourable prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma / G. Hedström, M. Berglund, D. Molin [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2007. – Vol. 138. – P. 68–71.

172. Mechanisms of transcriptional regulation by p53 / K. D. Sullivan, M. D. Galbraith, Z. Andrysik, J. M. Espinosa // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol. 25. – P. 133–143. DOI: 10.1038/cdd.2017.174.

173. Meng, Y. Identification of key microRNAs associated with diffuse large B-cell lymphoma by analyzing serum microRNA expressions / Y. Meng, L. Quan, A. Liu // *Gene.* – 2018. – Vol. 642. – P. 205–211. DOI: 10.1016/j.gene.2017.11.022.

174. Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? / H. M. Müller, M. Oberwalder, H. Fiegl [et al.] // *Lancet.* – 2004. – Vol. 363 (9417). – P. 1283–5. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16002-9.

175. Methylation of miR-34a, miR-34b/c, miR-124-1 and miR-203 in Ph-negative myeloproliferative neoplasms / C. S. Chim, T. S. Wan, K. Y. Wong [et al.] // *J Transl Med.* – 2011. – Vol. 9. – P. 197. DOI: 10.1186/1479-5876-9-197.

176. Methylation of p53-responsive microRNA genes in tumor tissue of lymphoma / E. Voropaeva, T. Pospelova, O. Berezina [et al.] // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022) : Abstracts the Thirteenth International Multiconference.* – Novosibirsk, 2022. – P. 103.

177. Michlewski, G. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis // G. Michlewski, J. F. Cáceres // *RNA.* – 2019. – Vol. 25 (1). – P. 1–16. DOI: 10.1261/rna.068692.118.

178. MicroRNA expression profiles classify human cancers / J. Lu, G. Getz, E. A. Miska [et al.] // *Nature.* – 2005. – Vol. 435 (7043). – P. 834–8. DOI: 10.1038/nature03702.

179. MicroRNA expression profiling identifies molecular signatures associated

with anaplastic large cell lymphoma / C. Liu, J. Iqbal, J. Teruya-Feldstein [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 122 (12). – P. 2083–92. DOI: 10.1182/blood-2012-08-447375.

180. MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription / H. Budak, R. Bulut, M. Kantar, B. Alptekin // *Brief Funct Genomics*. – 2016. – Vol. 15 (1). – P. 65–71. DOI: 10.1093/bfgp/elv026.

181. MicroRNA profiling of primary cutaneous large B-cell lymphomas / L. Koens, Y. Qin, W. Y. Leung [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8 (12). – P. e82471. DOI: 10.1371/journal.pone.0082471.

182. MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges / S. Reda El Sayed, J. Cristante, L. Guyon [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13 (11). – P. 2680. DOI: 10.3390/cancers13112680.

183. MicroRNA-129 Inhibits Glioma Cell Growth by Targeting CDK4, CDK6, and MDM2 / A. Moradimotlagh, E. Arefian, R. Rezazadeh Valojerdi [et al.] // *Mol Ther Nucleic Acids*. – 2020. – Vol. 19. – P. 759–764. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.11.033.

184. MicroRNA-129 modulates neuronal migration by targeting Fmr1 in the developing mouse cortex / C. Wu, X. Zhang, P. Chen [et al.] // *Cell Death Dis*. – 2019. – Vol. 10 (4). – P. 287. DOI: 10.1038/s41419-019-1517-1.

185. MicroRNA-203 induces apoptosis by upregulating Puma expression in colon and lung cancer cells / N. Funamizu, C. R. Lacy, M. Kamada [et al.] // *Int J Oncol*. – 2015. – Vol. 47 (5). – P. 1981–8. DOI: 10.3892/ijo.2015.3178.

186. MicroRNA-203 is a prognostic indicator in bladder cancer and enhances chemosensitivity to cisplatin via apoptosis by targeting bcl-w and survivin / X. Zhang, Y. Zhang, X. Liu [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – P. e0143441. DOI: 10.1371/journal.pone.0143441.

187. microRNA-203 suppresses bladder cancer development by repressing bcl-w expression / J. Bo, G. Yang, K. Huo [et al.] // *FEBS J*. – 2011. – Vol. 278 (5). – P. 786–92. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07997.x.

188. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human

gliomas / M. F. Corsten, R. MiRanda, R. Kasmieh [et al.] // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67 (19). – P. 8994–9000. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1045.

189. microRNA-34b/c on chromosome 11q23 is aberrantly methylated in chronic lymphocytic leukemia / S. Deneberg, M. Kanduri, D. Ali [et al.] // *Epigenetics.* – 2014. – Vol. 9 (6). – P. 910–7. DOI: 10.4161/epi.28603.

190. MicroRNA-34c-5p exhibits anticancer properties in gastric cancer by targeting MAP2K1 to inhibit cell proliferation, migration, and invasion / Q. Ma, Y. Zhao, Z. Li [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2022. – Vol. 2022. – P. 7375661. DOI: 10.1155/2022/7375661.

191. MicroRNAs as regulators of tumor metabolism / F. Ruggieri, K. Jonas, M. Ferracin [et al.] // *Endocr Relat Cancer.* – 2023. – Vol. 30 (8). –P. e220267. DOI: 10.1530/ERC-22-0267.

192. MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells / R. Liao, J. Sun, L. Zhang [et al.] // *J Cell Biochem.* – 2008. – Vol. 104 (3). – P. 805–17. DOI: 10.1002/jcb.21668.

193. MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing / I. Slezak-Prochazka, S. Durmus, B. J. Kroesen, A. van den Berg // *RNA.* – 2010. – Vol. 16 (6). – P. 1087–95. DOI: 10.1261/rna.1804410.

194. miR 29 promoter and enhancer methylation identified by pyrosequencing in Burkitt lymphoma cells: Interplay between MYC and miR 29 regulation / L. Mazzocchi, M. C. Robaina, C. E. Bacchi [et al.] // *Oncol Rep.* – 2019. – Vol. 42 (2). – P. 775–784. DOI: 10.3892/or.2019.7183.

195. Mir-129 reduces CDDP resistance in gastric cancer cells by inhibiting MAPK3 / H. Y. Cao, C. H. Xiao, H. J. Lu [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2020. – Vol. 24 (22). – P. 11468. DOI: 10.26355/eurrev_202011_23759.

196. miR-129-2 upregulation induces apoptosis and promotes NSCLC chemosensitivity by targeting SOX4 / W. Zhou, C. Cai, J. Lu, Q. Fan // *Thorac Cancer.* – 2022. – Vol. 13 (7). – P. 956–964. DOI: 10.1111/1759-7714.14336.

197. MiR-129-5p promotes radio-sensitivity of NSCLC Cells by targeting SOX4 and RUNX1 / T. Xue, G. Yin, W. Yang [et al.] // *Curr Cancer Drug Targets.* –

2021. – Vol. 21 (8). – P. 702–712. DOI: 10.2174/1568009621666210415094350.

198. MiR-129-5p protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via targeting HMGB1 / Z. X. Chen, D. He, Q. W. Mo [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2020. – Vol. 24 (8). – P. 4440–4450. DOI: 10.26355/eurev_202004_21026.

199. MiR-129-5p sensitization of lung cancer cells to etoposide-induced apoptosis by reducing YWHAB / C. Xu, Z. Du, S. Ren [et al.] // *J Cancer.* – 2020. – Vol. 11 (4). – P. 858–866. DOI: 10.7150/jca.35410.

200. MiR-129-5p/TRIP13 affects malignant phenotypes of colorectal cancer cells / Y. Cao, F. Huang, J. Liu [et al.] // *Histol Histopathol.* – 2022. – Vol. 37 (9). – P. 879–888. DOI: 10.14670/HH-18-455.

201. miR-150 downregulation contributes to the high-grade transformation of follicular lymphoma by upregulating FOXP1 levels / K. Musilova, J. Devan, K. Cerna [et al.] // *Blood.* – 2018. – Vol. 132 (22). – P. 2389–2400. DOI: 10.1182/blood-2018-06-855502.

202. MiR-203 over-expression promotes prostate cancer cell apoptosis and reduces ADM resistance / L. Z. Chen, Z. Ding, Y. Zhang [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2020. – Vol. 24 (6). – P. 2784. DOI: 10.26355/eurev_202003_20637.

203. MiR-203 regulates proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells by targeting SOCS3 / H. P. Liu, Y. Zhang, Z. T. Liu [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2020. – Vol. 24 (15). – P. 7914. DOI: 10.26355/eurev_202008_22448.

204. MiR-203 targets to the 3'-UTR of SLUG to suppress cerebral infarction-induced endothelial cell growth and motility / Y. Li, W. Bi, B. Han [et al.] // *Evid Based Complement Alternat Med.* – 2021. – Vol. 2021. – P. 5597567. DOI: 10.1155/2021/5597567.

205. miR-29b inhibits the progression of multiple myeloma through downregulating FOXP1 / H. Wang, Q. Ding, M. Wang [et al.] // *Hematology.* – 2019. – Vol. 24 (1). – P. 32–38. DOI: 10.1080/10245332.2018.1502961.

206. MiR-34: A New Weapon Against Cancer? / G. Misso, M. T. Di Martino, G. De Rosa [et al.] // *Molecular Therapy Nucleic Acids.* – 2014. – Vol. 3 (9). –

P. e194. DOI: 10.1038/mtna.2014.47.

207. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia / T. Zenz, J. Mohr, E. Eldering [et al.] // *Blood*. – 2009. – Vol. 113 (16). – P. 3801–8. DOI: 10.1182/blood-2008-08-172254.

208. miR-34a-FOXP1 Loop in Ovarian Cancer / E. Dirimtekin, M. Mortoglou, C. Alavanda [et al.] // *ACS Omega*. – 2023. – Vol. 8 (30). – P. 27743–27750. DOI: 10.1021/acsomega.3c03867.

209. MiR-34b/c-5p and the neurokinin-1 receptor regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis / L. Zhang, L. Wang, D. Dong [et al.] // *Cell Prolif*. – 2019. – Vol. 52 (1). – P. e12527. DOI: 10.1111/cpr.12527.

210. miR-34c-5p promotes eradication of acute myeloid leukemia stem cells by inducing senescence through selective RAB27B targeting to inhibit exosome shedding / D. Peng, H. Wang, L. Li [et al.] // *Leukemia*. – 2018. – Vol. 32 (5). – P. 1180–1188. DOI: 10.1038/s41375-018-0015-2.

211. miR-582 negatively regulates pre-B cell proliferation and survival through targeting Hif1 α and Rictor / X. Li, Y. Zhang, M. Zheng [et al.] // *Cell Death Dis*. – 2022. – Vol. 13 (2). – P. 107. DOI: 10.1038/s41419-022-04560-y.

212. MiRGeneDB 2.0: the metazoan microRNA complement / B. Fromm, D. Domanska, E. Høye [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2020. – Vol. 48 (D1). – P. D132–D141. DOI: 10.1093/nar/gkz885.

213. MiRNA-27a sensitizes breast cancer cells to treatment with Selective Estrogen Receptor Modulators / B. Ljepoja, J. García-Roman, A. K. Sommer [et al.] // *Breast*. – 2019. – Vol. 43. – P. 31–38. DOI: 10.1016/j.breast.2018.10.007.

214. miRNA-independent function of long noncoding pri-miRNA loci / D. He, D. Wu, S. Muller [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2021. – Vol. 118 (13). – P. e2017562118. DOI: 10.1073/pnas.2017562118.

215. Molecular mechanisms in clear cell renal cell carcinoma: role of mirnas and hypermethylated miRNA genes in crucial oncogenic pathways and processes / E. A. Braga, M. V. Fridman, V. I. Loginov [et al.] // *Front Genet*. – 2019. – Vol. 10. – P. 320. DOI: 10.3389/fgene.2019.00320.

216. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes / B. Chapuy, C. Stewart, A. J. Dunford [et al.] // *Nat Med.* – 2018. – Vol. 24 (5). – P. 679–690. DOI: 10.1038/s41591-018-0016-8.

217. MS-HRM protocol: a simple and low-cost approach for technical validation of next-generation methylation sequencing data / A. Javadmanesh, A. Mojtabanezhad Shariatpanahi, E. Shams Davodly [et al.] // *Mol Genet Genomics.* – 2022. – Vol. 297 (4). – P. 1101–1109. DOI: 10.1007/s00438-022-01906-1.

218. Muller, P. A. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities / P. A. Muller, K. H. Vousden // *Cancer Cell.* – 2014. – Vol. 25 (3). – P. 304–17. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.021.

219. Multifunctional roles of miR-34a in cancer: a review with the emphasis on head and neck squamous cell carcinoma and thyroid cancer with clinical implications / D. Kalfert, M. Ludvikova, M. Pesta [et al.] // *Diagnostics (Basel).* – 2020. – Vol. 10 (8). – P. 563. DOI: 10.3390/diagnostics10080563.

220. Musilova, K. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex / K. Musilova, M. Mraz // *Leukemia.* – 2015. – Vol. 29 (5). – P. 1004–1017. DOI: 10.1038/leu.2014.351.

221. Mutational profile of Diffuse Large B-cell Lymphoma with central nervous system relapse: analysis of CBioPortal for Cancer Genomics database / E. Voropaeva, O. Beresina, T. Pospelova [et al.]. – *Cognitive science*, 2020. DOI:10.1109/CSGB51356.2020.9214638.

222. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma / A. Ichikawa, T. Kinoshita, T. Watanabe [et al.] // *N Engl J Med.* – 1997. – Vol. 337 (8). – P. 529–34. DOI: 10.1056/NEJM199708213370804.

223. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma / A. Ichikawa, T. Kinoshita, T. Watanabe [et al.] // *N Engl J Med.* – 1997. – Vol. 337 (8). – P. 529–34. DOI: 10.1056/NEJM199708213370804.

224. MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation / E. Leucci, M. Cocco, A. Onnis [et al.] // *J Pathol.* – 2008. – Vol. 216 (4). – P. 440–50.

DOI: 10.1002/path.2410.

225. Myc-mediated repression of microRNA-34a promotes high-grade transformation of B-cell lymphoma by dysregulation of FoxP1 / V. J. Craig, S. B. Cogliatti, J. Imig [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 117 (23). – P. 6227–36. DOI: 10.1182/blood-2010-10-312231.

226. MYCN contributes to the sensitization of acute myelogenous leukemia cells to cisplatin by targeting SRY-box transcription factor 4 / X. Huang, L. Qi, W. Lu [et al.] // *Bioengineered*. – 2021. – Vol. 15 (1). – P. 1997697. DOI: 10.1080/21655979.2021.1997697.

227. MYD88 p.(L265P) detection on cell-free DNA in liquid biopsies of patients with primary central nervous system lymphoma / L. S. Hiemcke-Jiwa, R. J. Leguit, T. J. Snijders [et al.] // *Br J Haematol*. – 2019. – Vol. 185 (5). – P. 974–977. DOI: 10.1111/bjh.15674.

228. Nakayama, M. Mutant p53 in colon cancer / M. Nakayama, M. J. Oshima // *Mol Cell Biol*. – 2019. – Vol. 11 (4). – P. 267–276. DOI: 10.1093/jmcb/mjy075.

229. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program 6 [website]. – URL: <https://seer.cancer.gov/> (date of the application: 18.01.2021).

230. Negative feedback regulation of AXL by miR-34a modulates apoptosis in lung cancer cells / C. Y. Cho, J. S. Huang, S. G. Shiah [et al.] // *RNA*. – 2016. – Vol. 22 (2). – P. 303–15. DOI: 10.1261/rna.052571.115.

231. Non-genotoxic MDM2 inhibition selectively induces a pro-apoptotic p53 gene signature in chronic lymphocytic leukemia cells / C. Ciardullo, E. Aptullahoglu, L. Woodhouse [et al.] // *Haematologica*. – 2019. – Vol. 104 (12). – P. 2429–2442. DOI: 10.3324/haematol.2018.206631.

232. Nuclear stabilization of p53 requires a functional nucleolar surveillance pathway / K. M. Hannan, P. Soo, M. S. Wong [et al.] // *Cell Rep*. – 2022. – Vol. 41 (5). – P. 111571. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111571.

233. p53 expression in large B-cell lymphomas with MYC extra copies and CD99 expression in large B-cell lymphomas in relation to MYC status /

A. I. Richardson, D. Zhang, J. Woodroof, W. Cui // *Hum Pathol.* – 2019. – Vol. 86. – P. 21–31. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.11.015.

234. p53-dependent upregulation of miR-16-2 by sanguinarine induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma / B. Zhang, X. Wang, J. Deng [et al.] // *Cancer Lett.* – 2019. – Vol. 459. – P. 50–58. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.05.042.

235. PD-1/PD-L1 Pathway: A Therapeutic Target in CD30+ Large Cell Lymphomas / W. Xie, L. J. Medeiros, S. Li [et al.] // *Biomedicines.* – 2022. – Vol. 10 (7). – P. 1587. DOI: 10.3390/biomedicines10071587.

236. PD-L1 and miR-34a are Prognostic Factors for Primary Gastric Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients Treated with R-CHOP / J. Wang, S. Shang, J. Li [et al.] // *Cancer Manag Res.* – 2020. – Vol. 12. – P. 4999–5008. DOI: 10.2147/CMAR.S247874.

237. Pharmacogenomics of in vitro response of the NCI-60 cancer cell line panel to Indian natural products / H Sankaran, S Negi, LM McShane [et al.] // *BMC Cancer.* – 2022. – Vol. 22 (1). – P. 512. DOI: 10.1186/s12885-022-09580-7.

238. Pharmacological DNA demethylation restores SMAD1 expression and tumor suppressive signaling in diffuse large B-cell lymphoma / A. Stelling, C. T. Wu, K. Bertram [et al.] // *Blood Adv.* – 2019. – Vol. 3 (20). – P. 3020–3032. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000210.

239. Phase II trial of co-administration of CD19- and CD20-targeted chimeric antigen receptor T cells for relapsed and refractory diffuse large B cell lymphoma / W. Sang, M. Shi, J. Yang [et al.] // *Cancer Med.* – 2020. – Vol. 9 (16). – P. 5827–5838. DOI: 10.1002/cam4.3259.

240. Pidíková, P. miRNA Clusters with Down-Regulated Expression in Human Colorectal Cancer and Their Regulation / P. Pidíková, R. Reis, I. Herichova // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21 (13). – P. 4633. DOI: 10.3390/ijms21134633.

241. Pilley, S. Mutant p53 in cell-cell interactions // S. Pilley, T. A. Rodriguez, K. H. Vousden // *Genes Dev.* – 2021. – Vol. 35 (7-8). – P. 433–448. DOI: 10.1101/gad.347542.120.

242. Plasma microRNA profiling: Exploring better biomarkers for lymphoma surveillance / D. Khare, N. Goldschmidt, A. Bardugo [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12 (11). – P. e0187722. DOI: 10.1371/journal.pone.0187722.
243. Polatuzumab vedotin in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma / L. H. Sehn, A. F. Herrera, C. R. Flowers [et al.] // J Clin Oncol. – 2020. – Vol. 38 (2). – P. 155–165. DOI: 10.1200/JCO.19.00172.
244. Polatuzumab vedotin plus bendamustine and rituximab in relapsed/refractory DLBCL: survival update and new extension cohort data / L. H. Sehn, M. Hertzberg, S. Opat [et al.] // Blood Adv. – 2022. – Vol. 6 (2). – P. 533–543. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021005794.
245. Preferential binding of hot spot mutant p53 proteins to supercoiled DNA in vitro and in cells / M. Brázdová, L. Navrátilová, V. Tichý [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8 (3). – P. e59567. DOI: 10.1371/journal.pone.0059567.
246. Prognosis and personalized treatment prediction in TP53-mutant hepatocellular carcinoma: an in silico strategy towards precision oncology / C. Yang, X. Huang, Y. Li [et al.] // Brief Bioinform. – 2021. – Vol. 22 (3). – P. 164. DOI: 10.1093/bib/bbaa164.
247. Prognostic Value of the miR-17~92 Cluster in Chronic Lymphocytic Leukemia / S. Chocholska, M. Zarobkiewicz, A. Szymańska [et al.] // Int J Mol Sci. – 2023. – Vol. 24 (2). – P. 1705. DOI: 10.3390/ijms24021705.
248. Promoter DNA methylation frequency and clinicopathological role of mir-129-2 gene in patients with chronic lymphocytic leukemia / M. Hashemi, M. Mohammadipour, S. Rostami, M. S. Soltanpour // Oman Med J. – 2020. – Vol. 35 (4). – P. e151. DOI: 10.5001/omj.2020.71.
249. Regulation of miRNAs expression by mutant p53 gain of function in cancer / T. Madrigal, J. Hernández-Monge, L. A. Herrera [et al.] // Front Cell Dev Biol. – 2021. – Vol. 9. – P. 695723. DOI: 10.3389/fcell.2021.695723.
250. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer / A. Z. Syeda, S. S. S. Langden, C. Munkhzul [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21. – P. 1723. DOI: 10.3390/ijms21051723.

251. Reimann, D. Lollipops help align visual and statistical fit estimates in scatterplots with nonlinear models / D. Reimann, N. Ram, R. Gaschler // *IEEE Trans Vis Comput Graph.* – 2023. – Vol. 29 (7). – P. 3436–3440. DOI: 10.1109/TVCG.2022.3158093.

252. Roberts, A. W. BCL2 and MCL1 inhibitors for hematologic malignancies / A. W. Roberts, A. H. Wei, D. C. S. Huang // *Blood.* – 2021. – Vol. 138 (13). – P. 1120–1136. DOI: 10.1182/blood.2020006785.

253. ROBUST: A phase III study of lenalidomide plus R-CHOP versus placebo plus R-CHOP in previously untreated patients with ABC-type diffuse large B-cell lymphoma / G. S. Nowakowski, A. Chiappella, R. D. Gascoyne [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2021. – Vol. 39 (12). – P. 1317–1328. DOI: 10.1200/JCO.20.01366.

254. Role of microRNA-34b-5p in cancer and injury: how does it work? / X. Bai, L. Zheng, Y. Xu [et al.] // *Cancer Cell Int.* – 2022. – Vol. 22. – P. 381. DOI: 10.1186/s12935-022-02797-3.

255. Role of miR 34 in gastric cancer: From bench to bedside (Review) / S. Xiong, M. Hu, C. Li [et al.] // *Oncol Rep.* – 2019. – Vol. 42 (5). – P. 1635–1646. DOI: 10.3892/or.2019.7280.

256. Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis / S. G. Chaulk, G. L. Thede, O. A. Kent [et al.] // *RNA Biol.* – 2011. – Vol. 8 (6). – P. 1105–14. DOI: 10.4161/rna.8.6.17410.

257. Rossor, A. M. Antisense oligonucleotides and other genetic therapies made simple / A. M. Rossor, M. M. Reilly, J. N. Sleight // *Pract. Neurol.* – 2018. – Vol. 18. – P. 126–131.

258. Sadakierska-Chudy, A. MicroRNAs: diverse mechanisms of action and their potential applications as cancer epi-therapeutics / A. Sadakierska-Chudy // *Biomolecules.* – 2020. – Vol. 10 (9). – P. 1285. DOI: 10.3390/biom10091285.

259. Sánchez-Vásquez, E Epigenetic inactivation of miR-203 as a key step in neural crest epithelial-to-mesenchymal transition / E. Sánchez-Vásquez, M. E. Bronner, P. H. Strobl-Mazzulla // *Development.* – 2019. – Vol. 146 (7). – P. 171017. DOI: 10.1242/dev.171017.

260. Sargolzaei, J. The P53/microRNA network: A potential tumor suppressor with a role in anticancer therapy / J. Sargolzaei, T. Etemadi, A. Alyasin // *Pharmacol Res.* – 2020. – Vol. 160. – P. 105179. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105179.

261. Screening and identification of differentially expressed microRNAs in diffuse large B-cell lymphoma based on microRNA microarray / H. X. Gao, S. J. Li, M. B. Wang [et al.] // *Oncol Lett.* – 2021. – Vol. 22 (5). – P. 753. DOI: 10.3892/ol.2021.13014.

262. Selinexor in relapsed/refractory multiple myeloma / J. Richter, D. Madduri, S. Richard, A. Chari // *Therapeutic Advances in Hematology.* – 2020. – Vol. 11. DOI:10.1177/2040620720930629.

263. Simplified algorithm for genetic subtyping in diffuse large B-cell lymphoma / R. Shen, D. Fu, L. Dong [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2023. – Vol. 8 (1). – P. 145. doi: 10.1038/s41392-023-01358-y.

264. Singh, D. Role of p53-miRNAs circuitry in immune surveillance and cancer development: A potential avenue for therapeutic intervention / D. Singh, M. A. Khan, H. R. Siddique // *Semin Cell Dev Biol.* – 2022. – Vol. 124. – P. 15–25. DOI: 10.1016/j.semcdb.2021.04.003.

265. Single nucleotide variation in the TP53 3' untranslated region in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program / Y. Li, M. W. Gordon, Z. Y. Xu-Monette [et al.] // *Blood.* – 2013. – Vol. 121 (22). – P. 4529–4540. DOI: 10.1182/blood-2012-12-471722.

266. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches / W. Alshaer, H. Zureigat, A. Al Karaki [et al.] // *Eur J Pharmacol.* – 2021. – Vol. 905. – P. 174178. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174178.

267. Solution Structure of NPSL2, A Regulatory Element in the oncomiR-1 RNA / Y. Liu, A. Munsayac, I. Hall, S. C. Keane // *J Mol Biol.* – 2022. – Vol. 434 (18). – P. 167688. DOI: 10.1016/j.jmb.2022.167688.

268. Stavast, C. J. The non-canonical aspects of micrornas: many roads to gene regulation / C. J. Stavast, S. J. Erkeland // *Cells.* – 2019 – Vol. 8 (11). – P. 1465.

DOI: 10.3390/cells8111465.

269. Stegemann, M. DLBCL 1L-What to Expect beyond R-CHOP? / M. Stegemann, S. Denker, C. A. Schmitt // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14 (6). – P. 1453. DOI: 10.3390/cancers14061453.

270. Strmsek, Z. Data integration of 104 studies related with microRNA epigenetics revealed that miR-34 gene family is silenced by DNA methylation in the highest number of cancer types / Z. Strmsek, T. Kunej // *Discoveries (Craiova)*. – 2014. – Vol. 2 (2). – P. e18. DOI: 10.15190/d.2014.10.

271. Tarach, P. *Acta Universitatis Lodzensis* Application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) in the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) / P. Tarach // *Folia Biologica et Oecologica*. – 2021. – Vol. 17. – P. 48–53. DOI: 10.18778/1730-2366.16.14.

272. Targeted inhibition of PI3K α/δ is synergistic with BCL-2 blockade in genetically defined subtypes of DLBCL / K Bojarczuk, K Wienand, JA Ryan [et al.] // *Blood*. – 2019. – Vol. 133 (1). – P. 70–80. DOI: 10.1182/blood-2018-08-872465.

273. Targeted polymersome delivery of a stapled peptide for drugging the tumor protein p53:BCL-2-family axis in diffuse large B-cell lymphoma / M. R. Schnorenberg, K. M. Hawley, A. T. Thomas-Toth [et al.] // *ACS Nano*. – 2023. – Vol. 17 (23). – P. 23374–23390. DOI: 10.1021/acsnano.3c04112.

274. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies / J. Hu, J. Cao, W. Topatana [et al.] // *J Hematol Oncol*. – 2021. – Vol. 14 (1). – P. 157. DOI: 10.1186/s13045-021-01169-0.

275. Targeting MYC activity in double-hit lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with epigenetic bromodomain inhibitors / W. Li, S. K. Gupta, W. Han [et al.] // *J Hematol Oncol*. – 2019. – Vol. 12 (1). – P. 73. DOI: 10.1186/s13045-019-0761-2.

276. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy / H. Wang, M. Guo, H. Wei, Y. Chen // *Signal Transduct Target Ther*. – 2023. – Vol. 8 (1). – P. 92. DOI: 10.1038/s41392-023-01347-1.

277. Targeting the p53-MDM2 pathway for neuroblastoma therapy: Rays of

hope / A. Zafar, W. Wang, G. Liu [et al.] // *Cancer Lett.* – 2021. – Vol. 496. – P. 16–29. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.09.023.

278. TAZ is indispensable for c-MYC-induced hepatocarcinogenesis / H. Wang, S. Zhang, Y. Zhang [et al.] // *J Hepatol.* – 2022. – Vol. 76 (1). – P. 123–134. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.08.021.

279. The AGMK1-9T7 cell model of neoplasia: Evolution of DNA copy-number aberrations and miRNA expression during transition from normal to metastatic cancer cells / A. M. Lewis Jr., R. Thomas, M. Breen [et al.] // *PLoS One.* – 2022. – Vol. 17 (10). – P. e0275394. DOI: 10.1371/journal.pone.0275394.

280. The antiCD19 antibody drug immunoconjugate loncastuximab achieves responses in DLBCL relapsing after antiCD19 CAR-T cell therapy / P. F. Caimi, K. M. Ardeshtna, E. Reid [et al.] // *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* – 2022. – Vol. 22 (5). – P. e335–e339. DOI: 10.1016/j.clml.2021.11.005.

281. The ARTS of p53-dependent mitochondrial apoptosis / Q. Hao, J. Chen, H. Lu, X. Zhou // *J Mol Cell Biol.* – 2023. – Vol. 14 (10). – P. mjac074. DOI: 10.1093/jmcb/mjac074.

282. The competition of yin and yang: exploring the role of wild-type and mutant p53 in tumor progression / B. H. Cai, Y. T. Sung, C. C. Chen [et al.] // *Biomedicines.* – 2023. – Vol. 11 (4). – P. 1192. DOI: 10.3390/biomedicines11041192.

283. The comprehensive landscape of miR-34a in cancer research / S. Li, X. Wei, J. He [et al.] // *Cancer Metastasis Rev.* – 2021. – Vol. 40 (3). – P. 925–948. DOI: 10.1007/s10555-021-09973-3.

284. The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations / S. Diederichs, L. Bartsch, J. C. Berkmann [et al.] // *EMBO Mol Med.* – 2016. – Vol. 8 (5). – P. 442–57. DOI: 10.15252/emmm.201506055.

285. The function of a heterozygous p53 mutation in a Li-Fraumeni syndrome patient / Y. Li, T. Li, Y. Tang [et al.] // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15 (6). – P. e0234262. Doi: 10.1371/journal.pone.0234262.

286. The function of the mutant p53-R175H in cancer / Y. T. Chiang,

Y. C. Chien, Y. H. Lin [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13 (16). – P. 4088. DOI: 10.3390/cancers13164088.

287. The Mechanism of DNA Methylation and miRNA in Breast Cancer / L. Ma, C. Li, H. Yin [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2023. – Vol. 24 (11). – P. 9360. DOI: 10.3390/ijms24119360.

288. The methylation of the P53 targets the genes MIR-203, MIR-129-2, MIR-34A and MIR-34B/C in the tumor tissue of diffuse large B-cell lymphoma / E. N. Voropaeva, T. I. Pospelova, Y. L. Orlov [et al.] // *Genes*. – 2022. – T. 13, № 8. – C. 1401. DOI: 10.3390/genes13081401.

289. The multifaceted role and utility of microRNAs in Indolent B-Cell non-hodgkin lymphomas / P. I. Artemaki, P. A. Letsos, I. C. Zoupa [et al.] // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9 (4). – P. 333. DOI: 10.3390/biomedicines9040333.

290. The p53/miR-34 axis in development and disease / M. Rokavec, H. Li, L. Jiang, H. Hermeking // *J Mol Cell Biol*. – 2014. – Vol. 6 (3). – P. 214–30. DOI: 10.1093/jmcb/mju003.

291. The p53/miRNAs/Ccna2 pathway serves as a novel regulator of cellular senescence: Complement of the canonical p53/p21 pathway / S. Xu, W. Wu, H. Huang [et al.] // *Aging Cell*. – 2019. – Vol. 18 (3). – P. 12918. DOI: 10.1111/accel.12918.

292. The regulation and function of miR-21-FOXO3a-miR-34b/c signaling in breast cancer / X. Liu, J. Feng, L. Tang [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2015. – Vol. 16 (2). – P. 3148–62. DOI: 10.3390/ijms16023148.

293. The risks of miRNA therapeutics: in a drug target perspective / S. Zhang, Z. Cheng, Y. Wang, T. Han // *Drug Des Devel Ther*. – 2021. – Vol. 15. – P. 721–733. DOI: 10.2147/DDDT.S288859.

294. The Role and Function of microRNA in the Pathogenesis of Multiple Myeloma / H. Handa, Y. Murakami, R. Ishihara [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11 (11). – P. 1738. DOI: 10.3390/cancers11111738.

295. The role of exosomal miRNA in nonalcoholic fatty liver disease / A. Mahmoudi, A. E. Butler, T. Jamialahmadi, A. Sahebkar // *J Cell Physiol*. – 2022. – Vol. 237 (4). – P. 2078–2094. DOI: 10.1002/jcp.30699.

296. The Role of miR-129-5p in cancer: a novel therapeutic target / S. Xu, W. Li, J. Wu [et al.] // *Curr Mol Pharmacol.* – 2022. – Vol. 15 (4). – P. 647–657. DOI: 10.2174/1874467214666210914122010.

297. The role of TP53 in adaptation and evolution / K. Voskarides, N. Giannopoulou // *Cells.* – 2023. – Vol. 12 (3). – P. 512. DOI: 10.3390/cells12030512.

298. The Roles of miR-26, miR-29, and miR-203 in the Silencing of the Epigenetic Machinery during Melanocyte Transformation / C. R. Gasque Schoof, A. Izzotti, M. G. Jasiulionis, L. dos R. Vasques // *BioMed Research International.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 634749. DOI: 10.1155/2015/634749.

299. The rs78378222 prevalence and the copy loss of the protective allele A in the tumor tissue of diffuse large B-cell lymphoma / E. N. Voropaeva, Y. L. Orlov, T. I. Pospelova [et al.] // *PeerJ.* – 2020. – Vol. 8. – P. e10335. DOI: 10.7717/peerj.10335.

300. The rs78378222 prevalence and the copy loss of the protective allele A in the tumor tissue of diffuse large B-cell lymphoma / E. N. Voropaeva, Y. L. Orlov, T. I. Pospelova [et al.] // *PeerJ.* – 2020. – Vol. 8. – P. e10335.

301. The significance of DNA methylation profile in metastasis-related genes for the progression of colorectal cancer / P. Tokarz, E. Pawlowska, J. Bialkowska-Warzecha, J. Blasiak // *Cell. Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 63. – P. 79–87. DOI: 10.14715/cmb/2017.63.2.12.

302. Therapeutic potential of antagomiRs in haematological and oncological neoplasms / V. Innao, A. Allegra, N. Pulvirenti [et al.] // *Eur J Cancer Care (Engl).* – 2020. – Vol. 29 (2). – P. e13208. DOI: 10.1111/ecc.13208.

303. Thiotepa, busulfan, cyclophosphamide: effective but toxic conditioning regimen prior to autologous hematopoietic stem cell transplantation in central nervous system lymphoma / L. Delphine, D. Pierre-Edouard, R. Bruno [et al.] // *Med Sci (Basel).* – 2023. – Vol. 11 (1). – P. 14. DOI: 10.3390/medsci11010014.

304. Thyroid cancer harboring PTEN and TP53 mutations: A peculiar molecular and clinical case report / C. Colombo, G. Pogliaghi, D. Tosi [et al.] // *Front*

Oncol. – 2022. – Vol. 12. – P. 949098. DOI: 10.3389/fonc.2022.949098.

305. Tissue-specific microRNA expression alters cancer susceptibility conferred by a TP53 noncoding variant / Q. Deng, H. Hu, X. Yu [et al.] // *Nat Commun.* – 2019. – Vol. 10 (1). – P. 5061. DOI: 10.1038/s41467-019-13002-x.

306. TP53 hotspot mutations are predictive of survival in primary central nervous system lymphoma patients treated with combination chemotherapy / H. D. Munch-Petersen, F. Asmar, K. Dimopoulos [et al.] // *Acta Neuropathol. Commun.* – 2016. – Vol. 22. – P. 40. DOI: 10.1186/s40478-016-0307-6.

307. TP53/miR-129/MDM2/4/TP53 feedback loop modulates cell proliferation and apoptosis in retinoblastoma / X. Yao, H. Shen, Q. Peng, J. Yu // *Cell Cycle.* – 2021. – Vol. 20. – P. 603–615. DOI: 10.1080/15384101.2021.1892321.

308. TP53/PLCG2-mutated diffuse large B-cell lymphoma richter transformation (DLBCL-RT) of CLL with unusual CD2 and PD-1 expression / E. Symes, P. Wang, A. M. Lager [et al.] // *Leuk Lymphoma.* – 2022. – Vol. 63 (11). – P. 2735–2738. DOI: 10.1080/10428194.2022.2087070.

309. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs / A. A. Khan, D. Betel, M. L. Miller [et al.] // *Nat Biotechnol.* – 2009. – Vol. 27 (6). – P. 549–55. DOI: 10.1038/nbt.1543.

310. Treatment strategies for patients with diffuse large B-cell lymphoma / S. Poletto, M. Novo, L. Paruzzo [et al.] // *Cancer Treat Rev.* – 2022. – Vol. 110. – P. 102443. DOI: 10.1016/j.ctrv.2022.102443.

311. Tumor suppressor p53 and metabolism / J. Liu, C. Zhang, W. Hu, Z. Feng // *J Mol Cell Biol.* – 2019. – Vol. 11 (4). – P. 284–292. DOI: 10.1093/jmcb/mjy070.

312. Tumor-specific methylation of p53-responsive oncosuppressive microRNA genes in Diffuse Large B-cell Lymphoma / E. Voropaeva, T. Pospelova, M. Churkina [и др.] // *European Journal of Human Genetics.* – 2023. – V. 31. – P. 91–344.

313. Understanding the immune-stroma microenvironment in B cell malignancies for effective immunotherapy / B. Apollonio, N. Ioannou, D. Papazoglou, A. G. Ramsay // *Front Oncol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 626818. DOI: 10.3389/fonc.2021.626818.

314. Vousden, K. H. Live or let die: the cell's response to p53 / K. H. Vousden, X. Lu // *Nat Rev Cancer*. – 2002. – Vol. 2 (8). – P. 594–604. DOI:10.1038/nrc864.
315. Wang, L. New agents and regimens for diffuse large B cell lymphoma / L. Wang, L. R. Li, K. H. Young // *J Hematol Oncol*. – 2020. – Vol. 13 (1). – P. 175. DOI: 10.1186/s13045-020-01011-z.
316. Wang, P. Effective tools for RNA-derived therapeutics: siRNA interference or miRNA mimicry / P. Wang, Y. Zhou, A. M. Richards // *Theranostics*. – 2021. – Vol. 11 (18). – P. 8771–8796. DOI: 10.7150/thno.62642.
317. Watanabe, K. Disruption of the expression and function of microRNAs in lung cancer as a result of epigenetic changes / K. Watanabe, D. Takai // *Frontiers in Genetics*. – 2013. – Vol. 4. – P. 275. DOI: 10.3389/fgene.2013.00275.
318. Weinstein, N. A Computational Model of the Endothelial to Mesenchymal Transition / N. Weinstein, L. Mendoza, E. R. Álvarez-Buylla // *Front Genet*. – 2020. – Vol. 11. – P. 40. DOI: 10.3389/fgene.2020.00040.
319. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues / ed. S. H. Swerdlow [et al.]. – revised 4th ed. – Lyon, France : International Agency for Research in Cancer (IARC), 2017. – 585p.
320. XPO1 expression worsens the prognosis of unfavorable DLBCL that can be effectively targeted by selinexor in the absence of mutant p53 / M. Deng, M. Zhang, Z. Y. Xu-Monette [et al.] // *J Hematol Oncol*. – 2020. – Vol. 13 (1). – P. 148. DOI: 10.1186/s13045-020-00982-3.
321. Yang, G. Identification of potentially functional circRNA-miRNA-mRNA regulatory network in gastric carcinoma using bioinformatics analysis / G. Yang, Y. Zhang, J. Yang // *Med Sci Monit*. – 2019. – Vol. 25. – P. 8777–8796. DOI: 10.12659/MSM.916902.
322. Zhang, L. MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer / L. Zhang, Y. Liao, L. Tang // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2019. – Vol. 38 (1). – P. 53. DOI: 10.1186/s13046-019-1059-5.
323. Zhang, L. Epigenetics in Health and Disease / L. Zhang, Q. Lu, C. Chang // *Adv Exp Med Biol*. – 2020. – Vol. 1253. – P. 3–55. DOI: 10.1007/978-981-15-3449-2_1.

324. Zhang, L. MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer / L. Zhang, Y. Liao, L. Tang // J Exp Clin Cancer Res. – 2019. – Vol. 38 (1). – P. 53. DOI: 10.1186/s13046-019-1059-5.

325. Zhang, M. Y. miR-1250-5p is a novel tumor suppressive intronic miRNA hypermethylated in non-Hodgkin's lymphoma: novel targets with impact on ERK signaling and cell migration / M. Y. Zhang, L. Q. Wang, C. S. Chim // Cell Commun Signal. – 2021. – Vol. 19 (1). – P. 62. DOI: 10.1186/s12964-021-00707-0.

326. Zhao, Z. siRNA- and miRNA- based therapeutics for liver fibrosis / Z. Zhao, C. Y. Lin, K. Cheng // Transl Res. – 2019. – Vol. 214. – P. 17–29. DOI: 10.1016/j.trsl.2019.07.007.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Регуляция экспрессии микроРНК miR-129-2 и семейства miR-34 белком p53 на уровне транскрипции и miR-203 на уровне созревания. С. 43
2. Рисунок 2 – Дизайн исследования. С. 62
3. Рисунок 3 – Возрастное распределение пациентов группы исследования. С. 63
4. Рисунок 4 – Метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением (MS-HRM) для выявления метилирования ДНК: UM – неметилированная последовательность, М – метилированная последовательность, Tm – температура плавления. С. 73
5. Рисунок 5 – Результаты метил-специфической ПЦР для определения статуса метилирования гена *MIR-203* (электрофорез в 5 % полиакриламидном геле, М – ПЦР с праймерами, специфичными к метилированному аллелю, UM – ПЦР с праймерами, специфичными к неметилированному аллелю): К Met – контрольная метилированная ДНК, К UM – контрольная неметилированная ДНК, К отриц – отрицательный контроль, S1-S6 – образцы пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой, MW – маркер молекулярной массы 100 п. н. С. 76
6. Рисунок 6 – Результаты метил-специфической ПЦР для определения статуса метилирования гена *MIR-129-2* (электрофорез в 5 % полиакриламидном геле, М – ПЦР с праймерами, специфичными к метилированному аллелю, UM – ПЦР с праймерами, специфичными к неметилированному аллелю): К Met – контрольная метилированная ДНК, К UM – контрольная неметилированная ДНК, К отриц – отрицательный контроль, S1-S6 – образцы пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой,

- М – маркер молекулярной массы 100 п. н. С. 77
7. Рисунок 7 – Фрагмент хроматограммы бисульфитного сиквенса CpG-островка гена *MIR-34A*: А – метилированная ДНК, Б – неметилированная ДНК, Met – цитозин в метилированном состоянии, UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии, красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды. С. 78
8. Рисунок 8 – Фрагмент хроматограммы бисульфитного сиквенса CpG-островка гена *MIR-129-2*: А – метилированная ДНК, Б – неметилированная ДНК, Met – цитозин в метилированном состоянии, UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии, красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды. С. 78
9. Рисунок 9 – Фрагмент хроматограммы бисульфитного сиквенса CpG-островка гена *MIR-203*: А – метилированная ДНК, Б – неметилированная ДНК, Met – цитозин в метилированном состоянии, UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии, красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды. С. 79
10. Рисунок 10 – Результаты полимеразной цепной реакции с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) rs78378222 гена *TP53*: 1 – (106 + 84) п. н. (генотип А/С); 2 – 84 п. н. (генотип А/А); М – маркер с молекулярной массой 100 п. н. С. 80
11. Рисунок 11 – Результаты анализа статуса метилирования генов *MIR-34B/C* (А) и *MIR-34A* (Б) методом метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения: Т_м – температура плавления, НМ-аллель – неметилированный аллель, М-аллель – метилированный аллель. С. 83
12. Рисунок 12 – Вероятность выявления у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой экспрессии Ki67 45 % и более опухолевых клеток (А); Ki67 – 70 % и более опухолевых клеток (Б), и неблагоприятного прогноза по МПИ (В) в зависимости от статуса метилирования генов анализируемых микроРНК. С. 93

13. Рисунок 13 – Пятилетняя общая выживаемость пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой: А – МПИ 0–2 балла, МПИ 3–5 баллов, Б – Мет – с метилированием, Не мет – без метилирования MIR34A. С. 96
14. Рисунок 14 – Графическое изображение статуса метилирования генов MIR-203, MIR-129-2, MIR-34A и MIR-34B/C в образцах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы исследования. С. 98
15. Рисунок 15 – Распределение миссенс мутаций в гене *TP53*, выявленных в группе исследования. С. 101
16. Рисунок 16 – Графическое изображение статуса метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в образцах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. С. 104
17. Рисунок 17 – Общие мишени генов микроРНК *MIR-34A*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-203*, значимые для развития лимфом. С. 115
18. Таблица 1 – Краткие сведения об описанных р53-чувствительных онкосупрессорных микроРНК. С. 48
19. Таблица 2 – Общие значимые для развития гемобластозов мишени р53-чувствительных онкосупрессорных микроРНК. С. 58
20. Таблица 3 – Клиническая характеристика пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы обследования. С. 65
21. Таблица 4 – Данные общего анализа крови у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы обследования до начала терапии. С. 69
22. Таблица 5 – Результаты биохимического анализа крови пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы обследования. С. 70
23. Таблица 6 – Последовательности праймеров и длина продукта реакции. С. 74
24. Таблица 7 – Частота метилирования генов микроРНК *MIR-203*,

	<i>MIR-129-2</i> , <i>MIR-34A</i> и <i>MIR-34B/C</i> в опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой и лимфоидной ткани пациентов с реактивными лимфаденопатиями.	С. 82
25.	Таблица 8 – Сравнение клинических характеристик пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой при условии наличия и отсутствия метилирования генов <i>MIR-34A</i> , <i>MIR-34B/C</i>	С. 84
26.	Таблица 9 – Сравнение клинических характеристик пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой с метилированием и без метилирования генов <i>MIR-203</i> и <i>MIR-129-2</i>	С. 86
27.	Таблица 10 – Иммуногистохимические показатели образцов диффузной В-крупноклеточной лимфомы в зависимости от статуса метилирования изучаемых генов микроРНК.	С. 89
28.	Таблица 11 – Сравнение лабораторных показателей у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой с метилированием и без метилирования генов <i>MIR-34A</i> , <i>MIR-34B/C</i>	С. 91
29.	Таблица 12 – Результаты анализа эффективности терапии в группе больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.	С. 91
30.	Таблица 13 – Анализ сочетанного метилирования изученных генов микроРНК.	С. 94
31.	Таблица 14 – Характеристика результатов секвенирования гена <i>TP53</i>	С. 97
32.	Таблица 15 – Анализ патогенности выявленных миссенс мутаций в гене <i>TP53</i> при помощи предикторных программ.	С. 100
33.	Таблица 16 – Связь мутаций, выявленных в кодирующей части гена <i>TP53</i> , со злокачественными опухолями.	С. 102
34.	Таблица 17 – Анализ сочетанного выявления мутации в <i>TP53</i> и метилирования генов изучаемых p53-чувствительных микроРНК. .	С. 102