

Правительство Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Индекс УДК 575.1/2:616

Рег. № НИОКТР АААА-А20-120073190038-2

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
СПбГУ

С.В. Микушев

«19» декабря 2022 г.



ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
НАСЛЕДСТВЕННЫХ И МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ
ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ИХ ПАТОГЕНЕЗА
(заключительный)

Руководитель НИР,
главный научный сотрудник,
доктор биологических наук

(подпись)

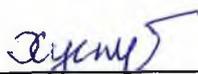
Э.К. Хуснутдинова

24.11.2022

Санкт-Петербург 2022

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы,
главный научный
сотрудник СПбГУ
доктор биологических наук,
профессор



(подпись)

24.11.2022

Хуснутдинова Эльза
Камилевна
(руководство,
планирование
экспериментов, написание
статей и отчёта)

Исполнители:

ведущий научный
сотрудник СПбГУ
доктор биологических наук,
доцент

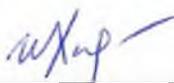


(подпись)

24.11.2022

Карунас Александра
Станиславовна
(проведение
экспериментов, написание
статей – раздел 1.4)

ведущий научный
сотрудник СПбГУ
доктор биологических наук,
профессор



(подпись)

24.11.2022

Хидиятова Ирина
Михайловна
(проведение экспериментов
– раздел 2.1)

ведущий научный
сотрудник СПбГУ
кандидат биологических
наук



(подпись)

24.11.2022

Бермишева Марина
Алексеевна
(проведение
экспериментов, написание
статей – раздел 1.1)

старший научный
сотрудник СПбГУ
кандидат биологических
наук



(подпись)

24.11.2022

Гилязова Ирина Ришатовна
(проведение
экспериментов, написание
статей – раздел 1.2)

научный сотрудник СПбГУ
кандидат биологических
наук



(подпись)

24.11.2022

Гималова Галия Фуатовна
(проведение
экспериментов, написание
статей – раздел 1.3)

научный сотрудник СПбГУ
кандидат биологических
наук



(подпись)

24.11.2022

Иванова Елизавета
Алексеевна
(проведение
экспериментов, написание
статей – раздел 1.2)

научный сотрудник СПбГУ
кандидат биологических
наук



(подпись)

24.11.2022

Федорова Юлия Юрьевна
(проведение
экспериментов, написание
статей – раздел 1.4)

инженер-исследователь
СПбГУ



(подпись)

24.11.2022

Савельева Ольга
Николаевна
(проведение
экспериментов, написание
статей – раздел 1.4)

Нормоконтроль



Н.В. Квадринус

30.11.2022

РЕФЕРАТ

Отчет: 56 страниц, 1 ч., 16 таблиц, 1 рисунок, 76 процитированных источников.

Ключевые слова: рак молочной железы, рак почки (почечно-клеточный рак), мелкоклеточный рак легкого, аллергические заболевания, бронхиальная астма, наследственные моторно-сенсорные нейропатии, микроРНК, мутации, полиморфные варианты генов, секвенирование экзома.

МОНОГЕННЫЕ И МНОГОФАКТОРНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ГЕНЫ, ЭКЗОМ

Объект исследования: ДНК пациентов, жителей Республики Башкортостан с бронхиальной астмой, раком яичника, раком почки, мелкоклеточным раком легкого, наследственной моторно-сенсорной нейропатией;

Цель – раскрытие молекулярных механизмов патогенеза многофакторных онкологических и аллергических заболеваний, а также моногенных нейродегенеративных патологий, направленное на разработку новых эффективных подходов ДНК-диагностики и патогенетического лечения.

Методы: секвенирование экзомов, секвенирование по Сэнгеру – при изучении моногенных заболеваний; ПЦР, ПДРФ-анализ, ПЦР в реальном времени, полногеномный анализ ассоциаций, анализ метилирования - при изучении многофакторной патологии.

В рамках реализации проекта проведены следующие работы: 1) анализ литературных данных и формирование панели из полиморфных вариантов, ассоциированных с онкологическими и аллергическими заболеваниями по данным кандидатных и полногеномных исследований, а также участвующих в метаболизме применяемых для лечения данных патологий лекарственных препаратов; 2) анализ ассоциаций прогенотипированных полиморфных локусов генов с развитием и течением аллергических и онкологических заболеваний (рака молочной железы и яичников, метастатического рака почки), с учетом этнической принадлежности индивидов, степени тяжести заболеваний; 3) анализ уровня метилирования промоторной области гомеобоксодержащего гена *SHOX2* у больных мелкоклеточным раком легкого; 4) идентификация генетических и эпигенетических маркеров риска развития и эффективности терапии исследуемых онкологических и аллергических заболеваний; 5) полное секвенирование экзома у пациентов с наследственной моторно-сенсорной нейропатией с неустановленной генетической причиной заболевания; биоинформатический анализ результатов исследования и их валидация методом секвенирования по Сэнгеру.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ.....	2
РЕФЕРАТ.....	3
УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	5
СПИСОК РИСУНКОВ.....	6
СПИСОК ТАБЛИЦ.....	7
1. ВВЕДЕНИЕ.....	9
2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	11
2.1. Идентификация генетических и эпигенетических маркеров риска развития и эффективности терапии исследуемых онкологических и аллергических заболеваний.....	11
2.1.1. Анализ ассоциации полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК с высокозлокачественным серозным раком яичников.....	11
2.1.2. Анализ ассоциации полиморфных вариантов в генах PD-1, PD-L1, CTLA-4 и DPF3 с риском развития почечно-клеточной карциномы и формированием ответа на терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа.....	20
2.1.3. Анализ уровня метилирования промоторной области гомеобоксодержащего гена SNOX2 у больных мелкоклеточным раком легкого.....	26
2.1.4. Репликативное исследование полиморфных локусов генов, ассоциированных с развитием бронхиальной астмы при GWAS, в независимой выборке больных с сочетанными проявлениями аллергопатологиями и здоровых индивидов контрольной группы из Республики Башкортостан.....	29
2.2. Полное секвенирование экзома у пациентов с наследственной моторно-сенсорной нейропатией с неустановленной генетической причиной заболевания, биоинформатический анализ результатов исследования и их валидация методом секвенирования по Сэнгеру.....	38
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	45
4. СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ И ПРИНЯТЫХ К ПЕЧАТИ В 2022 ГОДУ.....	49
5. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	50

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

GWAS – genome-wide association study – полногеномный анализ ассоциаций

SNP (ОНП) – single nucleotide polymorphism – однонуклеотидные полиморфные варианты

ДНК

ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота

РБ – Республика Башкортостан

НМСН - наследственные моторно-сенсорные neuropathies

БА – бронхиальная астма

РМЖ - рак молочной железы

РЯ – рак яичников

РП – рак почки

ПКК – почечно-клеточная карцинома

ИКТИ – ингибиторы контрольных точек иммунного ответа

МРЛ – мелкоклеточный рак легкого

СПИСОК РИСУНКОВ

Рисунок №	Название рисунка	Страница
1	Секвенирование гена MATR3: мутация с.254C>G (p.Ser85Gly) у пациента с наследственной моторно-сенсорной нейропатией	42

СПИСОК ТАБЛИЦ

Таблица №	Название таблицы	Страница
1	Характеристика полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК	12
2	Распределение частот аллелей полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК у женщин с высокозлокачественным серозным РЯ и контрольной группы русского этнического происхождения	14
3	Распределение частот аллелей полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК у женщин с высокозлокачественным серозным РЯ и контрольной группы татарского этнического происхождения	15
4	Распределение частот аллелей полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК у женщин с высокозлокачественным серозным РЯ и контрольной группы башкирского этнического происхождения	16
5	Распределение частот аллелей полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК в объединенной выборке больных высокозлокачественным серозным РЯ и контроля (русские, татары, башкиры)	17
6	Результаты мета-анализа ассоциации изученных полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК с высоко-злокачественным серозным РЯ	18
7	Ассоциация генотипов полиморфного локуса rs2740351 и rs7813 с риском развития высокозлокачественного серозного РЯ	19
8	Клинико-патологические характеристики пациентов со скПКК, получающих терапию ИКТИ	21
9	Наблюдаемые нежелательные явления в соответствии с категорией и степенью	22
10	Полиморфные варианты генов, включенные в исследование генетической предрасположенности к раку почки	23

11	Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов rs7866740 гена PD-L1, rs231775 гена CTLA4 и rs4903064 гена DRF3 в группе пациентов скПКК, получающих терапию ИКТИ	24
12	Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов, у больных БА с сопутствующим АР и в контрольной группе русской этнической принадлежности	32
13	Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов, у больных БА с сопутствующим АР и в контрольной группе татарской этнической принадлежности	33
14	Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов у больных БА с сопутствующим АР и в контрольной группе башкирской этнической принадлежности	34
15	Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов у больных с сочетанными АЗ (БА, АР и АД) и в контрольной группе	34
16	Результаты мета-анализа ассоциаций исследованных полиморфных вариантов генов с развитием БА с сопутствующим АР у русских, татар, башкир и индивидов смешанной этнической принадлежности	37

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и значимость изучения генетических основ моногенных и многофакторных заболеваний диктуются основной стратегией развития современной медицины - переводом ее на уровень персонализированной медицины (ПМ), представляющей собой интегральную медицину, которая включает в себя разработку персонализированных средств лечения, тестирование на предрасположенности к болезням, профилактику, диагностику и лечение заболеваний с учетом индивидуальных генетических особенностей пациентов. Необходимыми условиями развития и внедрения методов ПМ являются выявление генетических и эпигенетических механизмов патогенеза заболеваний. Выявление молекулярных механизмов патогенеза болезней, их конкретных клинических фенотипов является основой для разработки методов ранней диагностики и новейших методов лечения, основанных, в том числе, на технологии геномного редактирования.

Актуальность исследования онкологических заболеваний (рак молочной железы, яичников, рак почки, мелкоклеточный рак легкого) определяется их высокой распространенностью, сложностью прогнозирования и непредсказуемостью клинического течения, а также высоким уровнем смертности как в России, так и во всем мире. Несмотря на то что патогенез онкологических заболеваний активно изучается, в настоящее время не существует тест-систем для ранней диагностики заболеваний и/или прогноза их течения. Высокоспецифичных маркеров, которые могли бы свидетельствовать об эффективности терапии рака почки и предсказывать риск развития резистентности к терапии, не существует. В связи с этим, актуальным является поиск маркеров для контроля эффективности лечения пациентов с раком почки на основе комплексного генетического и эпигенетического анализа опухоли и ее микроокружения. Актуальными являются и проблемы поиска новых генетических и эпигенетических маркеров риска развития распространенных аллергических заболеваний - бронхиальной астмы и других аллергических заболеваний, в большинстве случаев сопутствующих БА (аллергическому риниту и атопическому дерматиту), для разработки новых подходов диагностики, профилактики и лечения.

Актуальность клинико-молекулярно-генетических исследований моногенных (олигогенных) патологий нервной системы связана с их широкой клинической и генетической гетерогенностью, перекрытием патогенетических механизмов различных нозологий и значительной долей случаев заболеваний с неустановленной генетической причиной. Поиск молекулярно-генетических причин их развития с использованием

технологий секвенирования нового поколения открывает перспективы дальнейшего развития этого направления, нацеленного на разработку новых эффективных подходов диагностики, профилактики и лечения таких болезней.

В связи с вышесказанным, планируется провести комплексное исследование генетических и эпигенетических механизмов развития ряда онкологических и аллергических заболеваний, а также отдельных наследственных заболеваний нервной системы с использованием современных технологий геномного анализа для разработки эффективных подходов диагностики, профилактики и лечения этих заболеваний.

Целью настоящего исследования является раскрытие молекулярных механизмов патогенеза многофакторных онкологических и аллергических заболеваний, а также моногенных нейродегенеративных патологий, направленное на разработку новых эффективных подходов ДНК-диагностики и патогенетического лечения.

В соответствие с целью, на 2022 год были поставлены следующие задачи:

1. С целью идентификации генетических и эпигенетических маркеров риска развития и эффективности терапии исследуемых онкологических и аллергических заболеваний провести:

- анализ ассоциации полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК с высокозлокачественным серозным раком яичников;
- анализ ассоциации полиморфных вариантов в генах PD-1, PD-L1, CTLA-4 и DPF3 с риском развития почечно-клеточной карциномы и формированием ответа на терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа;
- анализ уровня метилирования промоторной области гомеобоксодержащего гена SHOX2 у больных мелкоклеточным раком легкого;
- репликативное исследование полиморфных локусов генов, ассоциированных с развитием бронхиальной астмы при GWAS, в независимой выборке больных с сочетанными проявлениями аллергопатологиями и здоровых индивидов контрольной группы из Республики Башкортостан.

2. Провести полное секвенирование экзома у пациентов с наследственной моторно-сенсорной нейропатией с неустановленной генетической причиной заболевания; биоинформатический анализ результатов исследования и их валидацию методом секвенирования по Сэнгеру.

2 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Идентификация генетических и эпигенетических маркеров риска развития и эффективности терапии исследуемых онкологических и аллергических заболеваний

2.1.1. Исследование ассоциации полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК с высокозлокачественным серозным раком яичников

МикроРНК (миРНК) и их роль в регуляции физиологических процессов и патогенезе рака стали революционным открытием последнего десятилетия в области молекулярной онкологии. МикроРНК влияют на большинство клеточных процессов от метаболизма через пролиферацию и дифференцировку клеток до гибели клеток. В настоящее время считается, что дисрегуляция микроРНК влияет на критические молекулярные пути, которые участвуют в опухолевой прогрессии, инвазии, ангиогенезе и метастазировании при различных типах злокачественных новообразований.

Канонический путь биогенеза miRNA начинается с экпированного и полиаденилированного длинного первичного транскрипта (pri-miRNA или pri-miR), транскрибируемого РНК-полимеразой II (Pol II), напоминающего белок-кодирующие транскрипты [1]. Структура «стебель-петля» pri-миРНК распознается и далее обрабатывается ядерным ферментом РНКазой III — комплексом белкового домена связывания двухцепочечной РНК (DROSHA-DGCR8) — в структуру петли-шпильки, называемую предшественником-миРНК (пре-миРНК) или премиР [1; 2]. Pre-miR экспортируется из ядра по оси Exportin-5-Ran-GTP и далее процессируется в зрелую форму двухцепочечной РНК с помощью комплекса Dicer-TRBP [3]. РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), содержащий белки Argonaute (Ago), включает одну цепь дуплекса miRNA и направляет ее к частично комплементарному сайту в пределах 3'UTR гена-мишени [4]. Существует несколько неканонических путей биогенеза миРНК, включая миРНК, полученную из интронной области мРНК путем сплайсинга (Miltron) независимо от процессинга Drosha, и миРНК, обрезанную поли(А)-специфической рибонуклеазой (PARN), независимую от расщепления Dicer [5]. Тем не менее, подавляющее большинство miRNAs попадает в первую категорию биогенеза, в котором процессы и механизмы высоко консервативны у эволюционно далеких видов.

Однонуклеотидные полиморфные варианты в генах микроРНК, в сайтах связывания их с мишенью, а также генах участников биосинтеза и процессинга малых РНК могут существенно влиять на регуляторную функцию микроРНК, что в свою очередь может привести к развитию патологических процессов [6].

В нашем исследовании проведен анализ ассоциации полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК с риском развития высоко-злокачественного серозного РЯ (РЯ). Исследование проведено в группах сравнения случай / контроль с оценкой ассоциации заболеваний с отдельными полиморфными вариантами генов. Изучены 29 полиморфных локусов, расположенных в генах биогенеза микроРНК *DROSHA* / *RNASEN*, *DGCR8*, *DICER1*, *XPO5*, *RAN*, *PIWIL1* / *HIWI*, *AGO1* / *EIF2C1*, *AGO2*, *GEMIN4*, *GEMIN3* / *DDX20*, *DDX5* и микроРНК miR196a-2, miR27a (Таблица 1), у больных с РЯ и в контрольной группе индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности. Выбор полиморфных вариантов определялся частотой распространения в европейской популяции, информацией о роли генов в биогенезе микроРНК, а также литературными данными об ассоциации полиморфных вариантов с риском развития онкологических заболеваний.

Таблица 1 - Характеристика полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК

N	SNP ID	Позиция на хромосоме	Ген	Частота минорного аллеля (Global MAF)	A1 / A2*
1	rs11584657	Chr.1: 112296374	<i>GEMIN3</i>	T=0.1430/716	C/T
2	rs197412	Chr.1: 112308953	<i>GEMIN3</i>	C=0.4744/2376	C/T
3	rs563002	Chr.1: 112317135	<i>GEMIN3</i>	C=0.1915/959	C/T
4	rs595055	Chr.1: 36380133	<i>AGO1</i>	T=0.4882/2445	C/T
5	rs642321	Chr.5: 31401003	<i>DROSHA</i>	T=0.3219/1612	C/T
6	rs10719	Chr.5: 31401447	<i>DROSHA</i>	A=0.4830/2419	A/G
7	rs17409893	Chr.5: 31532789	<i>DROSHA</i>	G=0.2216/1110	A/G
8	rs4867329	Chr.5: 31435627	<i>DROSHA</i>	C=0.3722/1864	A/C
9	rs2257082	Chr.6: 43492578	<i>XPO5</i>	A=0.3249/1627	G/A
10	rs3864659	Chr.8: 141555862	<i>AGO2</i>	C=0.1436/719	A/C
11	rs7005286	Chr.8: 141594460	<i>AGO2</i>	T=0.1657/830	C/T
12	rs11060845	Chr.12: 130852174	<i>PIWIL1</i>	T=0.1278/640	G/T
13	rs3809142	Chr.12:131355546	<i>RAN</i>	T=0.1166/584	C/T
14	rs11614913	Chr.12: 54385599	<i>MIR196A2</i>	T=0.3327/1666	C/T
15	rs10773771	Chr.12: 130856316	<i>PIWIL1</i>	T=0.4994/2501	C/T
16	rs1057035	Chr.14: 95554142	<i>DICER1</i>	C=0.1723/863	C/T
17	rs13078	Chr.14: 95556747	<i>DICER1</i>	A=0.0911/456	A/T
18	rs2740351	Chr.17: 643426	<i>GEMIN4</i>	G=0.2895/1450	A/G
19	rs6505162	Chr.17: 28444183	<i>NSRP1 / MIR423</i>	C=0.4978/2493	A/C
20	rs1991401	Chr.17: 62502435	<i>DDX5</i>	G=0.2979/1492	G/A
21	rs7813	Chr.17: 648186	<i>GEMIN4</i>	G=0.2929/1467	A/G
22	rs3744741	Chr.17: 649232	<i>GEMIN4</i>	T=0.2770/1387	C/T
23	rs4968104	Chr.17: 649505	<i>GEMIN4</i>	A=0.1587/795	A/T
24	rs2740348	Chr.17: 649935	<i>GEMIN4</i>	G=0.1066/534	C/G
25	rs895819	Chr.19: 13947292	<i>MIR27A</i>	C=0.3638/1822	C/T
26	rs1640299	Chr.22: 20098359	<i>DGCR8</i>	G=0.3806/1906	T/G
27	rs417309	Chr.22: 20098544	<i>DGCR8</i>	A=0.0431/216	A/G

28	rs720012	Chr.22: 20098582	<i>DGCR8</i>	A=0.2208/1106	<i>A/G</i>
29	rs720014	Chr.22: 20098882	<i>DGCR8</i>	C=0.1833/918	<i>C/T</i>

*примечание: A1 / A2 - аллель 1 (VIC) и аллель 2 (FAM) согласно протоколу производителя (<https://www.thermofisher.com/ru>)

Данные о частоте аллелей полиморфных локусов rs11584657, rs197412, rs563002, rs595055, rs642321, rs10719, rs17409893, rs4867329, rs2257082, rs3864659, rs7005286, rs11060845, rs3809142, rs11614913, rs10773771, rs1057035, rs13078, rs2740351, rs6505162, rs1991401, rs7813, rs3744741, rs4968104, rs2740348, rs895819, rs1640299, rs417309, rs720012 и rs720014 у больных РЯ и в контроле в трех этнических группах - русских, татар и башкир представлены в таблицах 2, 3, 4, 5. Поскольку для полиморфного варианта rs10719 выявлено отклонение распределения частот генотипов от равновесного Харди-Вайнберга в контрольной группе, мы исключили его из дальнейшего анализа.

Результаты мета-анализа, объединившим данные для трех этнических групп (русских, татар и башкир) показали, что аллели полиморфных локусов rs2740351, rs7813, rs3744741, rs2740348 в гене *GEMIN4*, ассоциированы с риском развития высокозлокачественного серозного РЯ (таблица 6). Коррекция на множественность сравнений сохранила статистически значимые значения на уровне $P_{FDR} = 0.05$ для полиморфных локусов rs7813 и rs2740351.

При сравнении разных вариаций генотипов были определены несколько моделей ассоциации с риском развития РЯ. Для полиморфного локуса rs2740351 наиболее предпочтительными моделями являются доминантная, согласно которой у носителей генотипов с минорным аллелем (*AA* vs *AG-GG*) увеличивается риск развития РЯ: OR = 1.42, $p = 0.021$. В соответствии с аддитивной моделью показатель отношения шансов соответствовал значению 1.29 при $p = 0.0086$.

Для полиморфного локуса rs7813 наиболее оптимальными являются аддитивная и рецессивная модели наследования. Согласно рецессивной модели у женщин с генотипом *GG* повышается вероятность развития РЯ по сравнению с генотипами *AA-AG*, OR = 1.46, $p = 0.031$ (таблица 7).

Таблица 2 - Распределение частот аллелей полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК у женщин с высокозлокачественным серозным РЯ и контрольной группы русского этнического происхождения

SNP ID	A1	Частота аллеля A1		A2	P	OR	L95	U95
		Больные РЯ	контроль					
rs595055	C	0.1844	0.2437	T	0.0569	0.70	0.49	1.01
rs11584657	T	0.2008	0.2047	C	0.8956	0.98	0.68	1.40
rs197412	C	0.4672	0.4916	T	0.51	0.91	0.68	1.21
rs563002	C	0.2602	0.2712	T	0.7368	0.94	0.68	1.31
rs642321	T	0.1992	0.1922	C	0.811	1.04	0.73	1.50
rs10719	A	0.2418	0.2298	G	0.7016	1.07	0.76	1.50
rs4867329	A	0.5081	0.479	C	0.4304	1.12	0.84	1.50
rs17409893	G	0.3667	0.3955	A	0.4286	0.88	0.65	1.19
rs2257082	A	0.2787	0.3076	G	0.3954	0.87	0.63	1.2
rs3864659	C	0.1301	0.1341	A	0.8735	0.97	0.63	1.48
rs7005286	T	0.1748	0.1958	C	0.4701	0.87	0.59	1.27
rs11614913	T	0.3388	0.3146	C	0.4853	1.12	0.82	1.52
rs11060845	T	0.0369	0.0461	G	0.5438	0.79	0.37	1.68
rs10773771	C	0.3902	0.3828	T	0.8355	1.03	0.77	1.39
rs3809142	T	0.1423	0.1331	C	0.7154	1.08	0.71	1.64
rs1057035	C	0.2927	0.2978	T	0.8807	0.98	0.71	1.34
rs13078	A	0.2008	0.1789	T	0.4458	1.15	0.79	1.67
rs2740351	G	0.5203	0.4518	A	0.0638	1.32	0.98	1.76
rs7813	G	0.5331	0.4563	A	0.0390	1.36	1.01	1.82
rs3744741	T	0.1352	0.1629	C	0.3037	0.80	0.53	1.22
rs4968104	A	0.2746	0.2612	T	0.6832	1.07	0.77	1.48
rs2740348	G	0.2377	0.1896	C	0.1062	1.33	0.94	1.89
rs6505162	A	0.4836	0.486	C	0.9495	0.99	0.74	1.32
rs1991401	G	0.3415	0.381	A	0.2688	0.84	0.62	1.14
rs895819	C	0.3443	0.345	T	0.9839	0.99	0.73	1.35
rs1640299	G	0.4545	0.3626	T	0.0112	1.46	1.09	1.97
rs417309	A	0.0772	0.0958	G	0.3836	0.79	0.46	1.34
rs720012	A	0.1818	0.2116	G	0.3205	0.83	0.57	1.20
rs720014	C	0.2276	0.1972	T	0.3078	1.2	0.84	1.70

Примечание: A1 - минорный (редкий) аллель в популяции, A2 - мажорный (частый) аллель, OR - отношение шансов, L95 / U95 - нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала

Таблица 3 - Распределение частот аллелей полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК у женщин с высокозлокачественным серозным РЯ и контрольной группы татарского этнического происхождения

SNP ID	A1	Частота аллеля A1		A2	P	OR	L95	U95
		Больные РЯ	контроль					
rs595055	C	0.2938	0.3085	T	0.7167	0.93	0.64	1.36
rs11584657	T	0.2037	0.2041	C	0.9908	0.99	0.65	1.53
rs197412	C	0.5	0.4952	T	0.9139	1.02	0.72	1.51
rs563002	C	0.284	0.2792	T	0.9051	1.02	0.69	1.50
rs642321	T	0.3375	0.2771	C	0.1324	1.33	0.92	1.93
rs10719	A	0.4074	0.3291	G	0.0615	1.40	0.98	1.99
rs4867329	C	0.4506	0.4685	A	0.6846	0.93	0.66	1.32
rs17409893	G	0.284	0.2764	A	0.8475	1.04	0.71	1.52
rs2257082	A	0.3519	0.3265	G	0.5407	1.12	0.78	1.61
rs3864659	C	0.1938	0.1467	A	0.1428	1.39	0.89	2.19
rs7005286	T	0.225	0.2129	C	0.7401	1.07	0.70	1.63
rs11614913	T	0.4012	0.4019	C	0.9877	0.99	0.70	1.42
rs11060845	T	0.0802	0.0873	G	0.775	0.91	0.48	1.71
rs10773771	C	0.4813	0.4597	T	0.6257	1.09	0.77	1.54
rs3809142	T	0.1049	0.1266	C	0.4529	0.81	0.46	1.41
rs1057035	C	0.2407	0.2548	T	0.7137	0.92	0.62	1.39
rs13078	A	0.216	0.1577	T	0.07752	1.47	0.95	2.26
rs2740351	G	0.4444	0.3766	A	0.1142	1.32	0.93	1.88
rs7813	G	0.4375	0.3718	A	0.1276	1.31	0.92	1.87
rs3744741	T	0.1	0.1909	C	0.0066	0.47	0.27	0.82
rs4968104	A	0.1875	0.1899	T	0.9454	0.98	0.63	1.53
rs2740348	G	0.2222	0.1619	C	0.0711	1.48	0.96	2.27
rs6505162	A	0.4198	0.4604	C	0.3532	0.85	0.59	1.20
rs1991401	G	0.3563	0.3972	A	0.3431	0.84	0.59	1.20
rs895819	C	0.3889	0.354	T	0.4092	1.16	0.81	1.66
rs1640299	G	0.3688	0.3861	T	0.6871	0.93	0.65	1.33
rs417309	A	0.1173	0.0984	G	0.4796	1.22	0.70	2.10
rs720012	A	0.2469	0.1962	G	0.1549	1.34	0.89	2.02
rs720014	C	0.2284	0.215	T	0.712	1.08	0.71	1.63

Примечание: A1 - минорный (редкий) аллель в популяции, A2 - мажорный (частый) аллель, OR - отношение шансов, L95 / U95 - нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала

Таблица 4 - Распределение частот аллелей полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК у женщин с высокозлокачественным серозным РЯ и контрольной группы башкирского этнического происхождения

SNP ID	A1	Частота аллеля A1		A2	P
		Больные эРЯ	контроль		
rs595055	C	0.375	0.4012	T	0.8064
rs11584657	T	0.1667	0.1928	C	0.7603
rs197412	T	0.5833	0.4759	C	0.3251
rs563002	C	0.1667	0.2403	T	0.4258
rs642321	T	0.2917	0.2683	C	0.8099
rs10719	A	0.4167	0.3675	G	0.6415
rs4867329	C	0.3333	0.4939	A	0.1412
rs17409893	G	0.2917	0.2622	A	0.7602
rs2257082	A	0.25	0.3855	G	0.1982
rs3864659	C	0.1667	0.1566	A	0.8997
rs7005286	T	0.0833	0.253	C	0.0655
rs11614913	T	0.5	0.3537	C	0.166
rs11060845	T	0.125	0.1037	G	0.7515
rs10773771	C	0.375	0.4938	T	0.2768
rs3809142	T	0.0833	0.0904	C	0.9102
rs1057035	C	0.3333	0.2651	T	0.4832
rs13078	A	0.0417	0.1173	T	0.2644
rs2740351	G	0.375	0.3193	A	0.5863
rs7813	G	0.375	0.3148	A	0.5561
rs3744741	T	0.1667	0.1807	C	0.8666
rs4968104	A	0.1667	0.1585	T	0.9191
rs2740348	G	0.2083	0.1524	C	0.4849
rs6505162	A	0.5	0.4277	C	0.5045
rs1991401	G	0.4167	0.3735	A	0.6836
rs895819	C	0.2917	0.3659	T	0.4785
rs1640299	G	0.375	0.3916	T	0.8764
rs417309	A	0.1667	0.0964	G	0.2943
rs720012	A	0.1667	0.2229	G	0.5314
rs720014	C	0.1667	0.2651	T	0.2998

Примечание: A1 - минорный (редкий) аллель в популяции, A2 - мажорный (частый) аллель, OR отношение шансов, L95 / U95 - нижняя и верхняя границы 95% доверительного интервала

Таблица 5 - Распределение частот аллелей полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК в объединенной выборке больных высококачественным серозным РЯ и контроля (русские, татары, башкиры)

SNP ID	A1	Частота аллеля A1		A2	P	OR	L95	U95
		Больные РЯ	контроль					
rs595055	<i>C</i>	0.236	0.2878	<i>T</i>	0.0344	0.76	0.59	0.98
rs11584657	<i>T</i>	0.2	0.2032	<i>C</i>	0.8853	0.98	0.75	1.28
rs197412	<i>C</i>	0.4767	0.4967	<i>T</i>	0.4653	0.92	0.74	1.14
rs563002	<i>C</i>	0.2639	0.2713	<i>T</i>	0.7597	0.96	0.75	1.23
rs642321	<i>T</i>	0.2558	0.2358	<i>C</i>	0.3905	1.11	0.87	1.43
rs10719	<i>A</i>	0.314	0.2863	<i>G</i>	0.2655	1.14	0.90	1.44
rs4867329	<i>C</i>	0.4676	0.496	<i>A</i>	0.297	0.89	0.72	1.10
rs17409893	<i>G</i>	0.331	0.3311	<i>A</i>	0.9962	0.99	0.79	1.26
rs2257082	<i>A</i>	0.3047	0.3241	<i>G</i>	0.4461	0.91	0.73	1.15
rs3864659	<i>C</i>	0.1558	0.1418	<i>A</i>	0.4669	1.12	0.83	1.50
rs7005286	<i>T</i>	0.1884	0.2093	<i>C</i>	0.3433	0.88	0.67	1.15
rs11614913	<i>T</i>	0.3715	0.3554	<i>C</i>	0.5411	1.07	0.86	1.34
rs11060845	<i>T</i>	0.0581	0.0695	<i>G</i>	0.4044	0.83	0.53	1.29
rs10773771	<i>C</i>	0.4233	0.4268	<i>T</i>	0.8945	0.98	0.79	1.22
rs3809142	<i>T</i>	0.125	0.1257	<i>C</i>	0.9708	0.99	0.72	1.37
rs1057035	<i>C</i>	0.2755	0.2762	<i>T</i>	0.975	0.99	0.78	1.27
rs13078	<i>A</i>	0.1977	0.1633	<i>T</i>	0.0954	1.26	0.96	1.66
rs2740351	<i>G</i>	0.4838	0.4056	<i>A</i>	0.0037	1.37	1.11	1.70
rs7813	<i>G</i>	0.4883	0.4057	<i>A</i>	0.0024	1.39	1.13	1.73
rs3744741	<i>T</i>	0.1238	0.1766	<i>C</i>	0.0094	0.66	0.48	0.90
rs4968104	<i>A</i>	0.236	0.2202	<i>T</i>	0.4881	1.09	0.85	1.41
rs2740348	<i>G</i>	0.2302	0.174	<i>C</i>	0.0082	1.42	1.09	1.84
rs6505162	<i>A</i>	0.4605	0.4689	<i>C</i>	0.7578	0.97	0.78	1.19
rs1991401	<i>G</i>	0.3512	0.3869	<i>A</i>	0.1776	0.86	0.69	1.07
rs895819	<i>C</i>	0.3581	0.351	<i>T</i>	0.7844	1.03	0.83	1.29
rs1640299	<i>G</i>	0.4178	0.3757	<i>T</i>	0.1143	1.19	0.96	1.48
rs417309	<i>A</i>	0.0972	0.0969	<i>G</i>	0.9863	1.00	0.69	1.44
rs720012	<i>A</i>	0.2056	0.2064	<i>G</i>	0.9718	0.99	0.76	1.29
rs720014	<i>C</i>	0.2245	0.2121	<i>T</i>	0.5791	1.076	0.83	1.39

Таблица 6 - Результаты мета-анализа ассоциации изученных полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК с высоко-злокачественным серозным РЯ

SNP ID	A1	A2	N	Модель с фиксированным эффектом		Модель со случайным эффектом		Q	I ²
				P	OR	P(R)	OR(R)		
rs595055	C	T	3	0.1052	0.8116	0.1052	0.8116	0.5588	0.00
rs11584657	T	C	3	0.8601	0.9761	0.8601	0.9761	0.9612	0.00
rs197412	C	T	3	0.5062	0.9295	0.5062	0.9295	0.6180	0.00
rs563002	C	T	3	0.7322	0.9583	0.7322	0.9583	0.7276	0.00
rs642321	T	C	3	0.2151	1.1718	0.2151	1.1718	0.6604	0.00
rs4867329	A	C	3	0.2343	1.1400	0.2343	1.1400	0.4756	0.00
rs17409893	G	A	3	0.679	0.9525	0.679	0.9525	0.7466	0.00
rs2257082	A	G	3	0.5988	0.9392	0.6178	0.9331	0.2959	17.88
rs3864659	C	A	3	0.3706	1.1468	0.3706	1.1468	0.5034	0.00
rs7005286	T	C	3	0.5306	0.9157	0.5436	0.8847	0.1984	38.17
rs11614913	T	C	3	0.3924	1.1029	0.3924	1.1029	0.4401	0.00
rs11060845	T	G	3	0.6444	0.8987	0.6444	0.8987	0.8455	0.00
rs10773771	C	T	3	0.8495	1.0214	0.8495	1.0214	0.4942	0.00
rs3809142	T	C	3	0.8576	0.9706	0.8576	0.9706	0.7134	0.00
rs1057035	C	T	3	0.8809	0.9818	0.8809	0.9818	0.7325	0.00
rs13078	A	T	3	0.1178	1.2473	0.1854	1.2430	0.3066	15.41
rs2740351	G	A	3	0.0128	1.3168	0.0128	1.3168	0.9975	0.00
rs7813	G	A	3	0.0087	1.3389	0.0087	1.3389	0.9876	0.00
rs3744741	T	C	3	0.0175	0.6786	0.0424	0.6708	0.2795	21.56
rs4968104	A	T	3	0.7632	1.0403	0.7632	1.0403	0.9566	0.00
rs2740348	G	C	3	0.0129	1.3940	0.0129	1.3940	0.9302	0.00
rs6505162	A	C	3	0.6498	0.9511	0.6498	0.9511	0.5765	0.00
rs1991401	G	A	3	0.1931	0.8615	0.1931	0.8615	0.7442	0.00
rs895819	C	T	3	0.7366	1.0394	0.7366	1.0394	0.5876	0.00
rs1640299	G	T	3	0.1092	1.1980	0.4425	1.1489	0.1343	50.20
rs417309	A	G	3	0.85	1.0356	0.8236	1.0463	0.3184	12.62
rs720012	A	G	3	0.9418	1.0100	0.9915	1.0021	0.1845	40.84
rs720014	C	T	3	0.452	1.1050	0.452	1.1050	0.4361	0.00

Примечание: N число групп, включенных в исследование, P - p-value fixed, P(R) – p-value random, Q – критерий гетерогенности Кохрена, I² – оценка индекса статистической гетерогенности

Таблица 7 - Ассоциация генотипов полиморфного локуса rs2740351 и rs7813 с риском развития высокозлокачественного серозного РЯ

Модель	Генотип	Контроль	Больные	OR (95% CI)	P
rs2740351					
Codominant	A/A	279 (36.9%)	80 (29.2%)	1.00	0.031
	A/G	343 (45.4%)	130 (47.5%)	1.32 (0.96-1.82)	
	G/G	134 (17.7%)	64 (23.4%)	1.67 (1.13-2.46)	
Dominant	A/A	279 (36.9%)	80 (29.2%)	1.00	0.021
	A/G-G/G	477 (63.1%)	194 (70.8%)	1.42 (1.05-1.91)	
Recessive	A/A-A/G	622 (82.3%)	210 (76.6%)	1.00	0.046
	G/G	134 (17.7%)	64 (23.4%)	1.41 (1.01-1.98)	
Overdominant	A/A-G/G	413 (54.6%)	144 (52.5%)	1.00	0.56
	A/G	343 (45.4%)	130 (47.5%)	1.09 (0.82-1.43)	
Log-additive	---	---	---	1.29 (1.07-1.57)	0.0086
rs7813					
Codominant	A/A	278 (37%)	81 (29.9%)	1.00	0.035
	A/G	340 (45.2%)	125 (46.1%)	1.26 (0.92-1.74)	
	G/G	134 (17.8%)	65 (24%)	1.66 (1.13-2.45)	
Dominant	A/A	278 (37%)	81 (29.9%)	1.00	0.035
	A/G-G/G	474 (63%)	190 (70.1%)	1.38 (1.02-1.86)	
Recessive	A/A-A/G	618 (82.2%)	206 (76%)	1.00	0.031
	G/G	134 (17.8%)	65 (24%)	1.46 (1.04-2.04)	
Overdominant	A/A-G/G	412 (54.8%)	146 (53.9%)	1.00	0.8
	A/G	340 (45.2%)	125 (46.1%)	1.04 (0.79-1.37)	
Log-additive	---	---	---	1.29 (1.06-1.56)	0.0098

GEMIN4 является членом семейства белков GEMIN, участвующих в различных патологических процессах. МикроРНК - нуклеопротеиновый комплекс, в состав которого также входят белки Ago / Eif2C, необходим для сплайсинга и созревания микроРНК. Белок GEMIN4 участвует в работе комплекса RISC. Дефекты белка GEMIN4 могут приводить к дифференциальной экспрессии некоторых специфических микроРНК, которые связаны с злокачественными опухолями. В ряде работ было показано, что полиморфные локусы в гене GEMIN4 ассоциированы с некоторыми клинико-патологическими характеристиками рака мочевого пузыря [7], рака почки [8], рака яичников [9].

Согласно результатам широкомасштабного мета-анализа полиморфный локус rs2740348 / GEMIN4 ассоциирован с риском развития онкологических заболеваний разной локализации [10]. Показано, что у носителей генотипа rs2740348*GC снижается риск развития рака предстательной железы в китайской популяции [11]. Полиморфный вариант rs2740348 / GEMIN4 является функционально значимым, приводит к замене Gln450Glu и может играть потенциальную роль в регуляции экспрессии гена. Продукция белка

GEMIN4 тесно связана с биогенезом микроРНК, которые могут изменять риск развития РЯ.

Наши результаты показывают, что однонуклеотидные полиморфные варианты генов, продукты которых вовлечены в процессинг микроРНК, могут быть связаны с риском возникновения онкологических заболеваний. Эти данные требуют проверки путем дальнейших исследований с увеличением размеров выборки, а также изучения механизмов, с помощью которых генетическая вариабельность генов, вовлеченных в биогенез микроРНК, может влиять на развитие рака.

2.1.2. Анализ ассоциации полиморфных вариантов в генах *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* и *DPF3* с риском развития почечно-клеточной карциномы и формированием ответа на терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа

За отчетный период проведено генотипирование 10 полиморфных вариантов (SNP) генов, ассоциированных с ответом на иммунотерапию. В исследование было включено 86 пациентов со светлоклеточной почечно-клеточной карциномой (скПКК), получающих терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (ИКТИ). Из них 51 пациент имел низкую степень нежелательных явлений (НЯ), связанных с ИКТИ, и 35 пациентов имели высокую степень НЯ. Степень нежелательных явлений оценивалась согласно универсальной шкале токсичности СТСАЕ (Common Terminology Criteria for Adverse Events). Все пациенты обследованы и охарактеризованы высококвалифицированными специалистами Республиканского клинического онкологического диспансера и кафедр онкологии и урологии Башкирского государственного медицинского университета. Информированное согласие на участие в эксперименте было получено от каждого индивидуума. Клинико-патологические характеристики индивидов, включенных в исследование, представлены в таблице 8. В таблице 9 представлены наблюдаемые категории нежелательных явлений в группах с 0-2 и 3-4 степенью.

Таблица 8 - Клинико-патологические характеристики пациентов со скПЖК, получающих терапию ИКТИ

	Количество пациентов	%
Возраст, годы		
Медиана	60	
Диапазон	38-81	
Пол		
Мужчины	66	76.74
Женщины	20	23.26
Гистологический тип		
Светлоклеточный	86	100.00
Не светлоклеточный	0	0
IMDC классификация риска		
Благоприятный	0	0
Средний	59	68.60
Неблагоприятный	27	31.40

IMDC - Международный консорциум по лечению метастатического рака почки

Таблица 9 - Наблюдаемые нежелательные явления в соответствии с категорией и степенью

Категория	Степень, число индивидов	
	Степень 0-2 n (%)	Степень 3-4 n (%)
Явления со стороны кожи	10 (19.60)	5 (14.30)
Пневмонии	3 (5.90)	5 (14.30)
Диарея, колиты	9 (17.60)	8 (22.90)
События, связанные с эндокринной системой	20 (39.20)	6 (17.10)
Панкреатиты	1 (1.90)	5 (14.30)
Гепатиты	6 (11.70)	1 (2.90)
Нефриты	1 (1.90)	0
Миалгия	1 (1.90)	0
Боль в суставах	1 (1.90)	0
Другие	0	5 (14.30)

Иммунные контрольные точки являются ключевыми рецепторами, которые регулируют иммунную систему и предотвращают ее сверхактивацию. Этот регуляторный механизм, который в нормальных условиях отвечает за поддержание иммунного гомеостаза, может быть использован опухолевыми клетками, позволяя им избежать

распознавания и уничтожения иммунной системой. Белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1) представляет собой иммуноингибирующий рецептор, экспрессируемый в активированных Т-клетках; он участвует в регуляции функций Т-клеток, в том числе эффекторных CD8⁺ Т-клеток. Кроме того, этот белок также может способствовать дифференцировке CD4⁺ Т-клеток в Т-регуляторные клетки. PD-1 участвует в защите от аутоиммунитета, а также может способствовать ингибированию эффективного противоопухолевого и противомикробного иммунитета. PD-1 является одной из основных иммунных контрольных точек, которая при взаимодействии со своими лигандами — PD-L1/PD-L2 регулирует иммунный надзор в микроокружении опухоли. Важно отметить, что лиганды PD-1 также могут экспрессироваться опухолевыми клетками и опухолевой стромой. Взаимодействие PD-1/PD-L1 в микроокружении опухоли напрямую ответственно за нарушение иммунного ответа против рака и за уклонение опухолевых клеток от иммунного надзора. Таким образом, взаимодействие PD-1/PD-L1 может обеспечить упомянутый выше механизм ускользания опухолевых клеток от иммунного ответа [12]. Для предотвращения этого процесса в последние годы в клиническую практику были внедрены высокоэффективные ингибиторы контрольных точек иммунитета (анти-CTLA-4 и анти-PD-1, по отдельности или в комбинации), роль которых заключается в усилении иммунного ответа против опухолевых клеток [13]. Цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами (CTLA-4), был впервые обнаружен как транспортер ингибирующего сигнала, важный для прекращения иммунных ответов. CTLA-4 играет критическую и центральную роль в регуляции иммунных реакций и индукции толерантности к себе. CTLA-4 контролирует активацию Т-клеток многими способами, что важно для защиты от аутоиммунитета [14]. Также ранее было показано, что с ответом на иммунотерапию у пациентов со светлоклеточной почечно-клеточной карциномой могут быть связаны изменения нуклеотидной последовательности в комплексах ремоделирования хроматина (SWI/SNF), в частности в гене *DPF3* [15].

Исходя из вышеизложенного, было предположено, что однонуклеотидные полиморфизмы в генах *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4* и *DPF3* могут быть связаны с развитием почечно-клеточной карциномы и формированием ответа на терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа. Основываясь на анализе литературных данных, для исследования было выбрано 10 однонуклеотидных полиморфных вариантов, представленных в таблице 10.

Таблица 10 - Полиморфные варианты генов, включенные в исследование генетической предрасположенности к раку почки

SNP	Позиция	Частота минорного аллеля в популяции (согласно БД 1000 Геномов)	Ген
rs7866740	9:5450529	0.08 (G)	<i>PD-L1</i>
rs231775	2:203867991	0.43 (G)	<i>CTLA4</i>
rs2227981	2:241851121	0.35 (A)	<i>PD-1</i>
rs822336	9:5448690	0.35 (C)	<i>PD-L1</i>
rs733618	2:203866221	0.17 (C)	<i>CTLA4</i>
rs4903064	14:72812712	0.29 (C)	<i>DPF3</i>
rs11568821	2:241851760	0.04 (T)	<i>PD-1</i>
rs7421861	2:241853198	0.27 (G)	<i>PD-1</i>
rs4742098	9:5470497	0.29 (G)	<i>PD-L1</i>
rs10815225	9:5450497	0.16 (C)	<i>PD-L1</i>

В результате анализа ассоциаций было выявлено три полиморфных варианта, генотипы и аллели которых были ассоциированы с эффективностью терапии ИКТИ (Таблица 11).

Анализ ассоциаций аллелей и генотипов полиморфного локуса rs7866740 гена *PD-L1* показал, что аллель rs7866740**C* является маркером риска развития тяжелых форм нежелательных явлений у пациентов скПКК, получающих терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета. Аллель rs7866740**G* встречался в группе пациентов, демонстрирующих 3-4 степень НЯ значительно реже, с частотой 13% против 34% в группе пациентов со степенью НЯ 0-2. Полиморфный вариант rs7866740 расположен в 5'-нетранслируемой области, что как предполагают, наделяет его способностью ингибировать трансляцию белка. Ранее было показано, что минорный аллель полиморфного варианта rs7866740 ассоциирован с более высокой общей выживаемостью у пациентов со светлоклеточной почечно-клеточной карциномой [16]. Полученные нами результаты косвенно согласуются с этими данными, т.к. пациенты скПКК с более низкими степеням НЯ, как правило, имеют лучший прогноз и более высокие показатели выживаемости. С другой стороны, при исследовании немелкоклеточного рака легкого минорный аллель rs7866740**G* встречался значительно чаще в группе пациентов по сравнению с группой здорового контроля [17], что говорит о противоречивой роли

данного полиморфного локуса в развитии злокачественных опухолей и требует дальнейшего его изучения.

Таблица 11 - Распределение частот генотипов и аллелей полиморфных локусов rs7866740 гена *PD-L1*, rs231775 гена *CTLA4* и rs4903064 гена *DPF3* в группе пациентов скПКК, получающих терапию ИКТИ

Генотипы и аллели	Степень нежелательных явлений 0-2 (согласно СТСАЕ)		Степень нежелательных явлений 3-4 (согласно СТСАЕ)		χ^2	OR	95%CI	P-value
	n	pi±Sp, CI%	n	pi±Sp, CI%				
rs7866740 гена <i>PD-L1</i>								
CC	23	45±6,97, 30,95-59,62	27	77±7,1, 59,86-89,58	7,97	4,11	1,56-10,71	0,004
CG	21	42±6,91, 28,23-56,71	7	20±6,76, 8,44-36,94	3,32	0,35	0,13-0,96	0,06
GG	7	13±4,71, 5,17-25,47	1	3±2,82, 0,07- 14,92	1,76	0,16	0,02-1,57	0,13
C	67	66±4,69, 55,93-75,11	61	87±4,0 76,99-93,95	8,94	3,54	1,57-7,96	0,001
G	35	34±4,69, 24,89-44,07	9	13±4,0, 6,05-23,01	8,94	0,28	0,12-0,63	0,001
rs231775 гена <i>CTLA4</i>								
AA	10	20±5,56, 9,82-33,12	10	29±7,64, 14,64-46,3	0,50	1,64	0,59-4,43	0,437
AG	24	46±6,99, 32,93-61,54	21	60±8,28, 42,11-76,13	0,92	1,57	0,66-3,72	0,384
GG	17	34±6,6, 20,76-47,92	4	11±5,38, 3,2- 26,74	4,27	0,26	0,08-0,85	0,023
A	44	43±4,9, 33,37-53,32	41	58±5,89, 46,17-70,23	3,36	1,86	1,00-3,45	0,060
G	58	57±4,9, 46,68-66,63	29	41±5,89, 29,77-53,83	3,36	0,53	0,29-0,99	0,060
rs4903064 гена <i>DPF3</i>								
TT	28	55±6,97, 40,34-68,87	12	34±8,02, 19,13-52,21	2,76	0,43	0,17-1,04	0,79
CT	20	39±6,84, 25,84-53,89	15	43±8,36, 26,32-60,65	0,01	1,16	0,48-2,78	0,824
CC	2	6±3,29, 1,23- 16,24	8	23±7,1, 10,42-40,14	3,95	4,74	1,16-19,38	0,044

T	76	75±4,23, 64,92-82,62	39	56±5,94, 43,34-67,59	5,79	0,43	0,22-0,82	0,013
C	26	25±4,32, 17,38-35,08	30	44±5,94, 32,41-56,66	5,79	2,32	1,21-4,44	0,013

При изучении полиморфного варианта rs231775 гена *CTLA4* была обнаружена ассоциация генотипа *GG* со снижением риска развития нежелательных явлений 3-4 степени у пациентов скПКК, получающих терапию ИКТИ. Также была отмечена тенденция к снижению риска развития тяжелых НЯ у носителей аллеля *G* и тенденция к повышению риска тяжелых НЯ у носителей аллеля *A* полиморфного варианта rs231775 при терапии ИКТИ. Полиморфный вариант rs231775 представляет собой несинонимичный SNP, который приводит к замене треонина на аланин в положении 17 N-концевой последовательности белка *CTLA4*. Сообщается, что наличие генотипа *AA* (*Thr17*) в отличие от генотипа *GG* (*Ala17*) ассоциировано со значительно более низким уровнем активации Т-клеток и их меньшей пролиферацией. Также было продемонстрировано, что молекула *CTLA-4* с (*Thr17*) обладает более высокой способностью связывать *CD80* и более сильным ингибирующим действием на активацию Т-клеток по сравнению с (*Ala17*). Более того, предполагается, что гомозиготы (*Ala17*) могут экспрессировать на треть меньше *CTLA-4* на поверхности Т-клеток, чем гомозиготы (*Thr17*) [18].

Ассоциация полиморфного локуса rs231775 со злокачественными новообразованиями была обнаружена при различных типах рака, включая рак молочной железы, рак шейки матки, рак желудка, колоректальный рак и другие. Что касается урологических злокачественных опухолей, на сегодняшний день литературные данные ограничены. Известно, что в популяции Северной Индии генотип *GG* был связан с почти в 4 раза более высоким риском развития рака мочевого пузыря [19]. Результаты исследований данного полиморфного локуса при почечно-клеточной карциноме носят противоречивый характер. Так, в исследовании популяции Испании генотип rs231775**AA* был ассоциирован с двукратным увеличением риска развития ПКК. Также, представленность этого генотипа наблюдалась чаще в группе индивидов с опухолями высокой степени злокачественности [20]. В исследовании индивидов, проживающих на территории Польши, напротив, с повышением риска развития скПКК, а также с наличием некрозов и поздними стадиями заболевания был ассоциирован аллель rs231775**G* [21]. Также, было показано, что пациенты с генотипом *GG*, находящиеся на терапии сунитинибом в качестве первой линии, демонстрируют более высокую общую выживаемость, по сравнению с носителями генотипов *AA* и *AG*. В данном случае, было предположено, что в результате сниженной экспрессии *CTLA4* у носителей генотипа *GG*

происходит снижение связывания с лигандом, из-за чего Т-клетки могут лишь слабо ингибироваться, способствуя усиленному аутоимунному ответу, что может потенциально помочь пациенту со злокачественной опухолью [16]. Значительно более длительная выживаемость также наблюдалась у пациентов с немелкоклеточным раком легких с генотипами rs231775*GG и rs231775*AG, что свидетельствует о прогностической роли данного полиморфного варианта [22].

В результате анализа ассоциаций аллелей и генотипов полиморфного варианта rs4903064 гена *DPF3* было обнаружено, что аллель rs4903064*C и генотип rs4903064*CC ассоциированы с развитием более тяжелых форм нежелательных явлений у пациентов скПКК, получающих терапию ИКТИ. Аллель rs4903064*T при этом демонстрировал протективные свойства в отношении развития тяжелых форм нежелательных явлений после терапии ИКТИ. Известно, что светлоклеточная почечно-клеточная карцинома характеризуется в первую очередь деактивацией гена-супрессора опухолевого роста фон Хиппеля-Линдау, а также изменениями в генах ремоделирования хроматина, таких как *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*. Проведенные ранее полногеномные исследования почечно-клеточной карциномы идентифицировали тринадцать регионов предрасположенности к развитию данного типа опухоли. Одним из примечательных локусов является локус 14q24, содержащий полиморфный вариант rs4903064 гена *DPF3* комплекса ремоделирования SWI/SNF [23]. Продукт гена *DPF3* является важным регулятором экспрессии генов, действуя посредством репозиционирования нуклеосом. Ранее было показано, что аллель C полиморфного локуса rs4903064 связан с более высокой экспрессией *DPF3* как в нормальных тканях, так и в образцах опухолей [15]. Кроме того, аллель-специфичный эффект rs4903064, опосредованный через энхансер в локусе 14q24, по-видимому, приводит к изменениям доступности хроматина и экспрессии генов, а также к ингибированию апоптоза и активации онкогенных путей в клетках почки. Аллель риска развития ПКК rs4903064*C создает сайт связывания с гипоксией индуцированным фактором HIF и, по прогнозам, усиливает экспрессию генов, тогда как прогнозируется, что протективный аллель rs4903064*T увеличивает сродство к связыванию с IRX2/IRX5, которое подавляет транскрипцию *DPF3* [24]. Также, отмечается, что локус 14q24 может быть связан с активацией пути STAT3, являющегося важным супрессором противоопухолевого иммунного ответа, что в свою очередь, может увеличивать риск развития ПКК за счет уклонения опухоли от иммунитета [25].

Таким образом, за отчетный период были получены перспективные данные о роли ряда полиморфных вариантов в формировании ответа на терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа у пациентов со светлоклеточной почечно-клеточной

карциномой. Несмотря на противоречивые данные, которые встречаются в литературных источниках, полученные результаты вносят вклад в понимание развития резистентности злокачественных опухолей почки к иммунотерапии, однако, безусловно, требуются дальнейшие уточняющие и поисковые исследования на расширенных когортах пациентов, получающих терапию препаратами ИКТИ.

2.1.3. Анализ уровня метилирования промоторной области гомеобоксодержащего гена *SHOX2* у больных мелкоклеточным раком легкого

Мелкоклеточный рак легкого представляет собой очень агрессивную нейроэндокринную опухоль высокой степени злокачественности. Характерными признаками данной патологии являются раннее метастазирование, короткая выживаемость (относительная пятилетняя выживаемость менее 7%) и ограниченная тактика лечения. Генетические исследования данной патологии обнаружили частые соматические мутации в клетках легочной ткани, что, по-видимому, вызвано мутагенным воздействием табачного дыма. Статистические данные говорят о том, что среди больных МРЛ лишь 1% составляют никогда не курившие. Наиболее частыми мутациями при МРЛ являются: функциональная инактивация генов супрессоров опухолевого роста TP53, RB1, а также PTEN, увеличение числа повторов копий генов семейства MYC, мутации в генах белков-модификаторов гистонов *EP300*, *CREBBP*, *KMT2A (MLL)* и *KMT2D (MLL2)*, инактивирующие мутации в генах семейства NOTCH и частые делеции областей, содержащих гены *FHIT* и *CDKN2A* [26; 27].

Всё больше работ свидетельствуют о значительном вкладе в развитие МРЛ эпигенетических процессов, и одним из наиболее изученных механизмов эпигенетических модификаций генома является метилирование ДНК. Это важный эпигенетический процесс, и aberrантное метилирование является отличительной чертой возникновения рака у человека. Анализ профилей метилирования позволяет устанавливать тип опухоли, определять её лекарственную чувствительность и выявлять новые маркеры риска развития онкопатологии.

Метилирование считается одним из самых ранних маркеров развития онкопатологии. При раке легкого инактивация генов посредством гиперметилирования CpG островков промоторных областей происходит в 20-60% случаев. Исследованиями у больных с раком легкого показано гиперметилирование и, соответственно, инактивация более чем 40 генов, и главным образом, - генов супрессоров опухолевого роста. Кроме того, характерны мутации генов гистоновых ацетилтрансфераз *EP300* и *CREBBP* и

гистоновых метилтрансфераз *KMT2A* и *KMT2D*. Также при МРЛ стоит отметить гиперэкспрессию гистоновой метилтрансферазы *EZH2*, что можно считать отличительной чертой данного типа опухоли по сравнению с другими и с нормальной легочной тканью. Гиперметилирование ряда генов ассоциировано с ответом пациентов на терапию и с прогнозом выживаемости. Например, гиперметилирование промотора гена супрессора опухоли *RUNX* связано с выживаемостью при немелкоклеточной форме рака легкого.

В ходе ряда исследований обнаружен ещё один перспективный биомаркер для раннего выявления рака легких в бронхиальных аспиратах, основан он на метилировании гена *SHOX2* [28]. Онкоген *SHOX2* является членом семейства гомеобоксных генов, являющихся регуляторами транскрипции. Данный ген является регулятором клеточной пролиферации и апоптоза и индуктором эпителиально-мезенхимального перехода [29]. Аберрантное метилирование гена *SHOX2* является отличительной чертой онкопатологии легких и коррелирует с увеличением числа копий участка локуса 3q25.3. Стоит отметить, что метилирование гена *SHOX2* наблюдается в различных гистологических подтипах рака легких [30], и с особенно высокой частотой встречается при мелкоклеточном и плоскоклеточном раке легкого.

За отчетный период был проведен анализ уровня метилирования промоторной области гена *SHOX2* у 50 больных МРЛ. ДНК была выделена из опухолевой ткани легких, фиксированных в формалине и залитых парафином, с помощью набора GeneRead DNA FFPE Kit фирмы Qiagen. Определение статуса метилирования осуществляли на основе бисульфитной конверсии ДНК (набором EZ DNA Methylation-Gold Kit фирмы Zymo Research) и последующего метил-чувствительного анализа кривых плавления (MS-HRM analysis) (набором MeltDoctor HRM Master Mix фирмы Thermo). Для определения уровня метилирования использовали стандарты метилированной и неметилированной ДНК фирмы Zymo Research. Анализ проводился на приборе LightCycler96 (Roche Diagnostics, Германия).

Для оценки метилирования в исследуемых образцах использовались ДНК стандарты с уровнем метилирования 0%, 25%, 50% и 75%. Гиперметилирование промоторной области гена *SHOX2* выявлено в 23 образцах МРЛ, что составило 46%. В их числе у 13 образцов уровень метилирования составил 25%, а у 10 образцов – 50%. Образцов с уровнем метилирования 75% нами не выявлено. Все исследованные больные МРЛ с гиперметилированием промоторной области *SHOX2* имели распространенную форму МРЛ.

Многочисленными исследованиями образцов рака легкого показан повышенный уровень метилирования гена *SHOX2* при данной патологии [31; 30]. Интересно, что

обнаруживаются подобные изменения не только в легочной ткани, но и в бронхоальвеолярном лаваже, в жидкости из плевральной полости и в клетках лимфатических узлов. Важно отметить, что сочетанное гиперметилование гена *SHOX2* и другого известного опухолевого супрессора – гена *RASSF1A*, выявляемое в различных типах образцов, является высоко чувствительным и весьма специфичным для рака легкого. [28; 30; 32; 33].

Таким образом, имеющиеся литературные данные позволяют судить о гиперметиловании гена *SHOX2* как о потенциальном маркере для ранней диагностики рака легкого и мониторинга его течения.

2.1.4. Репликативное исследование полиморфных локусов генов, ассоциированных с развитием бронхиальной астмы при GWAS, в независимой выборке больных с сочетанными проявлениями аллергопатологиями и здоровых индивидов контрольной группы из Республики Башкортостан

Аллергические заболевания (АЗ) представляют собой группу распространенных патологий, в основе которых лежит аллергия или анафилаксия, и являются одной из важнейших проблем практического здравоохранения [34, 35]. Самыми распространенными аллергическими заболеваниями, в целом составляющими атопическую триаду, являются бронхиальная астма (БА), аллергический ринит (АР) и атопический дерматит (АД). Данные заболевания тесно связаны между собой, а каждое из них может выступить в роли пускового механизма для начала развития другого [36]. Около 30-40% населения мира страдают различными АЗ (<http://www.worldallergy.org>). Показано, что наследуемость БА варьирует от 35% до 95%, аллергического ринита от 33% до 91%, а атопического дерматита от 71% до 84% [37].

АЗ характеризуются сложной природой, взаимодействие многочисленных генетических и экологических факторов в совокупности обуславливает их обширную фенотипическую гетерогенность. В настоящее время продолжают исследования молекулярных механизмов мультиморбидности заболеваний атопической триады. При интеллектуальном анализе данных и построении сетей функционального взаимодействия на уровне белков показано, что заболевания атопической триады имеют более высокий уровень взаимосвязанности, чем можно было бы ожидать. В частности, пять белков (IL4, IL13, IL1RL1, IL18R1 и TSLP) и два клеточных пути, включая передачу сигналов, связанных с GATA3 и IL4, идентифицированы как общие для всех трех признаков атопической триады [38]. Ferreira с коллегами при GWAS пациентов с 3-мя признаками

атопической триады выявлено 136 полиморфных вариантов риска совместного развития данных патологий, при этом только небольшое количество вариантов (4,4%) показало более сильные эффекты в отношении одного атопического признака по сравнению с двумя оставшимися [39].

К настоящему времени выполнены анализы ассоциации АЗ с полиморфными вариантами сотен генов-кандидатов, проведен ряд полногеномных анализов сцепления БА и атопии. Начиная с 2007 года активно проводятся GWAS исследования АЗ, преимущественно астмы, в различных популяциях мира, в результате которых идентифицирован целый ряд полиморфных локусов, многие из которых ассоциированы с риском развития различных АЗ *HLA-DQB1*, *HLA-DQA1* (6p21.32), *IL1RL1*, *IL1RL1* (2q12.1), *LRRC32*, *C11orf30* (11q13.5), *GSDMB*, *ZBP2* (17q12-21), *IL33*, *RANBP6* (9p24.1), *IL13*, *RAD50* (5q31.1) и др. (www.genome.gwas.org). Проведенные исследования показали существование как общих генетических факторов риска АЗ, предрасполагающих к развитию патологий у индивидов различной этнической принадлежности, так и специфических факторов риска развития АЗ в отдельных популяциях.

В Республике Башкортостан также активно проводятся исследования аллергических заболеваний. В 2011 году в рамках интегрированного проекта Шестой рамочной программы Евросоюза GABRIEL нами был проведен полногеномный анализ ассоциации (GWAS) 610000 полиморфных локусов с развитием БА у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности, проживающих в Республике Башкортостан (РБ) [40]. Полногеномный анализ ассоциации показал наличие выраженной ассоциации данного заболевания у русских с полиморфными локусами - rs10958058 (8q11.21), rs1492313 (12q12) и rs6004423 (22q11.23); у татар - rs3769309 (2q31.1), rs1511599 (3q26.2), rs10435941 (9q21.2), rs12719740 (15q26.3); у башкир - rs9324750 (5q33.2), rs13207327 (6q27), rs10757282 (9p21.3), rs2155440 (11q22.3) и др. Наиболее значимая ассоциация с развитием БА при GWAS для индивидов из РБ была установлена для ОНП, локализованных в области 17q12-q21. При репликации результатов полногеномного исследования БА в РБ в независимых выборках пациентов и контроля русской, татарской и башкирской этнической принадлежности показано, что полиморфные варианты rs7216389, rs2290400 и rs2305480 гена *GSDMB* ассоциированы с развитием БА и БА в сочетании с АР [41].

Настоящее исследование является продолжением многолетнего молекулярно-генетического исследования БА и основан на результатах полногеномного анализа ассоциации БА, проведенного нами ранее в рамках проекта Шестой рамочной программы Евросоюза (GABRIEL). Целью данного этапа проекта явилось исследование

полиморфных локусов, ассоциированных с развитием БА по данным GWAS в Республике Башкортостан (rs12065806, rs3769309, rs1511599, rs764005, rs9324750, rs13207327, rs10958058, rs10757282, rs10435941, rs883017, rs2938001, rs2155440, rs1492313, rs716368, rs12719740, rs8054797, rs6004423), в независимой выборке больных с сочетанными проявлениями аллергических заболеваний и здоровых индивидов контрольной группы для определения значимости выявленных ассоциаций в развитии сочетанных форм аллергопатологии у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности.

Молекулярно-генетическое исследование выполнено с помощью современных методов. Выделение ДНК из крови проведено методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфных вариантов генов выполнено с помощью метода ПЦР в реальном времени с флуоресцентной детекцией (FLASH/RTAS) (ООО «ТестГен») и согласно протоколам фирм-производителя с помощью системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени CFX96 (Bio-Rad) (США). Материалом для исследования служили образцы ДНК 188 больных с сочетанными проявлениями аллергопатологий (русские - 34, татары - 59, башкиры – 28, смешанной этнической принадлежности - 67) и 190 практически здоровых индивидов (русские - 73, татары - 49, башкиры – 30, смешанной этнической принадлежности - 38), в возрасте от 2 до 67 лет. Выборка пациентов с сочетанными АЗ включает группу больных БА с сопутствующим АР и группу больных с сочетанными АЗ (АР, БА и АД).

Проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов rs12065806 (1p31.1), rs3769309 (2q31.1), rs1511599 (3q26.2), rs764005 (4q31), rs9324750 (5q33.2), rs13207327 (6q27), rs10958058 (8q11.21), rs10757282 (9p21.3), rs10435941 (9q21.2), rs883017 (10q11.23), rs2938001 (10q26.13), rs2155440 (11q22.3), rs1492313 (12q12), rs716368 (15q14), rs12719740 (15q26.3), rs8054797 (16q12.1), rs6004423 (22q11.23) в независимой выборке больных с сочетанными АЗ и в контрольной группе индивидов (Таблицы 12-15). Распределение частот генотипов данных локусов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Обнаружены статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs3769309 (g.172815054A>G) гена *RAPGEF4* между больными АЗ и индивидами соответствующих контрольных групп различной этнической принадлежности. Ген *RAPGEF4* кодирует цАМФ-регулируемый фактор замены гуанинового нуклеотида ГТФазы Rap1. Показано, что у больных БА с сопутствующим АР русской этнической принадлежности генотип rs3769309*GG и аллель rs3769309*G встречаются чаще (58,82% и 70,59%), чем в контрольной группе (23,29%, p=0,0003,

OR=4,71, 95%CI 1,97-11,26 и 51,37%, p=0,008, OR=2,27, 95%CI 1,23-4,2). Аллель rs3769309**A* определялся у 29,41% больных БА с сопутствующим АР и у 48,63% индивидов соответствующей контрольной группы русских (p=0,008, OR=0,44, CI95% 0,24-0,81). Обнаружена тенденция к ассоциации аллеля rs3769309**G* с развитием БА с сопутствующим АР у татар (p=0,06). Полиморфный локус rs3769309 локализован в 4-м интроне гена *RAPGEF4* (Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4) или *EPAC2* (Exchange Protein Directly Activated by cAMP). Связывая цАМФ, белки Ерас могут взаимодействовать с низкомолекулярными G-белками Rap1A/2B, вызывая замещение в их регуляторном центре ГДФ на ГТФ, поэтому их обозначают также как cAMP-GEF (guanine nucleotide exchange factor). Установлено, что Ерас1 и Ерас2 экспрессируются в гладкомышечных клетках дыхательных путей [42; 43]. Ерас1 и Ерас2 контролируют различные клеточные процессы, включая транспорт кальция, клеточную пролиферацию, дифференцировку, барьерную функцию, миграцию, воспалительный ответ путем передачи сигналов через различные эффекторы [44; 43].

Таблица 12 - Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов, у больных БА с сопутствующим АР и в контрольной группе русской этнической принадлежности

N	Хромосома	Ген, локализация	Полиморфный вариант	ОНП	Аллель 1	Ч-та аллеля 1 у больных, %	Ч-та аллеля 1 в контроле, %	Аллель 2	χ^2	p	OR
1	1	<i>LOC105378814</i>	rs12065806	g.53075287G>T	T	19,12	26,71	G	1,46	0,23	0,65
2	2	<i>RAPGEF4</i>	rs3769309	g.172815054A>G	A	29,41	48,63	G	7,01	0,008	0,44
3	3	3q26.2	rs1511599	g.168640934G>A	A	36,36	23,44	G	2,59	0,11	1,87
4	4	<i>LOC107986195</i>	rs764005	g.148986981G>A	A	48,53	42,25	G	0,73	0,39	1,29
5	5	<i>GRIA1</i>	rs9324750	c.220+42404A>C	A	29,41	32,19	C	0,17	0,68	0,88
6	6	<i>DACT2</i>	rs13207327	c.247-679A>G	C	42,65	45,89	T	0,20	0,66	0,88
7	8	<i>SPIDR</i>	rs10958058	g.47592067G>C	G	13,24	17,12	C	0,52	0,47	0,74
8	9	9p21.3	rs10757282	g.22133985T>C	C	33,33	40,97	T	1,12	0,29	0,72
9	9	9q21.2 (<i>FOXB2</i>)	rs10435941	g.77054188G>A	A	12,12	18,46	G	1,29	0,26	0,61
10	10	10q11.23	rs883017	g.49009393T>C	T	36,36	36,3	C	7,619e-05	0,99	1,00
11	10	<i>CTBP2</i>	rs2938001	g.125031719C>T	C	35,29	46,58	T	2,4	0,12	0,63

									1		
12	11	<i>EXPH5</i>	rs2155440	g.108429776C>T	T	41,18	49,32	C	1,2 3	0,27	0,72
13	12	<i>MUC19</i>	rs1492313	c.4571G>A, p.Arg1524Lys	G	30,88	41,78	A	2,3 3	0,13	0,62
14	15	<i>RYR3</i>	rs716368	g.33971926C>T	C	35,94	41,1	T	0,5 0	0,48	0,80
15	15	15q26.3	rs1271974 0	g.99072905G>A	A	22,06	15,07	G	1,5 9	0,208	1,60
16	16	16q12.1 (<i>BRD7</i>)	rs8054797	g.50385293C>A	A	16,67	20,14	C	0,3 5	0,55	0,79
17	22	<i>KIAA1671</i>	rs6004423	c.4530+21222G>A	A	17,65	30,82	G	4,1 2	0,04	0,48

Примечание: Примечание. N – номер варианта; χ^2 - Критерий хи-квадрат Пирсона; p – уровень значимости; OR – показатель отношения шансов

Таблица 13 - Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов, у больных БА с сопутствующим АР и в контрольной группе татарской этнической принадлежности

N	Хро- мосо- ма	Ген, локали- зация	Полиморфн ый вариант	ОНП	Ал- лель 1	Ч-та аллеля 1 у боль- ных,%	Ч-та алле- ля 1 в контр- оле, %	Ал- лель 2	χ^2	p	OR
1	1	<i>LOC10537 8814</i>	rs12065806	g.53075287G>T	T	22,88	32,65	G	2,5 8	0,1 1	0,61
2	2	<i>RAPGEF4</i>	rs3769309	g.172815054A>G	A	28,81	40,82	G	3,4 3	0,0 6	0,59
3	3	3q26.2	rs1511599	g.168640934G>A	A	32,46	30,77	G	0,0 5	0,8 3	1,08
4	4	<i>LOC10798 6195</i>	rs764005	g.148986981G>A	A	43,22	53,06	G	2,0 8	0,1 5	0,67
5	5	<i>GRIA1</i>	rs9324750	c.220+42404A>C	A	22,03	26,6	C	0,6 0	0,4 4	0,78
6	6	<i>DACT2</i>	rs13207327	c.247-679A>G	T	0,5	48,98	C	0,0 2	0,8 8	1,04
7	8	<i>SPIDR</i>	rs10958058	g.47592067G>C	G	15,79	21,43	C	1,1 2	0,2 9	0,69
8	9	9p21.3	rs10757282	g.22133985T>C	C	40,52	38,54	T	0,0 9	0,7 7	1,09
9	9	9q21.2 (<i>FOXB2</i>)	rs10435941	g.77054188G>A	A	13,79	17,14	G	0,3 8	0,5 4	0,77
10	10	10q11.23	rs883017	g.49009393T>C	T	30,51	34,38	C	0,3 6	0,5 5	0,84
11	10	<i>CTBP2</i>	rs2938001	g.125031719C>T	T	0,5	45,92	C	0,3 6	0,5 5	1,18
12	11	<i>EXPH5</i>	rs2155440	g.108429776C>T	T	34,75	37,76	C	0,2 1	0,6 5	0,88
13	12	<i>MUC19</i>	rs1492313	c.4571G>A, p.Arg1524Lys	G	44,92	39,13	A	0,7 0	0,4	1,27
14	15	<i>RYR3</i>	rs716368	g.33971926C>T	C	27,59	37,76	T	2,5 1	0,1 1	0,63

15	15	15q26.3	rs12719740	g.99072905G>A	A	16,95	21,43	G	0,70	0,40	0,75
16	16	16q12.1 (BRD7)	rs8054797	g.50385293C>A	A	28,81	20,83	C	1,79	0,18	1,53
17	22	KIAA1671	rs6004423	c.4530+21222G>A	A	25,42	27,55	G	0,12	0,72	0,90

Таблица 14 - Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов у больных БА с сопутствующим АР и в контрольной группе башкирской этнической принадлежности

N	Хромосома	Ген, локализация	Полиморфный вариант	ОНП	Аллель 1	Частота аллеля 1 у больных, %	Частота аллеля 1 в контроле, %	Аллель 2	χ^2	p	OR
1	1	LOC105378814	rs12065806	g.53075287G>T	T	28,57	31,67	G	0,13	0,72	0,86
2	2	RAPGEF4	rs3769309	g.172815054A>G	A	46,43	48,33	G	0,04	0,84	0,93
3	3	3q26.2	rs1511599	g.168640934G>A	A	40,74	38,89	G	0,02	0,89	3,22
4	4	LOC107986195	rs764005	g.148986981G>A	G	42,86	33,33	A	1,12	0,29	3,19
5	5	GRIA1	rs9324750	c.220+42404A>C	A	33,93	24,14	C	1,33	0,25	1,61
6	6	DACT2	rs13207327	c.247-679A>G	T	35,19	21,67	C	2,57	0,11	1,96
7	8	SPIDR	rs10958058	g.47592067G>C	G	30,36	20,69	C	1,40	0,24	1,67
8	9	9p21.3	rs10757282	g.22133985T>C	T	0,5	0,5	C	0	1	1
9	9	9q21.2 (FOXB2)	rs10435941	g.77054188G>A	A	11,11	04,55	G	0,81	0,37	2,62
10	10	10q11.23	rs883017	g.49009393T>C	T	30,36	21,67	C	1,14	0,29	1,58
11	10	CTBP2	rs2938001	g.125031719C>T	T	42,86	0,55	C	1,71	0,19	0,61
12	11	EXPH5	rs2155440	g.108429776C>T	T	28,57	36,67	C	0,86	0,35	0,69
13	12	MUC19	rs1492313	c.4571G>A, p.Arg1524Lys	G	39,29	42,86	A	0,15	0,70	0,86
14	15	RYR3	rs716368	g.33971926C>T	C	37,5	33,33	T	0,22	0,64	2,57
15	15	15q26.3	rs12719740	g.99072905G>A	A	12,5	0,25	G	2,95	0,09	0,43
16	16	16q12.1 (BRD7)	rs8054797	g.50385293C>A	A	33,93	15,52	C	5,21	0,02	2,80
17	22	KIAA1671	rs6004423	c.4530+21222G>A	A	08,93	31,48	G	8,74	0,003	0,21

Таблица 15 - Распределение частот аллелей полиморфных вариантов генов у больных с сочетанными АЗ (БА, АР и АД) и в контрольной группе

N	Хромосома	Ген, локализация	Полиморфный вариант	ОНП	Аллель 1	Частота аллеля 1 у больных, %	Частота аллеля 1 в контроле, %	Аллель 2	χ^2	p	OR
1	1	LOC105378814	rs12065806	g.53075287G>T	T	23,44	29,74	G	1,06	0,30	0,72
2	2	RAPGEF4	rs3769309	g.172815054A>G	A	34,38	44,5	G	2,30	0,13	0,65

3	3	3q26.2	rs1511599	g.168640934G>A	A	45,0	30,46	G	4,20	0,04	1,87
4	4	LOC107986195	rs764005	g.148986981G>A	A	51,56	47,62	G	0,34	0,56	1,17
5	5	GRIA1	rs9324750	c.220+42404A>C	A	31,25	27,93	C	0,30	0,59	1,17
6	6	DACT2	rs13207327	c.247-679A>G	T	58,06	44,24	C	4,10	0,04	1,75
7	8	SPIDR	rs10958058	g.47592067G>C	G	20,31	18,95	C	0,07	0,80	2,11
8	9	9p21.3	rs10757282	g.22133985T>C	C	34,38	41,71	T	1,22	0,27	0,73
9	9	9q21.2 (FOXB2)	rs10435941	g.77054188G>A	A	11,67	16,3	G	0,81	0,37	0,68
10	10	10q11.23	rs883017	g.49009393T>C	T	34,38	31,22	C	0,25	0,62	1,15
11	10	CTBP2	rs2938001	g.125031719C>T	C	53,12	47,91	T	0,60	0,44	1,23
12	11	EXPH5	rs2155440	g.108429776C>T	T	42,19	41,62	C	0,01	0,93	1,02
13	12	MUC19	rs1492313	c.4571G>A, p.Arg1524Lys	G	34,38	42,58	A	1,51	0,22	0,71
14	15	RYR3	rs716368	g.33971926C>T	C	33,87	37,7	T	0,33	0,56	0,85
15	15	15q26.3	rs12719740	g.99072905G>A	A	23,44	18,06	G	1,04	0,31	1,39
16	16	16q12.1 (BRD7)	rs8054797	g.50385293C>A	A	12,9	18,09	C	1,0	0,32	0,67
17	22	KIAA1671	rs6004423	c.4530+21222G>A	A	18,75	28,99	G	2,88	0,09	0,57

Статистически значимые различия выявлены также при анализе полиморфного локуса rs6004423 (c.4530+21222G>A), локализованного в гене белка *KIAA1671* (22q11.23). Обнаружено, что у больных БА с сопутствующим АР русской этнической принадлежности генотип rs6004423*GG и аллель rs6004423*G гена *KIAA1671* встречались с более высокой частотой (67,65% и 82,35%), чем в контрольной группе (46,58%, p=0,04, OR=2,4, CI95% 1,02-5,63 и 69,18%, p=0,04, OR=2,08, CI95%1,02-4,25). Показано, что у русских больных БА с сопутствующим АР частота минорного аллеля rs6004423*A у больных БА значительно ниже (17,65%), чем в соответствующей группе здоровых индивидов (30,82%, p=0,04, OR=0,48, 95%CI 0,24-0,98). Аллель rs6004423*G у больных БА с сопутствующим АР башкирской этнической принадлежности также встречался с более высокой частотой (91,07%), чем у индивидов контрольной группы (68,82%, p=0,007, OR=4,69, CI95% 1,59-13,84). Аллель rs6004423*A является маркером пониженного риска развития БА с сопутствующим АР у башкир (p=0,007, OR=0,21, CI95% 0,07-0,63).

При исследовании полиморфного варианта rs12719740 (g.99072905G>A), расположенного в области 15q26.3, у индивидов башкирской этнической принадлежности обнаружено, что аллель rs12719740*G у больных БА с сопутствующим АР встречается немного чаще (87,5%), чем в группе контроля (75%, p=0,09, OR=2,33, CI95% 0,87-6,24). В данном участке хромосомы локализован ген рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (*IGF1R*) и ген *FAM169B*, кодирующий белок с неисследованной функцией [45]. Экспрессия *IGF1R* наблюдается практически во всех тканях. Инсулиноподобные факторы роста играют важную роль в процессах клеточной репликации, пролиферации,

дифференциации и апоптоза [46]. Ростовые факторы IGF1 и IGFII экспрессируются в тканях легких эмбрионов на ранних сроках гестации (4-12 неделя), что свидетельствует об их участии в развитии легких человека [47]. Предполагается, что IGF1 играет важную роль в реэпителизации бронхов и ремоделировании дыхательных путей при хронических заболеваниях легких [48; 49].

При анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs13207327 (с.247-679A>G) гена *DACT2* (6q27) между группами больных с сочетанными АЗ и контрольной группой также установлены статистически значимые различия. Показано, что в группе больных с сочетанными проявлениями БА, АР и АД повышена частота аллеля rs13207327*Т, определенного в 58,06% случаев у больных и в 44,24% случаев в контрольной группе ($p=0,04$, $OR=1,75$, $CI_{95\%}$ 1,01-3,0). Частота аллеля rs13207327*С в группе пациентов с сочетанными аллергопатологиями была значительно ниже (41,94%), чем в контроле (55,76%, $p=0,04$, $OR=0,57$, $95\%CI$ 0,33-0,99). Полиморфный вариант rs13207327 локализован в гене антагониста бета-катенина 2 *DACT2*, участвующего во внутриклеточных сигнальных путях в период развития (Wnt). Известно его участие в морфогенезе эпителиальных клеток и показана его роль в качестве супрессора опухолевого роста (при гепатоклеточной карциноме, плоскоклеточном раке пищевода, раке легких) [50; 51; 52], однако его функциональное значение в развитии БА пока неизвестна.

Проведено исследование полиморфного варианта rs8054797 (g.50385293C>A), расположенного вблизи гена *BRD7* (16q12.1), у больных АЗ и индивидами контрольной группы из РБ. Установлено, что у больных БА с сопутствующим АР башкирской этнической принадлежности частота аллеля rs8054797*А выше (33,93%), чем в контрольной группе (15,52%, $p=0,02$, $OR=2,8$, $CI_{95\%}$ 1,14-6,88). Показано, что аллель rs8054797*С является маркером пониженного риска развития БА у башкир ($p=0,02$, $OR=0,36$, $CI_{95\%}$ 0,15-0,88). Белок, кодируемый геном *BRD7* функционирует как транскрипционный коактиватор или корепрессор, оказывает множественные клеточные эффекты посредством регуляции прогрессирования клеточного цикла (<https://omim.org/entry/618489>).

При анализе полиморфного варианта rs1511599 (g.168640934G>A), локализованного в области 3q26.2, выявлены статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов данного локуса между выборкой больных АЗ и контрольной группой ($p>0,05$). Обнаружено, что у больных с сочетанными проявлениями БА, АР и АД генотип rs1511599*АА и аллель rs1511599*А встречались с более высокой частотой (30,0% и 45,0%), чем в контрольной группе (10,34%, $p=0,01$, $OR=3,71$, $CI_{95\%}$

1,31-10,53 и 30,46%, $p=0,04$, $OR=1,87$, $CI95\% 1,02-3,41$). Аллель rs6004423*G, выявленный у больных в 55% случаев, а в контроле в 69,54% случаев, является маркером пониженного риска развития сочетанных АЗ ($p=0,04$, $OR=0,53$, $CI95\% 0,29-0,98$). Данный вариант ранее был ассоциирован с развитием БА у татар при GWAS у индивидов различной этнической принадлежности из РБ.

Для обобщения полученных результатов и выявления общих маркеров риска развития АЗ у индивидов различной этнической принадлежности нами проведен мета-анализ ассоциации исследованных полиморфных вариантов генов с развитием АЗ (Таблица 16). При мета-анализе ассоциации исследуемых полиморфных локусов с развитием БА у русских, татар, башкир и индивидов смешанной этнической принадлежности, установлена ассоциация аллеля rs3769309*G гена *RAPGEF4* с развитием БА с сопутствующим АР ($p=0,003$, $OR=1,59$, $95\%CI 1,17-2,16$). Согласно полученным нами ранее результатам, значительные различия в распределении частот аллелей и генотипов данного полиморфного варианта обнаружены между группами больных БА с сопутствующим АР русской этнической принадлежности и тенденция к ассоциации данного варианта с развитием БА с сопутствующим АР у татар. При мета-анализе ассоциации, проведенном в группе русских, татар, башкир и индивидов смешанной этнической принадлежности, также обнаружены тенденции к ассоциации аллельных вариантов rs12065806*G ($p=0,06$), rs13207327*T ($p=0,07$) и rs8054797*A ($p=0,08$) с развитием БА с сопутствующим АР.

Таблица 16 - Результаты мета-анализа ассоциаций исследованных полиморфных вариантов генов с развитием БА с сопутствующим АР у русских, татар, башкир и индивидов смешанной этнической принадлежности

N	Ген, локализация	Полиморфный вариант	A1	A2	N	Модель с фиксированным эффектом		Модель со случайным эффектом		Q	I ²
						P	OR	P(R)	OR(R)		
1	<i>LOC105378814</i>	rs12065806	T	G	4	0,06	0,73	0,06	0,73	0,83	0
2	<i>RAPGEF4</i>	rs3769309	A	G	4	0,003	0,63	0,003	0,63	0,43	0
3	3q26.2	rs1511599	A	G	4	0,20	1,30	0,20	1,30	0,74	0
4	<i>LOC107986195</i>	rs764005	A	G	4	0,87	1,03	0,95	1,01	0,07	58,41
5	<i>GRIA1</i>	rs9324750	A	C	4	0,95	0,99	0,95	0,99	0,55	0
6	<i>DACT2</i>	rs13207327	C	T	4	0,07	0,76	0,07	0,76	0,47	0
7	<i>SPIDR</i>	rs10958058	G	C	4	0,83	0,96	0,83	0,96	0,38	2,69
8	9p21.3	rs10757282	C	T	4	0,81	0,96	0,81	0,96	0,76	0
9	9q21.2 (<i>FOX2</i>)	rs10435941	A	G	4	0,41	0,82	0,41	0,82	0,63	0
10	10q11.23	rs883017	T	C	4	0,80	1,04	0,80	1,04	0,69	0
11	<i>CTBP2</i>	rs2938001	C	T	4	0,72	0,95	0,82	0,96	0,21	33,26

12	<i>EXPH5</i>	rs2155440	T	C	4	0,28	0,85	0,28	0,85	0,75	0
13	<i>MUC19</i>	rs1492313	G	A	4	0,34	0,86	0,35	0,86	0,37	4,75
14	<i>RYR3</i>	rs716368	C	T	4	0,24	0,83	0,24	0,83	0,59	0
15	15q26.3	rs12719740	A	G	4	1,0	1,0	0,92	0,97	0,11	50,02
16	16q12.1 (<i>BRD7</i>)	rs8054797	A	C	4	0,08	1,40	0,15	1,41	0,21	33,44
17	<i>KIAA1671</i>	rs6004423	A	G	4	0,06	0,71	0,14	0,63	0,04	64,76

Примечания: N число групп, включенных в исследование, P - p-value fixed, P(R) – p-value random, Q – критерий гетерогенности Кохрена, I² – оценка индекса статистической гетерогенности.

Таким образом, в результате исследования 15 полиморфных локусов, ассоциированным ранее с развитием БА при GWAS, выполненного на независимой выборке индивидов с сочетанными формами аллергопатологий, выявлены ассоциации генотипа rs3769309*GG и аллеля rs3769309*G гена *RAPGEF4* с развитием БА с сопутствующим AP у русских, генотипа rs6004423*GG и аллеля rs6004423*G гена *KIAA1671*- с развитием БА с сопутствующим AP у русских и башкир, аллеля rs8054797*A, расположенного вблизи гена *BRD7*, - с развитием БА с сопутствующим AP у башкир. Обнаружены ассоциации аллеля rs13207327*T гена *DACT2*, генотипа rs1511599*AA и аллеля rs1511599*A полиморфного варианта, локализованного в области 3q26.2, с сочетанными АЗ (БА, AP, АД). Мета-анализ результатов исследований данных полиморфных вариантов в группах больных русской, татарской, башкирской и смешанной этнической принадлежности, показал ассоциацию аллеля rs3769309*G гена *RAPGEF4* с развитием БА с сопутствующим AP, что подтверждает роль данного варианта в качестве общего маркера риска развития данных заболеваний. В целом, полученные результаты исследования свидетельствуют о роли целого ряда полиморфных вариантов, выявленных при проведенном ранее полногеномном анализе ассоциации БА, в развитии сочетанной аллергопатологии (БА, AP и АД) у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности.

2.2. Полное секвенирование экзома у пациентов с наследственной моторно-сенсорной нейропатией с неустановленной генетической причиной заболевания, биоинформатический анализ результатов исследования и их валидация методом секвенирования по Сэнгеру

Наследственные моторно-сенсорные нейропатии, НМСН (болезнь Шарко-Мари-Тута, ШМТ) – это большая клинически и генетически гетерогенная группа заболеваний,

поражающих периферическую нервную систему, для которых в настоящее время идентифицировано более 100 генов [<http://www.neuromuscular.wustl.edu>]. Частота всех форм НМСН в разных популяциях мира различна, составляет от 10 до 40:100000 населения [53; 54]. Как правило, заболевание имеет тяжелое, инвалидизирующее течение, его основными клиническими проявлениями являются прогрессирующая слабость и атрофия мышц дистальных отделов ног и, на поздней стадии – рук, угнетение сухожильных рефлексов, деформация стоп, расстройства чувствительности по полиневритическому типу. В основе болезни лежат дегенеративные изменения миелиновой оболочки или аксонов двигательных и чувствительных волокон периферических нервов и спинномозговых корешков. Соответственно этому, выделяют два основных типа – НМСН I – димиелинизирующий и НМСН II – аксональный, среди которых встречаются аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные и X-наследуемые формы. Большинство из известных генов, мутации в которых приводят к развитию НМСН, кодируют белки, непосредственно участвующие в структурной и функциональной организации миелина периферических нервных волокон. Среди них белки, наиболее часто задействованные в развитии заболевания - PMP22, Po (MPZ), Cx32/GJB1, - являются основными компонентами миелина; другую группу представляют белки - регуляторы транскрипции генов миелина - EGR2/Krox20 и SOX10; в отдельную группу выделяют внутриклеточные белки шванновских клеток, вовлеченные в синтез, транспорт и дегенерацию компонентов миелина. К ним относятся миотубуларин-связанный липид фосфатазы MTMR2, MTMR13/SBF2, SIMPLE, а также, возможно, динамин 2. Мутации фактора митохондриального деления GDAP1 и MFN2 вносят значительный вклад в участие митохондрий в процесс миелинизации или сохранности миелина, тогда как функции многих других генов, причастных к развитию данного заболевания, все еще до конца не выяснены.

Согласно литературным данным, в странах Европы и США наиболее распространена НМСН I типа, среди которого наиболее частой является форма НМСН1А (СМТ1А) (30-45%). Генетической причиной развития данной формы является дупликация 1,5 Мб в хромосомной области 17p11.2-12, включающей ген белка периферического миелина (PMP22) [55; 56]. Второй по частоте считается НМСН IX, связанная с мутациями в гене коннексина 32 (*GJB1*), составляющая 10-20% всех случаев НМСН [57]. К наиболее частым вариантам НМСН II типа относятся генетические формы заболевания, обусловленные мутациями в генах митофузина 2-го типа (*MFN2*) и ганглиозидиндуцированного, ассоциированного с дифференцировкой белка 1 (*GDAP1*), ответственных за процессы слияния и расщепления митохондриальных мембран в нейронах [58; 59]. Перечисленные

выше гены, как правило, в первую очередь исследовались при изучении молекулярно-генетических основ НМСН в различных популяциях мира. Впоследствии, благодаря широкому внедрению методов NGS-секвенирования в исследование НМСН было идентифицировано большое количество новых генов, связанных с заболеванием, получено значительное количество важных результатов, раскрывающих как отдельные ключевые звенья в процессах дегенерации периферических нейронов, так и пути их взаимодействия. Также стало ясно, что крупномасштабный скрининг пациентов позволяет определять частоты мутаций в генах НМСН, устанавливать фенотипические границы этих гетерогенных невропатий, и в то же время – исследовать фенотипические перекрытия между отдельными формами заболевания [60]. В целом же, проблема клинико-генетической гетерогенности данной группы заболеваний остается еще далеко не до конца раскрытой, и ее можно представить в более широком плане, учитывая существование многочисленных случаев аллельных заболеваний, когда мутации в одном и том же гене НМСН могут приводить к различным нозологическим формам, например, таким как наследственные спастические параличи (гены *KIF1A*, *SACS*, *TFG*), миопатия (гены *DNM2*, *LMNA*) и другим неврологическим заболеваниям [61]. Таким образом, учитывая широкую клиническую и генетическую гетерогенность НМСН, популяционную неоднородность по распространенности, спектру и частоте мутаций в известных генах, значительную долю пациентов с неустановленной генетической причиной заболевания, проведение секвенирования экзома у пациентов с четко установленными клинико-генеалогическими особенностями должно привести к получению новых важных результатов, вносящих вклад в разработку общей проблемы гетерогенности моторно-сенсорных невропатий их ДНК-диагностики, профилактики и лечения.

В последние годы молекулярно-генетическое изучение НМСН проводятся в Республике Башкортостан. Исследования, проведенные на выборке пациентов из 170 неродственных семей, включали анализ семи генов (*PMP22*, *MPZ*, *GJB1*, *EGR2*, *MFN2*, *GDAP* и *NEFL*). В результате этих исследований были выявлены спектр и частота мутаций, специфичные как для РБ в целом, так и для отдельных этнических групп. Однако, примерно в 50% семей с НМСН генетическая причина заболевания осталась неустановленной, что актуализирует проведение дополнительных исследований, позволяющих получить более точную картину спектра и частот мутаций в причинных генах.

В рамках настоящего проекта у двух неродственных пациентов с аутосомно-доминантной аксональной формой НМСН проведено полное секвенирование экзома по технологии NGS (“Next Generation Sequencing”). Данные пациенты были отобраны для

исследования из имеющегося в лаборатории банка ДНК пациентов с НМСН и их родственников, проживающих на территории Республики Башкортостан. Пробанды и их ближайшие родственники были осмотрены сотрудниками кафедры неврологии с курсами нейрохирургии и медицинской генетики Башкирского государственного медицинского университета. Ранее у этих пациентов в семи указанных выше генах патогенные варианты нуклеотидных последовательностей, являющиеся причиной развития заболевания, выявлены не были.

Полное секвенирование экзома проведено на секвенаторе MiSeq, Illumina. Биоинформатический анализ результатов NGS осуществлен с помощью набора утилит SAMtools, при этом в качестве референсной использована последовательность генома человека версии hg19 (Genome Reference Consortium Human Build 37). Далее проведен анализ полученных вариантов, представленных в файлах Variant Call Format. Обнаруженные варианты аннотированы с использованием средств программного пакета ANNOVAR (<http://annovar.openbioinformatics.org>), позволяющих сравнивать однонуклеотидные замены, а также инсерции и делеции, полученные в результате секвенирования, с рядом специализированных баз данных. Таким образом, предсказательная значимость выявленных изменений аннотирована с помощью *in silico* программ (MetaSVM, MetalR, PolyPhen-2, PhyloP, ClinVar) из dbNSFP v.3.0a. Также для аннотирования вариантов использованы инструменты SnpEff (<http://snpeff.sourceforge.net>), CADD (<http://cadd.gs.washington.edu>), SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg>), для получения дополнительной болезнь-специфичной информации - исследовательская платформа DisGeNET. Частоты вариантов оценены с использованием баз данных проекта «1000 Геномов», (<http://www.1000genomes.org>), базы данных проекта по секвенированию экзома (Exome Sequencing Project, ESP6500 (<http://esp.gs.washington.edu/drupal/>)), базы данных коалиции исследователей из различных крупномасштабных проектов секвенирования (Exome Aggregation Consortium, ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>)). Каждому варианту было сопоставлено до пяти значений частот, и для последующего анализа были отобраны варианты с частотой не более 0,05%. Также вариантам были сопоставлены идентификаторы баз данных dbSNP, доступ к которым осуществлен также с помощью ANNOVAR с использованием скриптов `annotate_variation.pl`, `table_annoar.pl`. Функциональные аннотации и частоты анализировались в комплексе, вместе с анализом имеющейся к данному моменту информации по исследуемому заболеванию. При анализе результатов в первую очередь рассматривались варианты, относящиеся к экзонам (кроме синонимичных замен), сайтам сплайсинга, а также некодирующим РНК, 5'- и 3'-нетранслируемой области. Поскольку в семьях обследуемых пациентов прослеживается

аутосомно-доминантный тип наследования НМСН, для дальнейшего этапа исследования были отобраны гетерозиготные варианты.

В результате полноэкзомного секвенирования и последующего биоинформатического анализа у обследованных пациентов в гетерозиготном состоянии была идентифицирована одинаковая миссенс-мутация – замена цитозина на гуанин в 254-м положении нуклеотидной кодирующей последовательности гена, приводящая к замене серина на цистеин в 85-м положении аминокислотной последовательности белка (с.254C>G (p.Ser85Cys)) в гене *MATR3*. Наличие данной мутации у обследованных пациентов было подтверждено секвенированием по Сэнгеру (рис. 1).

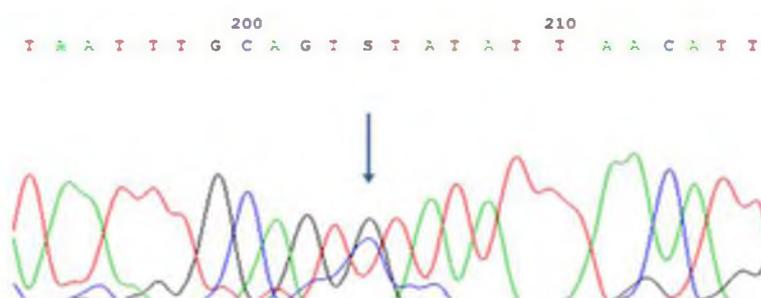


Рисунок 1. Секвенирование гена *MATR3*: мутация с.254C>G (p.Ser85Gly) у пациента с наследственной моторно-сенсорной нейропатией

В семьях обследованных пробандов мутация p.Ser85Gly была выявлена также у больных членов семей и не обнаружена у здоровых родственников.

Идентифицированная нами мутация с.254C>G (p.Ser85Cys) в гене *MATR3* ранее была описана как генетическая причина бокового амиотрофического склероза и дистальной миопатии, но не НМСН, что, безусловно, вызвало интерес в интерпретации полученных нами данных.

Ген *MATR3* (5q31.3) кодирует белок - матрин-3, с массой 125 кДа, и экспрессируются повсеместно почти во всех тканях организма с максимальной экспрессией в головном мозге [62]. Ядерный матричный белок MATR3 - это ДНК- и РНК-связывающий белок с разнообразными функциями в метаболизме нуклеиновых кислот, включая транскрипцию генов, ответ на повреждение ДНК, сплайсинг и деградацию РНК [63]. РНК-связывающие белки (RBP) являются важными факторами, необходимыми для физиологического функционирования нейронов, мышц и других типов тканей. На сегодняшний день белок матрин-3 остается недостаточно изученным, однако растущий объем генетических, клинических и патогенетических данных указывает на то, что

дисфункция RBP в силу различных генных мутаций приводят к нейродегенерации и миопатии.

Матрин-3 представляет из себя высококонсервативный и слабоупорядоченный белок, включающий 4 основных структурированных мотива: два мотива цинковых пальцев (ZnF1 и ZnF2) и два мотива распознавания РНК (RRM1 и RRM2). Помимо этих четырех мотивов, матрин-3 содержит карбокси-концевой сигнал ядерной локализации (NLS) и аминоконцевой сигнал ядерного экспорта (NES), которые функционируют в соответствии с их названиями. Оставшаяся часть белка состоит из двух больших внутренне неупорядоченных областей (IDR), причем С-концевой IDR является сильно кислым [64; 65]. Домены ZnF1 и ZnF2 взаимодействуют с ДНК, но также могут распознавать РНК и опосредовать белок-белковые взаимодействия [66]. Два тандема RRM могут связывать последовательности РНК, участвуя в их метаболизме [67]. Внутренние неупорядоченные области IDR сочетаются в белке MATR3 с хорошо структурированными мотивами ZNF и RRM. Считается, что такие белки (содержащие IDR) часто проявляют высокую степень пространственно-временной неоднородности и конформационной гибкости, обеспечивающей способность взаимодействовать с несколькими партнерами по связыванию посредством многих вариантов взаимодействия. Важной особенностью IDR белка MATR3 является то, что именно на них приходится большинство известных патогенных мутаций [64].

В научной литературе постепенно накапливаются данные о связи мутаций в MATR3 с различными фенотипами таких заболеваний, как семейный боковой амиотрофический склероз (БАС), лобно-височная деменция (ЛВД) и наследственная дистальная миопатия [68]. Наряду с этим, в последнее время появляются сведения и о других заболеваниях, ассоциированных с MATR3, так, например, в относительно недавних работах описывается повышенное содержание матрина-3 в цитоплазматическом пространстве клеток основания гиппокампа при болезни Альцгеймера [69], а Haruka Kuriyama с соавторами описывают роль матрина-3 в образовании злокачественной формы меланомы [70].

Мутация p.Ser85Cys была идентифицирована в семьях с особым вариантом аутосомно-доминантной дистальной миопатии, описанной первоначально в одной американской семье [71], а затем – в большой болгарской семье. Данный тип заболевания описывается как прогрессирующая аутосомно-доминантная миопатия у взрослых, часто связанная с дисфагией и дисфонией (слабость голосовых связок и глотки с дистальной миопатией [VCPDM]) [72].

Результаты нейрофизиологических исследований и биопсии мышц, проведенных у некоторых из этих пациентов, различались - соответствовали либо нейрогенному, либо миопатическому типу. У них было обнаружено несколько признаков, характерных для поражений верхних двигательных нейронов, таких как паттерн «раздвоенной руки», фасцикуляции языка, резкое подергивание нижней челюсти, рефлекс верхних конечностей и оживленное колено. В связи с этим пациенты с мутацией p.S85C в трех независимых семьях были повторно обследованы, и было обнаружено, что они страдают прогрессирующей дыхательной недостаточностью, ведущей к смерти через 15 лет после начала заболевания, в отличие от обычных 2–5 лет. Это привело к переклассификации расстройства, связанного с данной мутацией, в «медленно прогрессирующий боковой амиотрофический склероз (БАС) с дистальной миопатией» [73; 74]. С тех пор было описано несколько дополнительных семей с MATR3 (Ser85Cys), сцепленным с VCPDM [75; 76]. У большинства описанных пациентов из этих семей наблюдалась слабость из-за атрофии дистальных мышц конечностей, а также проксимальных мышц глотки и диафрагмы [75]. А в работе [76] представлено описание итальянского пациента, который имел вариант p.S85C MATR3 и демонстрировал составной фенотип VCPDM и сенсомоторной полинейропатии. Анализируя клинические особенности пациентов с мутацией p.Ser85Cys, можно заключить, что этот миссенс-вариант в гене матриксина-3 способен вызывать как миогенное, так и нейрогенное заболевание, фенотип которого, вероятно, зависит и от других, модифицирующих, генетических и эпигенетических факторов.

Патогенетическая значимость мутации c.254C>G (p.Ser85Gly) в гене MATR3 была убедительно доказана Malik et al. (2018). Авторы показали, что мутация S85C избирательно влияет на свойства капель MATR3 (на подвижность фазово-разделенных MATR3), образование и консистенция которых имеет важное значение для обеспечения основных функций белка.

Таким образом, на основании всех имеющихся данных мы предполагаем, что данная миссенс-мутация может являться основной причиной заболевания у обследованных нами больных с первоначально установленным диагнозом «моторно-сенсорная нейропатия II типа». Дистальная миопатия манифестирует со слабости мышц-разгибателей стоп, что приводит к изменению походки по типу степпаж, позднее слабость появляется в мышцах - разгибателях кисти; такая же локализация мышечной слабости характерна и для наследственных нейропатий. Слабость мышц голосовых связок и глотки, приводящая к нарушению звучности голоса и глотания, развивается только у части пациентов и, как правило, значительно позже дебюта мышечной слабости в конечностях. Вероятно, что у обследованных нами больных диагноз может быть переклассифицирован

в «дистальную миопатию», а ошибочное заключение о наличии наследственной моторно-сенсорной нейропатии II типа было сделано на основании данных электрофизиологического исследования, выполненного в неполном объеме: регистрировались только параметры распространения возбуждения по нервным стволам. При наследственных моторно-сенсорных нейропатиях II типа показатели скорости распространения возбуждения находятся в пределах нормальных величин, а регистрируются сниженные показатели амплитуды М-ответов, что отражает аксональный характер поражения периферических нервов; у пациентов с первично-мышечным поражением показатели амплитуды М-ответов снижаются за счет уменьшения количества мышечных волокон, поэтому для правильного определения уровня поражения требуется выполнение электрофизиологического исследования в полном объеме, с оценкой всех параметров потенциала действия двигательной единицы. Полученный нами результат свидетельствует о вероятно более широком распространении мутации с.254С>G (р.Ser85Gly) в гене *MATR3*, чем предполагалось ранее, и очевидно, представляет интерес ее дальнейший скрининг не только у пациентов с дистальной миопатией или с боковым амиотрофическим склерозом, но также и у пациентов с неустановленной причиной наследственных моторно-сенсорных нейропатий, особенно в случаях подозрения на дистальную миопатию. Поскольку данная мутация обнаруживается у больных в различных регионах мира, интересным является и вопрос о механизмах ее происхождения и распространения, чему могут быть посвящены отдельные исследования.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование генетической предрасположенности к широко распространенным многофакторным заболеваниям является чрезвычайно актуальной задачей медицинской генетики человека, решение которой направлено на познание структурно-функциональной организации генома, ее связи с патогенезом соответствующих заболеваний, что, в целом, является основой для разработки эффективных методов их ДНК-диагностики, способов прогнозирования, профилактики и лечения. Наследственную предрасположенность к многофакторным заболеваниям обуславливает целый комплекс генетических факторов, которыми могут являться как более функционально значимые изменения структуры генов – мутации, так и полиморфные варианты генов, встречающиеся с более высокой частотой в популяциях. Немаловажную роль в реализации генетической информации играют и эпигенетические факторы, в том числе микроРНК, регулирующие экспрессию генов. Отдельным актуальным направлением исследований является поиск генетических и

эпигенетических маркеров эффективности терапии различных заболеваний, что необходимо для разработки персонализированных подходов лечения больных.

За отчетный период проведены исследования молекулярно-генетических причин развития следующих многофакторных заболеваний: рака молочной железы и яичника, рака почки, мелкоклеточного рака легкого, бронхиальной астмы. В результате этих исследований получены результаты, представленные ниже.

Проведен анализ ассоциации полиморфных локусов генов биогенеза и предшественников микроРНК с риском развития высоко-злокачественного серозного РЯ (РЯ). Исследование проведено в группах сравнения случай / контроль с оценкой ассоциации заболеваний с отдельными полиморфными вариантами генов. Изучены 29 полиморфных локусов, расположенных в генах биогенеза микроРНК *DROSHA* / *RNASEN*, *DGCR8*, *DICER1*, *XPO5*, *RAN*, *PIWIL1* / *HIWI*, *AGO1* / *EIF2C1*, *AGO2*, *GEMIN4*, *GEMIN3* / *DDX20*, *DDX5* и микроРНК *miR196a-2*, *miR27a*, у больных с РЯ и в контрольной группе индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности. Результаты мета-анализа, объединившего данные для трех этнических групп (русских, татар и башкир) показали, что аллели полиморфных локусов *rs2740351* и *rs7813* в гене *GEMIN4* ассоциированы с риском развития высокзлокачественного серозного РЯ. При сравнении разных вариаций генотипов были определены наиболее информативные модели ассоциации с риском развития РЯ. Для полиморфного локуса *rs2740351* наиболее предпочтительной является доминантная модель, согласно которой у носителей генотипов с минорным аллелем (*AA* vs *AG* - *GG*) увеличивается риск развития РМЖ: OR = 1.42, p = 0.021. В соответствии с аддитивной моделью, показатель отношения шансов соответствовал значению 1.29 при p = 0.0086. Для полиморфного локуса *rs7813* наиболее оптимальными являются аддитивная и рецессивная модели наследования. Согласно рецессивной модели, у женщин с генотипом *GG* повышается вероятность развития РМЖ по сравнению с генотипами *AA* - *AG*, OR = 1.46, p = 0.031.

В ходе выполнения проекта была сформирована уникальная выборка образцов ДНК, выделенная из венозной крови пациентов со светлоклеточной почечно-клеточной карциномой (скПКК), получающих терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (ИКТИ). В результате анализа ассоциаций 23 полиморфных локусов в генах предшественников микроРНК, генах биосинтеза и процессинга микроРНК и сайтах связывания микроРНК с мишенью, а также генах контрольных точек иммунитета был обнаружен ряд генотипов и аллелей, ассоциированных с риском развития тяжелых форм нежелательных явлений (НЯ) при ответе на терапию ИКТИ. Показано, что с повышением риска развития тяжелых форм НЯ ассоциировано носительство генотипа *rs2910164*CC*

гена предшественника микроРНК-146а, аллеля rs7866740*С гена *PD-L1*, аллеля rs4903064*С и генотипа rs4903064*СС гена *DPF3*. Также обнаружено, что генотип rs231775*GG гена *CTLA4* ассоциирован со снижением риска развития тяжелых форм НЯ у пациентов со скПКК, получающих терапию ИКТИ. Таким образом, результаты проекта, с учетом дополнительных уточняющих исследований, могут быть использованы при создании прогностических систем молекулярных маркеров, а также вносят вклад в понимание патогенеза почечно-клеточных карцином и формирование резистентности при применении ингибиторов контрольных точек иммунитета при данном типе злокачественных опухолей.

У 50 больных мелкоклеточным раком легкого проведен анализ уровня метилирования промоторной области гомеобоксодержащего гена *SHOX2*. Гиперметилирование промоторной области гена *SHOX2* обнаружено у 46% образцов. Полученные результаты, а также литературные данные позволяют судить о гиперметилировании гена *SHOX2* как о потенциальном маркере для ранней диагностики рака легкого и мониторинга его течения.

В результате исследования 15 полиморфных локусов, ассоциированным ранее с развитием БА при GWAS, выполненного на независимой выборке индивидов с сочетанными формами аллергопатологий, выявлены ассоциации генотипа rs3769309*GG и аллеля rs3769309*G гена *RAPGEF4* с развитием БА с сопутствующим АР у русских, генотипа rs6004423*GG и аллеля rs6004423*G гена *KIAA1671*- с развитием БА с сопутствующим АР у русских и башкир, аллеля rs8054797*A, расположенного вблизи гена *BRD7*, - с развитием БА с сопутствующим АР у башкир. Обнаружены ассоциации аллеля rs13207327*T гена *DACT2*, генотипа rs1511599*AA и аллеля rs1511599*A полиморфного варианта, локализованного в области 3q26.2, с сочетанными АЗ (БА, АР, АД). Мета-анализ результатов исследований данных полиморфных вариантов в группах больных русской, татарской, башкирской и смешанной этнической принадлежности, показал ассоциацию аллеля rs3769309*G гена *RAPGEF4* с развитием БА с сопутствующим АР, что подтверждает роль данного варианта в качестве общего маркера риска развития данных заболеваний. В целом, полученные результаты исследования свидетельствуют о роли целого ряда полиморфных вариантов, выявленных при проведенном ранее полногеномном анализе ассоциации БА, в развитии сочетанной аллергопатологии (БА, АР и АД) у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности.

Наследственные моногенные (олигогенные) заболевания, в частности, наследственные моторно-сенсорные нейропатии, являются тяжелыми инвалидизирующими заболеваниями, для которых в настоящее время не существует

эффективного лечения. Для многих подобных заболеваний, в том числе, для НМСН, характерны клиническая и генетическая гетерогенность, существуют популяционные различия по частоте встречаемости и спектру мутаций генов, детерминирующих их развитие. Кроме того, в большинстве популяций существует еще значительная доля пациентов, для которых установить генетическую причину заболевания пока не удастся, и в настоящее время для решения этой проблемы используются методы NGS секвенирования. Идентификация причинных мутаций, обуславливающих развитие заболевания, является основой для познания его патогенеза и разработки патогенетических методов лечения. На основе сведений об этноспецифических особенностях распространения генетических форм олигогенных заболеваний, спектра и частоты мутаций в ответственных генах, разрабатываются оптимальные для конкретных регионов алгоритмы их ДНК-диагностики, значительно повышающие эффективность медико-генетического консультирования в семьях больных, направленного на профилактику данных таких заболеваний, что имеет большое медицинское и социально-экономическое значение.

За отчетный период проведено полное секвенирование экзона у двух неродственных пациентов с аутосомно-доминантной аксональной формой НМСН. В результате исследования и последующего биоинформатического анализа у обследованных пациентов в гетерозиготном состоянии была идентифицирована одинаковая миссенс-мутация –с.254C>G (p.Ser85Cys) в гене *MATR3*. Наличие данной мутации у обследованных пациентов было подтверждено секвенированием по Сэнгеру. Ранее данная мутация была описана как генетическая причина бокового амиотрофического склероза и дистальной миопатии, но не НМСН, что вызвало интерес в интерпретации полученных нами данных. Анализируя литературные данные, описывающие клинические особенности пациентов с мутацией p.Ser85Cys, можно заключить, что этот миссенс-вариант в гене матрина-3 способен вызывать как миогенное, так и нейрогенное заболевание, фенотип которого, вероятно, зависит и от других, модифицирующих, генетических и эпигенетических факторов.

4 СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ И ПРИНЯТЫХ К ПЕЧАТИ В 2022 ГОДУ

1. Ahearn TU, Zhang H, ... Bermisheva M, ..., Khusnutdinova E, ... Chatterjee N. Common variants in breast cancer risk loci predispose to distinct tumor subtypes. *Breast Cancer Res.* 2022 Jan 4;24(1):2. doi: 10.1186/s13058-021-01484-x. PMID: 34983606; PMCID: PMC8725568.
2. Dareng EO, Tyrer JP, ... Bermisheva M., ... Khusnutdinova E, Pharoah PDP. Polygenic risk modeling for prediction of epithelial ovarian cancer risk. *Eur J Hum Genet.* 2022 Mar;30(3):349-362. doi: 10.1038/s41431-021-00987-7. Epub 2022 Jan 14. Erratum in: *Eur J Hum Genet.* 2022 Mar 22;: PMID: 35027648; PMCID: PMC8904525.
3. Breast Cancer Association Consortium, Mavaddat N, Dorling L, ...Bermisheva M, ..., Khusnutdinova EK, ... Easton DF. Pathology of Tumors Associated With Pathogenic Germline Variants in 9 Breast Cancer Susceptibility Genes. *JAMA Oncol.* 2022 Mar 1;8(3):e216744. doi: 10.1001/jamaoncol.2021.6744. Epub 2022 Mar 17. PMID: 35084436; PMCID: PMC8796069.
4. Ivanova E., Asadullina D., Rakhimov R., Izmailov A., Gilyazova G., Galimov S., Pavlov V., Khusnutdinova E., Gilyazova I. Exosomal miRNA-146a is downregulated in clear cell renal cell carcinoma patients with severe immune-related adverse events// *Non-coding RNA Research.* 2022. Т. 7. № 3. С. 159-163. DOI: 10.1016/j.ncrna.2022.06.004
5. Гилязова И.Р., Асадуллина Д.Д., Иванова Е.А. и др. Герминальные мутации как возможные биомаркеры эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета у пациентов с почечно-клеточной карциномой (мини-обзор) // *Научные результаты биомедицинских исследований.* –2022. - Т.8. -№ 2. - С. 164-179. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-3
6. Хидиятова И.М., Сайфуллина Е.В., Карунас А.С., ... Хуснутдинова Э.К. Анализ мутаций гена *ATLI* и клинических особенностей течения заболевания у пациентов с наследственной спастической параплегией // *Генетика.* – 2022. - Т.58, №9. – С.1085-1093. DOI: 10.31857/S0016675822090119
7. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Гатиятуллин Р.Ф.З, Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Исследование роли полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, в развитии и течении бронхиальной астмы у индивидов из Республики Башкортостан // *Медицинская генетика.* –2022. Том 21, №8. С. 40-43.
8. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Бикташева А.Р., Гатиятуллин Р.Ф., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов

генов *ALDH7A1*, *AOC1*, *PSAP*, *ADCYAP1*, участвующих в метаболизме гистамина, с развитием бронхиальной астмы у индивидов из Республики Башкортостан // Якутский медицинский журнал. (принята к печати)

9. Тахирова З.Р., Федорова Ю.Ю., Мурзина Р.Р., Нургалиева А.Х., Прокофьева Д.С., Тазетдинов А.М., Сыманюк Э.Э., Хуснутдинова Э.К. Психосоматика болевого синдрома у детей: биологические и психологические аспекты благополучия личности в условиях болевых ощущений // Научная монография «Междисциплинарный подход к изучению благополучия человека», раздел: Благополучие личности: психологический аспект. Издательство УрФУ, принято к публикации, 2022.

5 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Cai X., Hagedorn C.H., Cullen, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs // *RNA*. – 2004. – Vol. 10. – P. 1957–1966.
2. Lee Y., Ahn C., Han J. et al. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing // *Nature*. – 2003. – Vol. 425. – P. 415–419.
3. Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E. et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA // *Science*. – 2001. – Vol. 293. P. 834–838.
4. Cifuentes D., Xue H., Taylor D.W. et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity // *Science*. – 2010. – Vol. 328. – P. 1694–1698.
5. Ha M., Kim V.N. Regulation of microRNA biogenesis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* -2014. – Vol. 15. – P. 509–524.
6. Malhotra P., Read G., Weidhaas J. Breast Cancer and miR-SNPs: The Importance of miR Germ-Line Genetics // *Noncoding RNA*. - 2019. – Vol. 5. №1. – P. 27
7. Yang H., Dinney C. Ye Y. et al. Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. – P. 2530-2537
8. Horikawa Y., Wood C., Yang H. et al. Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma // *Clin. Cancer Res.* - 2008. – Vol. 14. – P. 7956-7962
9. Liang D., Meyer L., Chang D. et al. Genetic variants in MicroRNA biosynthesis pathways and binding sites modify ovarian cancer risk, survival, and treatment response // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – P. 9765-76

10. Zhu W., Zhao J., He J. et al. Genetic variants in the MicroRNA biosynthetic pathway Gemin3 and Gemin4 are associated with a risk of cancer: a meta-analysis // *PeerJ.* – 2016. – Vol. 4. – e1724
11. Liu J., Liu J., Wei M. et al. Genetic Variants in the MicroRNA Machinery Gene GEMIN4 Are Associated with Risk of Prostate Cancer: A Case-control Study of the Chinese Han Population // *DNA Cell Biol.* - 2012. – Vol. 31. – P. 1296-1302
12. Dermani F.K., Samadi P., Rahmani G. et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy // *J. Cell. Physiol.* – 2019. – Vol. 234. N2. – P. 1313–1325.
13. Darvin P., Toor S.M., Sasidharan Nair V. et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers // *Exp. Mol. Med.* – 2018. – Vol. 50. N12. – P. 165.
14. Hosseini A., Gharibi T., Marofi F. et al. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy // *InV. Immunopharmacol.* 2020. – Vol. 80. – P. 106221.
15. Colli L.M., Jessop L., Myers T.A. et al. Altered regulation of DPF3, a member of the SWI/SNF complexes, underlies the 14q24 renal cancer susceptibility locus // *Am. J. Hum. Gene* – 2021. – Vol. 108. N9. – P. 1590.
16. Liu X., Swen J.J., Diekstra M.H.M. et al. A Genetic Polymorphism in CTLA-4 Is Associated with Overall Survival in Sunitinib-Treated Patients with Clear Cell Metastatic Renal Cell Carcinoma // *Clin. Cancer Res.* – 2018. – Vol. 24. N10. – P. 2350–2356.
17. Zhao X., Peng Y., Li X. et al. The association of PD-L1 gene polymorphisms with non-small-cell lung cancer susceptibility and clinical outcomes in a Chinese population // *InV. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2020. Vol. 13. N8. – P. 2130–2136.
18. Sun V., Zhou Y., Yang M. et al. Functional Genetic Variations in Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 and Susceptibility to Multiple Types of Cancer // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. N17. – P. 7025–7034.
19. Jaiswal R., Luk F., Dalla P.V. et al. Breast cancer-derived microparticles display tissue selectivity in the transfer of resistance proteins to cells // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. N4.
20. Cozar J.M., Romero J.M., Aptsiauri N. et al. High incidence of CTLA-4 AA (CT60) polymorphism in renal cell cancer // *Hum. Immunol.* – 2007. – Vol. 68. N8. – P. 698–704.8.
21. Tupikowski K., Partyka A., Kolodziej A. et al. CTLA-4 and CD28 genes' polymorphisms and renal cell carcinoma susceptibility in the Polish population – a prospective study // *Tissue Antigens.* – 2015. – Vol. 86. N5. – P. 353–361.
22. Song B., Liu Y., Liu J. et al. CTLA-4 +49A>G polymorphism is associated with advanced non-small cell lung cancer prognosis // *Respiration.* – 2011. – Vol. 82. N5. – P.

- 439–444.
23. Scelo G., Purdue M.P., Brown K.M. et al. Genome-wide association study identifies multiple risk loci for renal cell carcinoma // *NaV. Commun.* – 2017. – Vol. 8.
 24. Zhang J., Wang C., Chen X. et al. EglN2 associates with the NRF1-PGC1 α complex and controls mitochondrial function in breast cancer // *EMBO J.* – 2015. – Vol. 34.N23. – P. 2953–2970.
 25. Yu H., Pardoll D., Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 // *NaV. Rev. Cancer.* – 2009. – Vol. 9.N11. – P. 798–809.
 26. Bragelmann J., Bohm S., Guthrie M.R. et al. Family matters: how MYC family oncogenes impact small cell lung cancer// *Cell Cycle.* – 2017. – Vol.16. N16. – P.1489–98.
 27. Rudin C.M., Poirier J.T., Byers L.A. et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data// *Nat Rev Cancer.* – 2019. – Vol.19. N5. – P.289–97
 28. Dietrich D., Kneip C., Raji O. et al. Performance evaluation of the DNA methylation biomarker SHOX2 for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates// *Int J Oncol.* – 2012. – Vol. 40. N3. – P.825–832. DOI:10.3892/ijo.2011.1264
 29. Marchini A., Ogata T., Rappold G.A. A Track Record on SHOX: From Basic Research to Complex Models and Therapy// *Endocr Rev.* – 2016. – Vol.37. N4. – P.417-48. DOI: 10.1210/er.2016-1036
 30. Kneip C., Schmidt B., Seegebarth A. et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma// *J Thorac Oncol.* – 2011. – Vol.6. N10. – P.1632-8. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318220ef9a. PMID 21694641.
 31. Darwiche K., Freitag L., Nair A. et al. Evaluation of a novel endobronchial ultrasound-guided lymph node forceps in enlarged mediastinal lymph nodes// *Respiration.* – 2013. – Vol.86. N3. – P.229-36. DOI: 10.1159/000350867. PMID 23860465.
 32. Ooki A., Maleki Z., Tsay J.J. et al. A Panel of Novel Detection and Prognostic Methylated DNA Markers in Primary Non-Small Cell Lung Cancer and Serum DNA// *Clin Cancer Res.* – 2017. – Vol.23. N22. – P.7141-7152. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1222. PMID 28855354.
 33. Ren J., Ding L., Xu Q. et al. LF-MF inhibits iron metabolism and suppresses lung cancer through activation of P53-miR-34a-E2F1/E2F3 pathway// *Sci Rep.* – 2017. – Vol.7. – P.749.

34. Мельников В. Л., Митрофанова Н. Н., Мельников Л. В. Аллергические заболевания: учеб. пособие. Пенза: Изд-во ПГУ. – 2015. – Т. 88.
35. Wu C.Y., Huang H.Y., Pan W.C. et al. Allergic diseases attributable to atopy in a population sample of Asian children // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11. N 1. – P. 16052. PMC8346539.
36. Pullerits T., Rönmark E.P., Ekerljung L. et al. The triad of current asthma, rhinitis and eczema is uncommon among adults: Prevalence, sensitization profiles, and risk factors // *Respir Med.* – 2021. – Vol. 176. – P.106250. PMID: 33385738
37. Willis-Owen S.A.G., Cookson W.O.C., Moffatt M.F. The genetics and genomics of asthma // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* – 2018. – Vol. 19. – P. 223-246. PMID: 30169121
38. Aguilar D., Pinart M., Koppelman G.H. et al. Computational analysis of multimorbidity between asthma, eczema and rhinitis // *PLOS ONE.* – 2017. – Vol. 12. – P. e0179125. PMC5466323
39. Ferreira M.A., Vonk J.M., Baurecht H. et al. Shared genetic origin of asthma, hay fever and eczema elucidates allergic disease biology // *Nat. Genet.* – 2017. – Vol. 49. – P. 1752-57. PMC5989923
40. Карунас А.С., Юнусбаев Б.Б., Федорова Ю.Ю. и др. Полногеномный анализ ассоциации бронхиальной астмы в Волго-Уральском регионе России // *Молекулярная биология.* – 2011. – Т. 45. – № 6. – С. 992-1003.
41. Karunas A.S., Fedorova Y.Y., Gimalova G.F. et al. Association of Gasdermin B Gene GSDMB Polymorphisms with Risk of Allergic Diseases// *Biochem Genet.* – 2021. – Vol. 59. N6. – P. 1527-1543. PMID: 33963941
42. Roscioni S.S., Kistemaker L.E., Menzen M.H. et al. PKA and Epac cooperate to augment bradykinin-induced interleukin-8 release from human airway smooth muscle cells // *Respir Res.* – 2009. – Vol. 10(1). – P. 88. PMC2764632
43. Oldenburger A, Roscioni SS, Jansen E et al. Anti-inflammatory role of the cAMP effectors Epac and PKA: implications in chronic obstructive pulmonary disease // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. N2. – P. e31574. PMC3283666
44. Roscioni S. S., Maarsingh H., Elzinga C.R.S. et al. Epac as a novel effector of airway smooth muscle relaxation // *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* – 2011. – Vol.15. N7. – P. 1551-1563. PMC3823199

45. Ullrich A., Gray A., Tam A.W. et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity // *EMBO J.* – 1986. – V.5. N10. – P.2503-2512. PMC1167146
46. Kaplan R.C., Petersen A.K., Chen M.H. et al. A genome-wide association study identifies novel loci associated with circulating IGF-I and IGFBP-3 // *Hum Mol Genet.* – 2011. – V.20. N. 6. – P.1241-1251. PMID: 21216879
47. Han R.N., Post M., Tanswell A.K., et al. Insulin-like growth factor-I receptor-mediated vasculogenesis/angiogenesis in human lung development // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2003. – V.28. N2. – P.159-169. PMID: 12540483
48. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2001. – V.164. – P.28-38. PMID: 11734464
49. Krein P.M., Winston B.W. Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease // *Chest.* – 2002. – V.122. N6 Suppl. – P.289-293. PMID: 12475802
50. Gao S., Yang Z., Zheng Z.Y. et al. Reduced expression of *DACT2* promotes hepatocellular carcinoma progression: involvement of methylation-mediated gene silencing // *World J Surg Oncol.* – 2013. – Vol. 11. – P. 57. PMID: 23496880
51. Hou J., Liao L.D., Xie Y.M. et al. *DACT2* is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma // *Cancer Prev Res (Phila).* – 2013. – Vol. 6. N 8. – P. 791-800. PMID: 23803417
52. Jia Y., Yang Y., Brock M.V. et al. Epigenetic regulation of *DACT2*, a key component of the Wnt signalling pathway in human lung cancer // *J Pathol.* – 2013. – Vol. 230. N2. – P.194-204. PMC4061565
53. Skre H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease// *Clin Genet.* – 1974.- Vol.6, N2. –P. 98-118. DOI: 10.1111/j.1399-0004.1974.tb00638.x
54. Martyn CN, Hughes RA. Epidemiology of peripheral neuropathy// *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 1997. – Vol. 62, N4. – P.310-8. DOI: 10.1136/jnnp.62.4.310.
55. Timmerman V., Raeymaekers P., De Jonghe P. et al. Assignment of the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1 (CMT 1a) gene to 17p11.2-p12// *Am J Hum Genet.* – 1990. – Vol. 47. N4. – P. 680-5. PMC1683809.
56. Lebo R.V., Lynch E.D., Bird T.D., et al. Multicolor in situ hybridization and linkage analysis order Charcot-Marie-Tooth type I (CMTIA) gene-region markers // *Am J Hum Genet.* – 1992. - Vol. 50. N1. – P.42-55. PMC1682543.

57. Ionasescu V.V., Ionasescu R., Searby C. Screening of dominantly inherited Charcot-Marie-Tooth neuropathies // *Muscle Nerve*. -1993. – Vol.16. N11. – P,1232-8. DOI: 10.1002/mus.880161114.
58. Niemann A., Ruegg M. La Padula V., Schenone A., Suter U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease// *J Cell Biol*. -2005. Vol.170. N7. - P.1067-78. DOI: 10.1083/jcb.200507087.
59. Pedrola L., Espert A., Wu X., Claramunt R. et al. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria // *Hum Mol Genet*. - 2005 . – Vol.14. N8. – P.1087-94.
60. Drew A.P., Zhu D., Kidambi A. et al. Improved inherited peripheral neuropathy genetic diagnosis by whole-exome sequencing // *Mol Genet Genomic Med*. – 2015. – Vol.3. N2. – P.143-54. doi: 10.1002/mgg3.126.
61. Eggermann K, Gess B, Häusler M. et al. Hereditary neuropathies: clinical presentation and genetic panel diagnosis//*Dtsch Arztebl Int* - 2018. – N.115. – P. 91–97. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0091.
62. Coelho M.B., AttigJ., Ule J. and Smith C. W. J. (). *Matrin-3: Connecting Gene Expression with the Nuclear Matrix*. // *WIREs RNA*. – 2016. – Vol.7. – P. 303–315. doi:10.1002/wrna.1336
63. Uemura Y, Oshima T, Yamamoto M, Reyes CJ, Costa Cruz PH, Shibuya T, Kawahara Y. *Matrin3 binds directly to intronic pyrimidine-rich sequences and controls alternative splicing*. // *Genes Cells*. – 2017. – Vol.22. N9. – P.785-798. doi: 10.1111/gtc.12512. Epub 2017 Jul 11. PMID: 28695676.
64. Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold // *Nature*. – 2021. – N.596. – P. 583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
65. Malik AM, Barmada SJ. *Matrin 3 in neuromuscular disease: physiology and pathophysiology* // *JCI Insight*. – 2021. – Vol. 6. N1. - e143948. doi: 10.1172/jci.insight.143948. PMID: 33427209; PMCID: PMC7821588.
66. Brayer K.J., Kulshreshtha S., Segal D.J. The protein-binding potential of C2H2 zinc finger domains // *Cell Biochem Biophys*. – 2008. – Vol.51. N1. – P.9–19. doi: 10.1007/s12013-008-9007-6.
67. Hibino Y., Usui T., Morita Y. et al. Molecular properties and intracellular localization of rat liver nuclear scaffold protein P130 // *Biochim Biophys Acta*. – 2006. – Vol.1759. N5. – P.195–207.

68. Salem A, Wilson C.J., Rutledge B.S. et al. Matrin3: Disorder and ALS Pathogenesis //Front. Mol. Biosci. – 2022. - N8. – P.794646. doi: 10.3389/fmolb.2021.794646
69. Yamoah A., Tripathi P., Sechi A., et al. Aggregates of RNA binding proteins and ER chaperones linked to exosomes in granulovacuolar degeneration of the Alzheimer's disease brain // J. Alzheimers Dis. – 2020. –Vol.75. N1. – P.139–156. doi: 10.3233/JAD-190722
70. Kuriyama H., Fukushima S., Kimura T. et al. Matrin-3 plays an important role in cell cycle and apoptosis for survival in malignant melanoma.//J Dermatol Sci. – 2020. – Vol.100. N2. – P. 110-119. doi: 10.1016
71. Feit H., Silbergleit A., Schneider L.B. et al. Vocal cord and pharyngeal weakness with autosomal dominant distal myopathy: Clinical description and gene localization to 5q31// Am. J. Hum. Genet. - 1998. – N. 63. - P.1732–1742.
72. Senderek J., Garvey S.M., Krieger M. et al. Autosomal-dominant distal myopathy associated with a recurrent missense mutation in the gene encoding the nuclear matrix protein, matrin 3 // Am J Hum Genet. – 2009. –Vol. 84. N. 4. – P.511–518. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.03.006
73. Johnson J.O., Pioro E.P., Boehringer A. et al. Mutations in the Matrin 3 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis // Nat Neurosci. – 2014. – Vol.17. N5. – P.664–666. doi: 10.1038/nn.3688.
74. Müller T.J., Kraya T., Stoltenburg-Didinger G. et al. Phenotype of matrin-3-related distal myopathy in 16 German patients // Ann Neurol. – 2014. – Vol.76. N5. – P.669-80. doi: 10.1002/ana.24255. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25154462.
75. Kraya T., Schmidt B., Müller T., et al. Impairment of respiratory function in late-onset distal myopathy due to MATR3 mutation //Muscle Nerve. – 2015.- Vol. 51. N6. – P.916–918.
76. Manini A., Velardo D., Ciscato P., Expanding the Phenotypic Spectrum of Vocal Cord and Pharyngeal Weakness With Distal Myopathy due to the p.S85C MATR3 Mutation // Neurol Genet. – 2022. – Vol.6. N8(4). - e200006. doi: 10.1212/NXG.0000000000200006. PMID: 35812165; PMCID: PMC9258980.