

Правительство Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

УДК 577.21
Per. № НИОКТР 123042000102-9

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе

С.В. Микушев

«12» *декабря* 2023 г.



ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
НАСЛЕДСТВЕННЫХ И МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ
ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ИХ ПАТОГЕНЕЗА
(промежуточный, этап 1)

Руководитель НИР
гл. науч. сотрудник СПбГУ
д.б.н., проф.

Э.К. Хуснутдинова

Санкт-Петербург 2023

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

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

20.12.2023
(подпись, дата)

Хуснутдинова Эльза
Камилевна
(руководство,
редактирование статей и
отчёта)

Исполнители:

ведущий научный
сотрудник СПбГУ
доктор биологических наук,
доцент

20.12.2023
(подпись, дата)

Карунас Александра
Станиславовна
(анализ данных, написание
статей – раздел 2.2)

ведущий научный
сотрудник СПбГУ
доктор биологических наук,
профессор

20.12.2023
(подпись, дата)

Хидиятова Ирина Михайловна
(проведение экспериментов,
написание статей – раздел 2.4)

ведущий научный
сотрудник СПбГУ
доктор биологических наук

20.12.2023
(подпись, дата)


Бермишена Марина
Алексеевна
(проведение экспериментов,
написание статей – раздел
2.1.1)

ведущий научный
сотрудник СПбГУ
доктор биологических наук

20.12.2023
(подпись, дата)


Хусаинова Рита Игоревна
(анализ данных, написание
статей – раздел 2.3)

старший научный
сотрудник СПбГУ
кандидат биологических
наук

20.12.2023
(подпись, дата)


Гилязова Ирина Ришатовна
(проведение экспериментов,
написание статей – раздел
2.1.2)

научный сотрудник СПбГУ
кандидат биологических
наук

20.12.2023
(подпись, дата)


Иванова Елизавета
Алексеевна
(проведение экспериментов,
написание статей – раздел
2.1.2)

научный сотрудник СПбГУ
кандидат биологических
наук

20.12.2023
(подпись, дата)


Савельева Ольга Николаевна
(проведение экспериментов,
написание статей – раздел 2.2)

научный сотрудник СПбГУ
кандидат биологических
наук

20.12.2023
(подпись, дата)

Ялаев Булат Илдусович
(проведение экспериментов,
написание статей – раздел 2.3)

нормоконтролер

20.12.2023
(подпись, дата)

Вершинин Андрей
Владимирович

РЕФЕРАТ

Отчет: 66 страниц, 1 кн., 17 рисунков, 17 таблиц, 110 использованных источников.
МОНОГЕННЫЕ И МНОГОФАКТОРНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ГЕНЫ, ЭКЗОМ

Объект исследования: ДНК пациентов, жителей Республики Башкортостан с раком молочной железы, раком предстательной железы, бронхиальной астмой, остеопорозом, наследственной спастической параплегией;

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

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

В рамках реализации проекта проведены следующие работы: 1) исследования по идентификации генетических и эпигенетических маркеров риска развития онкологических заболеваний, включающие репликативное исследование полиморфных генетических локусов, ассоциированных с развитием рака молочной железы, по данным GWAS, в выборках больных и контрольной группы из Республики Башкортостан; анализ профиля экспрессии микроРНК у пациентов с раком предстательной железы на ранней и поздней стадиях злокачественного процесса; 2) исследования по идентификации генетических и эпигенетических маркеров риска развития аллергических заболеваний на основе анализа генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, у больных бронхиальной астмой; 3) исследования по идентификации генетических и эпигенетических маркеров риска развития метаболических заболеваний на основе анализа ассоциации полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК в мРНК целевых генов с остеопоротическими переломами и низким уровнем МПКТ; 4) поиск генетической причины развития наследственной спастической параплегии у пациентов с неустановленной генетической причиной заболевания на основе полного секвенирования экзона.

СОДЕРЖАНИЕ

| | Стр. |
|--|------|
| СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ..... | 2 |
| РЕФЕРАТ..... | 3 |
| УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ..... | 5 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 6 |
| 2.1 Идентификация генетических и эпигенетических маркеров риска развития онкологических заболеваний..... | 8 |
| 2.1.1. Репликативное исследование полиморфных генетических локусов, ассоциированных с развитием рака молочной железы, по данным GWAS, в выборке больных с раком молочной железы и здоровых индивидов контрольной группы из Республики Башкортостан..... | 8 |
| 2.1.2. Анализ профиля экспрессии микроРНК у пациентов с раком предстательной железы на ранней и поздней стадиях злокачественного процесса..... | 15 |
| 2.2. Идентификация генетических и эпигенетических маркеров риска развития аллергических заболеваний. Исследование генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, у больных бронхиальной астмой..... | 29 |
| 2.3. Идентификация генетических и эпигенетических маркеров риска развития метаболических заболеваний. Исследование ассоциации полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК в мРНК таргетных генов с остеопоротическими переломами и низким уровнем МПКТ..... | 38 |
| 2.4. Полное секвенирование экзома у пациентов с наследственной спастической параплегией с неустановленной генетической причиной заболевания, биоинформатический анализ результатов исследования и их валидация методом секвенирования по Сэнгеру... | 49 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 54 |
| СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ И ПРИНЯТЫХ К ПЕЧАТИ В 2023 ГОДУ..... | 57 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ..... | 58 |

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

GWAS – genome-wide association study – полногеномный анализ ассоциаций

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

ДНК

БА – бронхиальная астма

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

НСП – наследственные спастические параличи

ОП – остеопороз

РБ – Республика Башкортостан

РМЖ – рак молочной железы

РПЖ – рак предстательной железы

РЯ – рак яичников

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 предстательной железы) 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. 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.

Актуальным является исследование эпигенетических маркеров формирования первичного остеопороза в целом, переломов и низкого уровня МПКТ по отдельности и в коморбидном состоянии с учетом гендерных, этнических факторов для идентификации прогностически значимых маркеров заболевания и ранней диагностики остеопороза.

Актуальность клиничко-молекулярно-генетических исследований моногенных (олигогенных) патологий нервной системы связана с их широкой клинической и генетической гетерогенностью, перекрыванием 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, метаболических 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, метаболических и аллергических заболеваний, а также моногенных нейродегенеративных патологий, направленное на разработку новых эффективных подходов ДНК-диагностики и патогенетического лечения.

В соответствие с целью, на 2023 год были поставлены следующие задачи:

1. С целью идентификации генетических и эпигенетических маркеров риска развития рака молочной железы и яичников, рака предстательной железы провести:

- репликативное исследование полиморфных генетических локусов, ассоциированных с развитием рака молочной железы, по данным GWAS, в выборке больных с раком молочной железы и здоровых индивидов контрольной группы из Республики Башкортостан;

- анализ профиля экспрессии микроРНК у пациентов с раком предстательной железы на ранней и поздней стадиях злокачественного процесса.

2. С целью идентификации генетических и эпигенетических маркеров риска развития аллергических заболеваний провести исследование генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, у больных бронхиальной астмой.

3. С целью идентификации генетических и эпигенетических маркеров риска развития метаболических заболеваний провести исследование ассоциации полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК в мРНК таргетных генов с остеопоротическими переломами и низким уровнем МПКТ.

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.

2.1 Идентификация генетических и эпигенетических маркеров риска развития онкологических заболеваний

2.1.1 Репликативное исследование полиморфных генетических локусов, ассоциированных с развитием рака молочной железы, по данным GWAS, в выборке больных с раком молочной железы и здоровых индивидов контрольной группы из Республики Башкортостан

Предрасположенность к раку молочной железы (РМЖ) обусловлена многочисленными факторам внешней и внутренней среды. Одним из главных факторов является генетическая составляющая, которая формируется комбинацией большого количества полиморфных локусов, каждый из которых (индивидуально) оказывает небольшое влияние на риск развития РМЖ. Глобальный анализ, проведенный в рамках полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), позволил определить ряд полиморфных локусов, расположенных в различных участках генома, которые ассоциированы с риском развития РМЖ [1 – 7].

Мы провели репликативные исследования по данным GWAS на выборках больных РМЖ и контроля - жителей Республики Башкортостан. В исследовании случай - контроль анализировали однонуклеотидные полиморфные варианты rs11249433, rs1045485, rs13387042, rs1357245, rs4973768, rs4132417, rs1607237, rs2046210, rs10941679, rs889312, rs2180341, rs2046210, rs2981582, rs3817198, rs10483813, rs3803662, rs6504950 и rs1982073. Генотипирование образцов ДНК проводили на платформе 7500 FAST Sequence Detection System (Applied Biosystems) по протоколу фирмы производителя (*TaqMan Allelic Discrimination*, AB).

Результаты анализа распределения частот аллелей полиморфных вариантов rs11249433, rs1045485, rs13387042, rs1357245, rs4973768, rs4132417, rs1607237, rs2046210, rs10941679, rs889312, rs2180341, rs2046210, rs2981582, rs3817198, rs10483813, rs3803662, rs6504950 и rs1982073 у здоровых индивидов и больных РМЖ из РБ разной этнической принадлежности и в объединенных выборках представлены в таблицах 1 - 4.

Таблица 1 - Распределение частот аллелей полиморфных локусов по данным GWAS у женщин с РМЖ и контрольной группы русского этнической принадлежности

| SNP ID | A1 | Частота аллеля 1 | | A2 | P | OR | L95 | U95 |
|------------|----|------------------|----------|----|--------|------|------|------|
| | | Больные РМЖ | контроль | | | | | |
| rs11249433 | G | 0.362 | 0.346 | A | 0.4264 | 1.07 | 0.90 | 1.27 |
| rs1045485 | C | 0.1223 | 0.1139 | G | 0.595 | 1.08 | 0.81 | 1.46 |
| rs13387042 | G | 0.4211 | 0.4538 | A | 0.1199 | 0.87 | 0.74 | 1.04 |
| rs1357245 | T | 0.4509 | 0.4555 | C | 0.8265 | 0.98 | 0.83 | 1.16 |
| rs4973768 | T | 0.4573 | 0.4587 | C | 0.9448 | 0.99 | 0.84 | 1.17 |
| rs4132417 | T | 0.194 | 0.2048 | A | 0.5206 | 0.93 | 0.76 | 1.15 |
| rs1607237 | C | 0.4431 | 0.4459 | T | 0.8933 | 0.99 | 0.84 | 1.17 |
| rs10941679 | G | 0.2969 | 0.2548 | A | 0.0249 | 1.24 | 1.03 | 1.49 |
| rs889312 | C | 0.3239 | 0.3027 | A | 0.2768 | 1.10 | 0.92 | 1.32 |
| rs2180341 | G | 0.268 | 0.2568 | A | 0.5421 | 1.05 | 0.88 | 1.28 |
| rs2046210 | A | 0.2829 | 0.2659 | G | 0.3663 | 1.09 | 0.91 | 1.31 |
| rs2981582 | T | 0.3958 | 0.3339 | C | 0.0021 | 1.31 | 1.10 | 1.55 |
| rs3817198 | C | 0.3304 | 0.3137 | T | 0.395 | 1.07 | 0.91 | 1.29 |
| rs10483813 | A | 0.21 | 0.2206 | T | 0.5375 | 0.94 | 0.77 | 1.15 |
| rs3803662 | T | 0.3388 | 0.3075 | C | 0.1107 | 1.15 | 0.97 | 1.38 |
| rs6504950 | A | 0.2078 | 0.2369 | G | 0.0964 | 0.84 | 0.69 | 1.03 |
| rs1982073 | C | 0.3827 | 0.4036 | T | 0.3845 | 0.92 | 0.75 | 1.12 |

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

Таблица 2 - Распределение частот аллелей полиморфных локусов по данным GWAS у женщин с РМЖ и контрольной группы татарской этнической принадлежности

| SNP ID | A1 | Частота аллеля 1 | | A2 | P | OR | L95 | U95 |
|------------|----|------------------|----------|----|--------|------|------|------|
| | | Больные РМЖ | контроль | | | | | |
| rs11249433 | G | 0.3718 | 0.339 | A | 0.1886 | 1.15 | 0.93 | 1.43 |
| rs1045485 | C | 0.108 | 0.0982 | G | 0.6074 | 1.11 | 0.74 | 1.66 |
| rs13387042 | A | 0.5201 | 0.4703 | G | 0.0578 | 1.22 | 0.99 | 1.50 |
| rs1357245 | T | 0.4743 | 0.4432 | C | 0.2338 | 1.13 | 0.92 | 1.39 |
| rs4973768 | T | 0.4398 | 0.4776 | C | 0.1461 | 0.86 | 0.69 | 1.05 |
| rs4132417 | T | 0.2737 | 0.2339 | A | 0.0765 | 1.23 | 0.98 | 1.56 |
| rs1607237 | C | 0.4854 | 0.5036 | T | 0.4856 | 0.93 | 0.76 | 1.14 |
| rs10941679 | G | 0.3303 | 0.2725 | A | 0.0152 | 1.32 | 1.05 | 1.65 |
| rs889312 | C | 0.3668 | 0.3309 | A | 0.1478 | 1.17 | 0.95 | 1.45 |
| rs2180341 | G | 0.2646 | 0.2603 | A | 0.8521 | 1.02 | 0.81 | 1.29 |
| rs2046210 | A | 0.3004 | 0.2716 | G | 0.2204 | 1.15 | 0.92 | 1.44 |
| rs2981582 | T | 0.4011 | 0.3664 | C | 0.1712 | 1.16 | 0.94 | 1.43 |
| rs3817198 | C | 0.2875 | 0.3147 | T | 0.2586 | 0.88 | 0.70 | 1.1 |
| rs10483813 | A | 0.1941 | 0.2225 | T | 0.1849 | 0.84 | 0.65 | 1.09 |
| rs3803662 | T | 0.3741 | 0.3115 | C | 0.0110 | 1.32 | 1.07 | 1.64 |
| rs6504950 | A | 0.2318 | 0.2231 | G | 0.6923 | 1.05 | 0.82 | 1.34 |
| rs1982073 | C | 0.4429 | 0.447 | T | 0.8941 | 0.98 | 0.76 | 1.26 |

Таблица 3 - Распределение частот аллелей полиморфных локусов по данным GWAS у женщин с РМЖ и контрольной группы башкирской этнической принадлежности

| SNP ID | A1 | Частота аллеля 1 | | A2 | P | OR | L95 | U95 |
|------------|----|------------------|----------|----|--------|------|------|------|
| | | Больные РМЖ | контроль | | | | | |
| rs11249433 | G | 0.3787 | 0.2837 | A | 0.0054 | 1.54 | 1.14 | 2.09 |
| rs1045485 | C | 0.0625 | 0.0469 | G | 0.3894 | 1.36 | 0.68 | 2.72 |
| rs13387042 | A | 0.4301 | 0.3843 | G | 0.2054 | 1.21 | 0.90 | 1.62 |
| rs1357245 | T | 0.4522 | 0.4654 | C | 0.7189 | 0.95 | 0.71 | 1.27 |
| rs4973768 | T | 0.4449 | 0.4031 | C | 0.2495 | 1.19 | 0.88 | 1.59 |
| rs4132417 | T | 0.2537 | 0.3235 | A | 0.0384 | 0.71 | 0.51 | 0.98 |
| rs1607237 | T | 0.4743 | 0.4516 | C | 0.5354 | 1.10 | 0.82 | 1.46 |
| rs10941679 | G | 0.3456 | 0.3218 | A | 0.4912 | 1.11 | 0.82 | 1.51 |
| rs889312 | C | 0.4338 | 0.446 | A | 0.7392 | 0.95 | 0.71 | 1.27 |
| rs2180341 | G | 0.2868 | 0.2768 | A | 0.7632 | 1.05 | 0.76 | 1.45 |
| rs2046210 | A | 0.2904 | 0.2491 | G | 0.2016 | 1.23 | 0.89 | 1.70 |
| rs2981582 | T | 0.4007 | 0.331 | C | 0.0475 | 1.35 | 1.00 | 1.82 |
| rs3817198 | C | 0.3346 | 0.2405 | T | 0.0040 | 1.59 | 1.16 | 2.18 |
| rs10483813 | A | 0.1912 | 0.2413 | T | 0.1028 | 0.74 | 0.52 | 1.06 |
| rs3803662 | T | 0.4118 | 0.3955 | C | 0.6515 | 1.07 | 0.80 | 1.43 |
| rs6504950 | A | 0.2353 | 0.2266 | G | 0.7796 | 1.05 | 0.75 | 1.48 |
| rs1982073 | C | 0.4519 | 0.4785 | T | 0.517 | 0.90 | 0.65 | 1.24 |

Таблица 4 - Распределение частот аллелей полиморфных локусов по данным GWAS в общей выборке больных РМЖ и контрольной группы

| SNP ID | A1 | Частота аллеля 1 | | A2 | P | OR | L95 | U95 |
|------------|----|------------------|----------|----|------------|------|------|------|
| | | Больные РМЖ | контроль | | | | | |
| rs11249433 | G | 0.3672 | 0.3309 | A | 0.0081 | 1.17 | 1.04 | 1.32 |
| rs1045485 | C | 0.1053 | 0.09247 | G | 0.2019 | 1.16 | 0.92 | 1.44 |
| rs13387042 | G | 0.4568 | 0.516 | A | 4.384e-005 | 0.79 | 0.70 | 0.88 |
| rs1357245 | T | 0.4554 | 0.4528 | C | 0.8544 | 1.01 | 0.90 | 1.13 |
| rs4973768 | T | 0.4532 | 0.4535 | C | 0.9812 | 0.99 | 0.89 | 1.12 |
| rs4132417 | T | 0.2278 | 0.2395 | A | 0.3408 | 0.94 | 0.82 | 1.07 |
| rs1607237 | C | 0.4672 | 0.4817 | T | 0.3135 | 0.94 | 0.84 | 1.06 |
| rs10941679 | G | 0.3114 | 0.2768 | A | 0.0082 | 1.18 | 1.04 | 1.34 |
| rs889312 | C | 0.3556 | 0.3387 | A | 0.2176 | 1.08 | 0.96 | 1.21 |
| rs2180341 | G | 0.2711 | 0.2599 | A | 0.378 | 1.06 | 0.93 | 1.20 |
| rs2046210 | A | 0.2879 | 0.2674 | G | 0.111 | 1.11 | 0.98 | 1.26 |
| rs2981582 | T | 0.3992 | 0.3434 | C | 5.928e-005 | 1.27 | 1.13 | 1.43 |
| rs3817198 | C | 0.3189 | 0.3001 | T | 0.157 | 1.09 | 0.97 | 1.23 |
| rs10483813 | A | 0.2024 | 0.2244 | T | 0.0643 | 0.88 | 0.76 | 1.01 |
| rs3803662 | T | 0.361 | 0.3262 | C | 0.0108 | 1.17 | 1.04 | 1.31 |
| rs6504950 | A | 0.2189 | 0.2284 | G | 0.4318 | 0.95 | 0.83 | 1.08 |
| rs1982073 | C | 0.4107 | 0.4359 | T | 0.1358 | 0.90 | 0.79 | 1.03 |

По данным мета-анализа установлено, что полиморфные локусы rs10941679 / 5p12, rs13387042 / 2q35, rs2981582 / FGFR2, rs3803662 / 16q12 ассоциированы с риском развития РМЖ у женщин нашего региона (таблица 5). Для локусов rs11249433, rs4132417 и rs3817198 определен высокий показатель гетерогенности в популяциях, поэтому анализ ассоциации аллелей и генотипов данных полиморфных локусов с риском развития РМЖ был проведен в отдельных этнических группах.

Таблица 5 - Результаты мета-анализа ассоциации полиморфных локусов по данным GWAS с риском развития РМЖ

| SNP ID | A1 | A2 | N | Модель с фиксированным эффектом | | Модель со случайным эффектом | | Q | I ² |
|------------|----|----|---|---------------------------------|------|------------------------------|-------|--------|----------------|
| | | | | P | OR | P(R) | OR(R) | | |
| rs11249433 | G | A | 3 | 0.0148 | 1.16 | 0.056 | 1.20 | 0.1280 | 51.35 |
| rs1045485 | C | G | 3 | 0.3307 | 1.12 | 0.3307 | 1.12 | 0.8442 | 0.00 |
| rs13387042 | G | A | 3 | 0.0068 | 0.85 | 0.0068 | 0.85 | 0.8736 | 0.00 |
| rs1357245 | T | C | 3 | 0.7045 | 1.02 | 0.7045 | 1.02 | 0.4848 | 0.00 |
| rs4973768 | T | C | 3 | 0.6784 | 0.97 | 0.8214 | 0.98 | 0.1947 | 38.89 |
| rs4132417 | T | A | 3 | 0.7912 | 0.98 | 0.7356 | 0.95 | 0.0207 | 74.20 |
| rs1607237 | C | T | 3 | 0.4533 | 0.96 | 0.4533 | 0.96 | 0.8486 | 0.00 |
| rs10941679 | G | A | 3 | 0.0011 | 1.24 | 0.0011 | 1.24 | 0.6818 | 0.00 |
| rs889312 | C | A | 3 | 0.1461 | 1.10 | 0.1461 | 1.10 | 0.5280 | 0.00 |
| rs2180341 | G | A | 3 | 0.5087 | 1.05 | 0.5087 | 1.05 | 0.9713 | 0.00 |
| rs2046210 | A | G | 3 | 0.0623 | 1.13 | 0.0623 | 1.13 | 0.7931 | 0.00 |
| rs2981582 | T | C | 3 | 0.0001 | 1.26 | 0.0001 | 1.26 | 0.6044 | 0.00 |
| rs3817198 | C | T | 3 | 0.2587 | 1.08 | 0.4265 | 1.12 | 0.0113 | 77.68 |
| rs10483813 | A | T | 3 | 0.0643 | 0.87 | 0.0643 | 0.87 | 0.5062 | 0.00 |
| rs3803662 | T | C | 3 | 0.0056 | 1.19 | 0.0056 | 1.19 | 0.4662 | 0.00 |
| rs6504950 | A | G | 3 | 0.4061 | 0.94 | 0.4856 | 0.95 | 0.3161 | 13.18 |
| rs1982073 | C | T | 3 | 0.3327 | 0.93 | 0.3327 | 0.93 | 0.9799 | 0.00 |

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

В результате проведенного исследования полиморфного локуса rs10941679, расположенного в области 5p12, установлены статистически значимые различия в распределении частот аллелей между больными РМЖ и контрольной группой. Согласно данным мета-анализа, объединяющим три этнические группы - русских, татар и башкир, установлено, что аллель G ассоциирован с повышенным риском заболевания OR = 1.24, p = 0.001. Достоверные различия выявлены при сравнении частот аллелей полиморфного локуса rs13387042, расположенного в области 2q35. Показано, что аллель G встречается реже у больных РМЖ, чем в контрольной группе и показатель отношения шансов соответствует значению OR = 0.84, p = 0.007. Результаты мета -анализа, позволили определить, что аллель T локуса rs2981582 в гене FGFR2 связан с

повышенным риском развития РМЖ у женщин нашего региона, OR = 1.26 и p = 0.0001. Статистический анализ результатов исследования полиморфного варианта rs3803662 в области 16q12, показал, что у носителей аллеля T увеличивается риск РМЖ, OR = 1.19 и p = 0.006.

Сравнительный анализ частот разных комбинаций генотипов исследуемых полиморфных локусов между больными РМЖ и контролем позволил определить, что наиболее предпочтительными моделями ассоциации генотипов локуса rs10941679 являются доминантная (*AA vs AG-GG*) и аддитивная, которые связаны с повышенным риском развития РМЖ: OR = 1.25, p=0.005 и OR = 1.18, p=0.008, соответственно (таблица 6). Выявлена ассоциация генотипов полиморфного локуса rs13387042 с пониженным риском развития РМЖ. При кодоминантной модели наследования *AA vs AG* и *AA vs GG* показатель отношения шансов соответствовал значениям OR = 0.76 и OR = 0.63, p=0.0002, соответственно. Согласно аддитивной модели данный показатель имеет значение OR = 0.79, p = 0.0001. У женщин с генотипами *TC* и *TT* полиморфного локуса rs2981582 повышается вероятность развития РМЖ. Согласно кодоминантной модели наследования в отношении генотипов *CC vs TC*: OR = 1.23; *CC vs TT*: OR = 1.67, p=0.0002. Увеличение риска развития опухоли молочной железы наблюдается при рассмотрении аддитивной модели OR = 1.28, p=0.0001. Комбинация генотипов *TC* и *TT* полиморфного локуса rs3803662 повышает риск развития РМЖ. Показатель отношения шансов при доминантной модели наследования (*CC vs TC-TT*) соответствует OR = 1.26, p = 0.0056. Согласно рецессивной модели генотип по редкому аллелю *CC* полиморфного локуса rs1045485 связан с повышенным риском развития опухоли молочной железы (*GG-CG vs CC*) p = 0.026, но после введения поправки на множественность сравнений значения становятся статистически незначимыми.

Таблица 6 - Ассоциация генотипов полиморфных локусов rs10941679, rs3803662, rs13387042, rs2981582 с риском развития РМЖ

| Модель | Генотип | Контроль | Больные РМЖ | OR (95% CI) | P |
|-------------------|----------------|--------------|-------------|------------------|--------|
| <i>rs10941679</i> | | | | | |
| Кодоминантная | <i>A/A</i> | 860 (52.4%) | 441 (46.7%) | 1.00 | 0.02 |
| | <i>A/G</i> | 655 (39.9%) | 418 (44.3%) | 1.24 (1.05-1.47) | |
| | <i>G/G</i> | 127 (7.7%) | 85 (9%) | 1.31 (0.97-1.76) | |
| Доминантная | <i>A/A</i> | 860 (52.4%) | 441 (46.7%) | 1.00 | 0.0056 |
| | <i>A/G-G/G</i> | 782 (47.6%) | 503 (53.3%) | 1.25 (1.07-1.47) | |
| Рецессивная | <i>A/A-A/G</i> | 1515 (92.3%) | 859 (91%) | 1.00 | 0.26 |
| | <i>G/G</i> | 127 (7.7%) | 85 (9%) | 1.18 (0.89-1.57) | |
| Сверхдоминантная | <i>A/A-G/G</i> | 987 (60.1%) | 526 (55.7%) | 1.00 | 0.029 |
| | <i>A/G</i> | 655 (39.9%) | 418 (44.3%) | 1.20 (1.02-1.41) | |
| Лог-аддитивная | --- | --- | --- | 1.18 (1.05-1.34) | 0.0081 |
| <i>rs3803662</i> | | | | | |
| Кодоминантная | <i>C/C</i> | 745 (45.7%) | 382 (40.1%) | 1.00 | 0.021 |
| | <i>T/C</i> | 708 (43.4%) | 454 (47.6%) | 1.25 (1.05-1.48) | |
| | <i>T/T</i> | 178 (10.9%) | 117 (12.3%) | 1.28 (0.98-1.67) | |

Продолжение таблицы 6

| | | | | | |
|-------------------|----------------|--------------|-------------|------------------|--------|
| Доминантная | <i>C/C</i> | 745 (45.7%) | 382 (40.1%) | 1.00 | 0.0056 |
| | <i>T/C-T/T</i> | 886 (54.3%) | 571 (59.9%) | 1.26 (1.07-1.48) | |
| Рецессивная | <i>C/C-T/C</i> | 1453 (89.1%) | 836 (87.7%) | 1.00 | 0.3 |
| | <i>T/T</i> | 178 (10.9%) | 117 (12.3%) | 1.14 (0.89-1.46) | |
| Сверхдоминантная | <i>C/C-T/T</i> | 923 (56.6%) | 499 (52.4%) | 1.00 | 0.037 |
| | <i>T/C</i> | 708 (43.4%) | 454 (47.6%) | 1.19 (1.01-1.39) | |
| Лог-аддитивная | --- | --- | --- | 1.17 (1.04-1.32) | 0.011 |
| <i>rs13387042</i> | | | | | |
| Кодоминантная | <i>A/A</i> | 377 (23.7%) | 287 (30.3%) | 1.00 | 2e-04 |
| | <i>A/G</i> | 788 (49.5%) | 456 (48.1%) | 0.76 (0.63-0.92) | |
| | <i>G/G</i> | 428 (26.9%) | 205 (21.6%) | 0.63 (0.50-0.79) | |
| Доминантная | <i>A/A</i> | 377 (23.7%) | 287 (30.3%) | 1.00 | 3e-04 |
| | <i>A/G-G/G</i> | 1216 (76.3%) | 661 (69.7%) | 0.71 (0.60-0.86) | |
| Рецессивная | <i>A/A-A/G</i> | 1165 (73.1%) | 743 (78.4%) | 1.00 | 0.0029 |
| | <i>G/G</i> | 428 (26.9%) | 205 (21.6%) | 0.75 (0.62-0.91) | |
| Сверхдоминантная | <i>A/A-G/G</i> | 805 (50.5%) | 492 (51.9%) | 1.00 | 0.51 |
| | <i>A/G</i> | 788 (49.5%) | 456 (48.1%) | 0.95 (0.81-1.11) | |
| Лог-аддитивная | --- | --- | --- | 0.79 (0.71-0.89) | 1e-04 |
| <i>rs2981582</i> | | | | | |
| Кодоминантная | <i>C/C</i> | 693 (42.5%) | 342 (35.9%) | 1.00 | 2e-04 |
| | <i>T/C</i> | 757 (46.4%) | 460 (48.3%) | 1.23 (1.03-1.47) | |
| | <i>T/T</i> | 182 (11.2%) | 150 (15.8%) | 1.67 (1.30-2.15) | |
| Доминантная | <i>C/C</i> | 693 (42.5%) | 342 (35.9%) | 1.00 | 0.001 |
| | <i>T/C-T/T</i> | 939 (57.5%) | 610 (64.1%) | 1.32 (1.12-1.55) | |
| Рецессивная | <i>C/C-T/C</i> | 1450 (88.8%) | 802 (84.2%) | 1.00 | 8e-04 |
| | <i>T/T</i> | 182 (11.2%) | 150 (15.8%) | 1.49 (1.18-1.88) | |
| Сверхдоминантная | <i>C/C-T/T</i> | 875 (53.6%) | 492 (51.7%) | 1.00 | 0.34 |
| | <i>T/C</i> | 757 (46.4%) | 460 (48.3%) | 1.08 (0.92-1.27) | |
| Лог-аддитивная | --- | --- | --- | 1.28 (1.13-1.44) | 1e-04 |

При анализе частот аллелей и генотипов полиморфных локусов rs11249433, rs4132417 и rs3817198 в стратифицированных по этнической принадлежности выборках статистически значимые различия частот аллелей полиморфного локуса выявлены между женщинами с РМЖ и контрольной группы башкирской этнической принадлежности (Таблица 7). Минорный аллель rs11249433**G* ассоциирован с повышением риска РМЖ у башкир, OR = 1.54, 95% CI 1.13 - 2.09, $p = 0.005$. Тенденция к повышению частоты аллеля rs11249433**G* у больных РМЖ также наблюдалась для татар и русских. При сравнительном анализе генотипов наиболее информативной является доминантная модель. У женщин с генотипами несущими редкий аллель

AG - GG увеличивается риск развития РМЖ: OR = 1.94, 95% CI 1.28 - 2.95, p = 0.0017 (таблица 7). Сравнительный анализ частоты аллелей полиморфного локуса rs3817198 между группами женщин с РМЖ и контроля башкирской этнической принадлежности показал, что минорный аллель *C* достоверно чаще встречается у женщин с РМЖ, чем в группе контроля, p = 0.004. Показатель отношения шансов составил OR = 1.59, 95% CI 1.16 - 2.18 (Таблица 7). У женщин с генотипами *CT-CC* повышается риск развития РМЖ согласно доминантной модели наследования: OR = 1.71, 95% CI 1.13 - 2.58, p=0.01, более информативным является лог-аддитивный тест: OR = 1.60, 95% CI 1.16 - 2.20, p=0.0043. Снижение частоты минорного аллеля *T* полиморфного локуса rs4132417 наблюдалось у пациенток с РМЖ по сравнению с контрольной группой. Аллель rs4132417**T* ассоциирован с пониженным риском развития РМЖ у женщин башкирской этнической группы. При лог-аддитивной модели наследования установлено что значения показателя отношения шансов соответствуют 0.71, p= 0.035 (таблица 7).

Таблица 7 - Ассоциация генотипов полиморфных локусов rs11249433 rs3817198 и rs4132417 с риском развития РМЖ у женщин башкирской этнической принадлежности

| Модель | Генотип | Контроль | Больные РМЖ | OR (95% CI) | P |
|--------------|----------------|-------------|-------------|------------------|--------|
| rs11249433 | | | | | |
| Codominant | <i>A/A</i> | 151 (52.2%) | 49 (36%) | 1.00 | 0.0072 |
| | <i>A/G</i> | 112 (38.8%) | 71 (52.2%) | 1.95 (1.26-3.03) | |
| | <i>G/G</i> | 26 (9%) | 16 (11.8%) | 1.90 (0.94-3.82) | |
| Dominant | <i>A/A</i> | 151 (52.2%) | 49 (36%) | 1.00 | 0.0017 |
| | <i>A/G-G/G</i> | 138 (47.8%) | 87 (64%) | 1.94 (1.28-2.95) | |
| Recessive | <i>A/A-A/G</i> | 263 (91%) | 120 (88.2%) | 1.00 | 0.38 |
| | <i>G/G</i> | 26 (9%) | 16 (11.8%) | 1.35 (0.70-2.61) | |
| Overdominant | <i>A/A-G/G</i> | 177 (61.2%) | 65 (47.8%) | 1.00 | 0.0092 |
| | <i>A/G</i> | 112 (38.8%) | 71 (52.2%) | 1.73 (1.14-2.60) | |
| Log-additive | --- | --- | --- | 1.54 (1.13-2.10) | 0.0057 |
| rs3817198 | | | | | |
| Codominant | <i>T/T</i> | 166 (57.4%) | 60 (44.1%) | 1.00 | 0.017 |
| | <i>C/T</i> | 107 (37%) | 61 (44.9%) | 1.58 (1.02-2.43) | |
| | <i>C/C</i> | 16 (5.5%) | 15 (11%) | 2.59 (1.21-5.57) | |
| Dominant | <i>T/T</i> | 166 (57.4%) | 60 (44.1%) | 1.00 | 0.01 |
| | <i>C/T-C/C</i> | 123 (42.6%) | 76 (55.9%) | 1.71 (1.13-2.58) | |
| Recessive | <i>T/T-C/T</i> | 273 (94.5%) | 121 (89%) | 1.00 | 0.049 |
| | <i>C/C</i> | 16 (5.5%) | 15 (11%) | 2.12 (1.01-4.42) | |
| Overdominant | <i>T/T-C/C</i> | 182 (63%) | 75 (55.1%) | 1.00 | 0.12 |
| | <i>C/T</i> | 107 (37%) | 61 (44.9%) | 1.38 (0.91-2.09) | |
| Log-additive | --- | --- | --- | 1.60 (1.16-2.20) | 0.0043 |
| rs4132417 | | | | | |
| odominant | <i>A/A</i> | 131 (45.3%) | 75 (55.1%) | 1.00 | 0.11 |
| | <i>A/T</i> | 129 (44.6%) | 53 (39%) | 0.72 (0.47-1.10) | |
| | <i>T/T</i> | 29 (10%) | 8 (5.9%) | 0.48 (0.21-1.11) | |
| Dominant | <i>A/A</i> | 131 (45.3%) | 75 (55.1%) | 1.00 | 0.059 |
| | <i>A/T-T/T</i> | 158 (54.7%) | 61 (44.9%) | 0.67 (0.45-1.02) | |

Продолжение таблицы 7

| | | | | | |
|--------------|----------------|-------------|-------------|------------------|-------|
| Recessive | <i>A/A-A/T</i> | 260 (90%) | 128 (94.1%) | 1.00 | 0.14 |
| | <i>T/T</i> | 29 (10%) | 8 (5.9%) | 0.56 (0.25-1.26) | |
| Overdominant | <i>A/A-T/T</i> | 160 (55.4%) | 83 (61%) | 1.00 | 0.27 |
| | <i>A/T</i> | 129 (44.6%) | 53 (39%) | 0.79 (0.52-1.20) | |
| Log-additive | --- | --- | --- | 0.71 (0.51-0.98) | 0.035 |

Таким образом, репликация исследований GWAS позволила выявить генетические маркеры риска развития РМЖ. Установлено, что аллель *G* и генотипы *AG-GG* (доминантная модель) полиморфного локуса rs10941679 / (5p12), аллель *T* и генотипы *TC* и *TT* (кодоминантная модель) полиморфного локуса rs2981582 в гене *FGFR2*, аллель *T* и генотипы *TC-TT* (доминантная модель) полиморфного локуса rs3803662 / 16q12 ассоциированы с повышенным риском развития РМЖ у женщин, проживающих в Республике Башкортостан. Аллель *G*, а также генотипы *AG* и *GG* полиморфного локуса rs13387042 / 2q35 являются маркерами пониженного риска развития РМЖ. Результаты нашего исследования позволяют определить новые гены - кандидаты предрасположенности к РМЖ (*FGF10*, *FGFR2*, *TOX3*, *NOTCH2*, *LSP1* и др.), что в свою очередь стимулирует изучение их роли в процессе канцерогенеза.

2.1.2 Анализ профиля экспрессии микроРНК у пациентов с раком предстательной железы на ранней и поздней стадиях злокачественного процесса

За отчетный период проведено исследование профиля экспрессии 754 микроРНК в тканях опухолей предстательной железы и нормальных прилежащих тканей. Образцы тканей как раковых, так и здоровых тканей простаты были получены от лиц с диагнозом рак предстательной железы (РПЖ), проходивших лечение в Республиканском клиническом онкологическом диспансере и кафедрах онкологии и урологии клиники Башкирского государственного медицинского университета. Оценка этих образцов тканей была проведена двумя опытными патологами, с последующим определением гистологического типа клеток, стадии TNM и ядерную градацию по Фурману. От каждого пациента было получено письменное информированное согласие на забор биологических жидкостей и тканей и участие в научных исследованиях. Протокол исследования получил одобрение Комитета по этике исследований Института биохимии и генетики — обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук. Клинико-патологические характеристики индивидов, включенных в исследование, представлены в таблице 8. Высокопроизводительное профилирование экспрессии микроРНК с использованием панели TaqMan OpenArray Human MicroRNA было проведено на группе из 46 пациентов с РПЖ. На этапе валидации мы включили 39 пациентов с РПЖ, которые соответствовали критериям включения, такие как гистологически

подтвержденный диагноз РПЖ и минимум 80% опухолевых клеток в каждом образце опухоли. Были собраны клинические данные, такие как возраст, стадия TNM, гистологический тип, уровень ПСА, шкала Глисона и степень Фурмана. Кроме того, эти пациенты не получали химиотерапию или лучевую терапию до взятия образцов тканей. Для участия в исследовании не было никаких ограничений по возрасту, этническому происхождению или стадии злокачественного процесса.

Таблица 8 – Клинико-патологические характеристики пациентов с РПЖ, включенных в исследование

| | Скринирующий этап (n = 46) | Валидация (n = 39) |
|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Возраст, среднее (диапазон) | 65 (56–75) | 63 (52–70) |
| Градация по Фурману | | |
| 2 | 20 | 19 |
| 3–4 | 26 | 20 |
| TNM | | |
| I–II | 23 | 21 |
| III–IV | 23 | 18 |
| Метастазы | 10 | 8 |
| ПСА, среднее (диапазон) | 16.02 (0.27–75.04) | 14.3 (2.04–56.11) |
| Шкала Глисона | | |
| <8 | 28 | 23 |
| ≥8 | 18 | 16 |

Рак предстательной железы (РПЖ) является вторым наиболее распространенным раком у мужчин, заболеваемость которого постоянно растет. Существует несколько методов диагностики и скрининга РПЖ, в том числе анализ крови на простатспецифический антиген (ПСА). Хотя этот тест снижает смертность от РПЖ, он связан с гипердиагностикой, что приводит к ненужным биопсиям и лечению. Другие диагностические методы включают пальцевое ректальное исследование, трансректальное ультразвуковое исследование и биопсию с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ). К сожалению, зачастую даже при проведении биопсии нет абсолютной уверенности в том, что РПЖ будет обнаружен. Более того, несмотря на достаточно широкий спектр доступных методов, не разработано ни подходов, ни маркеров, позволяющих достоверно отличить медленно прогрессирующие формы РПЖ от агрессивных [8]. Существует ряд исследований, посвященных поиску маркеров для дифференциации заболевания на основе неинвазивной жидкостной биопсии [9; 10; 11], включая профилирование мРНК в моче. Например, уровни мРНК HOXC6 и DLX1 в сочетании с клиническими данными пациентов и факторами риска могут лучше стратифицировать пациентов по риску и идентифицировать пациентов с РПЖ высокой степени злокачественности [12]. Кроме того, было показано, что анализ экспрессии химерного гена TMPRSS2:ERG в моче в сочетании с уровнем ПСА3 может предсказать как наличие РПЖ, так и РПЖ высокой степени злокачественности при биопсии [13].

Данных об анализе экспрессии микроРНК в тканях РПЖ представлены в литературе достаточно широко, однако их результаты противоречивы и ограничены. Кроме того, Волго-Уральский регион остается неизученной областью в отношении профиля экспрессии микроРНК у пациентов с РПЖ. Чтобы восполнить этот пробел, мы провели комплексное исследование по скринингу экспрессии микроРНК, используя микрочипы на тканях аденокарциномы простаты, полученных во время простатэктомии, а также на нормальных тканях. В этом исследовании рассматривается стадия заболевания и степень его прогрессирования с целью выявления микроРНК, играющих решающую роль в патогенезе РПЖ и прогрессировании заболевания.

На скринирующем этапе с помощью микрочипов в тканях, полученных от пациентов с РПЖ на ранней (I–II TNM) и поздней (III–IV TNM) стадиях, было проанализировано 754 микроРНК (по 23 образца в каждой группе), и идентифицировано пять дифференциально экспрессируемых микроРНК. Было обнаружено, что уровни экспрессии микроРНК-324-3p, микроРНК-429, микроРНК-570 и микроРНК-616 снижены у пациентов с раком на ранней стадии по сравнению с пациентами с раком на поздней стадии. Напротив, экспрессия микроРНК-423-5p была повышена у пациентов с раком на ранней стадии (таблица 9). Тепловая карта наблюдаемых результатов представлена на рисунке 1.

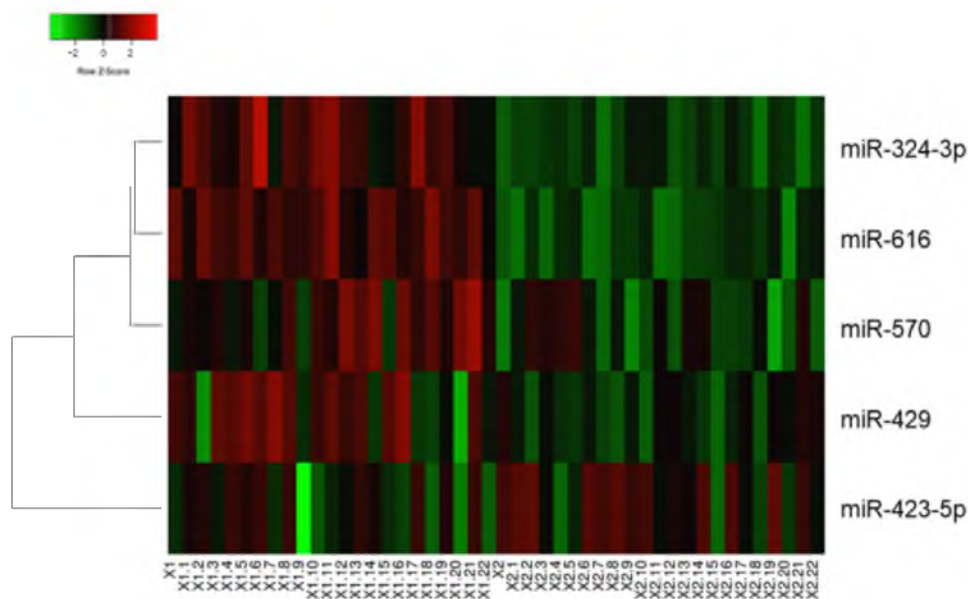


Рисунок 1 – Тепловая карта дифференциально экспрессирующихся микроРНК, идентифицированных на этапе скрининга. Группа X1-X1.22 включала ткани рака предстательной железы на поздней стадии, а группа X2-X2.22 включала ткани рака предстательной железы на ранней стадии

Таблица 9 – Уровни дифференциально экспрессирующихся микроРНК скринирующего этапа исследования

| МикроРНК | Fold Change | P _{FDR} -Value |
|-----------------|-------------|-------------------------|
| микроРНК-324-3р | 0.67 | <0.0001 |
| микроРНК-616 | 0.48 | <0.0001 |
| микроРНК-570 | 0.82 | 0.0006 |
| микроРНК-429 | 0.39 | 0.0021 |
| микроРНК-423-5р | 1.80 | 0.0145 |

Пять микроРНК, обнаруженные дифференциально экспрессирующиеся на этапе скрининга, были дополнительно проанализированы на независимой выборке образцов (n = 39), собранных у пациентов с РПЖ. Уровни экспрессии микроРНК-324-3р, микроРНК-429, микроРНК-570 и микроРНК-616 оставались значительно сниженными в тканях РПЖ на ранних стадиях по сравнению с тканями на поздних стадиях. Однако микроРНК-423-5р не показала существенной разницы между сравниваемыми группами (рисунок 2).

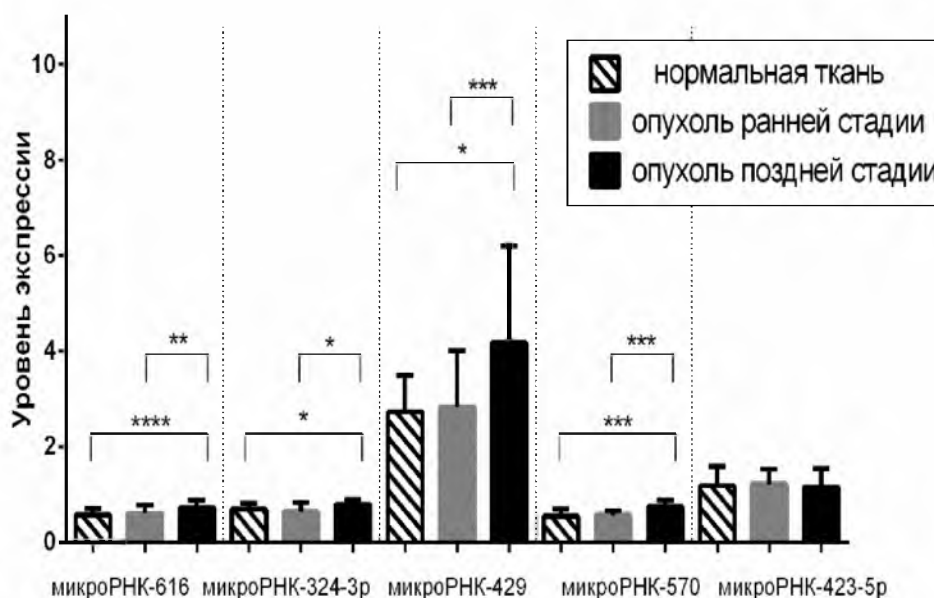


Рисунок 2 – Анализ экспрессии микроРНК в нормальной ткани предстательной железы, а также на ранних и поздних стадиях TNM в тканях опухоли РПЖ в группе валидации. Значения р рассчитывали с использованием критерия Манна-Уитни и t-критерия в зависимости от результатов теста на нормальность (*, p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001).

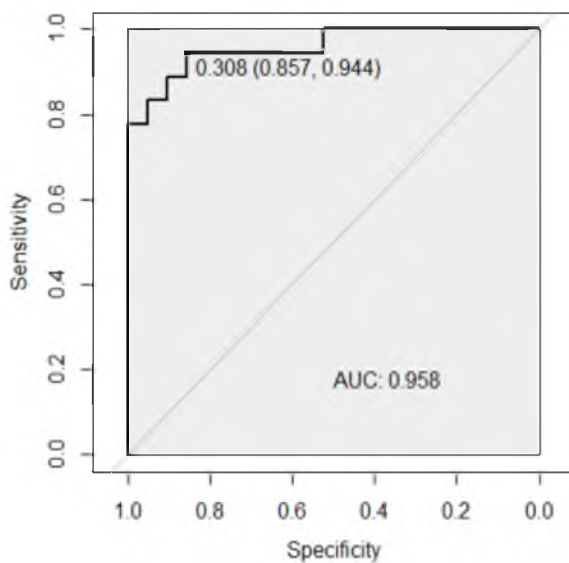
Столбцы представлены медианой и интерквартильным размахом

Оценка вероятности различия четырех валидированных микроРНК и клинических предикторов проводилась с использованием анализа логистической регрессии с последующим ROC-анализом (таблица 10). Показано, что лучшая модель с самой высокой AUC (0,958) включала

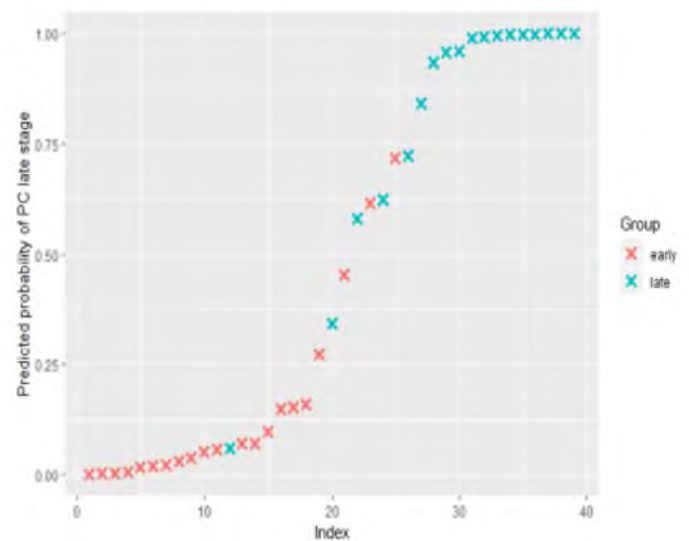
три микроРНК, уровни ПСА и баллы шкалы Глисона и продемонстрировала чувствительность, равную 0,857, и специфичность, равную 0,944. Положительная прогностическая ценность, отрицательная прогностическая ценность и количество правильно классифицированных случаев представлены в таблице 11. Кроме того, текущая модель имеет высокую возможность прогнозирования стадии опухолей простаты, как показано на рисунке 3.

Таблица 10 – Результаты анализа логистической регрессии, включающей все исследуемые предикторы

| | Estimate | Std. Error | z Value | Pr (> z) |
|---------------|------------|------------|---------|-----------|
| (Intercept) | -35.419466 | 12.487824 | -2.836 | 0.00456 |
| miR.616 | 0.009438 | 0.042614 | 0.221 | 0.82473 |
| miR.324 | 3.047531 | 1.291730 | 2.359 | 0.01831 |
| miR.570 | 5.923752 | 3.640018 | 1.627 | 0.10365 |
| PSA | 6.618535 | 4.263967 | 1.552 | 0.12061 |
| Gleason_score | 8.181656 | 3.991785 | 2.050 | 0.04040 |



(a)



(б)

Рисунок 3 – (а) Кривая ROC, отражающая уровень значимости комбинации предикторов, включая уровень экспрессии трех микроРНК, уровни ПСА и баллов шкалы Глисона для различения стадий РПЖ. (б) Прогнозируемая вероятность модели определить стадию опухолевого процесса наряду с фактическим статусом. ROC – рабочая характеристика приемника; AUC – площадь под кривой; early — ранние стадии рака предстательной железы, late — поздние стадии рака предстательной железы

Таблица 11 – Предсказательные характеристики модели, основанной на комбинации экспрессии микроРНК, уровней ПСА и шкале Глисона

| | Ранняя стадия | Не ранняя (поздняя) стадия | Итого строке | поПрогностическая значимость |
|--------------------|---------------|----------------------------|--------------|------------------------------|
| Положительный тест | 18 | 1 | 19 | PPV = 18/19 (94%) |
| Отрицательный тест | 3 | 17 | 20 | NPV = 17/20 (85%) |

PPV – положительная прогностическая ценность; NPV – прогностическая ценность отрицательного результата; ранняя стадия – ранние стадии рака простаты, поздняя стадия – поздние стадии рака простаты; Положительный результат теста – совокупный прогнозируемый балл ниже порогового значения; Тест отрицательный – совокупный прогнозируемый балл выше порогового значения.

Идентификация переменных, связанных с прогнозом

Многомерный регрессионный анализ Кокса был проведен для выявления наиболее важных переменных, которые могли бы служить прогностической моделью (таблица 12). Было замечено, что наиболее значимые переменные включали оценку Глисона, микроРНК-616 и микроРНК-324.

Таблица 12 – Наиболее яркие переменные, выявленные с помощью многомерного регрессионного анализа Кокса

| Переменная | Coef | HR | HR.95 L | HR.95 H | p |
|----------------|---------|----------|---------|---------|---------|
| ПСА | 0.01355 | 1.01364 | 0.9915 | 1.036 | 0.22904 |
| Оценка Глисона | 1.04361 | 2.83945 | 1.4593 | 5.525 | 0.00212 |
| микроРНК-616 | 2.34229 | 10.405 | 1.6563 | 65.365 | 0.01249 |
| микроРНК-324 | 2.52039 | 12.43345 | 1.6794 | 92.052 | 0.01361 |
| микроРНК-570 | 0.594 | 1.81122 | 0.3964 | 8.275 | 0.44349 |

Далее группа пациентов была разделена на две подгруппы в соответствии с оценкой риска. Индивидуальные оценки риска рассчитывали следующим образом: Оценка риска = $1,01 \times \text{ПСА} + 2,83 \times \text{оценка Глисона} + 10,41 \times \text{уровень экспрессии микроРНК-616} + 12,43 \times \text{уровень экспрессии микроРНК-324} + 1,81 \times \text{уровень экспрессии микроРНК-570}$. Медианное значение было выбрано в качестве порогового значения для разделения групп высокого и низкого риска. Кроме того, кривая выживаемости по шкале риска показала, что пациенты с РПЖ с высокой оценкой риска имели плохой прогноз ($p = 0,0087$, рисунок 4).

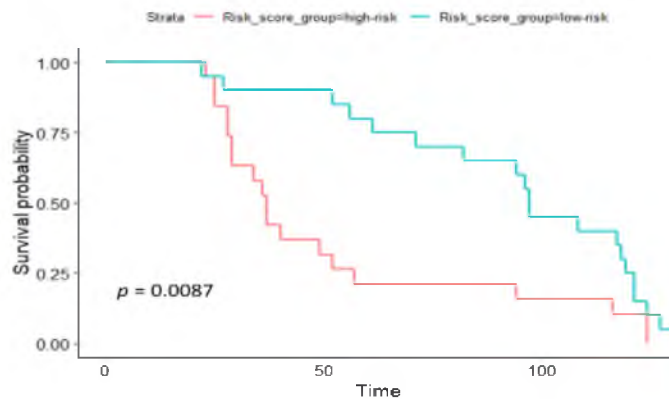


Рисунок 4 – Прогностическая модель для прогнозирования выживаемости при РПЖ. Кривая выживаемости Каплана-Мейера показывает выживаемость в группе высокого и низкого риска.

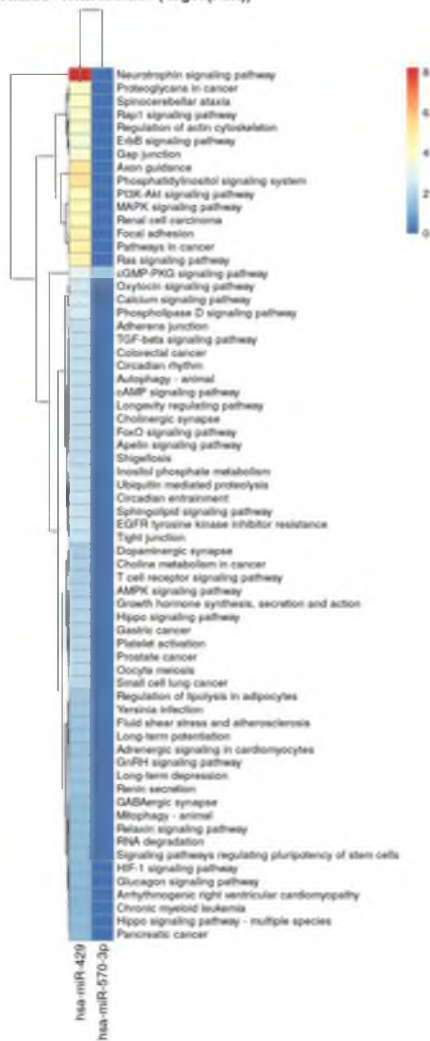
« p » — это значение p лог-рангового теста. Группы высокого (*high-risk*) и низкого (*low-risk*) риска разделены в зависимости от значения показателя риска. *Survival probability* – вероятность выживания; *Time* – время в месяцах

Анализ обогащения путей

Для четырех валидированных микроРНК были проанализированы их гены-мишени с использованием ShinyGo, String и miRPath v.4.0 из ресурсов Diana Tools. Анализ miRPath с использованием алгоритма microT-CDS (способ объединения результатов - объединение путей) продемонстрировал 67 путей KEGG с потенциальными мишенями изучаемых микроРНК для объединения путей (рис. 5a) и 71 путь KEGG для объединения генов (рис. 5b). Следующий анализ miRPath был выполнен на основе Tarbase v8.0 — базы данных экспериментально подтвержденных взаимодействий микроРНК:ген. Было показано, что изученные мишени микроРНК включают 42 пути объединения путей и 66 путей метода слияния объединений генов, включая сигнальный путь PI3K-Akt и сигнальный путь p53, которые чрезвычайно важны в патогенезе рака (рисунки 6a, б). Интересно, что наиболее существенный вклад в обогащение внесли гены-мишени микроРНК-429 и микроРНК-324-3p.

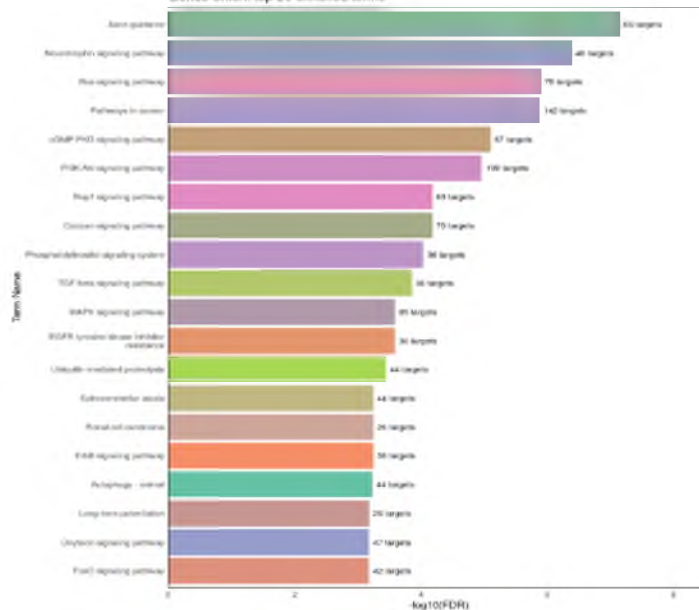
Для дальнейшего анализа мы выбрали набор из 32 генов-мишеней пути развития рака простаты, представленных в каждом анализе обогащения (Tarbase и microT-CDS) (рисунок 7). Как видно из иерархического дерева кластеризации корреляции путей (рисунок 8), наиболее значимые кластеры включали путь рака простаты, пути рака и сигнальный путь PI3K-Akt. Анализ STRING PPI обогащения (значение $p = 1,0 \times 10^{-16}$) продемонстрировал, что члены этого набора генов в определенных комбинациях являются участниками 150 путей (рисунок 9). Тридцать один из них входит в список путей развития рака простаты со значением $p = 2,91 \times 10^{-66}$ и степенью обогащения 2,3.

Pathways Union
significant miRNA-Term clusters (-log₁₀(FDR))



(a)

Genes Union: top 20 enriched terms



(b)

Рисунок 5 – Тепловая карта с кластерами целевых путей базы данных KEEG, включающих изучаемые гены-мишени микроРНК (на основе алгоритма microT-CDS): (a) — метод слияния объединений путей; (б) – метод слияния объединений генов

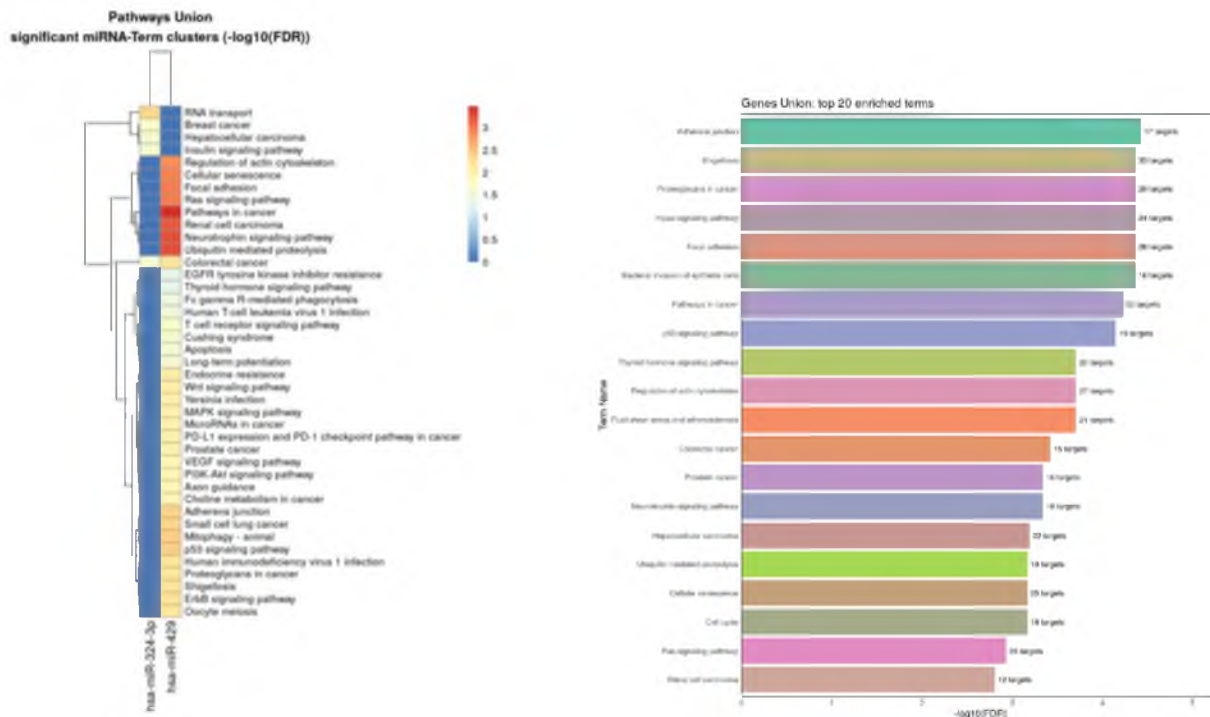


Рисунок 6 – Тепловая карта с кластерами целевых путей базы данных KEEG, включающих изучаемые гены-мишени микроРНК (на основе алгоритма Tarbase): (а) — метод слияния объединений путей; (б) – метод слияния объединений генов

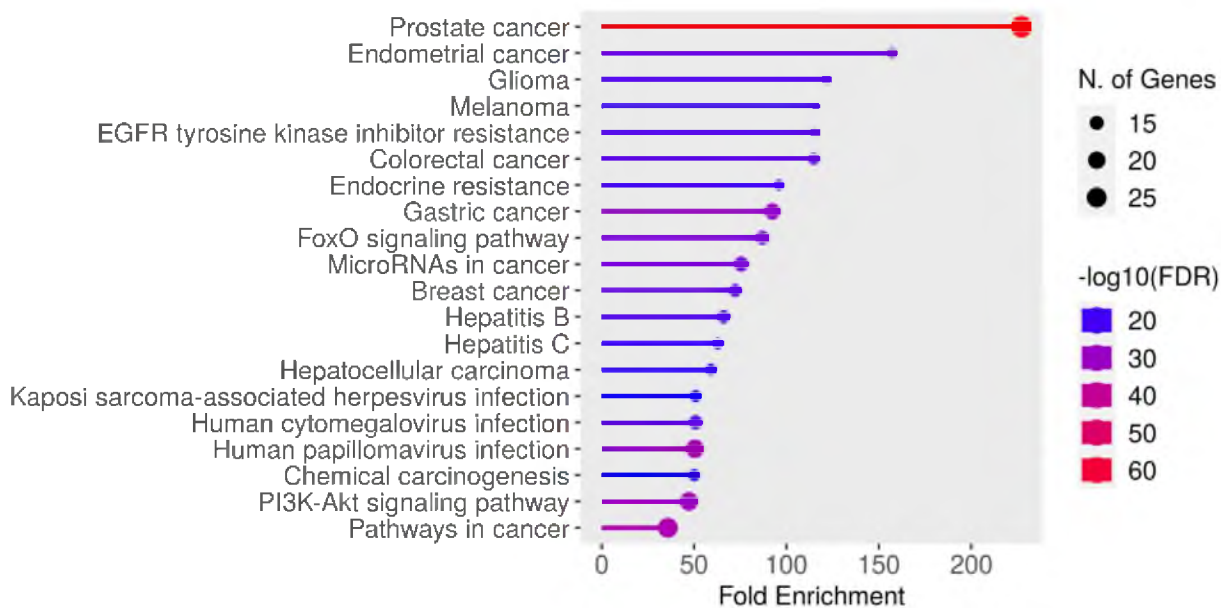


Рисунок 7 – 20 основных путей генов рака предстательной железы по результатам обогащения ShinyGo. N. of Genes — количество генов

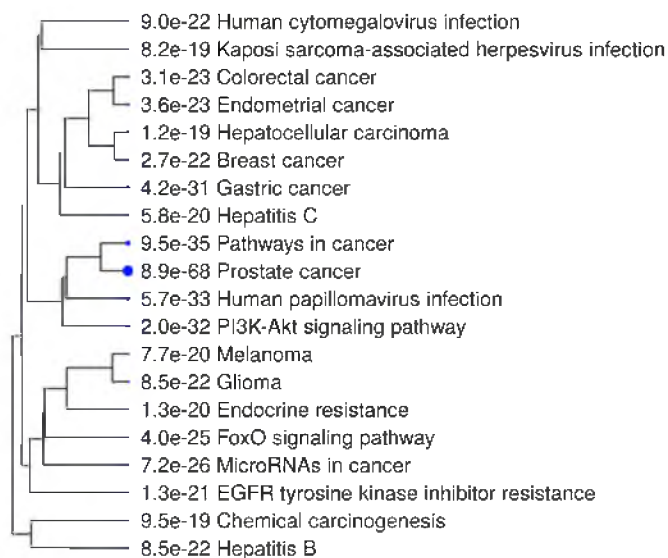


Рисунок 8 – Иерархическое дерево кластеризации, суммирующее корреляцию между значимыми путями изученных генов-мишеней. Пути со многими общими генами сгруппированы вместе. Большие точки указывают на более значимые значения p

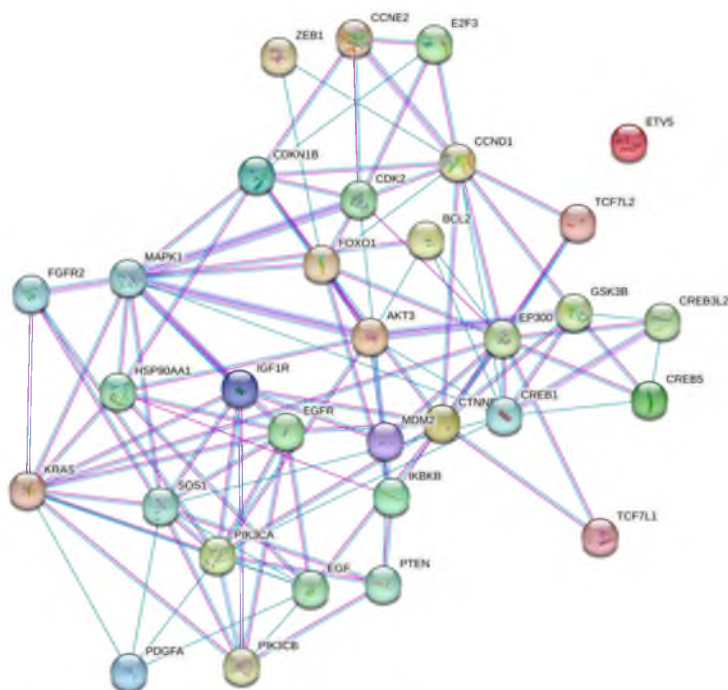


Рисунок 9 – График узлов STRING одиннадцати генов-мишеней микроРНК-429

Места этих генов в молекулярных процессах развития рака простаты представлены на рисунке 10. Кроме того, по данным WikiPathways, 13 генов участвуют в регуляции микроРНК сигнальных путей рака простаты (p-значение $2,98 \times 10^{-6}$; сила = 2.49).

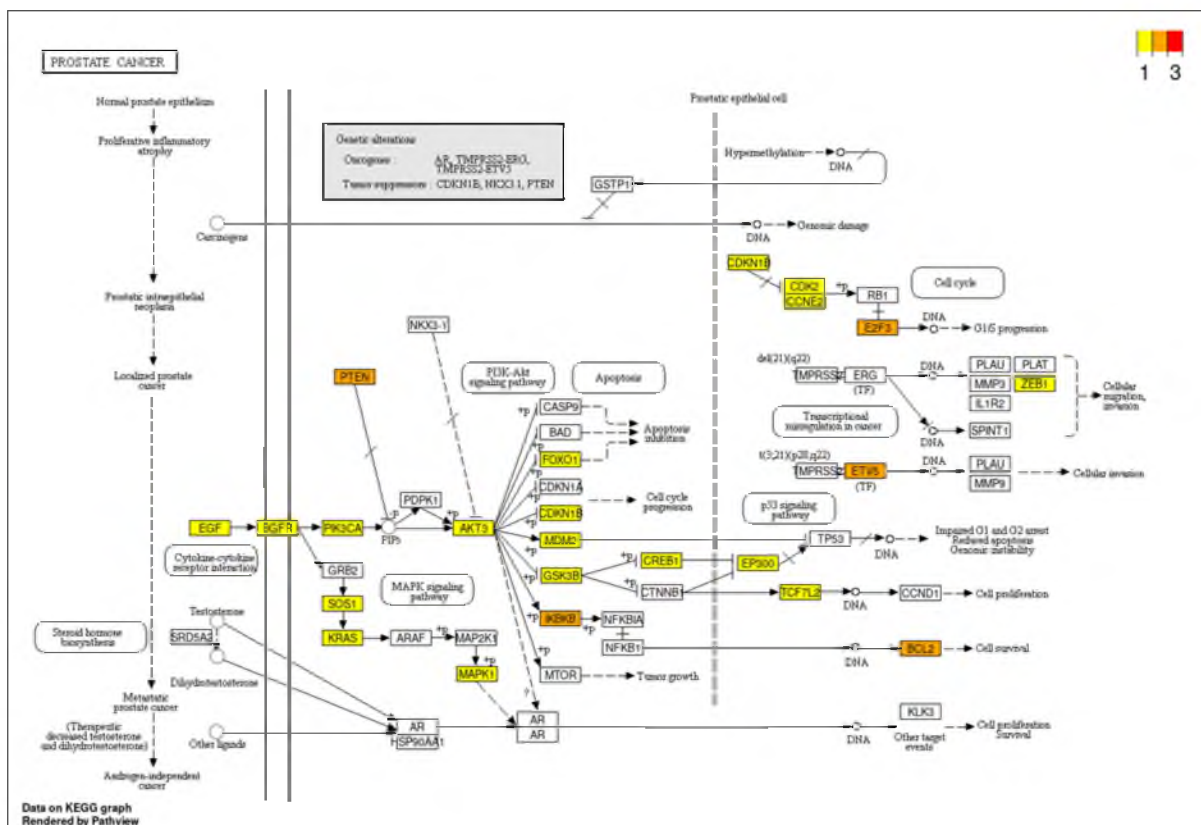


Рисунок 10 – Схематическое изображение молекулярных процессов рака простаты на основе данных KEGG. Гены, идентифицированные как мишени микроРНК-429, выделены цветом: желтым — мишень одной микроРНК, оранжевым — мишень двух микроРНК и красным — мишень трех микроРНК

Анализ экспрессии генов-мишеней микроРНК на основе данных TCGA

С целью идентификации дифференциально экспрессируемых генов-мишеней изучаемых микроРНК мы провели биоинформатический анализ данных TCGA для РПЖ (проект PRAD). Для анализа были отобраны пациенты европейской популяции, анализ включал два сравнения: 1 — нормальные образцы против локализованного РПЖ (N vs. LPCa; самая ранняя стадия, представленная в проекте), 2 — нормальные образцы против локализованного РПЖ + местно-распространенный РПЖ при отсутствии лимфогенного метастазирования (стадия N0; N vs. LPCa + LAPCa). Размер выборки при сравнении N и LPCa составил 40 парных образцов (нормальный/опухоль), а сравнение N и LPCa + LAPCa – 74 парных образцов (нормальный/опухоль). Далее гены-мишени, демонстрирующие отрицательную корреляцию с экспрессией микроРНК, были подвергнуты анализу обогащения с использованием онлайн-инструмента ShinyGO. Полученные результаты анализа обогащения представлены на рисунке 11 и рисунке 12 для групп N по сравнению с LPCa и N по сравнению с LPCa + LAPCa соответственно. Для группы сравнения нормальных тканей простаты и локализованного РПЖ только один путь был обогащен — сигнальный путь Wnt, который включает пять генов-мишеней из списка из

восемьдесят шесть генов-мишеней из TCGA. Анализ обогащения групп сравнения нормальных тканей по сравнению с локализованным РПЖ + местно-распространенным РПЖ с отсутствием лимфогенных метастазов показал 12 значительно обогащенных путей и в общей сложности 20 обогащенных путей. Как видно, большинство выявленных путей относятся к развитию рака.

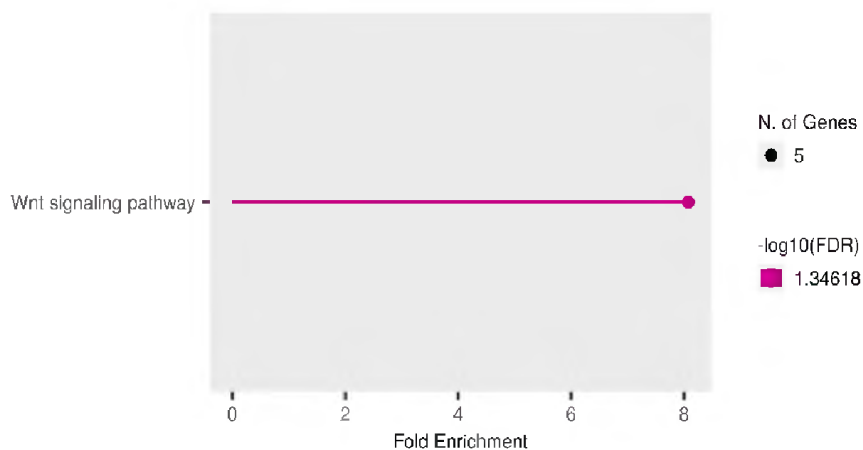


Рисунок 11 – Анализ путей обогащения для генов-мишеней микроРНК-324-3р, микроРНК-616, микроРНК-570 и микроРНК-429 на основе сравнения образцов N и LPCa. Целевые гены с более чем двукратным изменением экспрессии были включены в анализ обогащения с использованием инструментов ShinyGo. N. of Genes — количество генов, участвовавших в пути

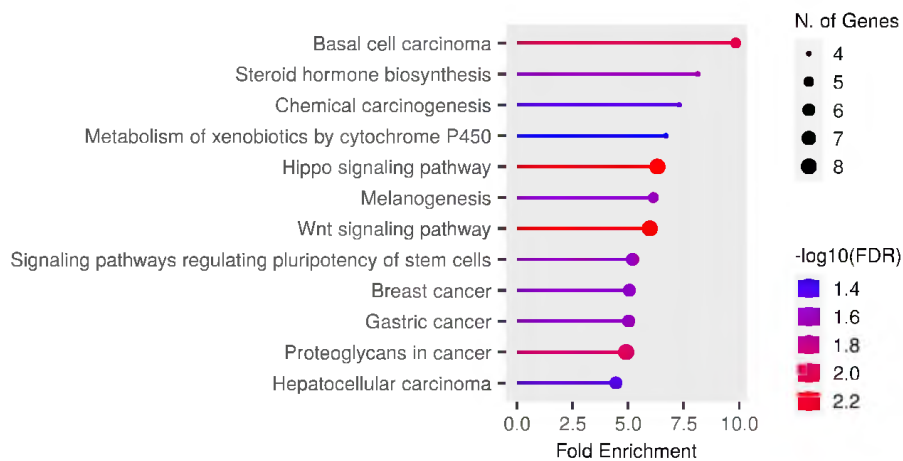


Рисунок 12 – Пути обогащения целевых генов с пониженной регуляцией микроРНК-324-3р, микроРНК-616, микроРНК-570 и микроРНК-429 на основе сравнения образцов N и LPCa + LAPCa. Целевые гены с более чем двукратным изменением экспрессии были включены в анализ обогащения с использованием инструментов ShinyGo. N. of Genes — количество генов, участвовавших в пути

В последние десятилетия роль микроРНК в заболеваниях человека, особенно при злокачественных опухолях, привлекает все больше внимания. Для РПЖ было идентифицировано множество микроРНК, регулирующих его онкогенез и метастазирование, действуя как онкогены или супрессоры опухолей. В метаанализе 104 статей, охватывающих несколько стран и преимущественно пациентов европеоидной расы, различные типы образцов (ткани, сыворотка,

плазма, моча) подвергались анализу экспрессии микроРНК с использованием qRT-PCR и микрочипов. Этот анализ выявил 22 дифференциально экспрессированных микроРНК при РПЖ, при этом микроРНК-125b, микроРНК-205, микроРНК-1 и микроРНК-23b показали наибольшую диагностическую эффективность. Повышенные уровни микроРНК-10b, микроРНК-100, микроРНК-106b, микроРНК-133b, микроРНК-150, микроРНК-191, микроРНК-301a, микроРНК-449b, микроРНК-663 и микроРНК-1207-3р коррелируют со снижением безрецидивной выживаемости, тогда как низкие уровни микроРНК-23a/b, микроРНК-27b, микроРНК-34b, микроРНК-224, микроРНК-466, микроРНК-709 и let-7b указывали на плохую выживаемость. Кроме того, микроРНК-32 и let-7c отличали метастазы от первичного РПЖ [14].

Другой метаанализ, в котором приняли участие 1371 участник в 10 исследованиях в Польше, Китае и Египте, определил микроРНК-21 как надежный диагностический биомаркер, а микроРНК-30с — как умеренно эффективный диагностический биомаркер РПЖ [15].

Предыдущие исследования показали, что микроРНК-324-3р участвует в регуляции прогрессирования опухоли и ЕМТ при различных видах рака, таких как рак носоглотки, рак желудка, гепатоцеллюлярная карцинома и плоскоклеточный рак легких. Однако роль микроРНК-324-3р в клетках РПЖ остается неизвестной. Например, было обнаружено, что микроРНК-324-3р ингибирует пролиферацию и инвазию клеток карциномы носоглотки посредством негативной регуляции гена, кодирующего белок цинковых пальцев *GLI3*, причем ее экспрессия отрицательно связана с канцерогенезом, прогрессированием и прогнозом рака [16]. В настоящем исследовании мы обнаружили, что уровень экспрессии микроРНК-324-3р снижается при раке простаты на ранней стадии по сравнению с опухолями на поздних стадиях. Ранее было показано, что микроРНК-324-3р может регулировать экспрессию онкогена *WNT2B*. Было высказано предположение, что *WNT2B*, как член семейства белков *WNT2*, играет критическую роль в каноническом сигнальном пути *Wnt/β-катенин* и влияет на прогрессию различных злокачественных опухолей. Более того, регуляторная ось *lncRNA SNHG7/miR-324-3p/WNT2B* была предложена в качестве новой терапевтической мишени при раке предстательной железы [17]. Однако было показано, что микроРНК-324-3р сверхэкспрессируется в опухолевых тканях по сравнению с соседними нормальными тканями в клетках рака желудка, что сопровождается усилением роста клеток, миграцией и снижением апоптоза. В этом случае наблюдалось, что микроРНК-324-3р подавляла экспрессию *Smad4*, а потеря *Smad4* активировала сигнальный путь *Wnt/β-катенин* [18].

При раке предстательной железы также была продемонстрирована онкогенная роль микроРНК-616; в частности, было показано, что микроРНК-616 является мишенью кольцевой РНК *hsa_circ_0007494*, которая действует как «молекулярная губка» для микроРНК-616 и, следовательно, активирует мишень микроРНК-616, *PTEN* [19]. Кроме того, для микроРНК-616 было высказано предположение, что роль губки может выполнять другая кольцевая РНК

circ_0000673. Было показано, что нокдаун circ_0000673 может снижать экспрессию PTEN и увеличивать экспрессию p13K и p-AKT [20]. С другой стороны, было замечено, что при раке молочной железы микроРНК-616 может ингибировать рост и миграцию опухолевых клеток путем подавления экспрессии c-MYC, демонстрируя роль супрессора опухоли [21].

МикроРНК-570 также демонстрирует неоднозначное значение для онкогенеза. Имеются некоторые данные о подавляющей роли микроРНК-570, например, при раке толстой кишки, где была продемонстрирована низкая экспрессия микроРНК-570 в тканях рака толстой кишки, что указывает на ее корреляцию с плохой общей выживаемостью, плохой безрецидивной выживаемостью и неблагоприятные онкологические показатели выживаемости [22]. Супрессорная роль микроРНК-570 была также продемонстрирована при гепатоцеллюлярном раке, где мимики микроРНК-570 снижали рост опухоли и увеличивает соотношение CD8+IFN- γ + Т-клеток [23]. Напротив, было показано, что микроРНК-570-3p способствует развитию опухоли при раке яичников. Предполагается, что активность микроРНК-570 регулируется кольцевой РНК (circ_0007444), а PTEN идентифицирован как ген-мишень микроРНК-570 [24].

МикроРНК-429 является членом семейства микроРНК-200 и расположена на хромосоме 1p36. Показано, что снижение уровня микроРНК-429 может остановить клеточный цикл рака простаты в фазе G1, что предполагает потенциальную роль микроРНК-429 в пролиферации рака простаты [25]. Повышение регуляции микроРНК-429 было показано в клетках карциномы эндометрия, и PTEN был предложен в качестве возможной мишени этой микроРНК [26]. Было показано, что при кастрационно-резистентном раке простаты уровень сывороточной микроРНК-429 повышается, что коррелирует с плохой общей выживаемостью [27]. Более того, сверхэкспрессия микроРНК-429 и других членов семейства микроРНК-200 (микроРНК-200a/b/-429) вызывала радиосенсибилизирующий эффект в опухолевых ксенотрансплантатах рака простаты, а микроРНК-200a/b/- Понижение регуляции 429, по-видимому, предсказывает радиорезистентность опухоли, опосредованную клеточной адгезией [28].

Таким образом, ни один из маркеров сам по себе не обладает высокой специфичностью и чувствительностью; поэтому для диагностики и прогноза заболеваний часто используют тест-системы, содержащие различные маркеры. Поэтому особенно важно сосредоточить внимание не только на ПСА и шкале Глисона, но и на других типах молекулярных маркеров, которые могут поддержать молекулярную классификацию РПЖ. По результатам, полученным в настоящем исследовании, можно предположить, что микроРНК-324-3p, микроРНК-570 и микроРНК-616 в сочетании с ПСА и шкалой Глисона играют роль в развитии и прогнозе рака простаты. Необходимы дальнейшие расширенные исследования для установления связи между активностью этих микроРНК и механизмами патогенеза рака предстательной железы.

2.2 Идентификация генетических и эпигенетических маркеров риска развития аллергических заболеваний

Исследование генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, у больных бронхиальной астмой

Бронхиальная астма (БА) представляет собой гетерогенное заболевание, характеризующееся хроническим воспалением дыхательных путей [29], в мире насчитывается более 300 миллионов больных с данной патологией. БА развивается при взаимодействии генетических, эпигенетических и экологических факторов [30], наследуемость данного заболевания достигает до 74 % у взрослых и до 90% у детей [31].

Воспаление дыхательных путей является основным патогенетическим звеном, определяющим развитие и течение БА. По международным стандартам в настоящее время ингаляционные глюкокортикостероиды (ИГКС) являются самыми эффективными препаратами базисной терапии БА. На молекулярном уровне действие ИГКС проявляется в модуляции активности генов, кодирующих белки, вовлеченные в формирование эпителиального барьера дыхательных путей, нарушение транскрипции некоторых генов, участвующих в развитии воспаления. Внедрение ГКС в широкую практику лечения больных БА привело к снижению тяжелых форм аллергопатологии, улучшению качества жизни больных [29]. Известно, что функциональная активность генов, участвующих в метаболизме противоастматических препаратов, во многом связана с ключевыми звеньями патогенеза БА. В частности, гены, участвующие в метаболизме ГКС, кодируют специфические рецепторы, регулирующие воспаление, пролиферацию и дифференцировку клеток (*NR3C1*), белки, участвующие на различных этапах биосинтеза медиаторов воспаления (*CMTR1*, *CRHR1*, *TBX21* и др.). В ряде исследований генов-кандидатов, а также GWAS выявлены ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ГКС, с развитием БА и чувствительностью пациентов к лечению ГКС (*GLCC11*, *ALLC*, *FBXL7*, *TBXT* и др.), однако, в то же время часто отмечаются значительные различия в полученных данных, которые во многом определяются этническим происхождением исследуемых групп.

Показано, что генетическая архитектура многофакторных заболеваний, в том числе БА, включает в себя определенное число полиморфных вариантов, которые действуют кумулятивно и управляют общим риском развития патологии [32]. Полигенные шкалы риска (PGS), созданные с использованием современных биоинформатических подходов на основе взвешенной суммы количества аллелей, связанных с риском развития признака, можно использовать в качестве панелей генетических маркеров для оценки индивидуального риска развития определенного фенотипа заболевания [33; 34]. При построении шкал полигенного риска в анализ предлагается включать большое число полиморфных вариантов, а не только те, которые достигли уровня

полногеномной значимости при GWAS [35]. К настоящему моменту построен ряд PGS-моделей риска развития БА, однако, они характеризуются невысокой прогностической ценностью для оценки риска развития заболевания и являются более подходящими лишь для основной исследуемой группы [36; 37; 38].

С другой стороны, одним важнейших направлений современных исследований БА является изучение влияния механизмов эпигенетической регуляции генов на развитие аллергических заболеваний. Эпигенетические изменения определяются как химические модификации генома, влияющие на экспрессию генов. Эпигенетические изменения включают такие механизмы как метилирование ДНК, модификации гистонов, а также изменения в некодирующих РНК [30].

Метилирование ДНК представляет собой добавление метильной группы к цитозину в положении 5 цитозинового кольца с образованием 5-метилцитозина при участии фермента ДНК-метилтрансферазы [39]. Метилирование ДНК регулирует экспрессию генов и обеспечивает стабильность генома. Метилирование ДНК в промоторах и других цис-регуляторных последовательностях может препятствовать связыванию транскрипционных факторов способствуя подавлению экспрессии генов. Во время внутриутробного развития и после рождения метилирование ДНК продолжает играть ключевую роль в клеточной детерминации и дифференцировке. Поскольку дыхательная система обычно подвергается воздействию раздражителей окружающей среды эпигеном клеток дыхательных путей склонен к динамическим изменениям, которые в конечном итоге могут повлиять на экспрессию генов [40]. Выполнено более 10 полноэпигеномных исследований БА в ходе которых выявлено более 14,5 тысяч дифференциально метилированных CpG сайтов, ассоциированных с развитием данного заболевания, локализованных в том числе в генах, участвующих в формировании иммунного ответа, функционировании эпителиального барьера, метаболизме противоастматических препаратов и др. (<https://ngdc.cncb.ac.cn/ewas/atlas>). Однако, в России проведено лишь несколько работ, посвященных анализу роли метилирования ДНК в формировании аллергопатологий [41; 42; 43].

В рамках данного проекта нами проведено исследование полиморфных локусов генов, участвующих в метаболизме ГКС, у больных БА и здоровых индивидов, проживающих в Республике Башкортостан (РБ).

В работе использованы образцы ДНК 561 неродственного больного БА в возрасте от 3 до 67 лет. Обследованные проходили лечение в детском отделении Клиники Башкирского государственного медицинского университета (БГМУ), в пульмонологическом и аллергологическом отделениях Городской клинической больницы № 21 г. Уфы. Диагноз БА устанавливался в соответствии с критериями GINA и отечественных программных документов по диагностике, лечению и профилактике БА [44]. Состав больных по этнической принадлежности

был следующим: русские – 174, татары – 142, башкиры – 105, смешанной – 140. Контролем служила группа из 504 практически здоровых лиц (194 русские, 145 татары, 86 башкиры, 79 смешанной этнической принадлежности) без признаков аллергических заболеваний и отягощенной наследственности, в возрасте от 2 до 67 лет, сопоставимых по возрасту и полу с группой больных.

Работа выполнена с использованием современных методов молекулярно-генетического исследования. Выделение ДНК из крови проведено методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфных вариантов генов выполнено методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентной детекцией (FLASH/RTAS) (ООО «ТестГен») согласно протоколам фирм-производителя (CFX96, Bio-Rad, США). Образцы ДНК, используемые для анализа метилирования, подвергнуты бисульфитной конверсии набором EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, США). Оценка уровня метилирования промоторной области гена *GLCCII* (GRCh38:7:7969920-7970072) выполнена методом MS-HRM (Methylation-Sensitive High Resolution Melting) на приборе LightCycler® 96 Roche (Roche, Германия). Бисульфит-конвертированные образцы метилированной (100%) и неметилированной ДНК (0%, Zymo Research, США) использованы для получения кривых плавления стандартных контролей по уровню метилирования. Контрольные стандарты метилированной и неметилированной ДНК (100%/0%) смешаны в определенном процентном соотношении (0/100, 5/95, 10/90, 25/75, 50/50, 75/25, 90/10, 100/0), вследствие чего уровень метилирования контрольных образцов соответственно равен 0%; 5%; 10%; 25%, 50%, 75%, 90% и 100%. Степень метилирования определена относительно кривых плавления стандартных контролей по метилированию, заданных в протоколе прибора LightCycler® 96 Roche как авто стандарты (Auto standard Curve). Результаты MS-HRM подтверждены секвенированием бисульфит-конвертированной ДНК на приборе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США).

Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием пакета программ статистического анализа PLINK 1.09, с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Для проверки соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению по закону Харди-Вайнберга использовался критерий χ^2 . При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля применялся критерий χ^2 для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность. В случае наличия достоверных отличий в исследуемых выборках проводилась оценка показателя отношения шансов (Odds Ratio, OR), а также границ его 95% доверительного интервала (CI95%).

За текущий отчетный период нами был проведен анализ литературных данных, на основании которого с учетом функциональной значимости и частоты встречаемости в европейских популяциях для настоящего исследования выбран ряд полиморфных вариантов

генов, участвующих в метаболизме ГКС. Характеристика выбранных для исследования полиморфных вариантов генов представлена в таблице 13.

Таблица 13 – Характеристика полиморфных вариантов, выбранных для исследования

| № | Ген | Позиция на хромосоме | № rs | ОМП |
|----|---------------|----------------------|------------|-----------------|
| 1 | <i>ALLC</i> | 2:3675436 | rs11123610 | c.84+1311G>A |
| 2 | <i>NR3C1</i> | 5:143399010 | rs41423247 | c.1184+646C>G |
| 3 | <i>FBXL7</i> | 5:15783487 | rs10044254 | c.128-144403A>G |
| 4 | <i>TBXT</i> | 6:166165782 | rs2305089 | c.530G>A |
| 5 | <i>CMTR1</i> | 6:38156303 | rs2395692 | c.1096-748G>A |
| 6 | <i>GLCC11</i> | 7:7968245 | rs37973 | c.-1106G>A |
| 7 | <i>CRHR1</i> | 17:45818213 | rs242939 | c.241+1631A>G |
| 8 | <i>CRHR1</i> | 17:45834159 | rs1876828 | c.1107+111C>T |
| 9 | <i>CRHR1</i> | 17:45815154 | rs242941 | c.122-1310A>C |
| 10 | <i>TBX21</i> | 17:47733553 | s2240017 | c.99C>G |

В выборке больных БА и контрольной группе из РБ проведено генотипирование десяти полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ГКС. Распределение частот аллелей и генотипов всех анализируемых полиморфных вариантов соответствовало распределению Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). Выполнен анализ ассоциаций исследованных полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ГКС, с риском развития БА в группах индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности.

При сравнительном анализе частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфных локусов в когортах больных БА и контроля русской этнической принадлежности выявлены значительные различия в распределении частот аллелей полиморфных локусов rs10044254 гена белка, содержащего лейцин-богатые повторы и F-box домен *FBXL7* и rs242941 гена кортикотропин-рилизинг-гормона *CRHR1*. У русских обнаружена значительно более высокая частота встречаемости аллеля rs10044254**T* гена *FBXL7* и аллеля rs242941**C* гена *CRHR1* в группе больных БА (78,36% и 73,85%), чем в контроле (69,66%; $p = 0,01$; OR=1,58; 95%CI 1,12-2,22 и 66,4%, $p = 0,03$; OR=1,43; 95%CI 1,04-1,97). По литературным данным, Park H.W. с коллегами выявлена ассоциация генотипа rs10044254**GG* гена *FBXL7* с более низкой чувствительностью к использованию ИГКС у больных БА европейского происхождения [45]. В ряде работ показана ассоциация аллеля rs242941**A* гена *CRHR1* с более низкими значениями показателей спирометрии и более высокой частотой обострений БА у индивидов европейского происхождения [46; 47; 48].

При анализе частот встречаемости аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ГКС, у индивидов татарской этнической принадлежности выявлена значительно более высокая частота встречаемости аллеля rs37973**C* гена глюкокортикоид-индуцированного транскрипта 1 *GLCC11* в общей группе больных БА

(51,1%) и в группе больных с началом БА в детском возрасте (52,73%), чем в контрольной выборке (41,57%; $p=0,05$; $OR=1,46$; 95%CI 1,0-2,17 и $p=0,03$; $OR=1,57$; 95%CI 1,04-2,36). В широком ряде опубликованных работ также показана ассоциация аллеля rs37973**G* и генотипа rs37973**GG* гена *GLCCII* с низкими значениями показателей спирометрии [49 - 54], а также более низкой чувствительностью больных БА к использованию ИГКС [48]. Известно, что ген *GLCCII* экспрессируется в легких и Т-клетках, а экспрессия гена значительно усиливается под действием ГКС [49].

Выполненный нами анализ распределения частот аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов в группах индивидов башкирской этнической принадлежности показал наличие статистически значимых различий между группами больных и контроля по полиморфным вариантам rs2395672 гена метилтрансферазы 1 *CMTR1* и rs2305089 гена транскрипционного фактора *TBXT*. В настоящем исследовании обнаружена значительно более высокая частота аллеля rs2395672**G* гена *CMTR1* и аллеля rs2305089**T* гена *TBXT* у больных БА (83,33% и 53,41%), чем в контрольной группе башкир (73,81%, $p=0,024$; $OR=1,77$; 95%CI 1,08-2,93 и 34,72%; $p=0,02$; $OR=2,16$; 95%CI 1,14-4,09). При GWAS показано, что генотип rs2395672**AA* гена *CMTR1* ассоциирован с более высокой частотой обострений БА у больных, принимающих ИГКС европейского происхождения. Показано значительное снижение уровня экспрессии гена *CMTR1* в клетках бронхоальвеолярного лаважа через несколько недель после случая обострения БА по сравнению с периодом обострения заболевания, что подтверждает возможную роль данного гена в патогенезе БА [55]. В 2012 году в GWAS исследовании пациентов с БА европейского происхождения установлена ассоциация риска развития БА с полиморфными локусами rs3127412 и rs6456042, расположенными на расстоянии 50 т. п. н. от гена *TFT*. Полиморфные локусы rs6456042 и rs312741 находятся в неравновесии по сцеплению с тремя функциональными полиморфными локусами гена *TFT* [56].

На следующем этапе работы нами был выполнен анализ уровня метилирования 7 CpG сайтов, локализованных в промоторной области гена *GLCCII* (GRCh38:7:7969920-7970072) в группах больных БА и контроля из РБ. Выбор данного гена для анализа основан как на литературных данных, свидетельствующих о роли данного гена в патогенезе БА, так и на результатах настоящего исследования, подтверждающего влияние полиморфного локуса гена *GLCCII* на развитие БА у татар. Предполагается, что изменение статуса метилирования гена *GLCCII* оказывает определенное влияние на функционирование Т- или В-лимфоцитов, и, как следствие, прогрессирование БА в целом [57]. Показано, что белок *GLCCII* участвует в реализации каскада взаимодействия глюкокортикоидов с глюкокортикоидным рецептором, оказывая антиапоптотический эффект в отношении Т-клеток [58]. Установлено, что изменение экспрессии мРНК *GLCCII* положительно коррелирует со значениями показателей ОФВ1 у больных БА из Китая, принимающих ИГКС [51]. На мышинной модели БА показано, что у мышей

дикого типа наблюдается более значительное снижение гиперреактивности и степени воспаления дыхательных путей после введения глюкокортикоидов, чем у мышей с дефицитом *GLCCII* [59].

Анализ уровня метилирования промотоной области гена *GLCCII* выполнен с использованием методов метил-чувствительного анализа кривых плавления (MS-HRM) и последующего секвенирования обработанных бисульфитом натрия образцов ДНК. Согласно данным, полученным при MS-HRM-анализе, уровень метилирования в исследуемых группах больных БА и контроля варьирует от 0% до 75% (рисунок 13, таблица 14).

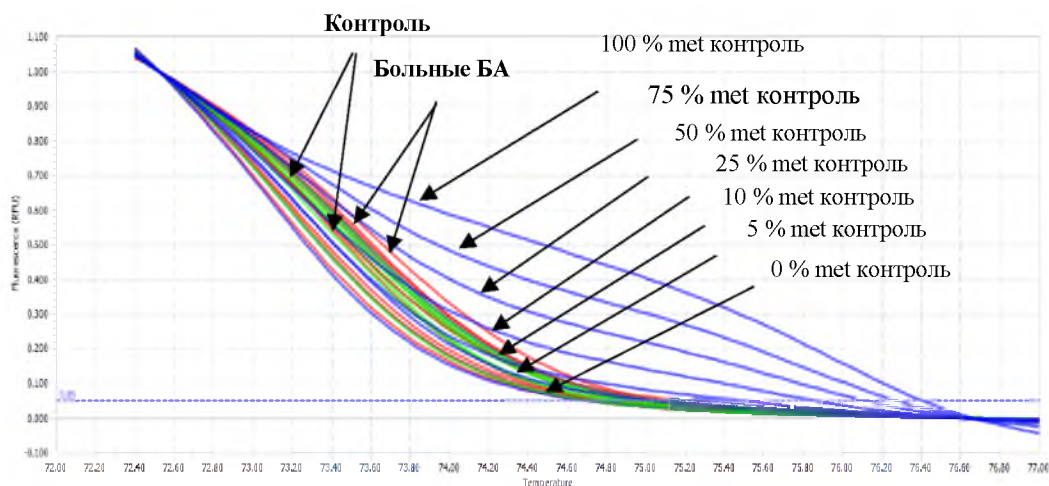


Рисунок 13 – MS-HRM анализ промоторной области гена *GLCCII* в группах больных БА и контроля. Синим цветом обозначены кривые плавления контрольных стандартов с различными уровнями метилирования (0% met, 5% met; 10% met, 25% met, 50% met, 75% met, 100% met); красным цветом – кривые плавления больных БА; зеленым цветом – кривые плавления индивидов из контрольной группы

Таблица 14 – Результаты анализа метилирования промоторной области гена *GLCCII* по данным MS-HRM-анализа

| Уровень метилирования, % | Больные БА | Больные с тяжелой и среднетяжелой БА | контроль |
|--------------------------|------------|---|------------|
| | n (%) | n (%) | n (%) |
| 0 | 1 (0,92) | - | 8 (7,84) |
| 5 | 16(14,68) | 10 (14,93) | 15 (14,71) |
| 10 | 32 (29,36) | 22 (32,84) | 31 (30,39) |
| 25 | 42(38,53) | 21 (31,34) | 39 (38,24) |
| 50 | 18 (16,51) | 14 (20,9) p=0,01, OR=3,1 95%CI 1,22-7,88 | 8 (7,84) |
| 75 | - | - | 1 (0,98) |
| N | 109 | 67 | 102 |

Примечание: N – численности групп; в скобках указана частота встречаемости уровней метилирования у индивидов, p – уровень статистической значимости различий частот встречаемости уровня метилирования между группами больных и контроля, указан при p<0,05; 95%CI – доверительный интервал

При сравнении исследуемых групп больных БА и контроля выявлена значительно более высокая частота встречаемости 50% уровня метилирования у индивидов с тяжелым и среднетяжелым течением БА (20,9%) по сравнению с контрольной выборкой (7,84%; $p=0,01$; $OR=3,1$; 95%CI 1,22-7,88). Для подтверждения результатов, полученных при MS-HRM, проведено секвенирование обработанных бисульфитом натрия образцов ДНК больных БА и контрольных стандартов по метилированию.

Результаты анализа подтверждает выявленный при MS-HRM 45%-50% уровень метилирования CpG сайтов исследуемой промоторной области гена *GLCC11* у больного БА (рисунок 14).

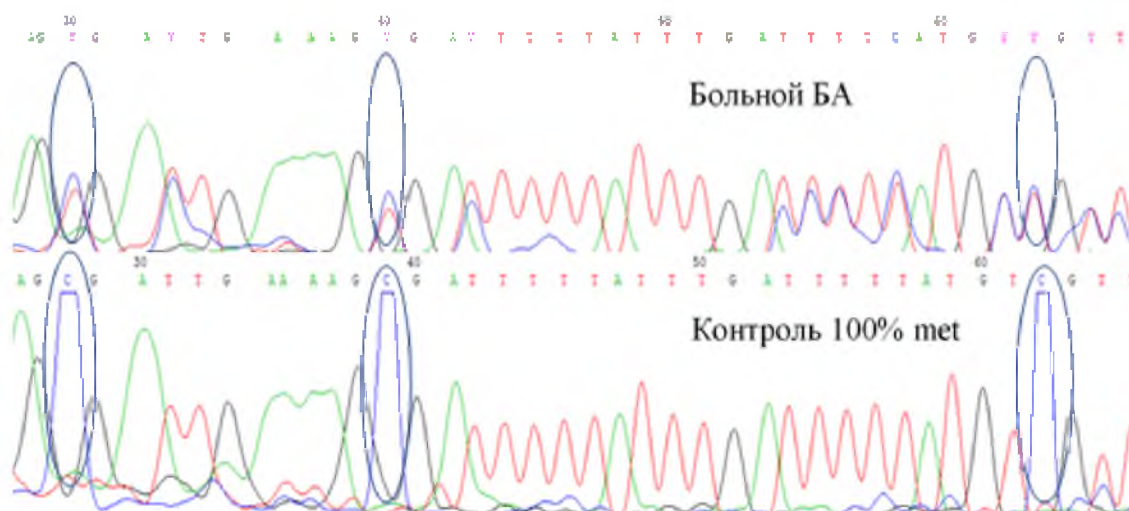


Рисунок 14 – Результаты секвенирования промоторной области гена *GLCC11* у больного БА и контроля 100% метилированной ДНК

По данным информационного ресурса Ensembl Release 98 исследованная нами область гена *GLCC11* включает возможный сайт связывания многофункционального транскрипционного фактора CTCF, участвующего в активации и репрессии транскрипции (<https://www.ensembl.org>). Jiang с соавт. обнаружен более низкий уровень метилирования 5-ти CpG сайтов гена *GLCC11* в клетках периферической крови пациентов с БА из Китая по сравнению с контрольной группой. Установлена ассоциация более низкого уровня метилирования 3-х из выявленных CpG сайтов гена *GLCC11* с пониженным уровнем экспрессии данного гена [57]. Выявлены значительные различия в уровне метилирования cg05267156, расположенного в гене *GLCC11*, до и после использования дексаметазона в ДНК буккального эпителия индивидов, находящихся на стоматологическом лечении (<https://ngdc.cncb.ac.cn/ewas/browse?gene=GLCC11>). В настоящей работе обнаружены значительные различия в уровне метилирования анализируемых CpG сайтов гена *GLCC11* между больными с тяжелым и среднетяжелым течением БА и контрольной группой, что частично согласуется с ранее опубликованными данными Jiang с соавт. и подтверждает возможную роль данного гена в патогенезе БА.

Одним из современных биоинформатических подходов, позволяющих проводить анализ генетической предрасположенности к признаку на индивидуальном уровне является оценка полигенного риска. В рамках настоящего исследования построены шкалы генетического риска (PGS) развития БА в объединенной группе индивидов, а также отдельно в группах русских, татар и башкир с использованием 10 исследованных полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ГКС. Полигенная оценка риска включала несколько основных этапов таких как: проверка полиморфных вариантов на неравновесие по сцеплению ($r^2 < 0,2$); логистический регрессионный анализ ассоциации полиморфных локусов с развитием АЗ с использованием аддитивной модели (значения β -коэффициентов, полученные при логистическом регрессионном анализе в исследуемых группах из РБ использованы в качестве весов для PGS); анализ полигенного риска (PLINK 1.9, R studio); ROC-анализ построенных PGS для выбора наиболее чувствительных и специфичных моделей с высоким уровнем прогностической значимости.

Ассоциативный анализ взвешенной PGS-модели риска развития БА в объединенной группе, построенной с использованием 10 исследованных полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме ГКС, показал наличие статистически значимых различий между группами больных БА и контроля ($p=7,84 \times 10^{-06}$; OR=1,32; 95%CI 1,17-1,48; AUC=0,58 [95%CI 0,54-0,61]). При PGS-моделей риска развития БА в группах индивидов различной этнической принадлежности также обнаружены выраженные различия между выборками больных БА и контроля: у русских ($p=0,0003$; OR=1,5; 95%CI 1,21-1,87; AUC=0,62 [95%CI 0,56-0,68]), татар ($p=0,0003$; OR=1,61; 95%CI 1,25-2,1; AUC=0,62 [95%CI 0,55-0,68]) и башкир ($p=0,0002$; OR=1,82; 95%CI 1,34-2,53; AUC=0,66 [95%CI 0,58-0,74]) (рисунок 15). Построенные модели обладают средним уровнем прогностической значимости для оценки риска развития БА.

Согласно литературным данным, сконструирован ряд PGS моделей риска развития БА, обладающих невысокой прогностической способностью для оценки риска формирования данного заболевания (AUC<0,60) [36; 37]. Kothalawala D.M. с коллегами разработана PGS модель риска развития БА с использованием 105 полиморфных вариантов генов, ассоциированных с развитием данного заболевания в детском возрасте при GWAS индивидов европейского происхождения (AUC=0,61), обладающая средней прогностической ценностью [38]. Полученные нами результаты частично согласуются с опубликованными данными, построенные нами модели также обладают средним уровнем прогностической ценности для оценки риска развития БА у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности.

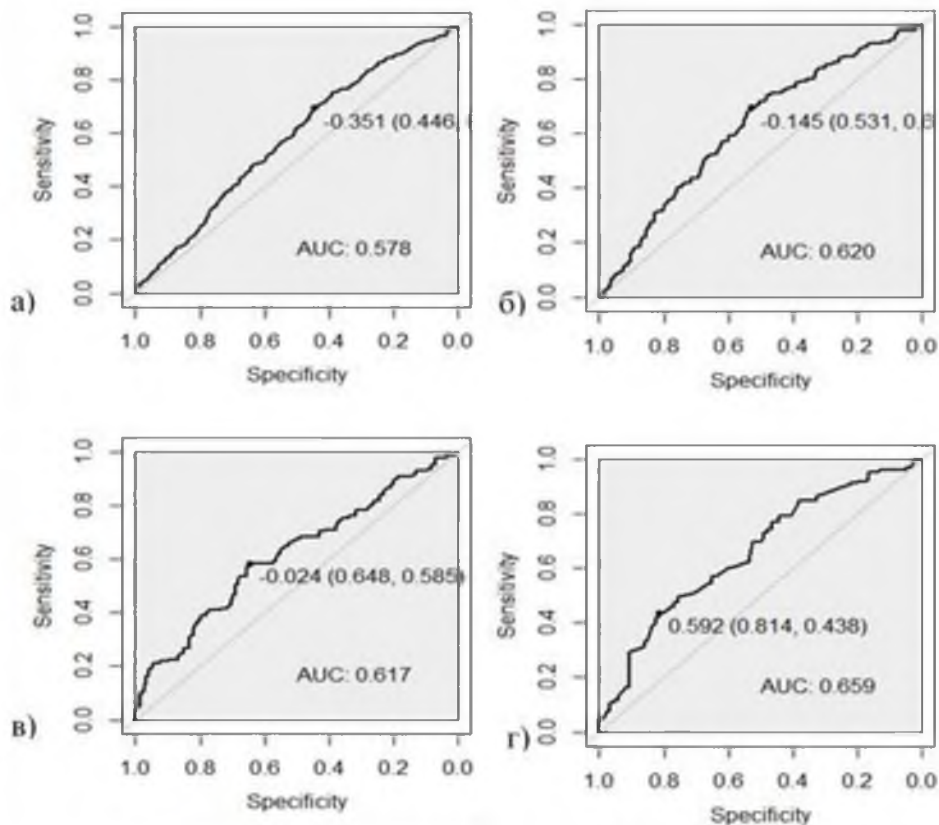


Рисунок 15 – ROC-кривые, полученные при взвешенном PGS-анализе риска развития БА: а) общая группа; б) русские; в) татары; г) башкиры

Таким образом, в рамках данной работы проведено исследование 10-ти полиморфных локусов генов, участвующих в метаболизме ГКС, у больных БА и здоровых индивидов из РБ. Обнаружено, что с развитием БА у русских ассоциированы аллели полиморфных вариантов генов *FBXL7* (rs10044254) и *CRHR1* (rs242941), у татар гена *GLCCII* (rs37973), у башкир генов *CMTR1* (rs2395672) и *TBXT* (rs2305089). При анализе метилирования промоторной области гена *GLCCII* выявлены значительные различия в уровне метилирования промоторной области данного гена между больными с тяжелым и среднетяжелым течением БА и контрольной группой, позволяющие предположить определенную роль метилирования гена *GLCCII* в развитии БА. Построен ряд PGS-моделей, ассоциированных с риском развития БА в общей группе индивидов и в отдельных этнических группах русских, татар и башкир. В целом, результаты настоящей работы свидетельствуют о вовлеченности ряда исследуемых генов, участвующих в метаболизме ГКС, в развитие БА и вносят вклад в общее понимание этиологии и молекулярного патогенеза данного заболевания. Полученные данные могут быть использованы для разработки и оптимизации панелей генетических маркеров ранней диагностики БА.

2.3. Идентификация генетических и эпигенетических маркеров риска развития метаболических заболеваний

Исследование ассоциации полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК в мРНК таргетных генов с остеопоротическими переломами и низким уровнем МПКТ

Наследственность определяет до 65% вариабельности уровня МПКТ [60], но, в то же время, выявлено мало ДНК-маркеров остеопороза с высоким рисковым эффектом [61]. Предполагается, что такие варианты могут быть обнаружены в регуляторных последовательностях ДНК, влияющих на эпигенетические механизмы контроля экспрессии генов [62]. Аберрации эпигенетических механизмов в значительной мере коррелируют с возрастанием риска переломов и снижением уровня МПКТ [62]. Это подтверждается весомым количеством работ по изучению паттернов метилирования ДНК [63] и пула микроРНК в крови или костной ткани у пациентов с ОП [64]. Некодирующие РНК действуют синергетически, регулируя клеточную пролиферацию, остеокластогенез, остеогенез, аутофагию и множество других процессов. Вместе с тем существует огромный пробел в понимании того, каким образом изменение сродства микроРНК в сайтах связывания мРНК влияет на риск развития первичного остеопороза. Поскольку каждая мРНК различается по своей способности связываться с микроРНК, одни делают это более эффективно, чем другие, и это связано с изменениями в последовательности в 3'-UTR нетранслируемых областях зрелых мРНК [65]. Кроме этого, различные аллельные варианты генов имеют сродство к различным типам микроРНК, меняя качественный состав и эффект (последствия) ДНК-РНК-х взаимодействий [66]. Таким образом, полиморфизм 3'-UTR последовательности мРНК изменяет аффинность связывания с микроРНК и тем самым может изменять регуляцию трансляции мРНК-мишеней или вызывать деградацию мРНК, что приводит к дифференциальной экспрессии таргетных генов [67]. Ранее, с использованием метода полигенной оценки риска, нами разработаны прогностические модели риска развития переломов у женщин из Волго-Уральского региона России, в которую наряду с другими вошли полиморфные варианты сайтов связывания микроРНК [68]. Первые результаты в этом направлении были получены в GWAS-исследовании Shu-Feng Lei et al., где были выявлены статистически значимые ассоциации 7 полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК rs6854081, rs1712, rs17054320, rs10793442, rs10098470 и rs2745426 с остеопорозом. Наиболее значимые ассоциации с ОП описаны для rs1712 гена *FBOX5* белка 5 и rs6854081 гена *FGF2* [69]. Однако, ассоциации не были воспроизведены.

Сродство микроРНК к определенным вариантам последовательности сайтов связывания может влиять на подбор векторных микроРНК, нацеленных на конкретную мРНК-мишень при разработке таргетной терапии. МикроРНК и длинные некодирующие РНК контролируют множество сигнальных путей и экспрессию структурных генов, поэтому, понимание того, как

полиморфизм сайтов связывания влияет на эффект РНК-интерференции расширяет возможности для разработки корректно работающей системы для изменения экспрессии целевых генов при доставке РНК-векторов [70]. В качестве терапевтического прецедента генная терапия опорно-двигательного аппарата за последние два десятилетия была хорошо продемонстрирована на мышинной модели с овариэктомией [71]. Весьма перспективным представляется разработка методов РНК-терапии ремоделирования парадонта через регуляцию активности микроРНК, влияющих на ортодонтическое перемещение зубов [72]. Таким образом, микроРНК являются перспективными биоэлементами для разработки методов таргетной терапии первичного ОП [73].

В нашем исследовании проведен анализ ассоциации полиморфных вариантов микроРНК с риском развития остеопоретических переломов и низкого уровня МПКТ. Исследование проведено в группах сравнения случай / контроль с оценкой ассоциации заболевания с отдельными полиморфными вариантами генов. Изучены 13 полиморфных локусов, расположенных в генах *COL1A1*, *COL11A1*, *COL11A1*, *VDR*, *FGF2*, *SOX9*, *MMP1*, *ZNF239*, *TPD52*, *SPARC*, *FBXO5*, *miR-146a*, *miR-196a* (таблица 15), у больных с ОП и в контрольной группе индивидов.

Таблица 15 – Характеристики полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК

| № | Полиморфный вариант | | Локализация | Ген |
|----|---------------------|-------------|-------------|-----------------|
| 1 | rs1061947 | с.*744C>T | 17q21.3 | <i>COL1A1</i> |
| 2 | rs1031820 | с.*105 C>T | 1p21.1 | <i>COL11A1</i> |
| 3 | rs9659030 | с.*1183 A>G | 1p21.1 | <i>COL11A1</i> |
| 4 | rs11540149 | с.*1865 G>A | 12q13.11 | <i>VDR</i> |
| 5 | rs6854081 | с.*3156 T>C | 4q28.1 | <i>FGF2</i> |
| 6 | rs1042673 | с.*811 A>G | 17q24.3 | <i>SOX9</i> |
| 7 | rs5854 | с.*269 C>T, | 11q22.2 | <i>MMP1</i> |
| 8 | rs10793442 | с.*332 G>T | 10q11.21 | <i>ZNF239</i> |
| 9 | rs10098470 | с.*1073 C>T | 8q21.13 | <i>TPD52</i> |
| 10 | rs1054204 | с.*582 G>C | 5q33.1 | <i>SPARC</i> |
| 11 | rs1712 | с.*433 C>T | 6q25.2 | <i>FBXO5</i> |
| 12 | rs2910164 | n. 303 C>G | 5q33.3 | <i>miR-146a</i> |
| 13 | rs11614913 | n.78C>T | 12p38.1 | <i>miR-196a</i> |

русской и татарской принадлежности. Выбор полиморфных вариантов определялся частотой распространения в европейской популяции, информацией о роли генов в костной биологии, а также литературными данными об ассоциации полиморфных вариантов с риском развития ОП.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов проведен между группами с переломами и их отсутствием, с низким и нормальным уровнем МПКТ (по отдельности и в сочетании) с учетом полового диморфизма и этнического происхождения. При

проверке равновесия Харди-Вайнберга выявлено незначительное отклонение по локусу rs1712 ($p=0,014$) в выборке мужчин с переломами, при этом, равновесие сохранялось в контрольной группе без переломов ($p=0,159$). В связи с этим, все полиморфные варианты допущены для проведения ассоциативного исследования. Частота минорного аллеля варьировала от 8,4% по локусу rs1031820 до 46,8% по локусу rs1054204 (таблица 16). Далее был проведен тест на ассоциацию полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК с использованием непараметрического критерия χ^2 с переломами в целом и с учетом их локализации, а также уровня МПКТ с отнесением к одному из 2 классов согласно Т-критерию (низкий уровень МПКТ при $T < -1$, при $T > -1$ – нормальный уровень МПКТ) (таблица 17).

Результаты ассоциативного анализа показали, что с фенотипами первичного остеопороза ассоциированы полиморфные варианты в генах rs6854081 (*FGF2*), rs11540149 (*VDR*), rs1042673 (*SOX9*), rs1712 (*FBOX5*), rs10098470 (*TPD52*), rs1054204 (*SPARC*), rs1031820 (*COL11A1*), rs5854 (*MMP1*), rs2910164 (*miR146a*) и rs11614913 (*miR196a*). Основные результаты:

*Ген FGF2: rs6854081*G* ассоциирован с переломами шейки бедра у мужчин в целом и у женщин русской этнической принадлежности. Полиморфный вариант rs6854081 локализован в 3'-нетранслируемой области гена фактора роста фибробластов 2-ого типа – мембранного рецептора, играющего ключевую роль в регенерации соединительной ткани, в том числе костной и кровеносной системы. Он запускает внутриклеточный сигналинг через тирозинкиназный домен, опосредуя индукцию клеточной дифференцировки и пролиферации, предположительно является маркером низкого уровня минеральной плотности костной ткани. Наше исследование показывает, что вариант rs6854081 может являться рисковым маркером переломов шейки бедра у женщин.

*Ген VDR: rs11540149*A* ассоциирован с переломами шейки бедра у мужчин в целом, переломом позвоночника у женщин и мужчин в целом, переломами лучевой кости, типичными переломами у мужчин в целом, низким уровнем МПКТ у мужчин в целом и низким уровнем МПКТ позвоночника у мужчин русской этнической принадлежности. Полиморфный вариант локализован в 3'-нетранслируемой области гена рецептора витамина Д, который играет ключевую роль в метаболизме кальция и фосфора, а также является регулятором экспрессии генов. Ассоциация с переломом может быть связана со снижением экспрессии данного гена в результате нарушения сродства микроРНК с мРНК гена в результате данного однонуклеотидного полиморфизма.

Таблица 16 – Результаты анализа распределения частот аллелей и генотипов локусов

| SNP | H_{obs} | H_{pred} | HW_{pval} | MAF | Аллель |
|-----------------------|-----------|------------|-------------|-------|--------|
| Когорта женщин | | | | | |
| rs10793442 | 0,250 | 0,233 | 0,080 | 0,135 | T |
| rs11540149 | 0,145 | 0,179 | 0,279 | 0,100 | A |
| rs1061947 | 0,298 | 0,291 | 0,697 | 0,177 | T |
| rs10098470 | 0,034 | 0,034 | 1,000 | 0,017 | T |
| rs1042673 | 0,485 | 0,474 | 0,673 | 0,386 | G |
| rs5854 | 0,426 | 0,433 | 0,739 | 0,317 | A |
| rs9659030 | 0,298 | 0,298 | 1,000 | 0,182 | G |
| rs1031820 | 0,156 | 0,155 | 1,000 | 0,084 | C |
| rs6854081 | 0,210 | 0,201 | 0,355 | 0,113 | C |
| rs1054204 | 0,491 | 0,498 | 0,755 | 0,468 | C |
| rs1712 | 0,207 | 0,214 | 0,447 | 0,122 | C |
| rs11614913 | 0,509 | 0,489 | 0,359 | 0,425 | T |
| rs2910164 | 0,319 | 0,418 | 0,457 | 0,297 | G |
| Когорта мужчин | | | | | |
| rs10793442 | 0,235 | 0,229 | 0,868 | 0,132 | T |
| rs11540149 | 0,159 | 0,166 | 0,622 | 0,091 | A |
| rs1061947 | 0,275 | 0,296 | 0,235 | 0,181 | T |
| rs10098470 | 0,058 | 0,056 | 1,000 | 0,029 | T |
| rs1042673 | 0,510 | 0,473 | 0,07 | 0,401 | G |
| rs5854 | 0,419 | 0,429 | 0,750 | 0,311 | A |
| rs9659030 | 0,293 | 0,275 | 0,495 | 0,164 | G |
| rs1031820 | 0,138 | 0,421 | 1,000 | 0,301 | C |
| rs6854081 | 0,169 | 0,173 | 0,763 | 0,096 | C |
| rs1054204 | 0,520 | 0,498 | 0,140 | 0,452 | C |
| rs1712 | 0,240 | 0,320 | 0,014 | 0,200 | C |
| rs11614913 | 0,482 | 0,484 | 0,852 | 0,404 | T |
| rs2910164 | 0,331 | 0,326 | 0,923 | 0,205 | G |

Таблица 17 - Результаты ассоциативного анализа с использованием критерия согласия Пирсона

| Аллель | Локус | Фенотип | Пол | Этнос | χ^2 | Дов. интер. | OR | P |
|--------|------------|------------------------|-----|---------|----------|-------------|-------|-----------------------|
| G | rs6854081 | Перелом шейки бедра | М | В целом | 5.079 | 1.103-7.462 | 2.869 | 0.02422 |
| A | rs11540149 | Перелом шейки бедра | М | В целом | 5.682 | 1.17-9.082 | 3.259 | 0.01714 |
| G | rs1042673 | Перелом шейки бедра | М | В целом | 4.216 | 1.013-6.226 | 2.512 | 0.04005 |
| A | rs11540149 | Перелом шейки бедра | М | Русские | 7.14 | 1.332-10.69 | 3.772 | 0.007538 |
| G | rs6854081 | Перелом шейки бедра | Ж | В целом | 4.167 | 1.017-3.575 | 1.907 | 0.04122 |
| G | rs6854081 | Перелом шейки бедра | Ж | Русские | 5.399 | 1.119-4.596 | 2.268 | 0.02015 |
| A | rs11540149 | Перелом позвоночника | Ж | В целом | 5.536 | 1.132-4.95 | 2.368 | 0.01863 |
| A | rs10098470 | Перелом позвоночника | Ж | Русские | 8.98 | 1.55-82.17 | 11.29 | 0.00273 |
| A | rs11540149 | Перелом позвоночника | Ж | Русские | 6.982 | 1.283-7.052 | 3.008 | 0.008232 |
| C | rs1712 | Типичные переломы | М | В целом | 16.62 | 1.825-5.997 | 3.308 | 4.561e ⁻⁰⁵ |
| A | rs10098470 | Типичные переломы | М | В целом | 15.62 | 2.172-14.98 | 5.703 | 7.763e-05 |
| A | rs11540149 | Типичные переломы | М | В целом | 6.877 | 1.18-3.361 | 1.992 | 0.008731 |
| G | rs1031820 | Переломы позвоночника | М | В целом | 8.859 | 1.323-4.249 | 2.371 | 0.002916 |
| C | rs1712 | Переломы позвоночника | М | В целом | 14.93 | 1.786-6.502 | 3.408 | 0.0001118 |
| A | rs10098470 | Переломы позвоночника | М | В целом | 12.58 | 1.915-15.18 | 5.392 | 0.0003902 |
| G | rs1031820 | Переломы позвоночника | М | Русские | 5.173 | 1.09-3.689 | 2.005 | 0.02294 |
| C | rs1712 | Переломы позвоночника | М | Русские | 11.43 | 1.568-6.019 | 3.072 | 0.0007236 |
| A | rs10098470 | Переломы позвоночника | М | Русские | 12.06 | 1.906-17.63 | 5.796 | 0.0005142 |
| A | rs11540149 | Переломы позвоночника | М | Русские | 4.089 | 1.011-3.611 | 1.91 | 0.04317 |
| C | rs1712 | Переломы лучевой кости | М | В целом | 7.711 | 1.452-27.59 | 6.329 | 0.005489 |
| A | rs11540149 | Переломы лучевой кости | М | В целом | 6.647 | 1.232-5.792 | 2.671 | 0.00993 |
| C | rs1712 | Переломы лучевой кости | М | Русские | 5.488 | 1.138-22.22 | 5.028 | 0.01915 |
| A | rs11540149 | Переломы лучевой кости | М | Русские | 7.503 | 1.321-6.897 | 3.018 | 0.006161 |
| A | rs11540149 | Переломы в целом | М | В целом | 3.969 | 1.004-2.518 | 1.59 | 0.04635 |
| A | rs10098470 | Переломы в целом | М | В целом | 8.419 | 1.441-9.534 | 3.707 | 0.003714 |
| A | rs11540149 | Перелом позвоночника | М | В целом | 5.029 | 1.077-3.464 | 1.932 | 0.02492 |
| C | rs1712 | Перелом в целом | М | Русские | 9.364 | 1.314-3.592 | 2.172 | 0.002213 |
| A | rs10098470 | Переломы в целом | М | Русские | 9.168 | 1.54-11.57 | 4.221 | 0.002463 |
| C | rs1712 | Типичные переломы | М | Русские | 12.5 | 1.59-5.444 | 2.942 | 0.0004074 |
| A | rs10098470 | Типичные переломы | М | Русские | 15.84 | 2.262-17.79 | 6.344 | 6.894e ⁻⁰⁵ |
| A | rs11540149 | Типичные переломы | М | Русские | 5.463 | 1.104-3.441 | 1.95 | 0.01942 |
| T | rs1061947 | Типичные переломы | М | Русские | 4.335 | 1.024-2.415 | 1.573 | 0.03733 |

Продолжение таблицы 17

| | | | | | | | | |
|---|------------|--------------------------|---|---------|-------|--------------|-------|-----------|
| A | rs10098470 | Типичные переломы | Ж | Русские | 5.118 | 1.051-28.37 | 5.461 | 0.02367 |
| C | rs1712 | Перелом в целом | М | В целом | 12.32 | 1.441-3.735 | 2.32 | 0.0004482 |
| C | rs1712 | Низкий МПКТ в целом | М | В целом | 3.905 | 1.002-2.46 | 1.57 | 0.04815 |
| A | rs11540149 | Низкий МПКТ в целом | М | В целом | 6.871 | 1.173-3.211 | 1.941 | 0.008758 |
| A | rs11540149 | Низкий МПКТ в целом | М | Русские | 7.872 | 1.248-3.742 | 2.161 | 0.005021 |
| A | rs9659030 | Низкий МПКТ шейки бедра | М | В целом | 4.361 | 1.028-2.664 | 1.655 | 0.03678 |
| G | rs1054204 | Низкий МПКТ шейки бедра | М | В целом | 4.235 | 1.014-1.776 | 1.342 | 0.03959 |
| G | rs10098470 | Низкий МПКТ шейки бедра | М | В целом | 4.215 | 0.9969-9.591 | 3.092 | 0.04007 |
| G | rs1054204 | Низкий МПКТ шейки бедра | М | Русские | 7.457 | 1.124-2.042 | 1.515 | 0.00632 |
| T | rs5854 | Низкий МПКТ шейки бедра | М | Русские | 4.467 | 1.025-1.943 | 1.411 | 0.03455 |
| G | rs1042673 | Перелом позвоночника | Ж | Татары | 7.875 | 1.487- 32.94 | 7 | 0.005012 |
| A | rs10793442 | Переломы лучевой кости | Ж | Татары | 4.166 | 1.017-4.852 | 2.222 | 0.04123 |
| G | rs1054204 | Низкий МПКТ позвоночника | М | Русские | 3.848 | 1-1.811 | 1.346 | 0.0498 |
| A | rs11540149 | Низкий МПКТ позвоночника | М | Русские | 4.222 | 1.021-3.038 | 1.761 | 0.03991 |
| C | rs2910164 | Низкий МПКТ позвоночника | Ж | Русские | 5.141 | 1.056-2.15 | 1.507 | 0.02337 |
| A | rs1042673 | Низкий МПКТ позвоночника | Ж | Русские | 5.141 | 1.065-2.421 | 1.606 | 0.02337 |
| T | rs11614913 | Переломы в целом | М | В целом | 5.789 | 1.065-1.871 | 1.412 | 0.01613 |

Примечание: P – p -value; χ^2 – критерий согласия Пирсона; OR – отношение шансов;
 FDR – значение P после поправки на множественность сравнений Бенджамина-Хохберга.

Согласно базе данных PolymiRTS микроРНК hsa-miR-1260a, hsa-miR-1260-b, которые комплементарны данному сайту связывания при варианте нуклеотида А, они участвуют в регуляции активности остеобластов [74], а уровни экспрессии были повышены при раке яичников у женщин [75]. Этот результат нами получен впервые и показывает, что *rs11540149*A (VDR)* ассоциирован с переломами позвоночника, с переломами шейки бедра и с переломами лучевой кости, по крайней мере, в популяциях Волго-Уральского региона России, однако, эти выводы требуют репликации, в том числе на популяциях из других стран.

*Ген TPD52: rs10098470*T* ассоциирован с переломами позвоночника у женщин русского происхождения, переломами в целом, типичными переломами у мужчин в целом, типичными переломами у женщин русского происхождения, а также низким уровнем МПКТ шейки бедра у мужчин. Полиморфный вариант *rs10098470* локализован в гене *TPD52*, кодирующего опухолевой белок D52. Функция этого белка в патогенезе остеопороза не описана. Ген *TPD52* был идентифицирован почти 20 лет назад благодаря его сверхэкспрессии при раке человека. Вскоре после сообщений о последовательностях *TPD52* у разных видов были идентифицированы родственные паралоги гена, и к 2004 году стало очевидно, что последовательности, подобные *TPD52*, высококонсервативны как внутри, так и между видами, они мало похожи на последовательности других белков [76]. Несмотря на то, что роль гена в метаболизме костной ткани не установлена, вариант *rs10098470* все же был идентифицирован в GWAS-исследовании [69]. Два исследования идентифицировали последовательности гена *TPD52* по их повышенной экспрессии в ткани рака молочной железы человека [77] и в клеточных линиях рака легких [78]. Согласно базам данных PolymiRTS дикий вариант с аллелем С имеет сродство к микроРНК hsa-miR-582-5p, который является потенциальным прогностическим маркером немелкоклеточного рака легкого человека и действует как опухолевый супрессор, воздействуя на MAP3K2. При этом, к варианту с аллелем Т сродством обладает микроРНК hsa-miR7849-3p, которая регулирует TMPRSS2 – мембрано-связанную сериновую протеазу, активирующая коронавирусный S-белок Sars-Cov-2, что может говорить о протективной роли данного микроРНК [79]. В нашей работе варианты с аллелем Т локуса *rs10098470* оказались потенциальными маркерами переломов, к тому же, показан значительный уровень гетерогенности в зависимости от этнического происхождения, что подтверждает потенциальную роль *rs10098470* в патогенезе ОП у женщин и мужчин с остеопорозом из Волго-Уральского региона России.

*Ген COL11A1: rs9659030*A* ассоциирован с низким уровнем МПКТ шейки бедра у мужчин.

Полиморфный вариант *rs9659030* локализован в 3'-нетранслируемой области гена *COL11A1*, который кодирует α -1-цепь коллагена 1 типа, являющегося структурным компонентом хрящей и стекловидного тела. Ген *COL11A1: rs1031820*G* ассоциирован с переломами позвоночника у мужчин в целом и русского происхождения. Полиморфный вариант *rs1031820* локализован в 3'-нетранслируемой области гена *COL11A1*, который кодирует α -1-цепь коллагена 11 типа, являющегося структурным компонентом хрящей и стекловидного тела. Мутации в этом гене, как правило, ассоциированы с коллагенопатиями II и XI типов, а также остеопорозом. В литературе полиморфный вариант *rs1031820* фигурирует как рискованный маркер закрытоугольной первичной глаукомы в популяции ханьцев ($p=0,047$) [80], а также является вероятным рискованным маркером остеоартрита (ОА), действующем через механизмы подавления экспрессии гена *COL11A1* [81]. Примечательно, что по базам данным PolymiRTS спрогнозированные микроРНК, имеющие сходство к данному сайту обозначены только для варианта с аллелем А: это микроРНК *hsa-miR-103a-3p*, *hsa-miR-107*, *hsa-miR-4310*, *hsa-miR-7157-5p*. Согласно работе авторства Honglei Z. и Isidore R. 2014 года *miR-103a-3p* нацелен на 5'-UTR регион гена *GPRC5A* в клетках поджелудочной железы, влияя на риск развития онкологического заболевания [82], а уровень *miR-107* был снижен в образцах хряща при ОА [83]. В данной работе аллель G *rs1031820* ассоциирован с переломами позвоночника у мужчин.

Ген *FBOX5: rs1712*C* ассоциирован с типичными переломами у мужчин в целом, переломами позвоночника и лучевой кости в целом и русского происхождения, переломами в целом у мужчин, а также низким уровнем МПКТ в целом у мужчин в целом.

Полиморфный вариант *rs1712* гена локализован в 3'-нетранслируемой области гена *FBOX5*, который кодирует уникальный белок F-бокса 5. Эти белки составляют одну из четырех субъединиц убиквитинового протеин-лигазного комплекса, называемых SCF (SKP1-cullin-F-box), функционирующие в зависимом от фосфорилирования процессе убиквитинирования. В нашей работе анализ идентифицировал статистически значимую ассоциацию аллеля Т полиморфного локуса *rs1712* гена *FBOX5* с низким уровнем МПКТ в поясничном отделе позвоночника в выборке женщин, однако, ассоциация не прошла проверку на множественную проверку гипотез. Экспрессия гена *FBOX5* повышена при многих онкологических заболеваниях человека и ассоциирована с хромосомной нестабильностью [84]. Есть сведения об ассоциации с уровнем МПКТ шейки бедренной кости для двух SNP – *rs1712* и *rs6854081* [69]. В базе данных PolymiRTS для данного полиморфизма спрогнозирована одна комплементарная микроРНК – *hsa-miR-549a*, уровень которой повышен при Хорее Генгтингтона [85] и является потенциальной терапевтической мишенью для данного заболевания, а также понижен в фибробластах при несиндромальной

расщелине нёба [86]. В нашей работе продемонстрировано, что *FBOX5.rs1712*C* ассоциирован в с переломами всех локализаций как в общей выборке мужчин, так и в выборке мужчин русской этнической принадлежности. Учитывая, что высокосignificanтная ассоциация данного локуса с ОП была показана ранее и другими авторами, этот вариант может быть потенциально эффективным биомаркером первичного ОП.

Ген *SOX9: rs1042673*G* ассоциирован с переломами шейки бедра у мужчин в целом и с переломами позвоночника у женщин татарского происхождения, *rs1042673*A* ассоциирован с низким уровнем МПКТ позвоночника у женщин русского происхождения. Полиморфный вариант *rs1042673* локализован в 3'-нетранслируемой области гена *SOX9* – кодирующего фактор транскрипции 9 SRY-бокса *SOX9*. Экспрессируется пролиферирующими, но не гипертрофическими хондроцитами, что важно для дифференцировки клеток-предшественников в хондроциты и, с помощью стероидогенного фактора 1, регулирует транскрипцию гена антимюллерова гормона [87]. В настоящее время не существует работ, в которой бы описывалась связь данного полиморфизма с остеопатиями. Примечательно, что к варианту гена с аллелем G имеет сродство известная микроРНК *hsa-let-7d-3p* – один из членов семейства *let-7d*, подавляющих развитие онкологических заболеваний. *Let-7d* подавляется при многих типах рака, включая рак яичников и напрямую нацелен на онкогены [88]. По базе PolymiRTS к варианту с аллелем G имеют сродство микроРНК *hsa-miR-190a-3p*, *hsa-miR-5011-5p*, для которых также не описана роль в патогенезе остеопатий. В нашей работе аллель G полиморфного локуса *rs1042673* гена *SOX9* в выборке женщин русской этнической принадлежности значимо ассоциирован с низким уровнем МПКТ позвоночника.

Ген *SPARC: rs1054204*G* ассоциирован с низким уровнем МПКТ шейки бедра у мужчин в целом и русской этнической принадлежности, а также с низким уровнем МПКТ позвоночника у мужчин русской этнической принадлежности. Полиморфный вариант *rs1054204* локализован в 3'-нетранслируемой области гена *SPARK* – кодирующего остеоонектин, также известный как секреторируемый кислым и богатым цистеином белка или белковой базальной мембраны 40 (BM-40) [89]. Это гликопротеин костной ткани, связывающий кальций. Он секреторируется остеобластами во время формирования костей и индуцирует минерализацию. Остеонектин проявляет сродство к коллагену в дополнение к минеральному кальцию [90]. Мыши с нокаутом или гаплонедостаточные по гену остеоонектина имеют остеопению. У мужчин с идиопатическим остеопорозом гаплотипы 3'-UTR однонуклеотидного полиморфизма гена *SPARK*, отличающиеся только вариантом *rs1054204*, ранее были связаны с костной массой. Установлено, что *rs1054204* в 3'-нетранслируемой области остеоонектина значимо ассоциирован с регуляцией массы костей

и является мишенью микроРНК miR-433 [90]. В нашей работе rs1054204 является предиктором переломов шейки бедра у женщин в общей выборке.

Ген *COL1A1*: *rs1061947*T* ассоциирован с типичными переломами у мужчин русской этнической принадлежности. Полиморфный вариант *rs1061947* локализован в 3'-нетранслируемой области гена *COL1A1*, который кодирует α -1-цепь коллагена 1 типа, являющегося структурным костей.

Ген *ZNF239*: *rs10793442*A* ассоциирован с переломами лучевой кости у женщин татарской этнической принадлежности. Не обнаружено сведений о вкладе данного гена в патогенез остеопатии кроме публикации, где исследована роль полиморфного варианта *rs10793442* и показана его ассоциация с уровнем МПКТ в шейке бедра [69]. По данным сайта PolymiRTS к аллелю *G имеют сродство hsa-miR-2115-3p, hsa-miR361-5p, hsa-miR-374a-3p. В работе Yaping Sun и их коллег (2021) уровень микроРНК hsa-miR-2115-3p отрицательно коррелировал с уровнями SIRT1 – 91 НАД- зависимой деацетилазы, который деацетилирует факторы транскрипции, способствующие клеточной регуляции [91].

Ген *miR196a*: *rs11614913*T* ассоциирован с переломами в целом у мужчин. Полиморфный вариант *rs11614913* локализован к кодирующей зоне гена микроРНК miR-196-а. Было показано, что данный однонуклеотидный полиморфизм может изменять ее экспрессию, влияя на процесс созревания микроРНК и эффективность взаимодействия с таргетными генами повышая риск онкологических заболеваний [92]. Однако, нами найдена публикация, в которой описана прямая связь данного полиморфного варианта с низким уровнем МПКТ. Согласно результатам GWAS, полиморфный вариант *rs11614913* в miR-196a-2 в значительной степени ассоциирован с уровнем МПКТ шейки бедренной кости ($p=9,9 \times 10^{-7}$, $\beta=-0,038$) и уровнем МПКТ поясничного отдела позвоночника ($p=3,2 \times 10^{-11}$, $\beta=-0,061$). Наши результаты согласуются с данными зарубежных исследований [93].

Ген *miR146a*: *rs2910164*C* ассоциирован с низким уровнем МПКТ позвоночника у женщин русской этнической принадлежности.

Полиморфный вариант *rs2910164* локализован в экзоне гена микроРНК miR146-а. В мета-анализе Yingqi Xiao с коллегами (2019) была обнаружена связь этого варианта с риском псориатического артрита и анкилозирующего спондилита – хронического системного заболевания суставов с преимущественной локализацией процесса в позвоночнике, крестцовоподвздошных сочленениях и паравертебральных мягких тканях [94]. Повышение уровня экспрессии гена miR-146-а наблюдается в различных тканевых структурах у пациентов с ревматоидным артритом [95]. Значимая ассоциация аллеля С с низким уровнем МПКТ в поясничном отделе позвоночника у женщин предварительно согласуется с данными упомянутых исследований, в которых изменение активности гена miR-146-а было

ассоциировано с патогенетическими процессами именно в области позвоночника [96]. Примечательно, что в работе Tae-Keun Ahn et al. (2017) аллель 101 *G был описан как рискованный, однако только в сочетании с определенными аллельными вариантами других локусов (miR-146aG / -149T / -196a2C / -449G) [96]. Согласно данным ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>), частота аллеля *G в среднем в популяциях мира составляет 71%, однако, в популяциях Восточной Азии она составляет 37%, что демонстрирует существование популяционных различий в распределении частот аллелей исследуемого нами локуса. Однако, полученные нами данные сопоставимы с таковыми в европейских популяциях, где частота аллеля G составляет 0,77.

Ген *MMP1*: rs5854*T ассоциирован с низким уровнем МПКТ шейки бедра у мужчин русской этнической принадлежности.

Полиморфный вариант rs5854 локализован в гене матричной металлопротеиназы 1 типа – секреторируемой внутритканевой коллагеназе из семейства внеклеточных цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса, которые имеют широкий диапазон биологических функций в ремоделировании, дифференцировке тканей, апоптозе и ряде других процессов. В работе 2014 года авторства Yan et al. (2014) описана ассоциация генотипа T/T с повышенным риском асептического расшатывания, что может быть связано с высокой вероятностью неэффективности эндопротезирования тазобедренного сустава [97]. Согласно базам данных PolymiRTS для варианта сайта связывания с нуклеотидом T спрогнозировано сродство микроРНК hsa-miR-517-5p, hsa-miR-5684, hsa-miR-6508-5p и hsa-miR-8067. Не обнаружено научных работ, в которых была бы описана роль данных микроРНК в патогенезе остеопатии, однако, известно, что присутствие циркулирующей hsa-miR-5684 было ассоциировано с выживаемостью при гепатоцеллюлярной карциноме при лечении акситинибом [98], а hsa-miR-8067 рекомендован в роли терапевтической мишени при терапии глиобластомы [99]. Наше исследование показывает, что локус rs5854 может являться рискованным маркером низкого уровня МПКТ позвоночника у мужчин.

Таким образом, получены новые данные об эпигенетически опосредованных факторах, вовлеченных в патогенез остеопороза в целом, переломов и низкого уровня минеральной плотности костной ткани по отдельности у женщин и мужчин из Волго-Уральского региона России с учетом их этнической принадлежности. Широко признано, что микроРНК играют важную регуляторную роль во многих клеточных процессах и их aberrантность вносит значительный вклад в возникновение заболеваний. Понимание функции микроРНК в настоящее время затруднено из-за отсутствия надежных подходов к изучению взаимодействий микроРНК с таргетными мРНК. Это объясняется большим количеством

потенциальных мишеней микроРНК в 3'-UTR последовательностях. Поэтому, актуальным в области исследований ОП является систематизация микроРНК с различным сродством к сайтам связывания в таргетных мРНК ключевых ремоделирования костной ткани. Наши результаты вносят вклад в накопление данных о частотах полиморфных вариантов в этнически гомогенных выборках и роли сайтов связывания микроРНК в формировании генетической предрасположенности к многофакторным патологиям в целом и к остеопорозу в частности. Необходимо проводить дальнейшие исследования по определению функциональной роли ассоциированных локусов.

2.4 Полное секвенирование экзона у пациентов с наследственной спастической параплегией с неустановленной генетической причиной заболевания, биоинформатический анализ результатов исследования и их валидация методом секвенирования по Сэнгеру

Наследственные спастические параплегии (НСП) – это генетически и клинически гетерогенная группа дегенеративных заболеваний нервной системы, обусловленных дистальным поражением длинных аксонов кортикоспинального тракта [100]. Клинически НСП проявляются спастичностью мышц нижних конечностей. Спастические параличи могут сочетаться с различными дополнительными симптомами - атрофией зрительных нервов, глухотой, атаксией, полинейропатией, эпилепсией, нарушением когнитивных функций и др. В зависимости от того, является ли основной симптом единственным или сочетается с другими неврологическими или экстраневральными симптомами, выделяют неосложнённые («чистые») или осложненные формы заболевания [101]. Чрезвычайная клиническая гетерогенность НСП связана с разнообразными патогенетическими процессами, возникающими в нейронах: дефектами формирования мембранных органоидов, молекулярного транспорта, нарушением процессов миелинизации, функций митохондрий, за которые ответственны мутации в различных генах. В настоящее время известно более 100 генов, связанных с различными типами наследования (<http://www.neuromuscular.wustl.edu>). Наиболее частыми причинами НСП являются мутации в генах, кодирующих белки внутриклеточного транспорта, а также белки локализации и формирования мембранных органоидов. В частности, мутации в генах спастина (SPAST), атластина (ATL1) и белка REEP1 обнаруживаются у АД НСП больных соответственно в 40% [102], 10% [103] и 2,4% - 6,5% случаев [104; 105].

В рамках настоящего проекта в семье пациента с аутосомно-доминантной спастической параплегией проведено секвенирование экзона по технологии NGS (“Next

Generation Sequencing”). Данная семья была отобрана для исследования из имеющегося в лаборатории банка ДНК пациентов с НСП и их близких родственников (на сегодняшний день - 63-х неродственных семей), проживающих на территории Республики Башкортостан. Пациент и его ближайшие родственники были осмотрены сотрудниками кафедры неврологии с курсами нейрохирургии и медицинской генетики Башкирского государственного медицинского университета. Ранее у данного пациента в четырех указанных выше генах патогенные варианты нуклеотидных последовательностей, являющиеся причиной развития заболевания, выявлены не были.

Полное секвенирование экзона 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 экзона (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 исследуемой семье прослеживается аутосомно-доминантный тип наследования НСП, для дальнейшего этапа исследования были отобраны гетерозиготные варианты.

В результате полноэкзомного секвенирования и последующего биоинформатического анализа у пациента 10.0 (башкирской этнической принадлежности) с аутосомно-доминантной спастической параплегией была идентифицирована в гетерозиготном состоянии нуклеотидная замена с.610С>Т в 8-м экзоне гена *KIF5A* (Chr12:57961297С>Т), приводящая к аминокислотной замене р.Arg204Trp (NM_004984.2) в молекуле белка. Алгоритмы предсказания патогенности расценивают данный вариант как вероятно патогенный (Mutationtaster, FATHMM prediction, SIFT, Polyphen2, PROVEAN). В контрольных выборках gnomAD, «1000 геномов», ESP6500 и ExAC этот нуклеотидный вариант не зарегистрирован.

Выявленная у пациента миссенс-мутация была подтверждена методом секвенирования по Сэнгеру (рисунок16).

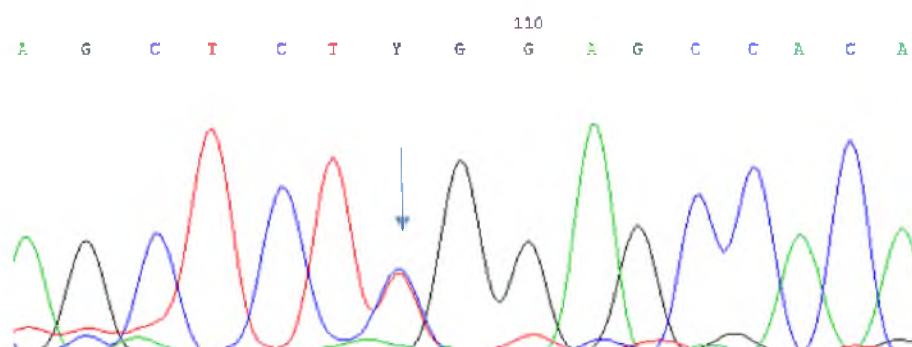


Рисунок 16 – Секвенирование 8-го экзона гена *KIF5A* у пациента с НСП: нуклеотидная замена с.610С>Т в гетерозиготном состоянии

В семье обследованного пациента спастическая параплегия имеет аутосомно-доминантное наследование, в частности, болен был также отец пробанда. Возраст манифестации у обоих - третье десятилетие (после 20 лет), в виде изменения походки и судорог в нижних конечностях. В клинической картине у сына, на момент осмотра 30 лет - спастическая походка, гиперрефлексия сухожильных рефлексов нижних конечностей, с легким повышением мышечного тонуса. Картина электронейромиографического исследования демонстрирует признаки нейропатии смешанного – аксонально-демиелинизирующего типа. Отец, 49 лет, имел не только спастическое повышение мышечного тонуса в ногах, но и парезы в нижних конечностях, со снижением силы до 4 баллов, что значительно меняло походку. По данным ЭНМГ – также смешанный тип нейропатии. В целом, у обоих обследованных больных членов этой семьи заболевание диагностируется как НСП, осложненная периферической нейропатией аксонально-

демиелинизирующего типа. К сожалению, для ДНК-диагностики биологический материал отца пробанда, а также других его родственников был недоступен, что не позволило провести у них анализ на наличие выявленной у пробанда мутации.

Для дальнейшего поиска данной нуклеотидной замены в общей обследуемой выборке пациентов с НСП (63 неродственных индивида) был применен метод конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP- анализ), для которого были подобраны условия, оптимальные для исследуемого локуса (рисунок 17).

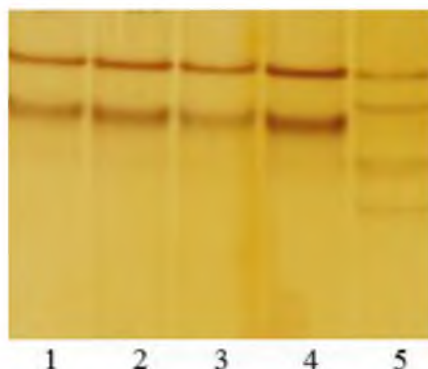


Рисунок 17 – SSCP-анализ 8-го экзона гена *KIF5A*: дорожки 1-4 – образцы без изменения электрофоретической подвижности однонитевой ДНК; дорожка 5 - образец ДНК пациента с мутацией c.610C>T в гене *KIF5A*

В результате проведенного скрининга у других больных НСП нуклеотидная замена c.610C>T в гене *KIF5A* не была обнаружена. Таким образом, выявленная миссенс-мутация оказалась редким случаем причины НСП у пациентов из РБ.

Ген *KIF5A* кодирует нейрон-специфическую тяжелую цепь кинезина 5A (НК-НС5A) – белка, участвующего в аксональном транспорте ряда важных компонентов, включая субъединицы нейрофиламентов, а также мембранные везикулы [106]. К настоящему времени описано более 21 патогенной мутации в гене *KIF5A*. Предположительно, мутации в *KIF5A* приводят к замедлению аксонального транспорта субъединиц нейрофиламентов к синапсам и, следовательно, к аксональной дегенерации [107; 108]. *KIF5A* экспрессируется во всех нейронах, что может привести к разнообразным проявлениям мутаций в этом гене, включая аксональную нейропатию, оптическую нейропатию, эпилепсию, амиотрофию и атаксию [108]. Миссенс-мутации в гене *KIF5A* в гетерозиготном состоянии описаны и у пациентов со спастической параплегией типа 10 (Spastic paraplegia 10, autosomal dominant ОММ: 604187), но они связаны с широким клиническим спектром: от «чистой» НСП до изолированного поражения периферических нервов или сложных фенотипов НСП. SPG10 является аутосомно-доминантным заболеванием, на его долю приходится около 10% осложненных форм НСП. Наиболее распространенными дополнительными клиническими

проявлениями болезни являются периферическая нейропатия и когнитивные нарушения. [107]. Большинство мутаций *KIF5A* сосредоточены в высококонсервативном моторном домене белка, необходимого для взаимодействия микротрубочек. Выявленный нами миссенс-вариант p.Arg204Trp также расположен в этом домене. Ранее он был представлен в двух сообщениях: впервые идентифицирован Tessa A. et al. (2008) [109] в одной итальянской семье, описан как патогенный вариант (CM083712), и позднее - Cuchanski M. et al. (2018) [110] - в семье, этническое происхождение которой авторами не указано. В исследовании [109] пробандом являлась 39-летняя женщина, у которой в возрасте 30 лет первоначально была выявлена спастическая походка, заметно ухудшающаяся с возрастом. На основании электронейромиографического исследования (ЭНМГ) была установлена аксональная сенсорно-моторная нейропатия. Авторы выявили мутацию p.Arg204Trp у всех обследованных больных членов семьи и не обнаружили ее у здоровых членов и у 150 здоровых индивидов контрольной группы. У пациента – мужчины, обследованного в возрасте 31 года, описанного в работе [110], первые признаки заболевания отмечались со школьного возраста, и более отчетливо проявились в 20-летнем возрасте в виде трудности при ходьбе, скованности рук и ног, дистальной парестезии; они прогрессировали с течением времени (прогрессирующая дизестезия рук и ног в течение 1 года). В семейном анамнезе этого пациента имелся схожий неврологический синдром у его отца и дяди по отцовской линии. Электронейромиографическое исследование продемонстрировало признаки периферической нейропатии со смешанными аксональными и демиелинизирующими признаками [110].

Таким образом, в описанных ранее случаях в семьях с мутацией c.610C>T(p.Arg204Trp) в гене *KIF5A* наследственная спастическая параплегия сочетается с аксональной или аксонально-демиелинизирующей сенсорно-моторной нейропатией с началом развития неврологического расстройства в подростковом или зрелом возрасте; заболевание характеризуется легкой или средней степенью тяжести, пациенты передвигаются самостоятельно. Клиническая характеристика SPG10 у обследованного нами пациента также в значительной степени укладывается в такую картину. Скрининг мутации c.610C>T(p.Arg204Trp) в гене *KIF5A* продемонстрировал ее низкую частоту у пациентов с НСП из РБ, но в дальнейшем целесообразной представляется ее идентификация у пациентов с аутосомно-доминантной НСП с соответствующей клинической картиной, с отсутствием мутаций в гене *SPAST (SPG4)*.

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 предстательной железы, бронхиальной астмы, остеопороза. В результате этих исследований получены результаты, представленные ниже.

Репликация исследований GWAS, проведенная на выборках пациентов с раком молочной железы и контрольной группы здоровых индивидов – жителей Республики Башкортостан, позволила выявить генетические маркеры риска развития РМЖ. Установлено, что аллель *G* и генотипы *AG-GG* (доминантная модель) полиморфного локуса rs10941679 / (5p12), аллель *T* и генотипы *TC* и *TT* (кодоминантная модель) полиморфного локуса rs2981582 в гене *FGFR2*, аллель *T* и генотипы *TC-TT* (доминантная модель) полиморфного локуса rs3803662 / 16q12 ассоциированы с повышенным риском развития РМЖ у женщин, проживающих в этом регионе. Аллель *G*, а также генотипы *AG* и *GG* полиморфного локуса rs13387042 / 2q35 являются маркерами пониженного риска развития РМЖ. Результаты нашего исследования позволяют определить новые гены - кандидаты предрасположенности к РМЖ (*FGF10*, *FGFR2*, *TOX3*, *NOTCH2*, *LSP1* и др.), что в свою очередь, стимулирует изучение их роли в процессе канцерогенеза.

В результате изучения профиля 754 микроРНК в образцах тканей, полученных от пациентов с раком предстательной железы было обнаружено, что уровни экспрессии микроРНК-324-3р, микроРНК-429, микроРНК-570 и микроРНК-616 значительно снижены в тканях рака на ранних стадиях по сравнению с тканями на поздних стадиях.

Примечательно, что модель, включающая комбинацию трех микроРНК, уровни ПСА и баллы Глисона позволяла различать пациентов с РПЖ ранней и поздней стадией с AUC 95%, чувствительностью 86% и специфичностью, близкой к 94.%. Таким образом, данные, полученные в этом исследовании, предполагают возможное участие идентифицированных микроРНК в патогенезе РПЖ, а также могут иметь потенциал для использования в качестве диагностических и прогностических инструментов при РПЖ.

С целью изучения генетической предрасположенности к аллергическим заболеваниям в рамках данной работы проведено исследование 10-ти полиморфных локусов генов, участвующих в метаболизме глюкокортикостероидов, у больных бронхиальной астмой и здоровых индивидов из РБ. Обнаружено, что с развитием БА у русских ассоциированы аллели полиморфных вариантов генов *FBXL7* (rs10044254) и *CRHR1* (rs242941), у татар - гена *GLCCII* (rs37973), у башкир - генов *CMTR1* (rs2395672) и *TBXT* (rs2305089). При анализе метилирования промоторной области гена *GLCCII* выявлены значительные различия в уровне метилирования промоторной области данного гена между больными с тяжелым и среднетяжелым течением БА и контрольной группой, позволяющие предположить определенную роль метилирования гена *GLCCII* в развитии БА. Построен ряд PGS-моделей, ассоциированных с риском развития БА в общей группе индивидов и в отдельных этнических группах русских, татар и башкир. В целом, результаты настоящей работы свидетельствуют о вовлеченности ряда исследуемых генов, участвующих в метаболизме ГКС, в развитие БА и вносят вклад в общее понимание этиологии и молекулярного патогенеза данного заболевания. Полученные данные могут быть использованы для разработки и оптимизации панелей генетических маркеров ранней диагностики БА.

С целью идентификации генетических и эпигенетических маркеров риска развития первичного остеопороза проведен поиск ассоциаций полиморфных вариантов сайтов связывания микроРНК в мРНК генов, участвующих в метаболизме соединительной и костной ткани *COL1A1* (rs1061947), *COL11A1* (rs1031820), *COL11A1* (rs9659030), *VDR* (rs11540149), *FGF2* (rs6854081), *SOX9* (rs1042673), *ZNF239* (rs10793442), *TPD52* (rs10098470), *SPARK* (rs1054204), *FBXO5* (rs1712) и *MMP1* (rs5854), а также полиморфных вариантов генов микроРНК *miR-146-a* (rs2910164) и *miR-196-a-2* (rs11614913) с первичным остеопорозом. Результаты ассоциативного анализа показали, что с различными фенотипами первичного остеопороза ассоциированы полиморфные варианты в генах rs6854081 (*FGF2*), rs11540149 (*VDR*), rs1042673 (*SOX9*), rs1712 (*FBXO5*), rs10098470 (*TPD52*), rs1054204 (*SPARC*), rs1031820 (*COL11A1*), rs5854 (*MMP1*), rs2910164 (*miR146a*) и rs11614913

(miR196a). Необходимо проводить дальнейшие исследования по определению функциональной роли ассоциированных локусов.

Наследственные моногенные (олигогенные) заболевания, в частности, наследственные спастические параплегии, являются тяжелыми инвалидизирующими заболеваниями, для которых в настоящее время не существует эффективного лечения. Для многих подобных заболеваний, в том числе, для НСП, 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 пациента с аутосомно-доминантной спастической параплегией с неустановленной генетической причиной заболевания. В результате исследования и последующего биоинформатического анализа у обследованного пациента башкирской этнической принадлежности в гетерозиготном состоянии была идентифицирована известная миссенс-мутация – с.610С>Т(р.Arg204Trp) в гене *KIF5A*, ответственного за редкую генетическую форму НСП SPG10. Клиническая картина заболевания у обследованного пациента соответствует НСП, осложненной периферической нейропатией смешанного (аксонально – демиелинизирующего типа) с возрастом манифестации в 20 лет, что в значительной степени согласуется с таковой у описанных ранее пациентов с данной мутацией. У других неродственных больных из общей выборки неродственных пациентов с НСП (63 чел.) данная мутация не была обнаружена, таким образом, она оказалась редким случаем причины НСП у пациентов из РБ.

СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ И ПРИНЯТЫХ К ПЕЧАТИ

1. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Власова А.О., 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. 2023. №1. С. 10-13.
2. Ялаев Б.И., Хусаинова Р.И. Эпигенетическая регуляция ремоделирования костной ткани и ее роль в патогенезе первичного остеопороза // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. Т. 27, № 4. С. 401-410.
3. Надыршина Д.Д., Хусаинова Р.И. Клинико-генетические аспекты и молекулярный патогенез остеопетроза // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. Т.27, №4. С.383-392.
4. Гилязова, И. Р., Экзосомальные микроРНК как возможные предикторы противоопухолевой эффективности ингибиторов контрольных точек иммунного ответа при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме/ И.Р. Гилязова, Д.Д. Асадуллина, Е.А. Иванова, А. А. Измайлов, Д.А. Кудлай, Г.Р. Гилязова, Э.Ф. Галимова, И.Б. Ермаков, Р.Р. Рахимов, Е. В. Попова, А.Ф. Насретдинов, А.В. Султанбаев, Э.К. Хуснутдинова и В.Н. Павлов // Молекулярная медицина. 2023. Т.21, №4. С.40-48.
5. Кутлубаева Р.Ф., Кутлубаев М.А., Магжанов Р.В., Сайфуллина Е.В., Хидиятова И.М. Наследственные спастические параплегии (обзор) //Нервно-мышечные болезни. 2023. Т.13, №4. С.39 – 47.
6. Мамадалиева Л.И., Бермишева М.А., Иванова Е.А., Нургалиева А.Х., Хуснутдинова Э.К. Мутация сайта сплайсинга с.290+1G>A в гене *STK11* в семье с синдромом Пейтца-Егерса // Вопросы онкологии (принята в печать)
7. Савельева О.Н., Карунас А.С., Бикташева А.Р., Власова А.О., Хидиятова И.М., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. Исследование роли генов, участвующих в метаболизме гистамина, в развитии аллергических заболеваний дыхательных путей //Генетика (принята в печать)
8. Gilyazova I., Ivanova E., Gupta H., Mustafin A., Ishemgulov R., Izmailov A., Gilyazova G., Pudova E.,Pavlov V., Khusnutdinova E. miRNA expression patterns in early- and late-stage prostate cancer patients: high-throughput analysis// Biomedicines. 2023. V.16, I.11. – P.:3073.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Milne R., Benítez J., Nevanlinna H. et al. Risk of Estrogen Receptor-Positive and -Negative Breast Cancer and Single-Nucleotide Polymorphism 2q35-rs13387042 // *J Natl Cancer Inst.* – 2009. – 101 (14). – P. 1012-8.
2. Milne, R., Goode E., García-Closas M. et al. Confirmation of 5p12 as a susceptibility locus for progesterone-receptor-positive, lower grade breast cancer // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2011. – V. 20. – P. 2222–2231.
3. Ghousaini M., French J., Michailidou K. et al. Evidence that the 5p12 Variant rs10941679 Confers Susceptibility to Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancer through *FGF10* and *MRPS30* Regulation // *The American Journal of Human Genetics.* – 2016. – V. 99. – P. 903 – 911.
4. Yang Y., Wang W., Liu G. et al. Association of single nucleotide polymorphism rs3803662 with the risk of breast cancer // *Scientific Reports.* – 2016. – V. 6: 29008.
5. Seksenyan, A. TOX3 is expressed in mammary ER+ epithelial cells and regulates ER target genes in luminal breast cancer / A. Seksenyan, A. Kadavallore, A. Walts et al. // *BMC Cancer.* – 2015. – V. 15: 22.
6. Hein, A. Genetic Breast Cancer Susceptibility Variants and Prognosis in the Prospectively Randomized SUCCESS A Study / A Hein, B Rack, L. Li et al. // *Geburtshilfe Frauenheilkd.* – 2017. – V. 77 (6). – P. 651 – 659.
7. Baxter J., Johnson N., Tomczyk K. et al. Functional annotation of the 2q35 breast cancer risk locus implicates a structural variant in influencing activity of a long-range enhancer element // *Am J Hum Genet.* – 2021. – 108(7) – P. 1190-1203.
8. Farha M. W., Salami S. S. Biomarkers for prostate cancer detection and risk stratification // *Ther Adv Urol.* 2022. T. 14.
9. Catalano M. et al. DNA repair deficiency as circulating biomarker in prostate cancer // *Front Oncol.* 2023. T. 13.
10. Li Z. et al. Native Mass Spectrometry Quantitation of α 2-3-Linked N-Acetylneuraminic Acid Content of Prostate-Specific Antigen: An Accurate Liquid Biopsy for Clinically Significant Prostate Cancer // *Anal Chem.* 2023. T. 95. № 29.
11. Souza Dutra C. de et al. Urinary endogenous peptides as biomarkers for prostate cancer // *Oncol Lett.* 2023. T. 25. № 4.
12. Neste L. Van et al. Detection of High-grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker-Based Risk Score // *Eur Urol.* 2016. T. 70. № 5. C. 740–748.

13. Tomlins S. A. et al. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment // *Eur Urol*. 2016. T. 70. № 1. C. 45–53.
14. Song C. J. et al. The potential of microRNAs as human prostate cancer biomarkers: A meta-analysis of related studies // *J Cell Biochem*. 2018. T. 119. № 3. C. 2763–2786.
15. Zhou H., Zhu X. MicroRNA-21 and microRNA-30c as diagnostic biomarkers for prostate cancer: a meta-analysis // *Cancer Manag Res*. 2019. T. 11. C. 2039–2050.
16. Zhang H. Q. et al. The expression of microRNA-324-3p as a tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance // *Onco Targets Ther*. 2017. T. 10. C. 4935–4943.
17. han Y., Hu H., zhou jinsong. Knockdown of LncRNA SNHG7 inhibited epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer through miR-324-3p/WNT2B axis in vitro // *Pathol Res Pract*. 2019. T. 215. № 10. C. 152537.
18. Sun G. L. et al. miR-324-3p promotes gastric cancer development by activating Smad4-mediated Wnt/beta-catenin signaling pathway // *J Gastroenterol*. 2018. T. 53. № 6. C. 725–739.
19. Zhang S. et al. Hsa_circ_0007494 suppresses prostate cancer progression via miR-616/PTEN axis // *Exp Cell Res*. 2020. T. 395. № 2.
20. Yang Y. et al. Downregulation of circ_0000673 Promotes Cell Proliferation and Migration in Endometriosis via the Mir-616-3p/PTEN Axis // *Int J Med Sci*. 2021. T. 18. № 15. C. 3506–3515.
21. Arabkari V. et al. UPR-Induced miR-616 Inhibits Human Breast Cancer Cell Growth and Migration by Targeting c-MYC // *Int J Mol Sci*. 2023. T. 24. № 17.
22. Jiang G. et al. Positive correlation between miR-570 and prognosis of colon cancer: inhibition of cell proliferation and invasion // *Clin Exp Med*. 2022. T. 22. № 2. C. 193–200.
23. Lin Y. et al. miR-570 Inhibits Proliferation, Angiogenesis, and Immune Escape of Hepatocellular Carcinoma // *Cancer Biother Radiopharm*. 2018. T. 33. № 6. C. 252–257.
24. Wu X. et al. Circ_0007444 Inhibits the Progression of Ovarian Cancer via Mediating the miR-570-3p/PTEN Axis // *Onco Targets Ther*. 2021. T. 14. C. 97–110.
25. Ouyang Y. et al. Downregulation of microRNA-429 inhibits cell proliferation by targeting p27Kip1 in human prostate cancer cells // *Mol Med Rep*. 2015. T. 11. № 2. C. 1435–1441.
26. Cavallari I. et al. The miR-200 Family of microRNAs: Fine Tuners of Epithelial-Mesenchymal Transition and Circulating Cancer Biomarkers // *Cancers (Basel)*. 2021. T. 13. № 23.
27. Li T. et al. Exosomal transfer of miR-429 confers chemoresistance in epithelial ovarian cancer // *Am J Cancer Res*. 2021. T. 11. № 5. C. 2124.
28. Nilsen A. et al. miR-200a/b/-429 downregulation is a candidate biomarker of tumor radioresistance and independent of hypoxia in locally advanced cervical cancer // *Mol Oncol*. 2022. T. 16. № 6. C. 1402.

29. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention (GINA). – 2023. – 217 p. – Режим доступа: <https://ginasthma.org/>.
30. Sheikhpour M., Maleki M., Vargoorani M. E., Amiri V. A review of epigenetic changes in asthma: methylation and acetylation // *Clin Epigenetics*. – 2021. – Vol. 13. – P. 65. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01049-x>
31. Hernandez-Pacheco N., Pino-Yanes M., Flores C. Genomic predictors of asthma phenotypes and treatment response // *Front. Pediatr.* – 2019. – Vol.7. – Art. 6 – P. 1-19. DOI: 10.3389/fped.2019.00006.
32. Torkamani A., Wineinger N.E., Topol E. J. The personal and clinical utility of polygenic risk scores // *Nature Reviews Genetics*. – 2018. – Vol. 19. – P. 581-590.
33. Kullo I.J., Lewis C.M., Inouye M. et al. Polygenic scores in biomedical research // *Nature Reviews Genetics*. – 2022. – Vol. 23. – P. 524-532. doi: 10.1038/s41576-022-00470-z.
34. Choi, S. W. Tutorial: a guide to performing polygenic risk score analyses / S. W. Choi, T. S.-H. Mak, P. F. O'Reilly // *Nature Protocols*. – 2020. – Vol. 15. – P. 2759-2772.
35. Mavaddat N., Michailidou K., Dennis J. et al. Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes // *Am J Hum Genet.* – 2019. – Vol. 104(1). – P.21-34. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.11.002.
36. Spycher, B.D., Henderson J., Granell R. et al. Genome-wide prediction of childhood asthma and related phenotypes in a longitudinal birth cohort // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2012. – Vol. 130. – P. 503–509.e7. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.06.002
37. Sordillo J.E., Lutz S.M., Jorgenson E. et al. A polygenic risk score for asthma in a large racially diverse population // *Clin Exp Allergy*. – 2021. – Vol. 0. – P.1-11. DOI: 10.1111/cea.14007
38. Kothalawala D.M., Kadalayil L., Curtin J. A. et al. Integration of Genomic Risk Scores to Improve the Prediction of Childhood Asthma Diagnosis // *J Pers Med.* – 2022. – Vol. 12(1). – P. 75. DOI: 10.3390/jpm12010075.
39. Wasti B., Liu Shao-kun, Xiang X.-D. Role of Epigenetics in the Pathogenesis, Treatment, Prediction, and Cellular Transformation of Asthma // *Mediators of Inflammation*. 2021. – Vol. 2021. – Article ID 9412929. <https://doi.org/10.1155/2021/9412929>
40. Legaki E., Arsenis C., Taka S., Papadopoulos N.G. DNA methylation biomarkers in asthma and rhinitis: Are we there yet? // *Clin Transl Allergy*. – 2022. – Vol. 12(3). – P. e12131. doi: 10.1002/clt2.12131
41. Быстрицкая Е.П., Ганковская Л.В., Намазова-Баранова Л.С и др. Эпигенетика TLR2 и TLR4 и их роль в патогенезе аллергической астмы и инфекционной пневмонии. *Вакцинология*

- как ответ биологическим угрозам. Сборник тезисов молодых ученых в рамках научной конференции с международным участием. 2019.
42. Смолкина О.Ю., Быстрицкая Е.П., Свитич О.А. и др. Анализ метилирования ДНК в пораженной и непораженной коже у взрослых пациентов с atopическим дерматитом // Молекулярная медицина. – 2021. – Том 19, № 1. – С. 53-58. doi.org/10.29296/24999490-2021-01-08.
43. Быстрицкая Е.П., Мурашкин Н.Н., Материкин А.И. и др. Полногеномный профиль метилирования ДНК и экспрессия генов TLR2, TLR9, IL4, IL13 при atopическом дерматите у детей и подростков // Иммунология. – 2022. – № 43(3). – С.255–265. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-3-255-265>.
44. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва: Издательский дом «Атмосфера», 2012. — 182 с.
45. Park H.W., Dahlin A., Tse S. et al. Genetic predictors associated with improvement of asthma symptoms in response to inhaled corticosteroids // J Allergy Clin Immunol. – 2014. – Vol. 133 (3). – P. 664-669. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.12.1042
46. Rogers A.J., Tantisira K.G., Fuhlbrigge A.L. et al. Predictors of poor response during asthma therapy differ with definition of outcome. Pharmacogenomics. – 2009. – Vol. 10 (8). – P. 1231-42. DOI: 10.2217/pgs.09.86
47. Mougey E.B., Chen C., Tantisira K.G. et al. Pharmacogenetics of asthma controller treatment // Pharmacogenomics J. – 2013. – Vol. 13 (3). – P. 242-250. DOI: 10.1038/tpj.2012.5.
48. Edris A., de Roos E. W., McGeachie M.J. Pharmacogenetics of inhaled corticosteroids and exacerbation risk in adults with asthma // Clin Exp Allergy. – 2021. – Vol. 0. – P.1-13. DOI: 10.1111/cea.13829.
49. Tantisira K.G., Lasky-Su J., Harada M., Murphy A. et al. Genome wide association between GLCCI1 and response to glucocorticoid therapy in asthma // N Engl J Med. – 2011. – Vol. 365 (13). – P. 1173-83. DOI: 10.1056/NEJMoa0911353.
50. Izuhara Y., Matsumoto H., Kanemitsu Y. et al. GLCCI1 variant accelerates pulmonary function decline in patients with asthma receiving inhaled corticosteroids // Allergy. – 2014. – Vol. 69 (5). – P. 668-673. doi: 10.1111/all.12400.
51. Hu C, Xun Q, Li X, et al. GLCCI1 variation is associated with asthma susceptibility and inhaled corticosteroid response in a Chinese Han population // Arch Med Res. – 2016. – Vol.47(2). – P. 118-125. doi:10.1016/j.arcmed.2016.04.005

52. Xu Y, Wu H., Wu X. et al. *GLCCI1* rs37973: A potential genetic predictor of therapeutic response to inhaled corticosteroids in Chinese asthma patients // *Medicine (Baltimore)*. – 2017. – Vol. 96 (52). – P. e9442. DOI: [10.1097/MD.00000000000009442](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009442)
53. Salhi M., Lahmar O., Salah M. O. et al. *GLCCI1* and *STIP1* variants are associated with asthma susceptibility and inhaled corticosteroid response in a Tunisian population // *J Asthma*. – 2021. – Vol. 58 (2). – P.197-206. DOI: [10.1080/02770903.2019.1666867](https://doi.org/10.1080/02770903.2019.1666867).
54. Huang J., Hu X., Zheng X. et al. Effects of *STIP1* and *GLCCI1* polymorphisms on the risk of childhood asthma and inhaled corticosteroid response in Chinese asthmatic children // *BMC Pulm Med*. – 2020. – Vol. 20. – P. 303. <https://doi.org/10.1186/s12890-020-01332-2>
55. Dahlin A., Denny J., Roden D.M. et al. *CMTR1* is associated with increased asthma exacerbations in patients taking inhaled corticosteroids // *Immun Inflamm Dis*. – 2015. – Vol. 3(4). – P. 350-9. DOI: [10.1002/iid3.73](https://doi.org/10.1002/iid3.73).
56. Tantisira K.G., Damask A., Szeffler S.J. et al. Genome-wide association identifies the *T* gene as a novel asthma pharmacogenetic locus // *Am J Respir Crit Care Med*. – 2012. – Vol. 185 (12). – P. 1286-91. DOI: [10.1164/rccm.201111-2061OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201111-2061OC)
57. Jiang Y., Xun Q., Wan R. et al. *GLCCII* gene body methylation in peripheral blood is associated with asthma and asthma severity. *Clin Chim Acta*. 2021. Vol. 523. P. 97-105.
58. Kiuchi Z., Nishibori Yu., Kutsuna S. et al. *GLCCI1* is a novel protector against glucocorticoid-induced apoptosis in T cells // *The FASEB journal*. – 2019. – Vol. 33 (6). – P. 7387-7402. <https://doi.org/10.1096/fj.201800344RR>.
59. Hu C.P., Xun Q.F., Li X.Z., et al. Effects of glucocorticoid-induced transcript 1 gene deficiency on glucocorticoid activation in asthmatic mice // *Chin Med J (Engl)*. – 2018. – Vol. 31(23). – P. 2817-2826. doi:[10.4103/0366-6999.246061](https://doi.org/10.4103/0366-6999.246061)
60. Howard G. M. et al. Genetic and environmental contributions to the association between quantitative ultrasound and bone mineral density measurements: A twin study // *J. Bone Miner. Res*. – 1998. – V. 13. – № 8. – P. 1318-1327.
61. Rivadeneira F. et al. Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies // *Nat. Genet*. – 2009. – V. 41. – № 11. – P. 1199-1206.
62. Xu F. et al. The Roles of Epigenetics Regulation in Bone Metabolism and Osteoporosis // *Front. Cell Dev. Biol*. – 2021. – T. 8. – P. 1-6.
63. Visconti V.V. et al. Dna methylation signatures of bone metabolism in osteoporosis and osteoarthritis aging-related diseases: An updated review // *Int. J. Mol. Sci*. – 2021. – T. 22. – № 8. – P. 1-6.

64. Huai Y. et al. A Comprehensive Analysis of MicroRNAs in Human Osteoporosis // *Front. Endocrinol. Lausanne.* – 2020. – V. 11. – P. 516213.
65. Plotnikova O., Baranova A., Skoblov M. Comprehensive Analysis of Human microRNA–mRNA Interactome // *Front. Genet.* – 2019. – V. 10. – P. 1-6.
66. Cloonan N. Re-thinking miRNA-mRNA interactions: Intertwining issues confound target discovery // *BioEssays.* – 2015. – V. 37. – № 4. – P. 379-388.
67. Zhang F., Wang D. The pattern of microRNA binding site distribution // *Genes (Basel).* – 2017. – V. 8. – № 11. – P. 296.
68. Yalaev B. et al. Using a Polygenic Score to Predict the Risk of Developing Primary Osteoporosis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23. – № 17. – P. 1-9.
69. Lei S. F., Papasian C. J., Deng H. W. Polymorphisms in predicted miRNA binding sites and osteoporosis // *J. Bone Miner. Res.* – 2011. – V. 26. – № 1. – P. 72-78.
70. Lin Y. et al. MRNA and long non-coding RNA expression profiling of human periodontal ligament cells under tension loading // *Eur. J. Orthod.* – 2021. – V. 43. – № 6. – P. 698-707.
71. Baltzer A.W. A. et al. Gene therapy for osteoporosis: Evaluation in a murine ovariectomy model // *Gene Ther.* – 2001. – V. 8. – № 23. – P. 1770-1776.
72. Chen Y., Zhang C. Role of noncoding RNAs in orthodontic tooth movement: new insights into periodontium remodeling // *J. Transl. Med.* – 2023. – V. 21. – № 1. – P. 1-6.
73. Wang Y., Grainger D. W. RNA therapeutics targeting osteoclast-mediated excessive bone resorption // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2012. – V. 64. – № 12. – P. 1341-1357.
74. Gan W. et al. Bone mineral density and risk of type 2 diabetes and coronary heart disease: A Mendelian randomization study // *Wellcome open Res.* – 2017. – V. 2. – P. 1-6.
75. Ghafour A.A. et al. High expression level of miR-1260 family in the peripheral blood of patients with ovarian carcinoma // *J. Ovarian Res.* – 2021. – V. 14. – P. 131.
76. Byrne J. A. et al. Tumor protein D52 (TPD52) and cancer – oncogene understudy or understudied oncogene? // *Tumor Biol.* – 2014. – V. 35. – № 8. – P. 7369-7382.
77. Byrne et al. A screening method to identify genes commonly overexpressed in carcinomas and the identification of a novel complementary DNA sequence // *Cancer Res.* – 1995. – V. 55. – № 13. – P. 2896-903.
78. Chen S.L. et al. Isolation and characterization of a novel gene expressed in multiple cancers // *Oncogene.* – 1996. – V. 12. – № 4. – P. 741-51.
79. Wang L.L., Zhang M. miR-582-5p is a potential prognostic marker in human non-small cell lung cancer and functions as a tumor suppressor by targeting MAP3K2 // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2018. – V. 22. – № 22. – P. 7760-7767.

80. Shi H. et al. Primary Angle Closure and Sequence Variants within MicroRNA Binding Sites of Genes Involved in Eye Development // *PLoS One*. – 2016. – V. 11. – № 11. – P. 1-6.
81. Hollander W. den et al. Annotating Transcriptional Effects of Genetic Variants in Disease-Relevant Tissue: Transcriptome-Wide Allelic Imbalance in Osteoarthritic Cartilage // *Arthritis Rheumatol*. – 2019. – V. 71. – № 4. – P. 561-570.
82. Zhou H., Rigoutsos I. MiR-103a-3p targets the 5' UTR of GPRC5A in pancreatic cells // *RNA*. – 2014. – V. 20. – № 9. – P. 1431.
83. Lu J., Wu Z., Xiong Y. Knockdown of long noncoding RNA HOTAIR inhibits osteoarthritis chondrocyte injury by miR-107/CXCL12 axis // *J. Orthop. Surg. Res.* – 2021. – V. 16. – № 1. – P. 1-6.
84. Wang Z. et al. Roles of F-box proteins in cancer // *Nat. Rev. Cancer*. – 2014. – V. 14. – № 4. – P. 233.
85. Dong X., Cong S. Bioinformatic analysis of microRNA expression in Huntington's disease // *Mol. Med. Rep.* – 2018. – V. 18. – № 3. – P. 2857.
86. Schoen C. et al. Differential microRNA expression in cultured palatal fibroblasts from infants with cleft palate and controls // *Eur. J. Orthod.* – 2018. – V. 40. – № 1. – P. 90-96.
87. Vining B. et al. Diverse Regulation but Conserved Function: SOX9 in Vertebrate Sex Determination // *Genes (Basel)*. – 2021. – V. 12. – № 4. – P. 1-6.
88. Zhang Z. et al. Evidence for circulating microRNA hsa-let-7d-3p as a potential new biomarker for sepsis in human subject // *Eur J Med Res.* – 2020. – V. 27. – № 1. – P. 137.
89. Roumeliotis S. et al. Biomarkers of vascular calcification in serum // *Adv. Clin. Chem.* – 2020. – V. 98. – P. 91-147.
90. Rosset E. M., Bradshaw A. D. SPARC/osteonectin in mineralized tissue // *Matrix Biol.* – 2016. – V. 52–54. – P. 78-87.
91. Sun Y., Wang J., Meng Y. Correlation Between Polymorphisms of the SIRT1 Gene microRNA Target Sites and Diabetic Nephropathy // *Genet Test Mol Biomarkers.* – 2021. – T. 25. – № 6. – P. 387-398.
92. Choupani J. et al. Association of mir-196a-2 rs11614913 and mir-149 rs2292832 polymorphisms with risk of cancer: An updated meta-analysis // *Front. Genet.* – 2019. – V. 10. – P. 186.
93. Zhu D. L. et al. A functional SNP regulated by miR-196a-3p in the 3'UTR of FGF2 is associated with bone mineral density in the Chinese population // *Hum. Mutat.* – 2017. – V. 38. – № 6. – P. 725-735.
94. Xiao Y. et al. Association of microRNAs genes polymorphisms with arthritis: a systematic review and meta-analysis // *Biosci. Rep.* – 2019. – V. 39. – № 7. – P. 1-6.

95. Pauley K. M. et al. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients // *Arthritis Res. Ther.* – 2008. – V. 10. – № 4. – P. 1-6.
96. Ahn T.K. et al. Polymorphisms of miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 are associated with osteoporotic vertebral compression fractures in Korean postmenopausal women // *J. Orthop. Res.* –2018. – V. 36. – № 1. – P. 244-253.
97. Yan Y. et al. Genetic susceptibility to total hip arthroplasty failure: a case–control study on the influence of MMP 1 gene polymorphism // *Diagn. Pathol.* – 2014. –V. 9. – № 1. – P. 177.
98. Kudo M. et al. Regional Differences in Efficacy, Safety, and Biomarkers for Second-Line Axitinib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: From a Randomized Phase II Study // *Liver Cancer.* – 2018. – V. 7. – № 2. – P. 148.
99. Qi T. et al. Function and regulation of the PEA3 subfamily of ETS transcription factors in cancer // *Am. J. Cancer Res.* 2020. – V. 10. – № 10. – P. 3083.
100. Fink, J.K. Advances in hereditary spastic paraplegia // *Curr Opin Neurol.* – 1997. – T. 10. - №4. – C. 313-318.
101. Harding, A. E. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias // *The Lancet.* – 1983. – V. 321. – №. 8334. – P. 1151-1155.
102. Fonknechten N. Mavel D., Byrne B. et al. Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia /N. Fonknechten, // *Human Molecular Genetics.* – 2000. – V. 9. – №. 4. – P. 637-644.
103. Namekawa M., Nelson I., Ribai P. et al. M. A founder effect and mutational hot spots may contribute to the most frequent mutations in the SPG3A gene // *Neurogenetics.* – 2006. – T. 7, №. 2. – P. 131-132.
104. Zuñchner S., Wang G., Tran-Viet et al. Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31 // *The American Journal of Human Genetics.* – 2006. – T. 79. – №. 2. – P. 365-369.
105. Hewamadduma C., McDermott C., Kirby J. et al. New pedigrees and novel mutation expand the phenotype of REEP1-associated hereditary spastic paraplegia (HSP) // *Neurogenetics.* – 2009. – T. 10, №. 2. – P. 105-110.
106. Klebe S., Stevanin G., Depienne C. Clinical and genetic heterogeneity in hereditary spastic paraplegias: from SPG1 to SPG72 and still counting. *Rev Neurol (Paris)* 2015 Jun–Jul;171(6–7):505–30.
107. Lo Giudice T., Lombardi F., Santorelli F.M., Kawarai T., Orlacchio A. Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol.*

- 2014 Nov;261:518-39. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.06.011. Epub 2014 Jun 20. PMID: 24954637.
108. Reid E., Kloos M., Ashley-Koch A., Hughes L., Bevan S., Svenson IK, et al. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet.* 2002 Nov;71(5):1189–94.
109. Tessa A., Silvestri G., de Leva M.F. et al. A novel KIF5A/SPG10 mutation in spastic paraplegia associated with axonal neuropathy. *J Neurol.* 2008 Jul;255(7):1090-2. doi: 10.1007/s00415-008-0840-8. Epub 2008 Jun 2. PMID: 18500496.
110. Cuchanski M/, Baldwin K.J. Mutation in KIF5A c.610C>T Causing Hereditary Spastic Paraplegia with Axonal Sensorimotor Neuropathy. *Case Rep Neurol.* 2018 Jul 4;10(2):165-168. doi: 10.1159/000490456. PMID: 30057544; PMCID: PMC6062669.