

Оценка метилирования генов *MIR-143* и *MIR-145* в лимфоузлах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Е.Н. Воропаева^{1, 2}, Т.И. Поспелова², М.И. Чуркина², А.М. Нестерец¹, О.В. Березина², Н.В. Скворцова², Т.А. Агеева², В.Н. Максимов^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Экспрессия онкосупрессорных микроРНК miR-143 и miR-145 наблюдается во всех типах изученных нормальных тканей и, по данным многочисленных исследований, утрачивается при злокачественных новообразованиях. Описано снижение экспрессии данных микроРНК при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ), механизмы которого требуют дополнительного изучения.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я . Оценить метилирование генов *MIR-143* и *MIR-145* в ткани лимфоузлов больных ДВККЛ и лимфоузлов пациентов с реактивной фолликулярной гиперплазией.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . В исследование включили биоптаты 14 фиксированных формалином и парафинизированных опухолевых лимфоузлов пациентов с ДВККЛ и 11 лимфоузлов больных с реактивной лимфоаденопатией. Определение статуса метилирования гена *MIR-145* в образцах проводили методом метил-специфичной полимеразной цепной реакции. Для количественной оценки метилирования гена *MIR-143* использовалось прямое бисульфитное секвенирование по Сенгеру.

Р е з у л ь т а т ы . Было установлено, что все исследованные образцы, как реактивные, так и опухолевые, имели метилирование гена *MIR-145*. Во всех образцах реактивной ткани лимфоузлов был зарегистрирован монотонный уровень метилирования CpG-динуклеотидов гена *MIR-143*, тогда как опухолевые образцы демонстрировали большую гетерогенность. В образцах ДВККЛ, а именно подтипа из клеток посттерминального происхождения, средний уровень метилирования изученного фрагмента последовательности гена *MIR-143* был значительно ниже, чем в образцах реактивных лимфоузлов ($p = 0.026$).

З а к л ю ч е н и е . Выявляемое в лимфоузлах больных ДВККЛ метилирование генов *MIR-143* и *MIR-145* не является опухоль-специфичным. Сложный клеточный состав анализируемых образцов, а также различная плотность микрососудов могут объяснять различия в уровне метилирования *MIR-143* в ткани реактивных и опухолевых лимфоузлов.

Ключевые слова: лимфома, метилирование, микроРНК, ген *MIR-143*, ген *MIR-145*.

Образец цитирования: Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Чуркина М.И., Нестерец А.М., Березина О.В., Скворцова Н.В., Агеева Т.А., Максимов В.Н. Оценка метилирования генов *MIR-143* и *MIR-145* в лимфоузлах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой // Journal of Siberian Medical Sciences. 2023;7(3):94-108. DOI: 10.31549/2542-1174-2023-7-3-94-108

Поступила в редакцию 26.04.2023
Прошла рецензирование 26.05.2023
Принята к публикации 16.06.2023

Автор, ответственный за переписку

Воропаева Елена Николаевна: Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины. 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1.
E-mail: vena.81@mail.ru

Received 26.04.2023
Revised 26.05.2023
Accepted 16.06.2023

Corresponding author

Elena N. Voropaeva: Research Institute of Internal and Preventive Medicine, 175/1, B. Bogatkova str., Novosibirsk, 630089, Russia.
E-mail: vena.81@mail.ru

Evaluation of *MIR-143* and *MIR-145* genes methylation in lymph nodes of patients with diffuse large B-cell lymphoma

E.N. Voropaeva¹, T.I. Pospelova², M.I. Churkina², A.M. Nesterets¹, O.V. Berezina², N.V. Skvortsova², T.A. Ageeva², V.N. Maksimov¹

¹Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . The expression of miR-143 and miR-145 oncosuppressive microRNAs is observed in all types of normal tissues studied and, according to numerous studies, it is lost in malignant neoplasms. A decrease in the expression of these microRNAs in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is described, the mechanisms of which require additional study.

A i m . To evaluate the methylation of *MIR-143* and *MIR-145* genes in the lymph node tissue of patients with DLBCL and lymph nodes of patients with reactive follicular hyperplasia.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . The study included biopsies of 14 formalin-fixed and paraffinized tumor lymph nodes of patients with DLBCL and 11 lymph nodes of patients with reactive lymphadenopathy. The methylation status of the *MIR-145* gene in samples was determined by the method of methyl-specific polymerase chain reaction. Direct bisulfite sequencing based on the Sanger method was used to quantify the methylation of the *MIR-143* gene.

R e s u l t s . It was found that all the studied samples, both reactive and tumor, had methylation of the *MIR-145* gene. A similar level of methylation of CpG dinucleotides of the *MIR-143* gene was registered in all samples of reactive lymph node tissue, whereas tumor samples showed greater heterogeneity. In the samples of DLBCL, namely a non-germinal B cell phenotype, the average level of methylation of the studied fragment of the *MIR-143* gene sequence was significantly lower, than in the samples of reactive lymph nodes ($p = 0.026$).

C o n c l u s i o n . The methylation of *MIR-143* and *MIR-145* genes detected in the lymph nodes of patients with DLBCL is not tumor-specific. The complex cellular composition of the analyzed samples, as well as the different density of microvessels, may explain the differences in the level of *MIR-143* methylation in the tissue of reactive and tumor lymph nodes.

Keywords: lymphoma, methylation, microRNA, *MIR-143* gene, *MIR-145* gene.

Citation example: Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Churkina M.I., Nesterets A.M., Berezina O.V., Skvortsova N.V., Ageeva T.A., Maksimov V.N. Evaluation of *MIR-143* and *MIR-145* genes methylation in lymph nodes of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2023;7(3):94-108. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-7-3-94-108

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК представляют собой короткие одноцепочечные молекулы длиной 18–24 нуклеотида, которые связываются с 3'-нетранслируемыми участками мишеней матричной РНК и подавляют таким образом трансляцию или вызывают их деградацию [1].

Некоторые микроРНК находятся в полицистронных кластерах и обычно регулируются одним промотором. Каждый кластер может охватывать от 100 до 1000 нуклеотидов и содержать от двух до нескольких десятков микроРНК. Так, гены онкосупрессорных микроРНК *MIR-143* и *MIR-145* образуют бицистронный кластер на 5q33.1 участке хромосомы и подвергаются ко-экспрессии [1]. Вместе с тем недавно было

INTRODUCTION

MicroRNAs are short single-stranded molecules with a length of 18–24 nucleotides that bind to 3'-untranslated regions of messenger RNA targets and thus suppress translation or cause their degradation [1].

Some microRNAs are located in polycistronic clusters and are usually regulated by a single promoter. Each cluster can span from 100 to 1000 nucleotides and contain from two to several dozen microRNAs. Thus, the genes of oncosuppressive microRNAs *MIR-143* and *MIR-145* form a bicistronic cluster on the chromosome 5q33.1 region and undergo co-expression [1]. However, it has recently been shown that *MIR-145* has a separate promoter and can be expressed in isolation of *MIR-143* [2].



Рис. 1. Экспрессия микроРНК miR-143 и miR-145 соответственно в нормальных тканях человека по данным ресурса The Genotype-Tissue Expression (по [11, 12], с изменениями)
Fig. 1. MiR-143 and miR-145 microRNA expression, respectively, in health human tissues according to The Genotype-Tissue Expression database (according to [11, 12], with changes)

показано, что *MIR-145* имеет отдельный промотор и может экспрессироваться изолированно от *MIR-143* [2].

Кластер *miR-143/145* представляет собой наглядный пример сложности механизмов формирования паттернов экспрессии микроРНК в норме и при патологии. Так, в рамках проекта The

The *miR-143/145* cluster is a clear example of the complexity of the mechanisms of formation of microRNA expression patterns in health and disease. Thus, within The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project, which is a publicly available resource for studying tissue-specific gene expression and regulation, data on the expression of 54 types of healthy

Genotype-Tissue Expression (GTEx), который представляет собой общедоступный ресурс для изучения тканеспецифичной экспрессии генов и их регуляции, обобщены данные по экспрессии 54 типов здоровых тканей почти 1000 чел., определенной методами высокопроизводительного РНК-секвенирования [3]. Согласно данным GTEx, экспрессия miR-143 и miR-145 наблюдается во всех типах изученных нормальных тканей и, по данным многочисленных исследований, утрачивается при злокачественных новообразованиях [1, 4–6].

Вместе с тем ресурс GTEx не содержит данных об экспрессии miR-143 и miR-145 в гемопоэтических тканях в норме. По результатам экспериментов по профилированию экспрессии микроРНК имеет место снижение уровня данных молекул при лимфопролиферативных заболеваниях в сравнении с контрольными образцами [4].

Привлекают внимание работы Y. Akao et al. (2007) и A. Roehle et al. (2008), в которых было показано снижение экспрессии микроРНК кластера miR-143/145 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ) [7, 8]. Проведенные ранее исследования показали, что снижение экспрессии ряда онкосупрессорных микроРНК в опухолевой лимфоидной ткани может быть связано с aberrantным метилированием [9, 10].

Кроме того, как видно из рис. 1, уровень miR-143 в одной и той же ткани в разы ниже уровня miR-145, что требует дополнительного объяснения и может быть связано со статусом метилирования кодирующих их генов.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить метилирование генов *MIR-143* и *MIR-145* в ткани лимфоузлов больных ДВККЛ и лимфоузлов пациентов с реактивной фолликулярной гиперплазией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили биоптаты 14 фиксированных формалином и парафинизированных опухолевых лимфоузлов пациентов с ДВККЛ (6 GCB и 8 non-GCB иммуногистохимического подтипа) и 11 лимфоузлов больных с реактивной фолликулярной гиперплазией.

С парафинизированных блоков брали 3–4 среза толщиной 10–12 мкм. Для выделения ДНК использовали фенол-хлороформный метод с гуанидином.

По 500 нг ДНК каждого образца подвергалось бисульфитной конверсии с применением наборов EZ DNA Methylation Kit, согласно протоколу производителя (Zymo Research, США).

tissues of almost 1000 people determined by high-performance RNA sequencing have been summarized [3]. According to GTEx data, the expression of miR-143 and miR-145 is observed in all types of normal tissues studied and, according to numerous studies, it is lost in malignant neoplasms [1, 4–6].

At the same time, the GTEx does not contain data on the expression of miR-143 and miR-145 in healthy hematopoietic tissues. According to the results of microRNA expression profiling experiments, there is a decrease in the level of these molecules in lymphoproliferative diseases in comparison with control samples [4].

The attention is attracted by works of Akao et al. (2007) and Roehle et al. (2008) which showed a decrease in miR-143/145 cluster microRNA expression in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) [7, 8]. Previous studies have shown that a decrease in the expression of a number of oncosuppressive microRNAs in tumor lymphoid tissue may be associated with aberrant methylation [9, 10].

In addition, as can be seen from Fig. 1, the level of miR-143 in the same tissue is several times lower than the level of miR-145, which requires additional explanation and may be related to the methylation status of the genes encoding them.

AIM OF THE RESEARCH

To evaluate the methylation of *MIR-143* and *MIR-145* genes in the lymph node tissue of patients with DLBCL and lymph nodes of patients with reactive follicular hyperplasia.

MATERIALS AND METHODS

The study included biopsies of 14 formalin-fixed and paraffinized tumor lymph nodes of patients with DLBCL (6 GCB and 8 non-GCB immunohistochemical phenotypes) and 11 lymph nodes of patients with reactive follicular hyperplasia.

Three to four 10–12 µm sections were taken from the paraffinized blocks. The phenol-chloroform extraction with guanidine was used to isolate DNA.

500 ng of DNA from each sample was subjected to bisulfite conversion using EZ DNA Methylation Kit, according to the manufacturer's protocol (Zymo Research, USA).

The Human Methylated and Non-methylated DNA Set (Zymo Research, USA) was used as negative and positive controls. The efficiency of bisulfite conversion was assessed by bisulfite sequencing (Fig. 2 and 3).

The determination of the methylation status of the *MIR-145* gene in samples was performed by methyl-specific polymerase chain reaction (MS-

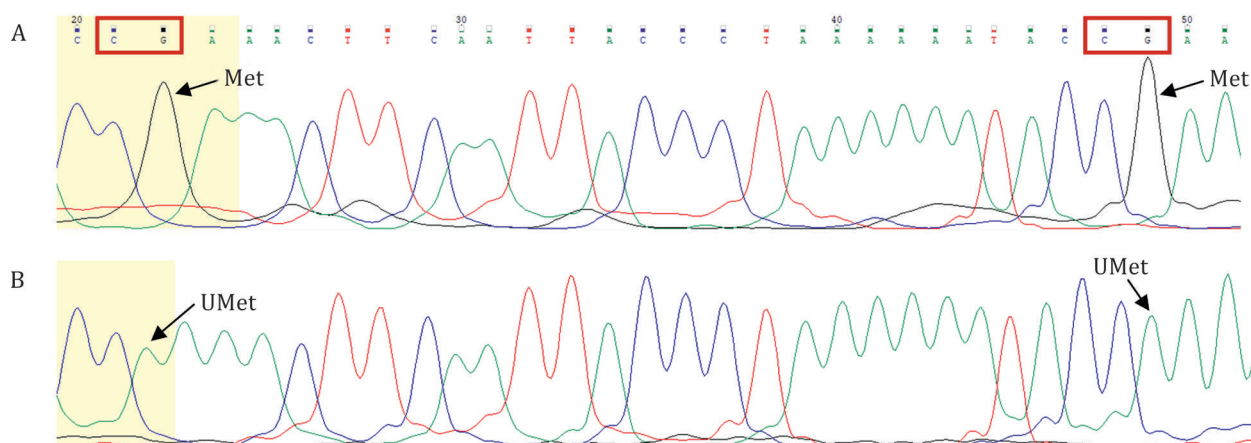


Рис. 2. Фрагмент хроматограммы бисульфитного секвенса CpG-островка гена *MIR-145* (выполнен с использованием обратного праймера; Met – цитозин в метилированном состоянии; UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии; красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды): А – метилированная ДНК; В – неметилированная ДНК

Fig. 2. Chromatogram fragment of the *MIR-145* gene CpG-island bisulfite sequence (made using a reverse primer; Met – methylated cytosine; UMet – thymine in place of unmethylated cytosine; CpG dinucleotides are highlighted with a red frame: A – methylated DNA; B – unmethylated DNA

В качестве отрицательного и положительного контроля применялся набор контрольных ДНК Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit (Zymo Research, США). Оценка полноты конверсии проводилась методом бисульфитного секвенирования (рис. 2 и 3).

Определение статуса метилирования гена *MIR-145* в образцах проводили методом метил-специфичной полимеразной цепной реакции

PCR) according to the previously described method [13] in two test tubes: with primers for the methylated and unmethylated allele (Table 1, Fig. 4).

To quantify the methylation of the *MIR-143* gene, direct bisulfite sequencing based on the Sanger method was used by capillary electrophoresis on a Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) according to the approaches described earlier (Table 1) [14–16]. The accuracy of this approach is

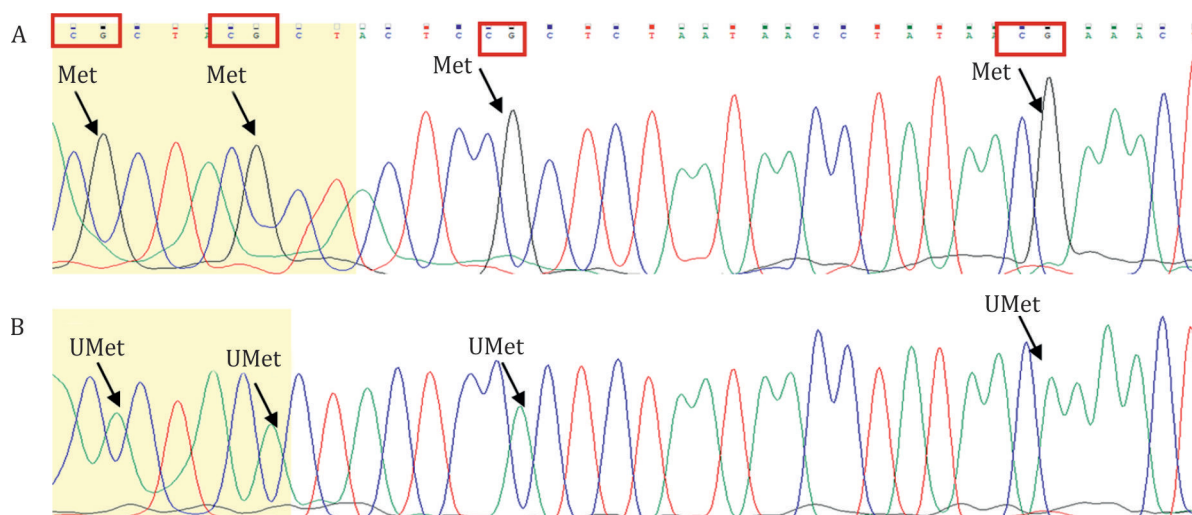


Рис. 3. Фрагмент хроматограммы бисульфитного секвенса CpG-островка гена *MIR-143* (выполнен с использованием обратного праймера; Met – цитозин в метилированном состоянии; UMet – тимин на месте цитозина в неметилированном состоянии; красной рамкой выделены CpG-динуклеотиды): А – метилированная ДНК; В – неметилированная ДНК

Fig. 3. Chromatogram fragment of the *MIR-143* gene CpG-island bisulfite sequence (made using a reverse primer; Met – methylated cytosine; UMet – thymine in place of unmethylated cytosine; CpG dinucleotides are highlighted with a red frame): A – methylated DNA; B – unmethylated DNA

Таблица 1. Последовательности для анализа статуса метилирования генов микроРНК
Table 1. Sequences for assessment the methylation status of microRNA genes

Метод Method	Ген Gene	Последовательность праймеров Sequence of primers	Длина ампликона, п.н. Amplicon length, b.p.	Т отжига, °C Annealing temperature, °C
МС-ПЦР MS-PCR	<i>MIR-145</i>	MF 5'-gggttttcggtatttttaggtaattgaagtttc-3' MR 5'-taaaataccacacgtcgccg-3'	98	64
		UMF 5'-gggttttcggtatttttaggtaattgaagtttc-3' UMR 5'-aaccaaaataaaataccacacatcacca-3'	108	56
БС BS	<i>MIR-143</i>	F 5'-ttgggtgtttaatggttaggttatag-3' R 5'-actccaactaaccaaaaatacaac-3'	217	60

Примечание: п.н. – пар нуклеотидов; МС-ПЦР – метил-специфичная полимеразная цепная реакция; БС – бисульфитное секвенирование.

Note. b.p. – base pairs; MS-PCR – methyl-specific polymerase chain reaction; BS – bisulfite sequencing.

(МС-ПЦР) по описанной ранее методике [13] в двух пробирках: с праймерами, комплементарными к метилированному и неметилированному аллелю (табл. 1, рис. 4).

Для количественной оценки метилирования гена *MIR-143* использовалось прямое бисульфитное секвенирование по Сенгеру методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) согласно описанным ранее подходам (см. табл. 1) [14–16]. Точность данного подхода несколько ниже, чем точность пиросеквенирования и секве-

somewhat lower than the accuracy of pyrosequencing and cloning-based sequencing, but it is sufficient to achieve the research goal, while its affordability, speed and simplicity surpass the latter two methods [14]. The method involves a simultaneous analysis of several CpG dinucleotides within the amplicon boundaries and has high specificity and reproducibility, as well as sensitivity from 15% of the methylated allele and more [17].

Four CpG dinucleotides were analyzed within the CpG island (a fragment with a length of 217 base pairs (b.p.)) located between –156 and +59 b.p. from

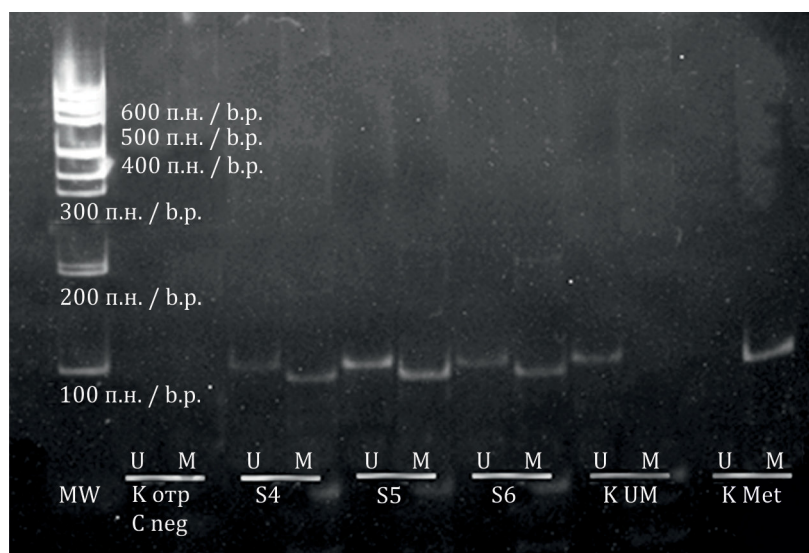


Рис. 4. Результаты метил-специфической полимеразной цепной реакции (МС-ПЦР) для определения статуса метилирования гена *MIR-145* (электрофорез в 5% полиакриламидном геле; п.н. – пар нуклеотидов; М – ПЦР с праймерами, специфичными к метилированному аллелю; U – ПЦР с праймерами, специфичными к неметилированному аллелю; MW – маркер молекулярной массы 100 п.н.; К отр – отрицательный контроль; S4–S6 – образцы пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой; К UM – контрольная неметилированная ДНК; К Met – контрольная метилированная ДНК)

Fig. 4. Results of methyl-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) to determine the methylation status of the *MIR-145* gene (polyacrylamide gel (5%) electrophoresis; b.p. – base pairs; M – PCR with primers for the methylated allele; U – PCR with primers for to the unmethylated allele; MW – marker of molecular weight of 100 b.p.; C neg – negative control; S4–S6 – samples of patients with diffuse large B-cell lymphoma; K UM – control unmethylated DNA; K Met – control methylated DNA)

нирования на основе клонирования, но достаточно для достижения цели исследования, в то время как его экономическая доступность, скорость и простота превосходят два последних метода [14]. Метод подразумевает одновременный анализ нескольких CpG-динуклеотидов в границах ампликона и обладает высокой специфичностью и воспроизводимостью, а также чувствительностью от 15% метилированного аллеля и выше [17].

Анализировали четыре CpG-динуклеотида в пределах CpG-островка (фрагмент длиной 217 пар нуклеотидов (п.н.)), расположенного между –156 и +59 п.н. от сайта начала трансляции гена *MIR-143*. Был выбран данный участок последовательности, так как паттерн его метилирования демонстрировал вариации при опухолевых заболеваниях и в норме [15]. Оценку результатов секвенирования осуществляли с помощью программы Chromas.

В анализ брали хроматограммы сиквенсов хорошего качества: с высоким уровнем сигнала и минимальным фоновым шумом. Проводилось определение высоты пиков цитозина и тимина в каждом CpG-динуклеотиде на хроматограмме. Поскольку секвенирование проводилось с обратного праймера, для количественного выражения уровня метилирования использовалась формула

$$\text{MetC} = 100 \times \text{hG} / \text{hG} + \text{hA},$$

где MetC – уровень метилирования цитозина, %;

hG – высота пика гуанина;

hA – высота пика аденина.

Одиночный пик G рассматривался как 100% метилирование, одиночный пик A – как отсутствие метилирования, а перекрывающиеся G и A – как частичное метилирование (0–100 %).

Статистический анализ проводился в программе SPSS 16.0 для Windows (SPSS Inc.). Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$. Нормальность распределения параметров проверяли с использованием теста Колмогорова – Смирнова. Для переменных, не подчиняющихся нормальному распределению, использованы значения медианы (Me), 25-го и 75-го процентиля (Q25; Q75). Расчеты производились с использованием тестов Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам МС-ПЦР было установлено, что все исследованные образцы, как реактивные, так и опухолевые, имели метилирование гена *MIR-145*.

the site of the start of translation of the *MIR-143* gene. This region of the sequence was chosen because the pattern of its methylation showed variations in tumors and in normal cells [15]. Sequencing results were evaluated using Chromas software.

Sequencing chromatograms of good quality were taken for analysis: with high signal strength and minimal background noise. The height of cytosine and thymine peaks in each CpG dinucleotide was determined on a chromatogram. Since sequencing was performed from a reverse primer, the formula was used to quantify the methylation level:

$$\text{MetC} = 100 \times \text{hG} / \text{hG} + \text{hA},$$

where MetC is cytosine methylation level, %;

hG is height of guanine peak;

hA is height of adenine peak.

A single peak G was considered as 100% methylation, a single peak A – as no methylation, and overlapping G and A – as partial methylation (0–100%).

Statistical analysis was carried out using SPSS 16.0 for Windows (SPSS Inc.). The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. The normality of the distribution of parameters was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. For variables that do not meet the normal distribution, median (Me), 25th and 75th percentiles (Q25; Q75) were used. Calculations were performed using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

RESULTS

According to the results of MS-PCR, it was found that all the studied samples, both reactive and tumor, had methylation of the *MIR-145* gene.

The values of the *MIR-143* gene methylation in samples of patients with reactive lymphadenopathy and patients with DLBCL are presented in Table 2.

We found no significant differences for each of the four individual CpG dinucleotides, however, the average methylation level for all CpG dinucleotides was significantly lower in tumor samples (71.5 (64.1; 74.7)% vs. 75.5 (71.8; 81.0)%, $p = 0.049$) (Fig. 5, A).

It was also noteworthy that in all samples of reactive lymph node tissue, a close level of methylation of the CpG dinucleotides of the *MIR-143* gene was recorded, while tumor samples showed greater heterogeneity (Table 2).

Separate analysis of DLBCL samples by immunohistochemical phenotypes showed that the difference in the average level of methylation of the CpG dinucleotides between the two groups of reactive and tumor lymph nodes is due to a lower level of methylation in the samples of patients with non-ger-

Таблица 2. Уровень метилирования CpG-динуклеотидов в лимфоузлах пациентов с реактивной лимфоаденопатией и опухолевых лимфоузлах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой, Me (25; 75)**Table 2.** The level of methylation of CpG dinucleotides in the lymph nodes of patients with reactive lymphadenopathy and tumor lymph nodes of patients with diffuse large B cell-lymphoma, Me (25; 75)

CpG-динуклеотид CpG dinucleotide	Уровень метилирования цитозина, % / Cytosine methylation level, %		<i>p</i>
	Реактивные лимфоузлы Reactive lymph nodes	Опухолевые лимфоузлы Tumor lymph nodes	
CpG1	78.0 (71.0; 81.0)	68.0 (45.8; 74.0)	0.055
CpG2	85.0 (80.0; 89.0)	81.0 (63.3; 86.0)	0.154
CpG3	77.0 (70.0; 82.0)	72.5 (68.8; 82.5)	0.476
CpG4	67.0 (58.0; 79.0)	61.5 (50.3; 73.3)	0.217
Среднее значение / Average value	75.5 (71.8; 81.0)	71.5 (64.1; 74.7)	0.049

Значения уровня метилирования гена *MIR-143* в образцах пациентов с реактивной лимфоаденопатией и больных ДВККЛ представлены в табл. 2.

Нами не было обнаружено значимых различий для каждого из четырех отдельных изученных CpG-динуклеотидов, однако средний уровень метилирования для всех CpG-динуклеотидов был значимо ниже в опухолевых образцах (71.5 (64.1; 74.7) % против 75.5 (71.8; 81.0) %, $p = 0.049$) (рис. 5, А).

Также обращало на себя внимание то, что во всех образцах реактивной ткани лимфоузлов был зарегистрирован близкий уровень метилирова-

минал center B-cell (non-GCB) lymphoma: 67.5 (55.9; 73.4)% vs. 75.5 (71.8; 81.0)%, $p = 0.026$ (Fig. 5, C). The average level of methylation in the samples of patients with GCB lymphoma was close to the level of methylation in reactive lymphadenopathy and amounted to 74.0 (70.5; 78.3)% (Table 3).

Fig. 6 shows examples of sequence chromatograms of reactive and tumor tissue samples.

DISCUSSION

Currently, studies have been conducted for profiling the level of microRNAs in various hematopoietic malignancies. It has been shown that the levels of miR-143 and miR-145 can be reduced both in

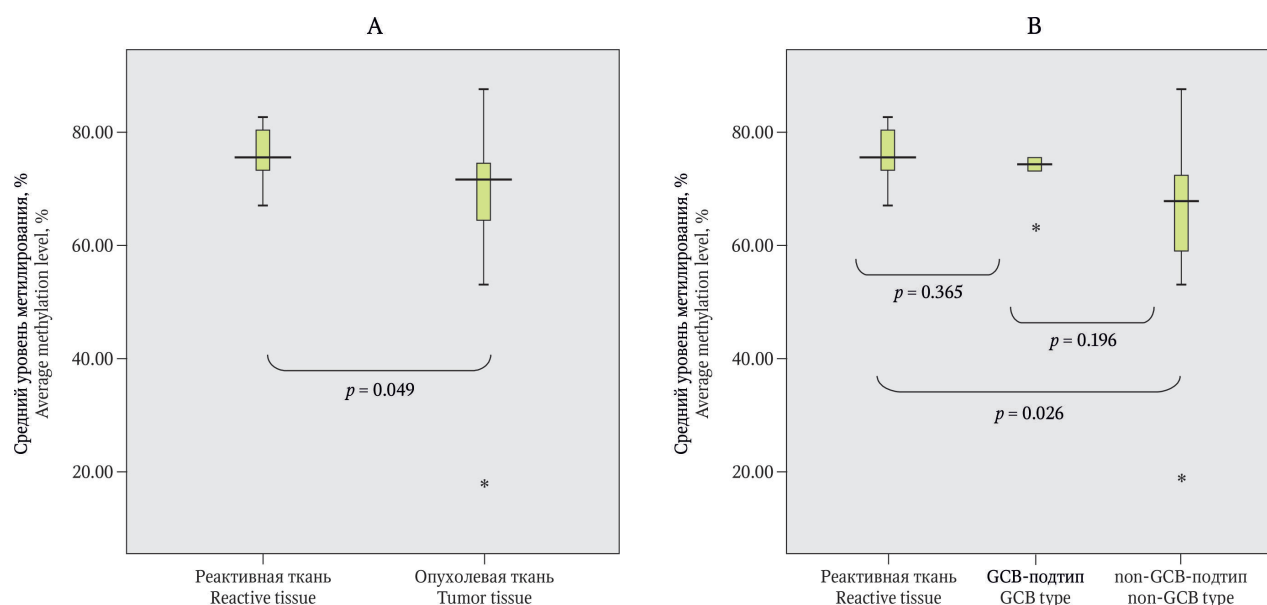


Рис. 5. Средний уровень метилирования в изученных образцах (звездочками обозначены образцы, которые не укладываются в диаграмму размаха для каждой анализируемой группы): А – реактивные и опухолевые лимфоузлы; В – реактивные и опухолевые лимфоузлы в зависимости от иммуногистохимического подтипа (GCB – подтип из клеток герминального центра; non-GCB – подтип из клеток постгерминального происхождения)
Fig. 5. The average level of methylation in the studied samples (GCB – germinal center B cell; non-GCB – non-germinal center B cell; asterisks indicate samples that do not fit into the box plots for each group): А – reactive and tumor lymph nodes; В – reactive and tumor lymph nodes, depending on the immunohistochemical phenotype

Таблица 3. Уровень метилирования CpG-динуклеотидов в лимфоузлах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой в зависимости от иммуногистохимического подтипа, Me (25; 75)

Table 3. The level of methylation of CpG dinucleotides in the lymph nodes of patients with diffuse large B-cell lymphoma depending on the immunohistochemical type, Me (25; 75)

CpG-динуклеотид CpG dinucleotide	Уровень метилирования цитозина, % Cytosine methylation level, %			P_{1-2} P_{1-3} P_{2-3}
	Реактивные лимфоузлы Reactive lymph nodes	GCB-подтип GCB type	non-GCB-подтип non-GCB type	
CpG1	78.0 (71.0; 81.0)	69.5 (58.0; 74.0)	61.5 (44.3; 84.3)	0.107 0.117 0.477
CpG2	85.0 (80.0; 89.0)	81.0 (70.3; 85.8)	81.0 (61.8; 86.0)	0.267 0.214 0.948
CpG3	77.0 (70.0; 82.0)	75.0 (72.3; 88.3)	70.5 (60.5; 78.8)	0.724 0.173 0.137
CpG4	67.0 (58.0; 79.0)	73.5 (66.0; 86.5)	53.5 (43.5; 63.3)	0.338 0.008 0.014
Среднее значение Average value	75.5 (71.8; 81.0)	74.0 (70.5; 78.3)	67.5 (55.9; 73.4)	0.365 0.026 0.196

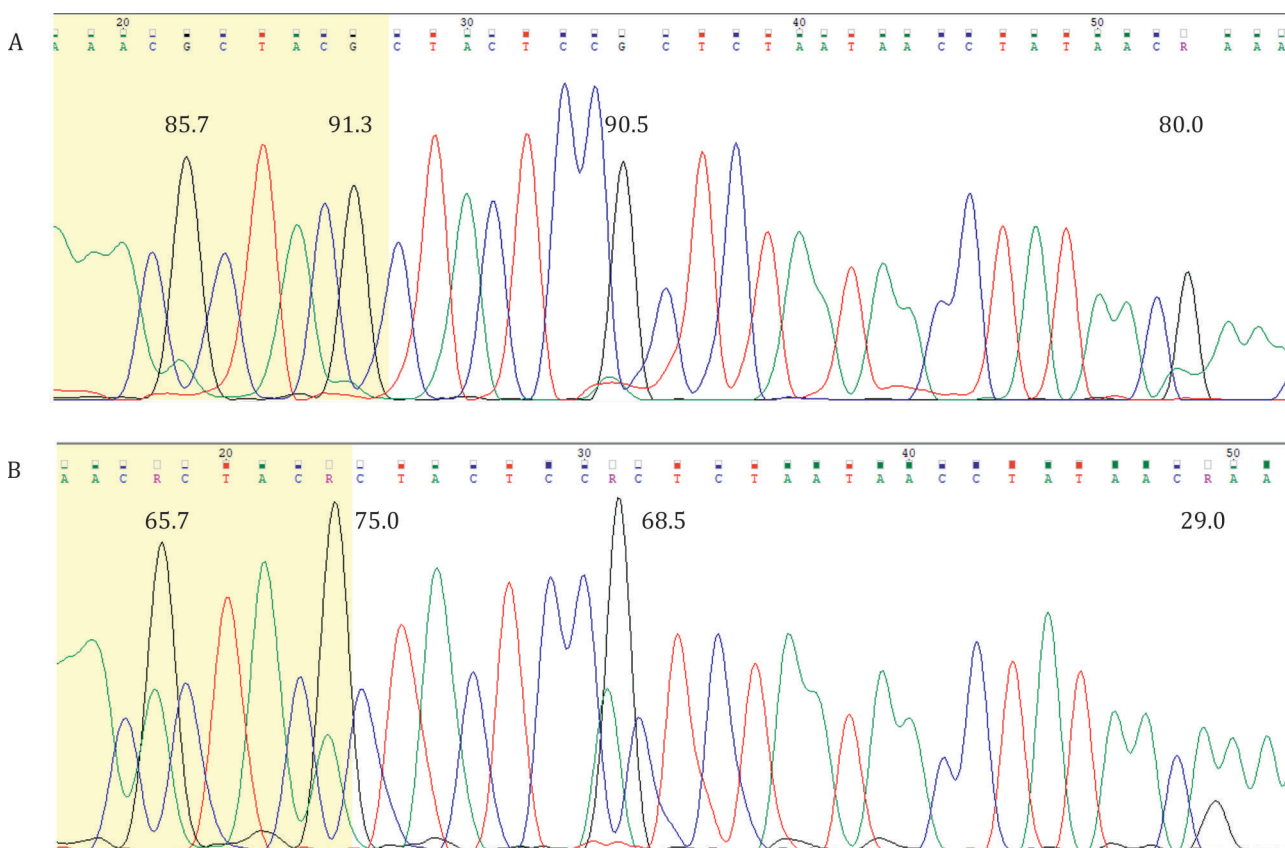


Рис. 6. Фрагмент хроматограммы бисульфитного сиквенса CpG-островка гена *MIR-143* (выполнен с использованием обратного праймера; цифрами указан уровень метилирования (%) каждого из CpG-динуклеотидов): А – реактивный лимфоузел; В – опухолевый лимфоузел больного диффузной В-крупноклеточной лимфомой, non-GCB-подтип

Fig. 6. Chromatogram fragment of bisulfite sequence of the CpG island of the *MIR-143* gene (made using a reverse primer; the figures indicate the methylation level (%) of each CpG dinucleotides): А – reactive lymph node; В – tumor lymph node of a patient with non-GCB diffuse large B-cell lymphoma

ния изученных CpG-динуклеотидов гена *MIR-143*, тогда как опухолевые образцы демонстрировали большую гетерогенность (см. табл. 2).

Раздельный анализ образцов ДВККЛ по иммуногистохимическим подтипам показал, что разница в среднем уровне метилирования изученных CpG-динуклеотидов между двумя группами реактивных и опухолевых лимфоузлов обусловлена более низким уровнем метилирования в материале больных лимфомой из клеток постгерминального происхождения (non-GCB): 67.5 (55.9; 73.4) % против 75.5 (71.8; 81.0) %, $p = 0.026$ (рис. 5, В). Средний уровень метилирования в образцах больных лимфомой из клеток герминального центра оказался близким уровню метилирования при реактивной лимфаденопатии и составил 74.0 (70.5; 78.3) % (табл. 3).

На рис. 6 представлены примеры хроматограмм сиквенса образцов реактивной и опухолевой ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время проведены исследования по профилированию уровня микроРНК при различных злокачественных новообразованиях системы кроветворения. Было показано, что уровни *miR-143* и *miR-145* могут быть снижены как в образцах больных В-клеточными лимфопролиферативными заболеваниями, так и в клеточных линиях некоторых типов лимфом [18].

По данным двух ранее проведенных исследований [9, 10], при ДВККЛ имеет место снижение уровня микроРНК кластера *miR-143/145* в сравнении с контролем. Поскольку нами ранее была показана высокая частота опухоль-специфичного метилирования целого ряда микроРНК при данной опухоли, было сделано предположение, что такое снижение может быть связано с гиперметилированием в опухолевых клетках кодирующих их генов.

В клетках животных метилирование происходит в CpG-островках. Оно является механизмом эпигенетической регуляции транскрипции и заключается в присоединении метильной группы ($-CH_3$) к цитозиновым основаниям CpG-динуклеотидов. При этом метильная группа образующегося метилцитозина располагается в большой бороздке спирали ДНК, с которой взаимодействуют большинство ДНК-связывающих белков. В настоящее время известны два механизма репрессии генов при метилировании: связывание с метилированными последовательностями ДНК белков, делающих хроматин транскрипционно неактивным, и препятствование

samples of patients with B-cell lymphoproliferative diseases and in cell lines of some types of lymphoma [18].

According to two previous studies [9, 10], in DLBCL, there is a decrease in the level of microRNA of the *miR-143/145* cluster in comparison with the control. Since we had previously shown a high frequency of tumor-specific methylation of a number of microRNAs in this tumor, it was assumed that such a decrease may be due to hypermethylation in tumor cells of the genes encoding them.

In animal cells, methylation occurs in CpG islands. It is a mechanism of epigenetic regulation of transcription and consists in attachment of a methyl group ($-CH_3$) to cytosine bases of CpG dinucleotides. In this case, the methyl group of the resulting methylcytosine is located in the major groove of the DNA helix with which most DNA-binding proteins interact. Currently, two mechanisms of gene repression during methylation are known: binding to methylated DNA sequences of proteins that make chromatin transcriptionally inactive, and preventing a methyl group from contacting DNA of regulatory proteins that are need for gene expression. Thus, methylation turns off the gene, and demethylation turns on the gene [19]. It is also known that DNA methylation/demethylation is carried out in a site-specific manner, which is important for the activation or inactivation of transcription [16].

We have analyzed the methylation status of *MIR-143* and *MIR-145* genes by bisulfite sequencing and MS-PCR, respectively, in lymph node tissue with reactive changes and tumor lesion of DLBCL. The results obtained indicate the presence of methylation of the *MIR-143* and *MIR-145* genes in all the samples studied, and, consequently, methylation detected in the lymph nodes of lymphoma patients is not tumor-specific.

On the contrary, the quantitative assessment showed that in the DLBCL samples, namely non-GCB type, the average level of methylation of the sequencing fragment of the *MIR-143* gene was significantly lower than in the samples of reactive lymph nodes.

Based on the results of the literature search, it can be assumed that the differences obtained are not directly related to tumor cells, but are explained by the peculiarities of the cellular composition of the studied samples. Recent experiments that were assessing the levels of *miR-143* and *miR-145* not in tissues, but in individual cell populations, have shown that these microRNA are actively expressed in mesenchymal cells, such as fibroblasts and smooth muscle cells, as well as in the endothelium, whereas their level is low in lymphocytes, epithelial cells and

метильной группы контакту с ДНК регуляторных белков, необходимых для экспрессии генов. Таким образом, метилирование «выключает» ген, а деметилирование – «включает» [19]. Известно также, что метилирование/деметилирование ДНК осуществляется сайт-специфичным образом, что важно для активации или инактивации транскрипции [16].

Нами выполнен анализ статуса метилирования генов *MIR-143* и *MIR-145* методами бисульфитного секвенирования и МС-ПЦР соответственно в ткани лимфоузлов с реактивными изменениями и опухолевым поражением ДВККЛ. Полученные результаты свидетельствуют о наличии метилирования генов *MIR-143* и *MIR-145* во всех исследованных образцах, а, следовательно, выявляемое в лимфоузлах больных лимфомой метилирование не является опухоль-специфичным.

Напротив, количественная оценка показала, что в образцах ДВККЛ, а именно non-GCB-подтипа, средний уровень метилирования изученного фрагмента последовательности гена *MIR-143* был значимо ниже, чем в образцах реактивных лимфоузлов.

На основании результатов литературного поиска можно предположить, что полученные различия не связаны непосредственно с опухолевыми клетками, а объясняются особенностями клеточного состава изученного биоматериала. Недавние эксперименты, оценившие уровни miR-143 и miR-145 не на тканевом уровне, а в отдельных клеточных популяциях, показали, что эти микроРНК активно экспрессируются в клетках мезенхимального происхождения, таких как фибробласты и гладкомышечные клетки, а также эндотелии, тогда как в лимфоцитах, эпителиальных клетках и эритроцитах уровень их низкий. По данным метода гибридизации *in situ* микроРНК кластера miR-143/145 также экспрессируются исключительно в мезенхимальных клетках [1].

Так, результаты недавнего исследования показали, что уровень miR-143 в 14.22 раза, а miR-145 в 11.36 раз выше в образцах ДНК, выделенной из FFPE-блоков больных ДВККЛ, в сравнении с изолированными популяциями лимфоцитов (пре-В-клеток (CD19+CD10+), покоящихся В-клеток (CD19+), наивных В-клеток (CD19+), В-клеток герминального центра (CD19+IgD-/CD39-), В-клеток, активированных *in vitro* стимуляцией IL-2 и IgM (CD19+/CD30+), плазматических клеток (CD138+), В-клеток памяти (CD19+/CD27+), CD3+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток,

erythrocytes. According to the *in situ* hybridization method, microRNAs of the miR 143/145 cluster are also expressed exclusively in mesenchymal cells [1].

Thus, the results of a recent study showed that the level of miR-143 is 14.22 times, and miR-145 is 11.36 times higher in DNA samples isolated from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsy samples with DLBCL, in comparison with isolated populations of lymphocytes (pre-B-cells (CD19+CD10+), resting B cells (CD19+), naïve B cells (CD19+), germinal center B cells (CD19+IgD-/CD39-), B cells activated *in vitro* by IL-2 and IgM stimulation (CD19+/CD30+), plasma cells (CD138+), memory B cells (CD19+/CD27+), CD3+ T cells, CD4+ T cells, CD8 T cells and NK cells (CD56+)) [20]. This contradicts the conclusions of studies on the low expression of these microRNAs in DLBCL in which samples with a mixed cellular composition (peripheral blood and non-neoplastic lymph nodes) were used for comparing the expression level [7, 8].

DLBCL is a heterogeneous entity in the context of the clinical findings and prognosis. It is believed that the observed heterogeneity of lymphoma may be related both to the biological properties of malignant B cells and to the different cellular composition of the inflammatory infiltrate surrounding tumor cells, including neutrophils, T lymphocytes, macrophages and mast cells. The last three cell types play an important role in enhancing angiogenesis in DLBCL due to the release of proangiogenic factors and complex cross-interaction in the tumor microenvironment [21, 22].

In this regard, it is worth mentioning the results of another work showing that in the lymph node tissue with reactive follicular hyperplasia, a low microvessel density is detected in more than 90% of cases, whereas in the lymph node tissue of patients with DLBCL, in half of the cases (50%) a high microvessel density was noted [23].

Finally, it has now been clearly shown that in the tissue of non-GCB DLBCL, in contrast to GCB DLBCL, there is a pronounced uniform infiltration with CD4+, CD8+ T lymphocytes and macrophages that promote neoangiogenesis in the tumor [24]. Thus, the data obtained in this work on a higher average level of methylation of the *MIR-143* gene in DLBCL samples of the non-GCB subtype in comparison with samples of reactive lymph nodes may be associated with a greater representation of endothelial cells in them.

CONCLUSION

Our study excludes the use of methylation of *MIR-143* and *MIR-145* genes for differential diagnosis

CD8 Т-клеток и NK-клеток (CD56+)) [20], что противоречит выводам работ о низкой экспрессии данных микроРНК при ДВБКЛ, в которых в качестве образцов сравнения уровня экспрессии использовали биологический материал со смешанным клеточным составом: периферическую кровь и неопухолевые лимфоузлы [7, 8].

ДВБКЛ представляет собой клинически и прогностически гетерогенную нозологию. Считается, что наблюдаемая гетерогенность лимфомы может быть связана как с биологическими свойствами злокачественных В-клеток, так и с различным клеточным составом воспалительного инфильтрата, окружающего опухолевые клетки, включающего нейтрофилы, Т-лимфоциты, макрофаги и тучные клетки. Последние три типа клеток играют важную роль в усилении ангиогенеза при ДВБКЛ за счет высвобождения проангиогенных факторов и посредством сложного перекрестного взаимодействия в микроокружении опухоли [21, 22].

В этой связи следует упомянуть результаты другой работы, показывающие, что в ткани лимфоузлов при реактивной фолликулярной гиперплазии более чем в 90 % случаев выявляется низкая плотность микрососудов, тогда как в ткани лимфоузлов больных ДВБКЛ в половине случаев (50 %) была отмечена высокая плотность микрососудов [23].

Наконец, в настоящее время четко показано, что в ткани ДВБКЛ из клеток постгерминального происхождения, в отличие от подтипа лимфомы из клеток зародышевого центра, имеет место выраженная равномерная инфильтрация CD4+, CD8+ Т-лимфоцитами и макрофагами, способствующими неоангиогенезу в опухоли [24]. Таким образом, полученные в настоящей работе данные о большем среднем уровне метилирования гена *MIR-143* в образцах ДВБКЛ негерминального подтипа в сравнении с образцами реактивных лимфоузлов могут быть связаны с большей представленностью в них эндотелиальных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование исключает использование метилирования генов *MIR-143* и *MIR-145* для дифференциальной диагностики

между лимфомой и реактивными изменениями в лимфоузлах.

The complex cellular composition of the analyzed samples may explain the presence of gene methylation of the analyzed cluster in the tissues of reactive and tumor lymph nodes, and the different microvessel density may explain the lower levels of methylation of the *MIR-143* gene in the non-GCB phenotype of DLBCL.

To further clarify the role of epigenetic regulation of miR-143 and miR-145 expression in lymphoma, it may be necessary both to increase the number of samples studied and to assess the level of gene methylation of the analyzed cluster in certain cell types contained in the samples.

Funding. The work was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation, Project No. 22-25-00222.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

между лимфомой и реактивными изменениями в лимфоузлах.

Сложный клеточный состав анализируемых образцов может объяснять наличие метилирования генов анализируемого кластера в ткани реактивных и опухолевых лимфоузлов, а различная плотность микрососудов – более низкие уровни метилирования гена *MIR-143* при non-GCB-подтипе ДВБКЛ.

Для дальнейшего уточнения роли эпигенетической регуляции экспрессии miR-143 и miR-145 при лимфоме может потребоваться как увеличение количества исследованных образцов, так и оценка уровня метилирования генов анализируемого кластера в отдельных типах клеток, содержащихся в биоматериале.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда, проект № 22-25-00222.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kent O.A., McCall M.N., Cornish T.C., Halushka M.K. Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localization of miRNAs // *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12):7528–7538. DOI: 10.1093/nar/gku461.

REFERENCES

1. Kent O.A., McCall M.N., Cornish T.C., Halushka M.K. Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localization of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12):7528–7538. DOI: 10.1093/nar/gku461.

2. Pidíková P., Reis R., Herichova I. miRNA clusters with down-regulated expression in human colorectal cancer and their regulation // *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(13):4633. DOI: 10.3390/ijms21134633.
3. Lonsdale J., Thomas J., Salvatore M. et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project // *Nat. Genet.* 2013;45(6):580-585. DOI: 10.1038/ng.2653.
4. Fischer L., Hummel M., Korfel A. et al. Differential micro-RNA expression in primary CNS and nodal diffuse large B-cell lymphomas // *Neuro-Oncology.* 2011;13(10):1090-1098. DOI: 10.1093/neuonc/nor107.
5. Zhang Y., Wang Z., Chen M. et al. MicroRNA-143 targets *MACC1* to inhibit cell invasion and migration in colorectal cancer // *Mol. Cancer.* 2012;11:23. DOI: 10.1186/1476-4598-11-23.
6. Takagi T., Iio A., Nakagawa Y. et al. Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers // *Oncology.* 2009;77(1):12-21. DOI: 10.1159/000218166.
7. Akao Y., Nakagawa Y., Kitade Y. et al. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies // *Cancer Sci.* 2007;98(12):1914-1920. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00618.x.
8. Roehle A., Hoefig K.P., Repsilber D. et al. MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas // *Br. J. Haematol.* 2008;142(5):732-744. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07237.x.
9. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Orlov Y.L. et al. The methylation of the p53 targets the genes *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* and *MIR-34B/C* in the tumor tissue of diffuse large B-cell lymphoma // *Genes.* 2022;13:1401. DOI: 10.3390/genes13081401.
10. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Чуркина М.И. и др. Комплексный анализ метилирования генов p53-респонзивных микроРНК и мутаций гена TP53 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме // *Медицинская генетика.* 2022;21(11):62-66. DOI: 10.25557/2073-7998.2022.11.62-66.
11. GeneCaRNA. The Human ncRNA Database. *MIR143* Gene – MicroRNA 143. URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR143> (дата обращения: 22.04.2023).
12. GeneCaRNA. The Human ncRNA Database. *MIR145* Gene – MicroRNA 145. URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR145&keywords=mir-145> (дата обращения: 22.04.2023).
13. Suh S.O., Chen Y., Zaman M.S. et al. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer // *Carcinogenesis.* 2011;32(5):772-778. DOI: 10.1093/carcin/bgr036.
14. Jiang M., Zhang Y., Fei J. et al. Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces // *Lab. Invest.* 2010;90(2):282-290. DOI: 10.1038/labinvest.2009.132.
15. Dou L., Zheng D., Li J. et al. Methylation-mediated repression of *microRNA-143* enhances *MLL-AF4* oncogene expression // *Oncogene.* 2012;31(4):507-517. DOI: 10.1038/onc.2011.248.
16. Drosou V., Kapazoglou A., Letsiou S. et al. Drought induces variation in the DNA methylation status of the barley *HvDME* promoter // *J. Plant Res.* 2020;21(13):4633. DOI: 10.3390/ijms21134633.
3. Lonsdale J., Thomas J., Salvatore M. et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* 2013;45(6):580-585. DOI: 10.1038/ng.2653.
4. Fischer L., Hummel M., Korfel A. et al. Differential micro-RNA expression in primary CNS and nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Neuro-Oncology.* 2011;13(10):1090-1098. DOI: 10.1093/neuonc/nor107.
5. Zhang Y., Wang Z., Chen M. et al. MicroRNA-143 targets *MACC1* to inhibit cell invasion and migration in colorectal cancer. *Mol. Cancer.* 2012;11:23. DOI: 10.1186/1476-4598-11-23.
6. Takagi T., Iio A., Nakagawa Y. et al. Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers. *Oncology.* 2009;77(1):12-21. DOI: 10.1159/000218166.
7. Akao Y., Nakagawa Y., Kitade Y. et al. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci.* 2007;98(12):1914-1920. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2007.00618.x.
8. Roehle A., Hoefig K.P., Repsilber D. et al. MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. *Br. J. Haematol.* 2008;142(5):732-744. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07237.x.
9. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Orlov Y.L. et al. The methylation of the p53 targets the genes *MIR-203*, *MIR-129-2*, *MIR-34A* and *MIR-34B/C* in the tumor tissue of diffuse large B-cell lymphoma. *Genes.* 2022;13:1401. DOI: 10.3390/genes13081401.
10. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Churkina M.I. et al. Complex analysis of p53-responsive microRNA genes methylation and TP53 gene mutations in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Medical Genetics.* 2022;21(11):62-66. DOI: 10.25557/2073-7998.2022.11.62-66. (In Russ.)
11. GeneCaRNA. The Human ncRNA Database. *MIR143* Gene – MicroRNA 143. URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR143> (accessed 22.04.2023).
12. GeneCaRNA. The Human ncRNA Database. *MIR145* Gene – MicroRNA 145. URL: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR145&keywords=mir-145> (accessed 22.04.2023).
13. Suh S.O., Chen Y., Zaman M.S. et al. MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2011;32(5):772-778. DOI: 10.1093/carcin/bgr036.
14. Jiang M., Zhang Y., Fei J. et al. Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces. *Lab. Invest.* 2010;90(2):282-290. DOI: 10.1038/labinvest.2009.132.
15. Dou L., Zheng D., Li J. et al. Methylation-mediated repression of *microRNA-143* enhances *MLL-AF4* oncogene expression. *Oncogene.* 2012;31(4):507-517. DOI: 10.1038/onc.2011.248.
16. Drosou V., Kapazoglou A., Letsiou S. et al. Drought induces variation in the DNA methylation status of the barley *HvDME* promoter. *J. Plant Res.*

- 2021;134(6):1351-1362. DOI: 10.1007/s10265-021-01342-z.
17. Grunau C., Clark S.J., Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters // *Nucleic Acids Res.* 2001;29(13):E65. DOI: 10.1093/nar/29.13.e65.
18. Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Березина О.В. и др. Метилирование генов p53-реактивных онкосупрессорных микроРНК при гемобластозах // *Сибирский онкологический журнал.* 2022;21(2):130-142. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142.
19. Волкова Н.С., Ермаков А.С. ДНК-метилирование и регуляция экспрессии генов // XXI Царскосельские чтения: материалы междунар. науч. конф. (Санкт-Петербург, 25–26 апреля 2017 г.). СПб., 2017. Т. 3. С. 285–288.
20. Lawrie C.H., Chi J., Taylor S. et al. Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma // *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13(7):1248-1260. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00628.x.
21. Marinaccio C., Ingravallo G., Gaudio F. et al. Microvascular density, CD68 and tryptase expression in human diffuse large B-cell lymphoma // *Leuk. Res.* 2014;38(11):1374-1377. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.09.007.
22. Marinaccio C., Ingravallo G., Gaudio F. et al. T cells, mast cells and microvascular density in diffuse large B cell lymphoma // *Clin. Exp. Med.* 2016;16(3):301-306. DOI: 10.1007/s10238-015-0354-5.
23. Abdou A.G., Asaad N., Kandil M. et al. Significance of stromal-1 and stromal-2 signatures and biologic prognostic model in diffuse large B-cell lymphoma // *Cancer Biol. Med.* 2017;14(2):151-161. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0007.
24. Guidolin D., Tamma R., Annese T. et al. Different spatial distribution of inflammatory cells in the tumor microenvironment of ABC and GBC subgroups of diffuse large B cell lymphoma // *Clin. Exp. Med.* 2021;21(4):573-578. DOI: 10.1007/s10238-021-00716-w.
- 2021;134(6):1351-1362. DOI: 10.1007/s10265-021-01342-z.
17. Grunau C., Clark S.J., Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(13):E65. DOI: 10.1093/nar/29.13.e65.
18. Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Berezina O.V. et al. Methylation of p53-responsive oncosuppressive microRNA genes in hemoblastosis. *Siberian Journal of Oncology.* 2022;21(2):130-142. DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-2-130-142. (In Russ.)
19. Volkova N.S., Ermakov A.S. (2017). DNA methylation and regulation of gene expression. XXI Tsarskoye Selo Readings: Proceedings of the International Scientific Conference April 25–26, 2017. St. Petersburg, Vol. 3, pp. 285–288. (In Russ.)
20. Lawrie C.H., Chi J., Taylor S. et al. Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13(7):1248-1260. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00628.x.
21. Marinaccio C., Ingravallo G., Gaudio F. et al. Microvascular density, CD68 and tryptase expression in human diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Res.* 2014;38(11):1374-1377. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.09.007.
22. Marinaccio C., Ingravallo G., Gaudio F. et al. T cells, mast cells and microvascular density in diffuse large B cell lymphoma. *Clin. Exp. Med.* 2016;16(3):301-306. DOI: 10.1007/s10238-015-0354-5.
23. Abdou A.G., Asaad N., Kandil M. et al. Significance of stromal-1 and stromal-2 signatures and biologic prognostic model in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Biol. Med.* 2017;14(2):151-161. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0007.
24. Guidolin D., Tamma R., Annese T. et al. Different spatial distribution of inflammatory cells in the tumor microenvironment of ABC and GBC subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Clin. Exp. Med.* 2021;21(4):573-578. DOI: 10.1007/s10238-021-00716-w.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Воропаева Елена Николаевна – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», доцент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-7542-7285.

Поспелова Татьяна Ивановна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-1261-5470.

ABOUT THE AUTHORS

Elena N. Voropaeva – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular and Genetic Studies of Internal Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Associate Professor, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-7542-7285.

Tatyana I. Pospelova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1261-5470.

Maria I. Churkina – Postgraduate Student, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1301-5944.

Alina M. Nesterets – Junior Researcher, Laboratory of Genetic and Environmental Determinants of the Human Life Cycle, Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Federal Research

Чуркина Мария Ивановна – аспирант кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-1301-5944.

Нестерец Алина Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории генетических и средовых детерминант жизненного цикла человека НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-1432-0473.

Березина Ольга Валерьевна – канд. мед. наук, ассистент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-4584-658X.

Скворцова Наталия Валерьевна – д-р мед. наук, доцент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-6938-3802.

Агеева Татьяна Августовна – д-р мед. наук, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0001-7933-8394.

Максимов Владимир Николаевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; доцент кафедры медицинской генетики ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-7165-4496.

Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-1432-0473.

Olga V. Berezina – Cand. Sci. (Med.), Assistant, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-4584-658X.

Nataliya V. Skvortsova – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-6938-3802.

Tatyana A. Ageeva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0001-7933-8394.

Vladimir N. Maksimov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Laboratory of Molecular Genetic Studies of Internal Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics; Associate Professor, Department of Medical Genetics, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-7165-4496.