

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ И.Е. Ямских

« ____ » _____ 2024 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование диагностического значения микроРНК при множественной
миеломе

06.04.01 – Биология

06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Руководители

подпись, дата

канд. мед. наук
ученая степень

И. А. Ольховский
инициалы, фамилия

подпись, дата

доцент, к. б. н.
должность, ученая степень

М.Г. Куцев
инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

А. Д. Тимерман
инициалы, фамилия

Рецензент

подпись, дата

канд. мед. наук
ученая степень

В.А. Бабушкин
инициалы, фамилия

Красноярск 2024

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Исследование диагностического значения микроРНК при множественной миеломе» содержит 94 страницы текстового документа, 26 иллюстраций, 30 таблиц, 2 формулы и 147 использованных источников.

МНОЖЕСТВЕННАЯ МИЕЛОМА, МИКРОРНК, MIR-15A, MIR-16, MIR-21, MIR-39, MIR-221, MIR-222

Цель работы: разработка диагностических тест – систем для детекции микроРНК miR-15a, miR-16, miR-21, miR-221 и miR-222 в пробах венозной крови и оценка их диагностического значения при множественной миеломе.

Задачи:

1. Подобрать оптимальный протокол выделения микроРНК;
2. Осуществить дизайн праймеров и зондов и оптимизировать условия для проведения реакций обратной транскрипции;
3. Осуществить дизайн праймеров и зондов и оптимизировать условия для проведения реакций ПЦР в реальном времени;
4. Изучить диагностическое значение уровней микроРНК при ММ в сравнении с группой контроля.

Разработка способов диагностики онкогематологических заболеваний на основе количественного определения микроРНК признается одним из перспективных направлений лабораторной диагностики. Множественная миелома представляет собой 2-ое по распространенности онкогематологическим заболеванием, морфологическим субстратом которого являются плазматические клетки. В литературных источниках наиболее часто описываются сдвиги уровней экспрессии микроРНК miR-15a, miR-16, miR-21, miR-221 и miR-222 при ММ, однако доступных для клинического использования наборов для диагностики, основанных на технологии ПЦР в настоящее время нет. Помимо этого, в литературных источниках отсутствуют исследования, направленные на их одновременный анализ в пробах крови методом ПЦР при ММ.

В результате проведённых исследований разработано 5 тест-систем для специфического анализа уровня 5 микроРНК, с использованием которых было выявлено, что уровень микроРНК miR-16 статистически значимо снижается, а уровень miR-21 и miR-222 – повышается в пробах плазмы крови у первичных пациентов с ММ по сравнению с донорами. На основе полученных данных разработано 2 способа диагностики множественной миеломы с использованием коэффициентов $miR-21/miR-16$ и $miR-16/(miR-21+miR-222)$ для проб плазмы венозной крови.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. Литературный обзор.....	9
1.1. МикроРНК	9
1.1.1. Общая информация о микроРНК.....	9
1.1.2. Биогенез микроРНК	10
1.1.2.1. Канонический путь.....	10
1.1.2.2. Неканонические пути.....	13
1.1.3. МикроРНК при множественной миеломе.....	17
1.1.3.1. МикроРНК miR-15a и miR-16	19
1.1.3.2. МикроРНК miR-21	21
1.2.3.3. МикроРНК miR-221 и miR-222.....	24
1.2. Множественная миелома	26
1.2.1. Клинические проявления.....	28
1.2.2. Патогенез и этиология.....	30
1.2.2.1. Генетические факторы.....	30
1.2.2.2. Микроокружение.....	33
1.2.3. Эпидемиология	34
1.2.4. Применяемые методы диагностики.....	36
Глава 2. Материалы и методы.....	37
2.1 Объект исследования	37
2.2 Методы	38
2.2.1 Дизайн праймеров и зондов для ОТ и ПЦР.....	38
2.2.2. ПЦР с градиентом температур.....	39
2.2.3. ПЦР с разведенными стандартными образцами.....	39
2.2.4 Выделение лейкоцитов из цельной крови	39
2.2.5 Выделение плазмы из цельной крови	40
2.2.6 Выделение микроРНК	40
2.2.7 Обратная транскрипция (ОТ).....	41
2.2.8 Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ)	Error!
Bookmark not defined.	

Глава 3. Результаты.....	42
3.1. Дизайн праймеров и зондов для детекции исследуемых микроРНК методом ПЦР-РВ	Error! Bookmark not defined.
3.2. Подбор оптимальных условий и концентраций реагентов для проведения реакции обратной транскрипции для отдельных микроРНК	Error! Bookmark not defined.
3.3. Подбор оптимальных условий и концентраций реагентов для проведения реакции ПЦР-РВ для отдельных микроРНК	Error! Bookmark not defined.
3.4. Подбор оптимальных условий и концентраций реагентов для проведения реакции ПЦР-РВ для мультиплексной детекции микроРНК	Error! Bookmark not defined.
3.5. Исследование уровня экспрессии микроРНК в лейкоцитах венозной крови	Error! Bookmark not defined.
3.6. Исследование уровня экспрессии микроРНК в плазме венозной крови	Error! Bookmark not defined.
3.7 Исследование референсных значений	Error! Bookmark not defined.
3.8 Статистическая обработка данных.....	Error! Bookmark not defined.
3.9. Разработка способа диагностики множественной миеломы	Error! Bookmark not defined.
3.10. Обсуждение результатов	Error! Bookmark not defined.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	43
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	45

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК представляют собой короткие (от 18 до 25 нуклеотидов) не кодирующие белок молекулы, участвующие в регуляции экспрессии генов путём РНК-интерференции (РНКи). Совместно с RISC-комплексом, микроРНК комплиментарно присоединяются к соответствующим мРНК-мишеням и блокируют трансляцию путём разрезания целевой последовательности.

МикроРНК влияют на течение широкого спектра физиологических процессов (например, на дифференцировку, пролиферацию и апоптоз клеток) как в норме, так и при патологиях, в связи с чем являются потенциальными биомаркерами различных заболеваний. К достоинствам микроРНК в качестве биомаркеров можно отнести высокую чувствительность, стабильность при хранении образца и универсальность детекции.

На сегодняшний день известно о ряде методов, позволяющих количественно оценить уровень экспрессии микроРНК, таких как, например, секвенирование нового поколения (NGS) и микрочипирование. К недостаткам данных методов относятся отсутствие стандартизации, дорогостоящее оборудование и реактивы, технологическая сложность, трудоемкость и длительность выполнения тестирования, высокие требования к квалификации персонала, что повышает стоимость тестирования и ограничивает широкое использование данных методов в реальной практике клинко-диагностических лабораторий. Альтернативным и широкодоступным вариантом количественного определения уровня отдельных молекул нуклеиновых кислот является полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ).

Кровь является одной из самых исследуемых и самых информативных сред организма. Определение уровня микроРНК в крови является важной задачей для поиска дополнительных потенциальных биомаркеров различных заболеваний. Поиск биомаркеров в крови, в первую очередь, является важным для диагностики онкогематологических заболеваний, являющихся гетерогенными

по своей природе. Помимо этого, поиск новых биомаркеров способствует развитию таргетной терапии и персонализированной медицины.

Вторым по распространенности онкогематологическим заболеванием является множественная миелома. Множественная миелома (ММ) представляет собой злокачественную гематологическую опухоль, которая характеризуется моноклональной пролиферацией плазматических клеток, приводящей к выработке моноклональных антител. Гиперпродукция легких цепей иммуноглобулинов приводит к тому, что они не могут полностью всосаться в проксимальных канальцах почек, тем самым перегружая их и накапливаясь, не полностью катаболизируясь, с развитием проксимальной дисфункции, что приводит к повреждению почек (ацидозу почечных канальцев) и почечной недостаточности. Помимо этого, в связи с локализацией опухоли в костном мозге, наблюдается повреждение костных тканей.

Согласно статистическим данным Global cancer observatory (GLOBOCAN), в 2020 году было зарегистрировано около 176 тысяч случаев ММ в мире, что составляет 0,91% от всех зарегистрированных случаев рака. В России за 2020 год зарегистрировано 5132 случая. Частота заболеваемости у мужчин и женщин составляет 2,2 и 1,5 на 100 тысяч соответственно. С 1990 по 2016 год заболеваемость ММ в мире увеличилась на 126%.

На сегодняшний день одним из первичных анализов для диагностики ММ является скрининг М-градиента в венозной крови, а также белка Бенс-Джонса в моче, однако у здоровых людей небольшое количество свободных легких цепей продуцируется постоянно, наряду с полными молекулами иммуноглобулинов. Стандартным протоколом для окончательной диагностики заболевания является анализ на наличие $\geq 10\%$ клональных плазматических клеток в опухолевом материале (плазмоцитоме), полученном путём проведения биопсии. Биопсия является инвазивной процедурой, результат которой существенно зависит от опыта специалиста и условий её проведения. Помимо этого, существуют риск возникновения осложнений у пациента, в связи с чем актуальным является поиск биомаркеров в крови, так как исследование крови, в отличие от биопсии

костного мозга, является малоинвазивным, а главное – проведение анализа возможно с любой периодичностью, что важно, в первую очередь, для отслеживания динамики течения заболевания.

На сегодняшний день известно о вовлечении ряда микроРНК в патогенез ММ. В литературных источниках наиболее часто описываются сдвиги уровней экспрессии микроРНК miR-15a, miR-16, miR-21, miR-221 и miR-222, однако доступных для клинического использования наборов для диагностики, основанных на широко распространенной технологии ПЦР в настоящее время нет. Помимо этого, в литературных источниках отсутствуют исследования, направленные на их одновременный анализ в пробах крови методом ПЦР при ММ.

Таким образом, целью данной работы является разработка диагностических тест – систем для детекции микроРНК miR-15a, miR-16, miR-21, miR-221 и miR-222 в пробах венозной крови и оценка их диагностического значения при множественной миеломе.

Для достижения поставленной цели были обозначены следующие задачи:

1. Подобрать оптимальный протокол выделения микроРНК;
2. Осуществить дизайн праймеров и зондов и оптимизировать условия для проведения реакций обратной транскрипции;
3. Осуществить дизайн праймеров и зондов и оптимизировать условия для проведения реакций ПЦР в реальном времени;
4. Изучить диагностическое значение уровней микроРНК при ММ в сравнении с группой контроля.

Глава 1. Литературный обзор

1.1. МикроРНК

1.1.1. Общая информация о микроРНК

МикроРНК (miRNA) представляют собой небольшие (от 18 до 25 нуклеотидов), не кодирующие белок молекулы РНК, которые контролируют экспрессию генов путем регуляции стабильности или активности транскриптов целевых матричных РНК путём РНК-интерференции (РНКи) [1]. В отличие от малых интерферирующих РНК, микроРНК геномно кодируются и транскрибируются как отдельные гены или кластеры нескольких генов под контролем одного промотора [2, 3].

МикроРНК могут транскрибироваться как из интергенных областей генома, так и из интронов кодирующих генов. Около половины микроРНК имеют собственные промоторы [4, 5]. У млекопитающих 61% микроРНК образуют кластеры [6], которые могут включать множество семейств микроРНК с одинаковыми сайтами узнавания мишени (seed region). Хотя биогенез микроРНК у животных, растений и грибов имеет некоторые различия, основные этапы этого процесса остаются схожими.

Первые микроРНК были открыты в 1993 году при изучении механизмов регуляции развития нематоды *Caenorhabditis elegans*. В ходе исследования было обнаружено, что ген *lin-4* кодирует не белок, а микроРНК, длиной в 22 нуклеотида, которая подавляет экспрессию гена *lin-14* [7]. Несмотря на открытие данной микроРНК, глобальные исследования по данному классу некодирующих РНК начались лишь в 2000 году, когда была открыта вторая молекула микроРНК, *let-7*. Она оказалась одинаковой для широкого спектра организмов и подавляла экспрессию сразу нескольких генов [8].

К тому моменту был также идентифицирован другой класс малых РНК – малые интерферирующие РНК (миРНК). В отличие от них, микроРНК происходят эндогенно, не нуждаются в полной комплементарности с матричной

РНК (мРНК), имеют до 100 целевых генов и обладают более разнообразными механизмами регулирования генной экспрессии [9].

МикроРНК играют ключевую роль в регуляции генной экспрессии внутри клетки. По различным данным, микроРНК могут воздействовать примерно с 30-60 процентов всех генов человека. Более того, одна микроРНК способна взаимодействовать с множеством различных генов, что значительно увеличивает их функциональный диапазон.

Подавление экспрессии генов микроРНК происходит путём выбора, распознавания и посадки (не обязательно полной) RISC-комплекса с ведущей микроРНК на комплиментарные последовательности в мРНК (гены-мишени). Для микроРНК характерен принцип узнавания сайта мишени, который впервые был предложен Lewis et al. в 2005 году (Seed Sequence Principle) [10]. Авторы продемонстрировали, что в большинстве случаев микроРНК связываются с мишенью через последовательность от второго до восьмого нуклеотидов их 5' конца (seed sequence). Для 9 – 20 нуклеотидов взаимодействие хотя и необходимо, но полной комплементарности не требует.

1.1.2. Биогенез микроРНК

1.1.2.1. Канонический путь

Канонический путь биогенеза микроРНК, который управляется ферментами РНКазами III и является зависимым от Drosha/DGCR8 и Dicer, характерен для большинства микроРНК животных [11]. Процесс канонического биогенеза можно разделить на следующие этапы:

Транскрипция РНК-полимеразой II и формирование первичного транскрипта микроРНК со стебле-петлевой структурой (pri-microRNA);

Образование молекулы-предшественницы микроРНК, длиной около 70 нуклеотидов (pre-microRNA);

Заключительный этап созревания эффекторной молекулы с характерной шпилькообразной вторичной структурой [12].

Канонический биогенез микроРНК начинается с синтеза первичного транскрипта микроРНК (pri-microRNA) в процессе транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II (Pol II) на матрице ДНК в ядре. Первичный транскрипт микроРНК (pri-microRNA) имеет длину приблизительно 1000 нуклеотидов. Обязательным критерием строения pri-microRNA является наличие самокомплементарного участка для образования шпильки, которые обычно содержатся в некодирующих РНК (например, тРНК или мРНК) или интронах мРНК. Также, достаточно часто, множественные "шпильки" pri-microRNA кодируются отдельным транскриптом.

На первом этапе процессинга – в ядре – pri-microRNA узнается и «обрезается» ядерным микропроцессорным комплексом (гетеродимером), представляющим собой специальный ферментативный комплекс, включающий в себя одну молекулу РНКазы III Drosha, связанную с двумя копиями ее партнера DGCR8.

DGCR8 (известный у беспозвоночных как Pasha) представляет собой белок, связывающий двухцепочечную РНК (дцРНК), который распознает проксимальный (~10 п. н.) конец стержня шпильки pri-miRNA, позиционируя каталитические сайты фермента РНКазы III Drosha [13]. Размер микропроцессорного комплекса составляет около 600 кДа, он является весьма консервативным [14, 15]. В ходе первого этапа процессинга высвобождается шпилька-предшественница микроРНК (pre-miRNA) длиной ~ 55-70 нуклеотидов [16].

Далее, последовательности длиной ~2 нуклеотида с 3' – конца pre-miRNA распознаются транспортным белком экспортин-5 (XPO5), который, в свою очередь, является частью комплекса белков ядерной поры [17, 18]. Происходит образование комплекса, состоящего из pre-miRNA, XPO5, ГТФ и малой ГТФазы Ran, который далее экспортируется через ядерные поры из ядра в цитоплазму.

Далее, после экспорта в цитоплазму, происходит распад комплекса с высвобождением pre-miRNA вследствие гидролиза ГТФ. Последующий цитоплазматический процессинг состоит в том, что второй энзим РНКазы III – Dicer – совместно с трансактиваторным РНК-связывающим белком (TRBP) связывается с pre-miRNA и вносит 2 разрыва возле петли, отрезая её от шпильки и образуя дуплекс [19, 20]. Дуплекс микроРНК состоит из двух нитей РНК, каждая из которых обычно состоит из 21-22 нуклеотидов.

Далее полученный двуцепочечный РНК-транскрипт связывается с белком Argonaute (Ago2). Одна из цепей – ведущая (guide strand), остаётся связанной с Ago2 по АТФ-независимому принципу, а другая – пассажирская (минорная, passenger strand), отщепляется от комплекса и деградирует. Комплекс ведущей цепи, Ago2 и белка GW182 называется miRISC (miRNA induced silencing complex) [12]. GW182 действует как молекулярный каркас, связывающий белок Argonaute и нижестоящие эффекторные комплексы, которые опосредуют микроРНК-зависимую репрессию трансляции. Цепь в составе RISC становится зрелой микроРНК и проводит комплекс к таргетной мРНК. Белок Ago является обязательным компонентом RISC и играет ключевую роль в посттранскрипционном сайленсинге генов (PTGS) (рис. 1).

Взаимодействие микроРНК с молекулой-мишенью – мРНК в большинстве случаев приводит к репрессии гена, однако есть данные и об усилении экспрессии гена-мишени [21, 22]. Наличие нескольких пар несоответствия в регионе затравки 5' конца микроРНК 3'UTR мишени (при неполной комплементарности) ведет к ингибированию мРНК на уровне трансляции, т.е. ведет к снижению уровня белка таргетного гена без снижения количества мРНК в клетке.

Альтернативным путем действия микроРНК является путь, который ведет к дестабилизации мишени через аденозин/урацил богатые элементы, т.е. к непосредственному разрушению таргетной мРНК [23]. Эти неканонические типы взаимодействия остаются недостаточно изученными и не могут быть предсказаны биоинформатическими методами, однако, они являются весьма

важными для понимания механизмов соответствия сайтов мишени затравке 5' конца микроРНК.

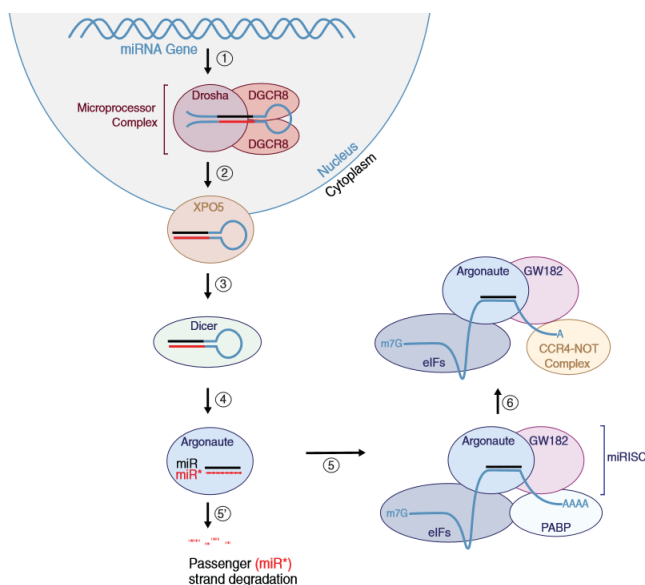


Рисунок 1 – Схема биогенеза микроРНК в клетке [1]

1.1.2.2. Неканонические пути

На данный момент установлено, что некоторые микроРНК могут обходить основной путь биогенеза. Например, процессинг таких микроРНК, как miR-320 и miR-484, не требует участия белков Drosha и DGCR8 [24], а микроРНК miR-451 созревает по Dicer-независимому пути [25].

В то время, как канонический путь биогенеза микроРНК требует обязательной обработки микропроцессорным комплексом и РНКазой Dicer, неканонические механизмы биогенеза микроРНК можно разделить на:

- Drosha/DGCR8-независимые, Dicer-зависимые пути биогенеза;
- Drosha/DGCR8-зависимые, Dicer-независимые пути биогенеза.

Drosha/DGCR8-независимые, Dicer-зависимые пути биогенеза, в свою очередь, можно разделить на три основных механизма:

1. На основе митронов;
2. На основе генов транспортных РНК (тРНК);

3. На основе малых ядрышковых РНК (мяРНК).

Процесс биогенеза микроРНК на основе миртронов заключается в использовании процесса сплайсинга вместо обработки ферментом Drosha. МикроРНК, не зависящие от Drosha и DGCR8, называются миртроны и миртроны «с хвостом» (miRtrons и tailed miRtrons) (рис. 2, розовая область). Pre-microRNA таких молекул формируются через сплайсинг и экзонуклеазное разрезание цепей [26].

Миртроны представляют собой нуклеотидные последовательности внутри интронных областей, содержащие самокомплементарные участки, которые при сплайсинге образуют pre-miRNA. Сайты сплайсинга определяют концы этих pre-miRNA. Таким образом, миртроны образуются из сплайсированных интронов и функционируют подобно классическим микроРНК, регулируя экспрессию генов посредством дестабилизации мРНК, ингибирования трансляции или целевого расщепления мРНК.

Миртроны были впервые обнаружены у *Drosophila melanogaster* и *Caenorhabditis elegans* [27, 28]. На сегодняшний день идентифицировано 14 миртронов у *D. melanogaster*, 9 у *C. elegans* и 19 у млекопитающих [29]. Миртроны являются альтернативными предшественниками для биогенеза микроРНК.

Помимо миртронов, pre-microRNA могут образовываться из генов транспортных РНК (тРНК), где 5'-конец определяется расщеплением РНКазой Z (RNaseZ), а 3' - конец соответствует сайту терминации транскрипции РНК-полимеразой III [30]. Так, например, в результате биогенеза тРНК MHV (вируса мышинного гепатита) с помощью РНКазы Z (рис. 2, серая область) образуются функциональные pre-miRNA.

Аналогичным миртронам образом pre-microRNA могут образовываться из малых ядерных РНК (мяРНК) – путем сплайсинга и экзонуклеазного разрезания цепей [31].

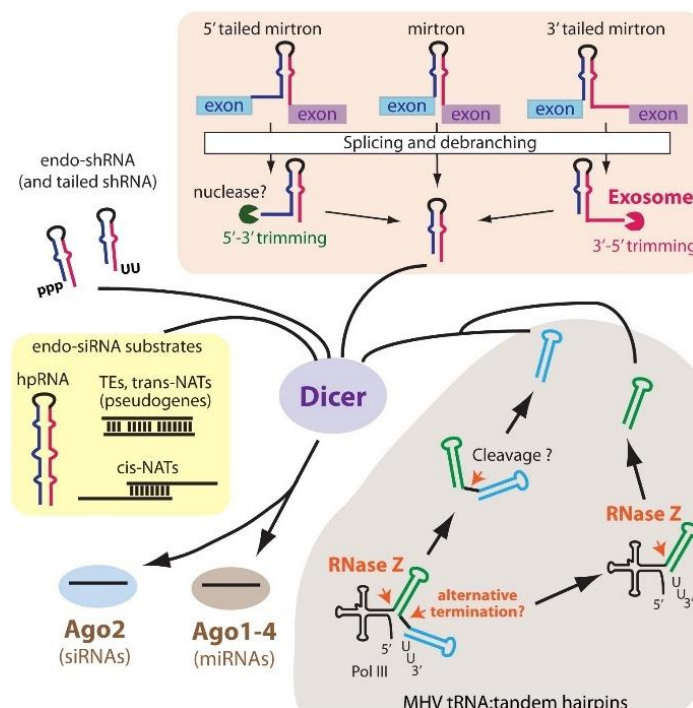


Рисунок 2 – Drosha/DGCR8-независимые, Dicer-зависимые пути биогенеза микроРНК

Примером реализации Drosha/DGCR8-зависимого, Dicer-независимого пути биогенеза является AGO2-зависимый процессинг miR-451. В отличие от других неканонических микроРНК, miR-451, специфичная для позвоночных, является единственным известным примером микроРНК, биогенез которой строго независим от Dicer.

Данный путь биогенеза реализуется посредством обработки pri-miR-451 микропроцессорным комплексом Drosha/DGCR8, вследствие чего образуется pre-miR-451 размером 18 п.н., которая далее взаимодействует непосредственно с Ago2. Шпилька pre-miR-451, полученная в результате расщепления Drosha, имеет необычно короткую ножку, которая обходит обработку Dicer, и ее созревание зависит, вместо этого, от расщепляющей активности белка Ago2, который расщепляет шпильку в середине ее 3'-плеча. Далее, после расщепления, следует обрезка с 3' до 5', опосредованная поли(А)-специфической рибонуклеазой (PARN) для генерации зрелой miR-451 с дальнейшим встраиванием в RISC-комплекс (рис. 3) [32].

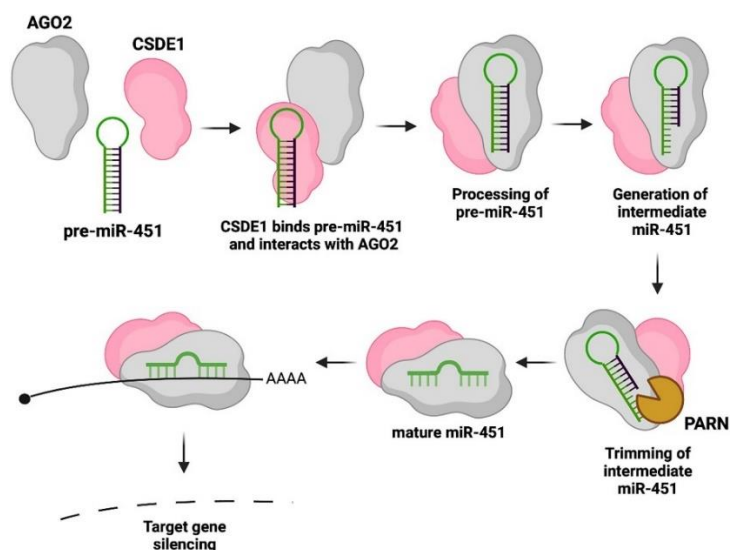


Рисунок 3 – AGO2-зависимый процессинг микроРНК miR-451

Нарушения в биогенезе микроРНК могут иметь значительные последствия как для клетки, так и для организма в целом. Делеции, сбои в процессинге микроРНК или нарушение регуляции со стороны микроокружения существенно влияют на процесс клеточной трансформации [33]. Исследования показывают, что утрата или нарушение функционирования компонентов биогенеза микроРНК, таких как Dicer и DGCR8, могут вызвать изменения в пролиферации и дифференцировке стволовых клеток [34, 35]. Любопытно отметить, что DGCR8 — это один из генов, расположенных в регионе 22q11.2, моноаллельная делеция которого наблюдается у более чем 90% пациентов с синдромом Ди Джорджи, который является наиболее распространённым генетическим синдромом, вызванным делецией [36]. Наиболее часто к опухолевой трансформации приводит нарушение функции Dicer из-за делеции этого локуса. Dicer является гаплонедостаточным опухолевым супрессором, то есть даже частичная утрата этого гена может вызвать малигнизацию клетки [37].

1.1.3. МикроРНК при множественной миеломе

На сегодняшний день в литературных источниках имеется широкий спектр данных о вовлечении микроРНК в патогенез множественной миеломы. В зависимости от их роли в патогенезе ММ, их можно разделить на онкогенные микроРНК и микроРНК, являющиеся опухолевыми супрессорами.

В литературе показано, что таргетное влияние на уровень определенных микроРНК посредством использования имитаторов микроРНК и их ингибиторов способно нормализовать сеть генной регуляции и сигнальные пути как в микроокружении, так и в опухолевых клетках, что делает их перспективными мишенями для терапии, однако лишь несколько препаратов на основе микроРНК дошли до стадии клинических испытаний.

Список микроРНК, вовлеченных в патогенез ММ представлен в табл. 1.

Таблица 1. Список микроРНК, вовлеченных в патогенез ММ

МикроРНК	Клеточные процессы	Гены-мишени	Статья
МикроРНК, действующие как онкогены			
miR-10a	↑ Клеточная пролиферация	-	[38]
	↓ Апоптоз		
miR-19b	↑ Пролиферация и миграция клеток	Белок PTEN	[39]
	↓ Апоптоз		
miR-20a	↑ Пролиферация и миграция клеток	Белок PTEN	[39]
	↓ Апоптоз		
miR-21	↓ Дифференцировка CD4+ Т-клеток (Th17)	STAT-1/-5a-5b и STAT3	[40]
	↑ Сигнализация, способствующая выживанию	Rho-B и PTEN	[41]
miR-25	↑ Жизнеспособность клеток	p38/MAPK	[42]
	↓ Апоптоз		
miR-27	↑ Клеточная пролиферация, миграция и инвазия	SPRY2	[43]
miR-27b-3p	↑ Устойчивость к пролиферации и апоптозу	FBXW7 и PTEN/AKT/GSK3	[44]
miR-93	↑ Жизнеспособность клеток	p38/MAPK	[42]
	↓ Апоптоз		
miR-106b	↑ Жизнеспособность клеток	p38/MAPK	[42]
	↓ Апоптоз		
miR-181a	↓ Апоптоз	HOXA1	[45]

miR-125a-5p	↑ Пролиферация и миграция клеток	-	[46,47]
	↓ Апоптоз		
miR-214-3p	↑ Устойчивость к пролиферации и апоптозу	FBXW7 и PTEN/AKT/GSK3	[44]
miR-221	↓ Аутофагия	ATG12 и p27/mTOR	[100]
	↑ Резистентность к дексаметазону		
	↑ Рост опухоли	p27/Kip1, p57/Kip2, PTEN и PUMA	[98]
miR-222	↓ Аутофагия	ATG12 и p27/mTOR	[100]
	↑ Резистентность к дексаметазону		
	↑ Рост опухоли	p27/Kip1, p57/Kip2, PTEN и PUMA	[98]
МикроРНК, действующие как супрессоры опухоли			
miR-15a /16	↓ Рост опухоли ↓ Ангиогенез ↑ Апоптоз	VEGF MAPK, AKT, NF-κB-активатор MAP3KIP, рибосомный белок S6	[48]
miR-199a-5p	↓ Хемотаксис ↓ Ангиогенез	VEGF, HIF-1α, IL-8, FGF-b	[49]
miR-29b	↑ апоптоз ↓ Пролиферация	SOCS1, PI3K /AKT, FOXP1	[50]
miR-26a	↓ Миграция ↓ Пролиферация ↑ Апоптоз	CD38	[51]
miR-489	↓ Пролиферация ↓ Жизнеспособность	LDHA	[52]
miR-30-5p	↓ Миграция ↓ Пролиферация	BCL9	[53]
miR-34a	↓ Пролиферация ↑ Апоптоз	NOTCH, MYC, BCL-2, CD44	[54]
miR-125a	↓ Жизнеспособность ↓ Способность к образованию колоний клеток	USP5	[55]
miR-125b	↓ Рост опухоли	IRF4	[56]
miR-33b	↓ Жизнеспособность ↓ Миграция ↓ Способность к образованию колоний клеток ↑ Апоптоз	PIM-1	[57]
miR-155	↓ Пролиферация ↑ Апоптоз	PSMβ5	[58]
miR-29b	↓ Пролиферация ↑ Апоптоз	Sp1	[59]
miR-101-3p	↓ Жизнеспособность	BIRC5	[60]
miR-137/197	↓ Жизнеспособность ↓ Миграция ↓ Способность к образованию колоний клеток ↑ Апоптоз	MCL-1	[61]

↑ увеличение уровня экспрессии; ↓ уменьшение уровня экспрессии.

1.1.3.1. МикроРНК miR-15a и miR-16

Большой интерес в контексте патогенеза множественной миеломы представляют микроРНК miR-15a и miR-16, которые действуют как предполагаемые опухолевые супрессоры, целью которых является онкоген BCL2, который вовлечен в клеточный цикл, апоптоз и пролиферацию клеток.

Предшественники микроРНК miR-15a и miR-16 кодируются длинным плечом 13 хромосомы в локусе 13q14.3 в виде кластера (рис. 4). Делеции этой области генома наблюдаются примерно в 40 % случаев множественной миеломы, что приводит к снижению их экспрессии и началу развития множественной миеломы [62,63]. Первые доказательства их участия в процессе канцерогенезе были получены в исследованиях, сообщающих о сниженной экспрессии данных микроРНК при ХЛЛ [64].

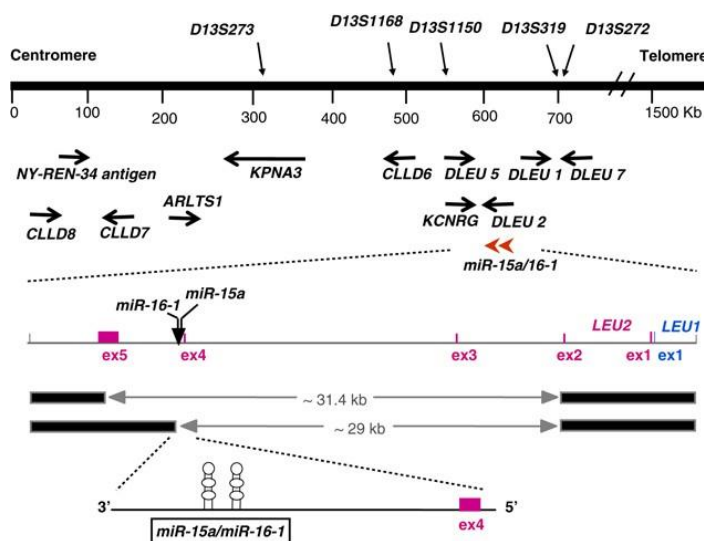


Рисунок 4 – Локализация микроРНК miR-15a и miR-16 в геноме

BCL2 является одним из центральных генов в организме человека, способствующий выживанию клеток за счет ингибирования апоптоза [65]. BCL2 подавляет апоптоз во многих клеточных системах, включая лимфогематопозитические и нейрональные клетки. Он представляет собой онкоген, локализующийся в 18-й хромосоме человека. В нормальном состоянии

BCL2 служит фактором выживания клетки, защищая ее от программированной гибели, однако избыточная продукция BCL2 предотвращает апоптоз, и, тем самым, поддерживает злокачественное перерождение клеток [66].

Белок BCL2 располагается на внешней мембране митохондрий и играет ключевую роль в подавлении проапоптотических белков. Транскрипционный фактор p53 активирует гены с проапоптотической функцией (Bax, NOXA, P53AIP, Araf-1 и Fas/CD95), которые затем ингибируются BCL2. При отсутствии ингибирования со стороны BCL2, белок Bax в форме активных гомодимеров встраивается в мембраны митохондрий и образует поры. Это приводит к высвобождению митохондриальных факторов APAF1 и цитохрома C, которые затем активируют каспазу 9, вызывая апоптоз.

Таким образом, регуляция апоптоза происходит путем контроля проницаемости митохондриальной мембраны: BCL2 ингибирует каспазы за счёт предотвращения выхода цитохрома из митохондрий и/или за счёт связывания фактора, активирующего апоптоз — APAF1 [67]. В связи с пониженной экспрессией микроРНК miR-15a и miR-16 увеличивается продукция BCL2, который ингибирует апоптоз в опухолевых клетках, что способствует развитию заболевания.

Кроме того, было продемонстрировано, что неоангиогенез в костном мозге играет важную роль в патогенезе и прогрессировании ММ. Ангиогенез — это сложный процесс формирования новых кровеносных сосудов. Образование новых кровеносных сосудов стимулируется геном фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), являющийся одной из мишеней miR-15a/miR-16 [68,69]. VEGF и способность опухоли поддерживать пролиферацию эндотелиальных клеток жизненно важны для ее роста [70-72]. Таким образом, в связи с пониженной экспрессией микроРНК miR-15a и miR-16 увеличивается продукция VEGF, что стимулирует ангиогенез и повышает выживаемость опухоли.

Также в литературе показано, что микроРНК miR-15a и miR-16 регулируют пролиферацию и рост опухолевых клеток при ММ *in vitro* и *in vivo* путем ингибирования АКТ серин/треонинпротеинкиназы (AKT3), рибосомального

протеинкиназы S6, MAP-киназ и активатора сигнального пути NF-κB – MAP3KIP3 [62].

Было показано, что активация NF-κB играет ключевую роль в стимуляции роста и выживании опухолевых клеток при ММ, а также при других заболеваниях плазматических клеток [73]. MAP3KIP3 в данном сигнальном пути действует как активатор посредством взаимодействия с TAK1. Снижение ингибирования MAP3KIP3 посредством miR-15a и miR-16 приводит к повышенной активности сигнального пути NF-κB, способствуя росту ММ.

В контексте костномозгового микроокружения, сигнальный путь PI3K/Akt регулирует адгезию и миграцию опухолевых клеток при ММ в костном мозге. Показано, что miR-15a и miR-16 нацелены на АКТ серин/треонинпротеинкиназ (AKT3), а также рибосомный белок S6 – нижестоящую мишень АКТ. Снижение уровня экспрессии miR-15a/miR-16 приводит к повышению способности опухолевых клеток к адгезии, что повышает их выживаемость и метастазирование опухоли.

1.1.3.2. МикроРНК miR-21

МикроРНК miR-21 является одной из наиболее изученных микроРНК в контексте различных видов рака, включая множественную миелому (ММ). MiR-21 была одной из первых микроРНК, идентифицированных у млекопитающих [74]. MiR-21 сверхэкспрессируется при большинстве типов онкологических заболеваний и действует как онкоген, нацеленный на гены, участвующие в пролиферации, апоптозе и метастазировании.

MiR-21 кодируется длинным плечом 17 хромосомы в локусе 17q.23.1, в 11-м интроне гена TMEM49 (трансмембранный белок 49), предшественника VMP1 (белок мембраны вакуоли 1). Сама последовательность miR-21 является высококонсервативной среди позвоночных, что указывает на её важность в регуляции генетических процессов [75,76]. У miR-21 есть свой собственный высококонсервативный промотор [77], при транскрипции продуцируется pri-

miRNA длиной 3433 п.н., которая впоследствии, в результате процессинга, образует pre-miRNA длиной 72 п.н., которая является предшественником зрелых транскриптов miR-21-5p и miR-21-3p (длиной 21 и 20 п.н. соответственно) [78].

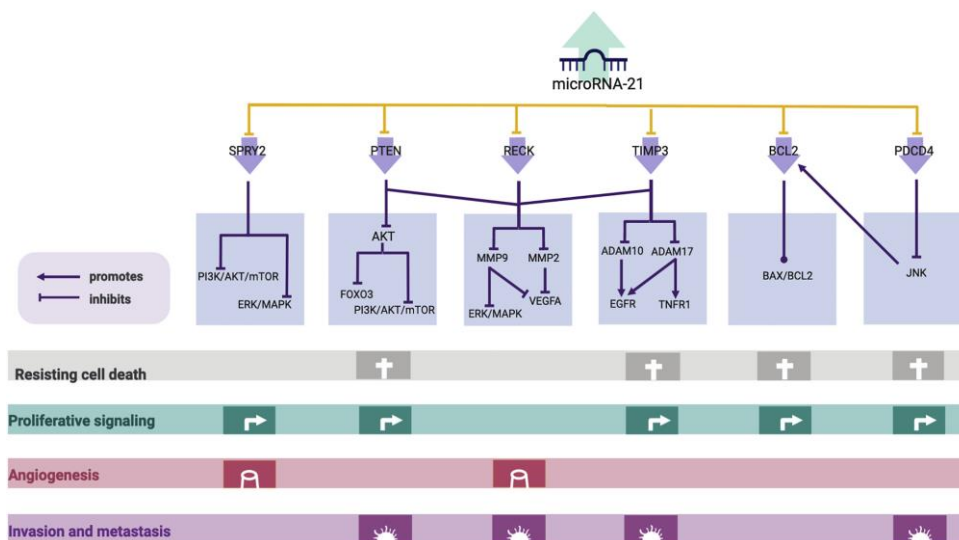


Рисунок 5 – Влияние микроРНК miR-21 на патогенез ММ

MiR-21 участвует в регуляции нескольких ключевых сигнальных путей, способствующих метастазированию и инвазии, а также препятствующих апоптозу опухолевых клеток при множественной миеломе (ММ) [79,80]. Один из таких путей — PI3K/AKT, который играет важную роль в клеточном росте и выживании опухолевых клеток.

MiR-21 нацелена на гены, снижающие метастатический потенциал, такие как PDCD4 [81], TIMP3 [82], TPM1 [83], SERPINB5 и PTEN [84]. Ингибирование PTEN, являющегося ингибитором сигнального пути PI3K/AKT, приводит к активации этого пути, что способствует повышенной клеточной пролиферации и выживаемости опухолевых клеток. Кроме того, miR-21 может влиять на апоптоз через регуляцию антиапоптотического белка BCL-2. Повышенная экспрессия miR-21 приводит к снижению уровня PTEN и повышению уровня BCL2, что способствует выживанию опухолевых клеток [85].

Другой значимый путь — JAK/STAT, который также вовлечен в клеточную пролиферацию и выживание опухолевых клеток при ММ. MiR-21

может регулировать этот сигнальный путь через ингибирование супрессоров цитокиновой сигнализации – SOCS, которые являются ингибиторами JAK/STAT, что приводит к повышенной активности сигнального пути JAK/STAT. SOCS белки связываются с фосфорилированными Янус-киназами (JAK), предотвращая дальнейшую активацию STAT и способствуя их деградации. Таким образом, повышенная экспрессия miR-21 снижает уровень белков SOCS, что приводит к повышенной активации JAK/STAT пути, и, как следствие – повышенной клеточной пролиферации и выживанию опухолевых клеток [86].

Также при множественной миеломе нарушается регуляция сигнального пути RANK/RANKL, играющего ключевую роль в остеокластогенезе, что приводит к усиленной резорбции костей [87].

Рецептор RANK (известный как TNFRSF11A) является членом суперсемейства TNF и экспрессируется на поверхности преостеокластов. RANKL (известный как TNFSF11) — это цитокин, который в основном экспрессируется в остеоцитах, стромальных клетках костного мозга и активированных лимфоцитах. Взаимодействие RANKL с RANK вызывает слияние преостеокластов и образование зрелых остеокластов, способных инициировать резорбцию кости. Остеопротегерин (OPG; известен как TNFRSF11B), также является членом суперсемейства TNF, секретируется остеобластами и служит рецептором-приманкой для RANKL. OPG связывает RANKL и предотвращает его взаимодействие с RANK, регулируя активность остеокластов [88]. Нарушение регуляции этого сигнального пути в костномозговом микроокружении приводит к дисбалансу между RANKL и OPG: OPG подавляется, а RANKL сверхэкспрессируется [89]. В результате клетки ММ экспрессируют RANKL, что способствует дифференцировке остеокластов и разрушению костной ткани [90].

Хотя в литературе показано, что циркулирующая микроРНК miR-21 действует как протоонкоген при многих видах рака [91,92], исследования miR-21 в сыворотке крови при ММ крайне ограничены и демонстрируют

противоречивые результаты [93,94]. В одном исследовании экспрессия miR-21 в сыворотке крови, исследованная у 30 пациентов с ММ, была значительно выше, чем в группе пациентов с моноклональной гаммопатией неопределенной значимости (MGUS) (14 пациентов) и контрольной группе [93] и, напротив, было показано, что уровень miR-21 в сыворотке крови пациентов с ММ, тлеющей множественной миеломой (SMM) и MGUS снижен только у пациентов с ММ, что указывает на то, что значительное снижение экспрессии miR-21 может быть связано с последующим прогрессированием заболевания.

1.2.3.3. МикроРНК miR-221 и miR-222

Предшественники микроРНК miR-221 и miR-222, кодируются в X хромосоме в локусе Xp11.3 в виде кластера. Промоторная область miR 221/222 включает в себя два канонических ТАТА-бокса на 550 и 190 пар оснований выше по последовательности хромосомы от pre-miR-222 и 3 последовательности poly-A ниже по последовательности хромосомы от pre-miR-221 [95].

В литературе отмечается, что экспрессия этого кластера генов регулируется ангиотензином II, а также репрессивным комплексом, включающим рецептор эстрогена α и ядерные рецепторы NCOR1 и NCOR2 [95,96]. MiR-221 кодируется и транскрибируется вместе с miR-222 как pri-miRNA, в которой две паралогичные микроРНК разделены 726 п.н. и имеют одинаковую начальную нуклеотидную последовательность.

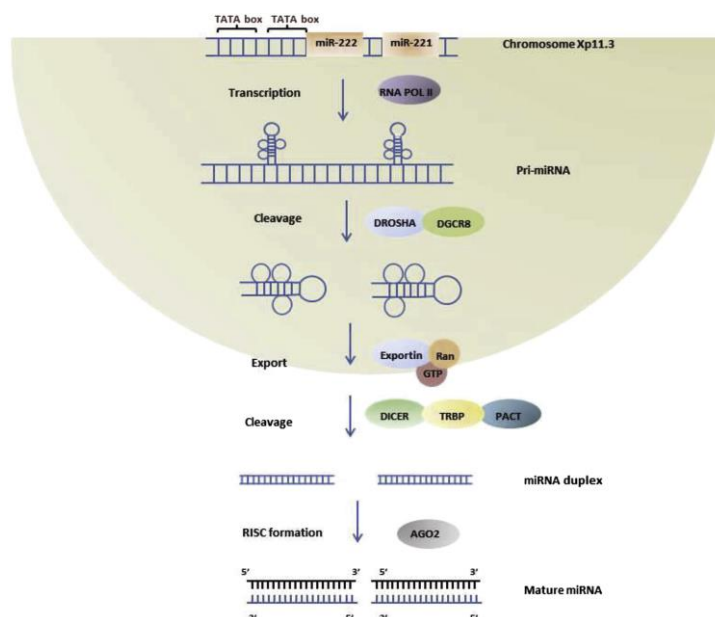


Рисунок 6 – Биогенез микроРНК miR-221 и miR-222

Среди микроРНК, связанных с патогенезом множественной миеломы (ММ), кластер miR-221/222 вызывает значительный интерес как потенциальная терапевтическая мишень. В исследовании Di Martino и его коллег было показано, что уровень экспрессии miR-221/222 значительно повышен у пациентов с ММ по сравнению со здоровыми донорами [97]. Особенно высокие уровни miR-221/222 были обнаружены у пациентов с ММ, имеющих транслокацию t(4;14), что делает эту группу идеальной для изучения биологических эффектов ингибирования miR-221/222. Ингибирование miR-221/222 специфическими ингибиторами в t(4;14)-позитивных клетках ММ вызывало противоопухолевый эффект как *in vitro*, так и в различных мышинных моделях ММ человека. Эти эффекты обусловлены повышением экспрессии мишеней miR-221/222, таких как p27, p57 и p53, которые активируют модулятор апоптоза PUMA и играют ключевую роль в подавлении опухолей. Более того, ингибирование miR-221/222 способствовало преодолению резистентности к мелфалану, вызывая апоптоз клеток ММ [98].

Также микроРНК могут влиять на формирование лекарственной резистентности – например, избыточная экспрессия miR-221/222 снижает аутофагию, воздействуя на связанный с аутофагией ген 12 (ATG12) и p27kip

(p27) – мишень рапамицинового сигнального пути млекопитающих (mTOR), что приводит к резистентности к дексаметазону [99].

1.2. Множественная миелома

Множественная миелома (ММ) представляет собой гематологическую злокачественную опухоль, характеризующуюся выработкой аномальных плазматических клеток (ПК) в костном мозге, продуцирующих моноклональный иммуноглобулин [100].

Данное онкогематологическое заболевание обусловлено повышенной выработкой аномальных клональных плазматических В-клеток в костном мозге по отношению к нормальным, тем самым снижая регуляцию остеобластов и активируя остеокласты, что вызывает злокачественные поражения и переломы костей, повреждение почек, анемию и гиперкальцемию [101]. Ухудшение состояния костей, гемопоэтическая дисфункция и почечная недостаточность являются наиболее распространенными признаками избыточного синтеза моноклонального белка [102-104].

Одной из самых распространенных систем стадирования множественной миеломы является классификация В. Durie и S. Salmon, предложенная в 1975 г. (табл. 2) [100, 105, 106], которая была заменена на международную систему стадирования (International Staging System – ISS), пересмотренную в 2014 г [100,107].

Дополнительным признаком, определяющим подстадию ММ, является состояние функции почек:

- А – нормальная (креатинин сыворотки <170 мкмоль/л или 2 г/дл);
- В – сниженная (креатинин сыворотки ≥ 170 мкмоль/л или 2 г/дл).

Классификация ISS основана на важном прогностическом значении сочетания $\beta 2$ -микроглобулина и альбумина сыворотки крови (табл. 3) [100].

Таблица 2. Стадирование ММ по системе B. Durie, S. Salmon [100, 105, 106]

Стадия	Признаки	Клеточная масса, $10^{12}/м^2$
I	Совокупность следующих признаков: 1. Уровень гемоглобина >10 г/дл; 2. Нормальный уровень кальция сыворотки; 3. Рентгенологически нормальная структура костей или одиночный очаг поражения; 4. Низкий уровень М-протеина: а) IgG <50 г/л; б) IgA <30 г/л Белок Бенс-Джонса <4 г/сут	$<0,6$ (низкая)
II	Показатели, не соответствующие ни I, ни III стадиям	$0,6 - 0,12$ (средняя)
III	Один или более из следующих признаков: 1. Уровень гемоглобина $<8,5$ г/дл; 2. Уровень кальция сыворотки превышает нормальные значения; 3. Множественные поражения костей (>3 литических очагов); 4. Высокий уровень М-протеина: а) IgG >70 г/л; б) IgA >50 г/л Белок Бенс-Джонса >12 г/сут	$>1,2$ (высокая)

Таблица 3. Стадирование ММ по системе ISS [100, 107]

Стадия	Показатели	Медиана ОВ, мес
I	$\beta 2$ -микроглобулин сыворотки $<3,5$ мг/л Альбумин $\geq 3,5$ г/дл	62
II	$\beta 2$ -микроглобулин сыворотки $<3,5$ мг/л Альбумин $<3,5$ г/дл или $\beta 2$ -микроглобулин сыворотки $3,5-5,5$ мг/л	44
III	$\beta 2$ -микроглобулин $\geq 5,5$ мг/л	29

1.2.1. Клинические проявления

При множественной миеломе сложный набор генетических и эпигенетических изменений приводит к неопластической трансформации плазматических клеток, что приводит к их неконтролируемому росту в костном мозге (КМ) и секреции большого количества нефункциональных моноклональных антител (М-белок) [108].

Симптоматика множественной миеломы чрезвычайно разнообразна, но, в значительной мере, определяется инфильтрацией костного мозга аномальными плазматическими клетками и повреждением различных органов.

Клинические проявления множественной миеломы включают в себя симптомы, связанные с различными повреждениями костей (боли в костях, переломы, компрессия спинного мозга, радикулярные боли), гиперкальциемией (полиурия, полидипсия, тошнота, рвота), почечной недостаточностью (тошнота, рвота, недомогание, слабость), амилоидозом (периферическая нейропатия, отеки, органомегалия), инфильтрацией костного мозга аномальными плазматическими клетками (анемия, геморрагический синдром), снижением уровня нормальных иммуноглобулинов (частые инфекции, пневмонии), криоглобулинемией (синдром Рейно, акроцианоз) и синдромом гипервязкости (одышка, транзиторные ишемические атаки, тромбоз глубоких вен, кровоизлияния в сетчатку глаза, тромбоз центральной вены сетчатки или ее ветвей, носовые кровотечения) [109].

У многих пациентов множественная миелома развивается из бессимптомной предраковой стадии, называемой моноклональной гаммапатией неопределенного значения (MGUS) [110, 111], которая присутствует более чем у 3% населения старше 50 лет [112, 113], а процент злокачественного перерождения составляет примерно 1% в год [114, 115].

Следует отметить, что MGUS развивается бессимптомно, и более половины пациентов, у которых выявлено это состояние, имели его более 10 лет до клинической диагностики [116]. У некоторых пациентов может быть

обнаружена промежуточная бессимптомная стадия, известная как тлеющая множественная миелома (SMM), которая является более запущенной предраковой стадией [117]. Тлеющая множественная миелома прогрессирует до множественной миеломы с частотой около 10% в год в течение первых 5 лет после диагностики, 3% в год в следующие 5 лет и 1,5% в год впоследствии. Цитогенетический тип заболевания влияет на скорость прогрессирования: пациенты с t(4;14) и del(17p) имеют повышенный риск перехода от MGUS или SMM к множественной миеломе [118-120].

При клиническом подозрении на множественную миелому пациентов тестируют на наличие М-белков, однако примерно у 2% пациентов с множественной миеломой наблюдается истинное несекреторное заболевание (несекретирующая миелома), при котором нет доказательств наличия М-белка [121], и, таким образом, данный вид миеломы диагностируется исключительно с использованием биопсии костного мозга с использованием метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) для выявления t(11;14), t(4;14), t(14;16), t(6;14), t(14;20), трисомий и del(17p) [122].

1.2.2. Патогенез и этиология

1.2.2.1. Генетические факторы

Патогенез множественной миеломы, как и практически любого онкологического заболевания, обусловлено совокупностью нескольких цитогенетических aberrаций плазматических клеток (таблица 4) [123, 124].

Таблица 4. Первичная молекулярно-цитогенетическая классификация множественной миеломы [125]

Подтип	Затронутые гены / хромосомы	Частота встречаемости при ММ, %
Трисомная множественная миелома		42
IgH транслоцированная множественная миелома		30
t (11;14) (q13; q32)	CCND1 (циклин D1)	15
t (4;14) (p16; q32)	FGFR-3 и MMSET	6
t (14; 16) (q32; q23)	C-MAF	4
t (14; 20) (q32; q11)	MAFB	<1
Другие транслокации IgH	CCND3 (циклин D3) при t (6;14) множественной миеломе	5
Комбинированная транслоцированная IgH / трисомная множественная миелома	Наличие трисомий и любой из повторяющихся транслокаций IgH у одного и того же пациента	15
Изолированная моносомия 14	Несколько случаев могут представлять собой транслокации 14q32 с участием неизвестных хромосом-партнеров	4,5
Другие цитогенетические аномалии при отсутствии транслокаций IgH, трисомии или моносомии 14		5,5
Нормальный		3

Согласно исследованиям костного мозга с использованием флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), примерно 40% множественных миелом характеризуется наличием трисомий в опухолевых плазматических

клетках (трисомная множественная миелома), в то время как большинство остальных имеют транслокацию с участием локуса тяжелой цепи иммуноглобулина (IgH) на хромосоме 14q32 (множественная миелома с транслокацией IgH) [126-129].

У небольшой части пациентов имеются как трисомии, так и транслокации IgH. Трисомии и транслокации IgH считаются первичными цитогенетическими аномалиями. Кроме того, в ходе течения множественной миеломы возникают другие цитогенетические изменения, называемые вторичными цитогенетическими аномалиями, включая мутации gain(1q), del(1p), del(17p), del(13), генов семейства RAS и вторичные транслокации с участием гена MYC.

Как первичные, так и вторичные цитогенетические нарушения могут влиять на течение заболевания, реакцию на терапию и прогноз. Важно отметить, что интерпретация и влияние цитогенетических нарушений при множественной миеломе варьируются в зависимости от фазы заболевания, на которой они были обнаружены (таблица 5) [130].

Таблица 5. Цитогенетические нарушения, влияющие на клиническое течение и прогноз при множественной миеломе [130]

Цитогенетические аномалии	Клинические условия, в которых обнаруживается аномалия	
	Тлеющая ММ	ММ
Трисомии (6, 8, 9, 11, 15, 17, 19, 21 хромосомы)	Средний уровень - риск прогрессирования; Медиана ВДП – 3 года	Хороший прогноз, ММ стандартного риска (медиана ОВ 7-10 лет) У большинства диагностируется миеломное заболевание костей Отличный ответ на терапию на основе леналидомида
t (11;14) (q13; q32)	Стандартный риск прогрессирования; Медиана ВДП – 5 лет	Хороший прогноз, ММ стандартного риска (медиана ОВ 7-10 лет)
t (6;14) (p21; q32)	Стандартный риск прогрессирования; Медиана ВДП – 5 лет	Хороший прогноз, ММ стандартного риска (медиана ОВ 7-10 лет)
t (4;14) (p16; q32)	Высокий риск прогрессирования; Медиана ВДП – 2 года	ММ высокого риска (медиана ОВ 5 лет) Необходима ранняя трансплантация аутологичных стволовых клеток

		(при наличии возможности) с последующей консолидацией на основе бортезомиба
t (14; 16) (q32; q23)	Стандартный прогрессирования; Медиана ВДП – 5 лет	риск ММ высокого риска (медиана ОВ 5 лет) Ассоциируется с высоким уровнем FLC и у 25% пациентов наблюдается острая почечная недостаточность в качестве начальной стадии
t (14;20) (q32; q11)	Стандартный прогрессирования; Медиана ВДП – 5 лет	риск ММ высокого риска (медиана ОВ 5 лет) Нуждается в ранней трансплантации аутологичных стволовых клеток (при наличии возможности) с последующей консолидацией / поддерживающим приемом бортезомиба
Gain(1q21)	Высокий прогрессирования; Медиана ВДП – 2 года	риск ММ высокого риска (медиана ОВ 5 лет) Нуждается в ранней трансплантации аутологичных стволовых клеток (при наличии возможности) с последующей консолидацией / поддерживающим приемом бортезомиба
Del(17p)	Высокий прогрессирования; Медиана ВДП – 2 года	риск ММ высокого риска (медиана ОВ 5 лет) Нуждается в ранней трансплантации аутологичных стволовых клеток (при наличии возможности) с последующей консолидацией / поддерживающим приемом бортезомиба
Трисомии + любая из транслокаций IgH	Стандартный прогрессирования; Медиана ВДП – 5 лет	риск Может улучшить неблагоприятный прогноз, обусловленный транслокациями IgH высокого риска и del 17p
Изолированная моносомия 13, или изолированная моносомия 14	Стандартный прогрессирования; Медиана ВДП – 5 лет	риск Влияние на прогноз неясно
Нормальный	Низкий прогрессирования; Медиана ВДП – 7-10 лет.	риск Хороший прогноз, вероятно, отражающий низкую опухолевую нагрузку (медиана ОВ > 7-10 лет)

ВДП – время до прогрессирования, ОВ – общая выживаемость

1.2.2.2. Микроокружение

Костный мозг, как микроокружение для ММ, оказывает значительное влияние на клеточную пролиферацию, рост и выживание опухолевых клеток при ММ. Костные клетки, ММ-клетки, эндотелиальные клетки и внеклеточный матрикс тесно взаимодействуют в этой микросреде. Клетки ММ прикрепляются к стромальным клеткам костного мозга (СК) для поддержания клеточной пролиферации и инвазии.

Компоненты костного мозга, особенно стромальные клетки (СК) и белки внеклеточного матрикса (БВМ), играют ключевую роль в патогенезе ММ [131] (рис. 7).

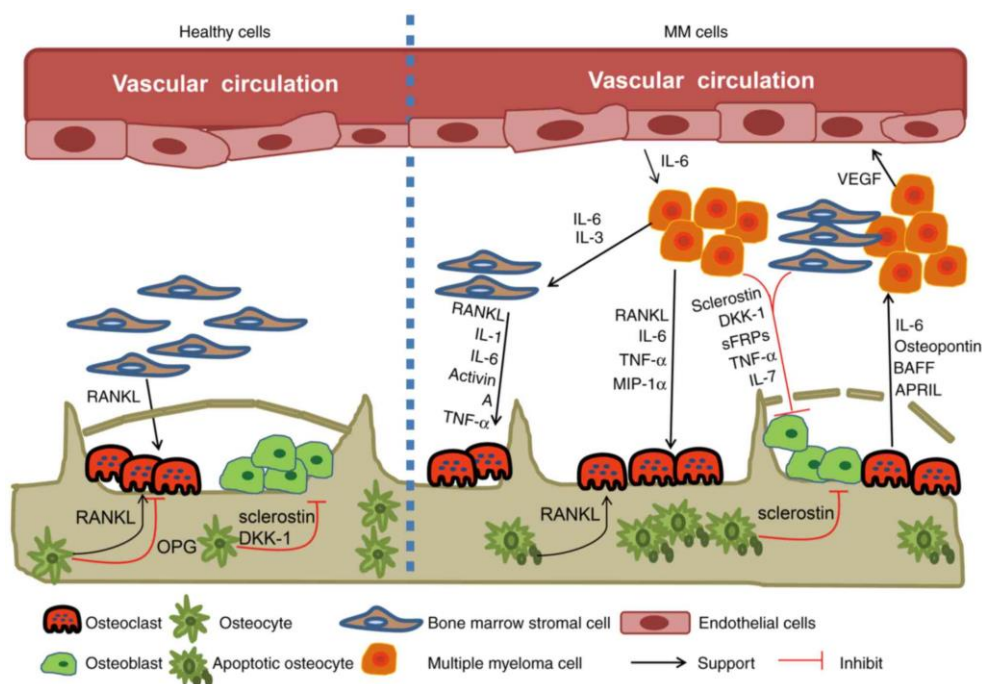


Рисунок 7 – Взаимодействие между клетками ММ и микроокружением костного мозга

Адгезия, которая происходит между плазматическими клетками ММ и белками СК и БВМ, хорошо известна. Данный фактор может влиять на рост, пролиферацию, инвазию и устойчивость к лекарствам клеток ММ, а также вызывать ангиогенез и литические поражения костей [132,133].

Интегрин $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), который расположен на поверхности плазматических клеток ММ, опосредует связывание опухолевых клеток с белками внеклеточного матрикса, включая коллаген I типа и фибронектин, а также может связываться с молекулой адгезии VCAM-1.

Опухолевые клетки, которые прикрепляются к СК, могут стимулировать многочисленные сигнальные пути и приводить к усилению продукции цитокинов, которые регулируют жизнедеятельность клетки, а также антиапоптотических белков [134], включая интерлейкин-6 (IL-6), RANKL и активин A [135,136].

Взаимодействие между ММ и стромальными клетками может быть опосредовано сигнальным путем Notch. Сигнальный путь Notch в клетках ММ и СК может стимулироваться взаимодействием с лигандом Notch-Notch, что может приводить к секреции IL-6, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1).

Кроме того, адгезия ММ-клеток к СК также индуцирует NF- κ B-зависимую транскрипцию и секрецию IL-6. IL-6 способствует продукции ММ-клеток и секреции VEGF, а также регулирует апоптоз злокачественных плазматических клеток [137].

Также в литературе продемонстрировано, что у пациентов с ММ экзосомы могут высвобождаться стромальными клетками и переноситься в ММ-клетки, что приводит к прогрессированию ММ и индукции резистентности к лекарствам [138,139].

1.2.3. Эпидемиология

Согласно текущим статистическим данным Global cancer observatory (GLOBOCAN), ежегодно регистрируется около 176 тысяч случаев ММ в мире, что составляет 0,91% от всех зарегистрированных случаев онкологии. В России за 2020 год зарегистрировано 5132 случая. Частота заболеваемости у мужчин и женщин составляет 2,2 и 1,5 на 100 тысяч соответственно [140].

Заболеваемость ММ составляет приблизительно 1 % среди всех злокачественных опухолей и до 10–15% всех опухолей кроветворной и лимфоидной тканей. ММ является вторым по распространенности онкогематологическим заболеванием, после неходжкинских лимфом. Заболевают преимущественно люди старшей возрастной группы. Средний возраст вновь заболевших – ≈ 70 лет, распространенность заболевания среди населения моложе 40 лет не превышает 2 %.

С 1990 по 2016 год заболеваемость ММ в мире увеличилась на 126%. Таким образом, ММ в настоящее время описывается как 14-е по частоте новообразование. Ожидаемый уровень заболеваемости составляет 7,0 на 100 000 человек, что на 143 % больше по сравнению с прогнозируемым показателем заболеваемости в 1975 году в 4,9 на 100 000 человек [141].

От момента рождения до 74 лет совокупный риск заболевания у мужчин и женщин составляет 0,24 % и 0,17 % соответственно, что делает вероятность диагностирования заболевания у мужчин примерно в 1,5 раза выше, чем у женщин [142].

Несмотря на достижения в терапии, 10-летняя выживаемость составляет всего 17% [143]. Средняя продолжительность жизни пациентов на III стадии заболевания составляет 29 месяцев, в отличие от пациентов на I и II стадиях, у которых средний период выживаемости составляет 5 и 4 года соответственно [144].

Вероятность смерти от ММ составляет 0,15 % у мужчин и 0,10 % у женщин, что свидетельствует о сопоставимом глобальном уровне выживаемости. В период с 1990 по 2016 год смертность от новообразований во всем мире увеличилась на 94 % [145], однако более высокие показатели выживаемости снизили общие показатели смертности от множественной миеломы за последние несколько десятилетий. С 2013 по 2017 год уровень смертности снизился с 3,3 на 100 000 до 3,2 на 100 000 во всех возрастных группах и с 21,7 на 100 000 до 20,5 на 100 000 в возрастных группах более 65 лет [146].

1.2.4. Применяемые методы диагностики

На сегодняшний день наиболее распространёнными и убедительными методами первичной диагностики миеломы являются определение уровня общего белка, выявление и иммунотипирование М-градиента, а также морфологическое исследование биоптата костного мозга. При электрофорезе белков сыворотки крови у 80% больных наблюдается М-градиент, при иммунофиксации – у 93% пациентов с ММ.

Процедуру иммунофиксации необходимо выполнять, даже если при электрофорезе крови характерный пик не выявлялся. Она проводится с целью уточнения моноклональной природы М-градиента, обнаруженного в ходе электрофореза белковых фракций, и его типирования (определения, какие типы тяжёлых и лёгких цепей входят в его состав) [101].

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Объектом данного исследования являются анонимные образцы венозной крови, а именно лейкоциты и плазма венозной крови 58 пациентов с подтвержденным диагнозом «множественная миелома», 28 пациентов, не имеющих онкогематологических заболеваний и 65 здоровых доноров крови. Общая характеристика пациентов представлена в табл. 6 и 7 соответственно.

Таблица 6. Характеристика пациентов с множественной миеломой (пробы лейкоцитов венозной крови)

	Впервые выявленный	Лечение: Начало лечения	Лечение: Ремиссия	Лечение: Прогрессия
Количество проб, n	16	9	15	14
Мужчины/ женщины, n	8/8	3/6	9/6	5/9
Возраст (Me (min-max)), лет	63 (47-76)	65 (33-75)	62 (41-84)	66 (49-76)
Кол-во проб с 1 или 2 стадией по Durie-Salmon, n	2	4	3	3
Кол-во проб с 3А или 3В стадией по Durie-Salmon, n	14	5	12	11
Кол-во проб с «несекретирующей» ММ, n	1	-	1	-
Лейкоциты (Me (min-max)), клеток *10 ⁹ /литр	8,955 (2,12-26,4)	4,42 (2,3-14,1)	5,76 (2,54-11,26)	4,79 (1,06-10,9)

Таблица 7. Характеристика пациентов, не имеющих онкогематологических заболеваний и доноров крови

	Пациенты, не имеющие онкогематологических заболеваний	Доноры крови
Количество проб, n	28	65
Мужчины/ женщины, n	14/14	47/18
Возраст (Me (min-max)), лет	44 (21-85)	37 (19-56)
Лейкоциты (Me (min-max)), клеток *10 ⁹ /литр	6,285 (4-11,54)	6,3 (2,8-10,1)

2.2 Методы

2.2.1 Дизайн праймеров и зондов для ОТ и ПЦР

Дизайн праймеров и зондов для реакции ПЦР в реальном времени осуществлялся на основе последовательностей кДНК с использованием электронного ресурса Primer3Plus. Для реакции ПЦР используются два комплиментарных к последовательности кДНК зонда, которые должны соответствовать следующим требованиям:

1. Длина 18–24 нуклеотида;
2. Четыре (и более) 3'-концевых нуклеотида не должны быть комплиментарны самому праймеру, праймеру в паре или другим олигонуклеотидам, присутствующим в смеси в высокой концентрации;
3. Температура отжига (Ta) должна быть равна примерно 60-70 °С;
4. Температура отжига праймеров, работающих в паре, не должна существенно различаться.

В качестве флуоресцентных меток для зондов использовали FAM (флуоресцеин) – для детекции miR-16, miR-21, miR-221, miR-222 и HEX

(хлорированный флуоресцеин) – для детекции miR-39. Для микроРНК miR-15a вместо зонда использовался интеркалирующий краситель EvaGreen.

2.2.2. ПЦР с градиентом температур

Для эмпирического определения оптимальной температуры отжига праймеров для каждой целевой микроРНК было проведено исследование амплификации стандартных образцов микроРНК при различных температурах отжига праймеров в диапазоне от 55 до 65 °С.

В качестве экспериментальных групп были взяты образцы кДНК стандартов микроРНК в концентрациях 10 фм. Контроль для каждой смеси был представлен продуктом обратной транскрипции, в который, вместо матрицы кДНК, был добавлен аналогичный объем воды.

2.2.3. ПЦР с разведенными стандартными образцами

Для определения эффективности и чувствительности ПЦР для каждой исследуемой микроРНК были выполнены серии 10-кратных разведений стандартных микроРНК в форме кДНК. Все реакции проводились в трёх повторах для каждого разведения.

2.2.4 Выделение лейкоцитов из цельной крови

Образцы крови получали из локтевой вены и стабилизировали раствором ЭДТА К2 в объемном отношении 9:1. В процессе исследования кровь сохраняли в закрытых пластиковых пробирках при комнатной температуре не более 3 часов, с соблюдением общепринятых мер предосторожности при работе с венозной кровью и её компонентами.

Выделение лейкоцитов из цельной крови осуществлялось путём добавления к 200 мкл цельной крови 600 мкл гемолитика (0,9% NH_4Cl),

дальнейшей инкубации при комнатной температуре в течение 10 мин., центрифугирования (1 мин., 12000 об/мин) и удаления надосадочной жидкости.

2.2.5 Выделение плазмы из цельной крови

Образцы крови получали из локтевой вены и стабилизировали раствором ЭДТА К2 в объемном отношении 9:1. В процессе исследования кровь сохраняли в закрытых пластиковых пробирках при комнатной температуре не более 3 часов, с соблюдением общепринятых мер предосторожности при работе с венозной кровью и её компонентами.

Для получения плазмы пробирку с венозной кровью центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Из надосадочной жидкости, которая представляет собой плазму крови, отбирали 200 мкл в чистую пробирку.

2.2.6 Выделение микроРНК

Выделение микроРНК осуществлялось фенол-хлороформным методом с последующей очисткой на спин-колонках. Фенол-хлороформный метод заключается в разделении реакционной смеси при кислых значениях рН на 3 фазы - водную (верхнюю) фазу с РНК, среднюю с денатурированными белками и фенольную (нижнюю) фазу с ДНК.

В процессе выделения производится добавление 10 мкл внутреннего контроля (микроРНК *cel-miR-39-3p*) с известной концентрацией в исследуемую пробу для дополнительного контроля эффективности всех этапов анализа. Интерпретация результатов осуществлялась при выполнении условия, что пороговый цикл флуоресценции в реакции ПЦР (Ct) микроРНК *miR-39* не более 22.

2.2.7 Обратная транскрипция (ОТ)

Полученная после выделения микроРНК подвергается реакции обратной транскрипции. В ходе данного процесса происходит синтез одноцепочечной ДНК (кДНК) из матричной одноцепочечной микроРНК при участии РНК-зависимой-ДНК-полимеразы (ревертазы). Особенностью проведения реакции обратной транскрипции для микроРНК является использование петлевых праймеров.

Для проведения реакции обратной транскрипции использовались 5X буфер, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP), специфические петлевые праймеры для каждой исследуемой микроРНК, ревертаза MMLV-RT («Синтол») и вода. К 15 мкл реакционной смеси добавлялось 10 мкл РНК.

Реакция обратной транскрипции проводилась в амплификаторе «Терцик» по программе 16°C 30 мин., 42°C 30 сек., 92°C 5 мин.

Схема реакции, информация об использованных реагентах и программа для амплификатора представлены на рис. 8, табл. 8 и табл. 9 соответственно.

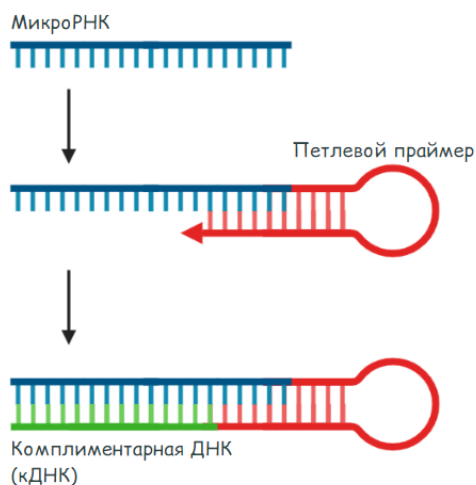


Рисунок 8 – Схема реакции обратной транскрипции для микроРНК

С 42 по 77 стр. изъято в связи с авторскими правами

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной научно-исследовательской работы были получены следующие результаты:

1. Разработаны 5 тест-систем на основе ПЦР в реальном времени для индивидуального специфического анализа пяти микроРНК – miR-15a, -16, -21, -221 и -222. Аналитическая чувствительность реакций ПЦР составила от 74,4% до 103,5%, а чувствительность – от 0,0002 фм до 0,02 фм;
2. Разработана смесь для мультиплексной детекции двух микроРНК методом ПЦР в реальном времени – miR-39 (по каналу HEX) и miR-21 (по каналу FAM) с показателями эффективности 97,0% и 89,8% соответственно;
3. При анализе результатов анализа проб плазмы венозной крови выявлено снижение уровня микроРНК miR-16 и повышение уровня микроРНК miR-21 и miR-222 у пациентов с первично выявленной множественной миеломой по отношению к здоровым донорам крови;
4. На основе данных тест-систем сформированы 2 способа диагностики ММ, которые могут быть внедрены в практическую онкогематологию: на основе расчета коэффициента miR-21/miR-16 и коэффициента $\text{miR-16/(miR-21+miR-222)}$ для проб плазмы венозной крови;
5. Показана принципиальная возможность использования технологии анализа уровня микроРНК в пробах венозной крови для первичной диагностики множественной миеломы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РНК – рибонуклеиновая кислота
микроРНК – малая рибонуклеиновая кислота
РНКи – РНК-интерференция
миРНК – малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
мяРНК – малая ядерная рибонуклеиновая кислота
pri-microRNA – первичная микроРНК
pre-miRNA – предшественник микроРНК
ГТФ – гуанозинтрифосфат
miRISC, RISC – микроРНК-индуцированный комплекс сайленсинга
AGO – семейство белков Argonaut
XPO5 – экспортин-5
ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз
ММ – множественная миелома
ПК – плазматическая клетка
ISS – International Staging System
MGUS – моноклональная гаммопатия неопределенной значимости
SMM – тлеющая множественная миелома
FISH – флуоресцентная гибридизация in situ
СК – стромальные клетки
BBM – белки внеклеточного матрикса
ОТ – обратная транскрипция
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
кДНК – комплиментарная дезоксирибонуклеиновая кислота
dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфаты

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. microRNA strand selection: Unwinding the rules / Medley J. C., Panzade G., Zinovyeva A. Y. // Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. – 2021. – Т. 12. – №. 3. – С. 1–22.
2. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer / Kim Y. K. et al. // Nucleic acids research. – 2009. – Т. 37. – №. 5. – С. 1672-1681.
3. Novel regulation and functional interaction of polycistronic miRNAs / Truscott M., Islam A. B., Frolov M. V. // RNA. – 2016. – Т. 22. – №. 1. – С. 129-138.
4. Biogenesis of small RNAs in animals / Kim V. N., Han J., Siomi M. C. // Nature reviews Molecular cell biology. – 2009. – Т. 10. – №. 2. – С. 126-139.
5. Annotation of mammalian primary microRNAs / Saini H. K., Enright A. J., Griffiths-Jones S. // BMC genomics. – 2008. – Т. 9. – С. 1-19.
6. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes / Chiang H. R. et al. // Genes & development. – 2010. – Т. 24. – №. 10. – С. 992-1009.
7. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* / Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. // Cell. – 1993. – Т. 75. – №. 5. – С. 843-854.
8. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* / Reinhart B. J. et al. // Nature. – 2000. – Т. 403. – №. 6772. – С. 901-906.
9. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing / Lam J. K. W. et al. // Molecular Therapy-Nucleic Acids. – 2015. – Т. 4. – № 9 (4). – С. 1–20

10. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets / Lewis B. P., Burge C. B., Bartel D. P. // *Cell*. – 2005. – T. 120. – №. 1. – C. 15-20.
11. Small silencing RNAs: an expanding universe / Ghildiyal M., Zamore P. D. // *Nature reviews genetics*. – 2009. – T. 10. – №. 2. – C. 94-108.
12. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing / Kim V. N. // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2005. – T. 6. – №. 5. – C. 376-385.
13. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex / Han J. et al. // *Cell*. – 2006. – T. 125. – №. 5. – C. 887-901.
14. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex / Denli A. M. et al. // *Nature*. – 2004. – T. 432. – №. 7014. – C. 231-235.
15. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs / Gregory R. I. et al. // *Nature*. – 2004. – T. 432. – №. 7014. – C. 235-240.
16. MicroRNA biogenesis and cancer / Gregory R. I., Shiekhattar R. // *Cancer research*. – 2005. – T. 65. – №. 9. – C. 3509-3512.
17. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs / Bohnsack M. T., Czaplinski K., Görlich D. // *RNA*. – 2004. – T. 10. – №. 2. – C. 185-191.
18. Nuclear export of microRNA precursors / Lund E. et al. // *Science*. – 2004. – T. 303. – №. 5654. – C. 95-98.
19. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA / Hutvagner G. et al. // *Science*. – 2001. – T. 293. – №. 5531. – C. 834-838.
20. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans* / Ketting R. F. et al. // *Genes & development*. – 2001. – T. 15. – №. 20. – C. 2654-2659.

21. MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation / Ørom U. A., Nielsen F. C., Lund A. H. // *Molecular cell*. – 2008. – T. 30. – №. 4. – C. 460-471.
22. Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signatures / Stark A. et al. // *Nature*. – 2007. – T. 450. – №. 7167. – C. 219-232.
23. Decoding ARE-mediated decay: is microRNA part of the equation? / Von Roretz C., Gallouzi I. E. // *The Journal of cell biology*. – 2008. – T. 181. – №. 2. – C. 189-194.
24. DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development / Yi R. et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – T. 106. – №. 2. – C. 498-502.
25. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis / Cheloufi S. et al. // *Nature*. – 2010. – T. 465. – №. 7298. – C. 584-589.
26. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants / Yang J. S., Lai E. C. // *Molecular cell*. – 2011. – T. 43. – №. 6. – C. 892-903.
27. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing / Ruby J. G., Jan C. H., Bartel D. P. // *Nature*. – 2007. – T. 448. – №. 7149. – C. 83-86.
28. Formation, regulation and evolution of *Caenorhabditis elegans* 3' UTRs / Jan C. H. et al. // *Nature*. – 2011. – T. 469. – №. 7328. – C. 97-101.
29. A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains / Zhu Q. H. et al. // *Genome research*. – 2008. – T. 18. – №. 9. – C. 1456-1465.
30. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing / Haussecker D. et al. // *RNA*. – 2010. – T. 16. – №. 4. – C. 673-695.

31. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs / Babiarz J. E. et al. // *Genes & development*. – 2008. – T. 22. – №. 20. – C. 2773-2785.
32. CSDE1 promotes miR-451 biogenesis / Kakumani P. K. et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – T. 51. – №. 17. – C. 9385-9396.
33. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis / Kumar M. S. et al. // *Nature genetics*. – 2007. – T. 39. – №. 5. – C. 673-677.
34. Dicer is essential for mouse development / Bernstein E. et al. // *Nature genetics*. – 2003. – T. 35. – №. 3. – C. 215-217.
35. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal / Wang Y. et al. // *Nature genetics*. – 2007. – T. 39. – №. 3. – C. 380-385.
36. Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region / Shiohama A. et al. // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2003. – T. 304. – №. 1. – C. 184-190.
37. Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo / Lambertz I. et al. // *Cell Death & Differentiation*. – 2010. – T. 17. – №. 4. – C. 633-641.
38. Induction of multiple myeloma bone marrow stromal cell apoptosis by inhibiting extracellular vesicle miR-10a secretion / Umezu T. et al. // *Blood advances*. – 2019. – T. 3. – №. 21. – C. 3228-3240.
39. MiR-19b and miR-20a suppress apoptosis, promote proliferation and induce tumorigenicity of multiple myeloma cells by targeting PTEN / Yuan J. et al. // *Cancer Biomarkers*. – 2019. – T. 24. – №. 3. – C. 279-289.
40. miR-21 antagonism abrogates Th17 tumor promoting functions in multiple myeloma / Rossi M. et al. // *Leukemia*. – 2021. – T. 35. – №. 3. – C. 823-834.

41. Targeting miR-21 inhibits in vitro and in vivo multiple myeloma cell growth / Leone E. et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2013. – T. 19. – №. 8. – C. 2096-2106.
42. Integrative analysis of signaling pathways and diseases associated with the miR-106b/25 cluster and their function study in berberine-induced multiple myeloma cells / Gu C. et al. // *Functional & Integrative Genomics*. – 2017. – T. 17. – C. 253-262.
43. Increased expression of miR-27 predicts poor prognosis and promotes tumorigenesis in human multiple myeloma / Che F. et al. // *Bioscience reports*. – 2019. – T. 39. – №. 4. – C. BSR20182502.
44. Bone marrow fibroblasts overexpress miR-27b and miR-214 in step with multiple myeloma progression, dependent on tumour cell-derived exosomes / Frassanito M. A. et al. // *The Journal of pathology*. – 2019. – T. 247. – №. 2. – C. 241-253.
45. Effects of miR-181a on the biological function of multiple myeloma / Liu N. et al. // *Oncology reports*. – 2019. – T. 42. – №. 1. – C. 291-300.
46. Integrative high-resolution microarray analysis of human myeloma cell lines reveals deregulated miRNA expression associated with allelic imbalances and gene expression profiles / Lionetti M. et al. // *Genes, Chromosomes and Cancer*. – 2009. – T. 48. – №. 6. – C. 521-531.
47. A p53-dependent tumor suppressor network is induced by selective miR-125a-5p inhibition in multiple myeloma cells / Leotta M. et al. // *Journal of cellular physiology*. – 2014. – T. 229. – №. 12. – C. 2106-2116.
48. The biological significance of histone modifiers in multiple myeloma: clinical applications / Ohguchi H., Hideshima T., Anderson K. C. // *Blood cancer journal*. – 2018. – T. 8. – №. 9. – C. 83.
49. Epigenetic modifications in multiple myeloma: recent advances on the role of DNA and histone methylation / Amodio N. et al. // *Expert opinion on therapeutic targets*. – 2017. – T. 21. – №. 1. – C. 91-101.

50. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells / Lujambio A. et al. // *Cancer research*. – 2007. – T. 67. – №. 4. – C. 1424-1429.
51. MicroRNAs and epigenetics / Sato F. et al. // *The FEBS journal*. – 2011. – T. 278. – №. 10. – C. 1598-1609.
52. Tumor-suppressive microRNA silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer cells / Kozaki K., Inazawa J. // *Cancer science*. – 2012. – T. 103. – №. 5. – C. 837-845.
53. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B / Fabbri M. et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – T. 104. – №. 40. – C. 15805-15810.
54. ABCG2 expression, function, and promoter methylation in human multiple myeloma / Turner J. G. et al. // *Blood*. – 2006. – T. 108. – №. 12. – C. 3881-3889.
55. DNA methylation of tumor suppressor protein-coding and non-coding genes in multiple myeloma / Wong K. Y., Chim C. S. // *Epigenomics*. – 2015. – T. 7. – №. 6. – C. 985-1001.
56. Chromatin modifications and their function / Kouzarides T. // *Cell*. – 2007. – T. 128. – №. 4. – C. 693-705.
57. Histone modification patterns and epigenetic codes / Lennartsson A., Ekwall K. // *Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects*. – 2009. – T. 1790. – №. 9. – C. 863-868.
58. Histone onco-modifications / Füllgrabe J., Kavanagh E., Joseph B. // *Oncogene*. – 2011. – T. 30. – №. 31. – C. 3391-3403.
59. The role of chromatin during transcription / Li B., Carey M., Workman J. L. // *Cell*. – 2007. – T. 128. – №. 4. – C. 707-719.
60. Epigenetic regulatory mutations and epigenetic therapy for multiple myeloma / Dupéré-Richer D., Licht J. D. // *Current opinion in hematology*. – 2017. – T. 24. – №. 4. – C. 336-344.

61. MMSET stimulates myeloma cell growth through microRNA-mediated modulation of c-MYC / Min D. J. et al. // *Leukemia*. – 2013. – T. 27. – №. 3. – C. 686-694.
62. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma / Roccaro A. M. et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2009. – T. 113. – №. 26. – C. 6669-6680.
63. Micro-RNA-15a and micro-RNA-16 expression and chromosome 13 deletions in multiple myeloma / Corthals S. L. et al. // *Leukemia Research*. – 2010. – T. 34. – №. 5. – C. 677-681.
64. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia / Calin G. A. et al. // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2002. – T. 99. – №. 24. – C. 15524-15529.
65. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 / Cimmino A. et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – T. 102. – №. 39. – C. 13944-13949.
66. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch / Cory S., Adams J. M. // *Nature Reviews Cancer*. – 2002. – T. 2. – №. 9. – C. 647-656.
67. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia / Calin G. A. et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – T. 105. – №. 13. – C. 5166-5171.
68. Design, synthesis, anticancer evaluation, and molecular modelling studies of novel tolmetin derivatives as potential VEGFR-2 inhibitors and apoptosis inducers / Kassab A. E. et al. // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. – 2021. – T. 36. – №. 1. – C. 922-939.
69. Development of pyrolo [2, 3-c] pyrazole, pyrolo [2, 3-d] pyrimidine and their bioisosteres as novel CDK2 inhibitors with potent in vitro apoptotic anti-proliferative activity: Synthesis, biological evaluation and molecular

- dynamics investigations / Azmy E. M. et al. // *Bioorganic Chemistry*. – 2023. – T. 139. – C. 106729.
70. Nanocomposite based on gold nanoparticles and carboxymethyl cellulose: synthesis, characterization, antimicrobial, and anticancer activities / Doghish A. S. et al. // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2022. – T. 77. – C. 103874.
71. Graphene oxide and its nanocomposites with EDTA or chitosan induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer / Doghish A. S. et al. // *RSC advances*. – 2021. – T. 11. – №. 46. – C. 29052-29064.
72. New benzoxazole derivatives as potential VEGFR-2 inhibitors and apoptosis inducers: Design, synthesis, anti-proliferative evaluation, flowcytometric analysis, and in silico studies / Elkady H. et al. // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. – 2022. – T. 37. – №. 1. – C. 403-416.
73. Targeting NF- κ B in Waldenstrom macroglobulinemia / Leleu X. et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2008. – T. 111. – №. 10. – C. 5068-5077.
74. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs / Lagos-Quintana M. et al. // *Science*. – 2001. – T. 294. – №. 5543. – C. 853-858.
75. A novel source for miR-21 expression through the alternative polyadenylation of VMP1 gene transcripts / Ribas J. et al. // *Nucleic acids research*. – 2012. – T. 40. – №. 14. – C. 6821-6833.
76. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs / Cai X., Hagedorn C. H., Cullen B. R. // *RNA*. – 2004. – T. 10. – №. 12. – C. 1957-1966.
77. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters / Oszolak F. et al. // *Genes & development*. – 2008. – T. 22. – №. 22. – C. 3172-3183.
78. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature / Griffiths-Jones S. et al. // *Nucleic acids research*. – 2006. – T. 34. – №. 1. – C. D140-D144.

79. MicroRNA-21 (Mir-21) promotes cell growth and invasion by repressing tumor suppressor PTEN in colorectal cancer / Wu Y. et al. // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2017. – T. 43. – №. 3. – C. 945-958.
80. MicroRNA-21 (miR-21) expression promotes growth, metastasis, and chemo-or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN / Liu Z. L. et al. // Molecular and cellular biochemistry. – 2013. – T. 372. – C. 35-45.
81. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer / Asangani I. A. et al. // Oncogene. – 2008. – T. 27. – №. 15. – C. 2128-2136.
82. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression / Song B. et al. // Journal of experimental & clinical cancer research. – 2010. – T. 29. – C. 1-8.
83. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1) / Zhu S. et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – T. 282. – №. 19. – C. 14328-14336.
84. Up-regulation of miR-21 by HER2/neu signaling promotes cell invasion / Huang T. H. et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – T. 284. – №. 27. – C. 18515-18524.
85. Induced apoptosis in multiple myeloma cells expressing miR-21 through AKT/FOXO1/BIM signaling / Song H. et al. // Nanoscience and Nanotechnology Letters. – 2018. – T. 10. – №. 7. – C. 1006-1012.
86. New therapeutic axis in blood malignancies involving microRNAs and JAK/STAT3 signaling / House G. // Authorea Preprints. – 2023.
87. Biology and treatment of myeloma related bone disease / Terpos E., Christoulas D., Gavriatopoulou M. // Metabolism. – 2018. – T. 80. – C. 80-90.
88. Osteoclast differentiation and activation / Boyle W. J., Simonet W. S., Lacey D. L. // Nature. – 2003. – T. 423. – №. 6937. – C. 337-342.

89. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression / Pearse R. N. et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – T. 98. – №. 20. – C. 11581-11586.
90. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo / Farrugia A. N. et al. // Cancer research. – 2003. – T. 63. – №. 17. – C. 5438-5445.
91. MicroRNA-21 and multiple myeloma: small molecule and big function / Ma J., Liu S., Wang Y. // Medical Oncology. – 2014. – T. 31. – C. 1-6.
92. From molecular mechanisms to therapeutics: understanding MicroRNA-21 in cancer / Rhim J. et al. // Cells. – 2022. – T. 11. – №. 18. – C. 2791.
93. Aberrant levels of miRNAs in bone marrow microenvironment and peripheral blood of myeloma patients and disease progression / Wang W. et al. // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2015. – T. 17. – №. 6. – C. 669-678.
94. Myeloma cell adhesion to bone marrow stromal cells confers drug resistance by microRNA-21 up-regulation / Wang X. et al. // Leukemia & lymphoma. – 2011. – T. 52. – №. 10. – C. 1991-1998.
95. MicroRNA-221: biogenesis, function and signatures in human cancers / Abak A. et al. // European Review for Medical & Pharmacological Sciences. – 2018. – T. 22. – №. 10.
96. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor α interactions in breast cancer / Di Leva G. et al. // JNCI: Journal of the National Cancer Institute. – 2010. – T. 102. – №. 10. – C. 706-721.
97. Small RNA sequencing reveals microRNAs that modulate angiotensin II effects in vascular smooth muscle cells / Jin W. et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – T. 287. – №. 19. – C. 15672-15683.

98. In vitro and in vivo anti-tumor activity of miR-221/222 inhibitors in multiple myeloma / Di Martino M. T. et al. // *Oncotarget*. – 2013. – Т. 4. – №. 2. – С. 242.
99. A 13 mer LNA-i-miR-221 inhibitor restores drug sensitivity in melphalan-refractory multiple myeloma cells / Gulla A. et al. // *Clinical cancer research*. – 2016. – Т. 22. – №. 5. – С. 1222-1233.
100. miR-221/222-mediated inhibition of autophagy promotes dexamethasone resistance in multiple myeloma / Xu J. et al. // *Molecular Therapy*. – 2019. – Т. 27. – №. 3. – С. 559-570.
101. Менделеева Л.П., Вотякова О.М., Рехтина И.Г. Множественная миелома. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению злокачественных лимфопролиферативных заболеваний. / под ред. Поддубной И.В., Савченко В.Г. Москва, 2018. 213–241 р.
102. Management of newly diagnosed elderly multiple myeloma patients / Antoine-Pepeljugoski C., Braunstein M. J. // *Current Oncology Reports*. – 2019. – Т. 21. – С. 1-11.
103. Multiple myeloma: from diagnosis to treatment / Eslick R., Talaulikar D. // *Australian family physician*. – 2013. – Т. 42. – №. 10. – С. 684-688.
104. Pathogenesis and treatment of myeloma-related bone disease / Gau Y. C. et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Т. 23. – №. 6. – С. 3112.
105. Intracлонаl heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms / Walker B. A. et al. // *Leukemia*. – 2014. – Т. 28. – №. 2. – С. 384-390.
106. A clinical staging system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival / Durie B. G. M., Salmon S. E. // *Cancer*. – 1975. – Т. 36. – №. 3. – С. 842-854.
107. International staging system for multiple myeloma / Greipp P. R. et al. // *Journal of clinical oncology*. – 2005. – Т. 23. – №. 15. – С. 3412-3420.

108. The genetic architecture of multiple myeloma / Morgan G. J., Walker B. A., Davies F. E. // Nature Reviews Cancer. – 2012. – Т. 12. – №. 5. – С. 335-348.
109. Множественная миелома (лекция) / Бессмельцев С. С. // Вестник гематологии. – 2014. – Т. 10. – №. 3. – С. 6-39.
110. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study / Landgren O. et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2009. – Т. 113. – №. 22. – С. 5412-5417.
111. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients / Weiss B. M. et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2009. – Т. 113. – №. 22. – С. 5418-5422.
112. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance / Kyle R. A. et al. // New England Journal of Medicine. – 2006. – Т. 354. – №. 13. – С. 1362-1369.
113. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study / Dispenzieri A. et al. // The Lancet. – 2010. – Т. 375. – №. 9727. – С. 1721-1728.
114. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance / Kyle R. A. et al. // New England Journal of Medicine. – 2002. – Т. 346. – №. 8. – С. 564-569.
115. Long-term follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance / Kyle R. A. et al. // New England journal of medicine. – 2018. – Т. 378. – №. 3. – С. 241-249.
116. Incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance and estimation of duration before first clinical recognition / Therneau T. M. et al. // Mayo Clinic Proceedings. – Elsevier, 2012. – Т. 87. – №. 11. – С. 1071-1079.

117. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma / Kyle R. A. et al. // New England Journal of Medicine. – 2007. – T. 356. – №. 25. – C. 2582-2590.
118. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma / Rajkumar S. V. et al. // Leukemia. – 2013. – T. 27. – №. 8. – C. 1738-1744.
119. Progression in smoldering myeloma is independently determined by the chromosomal abnormalities del (17p), t (4; 14), gain 1q, hyperdiploidy, and tumor load / Neben K. et al. // Journal of clinical oncology. – 2013. – T. 31. – №. 34. – C. 4325-4332.
120. Prognostic significance of interphase FISH in monoclonal gammopathy of undetermined significance / Lakshman A. et al. // Leukemia. – 2018. – T. 32. – №. 8. – C. 1811-1815.
121. Clinical course and prognosis of non-secretory multiple myeloma / Chawla S. S. et al. // European journal of haematology. – 2015.
122. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013 / Mikhael J. R. et al. // Mayo Clinic Proceedings. – Elsevier, 2013. – T. 88. – №. 4. – C. 360-376.
123. The multiple myelomas—current concepts in cytogenetic classification and therapy / Kumar S. K., Rajkumar S. V. // Nature reviews Clinical oncology. – 2018. – T. 15. – №. 7. – C. 409-421.
124. Multiple myeloma—translation of trial results into reality / Moreau P., Rajkumar S. V. // The Lancet. – 2016. – T. 388. – №. 10040. – C. 111-113.
125. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics / Kumar S. et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2012. – T. 119. – №. 9. – C. 2100-2105.

126. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions / Kuehl W. M., Bergsagel P. L. // *Nature Reviews Cancer*. – 2002. – Т. 2. – №. 3. – С. 175-187.
127. Chromosome translocations in multiple myeloma / Bergsagel P. L., Kuehl W. M. // *Oncogene*. – 2001. – Т. 20. – №. 40. – С. 5611-5622.
128. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance / Fonseca R. et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2002. – Т. 100. – №. 4. – С. 1417-1424.
129. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma / Seidl S., Kaufmann H., Drach J. // *The lancet oncology*. – 2003. – Т. 4. – №. 9. – С. 557-564.
130. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice / Rajan A. M., Rajkumar S. V. // *Blood cancer journal*. – 2015. – Т. 5. – №. 10. – С. e365-e365.
131. Pathogenesis of myeloma / Anderson K. C., Carrasco R. D. // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2011. – Т. 6. – С. 249-274.
132. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma / Kawano Y. et al. // *Immunological reviews*. – 2015. – Т. 263. – №. 1. – С. 160-172.
133. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms / Abdi J., Chen G., Chang H. // *Oncotarget*. – 2013. – Т. 4. – №. 12. – С. 2186.
134. Pathogenesis beyond the cancer clone (s) in multiple myeloma / Bianchi G., Munshi N. C. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2015. – Т. 125. – №. 20. – С. 3049-3058.
135. Microenvironment and multiple myeloma spread / Ribatti D., Moschetta M., Vacca A. // *Thrombosis research*. – 2014. – Т. 133. – С. S102-S106.

136. The microenvironment and molecular biology of the multiple myeloma tumor / Lemaire M. et al. // *Advances in cancer research*. – 2011. – Т. 110. – С. 19-42.
137. IL-6 enhances osteocyte-mediated osteoclastogenesis by promoting JAK2 and RANKL activity in vitro / Wu Q. et al. // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2017. – Т. 41. – №. 4. – С. 1360-1369.
138. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells / Wang J. et al. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2014. – Т. 124. – №. 4. – С. 555-566.
139. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression / Roccaro A. M. et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2013. – Т. 123. – №. 4. – С. 1542-1555.
140. International Agency for Research on Cancer: Global Cancer Observatory. — URL: <https://gco.iarc.fr> (дата обращения: 29.04.2023).
141. Global burden of multiple myeloma: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016 / Cowan A. J. et al. // *JAMA oncology*. – 2018. – Т. 4. – №. 9. – С. 1221-1227.
142. Myeloma in elderly patients: when less is more and more is more / Rosko A. et al. // *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. – 2017. – Т. 37. – С. 575-585.
143. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients / Kumar S. K. et al. // *Leukemia*. – 2014. – Т. 28. – №. 5. – С. 1122-1128.
144. Antibody drug conjugates for the treatment of multiple myeloma / Leong S. et al. // *American Journal of Hematology*. – 2023. – Т. 98. – С. S22-S34.
145. Epidemiology, staging, and management of multiple myeloma / Padala S. A. et al. // *Medical Sciences*. – 2021. – Т. 9. – №. 1. – С. 3.

146. Rapidly changing myeloma epidemiology in the general population: Increased incidence, older patients, and longer survival / Turesson I. et al. // European journal of haematology. – 2018. – T. 101. – №. 2. – C. 237-244.
147. Inflexibility of the plasma miRNA response following a high-carbohydrate meal in overweight insulin-resistant women / Ramzan F. et al. // Genes & Nutrition. – 2020. – T. 15. – C. 1-12.

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 И.Е. Ямских

«20» июля 2024 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование диагностического значения микроРНК при множественной
миеломе

06.04.01 – Биология

06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Руководители


подпись, дата

канд. мед. наук
ученая степень

И. А. Ольховский
инициалы, фамилия


подпись, дата

доцент, к. б. н.
должность, ученая степень

М.Г. Куцев
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

А. Д. Тимерман
инициалы, фамилия

Рецензент


подпись, дата

канд. мед. наук
ученая степень

В.А. Бабушкин
инициалы, фамилия

Красноярск 2024