

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

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Научно-исследовательском институте терапии и профилактической медицины – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук

Поспелова Татьяна Ивановна
Воропаева Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Семочкин Сергей Вячеславович

(Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П. А. Герцена – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, группа высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга, заведующий)

доктор биологических наук

Мартынкевич Ирина Степановна

(Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Научно-исследовательский центр клеточной и молекулярной патологии, руководитель)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « _____ » _____ 2024 года в « _____ » часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.07, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, ул. Залесского, д. 4; тел. 8 (383) 229-10-83); <https://new.ngmu.ru/dissers/dissertation/365>)

Автореферат разослан « _____ » _____ 2024 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

Т. А. Агеева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) является наиболее распространенным, клинически и биологически гетерогенным подтипом неходжкинских злокачественных лимфом с различным ответом на лечение. Терапия первой линии ДВККЛ для большинства больных долгие годы оставалась неизменной и проводилась по протоколу R-СНОР (ритуксимаб в комбинации с циклофосфаном, доксорубицином, винкристином и преднизолоном), что в 40 % случаев заканчивалось неудачей лечения (Тумян Г. С., 2022; Wang L., 2020). При этом медиана общей выживаемости пациентов с рефрактерностью к терапии R-СНОР составляла менее 12 месяцев (Poletto S., 2022).

При ДВККЛ мутации в гене *TP53* признаны негативным прогностическим фактором и ассоциированы с более высоким риском развития первичной рефрактерности к R-СНОР (Qin Y., 2020). Вместе с тем, дальнейшего изучения требуют механизмы устойчивости ДВККЛ к стандартной терапии в случаях с отсутствием мутаций в *TP53*. Предполагается, что они могут заключаться в нарушениях работы p53-сигнальной цепи за счет повреждения других ее звеньев (Duffy M. J., 2020; Wang Z., 2022).

Все больше данных свидетельствует о том, что эффекты p53 реализуются, в том числе, посредством регуляции транскрипции генов и/или дальнейшего созревания ряда микроРНК, включая miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129 и miR-203 (Donehower L. A., 2019; Zhang C., 2020). Последние вовлечены также в механизмы положительной регуляции экспрессии *TP53*, что способствует совместному усилению эффектов, контролю и настройке сигналов в ответ на генотоксический стресс.

Помимо мутантного статуса *TP53*, возможны и другие механизмы нарушения экспрессии miR-34a, miR-34b, miR-34c, miR-129 и miR-203 при ДВККЛ (Yue X., 2020). Однако, согласно данным литературы, возникновение мутаций в генах, кодирующих микроРНК и отвечающих за биогенез данных молекул, является крайне редким событием при злокачественных новообразованиях (Yata A., 2016; Urbanek-Trzeciak M. O., 2021). Кроме того, гены *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* расположены вне локусов рекуррентных хромосомных поломок, выявляемых при цитогенетическом исследовании ДВККЛ. Вместе с тем, при опухолях гены микроРНК подвергаются aberrантному метилированию в пять-десять раз чаще, чем белок-кодирующие гены (Wang L. Q., 2012; Pidičková P., 2020; Nishiyama A., 2021). Метилирование же генов p53-чувствительных онкосупрессорных микроРНК при ДВККЛ до настоящего времени является наименее изученным аспектом.

Более глубокое понимание молекулярных нарушений, затрагивающих p53-сигнальный путь, имеет важное значение для понимания механизмов формирования, прогрессии ДВККЛ и ее чувствительности к лечению (Бабичева Л. Г., 2023; Cai B. H., 2023). Установление 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 способствовать улучшению стратификации пациентов на группы

риска для более интенсивной терапии и разработке новых терапевтических стратегий при ДВККЛ.

Степень разработанности темы диссертации. В литературе описано снижение уровня при лимфомах таких p53-чувствительных микроРНК, как miR-203, miR-129, miR-34a, miR-34b и miR-34c, мишенями которых являются участвующие в лимфоогенезе онкогены (Chim C. S, 2011; Wong K. Y., 2013; Asmar F., 2014; Artemaki P. I., 2021). При этом механизмы нарушения экспрессии данных микроРНК нуждаются в уточнении.

Метилирование генов *MIR-203* и *MIR-129-2* при ДВККЛ было изучено ранее на небольших смешанных группах образцов неходжкинских лимфом, которые включали лишь 2 и 13 случаев ДВККЛ соответственно (Chim C. S, 2011; Wong K. Y., 2013). Для уточнения частоты встречаемости метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2* при ДВККЛ необходимо проведение анализа на большей группе первичных образцов пациентов с данным вариантом опухоли.

Во всех опубликованных работах, изучающих метилирование генов p53-чувствительных микроРНК, в качестве контроля использовалась периферическая кровь доноров или нормальный костный мозг, но не ткань лимфатических узлов (Artemaki P. I., 2021). Следовательно, до настоящего времени не установлен статус метилирования генов miR-203, miR-129, miR-34a, miR-34b, miR-34c в лимфоидной ткани.

Смешанный состав и небольшой размер выборок в проведенных ранее исследованиях затрудняет идентификацию клинической значимости метилирования *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* при лимфомах. Оценка частоты и ассоциации с клиническими параметрами метилирования изучаемых генов онкосупрессорных микроРНК позволит охарактеризовать ценность метилирования в качестве диагностического и прогностического маркера, а также терапевтической мишени при ДВККЛ.

Одновременный анализ метилирования *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* и аббераций в гене *TP53* на одной группе образцов ДВККЛ ранее не проводился. В литературных источниках отсутствуют сведения о сочетанном или независимом характере возникновения данных нарушений при ДВККЛ.

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 p53-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 p53-чувствительных микроРНК и aberrаций 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-СНОР. 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 p53-чувствительных генов 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 значительно дополняют существующие представления о механизмах нарушения функционирования p53-сигнальной сети при ДВККЛ и расширяют фундаментальные знания о биологии данной опухоли.

Установлено, что метилирование *MIR-129-2* и *MIR-203*, а также генов микроРНК семейства miR-34 может служить основанием для дифференциальной диагностики ДВККЛ и реактивных лимфаденопатий, а метилирование *MIR-34A* позволяет стратифицировать пациентов на группы риска неэффективности стандартного лечения ДВККЛ по протоколу R-СНОР. Полученные данные представляют потенциал для дальнейших исследований,

направленных на разработку стратегии лечения ДВККЛ, а именно: таргетных подходов снятия aberrантного метилирования генов p53-чувствительных микроРНК.

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, статус метилирования панели генов p53-чувствительных микроРНК, разрушение сигнала полиаденилирования и мутации 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 использованы современные специальные методы исследования: фенол-хлороформная экстракция ДНК, прямое капиллярное секвенирование по Сенгеру, бисульфитная конверсия ДНК, метил-специфичная ПЦР, метил-чувствительный анализ кривых плавления высокого разрешения, ПЦР с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, статистический анализ и биоинформационная обработка.

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. Исследование выполнено на репрезентативном объеме клинических наблюдений. Достоверность результатов диссертации подтверждается применением современных лабораторно-инструментальных и молекулярно-генетических методов исследования, а также проведением корректной биоинформационной и статистической обработки.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены и обсуждены на European Human Genetics Conference (Вена, 2022), на Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology Conference (Новосибирск, 2022), на 12-м съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии им. Н. Н. Трапезникова, посвященном 25-летию АДИОР (Москва, 2021), на 18-й и 20-й Российских конференциях с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Москва, 2021, 2023), на 6-й Международной конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» (Санкт-Петербург, 2021), на Международной конференции, посвященной Дню ДНК-2019 (Санкт-Петербург, 2019), на

конгрессе «Актуальные вопросы функциональной и клинической медицины» (Томск, 2022), на Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии» (Киров, 2021), на Всероссийском гематологическом форуме «Фундаментальные и прикладные исследования в гематологии» (Новосибирск, 2023), на Российских конкурс-конференциях студентов и молодых ученых «Авиценна» (Новосибирск, 2022, 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.

Диссертационное исследование выполнено при поддержке Гранта РФФИ №22-25-00222 в 2022–2023 гг. на тему: «Метилирование генов p53-респонсивных онкосупрессорных микроРНК при неходжкинских лимфомах».

Внедрение результатов исследования. Полученные результаты внедрены в 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.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 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 SA(pt).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 167 страницах машинописного текста, построена классически 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 автора. Автор диссертационного исследования лично участвовал в разработке дизайна исследования, внес личный вклад в формулировку цели и задач исследования, самостоятельно выполнял анализ данных литературы, сбор биологического материала и клинических данных, анализ статуса метилирования целевых генов микроРНК, генотипирование и оценку мутаций *TP53*, статистическую обработку данных, обобщение, интерпретацию научных результатов, обсуждение результатов исследования и формирование выводов. В соавторстве написаны и опубликованы все печатные работы в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК, в которых отражены полученные результаты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 129 от 30.11.2020). До включения в исследование все больные подписывали информированное добровольное согласие. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Краткая характеристика группы обследованных больных. Группу обследованных составили 136 человек с диагнозом ДВККЛ. Средний возраст пациентов ($54,3 \pm 16,1$) года (от 25 до 92 лет). По полу больные распределялись следующим образом: 71 / 136 (52,2 %) – мужчины, 65 / 136 (47,8 %) – женщины.

Клинические данные были доступны для 73 пациентов. По МПИ 4 из 73 (5,4 %) больных были отнесены к группе низкого риска, низкого/промежуточного – 25 / 73 (34,2 %), промежуточного/высокого – 30 / 73 (38,3 %) и высокого риска – 16 / 73 (21,1 %). Подавляющее число больных имели III и IV стадии заболевания – 68 / 73 (93,2 %), более половины 42 / 73 (57,5 %) – симптомы опухолевой интоксикации. По шкале ECOG статус 1 имели 35 / 73 (47,9 %), статус 2 – 14 / 73 (19,1 %), статус 3 и 4 – 21 / 73 (31,5 %) и 2 / 73 (2,7 %) обследованных соответственно.

Общеклинические методы исследования. Общеклиническое обследование больных ДВККЛ проведено в соответствии с действующими Российскими клиническими рекомендациями по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний (Поддубная И. В., Савченко В. Г., 2018).

Специальные методы исследования. Для работы отбирались блоки фиксированных формалином и парафинизированных биоптатов лимфоузлов пациентов с ДВККЛ ($n = 136$). Содержание опухолевых клеток в срезе было не менее 50 %. Для оценки специфичности выявляемого метилирования использовались блоки фиксированных формалином и парафинизированных биоптатов лимфоузлов больных с реактивной фолликулярной гиперплазией ($n = 11$). С блоков бралось 3-4 среза толщиной 10–12 мкм. Для выделения ДНК использовали фенол-хлороформный метод с гуанидином.

По 500 нг ДНК каждого образца подвергалось бисульфитной конверсии с применением наборов EZ DNA Methylation Kit, согласно протоколу производителя («Zymo research», США), и элюции бидистиллированной водой в конечном объеме 20 мкл.



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Для оценки полноты конверсии применялся набор контрольных ДНК Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit («Zymo research», США). Полноту конверсии проверяли методом бисульфитного секвенирования (Рисунок 2). Анализ результатов секвенирования осуществляли с помощью программы Chromas.

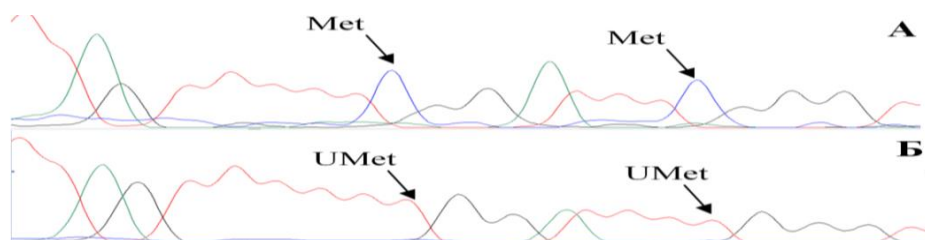


Рисунок 2 – Фрагмент хроматограммы бисульфитного секвенса CpG-островка гена *MIR-34A*:
 А – метилированная ДНК, Б – неметилированная ДНК, Met – цитозин в метилированном состоянии, UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии

Анализ метилирования генов *MIR-34A* и *MIR-34B/C* проводился методом метил-чувствительного анализа кривых плавления высокого разрешения (Methylation-Sensitive High-Resolution-Melting – MS-HRM) на аппарате Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия) в двух повторах.

Определение статуса метилирования генов *MIR-203* и *MIR-129-2* проводили методом метил-специфичной ПЦР на ДНК-амплификаторе Терцик («ДНК-Технология», Россия) в двух пробирках: с праймерами, комплементарными к метилированному и неметилированному аллелю. Электрофоретический анализ результатов ПЦР проводился в 5 % полиакриламидном геле, на который наносили по 7 мкл каждого образца, использовался маркер молекулярной массы 100 п. н. (в количестве 3,0 мкл) (Рисунок 3).

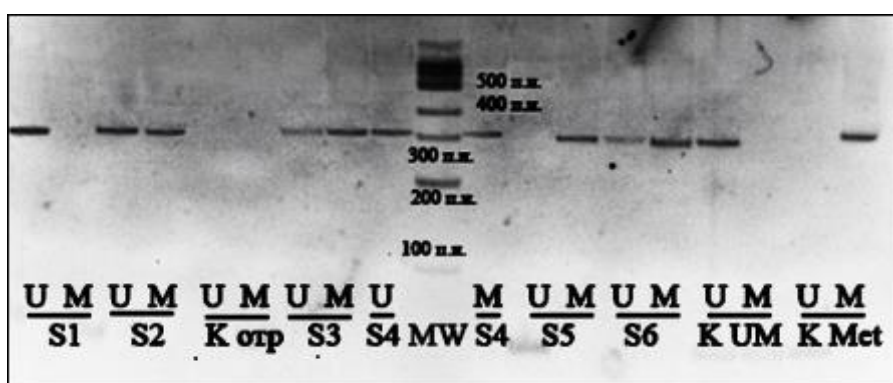


Рисунок 3 – Результаты метил-специфической ПЦР для определения статуса метилирования гена *MIR-203* (электрофорез в 5 % полиакриламидном геле, М – ПЦР с праймерами, специфичными к метилированному аллелю; UM – ПЦР с праймерами, специфичными к неметилированному аллелю): К Met – контрольная метилированная ДНК, К UM – контрольная неметилированная ДНК, К отр – отрицательный контроль, S1-S6 – образцы пациентов с ДВККЛ, MW – маркер молекулярных масс 100 п. н.

Методом прямого секвенирования по Сенгеру определена нуклеотидная последовательность ДНК-связывающего домена (5–8 экзон) гена *TP53* в соответствии с IARC protocol. Оценка rs78378222, приводящего к разрушению сигнала полиаденилирования гена *TP53*, проводилась методом полимеразной цепной реакции с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) с использованием эндонуклеазы рестрикции HindIII.

Статистическая обработка материала. Статистический анализ проводился в программе SPSS 16.0 для Windows (SPSS Inc.). За уровень достоверности различий принимали $p < 0,05$. Для переменных, не подчиняющихся нормальному распределению, использованы значения медианы (Me), 25-го и 75-го перцентиля (Q25, Q75) и тест Манна – Уитни. Проводились сравнение частот анализируемых признаков (χ^2 Пирсона, точный критерий Фишера), расчет отношение шансов (ОШ) с 95 % доверительным интервалом (ДИ), оценка выживаемости методом Каплана – Мейера и Log-rank теста. Мутационный спектр гена *TP53* был визуализирован в формате графика «леденец на палочке» с помощью программы Lollipops. Анализ сочетанности aberrаций *TP53* и метилирования генов микроРНК проводился с применением сервиса OncoPrint и вычислением Log2 отношения шансов (Log2 ОШ) и точного критерия Фишера с поправкой на множественность сравнений с помощью процедуры Бенджамини – Хохберга (q). 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. Дополнительно производился биоинформационный анализ миссенс-мутаций с применением предикторных программ (SIFT, PolyPhen2, LRT, MutationAssessor).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частоты метилирования генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129* и *MIR-203* в исследуемых образцах ДВККЛ составили 23 %, 55 %, 65 % и 66 % соответственно (Рисунок 4; Таблица 1). При этом не выявлено метилирования анализируемых генов микроРНК ни в одном из биоптатов лимфоузлов пациентов с реактивной лимфаденопатией.

Учитывая полученные результаты и литературные данные об отсутствии метилирования *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129* и *MIR-203* в клетках костного мозга и крови здоровых доноров, установлено, что выявленное метилирование генов в лимфоидной ткани больных ДВККЛ носит опухоль-специфичный характер и потенциально может быть дополнительным биомаркером для дифференциальной диагностики ДВККЛ и реактивных лимфаденопатий. Важно отметить, что в опухолевой ткани больных ДВККЛ анализируемой выборки отсутствие метилирования хотя бы одного из изучаемых генов микроРНК имело место лишь в 13 % случаев. Анализ метилирования всех 4 генов позволял отличить опухолевые образцы лимфоузлов от реактивных со специфичностью 100 % и чувствительностью 89 % ($p < 0,001$).

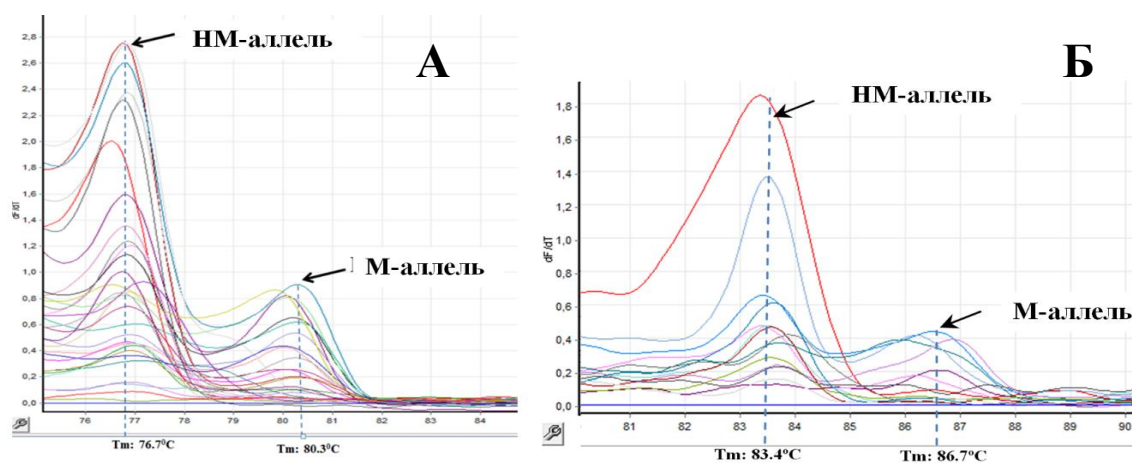


Рисунок 4 – Результаты MS-HRM анализа статуса метилирования: А – гена *MIR-34B/C*, Б – гена *MIR-34A*, Tm – температура плавления, НМ-аллель – неметилированный аллель, М-аллель – метилированный аллель.

Таблица 1 – Частота метилирования генов микроРНК *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в лимфонной ткани и реактивных лимфоузлах

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

Примечание: М – метилированный, НМ – неметилированный.

Оценка ассоциации метилирования *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* с особенностями клинического течения и эффективностью терапии ДВККЛ показала, что (Таблица 2) наибольшая частота выявления метилирования *MIR-34A* отмечена у пациентов с ДВККЛ пожилого и старческого возраста: в подгруппе пациентов старше 60 лет метилированный статус гена встречался в 2 раза чаще, чем у более молодых лиц: 40,7 % против 19,6 % ($p = 0,051$).

Это согласуется с литературными данными о более высокой частоте гиперметилирования генов-супрессоров опухолей в образцах пожилых онкобольных (старше 60 лет) в сравнении с пациентами в возрасте до 40 лет (Müller Н. М., 2004; Maugeri А., 2020).

Также отмечалась тенденция к более частому выявлению высокого уровня ЛДГ в сыворотке крови у пациентов с метилированием *MIR-34A* – в 3/4 (75 %) случаев, тогда как у больных без метилирования – лишь в 50,9 % ($p = 0,064$).

Получены данные о выраженной статистически значимой ассоциации метилированного статуса *MIR-34A* с высокой и промежуточной/высокой группой риска, согласно МПИ: 90 % в подгруппе больных с метилированием против 46,4 % ($p = 0,002$) в подгруппе больных без метилирования данного гена. В соответствии с этим, у пациентов с ДВККЛ и метилированным статусом *MIR-34A* установлена меньшая частота достижения ремиссии после первой линии терапии по протоколу R-CHOP (55,0 % против 77,4 % у лиц без метилирования, $p = 0,060$), а также ухудшение показателей 5-летней общей выживаемости (40 % против 56,6 % в отсутствие метилирования, $p = 0,162$). Для разделения образцов на молекулярные подтипы применялся иммуногистохимический алгоритм Hans et al. В подгруппе пациентов с подтипом ДВККЛ из клеток герминального происхождения (GCB-like) метилированный статус *MIR-34A* имели 8/20 (40,0 %), тогда как в подгруппе с лимфомой из клеток негерминального происхождения (non-GCB-like) – 6/35 (17,1 %, $p = 0,046$) человек.

Полученные данные необходимо валидировать с применением методов профилирования экспрессии генов на микрочипах.

В проведенном исследовании обнаружена ассоциация метилирования *MIR-34B/C*, *MIR-203* и *MIR-129-2* с экспрессией опухолевыми клетками ДВККЛ маркера Ki-67 ($p = 0,010$, $p = 0,011$ и $p = 0,013$ соответственно), который в рутинной практике применяется для оценки пролиферативной активности опухолей (Menon S. S., 2019). Ранее уже была показана статистически значимая связь между метилированием гена *MIR-34B/C* и экспрессией Ki-67 опухолевыми клетками рака молочной железы (Zhang L., 2019).

Большой пролиферативный потенциал ДВККЛ в случаях с метилированием *MIR-34B/C* и *MIR-203* коррелирует с полученными в настоящем 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 является косвенным отражением агрессивности опухоли и объема опухолевой массы. Показано, что у лиц с сочетанным метилированием *MIR-34B/C* и *MIR-203* в сравнении с пациентами без метилирования генов или метилированием одного из данных генов уровень экспрессии Ki-67 70 % и более опухолевых клеток был в 1,8 раза чаще ($p = 0,023$). Последнее может быть связано с тем, что у кодируемых генами *MIR-34B/C* и *MIR-203* микроРНК имеются общие проонкогенные мишени, такие как 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 (Lin X. M., 2019; Xue T., 2021). Таким образом, одновременное метилирование генов *MIR-34B/C* и *MIR-203* может в большей степени отражаться на пролиферативной способности клеток.

Таблица 2 – Сравнение клинических характеристик, лабораторных и иммуногистохимических показателей пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой в зависимости от статуса метилирования генов изучаемых микроРНК

Параметр	MIR-34A			MIR-34B/C			MIR-203			MIR-129-2		
	М	НМ	р	М	НМ	р	М	НМ	р	М	НМ	р
Возраст ≤ 60 лет, абс. (%)	9 (45,0)	37 (69,8)	0,051	26 (57,8)	20 (71,4)	0,241	30 (62,5)	16 (64,0)	0,900	31 (63,3)	15 (62,5)	0,950
МПИ 3–5 баллов, абс. (%)	18 (90,0)	26 (46,4)	0,002	28 (62,2)	16 (57,1)	0,667	28 (58,3)	16 (64,0)	0,639	28 (57,1)	16 (66,7)	0,485
ИГХ Non-GCB-like подтип, абс. (%)	6 (31,6)	29 (82,8)	0,046	21 (61,7)	14 (70,0)	0,541	23 (65,7)	12 (63,2)	0,851	23 (67,6)	12 (63,2)	0,851
Высокий уровень Ki-67, абс. (%)	16 (64,0)	34 (60,7)	0,783	37 (72,5)	13 (43,3)	0,010	38 (71,6)	12 (42,9)	0,011	42 (70,0)	8 (38,1)	0,013
СОЭ > 15 мм/ч, абс. (%)	17 (85,0)	35 (66,0)	0,111	36 (80,0)	16 (57,1)	0,036	36 (75,0)	17 (68,0)	0,525	37 (75,5)	17 (70,8)	0,669
СРБ > 4 г/л, абс. (%)	9 (45,0)	16 (30,1)	0,235	17 (37,8)	8 (28,6)	0,541	33 (68,8)	7 (28,0)	0,001	33 (67,3)	15 (62,5)	0,686
ЛДГ > 450 Ед/л, абс. (%)	42 (67,5)	15 (75,0)	0,064	27 (50,9)	28 (51,1)	0,305	23 (47,9)	19 (36,0)	0,202	26 (57,1)	16 (66,7)	0,270
ЧР, абс. (%)	11 (55,0)	41 (77,4)	0,060	33 (73,3)	19 (67,8)	0,616	35 (72,9)	17 (68,0)	0,660	36 (73,5)	16 (66,7)	0,547
5-летняя ОВ, мес.	40	56,6	0,162	53,3	50,0	0,699	54,2	48,0	0,590	57,1	41,7	0,269
Примечание: М – метилированный, НМ – неметилированный, МПИ – международный прогностический индекс, ИГХ – иммуногистохимические показатели, СОЭ – скорость оседания эритроцитов, СРБ – С-реактивный белок, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ЧР – частота достижения ремиссии, ОВ – общая выживаемость.												

В настоящем исследовании комплексно охарактеризован статус метилирования генов ряда онкосупрессорных p53-чувствительных микроРНК и аберрации в гене *TP53* на крупной группе образцов ДВККЛ, что позволило установить ряд закономерностей. Было показано, что в 24,3 % случаев имело место метилирование – 2, в 44,1 % – 3 и в 11,1 % всех 4 проанализированных генов (Рисунок 5). При этом в опухолевой ткани больных лимфомой даже с учетом поправки на множественность сравнений достоверно коррелировал друг с другом статус 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 том, что общие и частично перекрывающиеся мишени изучаемых онкосупрессорных p53-чувствительных микроРНК (Рисунок 7) связаны с контролем многочисленных внутриклеточных сигнальных путей, определяющих самообновление клеток, пролиферацию, репарацию повреждений ДНК, программированную клеточную смерть, эпителиально-мезенхимальный переход и миграцию, противоопухолевый иммунный ответ и неоангиогенез. Таким образом, одновременное метилирование генов *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* потенциально может оказывать более выраженный биологический эффект и нарушать регуляцию нескольких функционально связанных генов, участвующих в путях лимфоогенеза.

Для оценки связи метилирования *MIR-34A*, *MIR-34B/C*, *MIR-129-2* и *MIR-203* с аберрациями в гене *TP53* в ткани пораженных лимфоузлов пациентов с ДВККЛ в рамках данной работы проводилось изучение двух наиболее частых типов молекулярно-генетических повреждений, приводящих к дефициту функции данного гена: мутаций в ДНК-связывающем домене и rs78378222. Выбор данных аберраций связан с тем, что rs78378222 приводит к разрушению сигнала полиаденилирования гена и нарушению синтеза функционального белка, тогда как мутации в ДНК-связывающем домене *TP53* могут быть причиной нарушения транскрипционно-зависимых функций белка p53, а, значит, нарушения экспрессии p53-чувствительных мишеней (Qiran D., 2019).

Было показано, что в целом частота анализируемых аберраций 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* (Fabrice J., 2013).

Биоинформационный анализ с применением предикторных программ показал, что миссенс-замены располагались в ДНК-связывающем домене гена *TP53* (Рисунок 6) и в большинстве своем являлись возможно/вероятно патогенными. К другим функционально-значимым аберрациям 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 %.

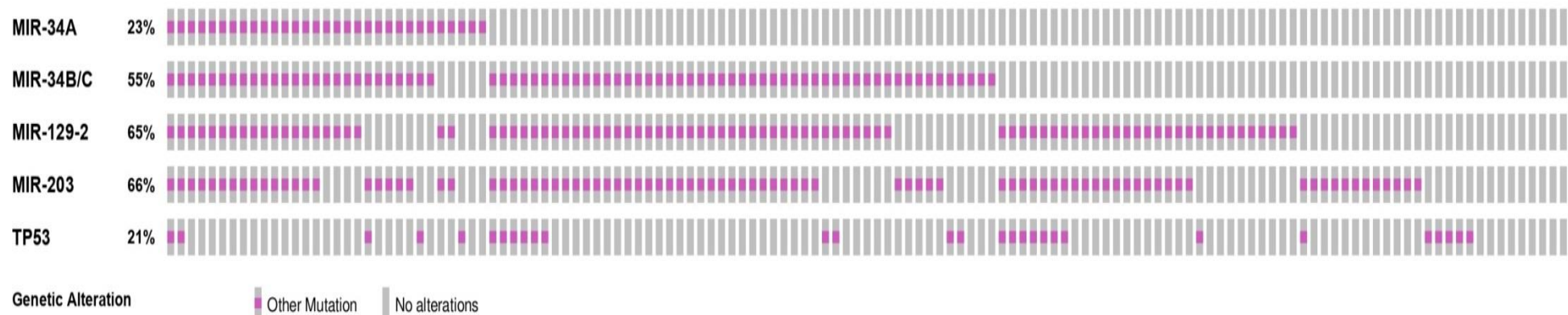


Рисунок 5 – Графическое изображение статуса метилирования генов *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-34B/C* в образцах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой



Рисунок 6 – Распределение миссенс-мутаций в гене *TP53*, выявленных в группе исследования

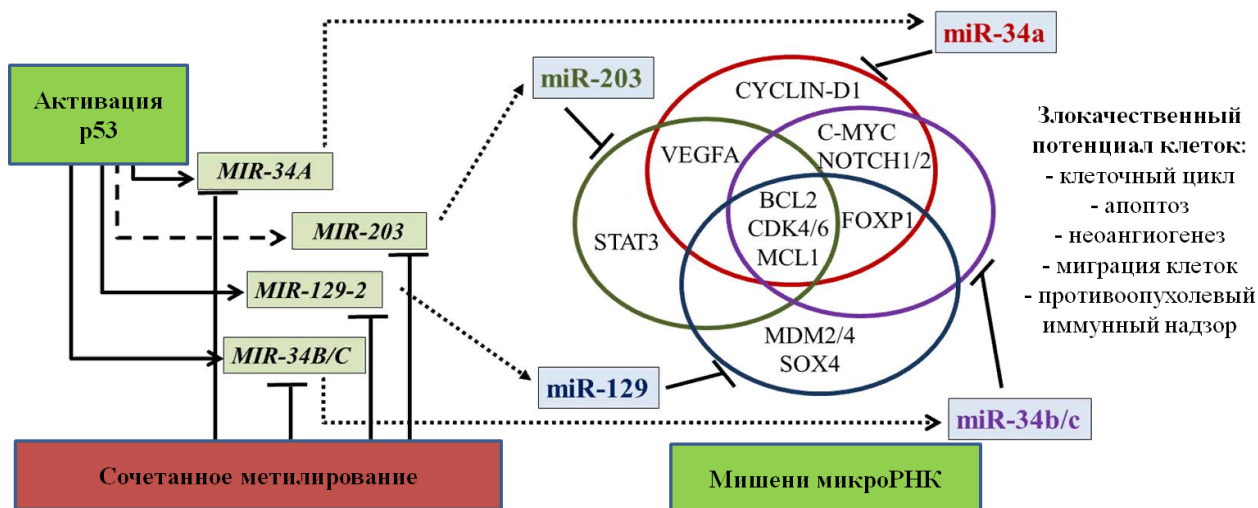


Рисунок 7 – Общие мишени генов микроРНК *MIR-34A*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* и *MIR-203*, значимые для развития лимфом

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 (Michlewski G., 2019). 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* (Madrigal T., 2021).

Результаты комплексного анализа свидетельствуют не только о независимом характере (см. Рисунок 5; Таблица 3), но и тенденции к взаимному исключению обнаружения в опухолевой ткани ДВККЛ aberrаций в *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*.

Таблица 3 – Анализ сочетанного выявления мутации в *TP53* и метилирования генов изучаемых *p53*-чувствительных микроРНК

Метилирование	Мутации	Log2 ОШ	p	q	Связь
<i>MIR-34A</i>	<i>TP53</i>	-0,624	0,297	0,424	Взаимное исключение
<i>MIR-129-2</i>	<i>TP53</i>	-0,269	0,412	0,458	Взаимное исключение
<i>MIR-34B/C</i>	<i>TP53</i>	-0,507	0,264	0,424	Взаимное исключение
<i>MIR-203</i>	<i>TP53</i>	-0,600	0,225	0,424	Взаимное исключение

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые в России получены данные о диагностическом, прогностическом значении и терапевтическом потенциале метилирования изучаемых генов микроРНК при ДВККЛ. Обращает на себя внимание то, что метилирование *MIR-34A* встречалось реже метилирования других генов. Возможным объяснением данного факта может быть реализация в опухолевой ткани ДВККЛ других механизмов нарушения экспрессии *miR-34*, например утрата кодирующего ее гена.

Более того, в проводимых ранее исследованиях в качестве контроля использовали периферическую кровь доноров или нормальный костный мозг, но не ткань лимфатических узлов, что не давало возможность определить, являлось ли выявляемое в лимфоидной ткани пациентов с ДВККЛ метилирование опухоль-специфичным.

Проведенное диссертационное исследование является первой попыткой оценить связь метилирования ряда генов *TP53*-чувствительных онкосупрессорных микроРНК с особенностями клинического течения ДВККЛ.

Мутации в ДНК-связывающем домене являлись наиболее частыми и приводили к нарушению транскрипционно-зависимых функций *p53*, а значит, активации экспрессии *p53*-чувствительных микроРНК.

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*. Косвенно это свидетельствует о том, что метилирование изучаемых генов может являться независимой от мутаций в *TP53* причиной снижения экспрессии микроРНК *miR-34a*, *miR-34b*, *miR-34c*, *miR-129* и *miR-203* в опухолевой ткани ДВККЛ.

Настоящее исследование является первым, в котором комплексно описывается метилирование генов онкосупрессорных *TP53*-чувствительных микроРНК в одной группе образцов ДВККЛ.

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

Возможными направлениями персонафицированной терапии пациентов с ДВККЛ могут быть как использование ингибиторов метилирования ДНК, так и экзогенных микроРНК. Снятие aberrантного метилирования генов микроРНК будет способствовать восстановлению их экспрессии и возобновлению функционирования *p53*-сигнального пути.

Описано восстановление экспрессии miR-203 под действием 5-азацитина в культурах клеточных линий лимфомы мантийной зоны и множественной миеломы (Ripperger T., 2007; Łuczowska K., 2023).

В целом, полученные в работе данные по метилированию изучаемых p53-чувствительных микроРНК и aberrаций в гене *TP53* значительно усложняют существующие представления о механизмах нарушения функционирования глобальной регуляторной сети гена *TP53*. 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 дифференциальной диагностике лимфомы и реактивных лимфаденитов, стратификации пациентов на группы риска неэффективности стандартного лечения и способствовать разработке новых терапевтических стратегий.

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; 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. 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 р53-чувствительных микроРНК являются независимыми событиями с тенденцией к взаимному исключению: *MIR-34A* (Log_2 ОШ = $-0,624$, $p = 0,297$), *MIR-34B/C* (Log_2 ОШ = $-0,507$, $p = 0,264$), *MIR-203* (Log_2 ОШ = $-0,600$, $p = 0,225$) и *MIR-129-2* (Log_2 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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 [and other., including **M. I. Churkina**] // **PeerJ**. – 2020. – Vol. 8. – P. e10335.

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

3. Абберантная 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.

4. 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.

5. Комплексный анализ метилирования генов р53-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.

6. 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 [and other., including **M. I. Churkina**] // **Genes**. – 2022. – Т. 13, № 8. – С. 1401.

7. Метилирование генов р53-респонзивных онкосупрессорных микроРНК при гемобластозах / Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова, О. В. Березина [и др., в том числе **М. И. Чуркина**] // **Сибирский онкологический журнал**. – 2022. – Т. 21, № 2. – С. 130–142.

8. Механизмы нарушения экспрессии генов p53-респонсивных 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.
9. Клиническое значение метилирования генов p53-респонсивных онкосупрессорных микро-РНК и мутаций в гене *TP53* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова, **М. И. Чуркина** [и др.] // **Вестник гематологии**. – 2023. – Т. XIX, № 2. – С. 72–73.
10. 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.
11. 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 : сборник материалов 6-й Международной конференции, посвященной Дню ДНК-2019**. – Санкт-Петербург, 2019. – С. 55–56.
12. 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 : сборник тезисов постерной сессии 18-й Российской конференции с международным участием**. – Москва, 2021. – С. 13.
13. **Чуркина, М. И.** Метилирование генов микро-РНК *MIR-34b/c*, *MIR-34a* и *MIR203* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / **М. И. Чуркина**, Т. И. Поспелова, Е. Н. Воропаева // **Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии : сборник материалов Международной научно-практической конференции**. – Киров, 2021. – С. 182–185.
14. **Чуркина, М. И.** Метилирование гена *MIR-203* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме / **М. И. Чуркина**, Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова // **Внеочередной 12-й съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии им. Н. Н. Трапезникова, посвященный 25-летию АДИОР, 7–9 апреля 2021 г. (online)** // **Евразийский онкологический журнал**. – 2021. – Т. 9, № 1. – С. 115.
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. Поспелова // **Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины : сборник материалов конгресса молодых ученых**. – Томск, 2022. – С. 259–261.
16. Methylation of p53-responsive microRNA genes in tumor tissue of lymphoma / E. Voropaeva, T. Pospelova, O. Berezina [and other., including **M. I. Churkina**] // **Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022) : Abstracts the Thirteenth International Multiconference**. – Novosibirsk, 2022. – P. 103.
17. **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.

18. **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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДВККЛ	– диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома
Б/х	– биохимический
ДИ	– доверительный интервал
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИГХ	– иммуногистохимический
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
МПИ	– международный прогностический индекс
ОАК	– общий анализ крови
ОАМ	– общий анализ мочи
ОВ	– общая выживаемость
ОШ	– отношение шансов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СОЭ	– скорость оседания эритроцитов
СРБ	– С-реактивный белок
ЧР	– частичная ремиссия
ABC	– activated B-cell, подтип из активированных В-клеток
ECOG	– Eastern Cooperative Oncology Group, шкала оценки общего состояния больного
GCB	– germinal center B-cell, подтип из клеток зародышевого центра
IARC	– International Agency for Research on Cancer, Международное агентство по исследованию рака
Met	– метилированная
MS-HRM	– Methylation-Sensitive High-Resolution-Melting, Метил-чувствительный анализ кривых плавления с высоким разрешением
R-CHOP	– ритуксимаб, циклофосфан, доксорубицин, винкристин, преднизолон
UMet	– не метилированная