



ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Диагностический потенциал регуляторных не кодирующих белок РНК при хроническом лимфоцитарном лейкозе

Diagnostic Potential of Regulatory Non-Coding Protein RNAs in Chronic Lymphocytic Leukemia

М.А. Столяр^{1,2}, А.С. Горбенко^{1,2}, И.А. Ольховский^{1,2}

MA Stolyar^{1,2}, AS Gorbenko^{1,2}, IA Olkhovskii^{1,2}

¹ Красноярский филиал ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, ул. Академгородок, д. 50/45, Красноярск, Российская Федерация, 660036

¹ Krasnoyarsk branch of the National Research Center for Hematology, 50/45 Akademgorodok ul., Krasnoyarsk, Russian Federation, 660036

² ФГБНУ ФИЦ «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», ул. Академгородок, д. 50, Красноярск, Российская Федерация, 660036

² Krasnoyarsk Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 50 Akademgorodok ul., Krasnoyarsk, Russian Federation, 660036

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

В обзоре обобщены современные данные об участии регуляторных не кодирующих белок РНК (нкРНК) в патогенезе хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) и их потенциальных возможностях в качестве диагностических маркеров. Разнообразие клинического течения, отсутствие у 20 % пациентов выявляемых хромосомных aberrаций или соматических мутаций определяют интерес к исследованию эпигенетических аспектов патогенеза. В этой связи нкРНК представляются одними из перспективных диагностических маркеров, поскольку их экспрессия, как правило, тканеспецифическая и они достаточно стабильны в жидкостях организма. Среди регуляторных нкРНК, вовлеченных в патогенез ХЛЛ, наиболее изучены микроРНК, длинные (lncRNA) и, в меньшей степени, кольцевые (циркуляторные) нкРНК (circRNA). Аномальная экспрессия нкРНК может послужить причиной резистентного течения ХЛЛ при отсутствии выявленных нарушений генома. Биоинформационный анализ баз данных секвенирования РНК позволяет выделять новые нкРНК молекулы-кандидаты, в т. ч. связанные с подавлением транспозонов с помощью РНК, взаимодействующих с белками Piwi. Предложены новые независимые прогностические модели, основанные на оценке экспрессии одновременно 2 (LNC-KIA1755-4, LNC-IRF2-32-LNCRNA), 4 (miR-125b, miR-15b, miR-181c, miR-412) и 6 (PRKCQ, TRG.AS1, LNC00467, LNC01096, PCAT6, SBF2.AS1) различных нкРНК. Поскольку разграничение гематологических злокачественных опухолей по группам риска и стадиям заболевания выполняется с учетом не только клинических, но и молекулярно-генетических маркеров, мониторинг уровня экспрессии регуляторных нкРНК может стать дополнительным инструментом более эффективной стратификации больных. В настоящем обзоре отражены существующие методические проблемы выполнения аналитических процедур, которые являются основным сдерживающим фактором широкого использования лабораторных тестов по определению нкРНК.

This paper reviews current knowledge about regulatory non-coding protein RNAs (ncRNAs) involved in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and their potential capabilities as diagnostic markers. Diversity of clinical course as well as absence of detectable chromosomal aberrations and somatic mutations in 20 % of patients increase the interest to study the epigenetic aspects of pathogenesis. In this context, ncRNAs are believed to be promising diagnostic markers since their expression is commonly tissue-specific and they are quite stable in body fluids. Among the regulatory ncRNAs involved in the CLL pathogenesis, microRNAs and long (lncRNAs) have been most studied, whereas ring-like, or circulatory, ncRNAs (circRNAs) require further analysis. Aberrant expression of ncRNAs may account for the resistance to treatment in CLL patients without detected genomic abnormalities. Bioinformatics analysis of RNA sequencing databases allows to isolate novel candidate ncRNA molecules, including those associated with RNA-mediated suppression of the Piwi protein-interacting transposons. This paper proposes new independent predictive models based on the expression of 2 (LNC-KIA1755-4, LNC-IRF2-32-LNCRNA), 4 (miR-125b, miR-15b, miR-181c, miR-412), and 6 (PRKCQ, TRG.AS1, LNC00467, LNC01096, PCAT6, SBF2.AS1) simultaneously assessed different ncRNAs. Since risk- and stage classification of hematological malignancies is performed not only on the basis of clinical but also molecular genetic markers, the monitoring of regulatory ncRNA expression can provide an additional tool for more effective stratification of patients. The present review is concerned with the methodology issues in analytical procedures which impede widespread use of laboratory ncRNA tests.

Ключевые слова: регуляторные не кодирующие белок РНК, хронический лимфолейкоз, молекулярно-генетическая диагностика.

Получено: 24 августа 2023 г.

Принято в печать: 10 марта 2024 г.

Для переписки: Игорь Алексеевич Ольховский, канд. мед. наук, а/я 16300, Красноярск, Российская Федерация, 660001; e-mail: krashemcenter@mail.ru

Для цитирования: Столяр М.А., Горбенко А.С., Ольховский И.А. Диагностический потенциал регуляторных не кодирующих белок РНК при хроническом лимфоцитарном лейкозе. Клиническая онкогематология. 2024;17(2):154–65.

DOI: 10.21320/2500-2139-2024-17-2-154-165

Keywords: regulatory non-coding protein RNAs, chronic lymphocytic leukemia, molecular genetic diagnosis.

Received: August 24, 2023

Accepted: March 10, 2024

For correspondence: Igor Alekseevich Olkhovskii, MD, PhD, а/я 16300, Krasnoyarsk, Russian Federation, 660001; e-mail: krashemcenter@mail.ru

For citation: Stolyar MA, Gorbenko AS, Olkhovskii IA. Diagnostic Potential of Regulatory Non-Coding Protein RNAs in Chronic Lymphocytic Leukemia. Clinical oncohematology. 2024;17(2):154–65. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2024-17-2-154-165

ВВЕДЕНИЕ

Хронический лимфоцитарный лейкоз, или В-клеточная лимфома из малых В-лимфоцитов (В-ХЛЛ), — одна из наиболее распространенных злокачественных опухолей и составляет около 30 % всех случаев лейкоза [1–3]. Клиническое течение заболевания отличается гетерогенностью, и достаточно часто (3,5–12,0 % среди здоровых людей) обнаруживается бессимптомная персистенция моноклональных лимфоцитов ($< 5 \times 10^9/\text{л}$) — моноклональный В-клеточный лимфоцитоз [1].

Современные подходы терапии существенно повысили продолжительность и качество жизни пациентов. Однако ХЛЛ остается неизлечимым заболеванием, а молекулярные механизмы его прогрессирования и развития лекарственной резистентности недостаточно изучены. При этом в последние годы с развитием технологий секвенирования РНК появляется все больше данных об их участии в патогенезе гематологических злокачественных опухолей, включая ХЛЛ.

Цель настоящего обзора — обобщить современные данные о потенциальном диагностическом значении регуляторных не кодирующих белок РНК при ХЛЛ.

ОСНОВНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ХЛЛ

ХЛЛ характеризуется накоплением клональных В-лимфоцитов CD5+ в крови, костном мозге, лимфатических узлах и селезенке [4]. Первичным лабораторным диагностическим маркером служит присутствие в крови более $5 \times 10^9/\text{л}$ клональных В-лимфоцитов.

Имунофенотипическое исследование с использованием многоцветной проточной цитометрии — один из основных диагностических методов, позволяющих подтвердить клональную природу В-лимфоцитов. К важным маркерам тяжести течения ХЛЛ относят экспрессию в В-клетках цитоплазматической тирозинкиназы ZAP-70, которая в норме вовлечена в инициацию сигнального пути Т-клеточного рецептора [5]. Экспрессия несвойственного для зрелых лимфоцитов

антигена рецепторной трансмембранной тирозинкиназы ROR1 считается одним из кандидатов для оценки прогноза и минимальной остаточной болезни, а также рассматривается как потенциальная мишень для иммунотерапии [6, 7].

Известными диагностическими маркерами ХЛЛ являются хромосомные и молекулярно-генетические поломки [1, 6]. Наиболее частыми хромосомными изменениями при первичном выявлении заболевания считаются делеции хромосом 13q14.3 (~55 %), 11q22 (~25 %) и 17p13 (~5–8 %), а также трисомия хромосомы 12 (~10 %). Важным прогностическим фактором служит наличие мутаций в генах, кодирующих вариабельные области тяжелых цепей иммуноглобулина (IgHV), а также отдельные стереотипные варианты В-клеточного рецептора [8].

Соматические мутации в ряде генов сигнальных путей В-клеточного рецептора, NF-κB и Toll-подобного рецептора связаны с устойчивостью к противоопухолевой терапии и ухудшением показателей безрецидивной выживаемости [9, 10]. Наиболее существенными отрицательными прогностическими маркерами признаются делеция участка хромосомы 17p и/или соматические мутации в гене TP53 [11]. Вместе с тем примерно у 20 % пациентов с ХЛЛ отсутствуют выявляемые хромосомные aberrации и соматические мутации, а течение ХЛЛ, как и ответ на лечение, не всегда коррелирует с генетическими поломками [9, 12]. Гетерогенность клинических проявлений ХЛЛ сохраняется также в биологических вариантах мутаций в генах IgHV [7, 8, 13–17]. Открытыми остаются вопросы оценки рисков развития ХЛЛ из моноклонального В-клеточного лимфоцитоза, необходимости превентивных воздействий, а также предсказания эффективности различных режимов терапии и трансформации ХЛЛ в синдром Рихтера. В поисках более информативных прогностических критериев внимание исследователей привлекает изучение транскриптома* клеток ХЛЛ.

* Транскриптом — это совокупность всех транскриптов, синтезируемых одной клеткой или группой клеток, включая мРНК и не кодирующие белок РНК.

Таблица 1. Регуляторные микроРНК при ХЛЛ

МикроРНК	Изменение экспрессии	Мишень или сигнальный путь	Патогенетические и клинические ассоциации	Источник
miR-150	Повышение	PI3K/AKT/mTOR	Корреляция со статусом генов IgHV, ZAP-70, стадией заболевания	[26]
miR-155	Повышение	PI3K/AKT/mTOR	Корреляция с прогрессированием, ухудшение показателей общей выживаемости	[28]
miR-150, miR-29a, miR-20a	Повышение	PI3K/AKT/mTOR	Корреляция с экспрессией ZAP-70. miR-20a коррелирует со стадией заболевания	[23]
miR-192	Снижение	TP53	Снижение при ХЛЛ по сравнению с группой доноров крови	[38]
miR-363	Повышение	SIRT6/PI3K/AKT	Характерно для пациентов с поздними стадиями заболевания	[30]
miR-15a/16-1	Снижение при делеции 13q14.3	Bcl-2, NF-κB	Соответствует прогнозу при делеции 13q14.3	[31]
miR-181a, miR-221	Повышение	NF-κB/STAT3	Благоприятный прогноз	[32]
miR-34a	Снижение	WNT/β-катенин	Отражает функциональные последствия делеции 17p	[33]
miR-181b	Снижение	PI3K/AKT/mTOR	Более ранняя потребность в начале терапии	[34]
miR-125a, miR-34a	Повышение miR-125a, снижение miR-34a	Bcl-2	Развитие синдрома Рихтера	[24]
miR-21, miR-148a, miR-222	Повышение	PI3K/AKT/mTOR	Прогноз резистентности к флударабину	[29]
Кластер miR 17-92	Повышение miR-17-5p	TCL1	Высокий риск прогрессирования (стадии III–IV по Rai)	[35]
miR 125b, miR-181c, miR-15b, miR-412	Повышение	Неизвестно	Связаны с низким риском раннего рецидива при терапии FCR	[36]
miR 125b, miR-193b	Снижение	TGF-β, NOTCH	Более частые рецидивы при терапии FCR	[37]

FCR — флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб; IgHV — варибельная область тяжелых цепей иммуноглобулина; TGF-β — трансформирующий фактор роста β; ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

Поскольку генетическая и эпигенетическая гетерогенность ХЛЛ не всегда коррелирует с его клинической гетерогенностью, в последнее десятилетие внимание исследователей сместилось в сторону изучения транскриптома клеток ХЛЛ. Результаты секвенирования РНК в клетках ХЛЛ демонстрируют изменения в экспрессии примерно 500 генов [18, 19], при этом только 2 % РНК этих генов кодируют белки. Среди не кодирующих белок РНК (нкРНК) выделяют группу регуляторных нкРНК. В их число входят малые (< 200 п. н.) нкРНК (микроРНК, интерферирующие РНК, Рiwi-взаимодействующие РНК) и длинные (> 200 п. н.) нкРНК, а также кольцевые (циркуляторные) нкРНК (circRNA).

Показано, что регуляторные нкРНК вовлечены во все клеточные процессы, их уровень значительно изменяется при различных опухолевых заболеваниях. При ХЛЛ они влияют на прогноз и развитие резистентности к терапии [20–22]. Наиболее полно к настоящему времени изучены регуляторные микроРНК.

Регуляторные микроРНК

МикроРНК представляют собой короткие молекулы РНК длиной около 21–23 нуклеотидов. Они осуществляют регуляцию важных процессов в клетках, включая апоптоз, пролиферацию, дифференцировку и ангиогенез, играющих важную роль в канцерогенезе [23]. Биосинтез микроРНК является сложным процессом, включающим несколько этапов, и достаточно полно описан ранее [24].

В процессе биосинтеза двухцепочечная молекула РНК-предшественник связывается с белком Ago2. При этом только одна цепь, называемая ведущей, остается связанной с Ago2, вторая цепь, «пассажирская»,

впоследствии деградирует. Полученный после связывания с Ago2 комплекс обеспечивает дальнейшее распознавание целевых мишеней мРНК. Если комплементарность нуклеотидной последовательности мРНК соответствует центральной области микроРНК (нуклеотиды 9–11), то мРНК-мишень может быть расщеплена благодаря эндонуклеазной активности Ago2. Одна и та же микроРНК может взаимодействовать с большим количеством различных мРНК, имеющих соответствующие сайты связывания [25].

Образующиеся в процессе биосинтеза «пассажирские» цепи не сразу расщепляются и могут по-разному экспрессироваться у разных видов, в разных тканях, на разных стадиях развития и при определенных патологических состояниях [24]. Этот факт отражен в номенклатуре микроРНК. В ней микроРНК, образованная из ведущей цепи, обозначается суффиксом «5p» (из 5'-плеча предшественника), а микроРНК из «пассажирской» цепи — суффиксом «3p» (из 3'-плеча предшественника). Наименования конкретных микроРНК формируются с использованием префикса «miR» и уникального идентификационного номера, который присваивается в последовательном порядке регистрации новых молекул (например, miR-1, miR-2 и т. д.). Гомологичные микроРНК обозначаются одинаковой цифрой с добавлением латинской буквы (например, miR-2a, miR-2b). Если в геноме человека имеется два и более участков, кодирующих идентичный основной продукт микроРНК, то такая микроРНК обозначается дополнительно цифрой 1 или 2, например: hsa-miR-16-1 для гена на хромосоме 13 и hsa-miR-16-2 для аналогичного гена на хромосоме 3 (hsa — идентификатор видовой принадлежности человеку) [25, 26]. Известные к настоящему времени

данные об участии отдельных микроРНК в патогенезе ХЛЛ приведены в табл. 1.

Цркулирующие микроРНК являются ценными биомаркерами, поскольку они обладают сравнительно высокой стабильностью в жидкостях организма. Известно три основных источника циркулирующих в крови микроРНК. Во-первых, появление микроРНК в крови является результатом разрушения мембраны клеток. Во-вторых, возможен активный процесс высвобождения микроРНК из клетки в формирующиеся микровезикулы. Согласно третьему варианту, активная избирательная секреция отдельных микроРНК из клеток происходит непосредственно в межклеточное пространство без участия микровезикул [25].

Цркулирующие микроРНК отражают сложные взаимосвязи регуляции синтеза белка, которые способствуют пролиферации опухолевых В-клеток на ранних стадиях заболевания, что делает их потенциально мощным инструментом ранней диагностики и прогнозирования ответа на терапию. Первые доказательства ключевой роли микроРНК в развитии злокачественных опухолей были как раз получены при изучении ХЛЛ у пациентов с делецией хромосомы 13q14. G.A. Calin и соавт. [31] впервые продемонстрировали, что делеция области в длинном плече хромосомы 13q приводит к потере двух микроРНК: miR-15a и miR-16. Последние, связывая мРНК, приводят к увеличению активности Bcl-2 и ингибированию апоптоза. Экспрессию miR-15a/miR-16-1 предложено рассматривать в качестве маркеров функциональных последствий делеций хромосомы 13q [28].

Цркулирующие микроРНК обнаруживаются в плазме и сыворотке, и их количество существенно изменяется в образцах пациентов с ХЛЛ [21]. В частности, по профилю 14 микроРНК в плазме удается статистически значимо отличить образцы пациентов с ХЛЛ от образцов здоровых людей и пациентов с другими вариантами лейкоза [37]. В другом исследовании оценивался профиль микроРНК в В-лимфоцитах крови у пациентов с впервые диагностированным ХЛЛ в сравнении с донорами крови [32]. Установлено, что при ХЛЛ уровень микроРНК, включая miR-34a, miR-155 и miR-342-3p, был повышен, а miR-103, miR-181a и miR-181b — снижен [32]. В крови пациентов с ХЛЛ также регистрируется значительное снижение уровня miR-192 по сравнению со здоровыми донорами [38]. Эти данные свидетельствуют о возможном использовании нкРНК в ранней диагностике ХЛЛ.

Группа генов, образующих кластер miR-17/92, непосредственно не теряется при типичных для ХЛЛ хромосомных делециях. Однако их транскрипция значительно увеличивается при немутантном варианте ХЛЛ по генам IgHV. Показано, что высокая экспрессия miR-17-5p связана с другими неблагоприятными прогностическими факторами (в т. ч. экспрессией CD38 и ZAP-70), а miR-20a можно, наоборот, рассматривать как благоприятный прогностический фактор, т. к. она тесно связана с низкой экспрессией ZAP-70/CD38 и с отсутствием неблагоприятных цитогенетических aberrаций [35].

Цркулирующая miR-20a обратно коррелирует с экспрессией гена ZAP70, при этом низкие уровни

микроРНК соответствуют худшему прогнозу [37]. При исследовании у 273 больных ХЛЛ обнаружены гиперэкспрессия miR-150 в клетках и высокий ее уровень в сыворотке по сравнению с контрольной группой доноров. У пациентов с ХЛЛ низкий уровень клеточной экспрессии miR-150 был связан с размером опухолевой массы, агрессивным течением ХЛЛ и наличием неблагоприятных прогностических факторов [26]. Кроме того, показано, что miR-181a, miR-181b и miR-221 снижаются в мононуклеарах у пациентов с более низким риском прогрессирования ХЛЛ [34, 39].

Хорошо известно, что характерная для ХЛЛ повышенная активация сигнального пути рецептора В-клеток (BCR) индуцирует экспрессию ключевого регулятора клеточного цикла MYC, который, в свою очередь, регулирует уровень экспрессии кластера генов miR-17/92 [40]. Экспрессия микроРНК одного из членов генетического кластера miR-17/92-miR-29 наряду с другой микроРНК miR-181 тормозит экспрессию гена *TCL1* (Т-клеточный лейкоз-лимфома 1). Продукт этого гена (белок TCL-1) активирует сигнальный путь АКТ и ингибирует активность ДНК-метилтрансфераз DNMT3A и DNMT3B [41]. Соответственно низкие уровни микроРНК miR-29 и miR-181 коррелируют с высокой экспрессией гена *TCL1* и характерны для агрессивных клинических вариантов ХЛЛ [42]. С прогностической целью наряду с делецией хромосомы 17p предлагается определять связанные с активностью гена *TP53* микроРНК miR-15a, miR-21, miR-34a, miR-155 и miR-181b как количественные показатели нарушенной проапоптотической функции [29, 43–46]. МикроРНК miR-34a, как и miR-34b/c, являются прямыми мишенями белка p53, посредством которых реализуется его влияние на апоптоз, остановку клеточного цикла и старение. Во многих типах опухолей промоторы генов miR-34a и miR-34b/c инактивируются CpG-метилованием без выявленных нарушений структуры хромосомы 17. Этим, вероятно, объясняется то, что miR-34a подавляется не только у пациентов с делецией 17p или мутацией в гене *TP53*, но и у больных ХЛЛ, рефрактерным к флударабину, и без выявленных хромосомных aberrаций [33].

В работе I. Duroux-Richard и соавт. показано, что для определения прогноза ХЛЛ большое значение имеет соотношение экспрессии отдельных микроРНК [36]. Так, ни у одного из пациентов с высоким уровнем экспрессии одновременно трех микроРНК (miR-125b, miR-15b, miR-181c) не отмечалось рецидивов заболевания в период наблюдения. В то же время у пациентов с высоким уровнем miR-125b, miR-412, но низким уровнем miR-15b, а также у больных с низким уровнем экспрессии как miR-125b, так и miR-193b рецидивы развивались статистически значимо чаще. В исследовании A. Alharthi и соавт. продемонстрировано увеличение miR-363 в плазме у пациентов с ХЛЛ на поздней стадии по сравнению с больными с ранними стадиями или здоровыми донорами крови [30]. R. Visone и соавт. обнаружили, что немутантный вариант ХЛЛ по генам IgHV, высокая экспрессия белка ZAP-70, как и низкая экспрессия микроРНК miR-223, miR-29c, miR-29b, miR-181 были тесно связаны с прогрессированием ХЛЛ при наличии делеции 17p. У лиц с трисомией хромосомы 12 высокая экспрессия

miR-181a свидетельствовала о более агрессивном течении заболевания [34].

В работе К. Vargova и соавт. отмечалось, что miR-155 коррелировала со стадиями заболевания, повышаясь при прогрессировании ХЛЛ [46]. Кроме того, показано, что уровень циркулирующей miR-155 перед началом лечения ХЛЛ был значительно выше у пациентов, у которых в последующем не удалось достичь полной ремиссии, по сравнению с теми, у кого констатирован полный ответ [47].

Экспрессия семейства miR-181 обратно коррелирует с резистентностью к противоопухолевой терапии, а высокий уровень экспрессии miR-181b служит предвестником лучшей выживаемости. Наоборот, гиперэкспрессия микроРНК miR-155 и miR-21 имеет место у пациентов с неблагоприятным прогнозом, а их уровни позволяют дифференцировать пациентов с ХЛЛ, рефрактерным и чувствительным к флударабину [44, 48]. В работе М. Ferracin и соавт. продемонстрировано, что микроРНК miR-148a, miR-222 и miR-21 значительно более высоко экспрессировались у пациентов, не ответивших на лечение как до, так и после назначения флударабина, что делает их перспективными маркерами прогноза эффективности данной терапии [29]. Кроме того, как описано ранее, потеря miR-15/16 служит одним из начальных событий в патогенезе ХЛЛ, вызывающим избыточную экспрессию Bcl-2 [2]. Соответственно ингибитор Bcl-2 венетоклакс показывает частоту ответа 80 % у этих пациентов даже при наличии делеции 17p [2].

Недавно была идентифицирована еще одна мишень miR-15/16 — мРНК гена *ROR1*, участвующего в сигнальном пути рецептора WNT5A. Ген *ROR1* не экспрессируется в нормальных тканях, но высоко экспрессируется при ХЛЛ, лишенном кластера miR-15/16. Следовательно, комбинированная терапия на основе венетоклакса и антител к ROR-1 (цирмтузумаб) у таких пациентов оказывает синергическое действие на клетки ХЛЛ [49]. Ранее в нашей работе было показано, что в процессе терапии ХЛЛ снижается уровень miR-155 в плазме, как и уровень мРНК *ROR1* в лейкоцитах крови, что свидетельствует о перспективности комбинации данных РНК-маркеров для оценки минимальной остаточной болезни при ХЛЛ [50].

Регуляторные не кодирующие белок piwiRNA

Молекулы piwiRNA нуклеотидов со специфическим 2'-О-метилованием на их 3'-конце имеют длину 26–30 нуклеотидов и вместе с малыми интерферирующими РНК (миРНК) и микроРНК составляют три основные группы регуляторных малых нкРНК. Эти группы с различными способами биогенеза и регуляции имеют некоторые общие черты. Однако piwiRNA обладают тремя уникальными особенностями, которые отличают их от аналогов. Во-первых, piwiRNA происходят из межгенных областей (известных как кластеры piwiRNA) посредством Dicer-независимого механизма. Во-вторых, в отличие от миРНК и микроРНК, которые имеют двухцепочечные транскрипционные предшественники, предшественники piwiRNA представляют собой одноцепочечные транскрипты. Наконец, piwiRNA обнаруживают 2'-О-метилую модификацию на 3'-конце и специ-

чески связываются с белками Piwi, что позволяет выполнять соответствующие функции в организме человека [51]. На уровне транскрипции piwiRNA и белки Piwi напрямую модифицируют структуру хроматина и гистоновые белки в ядре посредством регуляции ДНК-метилтрансферазы. На посттранскрипционном уровне piwiRNA и белки Piwi индуцируют деградацию мРНК посредством механизма деаденилирования.

Все piwiRNA можно разделить на пять групп в зависимости от происхождения: происходящие от транспозона, происходящие от мРНК, происходящие от транспортной РНК (тРНК), производные от длинной не кодирующей белок РНК (lncRNA) и производные от малой ядрышковой РНК. После расщепления и модификации промежуточные piwiRNA затем образуют зрелые piwiRNA в комплексе с белками Piwi, посредством которых реализуются их функции регуляции генома. Подсчитано, что геном человека содержит около 23 000 различных piwiRNA, что заметно больше, чем микроРНК (приблизительно 3000), но аналогично белкам, кодируемым генами мРНК (около 20 000). К настоящему времени piwiRNA обнаружены как в клетках зародышевой линии, так и в соматических клетках живых организмов. Аберрантная экспрессия piwiRNA выявлена при различных новообразованиях и заболеваниях репродуктивной системы. Уровень piwiRNA в кровотоке относительно стабильный и обнаруживается в жидких средах организма. В связи с этим piwiRNA также предложено использовать в качестве диагностических биомаркеров при злокачественных опухолях, однако пока известны лишь единичные случаи. Так, например, piR-54265 служит молекулярным маркером раннего скрининга колоректального рака [52]. Авторы биоинформационного анализа предсказали возможное диагностическое значение 28 piwiRNA при ХЛЛ [53].

Регуляторные длинные не кодирующие белок РНК

Согласно обширной базе данных сбора и аннотирования нкРНК (NONCODEv6), было идентифицировано более 1 000 000 lncRNA, около 18 000 были подтверждены в консорциуме проекта «Энциклопедия элементов ДНК» (ENCODE) [54]. Как и в случае мРНК, lncRNA транскрибируются РНК-полимеразой II, а затем подвергаются посттранскрипционным модификациям. lncRNA имеют небольшую открытую рамку считывания и, располагаясь как в ядре, так и в цитоплазме, функционируют посредством многочисленных взаимодействий с ДНК, РНК и белками. Их ключевая роль заключается в регуляции экспрессии генов, что достигается путем воздействия на модификацию хроматина.

Согласно молекулярным механизмам действия, lncRNA можно классифицировать на четыре группы: направляющие, «приманки», сигнальные и каркасные. «Приманки» lncRNA опосредуют секвестрирование различных регуляторных молекул, таких как факторы транскрипции, модификаторы хроматина или субъединицы каталитического белка. Таким образом, связываясь с факторами транскрипции, lncRNA действует как «губка», удаляя их из промоторных областей генов-мишеней, ингибируя экспрессию

генов. С другой стороны, «приманки» lncRNA могут выступать, наоборот, как активаторы транскрипции, связываясь с транскрипционными факторами так, что это приводит к их активирующим конформационным изменениям. Сигнальные lncRNA действуют как регуляторные молекулы в ответ на различные стимулы. Их транскрипция происходит в определенное время и в определенном месте, в зависимости от клеточного контекста стимулов. Одним из таких стимулов служит повреждение ДНК, активирующее специфическую экспрессию lincRNA-p21 и PANDAR. Другие сигнальные lncRNA участвуют в генетическом импринтинге путем маркировки определенного места с учетом момента времени или стадии для регуляции генов [55, 56].

Классификация lncRNA основана на нескольких критериях, которые не являются взаимно согласованными. Опираясь на геномный контекст (местоположение, ориентация, направление транскрипции) относительно генов, кодирующих белок, lncRNA можно классифицировать как интронные, антисмысловые, внутригенные, промоторные и энхансерные. Интронные lncRNA расположены в интроне какого-либо другого транскрипта. Межгенные lncRNA находятся полностью вне кодирующих генов без какого-либо перекрытия. Некоторые lncRNA расположены в экзонах или перекрываются с другими генами. Исходная цепь для транскрипции lncRNA может быть смысловой или антисмысловой, а направление транскрипции, когда lncRNA и кодирующие гены транскрибируются из одной и той же цепи, может быть расходящимся или сходящимся. Номенклатуру конкретных lncRNA, очевидно, нельзя считать оптимальной, поскольку наименования отдельных молекул исторически формировалось авторами, впервые описавшими структурную последовательность рибонуклеотидов, а также биологическую роль молекулы и чаще всего на основании связи с каким-либо биологическим эффектом [55].

Гены lncRNA *DLEU1/2* локализованы на хромосоме 13 и часто утрачиваются при делеции 13q14.3. Эта область включает в себя два смежных субрегиона, кодирующих *DLEU1* и *DLEU2*. Ген *DLEU2* (также известный как lnc-SPRYD7-1) негативно регулирует циклины D1 и E1 через связывание miR-15A и miR-16-1, что играет важную роль в патогенезе ХЛЛ. Кроме того, A. Garding и соавт. обнаружили, что гены *DLEU1* и *DLEU2* были значительно деметилированы на их соответствующем 5'-конце почти у всех пациентов с ХЛЛ, что приводит к ослаблению транскрипции смежных последовательностей, кодирующих гены-супрессоры опухоли [57].

В исследовании D. Ronchetti и соавт. [76] выявлена комбинация 12 и 20 различных lncRNA, тесно связанных с уровнем экспрессии ZAP-70 или CD38 соответственно. Среди них пять lncRNA (lnc-IRF2-3, lnc-AC004696.1-1, lnc-TNFRSF13B-5, lnc-C1orf132-1, lnc-BACH1-1) были общими, что согласуется с представлением о том, что CD38 и ZAP-70 представляют собой суррогатные маркеры мутационного статуса генов IgHV. Обнаружено также снижение экспрессии расположенной в 11q13 lnc-LTBP3-2, антисмысловой к другим онкогенным lncRNA NEAT1 (nuclear enriched abundant transcript 1) и MALAT1 (metastasis-associated

lung adenocarcinoma transcript 1). Только две lncRNA по-разному экспрессировались у пациентов с делецией 17p. В результате авторы предложили новую информативную прогностическую модель, основанную на экспрессии двух lncRNA (LNC-KIA1755-4 и LNC-IRF2-32-LNCRNA), независимую от других прогностических шкал, учитывающих мутационный статус генов IgHV, экспрессию CD38 и ZAP-70, мутации в гене *NOTCH1* и неблагоприятные цитогенетические поломки.

Результаты анализа общедоступных баз данных экспрессии генов при ХЛЛ позволили сформировать еще одну прогностическую шкалу на основе связанных с процессами ферроптоза молекулами lncRNA (PRKCQ, TRG.AS1, LNC00467, LNC01096, PCAT6, SBF2.AS1) [58]. Дополнительно к указанным выше lncRNA предполагается участие в патогенезе ХЛЛ также lncRNA NEAT1 и LINC RNA-P21 в связи с их вовлечением в p53-зависимый механизм реакции на повреждение ДНК [59]. Обобщенные данные об участии lncRNA в патогенезе ХЛЛ представлены в табл. 2.

Кольцевые РНК

Кольцевые, или циркулярные, РНК (circRNA) представляют отдельный класс консервативных одноцепочечных молекул РНК, полученных из экзонных или интронных последовательностей путем обратного сплайсинга предшественников мРНК. В отличие от канонических линейных РНК circRNA образуют ковалентно замкнутые, непрерывные и достаточно стабильные петли без 5'-концевого кэпа и 3'-концевого поли(А)-хвоста, а следовательно, устойчивы к расщеплению экзонуклеазами. Большинство circRNA специфичны для конкретных тканей или стадии развития болезни [77]. Все circRNA подразделяют на четыре категории: экзонные (ecircRNA), кольцевые интронные (ciRNA), экзон-интронные (EicRNA) и тРНК-интронные (tricRNA). Среди различных типов circRNA наиболее изучены ecircRNA, на долю которых приходится более 80 % всех circRNA [78].

circRNA рассматриваются как конкурирующие эндогенные РНК, которые регулируют альтернативный сплайсинг или транскрипцию, связывают или секвестрируют белки, участвуют в генерации псевдогенов. Известно, что несколько circRNA регулирует эпигенетические изменения, такие как модификация гистонов и метилирование ДНК. Сообщается, что circRNA участвуют в физиологических и патологических процессах четырьмя уникальными способами. Во-первых, circRNA могут функционировать в качестве так называемых адсорбирующих губок miRNA-sponge для микроРНК или белков-рибопротеинов. Известные данные свидетельствуют о том, что circRNA содержат сайты связывания микроРНК [78]. По этой причине они могут блокировать связывание микроРНК с областью 3'-UTR их мРНК-мишеней и тем самым положительно регулировать экспрессию мРНК. При этом микровезикулы, действуя как капсулы доставки, могут транспортировать комплекс circRNA-микроРНК к тканям-мишеням. В них микроРНК и рибопротеины высвобождаются из комплекса с circRNA посредством деградации circRNA-носителя или с помощью других механизмов.

Во-вторых, circRNA напрямую регулирует транскрипцию генов [79, 80]. При этом ciRNA и EicRNA

Таблица 2. Длинные не кодирующие белок РНК при ХЛЛ (цит. по [56, 61])

Название lncRNA	Изменение экспрессии	Мишень или сигнальный путь	Патогенетические и клинические ассоциации	Источник
DLEU1/2	Снижение	miR-12a, miR-16-1; NF-κB	Корреляция с неблагоприятным прогнозом	[57, 61–63]
MALAT1	Повышение	EZH2	Индукция пролиферации и торможение апоптоза клеток; статистически значимых различий между прогностическими группами нет	[64]
MIAT	Повышение	OCT4	Увеличение экспрессии коррелирует с ранней летальностью	[65]
GATA6-AS1	Снижение	miR-543; PTEN/AKT	Ингибирует клеточную пролиферацию. Метилирование GATA6-AS1 коррелирует со стадией по Rai	[67]
TRERNA1	Повышение	microRNA-190a. Усиливает защиту от повреждения ДНК, опосредованного цитотоксичностью	Связана с маркерами агрессивного течения заболевания, более коротким временем до лечения, худшей общей выживаемостью	[67]
lncRNA-p21	Снижение	Активируется p53 и связывает hnRNP-K, что вызывает апоптоз	Прогноз благоприятный	[68–70]
NEAT1	Снижение	Активируется p53	Прогноз благоприятный	[59, 71]
AC092652.2-202	Повышение	ARHGAP15	Связана с неблагоприятным прогнозом	[72]
BM74240	Снижение	Метилирование гена <i>BM742401</i> связано с метилированием гена, кодирующего miR-129-2	Более высокая экспрессия служит маркером благоприятного прогноза	[66]
CRNDE	Снижение	miR-28	Подавляет пролиферацию, индуцирует апоптоз клеток	[73]
GAS5	Снижение	miR-222	Подавляет пролиферацию	[74]
LEF1-AS1	Повышение	LEF1	Ингибирует апоптоз клеток	[75]
lnc-IRF2-3 и lnc-KIAA1755-4	Повышение	Неизвестно	Соотношение экспрессии — независимый индикатор прогноза в отношении безрецидивной выживаемости	[76]
PRKCO, TRG.AS1, LNC00467, LNC01096, PCAT6, SBF2.AS1	Разнонаправленное	Связаны с ферроптозом опухолевых клеток	Соотношение экспрессии — независимый индикатор прогноза в отношении общей выживаемости	[58]

регулируют транскрипцию генов по-разному. siRNA действуют в основном за счет накопления в транскрипционной области родительского гена, усиливая активность полимеразы II для регуляции транскрипции [79]. EicRNA способствуют транскрипции преимущественно за счет взаимодействия с малой РНК U1 (snRNP) в области промотора гена и связывания с полимеразой II [80].

В-третьих, circRNA могут воздействовать на разные белки с образованием кольцевых РНК-белковых комплексов (circRNP). Последние регулируют действие и субклеточную локализацию белков или экспрессию генов-мишеней. Некоторые circRNA могут действовать как «приманка» для регуляции экспрессии генов путем связывания или диссоциации белков. Некоторые circRNA могут использоваться в качестве белковых каркасов для белок-белковых взаимодействий [80].

В-четвертых, накопленные данные показали, что хотя не кодирующие белок свойства circRNA традиционно обусловлены отсутствием свободных 5'- и 3'-концов молекул, тем не менее circRNA все-таки могут транслироваться в пептиды или белки [81].

Все больше данных указывает на то, что circRNA играют решающую роль в канцерогенезе и лекарственной устойчивости злокачественных опухолей [79–81]. Растущее число исследований свидетельствует о том, что circRNA связаны с химиорезистент-

ностью при лейкозах [82–84]. Известно также, что circRNA могут оказывать влияние на микроокружение опухоли посредством межклеточной коммуникации из-за их обилия в экзосомах межклеточных жидкостей. Недавнее открытие «кода circRNA-микроРНК», в котором два отдельных типа молекул РНК специфически взаимодействуют друг с другом, что определяет достижение конкретного уровня экспрессии генов, представляется многообещающей областью фундаментальных исследований [85].

В отличие от линейных мРНК уникальные ковалентно замкнутые структуры позволяют circRNA избегать деградации, что обеспечивает их большую стабильность в биологических образцах так же, как и микроРНК [77]. circRNA определяются в плазме, моче, образцах тканей, слюне и других биологических жидкостях. Паттерны экспрессии и характеристики circRNA (высокая и селективная распространенность, высокая стабильность, высокая консервативность и специфическая экспрессия) обуславливают перспективность их использования в качестве потенциальных биомаркеров или терапевтических мишеней.

Исследования диагностического значения circRNA при гематологических опухолях пока в основном посвящены хроническому миелолейкозу (ХМЛ). Н.Х. Сао и соавт. продемонстрировали, что Circ_0009910 активировалась в клетках пациентов с ХМЛ, резистентным к иматинибу, и способствовала развитию устойчи-

Таблица 3. Регуляторные сигнальные пути, включающие circRNA/микроРНК/белки-мишени при ХЛЛ (цит. по [86])

Название circRNA	Изменение экспрессии	Мишень или сигнальный путь	Патогенетические и клинические ассоциации	Источник
circ_0132266	Снижение	miR-337-3p; PML	Участвует в обеспечении жизнеспособности клеток В-ХЛЛ	[87]
circ-RPL15	Повышение	miR-146b-3p	Прогноз неблагоприятный, высокая вероятность прогрессирования	[89]
circ-CBFB	Повышение	Путь Wnt/ β -катенин через miR-607/FZD3	Способствует пролиферации и ингибирует апоптоз клеток	[88]
mc-COX2	Повышение	Неизвестно	Способствует пролиферации и ингибирует апоптоз клеток	[90]
circZNF91	Повышение	miR-1283; WEE1	Способствует формированию опухолевого фенотипа клеток В-ХЛЛ	[91]

ности к препарату за счет регуляции miR-34a-5p и гена *ULK1*, а также индукции аутофагии [83].

Вовлеченность circRNA в патогенез ХЛЛ до сих пор остается малоизученным направлением. В настоящее время известно всего несколько посвященных данной проблеме исследований (табл. 3) [86]. W. Deng и соавт. [86] изучили экспрессию 13 368 circRNA у 21 пациента с ХЛЛ. В результате обнаружено, что независимо от клинических, прогностических или генетических характеристик клетки ХЛЛ имеют отличный от нормальных В-лимфоцитов профиль экспрессии circRNA. В исследовании W. Wu и соавт. [87] показано, что кольцевая РНК circMTO1 (*hsa_circ_0132266*) была заметно снижена в мононуклеарных клетках крови у пациентов с ХЛЛ по сравнению с контрольной группой. Предполагается, что *hsa_circ_0132266* способствует прогрессированию ХЛЛ посредством сигнального каскада *hsa_circ_0132266*/miR-337-3p/PML, поскольку она служит эндогенной «губкой» для miR-337-3p и они вместе регулируют экспрессию гена *PML*. L. Xia и соавт. [88] показали, что кольцевая РНК circCBFB (*hsa_circ_0000707*) играет решающую роль в онкогенезе ХЛЛ. Она связывает miR-607 и, соответственно, вызывает гиперэкспрессию гена *FZD3*, что способствует активированию сигнального пути Wnt/ β -катенин. Отмечается также, что кольцевая РНК *Circzfn91* связана с агрессивным течением ХЛЛ. Еще одна кольцевая РНК circ-RPL15 была идентифицирована как новый маркер ХЛЛ, поскольку она участвует в miR-146b-3p-опосредованном ингибировании сигнального пути RAS/RAF1/MEK/ERK. Показано, что активация экспрессии circ-RPL15 напрямую коррелирует с мутационным статусом ХЛЛ по генам IgHV [89]. Кольцевая РНК mc-COX2, происходящая из митохондриального генома, также была гиперэкспрессирована в экзосомах плазмы у пациентов с ХЛЛ. Активация mc-COX2 ускоряла пролиферацию клеток ХЛЛ и ингибировала апоптоз. Важно отметить, что высокая экспрессия mc-COX2 коррелировала с ухудшением прогноза у больных ХЛЛ [90].

РЕГУЛЯТОРНЫЕ НКРНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Благодаря участию микроРНК в качестве опухолевых супрессоров широко обсуждается вопрос об использовании их как терапевтических мишеней. В данном аспекте одной из самых изученных микроРНК является miR-34a. Воздействуя на мРНК Foxp1, она инги-

бирует переход про-В-клеток в пре-В-клетки [92], что может быть полезным при лимфопролиферативных заболеваниях. Один из вариантов использования miR-34a в терапии — введение ее в организм в виде молекулярного агента, называемого миметиком miR-34a, который может быть доставлен в опухолевые клетки с помощью наночастиц или вирусных векторов. Миметик miR-34a, названный MRX34, был разработан путем синтеза двухцепочечной молекулы, инкапсулированной в липосомы (SMARTICLES), что обеспечивает эффективную и безопасную доставку препарата [93]. При ХЛЛ в нескольких исследованиях показано, что miR-34a может ингибировать пролиферацию опухолевых лимфоцитов, а также усиливать их чувствительность к противоопухолевым лекарственным препаратам [94].

Препарат MRG-106 представляет собой модифицированный олигонуклеотид, ингибирующий miR-155. Клиническое исследование I фазы (NCT02580552) было направлено на изучение MRG-106 при кожной Т-клеточной лимфоме, ХЛЛ, диффузной В-клеточной лимфоме и Т-клеточном лейкозе/лимфоме взрослых. Это исследование стало первым с использованием ингибиторов микроРНК, и поскольку в ходе I фазы практически не было выявлено побочных эффектов, есть надежда на то, что изучение препарата MRG-106 продолжится [95].

Гораздо более скромно к настоящему времени представлены попытки использования lncRNA в качестве терапевтических мишеней. Тем не менее они имеют существенный потенциал благодаря их тканеспецифическому профилю экспрессии и широкому спектру функций. На модели мононуклеарных клеток пациентов описана успешная попытка воздействия мРНК для дерепрессии промотора *Dleu2*, что увеличивало экспрессию miR-15a/16-1 и гибель опухолевых В-клеток [96]. Таким образом, терапия, направленная на усиленную транскрипцию гена *DLEU2*, может представлять перспективную возможность повышения эффективности лечения пациентов с ХЛЛ [97]. Следует отметить, что пока нет опубликованных сообщений об использовании circRNA в качестве терапевтических мишеней, но ситуация, вероятно, изменится в ближайшем будущем. Что касается гиперэкспрессии circRNA при злокачественных новообразованиях, то вероятным терапевтическим подходом может быть использование мРНК против ее последовательности [86]. В случае пониженной экспрессии circRNA восстановление ее уровня может быть достигнуто путем клонирования олигонуклеотидных последовательностей circRNA. Разработка и включение в арсенал

терапевтических опций препаратов на основе нкРНК потребуют, в свою очередь, создания стандартизованных методов их определения в биологических образцах.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ нкРНК В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Несмотря на растущий интерес, к настоящему времени только два диагностических теста на основе микроРНК (Biomild и Cosmos II) достигли IV фазы клинических исследований [98]. Основные причины ограниченного применения указанных диагностических тестов можно разделить на три категории: 1) преаналитические, 2) аналитические и 3) постаналитические, которые влияют на достоверность результатов измерений и их воспроизводимость независимо от клинического применения. Циркулирующие микроРНК отражают физиологические и патологические изменения в организме, однако и на их уровень могут также влиять различные факторы образа жизни пациентов. Индивидуальная вариабельность отдельных микроРНК в плазме конкретного индивидуума колеблется более чем на порядок — от 9000 до 130 000 копий/мкл. Показано, что курение, диета, активные физические упражнения могут влиять на общий уровень циркулирующих микроРНК [99, 100]. Кроме того, наличие сопутствующих заболеваний также является важной проблемой и смещающим результаты фактором [101, 102].

Можно выделить следующие преаналитические факторы, связанные с образцами микроРНК: различия их содержания в плазме и сыворотке, наличие гемолита, используемые антикоагулянты, режимы центрифугирования, сроки и условия хранения образцов. В работе Z. Jiang и соавт. показано значительное влияние изменения условий и времени хранения проб на уровень мРНК ряда генов [103].

В настоящее время доступно несколько коммерческих наборов для выделения микроРНК из биологических образцов, которые, однако, имеют различную эффективность [104]. Методы выявления РНК обычно основаны на их относительном количественном определении, поэтому необходим адекватный выбор способа нормализации результатов. Наиболее распространенными РНК, используемыми в качестве эталонных молекул для нормирования концентраций диагностически значимых малых нкРНК, являются эндогенные miR-16, RNU6B и добавляемая к образцу синтетическая cel-miR-39. Однако в научном сообществе до настоящего времени нет общего консенсуса по оптимальному выбору молекул стандартизации. Некоторые из наиболее часто используемых молекул, например miR-16, не могут служить в качестве РНК сравнения, поскольку изменяются при ряде заболеваний, в т. ч. и при ХЛЛ [105]. Показано, что уровень нкРНК RNU6B также может варьировать в разных образцах [106]. Одним из предложенных вариантов решения проблемы нормализации результатов является применение сразу нескольких эталонных молекул с расчетом отношения искомым микроРНК

к средним значениям экспрессии выбранных стандартных молекул. Кроме того, возможен расчет уровня экспрессии и с использованием калибровочного графика, построенного при анализе синтетических стандартных калибраторов искомой микроРНК.

Для непосредственного количественного определения микроРНК применяются различные методы, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с обратной транскрипцией, цифровую ПЦР, микрочипы и высокопроизводительное секвенирование. МикроРНК довольно трудно количественно оценить с помощью ПЦР по нескольким причинам: малый размер молекул препятствует оптимальному дизайну праймеров; пре-микроРНК состоит из «шпильки», а зрелая микроРНК неотличима от пре-микроРНК, т. к. соответствует части последней; наличие разных членов семейства, отличающихся всего одним или несколькими нуклеотидами; низкое содержание многих микроРНК в биологических жидкостях. Однако количественная ПЦР в реальном времени имеет ряд неоспоримых преимуществ перед другими методами: простота и быстрота анализа, экономичность, широкая распространенность приборов и наличие подготовленного персонала [102].

При анализе методом цифровой ПЦР количественная оценка осуществляется без необходимости использования эталонных генов или построения калибровочной кривой, что обеспечивает большую точность по сравнению с ПЦР в реальном времени. Ограничениями данной технологии являются высокая стоимость оборудования и реагентов, лимитированные возможности мультиплексирования, длительность процедуры, необходимость в квалифицированных сотрудниках.

В последние годы были предложены разные варианты обнаружения различных микроРНК с помощью технологии микрочипов, отличающиеся способом иммобилизации, конструкцией зонда и методами визуализации. В целом микрочипы микроРНК лучше всего подходят для первичной диагностики, но они не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для количественного измерения, необходимого в период мониторинга терапии. При определении отдельных длинных нкРНК обычно достаточно использования методик стандартной ПЦР с обратной транскрипцией. Основные аналитические проблемы связаны с полнотой их выделения из образцов, достижением требуемого уровня чувствительности и специфичности, а также со стандартизацией тестирования и организацией контроля качества.

Методические особенности определения circRNA связаны с необходимостью дополнительного этапа удаления линейных молекул РНК, как правило, с помощью особого варианта РНКазы R. Описано два основных метода: первый представляет собой обнаружение circRNA на основе микрочипов [91], второй заключается в обнаружении circRNA с помощью ПЦР [94, 107].

Секвенирование нового поколения является мощным инструментом для изучения профиля экспрессии различных молекул РНК. В результате такого анализа генерируется большой массив данных, интерпретация которых требует специальных профессио-

нальных навыков и адекватного программного обеспечения. Кроме того, секвенирование по-прежнему остается одним из малодоступных методов анализа в региональных медицинских центрах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на устоявшиеся диагностические критерии ХЛЛ, остаются чрезвычайно актуальными вопросы прогноза становления и развития заболевания. К ним относятся риск перехода из В-клеточного моноклонального лимфоцитоза, продолжительность фазы заболевания, не требующей специальной терапии, выделение групп риска, предсказание эффективности различных режимов противоопухолевого лечения, а также трансформации ХЛЛ в синдром Рихтера. Отличительная особенность ХЛЛ заключается в разнообразии клинического течения, отсутствии у 20 % пациентов определяемых хромосомных aberrаций или соматических мутаций, обнаружение которых не всегда коррелирует с ответом на лечение. В связи с этим вызывают интерес потенциальные эпигенетические маркеры и, особенно, регуляторные не кодирующие белок РНК, которые вовлечены во все клеточные процессы и оказывают большое влияние на развитие лейкозного процесса. При этом aberrантная экспрессия отдельных нкРНК специфична для конкретных клеток и тканей. В то же время они являются ценными биомаркерами, поскольку обладают ключевыми преимуществами, такими как высокая устойчивость к рибонуклеазам и стабильность в жидкостях организма. Некоторые нкРНК и их комбинации уже признаны индикаторами, важными для диагностики и формирования независимых прогностических моделей. Вместе с тем основным сдерживающим фактором для широкого применения лабораторных тестов количественного определения нкРНК является отсутствие доступных стандартизованных методик и соответствующих наборов реактивов. Кроме того, существует острая потребность в повышении доказательной базы диагностических возможностей при ХЛЛ в рамках многоцентровых клинических исследований.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: И.А. Ольховский.

Сбор и обработка данных: все авторы.

Предоставление материалов исследования: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: все авторы.

Подготовка рукописи: М.А. Столяр, И.А. Ольховский.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Хронический лимфолейкоз. Современная диагностика и лечение. Руководство для клиницистов. Под ред. Е.А. Никитина. М.: Буки-Веди, 2021. 436 с. [Nikitin EA, ed. Khronicheskii limfoleikoz. Sovremennaya diagnostika i lechenie. Rukovodstvo dlya klinitsistov. (Chronic lymphocytic leukemia. Current methods of diagnosis and treatment. A Clinician's Manual.) Moscow: Buki-Vedi Publ.; 2021. 436 p. (In Russ)]
2. Lingua MF, Carra G, Maffeo B, Morotti A. Non-Coding RNAs: The "Dark Side Matter" of the CLL Universe. *Pharmaceuticals*. 2021;14(2):168. doi: 10.3390/ph14020168.
3. Lugassy G, Boussiotis VA, Ruchlemer R, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia in Young Adults: Report of Six Cases Under the Age of 30 Years. *Leuk Lymphoma*. 1991;5(Suppl 1):179–82. doi: 10.3109/10428199109103402.
4. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131(25):2745–60. doi: 10.1182/blood-2017-09-806398.
5. Liu Y, Wang Y, Yang J, et al. ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia: A meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2018;483:82–8. doi: 10.1016/j.cca.2018.04.026.
6. Почтарь Е.В., Луговская С.А., Наумова Е.В. и др. Экспрессия ROR-1 в диагностике и мониторинге минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе. *Клиническая онкогематология*. 2022;15(2):148–55. doi: 10.21320/2500-2139-2022-15-2-148-155. [Pochtary EV, Lugovskaya SA, Naumova EV, et al. ROR-1 Expression in the Diagnosis and Monitoring of Minimal Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical oncohematology*. 2022;15(2):148–55. doi: 10.21320/2500-2139-2022-15-2-148-155. (In Russ)]
7. Горбенко А.С., Столяр М.А., Бахтина В.И. и др. Разработка метода определения мРНК гена ROR1 в лейкоцитах крови. *Лабораторная служба*. 2021;10(1):32–7. doi: 10.17116/labs20211001132. [Gorbenko AS, Stolyar MA, Bakhtina VI, et al. Development of a method for determining of the mRNA ROR1 in blood leukocytes. *Laboratornaya sluzhba*. 2021;10(1):32–7. doi: 10.17116/labs20211001132. (In Russ)]
8. Бидерман Б.В., Судариков А.Б. Гены иммуноглобулинов и стереотипные антигенные рецепторы при хроническом лимфолейкозе и других лимфопролиферативных заболеваниях. *Гематология и трансфузиология*. 2023;68(1):70–9. doi: 10.35754/0234-5730-2023-68-1-70-79. [Biderman BV, Sudarikov AB. Immunoglobulin genes and stereotyped antigenic receptors in chronic lymphocytic leukemia and other lymphoproliferative diseases. *Russian journal of hematology and transfusiology*. 2023;68(1):70–9. doi: 10.35754/0234-5730-2023-68-1-70-79. (In Russ)]
9. Gaidano G, Rossi D. The mutational landscape of chronic lymphocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment. *Hematology*. 2017;2017(1):329–37. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.329.
10. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: pathogenesis and management. *Semin Oncol*. 2016;43(2):311–9. doi: 10.1053/j.seminoncol.2016.02.012.
11. Buccheri V, Barreto WG, Fogliatto LM, et al. Prognostic and therapeutic stratification in CLL: focus on 17p deletion and p53 mutation. *Ann Hematol*. 2018;97(12):2269–78. doi: 10.1007/s00277-018-3503-6.
12. Arruga F, Deaglio S. Mechanisms of Resistance to Targeted Therapies in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Handb Exp Pharmacol*. 2018;249:203–29. doi: 10.1007/164_2017_12.
13. Xanthopoulos C, Kostareli E. Advances in Epigenetics and Epigenomics in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Genet Med Rep*. 2019;7(4):214–26. doi: 10.1007/s40142-019-00178-3.
14. Mustafin RN, Khusnutdinova EK. Epigenetics of carcinogenesis. *Creat Surg Oncol*. 2017;7(3):60–7. doi: 10.24060/2076-3093-2017-7-3-60-67.
15. Lee SH, Singh I, Tisdale S, et al. Widespread intronic polyadenylation inactivates tumour suppressor genes in leukaemia. *Nature*. 2018;561(7721):127–31. doi: 10.1038/s41586-018-0465-8.
16. Ольховский И.А., Комина А.В., Столяр М.А., Горбенко А.С. Молекулярно-генетические нарушения при острых лейкозах как основа разработки диагностических тестов (обзор литературы). *Лабораторная служба*. 2020;9(4):26–45. doi: 10.17116/labs2020904126. [Olkhovskiy IA, Komina AV, Stolyar MA, Gorbenko AS. Molecular genetic disorders in acute leukemia as a basis for the development of diagnostic tests (literature review). *Laboratornaya sluzhba*. 2020;9(4):26–45. doi: 10.17116/labs2020904126. (In Russ)]
17. Robbe P, Ridout KE, Vavoulis DV, et al. Whole-genome sequencing of chronic lymphocytic leukemia identifies subgroups with distinct biological and clinical features. *Nat Genet*. 2022;54(11):1675–89. doi: 10.1038/s41588-022-01211-y.
18. Gao C, Zhou C, Zhuang J, et al. Identification of key candidate genes and miRNA-mRNA target pairs in chronic lymphocytic leukemia by integrated bioinformatics analysis. *Mol Med Rep*. 2019;19(1):362–74. doi: 10.3892/mmr.2018.9636.
19. Fabris L, Juracek J, Calin G. Non-Coding RNAs as Cancer Hallmarks in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):6720. doi: 10.3390/ijms21186720.

20. Van Roosbroeck K, Calin GA. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia: miRacle or miRage for prognosis and targeted therapies? *Semin Oncol*. 2016;43(2):209–14. doi: 10.1053/j.seminoncol.2016.02.015.
21. Uppaluri KR, Challa HJ, Gaur A, et al. Unlocking the potential of non-coding RNAs in cancer research and therapy. *Transl Oncol*. 2023;35:101730. doi: 10.1016/j.tranon.2023.101730.
22. Smolarz B, Durczynski A, Romanowicz H, et al. miRNAs in Cancer (Review of Literature). *Int J Mol Sci*. 2022;23(5):2805. doi: 10.3390/ijms23052805.
23. Аушев В.Н. МикроРНК: малые молекулы с большим значением. *Клиническая онкогематология*. 2015;8(1):1–12. doi: 10.21320/2500-2139-2015-8-1-1-12. [Aushev VN. MicroRNA: Small Molecules of Great Significance. *Clinical oncohematology*. 2015;8(1):1–12. doi: 10.21320/2500-2139-2015-8-1-1-12. (In Russ)]
24. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:3–14. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.001.
25. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003;9(3):277–9. doi: 10.1261/rna.2183803.
26. Stamatopoulos B, Van Damme M, Crompton E, et al. Opposite Prognostic Significance of Cellular and Serum Circulating MicroRNA-150 in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mol Med*. 2015;21(1):123–33. doi: 10.2119/molmed.2014.00214.
27. Mirzaei H, Fathollahzadeh S, Khanmohammadi R, et al. State of the art in microRNA as diagnostic and therapeutic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Physiol*. 2018;233(2):888–900. doi: 10.1002/jcp.25799.
28. Cui B, Chen L, Zhang S, et al. MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124(4):546–54. doi: 10.1182/blood-2014-03-559690.
29. Ferracin M, Zagatti B, Rizzotto L, et al. MicroRNAs involvement in fludarabine refractory chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer*. 2010;9(1):123. doi: 10.1186/1476-4598-9-123.
30. Alharthi A, Beck D, Howard DR, et al. An increased fraction of circulating miR-363 and miR-16 is particle bound in patients with chronic lymphocytic leukaemia as compared to normal subjects. *BMC Res Notes*. 2018;11(1):280. doi: 10.1186/s13104-018-3391-9.
31. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(24):15524–9. doi: 10.1073/pnas.242606799.
32. Li S, Moffett HF, Lu J, et al. MicroRNA Expression Profiling Identifies Activated B Cell Status in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e16956. doi: 10.1371/journal.pone.0016956.
33. Zenz T, Mohr J, Eldering E, et al. Mir-34a as Part of the Chemotherapy Resistance Network in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 2008;112(11):1209. doi: 10.1182/blood.V112.11.1209.1209.
34. Visone R, Veronese A, Rassenti LZ, et al. miR-181b is a biomarker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(11):3072–9. doi: 10.1182/blood-2011-01-333484.
35. Chocholska S, Zarobkiewicz M, Szymanska A, et al. Prognostic Value of the miR-17~92 Cluster in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2):1705. doi: 10.3390/ijms24021705.
36. Duroux-Richard I, Gagez AL, Alaterre E, et al. miRNA profile at diagnosis predicts treatment outcome in patients with B-chronic lymphocytic leukemia: A FILO study. *Front Immunol*. 2022;13:983771. doi: 10.3389/fimmu.2022.983771.
37. Moussay E, Wang K, Cho JH, et al. MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(16):6573–8. doi: 10.1073/pnas.1019557108.
38. Fathollahzadeh S, Mirzaei H, Honardoost MA, et al. Circulating microRNA-192 as a diagnostic biomarker in human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Gene Ther*. 2016;23(10):327–32. doi: 10.1038/cgt.2016.34.
39. Grenda A, Filip A, Wasik-Szczepanek E. Inside the chronic lymphocytic leukemia cell: miRNA and chromosomal aberrations. *Mol Med Rep*. 2022;25(2):65. doi: 10.3892/mmr.2022.12581.
40. Mogilyansky E, Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ*. 2013;20(12):1603–14. doi: 10.1038/cdd.2013.125.
41. Palamarchuk A, Yan PS, Zaneni N, et al. Tcf1 protein functions as an inhibitor of de novo DNA methylation in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(7):2555–60. doi: 10.1073/pnas.1200003109.
42. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, et al. Tcf1 Expression in Chronic Lymphocytic Leukemia Is Regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*. 2006;66(24):11590–3. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3613.
43. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2010;17(2):193–9. doi: 10.1038/cdd.2009.56.
44. Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*. 2010;116(6):945–52. doi: 10.1182/blood-2010-01-263889.
45. Balatti V, Acunzo M, Pekarky Y, Croce CM. Novel Mechanisms of Regulation of miRNAs in CLL. *Trends Cancer*. 2016;2(3):134–43. doi: 10.1016/j.trecan.2016.02.005.
46. Vargova K, Pesta M, Obrtikova P, et al. MiR-155/miR-150 network regulates progression through the disease phases of chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J*. 2017;7(7):e585. doi: 10.1038/bcj.2017.63.
47. Ferrajoli A, Shanafelt TD, Ivan C, et al. Prognostic value of miR-155 in individuals with monoclonal B-cell lymphocytosis and patients with B chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;122(11):1891–9. doi: 10.1182/blood-2013-01-478222.
48. Fonte E, Apollonio B, Scarfo L, et al. In Vitro Sensitivity of CLL Cells to Fludarabine May Be Modulated by the Stimulation of Toll-like Receptors. *Clin Cancer Res*. 2013;19(2):367–79. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1922.
49. Rassenti LZ, Balatti V, Ghia EM, et al. MicroRNA dysregulation to identify therapeutic target combinations for chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(40):10731–6. doi: 10.1073/pnas.1708264114.
50. Gorbenko A, Stolyar M, Bakhtina V, et al. Potential capabilities of mRNA ROR1 and miR-155 for MRD assessment in CLL. *Hemashere*. 2021;5(52):291.
51. Wu X, Pan Y, Fang Y, et al. The Biogenesis and Functions of piRNAs in Human Diseases. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;21:108–20. doi: 10.1016/j.omtn.2020.05.023.
52. Mai D, Zheng Y, Guo H, et al. Serum piRNA-54265 is a new biomarker for early detection and clinical surveillance of human colorectal cancer. *Theranostics*. 2020;10(19):8468–78. doi: 10.1515/tno.46241.
53. Ruhela V, Gupta A, Sriram K, et al. A Unified Computational Framework for a Robust, Reliable, and Reproducible Identification of Novel miRNAs From the RNA Sequencing Data. *Front Bioinforma*. 2022;2:842051. doi: 10.3389/fbioinf.2022.842051.
54. ENCODE portal. Available from: <https://www.encodeproject.org/> (accessed 21.08.2023).
55. Gasic V, Karan-Djurasevic T, Pavlovic D, et al. Diagnostic and Therapeutic Implications of Long Non-Coding RNAs in Leukemia. *Life*. 2022;12(11):1770. doi: 10.3390/life12111770.
56. Bhattacharya M, Gutti RK. Non-coding RNAs: are they the protagonist or antagonist in the regulation of leukemia? *Am J Transl Res*. 2022;14(3):1406–32.
57. Garding A, Bhattacharya N, Claus R, et al. Epigenetic upregulation of lncRNAs at 13q14.3 in leukemia is linked to the In Cis downregulation of a gene cluster that targets NF-kB. *PLoS Genet*. 2013;9(4):e1003373. doi: 10.1371/journal.pgen.1003373.
58. Xu Z, Pan B, Li Y, et al. Identification and Validation of Ferroptosis-Related lncRNAs Signature as a Novel Prognostic Model for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Gen Med*. 2023;16:1541–53. doi: 10.2147/IJGM.S399629.
59. Blume CJ, Hotz-Wagenblatt A, Hullein J, et al. p53-dependent non-coding RNA networks in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29(10):2015–23. doi: 10.1038/leu.2015.119.
60. Gao J, Wang F, Wu P, et al. Aberrant lncRNA Expression in Leukemia. *J Cancer*. 2020;11(14):4284–96. doi: 10.7150/jca.42093.
61. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;353(17):1793–801. doi: 10.1056/NEJMoa050995.
62. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(39):13944–9. doi: 10.1073/pnas.0506654102.
63. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50(8):633–43. doi: 10.1002/gcc.20885.
64. Ahmadi A, Kaviani S, Yaghmaie M, et al. Altered expression of MALAT1 lncRNA in chronic lymphocytic leukemia patients, correlation with cytogenetic findings. *Blood Res*. 2018;53(4):320–4. doi: 10.5045/br.2018.53.4.320.
65. Sattari A, Siddiqui H, Moshiri F, et al. Upregulation of long noncoding RNA MIAT in aggressive form of chronic lymphocytic leukemias. *Oncotarget*. 2016;7(34):54174–82. doi: 10.18632/oncotarget.11099.
66. Wang LQ, Wong KY, Li ZH, Chim CS. Epigenetic silencing of tumor suppressor long non-coding RNA BM742401 in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016;7(50):82400–10. doi: 10.18632/oncotarget.12252.
67. Miller CR, Ruppert AS, Fobare S, et al. The long noncoding RNA, treRNA, decreases DNA damage and is associated with poor response to chemotherapy in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2017;8(16):25942–54. doi: 10.18632/oncotarget.15401.
68. Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*. 2010;142(3):409–19. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.040.
69. Chen S, Liang H, Yang H, et al. lincRNA-p21: function and mechanism in cancer. *Med Oncol*. 2017;34(5):98. doi: 10.1007/s12032-017-0959-5.
70. Dimitrova N, Zamudio JR, Jong RM, et al. lincRNA-p21 activates p21 in cis to promote Polycomb target gene expression and to enforce the G1/S checkpoint. *Mol Cell*. 2014;54(5):777–90. doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.025.
71. Adriaens C, Standaert L, Barra J, et al. p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. *Nat Med*. 2016;22(8):861–8. doi: 10.1038/nm.4135.
72. Bomben R, Roisman A, D'Agaro T, et al. Expression of the transcribed ultraconserved region 70 and the related long non-coding RNA AC092652.2-202 has prognostic value in Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Br J Haematol*. 2019;184(6):1045–50. doi: 10.1111/bjh.15237.
73. Ni J, Hong J, Li Q, et al. Long non-coding RNA CRNDE suppressing cell proliferation is regulated by DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2021;105:106564. doi: 10.1016/j.leukres.2021.106564.
74. Jing Z, Gao L, Wang H, et al. Long non-coding RNA GAS5 regulates human B lymphocytic leukaemia tumorigenesis and metastasis by sponging miR-222. *Cancer Biomark Sect Dis Markers*. 2019;26(3):385–92. doi: 10.3233/cbm-190246.

75. Erdfelder F, Hertweck M, Filipovich A, et al. High lymphoid enhancer-binding factor-1 expression is associated with disease progression and poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Rep.* 2010;2(1):e3. doi: 10.4081/hr.2010.e3.
76. Ronchetti D, Manzoni M, Agnelli L, et al. lncRNA profiling in early-stage chronic lymphocytic leukemia identifies transcriptional fingerprints with relevance in clinical outcome. *Blood Cancer J.* 2016;6(9):e468. doi: 10.1038/bcj.2016.77.
77. Tang X, Ren H, Guo M, et al. Review on circular RNAs and new insights into their roles in cancer. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021;19:910–28. doi: 10.1016/j.csbj.2021.01.018.
78. Li Q, Ren X, Wang Y, Xin X. CircRNA: a rising star in leukemia. *Peer J.* 2023;11:e15577. doi: 10.7717/peerj.15577.
79. Rajappa A, Banerjee S, Sharma V, Khandelia P. Circular RNAs: Emerging Role in Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Front Mol Biosci.* 2020;7:577938. doi: 10.3389/fmolb.2020.577938.
80. Li J, Sun D, Pu W, et al. Circular RNAs in Cancer: Biogenesis, Function, and Clinical Significance. *Trends Cancer.* 2020;6(4):319–36. doi: 10.1016/j.trecan.2020.01.012.
81. Schneider T, Bindereif A. Circular RNAs: Coding or noncoding? *Cell Res.* 2017;27(6):724–5. doi: 10.1038/cr.2017.70.
82. Singh V, Uddin MH, Zonder JA, et al. Circular RNAs in acute myeloid leukemia. *Mol Cancer.* 2021;20(1):149. doi: 10.1186/s12943-021-01446-z.
83. Cao HX, Miao CF, Sang LN, et al. Circ_0009910 promotes imatinib resistance through ULK1-induced autophagy by sponging miR-34a-5p in chronic myeloid leukemia. *Life Sci.* 2020;243:117255. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117255.
84. Pan Y, Lou J, Wang H, et al. CircBA9.3 supports the survival of leukaemic cells by up-regulating c-ABL1 or BCR-ABL1 protein levels. *Blood Cells Mol Dis.* 2018;73:38–44. doi: 10.1016/j.bcmd.2018.09.002.
85. Verduci L, Strano S, Yarden Y, Blandino G. The circ RNA–micro RNA code: emerging implications for cancer diagnosis and treatment. *Mol Oncol.* 2019;13(4):669–80. doi: 10.1002/1878-0261.12468.
86. Deng W, Chao R, Zhu S. Emerging roles of circRNAs in leukemia and the clinical prospects: An update. *Immun Inflamm Dis.* 2022;11(1):e725. doi: 10.1002/iid3.725.
87. Wu W, Wu Z, Xia Y, et al. Downregulation of circ_0132266 in chronic lymphocytic leukemia promoted cell viability through miR-337–3p/PML axis. *Aging.* 2019;11(11):3561–73. doi: 10.18632/aging.101997.
88. Xia L, Wu L, Bao J, et al. Circular RNA circ-CBFB promotes proliferation and inhibits apoptosis in chronic lymphocytic leukemia through regulating miR-607/FZD3/Wnt/β-catenin pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(1):385–90. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.045.
89. Wu Z, Sun H, Liu W, et al. Circ-RPL15: a plasma circular RNA as novel oncogenic driver to promote progression of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2020;34(3):919–23. doi: 10.1038/s41375-019-0594-6.
90. Wu Z, Sun H, Wang C, et al. Mitochondrial Genome-Derived circRNA mc-COX2 Functions as an Oncogene in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020;20:801–11. doi: 10.1016/j.omtn.2020.04.017.
91. Li S, Chen J, Fan Y, et al. circZNF91 Promotes the Malignant Phenotype of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells by Targeting the miR-1283/WEE1 Axis. *BioMed Res Int.* 2022;2022:2855394. doi: 10.1155/2022/2855394.
92. Li WJ, Wang Y, Liu R, et al. MicroRNA-34a: Potent Tumor Suppressor, Cancer Stem Cell Inhibitor, and Potential Anticancer Therapeutic. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:640587. doi: 10.3389/fcell.2021.640587.
93. Hong DS, Kang YK, Borad M, et al. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer.* 2020;122(11):1630–7. doi: 10.1038/s41416-020-0802-1.
94. Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature.* 2009;457(7228):405–12. doi: 10.1038/nature07755.
95. miRagen Therapeutics, Inc. SOLAR: Efficacy and Safety of Cobomarsen (MRG-106) vs. Active Comparator in Subjects With Mycosis Fungoides (SOLAR). *ClinicalTrials.gov* (Internet). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2022. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03713320> (accessed 24.08.2023).
96. Kasar S, Underbayev C, Yuan Y, et al. Therapeutic implications of activation of the host gene (Dleu2) promoter for miR-15a/16-1 in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene.* 2014;33(25):3307–15. doi: 10.1038/onc.2013.291.
97. Qu X, Cao YX, Xing YX, et al. Deleted in lymphocytic leukemia 2 (DLEU2): a possible biomarker that holds promise for future diagnosis and treatment of cancer. *Clin Transl Oncol.* 2023;25(10):2772–82. doi: 10.1007/s12094-023-03149-x.
98. Kim T, Croce CM. MicroRNA: trends in clinical trials of cancer diagnosis and therapy strategies. *Exp Mol Med.* 2023;55(7):1314–21. doi: 10.1038/s12276-023-01050-9.
99. Seijo LM, Peled N, Ajona D, et al. Biomarkers in Lung Cancer Screening: Achievements, Promises, and Challenges. *J Thorac Oncol.* 2019;14(3):343–57. doi: 10.1016/j.jtho.2018.11.023.
100. Takahashi K, Yokota S, Tatsumi N, et al. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272(1):154–60. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.018.
101. Witwer KW. XenomiRs and miRNA homeostasis in health and disease: Evidence that diet and dietary miRNAs directly and indirectly influence circulating miRNA profiles. *RNA Biol.* 2012;9(9):1147–54. doi: 10.4161/rna.21619.
102. Precazzini F, Detassis S, Imperatori AS, et al. Measurements Methods for the Development of MicroRNA-Based Tests for Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1176. doi: 10.3390/ijms22031176.
103. Jiang Z, Lu Y, Shi M, et al. Effects of storage temperature, storage time, and hemolysis on the RNA quality of blood specimens: A systematic quantitative assessment. *Heliyon.* 2023;9(6):e16234. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e16234.
104. Brunet-Vega A, Pericay C, Quilez ME, et al. Variability in microRNA recovery from plasma: Comparison of five commercial kits. *Anal Biochem.* 2015;488:28–35. doi: 10.1016/j.ab.2015.07.018.
105. Yang L, Yang S, Ren C, et al. Deciphering the roles of miR-16-5p in malignant solid tumors. *Biomed Pharmacother.* 2022;148:112703. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112703.
106. Kok MGM, Halliani A, Moerland PD, et al. Normalization panels for the reliable quantification of circulating microRNAs by RT-qPCR. *FASEB J.* 2015;29(9):3853–62. doi: 10.1096/fj.15-271312.
107. Mi Z, Zhongqiang C, Caiyun J, et al. Circular RNA detection methods: A minireview. *Talanta.* 2022;238:123066. doi: 10.1016/j.talanta.2021.123066.