ЦИТОЛОГИЯ, 2020, том 62, № 4, с. 250–257

УДК 575.164:616-008

ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ микроРНК В КЛЕТКАХ ОСТРОГО ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА ПРИ РАЗЛИЧНОМ КАРИОТИПЕ

© 2020 г. Ю. А. Веряскина[1, 2, *], С. Е. Титов[2, 3], М. М. Агакишиев[4], А. В. Забела[4], В. С. Селиванов[4], С. П. Мелихов[4], И. Б. Ковынев[4], Т. И. Поспелова[4], И. Ф. Жимулёв[2]

[1]*Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия*

[2]*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия*

[3]*АО Вектор-Бест, Новосибирск, 630117 Россия*

[4]*Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Новосибирск, 63009 Россия*

**E-mail: microrna@inbox.ru*

Поступила в редакцию 12.02.2020 г.
После доработки 22.02.2020 г.
Принята к публикации 22.02.2020 г.

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) является одним из подтипов острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и в большинстве случаев при этом заболнвании детектируется сбалансированная реципрокная транслокация t(15; 17) (q24.1; q21.1). Развитие острого лейкоза сопровождается наличием как генетических, так и эпигенетических модификаций, включая микроРНК (миРНК). Целью настоящей работы является анализ дифференциальной экспрессии миРНК при развитии ОПЛ в зависимости от цитогенетических характеристик опухоли. В работе использованы цитологические препараты, содержащие мазки костного мозга: ОМЛ с наличием транслокации t(15; 17) (q24.1; q21.1) ($n = 7$), ОМЛ с нормальным кариотипом ($n = 8$) и образцы неопухолевых патологий (НОП) ($n = 20$). Анализ уровней экспрессии миРНК-128, миРНК-150, миРНК-155, миРНК-26a, миРНК-181b, миРНК-29b, миРНК-20a, миРНК-223, миРНК-92a, миРНК-100, миРНК-126, миРНК-451a, миРНК-103a, миРНК-191 и миРНК-378 проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Общими статистически значимыми маркерами для дифференциации НОП от ОМЛ вне зависимости от кариотипа являются миРНК-50, миРНК-26a, миРНК-29b, миРНК-20a, миРНК-223, миРНК-126, миРНК-451a ($P < 0.05$). Уровни экспрессии миРНК-128 ($P = 0.020513$) и миРНК-155 ($P = 0.013986$) в образцах ОМЛ с наличием транслокации t(15; 17) (q24.1; q21.1) статистически достоверно отличаются от соответствующей экспрессии в образцах ОМЛ с нормальным кариотипом. Полученные результаты подтверждают наличие эпигенетической регуляции в развитии ОМЛ, однако исследуемые миРНК не попадают в область транслокации t(15; 17) (q24.1; q21.1), что свидетельствует о наличии более сложных и многоступенчатых путей регуляции развития ОМЛ.

Ключевые слова: микроРНК, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, t(15, 17) (q24.1, q21.1), PML-RARα

DOI: 10.31857/S0041377120050077

Гематологические злокачественные новообразования представляют собой совокупность заболеваний, происходящих из клеток костного мозга или лимфатической системы, и включающих лейкемии, лимфомы, миелодиспластические синдромы (МДС) и миелопролиферативные новообразования. В 2018 г. в России было зафиксировано более 2000 случаев ОМЛ (Александрова и др., 2019).

В настоящее время золотой стандарт диагностики ОМЛ включает комплексную оценку результатов морфологического анализа биоптатов костного мозга, цитогенетического исследования, иммунофенотипирования клеток костного мозга и анализа периферической крови. Важна оценка как качественных, так и количественных изменений клеток костного мозга. ОМЛ является гетерогенным заболеванием и может развиваться как *de novo*, так и на фоне МДС.

Международная классификация ВОЗ выделяет несколько подтипов ОМЛ, различающихся как по морфологии, так и по клиническим характеристикам (Arber et al., 2016). Одним из вариантов ОМЛ является подтип М3 – ОПЛ. Он возникает в результате сбалансированной реципрокной транслокации t(15; 17) (q24.1; q21.1) с участием хромосом 15 и 17, приводящей к образованию химерного гена *PML-RAR*α (De Thé et al., 1990). Обнаружены три различных тран-

Принятые сокращения: МДС – миелодиспластический синдром; НОП – неопухолевые патологии крови; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ОПЛ – острый промиелоцитарный лейкоз, ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ).

скрипта *PML-RARα* – L (long), S (short) и V (Gu et al., 2002). В редких случаях возможны слияния гена *RARα* с генами *PLZF*, *NPM1*, *NUMA1* и *STAT5B* (Redner, 2002). Изменения структуры гена *RARα* приводят к нарушению созревания миелоидных предшественников на промиелоцитарной стадии. На примере мышиной модели показано, что наличие перестройки *PML-RARα* способствует латентному течению заболевания и, видимо, для развития полноценного ОПЛ необходимы вторичные генетические и (или) эпигенетические изменения (Brown et al., 1997). К последним относится также изменение экспрессии миРНК – малых некодирующих РНК, которые участвуют в регулировке клеточного цикла, пролиферации, апоптоза.

Опубликовано множество работ, описывающих потенциальную роль миРНК в инициации и развитии опухолей различного генеза и, в частности, в гематологических злокачественных новообразованиях (Titov et al., 2016; Weiss et al., 2017). Так, например, миРНК-223 занимает ключевое место в миелопоэзе, ингибируя пролиферацию клеток и усиливая апоптоз в линиях клеток ОМЛ, а уровень экспрессии миРНК-223 снижается у пациентов с ОМЛ по сравнению с нормой (Xiao et al., 2016). МиРНК-26a регулирует клеточный цикл и стимулирует миелоидную дифференцировку клеток ОМЛ (Salvatori et al., 2011). МиРНК-92a является онкогеном и снижение уровня ее экспрессии способствует апоптозу в ОПЛ (Sharifi et al., 2014). Уровень экспрессии миРНК-451a значительно ниже у пациентов с ОМЛ по сравнению со здоровыми людьми, и низкие уровни экспрессии миРНК-451a предположительно способствуют плохому терапевтическому ответу у пациентов с ОМЛ (Krakowsky et al., 2018).

МиРНК-126 может выступать как в роли онкогена, так и в роли онкосупрессора, способствуя развитию ОМЛ (Li et al., 2015). Анализ данных из литературы показал, что уровень экспрессии миРНК-150 снижается в образцах пациентов ОМЛ с различными цитогенетическими аномалиями (Li et al., 2008). МиРНК-150 модулирует как эритроидную, так и моноцитарную дифференцировку, а также участвует в лимфопоэзе (Zhou et al., 2007; Lu et al., 2008; Morris et al., 2013). Учитывая важную роль миРНК-150 в нормальном кроветворении, неудивительно, что изменения уровней экспрессия миРНК-150 часто наблюдаются при различных типах гематопоэтических злокачественных новообразований, включая ОМЛ (He et al., 2014). Анализ данных из литературы позволяет сформировать панель миРНК дифференциально экспрессирующихся при ОМЛ: миРНК-128, миРНК-150, миРНК-155, миРНК-26a, миРНК-181b, миРНК-29b, миРНК-20a, миРНК-223, миРНК-92a, миРНК-100, миРНК-126, миРНК-451a, миРНК-103a, миРНК-191 и миРНК-378, однако о роли миРНК при ОПЛ опубликованы лишь единичные исследования (Trino et al., 2018).

Несмотря на прогресс в развитии новых подходов к лечению ОМЛ, большая часть пациентов по-прежнему рецидивируют и умирают после непродолжительной ремиссии (Burnett et al., 2011). Понимание генетических механизмов развития и прогрессирования ОМЛ позволит максимально персонализировать проводимую терапию.

Целью работы является анализ дифференциальной экспрессии миРНК при развитии ОМЛ в зависимости от цитогенетических характеристик опухоли. Основной задачей представленной работы является сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК-128, миРНК-150, миРНК-155, миРНК-26a, миРНК-181b, миРНК-29b, миРНК-20a, миРНК-223, миРНК-92a, миРНК-100, миРНК-126, миРНК-451a в образцах ОМЛ с транслокацией t(15; 17) (q24.1; q21.1) и в образцах ОМЛ с нормальным кариотипом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В исследование включено 15 случаев ОМЛ *de novo*, включая 7 пациентов с диагнозом ОМЛ с наличием транслокации t(15; 17) (q24.1; q21.1) и 8 пациентов с диагнозом ОМЛ с нормальным кариотипом, а также 20 образцов с неопухолевыми патологиями крови (НОП). В работе использованы цитологические препараты, представляющие собой мазки костного мозга. На исследование было получено разрешение комиссии по этике медицинских исследований Новосибирского государственного медицинского университета Минздрава РФ. Все первичные данные пациентов были обезличены в соответствии с требованиями законодательства РФ.

Экстракция РНК. Выделение нуклеиновых кислот из образцов проводили с использованием набора реагентов “РеалБест экстракция 100” (АО ВекторБест, Россия). Смыв материала костного мозга, нанесенного на предметное стекло, осуществлялся 600 мкл лизирующего гуанидинового буфера. Ткань в растворе интенсивно перемешивали в термошейкере TS-20 (Biosan, Латвия) в течение 15 мин при температуре 65°C. Далее раствор центрифугировали 2 мин при 10000 об./мин (ротор угловой F-45-12-11; MiniSpin Eppendorf, Германия) и переносили супернатант в новые пробирки, добавляя к нему равный объем изопропанола и 10 мкл суспензии магнитных частиц. Затем перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. На следующем этапе выделения проводили центрифугирование в течение 10 мин при 13000 об./мин (ротор угловой F-45-12-11; MiniSpin Eppendorf, Германия), супернатант сливали, а осадок промывали с помощью 500 мкл 70%-ного этанола, а затем 300 мкл ацетона. Полученный осадок высушивали и растворяли в 200 мкл элюирующего раствора. Концентрацию тотальной РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Концентрация РНК выделенных препаратов находилась в диапазоне 25.6–153.6 нг/мкл.

Обратная транскрипция (ОТ). Реакцию ОТ для получения кДНК проводили в объеме 30 мкл. Использовали готовые реакционные смеси “РеалБест Мастер микс ОТ” (АО Вектор-Бест, Россия). Реакция ОТ содержала: 3 мкл выделенной РНК, 16.2 мкл 40%-ного раствора трегалозы, 3 мкл 10-кратного буферного раствора для обратной транскрипции, 3 мкл 4 мМ раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов, 3 мкл 10%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0.32 мкл обратной транскриптазы (АО Вектор-Бест, Россия), 1.5 мкл 10 мкМ раствора соответствующего праймера для обратной транскрипции. Все олигонуклеотиды были синтезированы в АО Вектор-Бест, Россия. Олигонуклеотиды разработаны с использование PrimerQuest online сервиса (http://eu.idtdna.com/). Полученную реакционную смесь, содержащую кДНК, в объеме 3 мкл сразу использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР в реальном времени на приборе CFX 96 (Bio-Rad, США).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Измерение уровней экспрессии миРНК методом ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Реакцию проводили в объеме 30 мкл: 3 мкл полученной кДНК, 14 мкл H_2O, 3 мкл 10-кратного буфера для ПЦР (АО Вектор-Бест, Россия), 3 мкл 4 мМ раствора дезоксинуклеозидтрифосфатов, 3 мкл 10%-ного раствора BSA, 1 мкл Taq-полимеразы (АО Вектор-Бест, Россия) в комплексе с моноклональными антителами к ее активному центру (Clontech, США), 3 мкл раствора прямого и 5 мкМ обратного праймера и 2.5 мкМ зонда. Системы праймеров и зондов разработаны компанией АО Вектор-Бест и эффективность реакции составляла 90–100%. Анализ полученных данных пороговых циклов ПЦР в реальном времени проводили методом $2(-\Delta Ct)$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Статистическую обработку полученных данных проводили на основе непараметрического коэффициента Манна–Уитни с использованием программного обеспечения STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc., США). При значении $p < 0.05$ разницу считали статистически достоверной.

РЕЗУЛЬТАТЫ

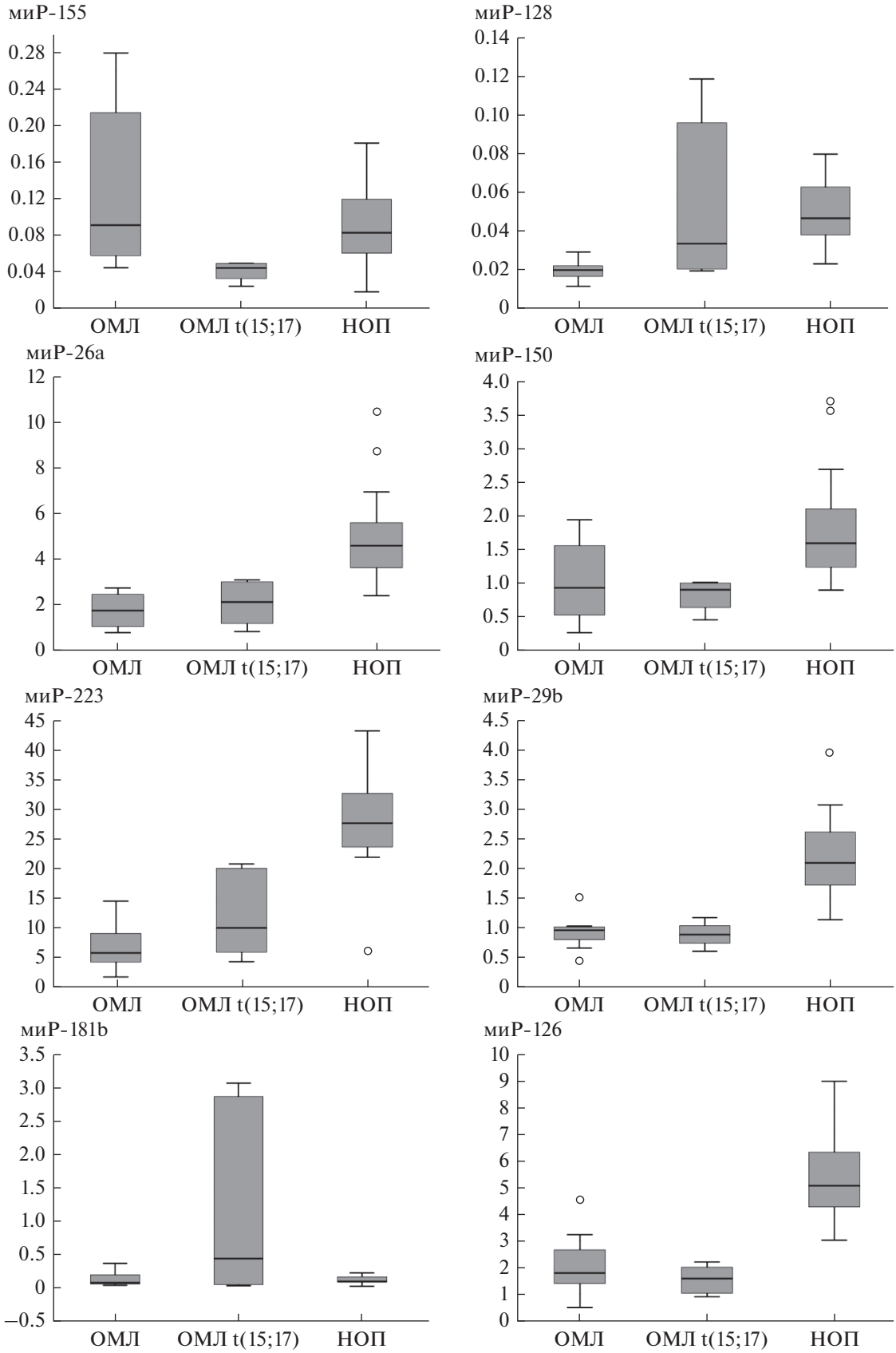
Выбор нормализатора для анализа ПЦР в реальном времени. Для количественного анализа уровней экспрессии микроРНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени необходимо выбрать референсный ген. Если референсный ген будет варьировать внутри опухоли, то это будет вносить вклад в конечный результат. Таким образом, некорректный выбор референсного гена может быть одним из факторов несогласованности данных между различными исследованиями. Существуют работы по анализу уровней экспрессии миРНК с нормализацией на известные в литературе референсные гены без проверки стабильности экспрессии в интересующих образцах, в частности на малые ядерные РНК. Однако в более поздних работах показано, что уровни экспрессии малых ядерных РНК также варьируют при раке и теперь все чаще уделяется внимание тому, что ни один ген не является универсальным и пригодным для всех типов клеток и во всех экспериментальных условиях (Lou et al., 2015).

Для выбора нормализатора мы использовали алгоритм geNorm, позволяющий выявить наиболее стабильные гены из списка кандидатов, измеренных в исследуемых образцах (Vandesompele et al., 2002). Методом ОТ-ПЦР в реальном времени в 15 образцах ОМЛ и 20 образцах НОП измерены относительные уровни экспрессии миРНК-128, миРНК-150, миРНК-155, миРНК-26a, миРНК-181b, миРНК-29b, миРНК-20a, миРНК-223, миРНК-92a, миРНК-100, миРНК-126, миРНК-451a, миРНК-103a, миРНК-191 и миРНК-378. С помощью алгоритма geNorm проведена оценка оптимального числа наиболее стабильно выраженных референсных генов. Этот алгоритм ранжирует анализируемые гены по значению относительной стабильности экспрессии. В качестве нормализатора рекомендуется использовать среднее геометрическое как минимум трех самых стабильных генов. Наиболее оптимальным нормализатором в данном исследовании является среднее геометрическое из пороговых циклов флуоресценции трех миРНК: миРНК-103a, миРНК-191 и миРНК-378.

Сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК в образцах ОМЛ с наличием транслокации t (15; 17) (q24.1; q21.1) и в образцах ОМЛ с нормальным кариотипом. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени проанализированы уровни экспрессии миРНК-128, миРНК-150, миРНК-155, миРНК-26a, миРНК-181b, миРНК-29b, миРНК-20a, миРНК-223, миРНК-92a, миРНК-100, миРНК-126, миРНК-451a в 7 образцах ОМЛ с наличием транслокации t(15; 17) (q24.1; q21.1) и в 8 образцах ОМЛ с нормальным кариотипом. Распределение относительных уровней экспрессии панели миРНК, включая значение медианы и межквартильный диапазон, представлено на рис. 1.

Мы наблюдаем увеличение уровней экспрессии миРНК-128, миРНК-26a, миРНК-181b, миРНК-20a, миРНК-223, миРНК-92a, миРНК-100 и снижение уровней экспрессии миРНК-150, миРНК-155, миРНК-29b, миРНК-126, миРНК-451a в подгруппе образцов ОМЛ с наличием транслокации t(15; 17) (q24.1; q21.1) в сравнении с подгруппой ОМЛ с нормальным кариотипом. Наибольшие по размаху различия, более чем в 5 раз, получены для миРНК-181b и миРНК-100, однако статистически достоверные различия уровней экспрессии зафиксированы лишь в случае миРНК-128 ($P = 0.020513$) и миРНК-155 ($P = 0.013986$) (табл. 1).

Сравнительный анализ образцов ОМЛ и НОП по уровню экспрессии миРНК. Сравнивали относительные уровни экспрессии тех же миРНК (128, 150, 155,


миР-155
0.28
0.24
0.20
0.16
0.12
0.08
0.04
0
ОМЛ
ОМЛ t(15;17)
НОП
миР-128
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0
ОМЛ
ОМЛ t(15;17)
НОП
миР-26a
12
10
8
6
4
2
0
ОМЛ
ОМЛ t(15;17)
НОП
миР-150
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
ОМЛ
ОМЛ t(15;17)
НОП
миР-223
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
ОМЛ
ОМЛ t(15;17)
НОП
миР-29b
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
ОМЛ
ОМЛ t(15;17)
НОП
миР-181b
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
–0.5
ОМЛ
ОМЛ t(15;17)
НОП
миР-126
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ОМЛ
ОМЛ t(15;17)
НОП

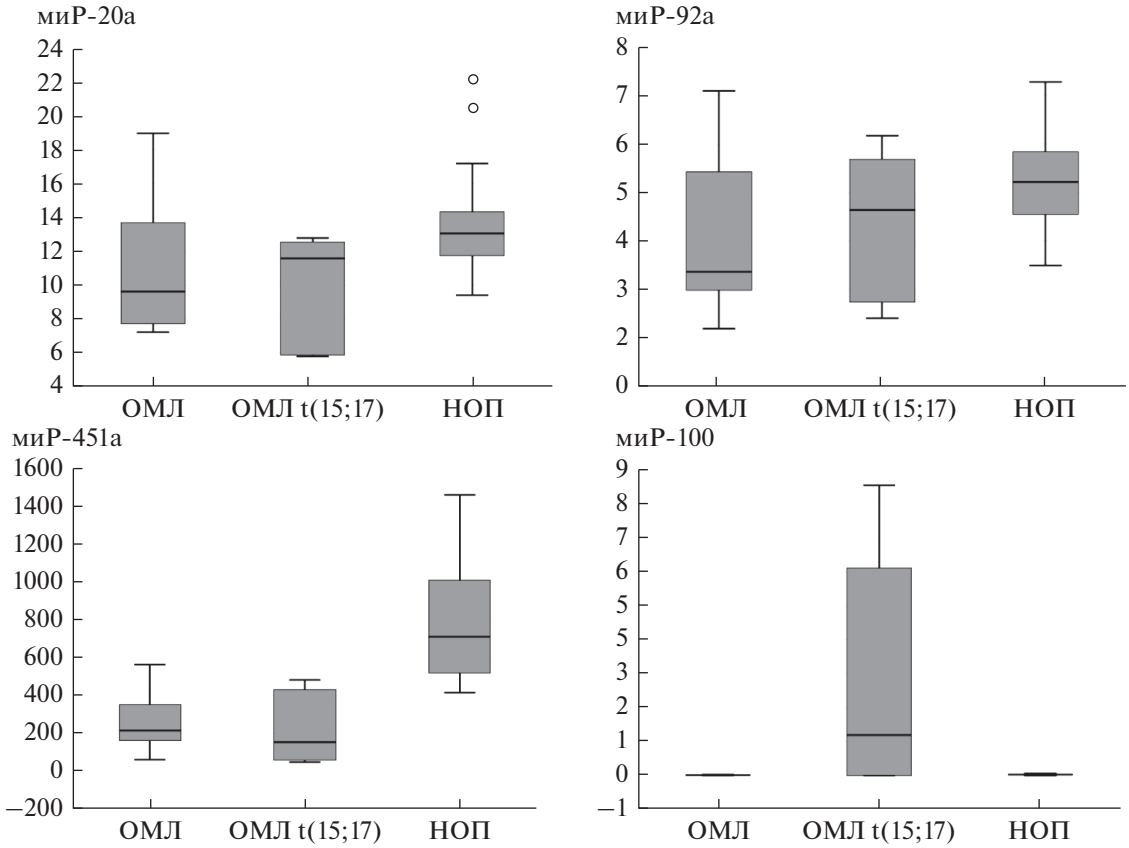


Рис. 1. Относительные уровни экспрессии панели дифференциально экспрессированных миРНК (миР) (миР-155, миР-128, миР-26а, миР-150, миР-223, миР-29b, миР-181b, миР-126, миР-20а, миР-92а, миР-451а, миР-100) в образцах от пациентов с острым миелоцитарным лейкозом (ОМЛ) с нормальным кариотипом, в образцах ОМЛ с наличием транслокации t (15; 17) (q24.1; q21.1) (ОПЛ t(15; 17)) и в образцах неопухолевых патологий (НОП). *Горизонтальная черная линия в пределах бокса* – медиана, *бокс* – межквартильный диапазон, *вертикальные отрезки* – диапазон без выбросов, выбросы обозначены *кружками*. Статистическая значимость оценивается по критерию Манна–Уитни, значение $P < 0.05$ является статистически значимым. Значения P представлены в табл. 1.

26a, 181b, 29b, 20a, 23, 92a, 100, 126, 451a) в образцах ОПЛ с различным кариотипом и в образцах НОП. Результаты показаны на рис. 1. Сравнение уровней экспрессии миРНК в образцах ОПЛ с нормальным кариотипом и в образцах НОП показало снижение экспрессии миРНК-128, миРНК-150, миРНК-26а, миРНК-181b, миРНК-29b, миРНК-20а, миРНК-223, миРНК-92а, миРНК-100, миРНК-126, миРНК-451а. Уровень экспрессии миРНК-155 не изменился. Однако статистически достоверные различия получены лишь для миРНК-128, миРНК миРНК-150, миРНК-26а, миРНК-29b, миРНК-20а, миРНК-223, миРНК-92а, миРНК-126, миРНК-451а ($P < 0.05$).

Сравнительный анализ панели миРНК образцов ОМЛ с наличием транслокации t(15; 17) (q24.1; q21.1) с образами НОП показал снижение уровней экспрессии миРНК-128, миРНК-150, миРНК-155, миРНК-26а, миРНК-29b, миРНК-20а, миРНК-223, миРНК-92а, миРНК-126, миРНК-451а и увеличение уровней экспрессии миРНК-181b и миРНК-100. Однако статистически достоверные различия получены лишь для миРНК-155, миРНК-150, миРНК-26а, миРНК-29b, миРНК-20а, миРНК-223, миРНК-126, миРНК-451а ($P < 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

ОМЛ является гетерогенным заболеванием в морфологическом, цитогенетическом и прогностическом плане. В соответствии с классификацией ВОЗ 2016 г. анализ молекулярных и цитогенетических особенностей является важным диагностическим критерием ОМЛ (Arber et al., 2016). Помимо генетических изменений при ОМЛ детектируются различные эпигенетические модификации, включая вариабельность уровней экспрессии миРНК (Trino et al., 2018).

Сравнительный анализ уровней экспрессии панели из 12 миРНК показал тенденцию к снижению экспрессии миРНК-128, миРНК-150, миРНК-26а, миРНК-29b, миРНК-20а, миРНК-223, миРНК-92а, миРНК-126, миРНК-451а в образцах ОМЛ по срав-

Таблица 1. Результаты статистического анализа данных, полученных при сравнительном анализе относительных уровней экспрессии миРНК между подгруппами ОМЛ, ОМЛ с наличием транслокации t(15; 17) (q24.1; q21.1) и НОП

миРНК	ОМЛ *vs* ОМЛ t(15;17)	ОМЛ *vs* НОП	ОМЛ *t*(15;17) *vs* НОП
128	**0.020513**	**0.000001**	0.464000
150	0.694328	**0.018326**	**0.000068**
155	**0.013986**	0.708636	**0.007680**
26a	0.612587	**0.000003**	**0.000009**
181b	0.189277	0.468804	0.145482
29b	0.778866	**0.000003**	**0.000005**
20a	0.866511	**0.037521**	**0.009315**
223	0.189277	**0.000043**	**0.000554**
92a	0.866511	**0.042843**	0.161846
100	0.280963	0.055295	0.263455
126	0.535820	**0.000062**	**0.000002**
451a	0.535820	**0.000062**	**0.000027**

Примечание. В таблице представлены значения статистической величины *P*. Значение $P < 0.05$ считается статистически значимым (выделено жирным шрифтом). Использован непараметрический коэффициент Манна–Уитни.

нению с НОП. Общими статистически значимыми маркерами для дифференциации НОП от ОМЛ вне зависимости от кариотипа являются миРНК-150, миРНК-26a, миРНК-29b, миРНК-20a, миРНК-223, миРНК-126, миРНК-451a ($P < 0.05$). Ожидается, что при увеличении исследуемой выборки диапазон значений для миРНК-128 и миРНК-92a позволит достигнуть статуса статистически значимых результатов. Стоит отметить, что уровень экспрессии миРНК-128 статистически достоверно повышен в образцах ОМЛ с наличием транслокации t(15; 17) в сравнении с ОМЛ с нормальным кариотипом ($P = 0.020513$), что согласуется с ранее опубликованными результатами (Trino et al., 2018).

МиРНК может выполнять роль как онкогена, так и онкосупрессора в зависимости от функции гена-мишени, который она регулирует. В частности, миРНК-155 может участвовать как в развитии миелопролиферативных заболеваний, так и способствовать апоптозу клеток костного мозга (O'Connell et al., 2008; Palma et al., 2014). В представленной работе зафиксированы статистически достоверные различия по уровню экспрессии миРНК-155 между подгруппами ОМЛ с различным кариотипом, а также в сравнении с НОП ($P < 0.05$). Эти результаты подчеркивают важную роль миРНК-128 и миРНК-155 в развитии миелопролиферативных заболеваний.

Метилирование ДНК является важной эпигенетической модификацией в патогенезе ОМЛ. По данным из литературы миРНК-29b непосредственно регулирует гены *DNMT3*A и *DNMT3*B и косвенно ген *DNMT1*, что приводит к гипометилированию ДНК (Garzon et al., 2009). Повышенный уровень экспрессии миРНК-29b в клетках ОМЛ приводит к снижению глобального метилирования. Мы не наблюдаем значительных различий между уровнями экспрессии миРНК-29b в подгруппах ОМЛ с различным кариотипом, однако существует статистически достоверное снижение уровня экспрессии миРНК-29b в ОМЛ по сравнению с неопухолевыми патологиями ($P < 0.05$), что, безусловно, свидетельствует о роли повышения уровня метилирования в развитии заболевания.

В ряде исследований показана корреляция уровней экспрессии миРНК с цитогенетическими подтипами ОМЛ. В частности, уровень экспрессии миРНК-27a, миРНК-126, миРНК-150 и миРНК-223 значительно выше в ОМЛ с наличием транслокации t(8; 21) в сравнении с ОМЛ с транслокацией t(15; 17). В то же время уровень экспрессии миРНК-100 повышен более чем в 10 раз при наличии перестройки t(15; 17), чем при любом другом цитогенетическом подтипе ОМЛ (Trino et al., 2018). Предполагается, что высокий уровень экспрессии миРНК-100 может нарушать контроль клеточного цикла, способствовать пролиферации клеток и, следовательно, способствовать развитию ОМЛ (Bai et al., 2012; Zheng et al., 2012). В представленной работе мы также наблюдаем значительное увеличение уровня экспрессии миРНК-100 в образцах ОМЛ с наличием транслокации t(15; 17) в отличие от ОМЛ с нормальным кариотипом.

ОПЛ характеризуется специфическими хромосомными транслокациями с участием гена *RAR*α. Наиболее частая транслокация связывает *RAR*α с *PML* и вызывает блокирование дифференцировки. Лечение ОПЛ отличается от терапии других форм ОМЛ с использованием специфического препарата ATRA (полностью транс-ретиноевой кислоты – all-trans retinoic acid) в сочетании с триоксидом мышьяка, которые способствуют стимуляции дифференцировки опухолевых бластных клеток до уровня развитию зрелых гранулоцитов. ATRA способствует подавлению ОПЛ (*PML-RAR*α) и изменению уровней экспрессии миРНК: уровни экспрессии миРНК-15b, миРНК-223 и миРНК-342 повышаются, тогда как уровни экспрессии миРНК-181a/181b снижаются. Кроме того, опубликован список из 65 миРНК с предсказанными сайтами связывания с *PML-RAR*α, включая миРНК-100 и миРНК-29b (Saumet et al., 2009).

Мы наблюдаем тенденцию к увеличению уровня экспрессии миРНК-181b в образцах ОМЛ t(15; 17) в сравнении с ОМЛ с нормальным кариотипом, а также по отношению к неопухолевым патологиям. Однако статистически достоверных результатов различия уровней экспрессии миРНК-100 и миРНК-181b при сравнении ОМЛ и НОП мы не получили. Возможно, это следствие небольшой выборки исследуемых образцов. В комплексе с нашими результатами

миРНК-181 и миРНК-100 являются перспективными объектами для исследования фундаментальных основ развития ОПЛ с транслокацией t(15; 17).

Таким образом, полученные статистически достоверные различия между ОМЛ и НОП по уровням экспрессии миРНК подтверждают наличие эпигенетической регуляции в развитии ОМЛ, однако исследуемые миРНК не попадают в область транслокации t(15; 17) (q24.1; q21.1), что свидетельствует о наличии более сложных и многоступенчатых путей регуляции развития ОМЛ. Анализ данных литературы показывает частичное перекрытие в профиле миРНК в исследованиях разных авторов, и это, вероятно, связано с использованием различных реактивов, с типом и качеством выборки, или с методом статистической обработки полученных данных. Увеличение выборки исследуемых образцов позволит расширить наши представления об этих взаимосвязях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-34-60024), а также федерального бюджета на выполнение государственного задания (№ 0310-2019-0003).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено с разрешения комиссии по этике медицинских исследований Новосибирского государственного медицинского университета Минздрава РФ. Все первичные данные пациентов были обезличены в соответствии с требованиями законодательства РФ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Александрова Г.А., Голубев Н.А., Тюрина Е.М., Огрызко Е.В., Залевская О.В., Авдеева Л.Н. 2019. Социально значимые заболевания населения России в 2018 г. В кн.: Статистические материалы. М. 73 с. (*Alexandrova G.A., Golubev N.A., Tyurina E.M., Ogryzko E.V., Zalevskaya O.V., Avdeeva L.N.* (2019). Socially significant diseases of the Russian population in 2018. Statistical Materials. M. 73 pp.)

Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., Bloomfield C.D., Cazzola M., Vardiman J.W. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. V. 127. P. 2391.

Bai J., Guo A., Hong Z., Kuai W. 2012. Upregulation of microRNA-100 predicts poor prognosis in patients with pediatric acute myeloid leukemia. Onco Targets Ther. V. 5. P. 213.

Brown D., Kogan S., Lagasse E., Weissman I., Alcalay M., Pelicci P.G., Atwater S., Bishop J.M. 1997. A *PMLRAR*α transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 94. P. 2551.

Burnett A., Wetzler M., Löwenberg B. 2011. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. J. Clin. Oncol. V. 29. P. 487.

De Thé H., Chomienne C., Lanotte M., Degos L., Dejean A. 1990. The t(15; 17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. Nature. V. 347. P. 558.

Garzon R., Liu S., Fabbri M., Liu Z., Heaphy C.E., Callegari E., Schwind S., Pang J., Yu J., Muthusamy N., Havelange V., Volinia S., Blum W., Rush L.J., Perrotti D., Andreeff M., Bloomfield C.D., Byrd J.C., Chan K., Wu L.C., Croce C.M., Marcucci G. 2009. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly *DNMT3A* and *3B* and indirectly *DNMT1*. Blood. V. 113. P. 6411.

Gu B.W., Xiong H., Zhou Y., Chen B., Wang L., Dong S., Yu Z.Y., Lu L.F., Zhong M., Yin H.F., Zhu G.F., Huang W., Ren S.X., Gallagher R.E., Waxman S., Chen G.Q., Wang Z.G., Chen Z., Fu G., Chen S.J. 2002. Variant-type *PML-RAR(alpha)* fusion transcript in acute promyelocytic leukemia: use of a cryptic coding sequence from intron 2 of the *RAR*(*alpha*) gene and identification of a new clinical subtype resistant to retinoic acid therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 99. P. 7640.

He Y., Jiang X., Chen J. 2014. The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis. Oncogene. V. 33. P. 3887.

Krakowsky R.H.E., Wurm A.A., Gerloff D., Katzerke C., Bräuer-Hartmann D., Hartmann J.U., Wilke F., Thiede C., Müller-Tidow C., Niederwieser D., Behre G. 2018. miR-451a abrogates treatment resistance in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia. Blood Cancer J. V. 8. P. 36.

Li Z., Chen P., Su R., Li Y., Hu C., Wang Y., Arnovitz S., He M., Gurbuxani S., Zuo Z., Elkahloun A.G., Li S., Weng H., Huang H., Neilly M.B., Wang S. et al. 2015. Overexpression and knockout of miR-126 both promote leukemogenesis. Blood. V. 126. P. 2005.

Li Z., Lu J., Sun M.,Mi S., Zhang H., Luo R.T., Chen P., Wang T., Yan M., Qian Z., Neilly M.B., Jin J., Zhang Y., Bohlander S.K., Zhang D-Er. et al. 2008. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 105. P. 15535.

Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCt method. Methods. V. 25. P. 402.

Lou G., Ma N., Xu Y., Jiang L., Yang J., Yang J., Wang C., Jiao J., Gao X. 2015. Differential distribution of U6 (RNU6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for microRNA quantification. Int. J. Mol. Med. V. 36. P. 1400.

Lu J., Guo S., Ebert B.L., Zhang H., Peng X. Bosco J., Pretz J., Schlanger R., Wang J.Y., Mak R.H., Dombkowski D.M., Preffer F.I., Scadden D.T., Golub T.R. 2008. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. Dev. Cell. V. 14. P. 843.

Morris V.A., Zhang A., Yang T., Stirewalt D.L., Ramamurthy R., Meshinchi S., Oehler V.G. 2013. MicroRNA-150 expression induces myeloid differentiation of human acute leukemia cells and normal hematopoietic progenitors. PLoS One. V. 8. e75815.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075815

O'Connell R.M., Rao D.S., Chaudhuri A.A., Boldin M.P., Taganov K.D., Nicoll J., Paquette R.L., Baltimore D. 2008. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic

stem cells causes a myeloproliferative disorder. J. Exp. Med. V. 205. P. 585.

Palma C.A., A Sheikha D., Lim T.K., Bryant A., Vu T.T., Jayaswa V., Ma D.D. 2014. MicroRNA-155 as an inducer of apoptosis and cell differentiation in acute myeloid leukaemia. Mol. Cancer. V. 13. P. 79.

Redner R.L. 2002. Variations on a theme: The alternate translocations in APL. Leukemia. V. 16. P. 1927.

Salvatori B., Iosue I., Djodji Damas N., Mangiavacchi A., Chiaretti S., Messina M., Padula F., Guarini A., Bozzoni I., Fazi F., Fatica A. 2011. Critical role of c-Myc in acute myeloid leukemia involving direct regulation of miR-26a and histone methyltransferase EZH2. Genes Cancer. V. 2. P. 585.

Saumet A.,Vetter G., Bouttier M., Portales-Casamar E., Wasserman W., Maurin T., Mari B., Barbry P., Valla L., Friederich E., Arar K., Cassinat B., Chomienne C., Lecellier C.H. 2009. Transcriptional repression of microRNA genes by *PML-RARA* increases expression of key cancer proteins in acute promyelocytic leukemia. Blood. V. 113. P. 412.

Sharifi M., Salehi R., Gheisari Y., Kazemi M. 2014. Inhibition of microRNA miR-92a induces apoptosis and necrosis in human acute promyelocytic leukemia. Adv. Biomed. Res. V. 3. P. 61.

Titov S.E., Ivanov M.K., Karpinskaya E.V., Tsivlikova E.V., Shevchenko S.P., Veryaskina Y.A., Akhmerova L.G., Poloz T.L., Klimova O.A., Gulyaeva L.F., Zhimulev I.F., Kolesnikov N.N. 2016. MiRNA profiling, detection of BRAF V600E mutation and RET-PTC1 translocation in patients from Novosibirsk oblast (Russia) with different types of thyroid tumors. BMC Cancer. V. 16. P. 201.

Trino S., Lamorte D., Caivano A., Laurenzana I., Tagliaferri D., Falco G., Del Vecchio L., Musto P., De Luca L. 2018. MicroRNAs as new biomarkers for diagnosis and prognosis, and as potential therapeutic targets in acute myeloid leukemia. Int. J. Mol. Sci. V. 19. P. 460.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. V. 3. http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.

Weiss C.N., Ito K. 2017. A Macro View of MicroRNAs: The Discovery of microRNAs and their role in hematopoiesis and hematologic disease. Int. Rev. Cell Mol. Biol. V. 334. P. 99.

Xiao Y., Su C., Deng T. 2016. miR-223 decreases cell proliferation and enhances cell apoptosis in acute myeloid leukemia via targeting *FBXW7*. Oncol. Lett. V. 12. P. 3531.

Zheng Y.S., Zhang H., Zhang X.J., Feng D.D., Luo X.Q., Zeng C.W., Lin K.Y., Zhou H., Qu L.H., Zhang P., Chen Y.Q. 2012. MiR-100 regulates cell differentiation and survival by targeting *RBSP3*, a phosphatase-like tumor suppressor in acute myeloid leukemia. Oncogene. V. 31. P. 80.

Zhou B., Wang S., Mayr C., Bartel D.P., Lodish H.F. 2007. MiR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 104. P. 7080.

PROFILING KARYOTYPE-DEPENDENT PATTERNS OF miRNA EXPRESSION IN ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA

Yu. A. Veryaskina[a, b, *], S. E. Titov[b, c], M. M. Agakishiev[d], A. V. Zabela[d], V. S. Selivanov[d], S. P. Melikhov[d], I. B. Kovynev[d], T. I. Pospelova[d], and I. F. Zhimulev[b]

[a] *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

[b] *Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

[c] *JSC Vector-Best, Novosibirsk, 630117 Russia*

[d] *Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health, Novosibirsk, 630091 Russia*

**e-mail: microrna@inbox.ru*

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a subtype of acute myeloid leukemia (AML), with a balanced reciprocal translocation t(15; 17) (q24.1; q21.1) detected in most cases. Acute leukemia progression is accompanied by the occurrence of genetic and epigenetic modifications, including microRNA. The aim of the work is to analyze the role of differential miRNA expression in AML, depending on the cytogenetic properties of tumor cells. The study used cytological specimens containing bone marrow smears: AML with t(15; 17) (q24.1; q21.1) ($n = 7$), normal-karyotype APL ($n = 8$) and benign tumors (BT) ($n = 20$). Analysis of expression levels of miR-128, miR-150, miR-155, miR-26a, miR-181b, miR-29b, miR-20a, miR-223, miR-92a, miR-100, miR-126, miR-451, miR-103a, miR-191, and miR-378 was performed by RT-qPCR. The markers differentiating between BT and AML, no matter which karyotype, are miR-150, miR-26a, miR-29b, miR-20a, miR-223, miR-126, and miR-451a ($P < 0.05$). Expression levels of miR-128 ($P = 0.020513$) and miR-155 ($P = 0.013986$) are statistically different between AML with t(15; 17) (q24.1; q21.1) and normal-karyotype AML. The results obtained confirm the epigenetic regulation of AML; however, the miRNAs in question lie beyond t(15; 17) (q24.1; q21.1), suggesting the presence of more complex, staged regulatory pathways underlying AML.

Keywords: microRNA, acute promyelocytic leukemia, acute myeloid leukemia, t(15, 17) (q24.1, q21.1), *PML-RARα*