

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

УДК 577.21
Рег.№ НИОКТР
AAAA-A20-120073190038-2

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
_____ С.В. Микушев
«__» _____ 2024 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 2)

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

Э.К.Хуснутдинова

Санкт-Петербург 2024

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, главный научный сотрудник СПбГУ доктор биологических наук, профессор	_____	Хуснутдинова Эльза Камилевна (руководство, редактирование статей и отчёта)
	(подпись, дата)	
	Исполнители:	
ведущий научный сотрудник СПбГУ доктор биологических наук, доцент	_____	Карунас Александра Станиславовна (анализ данных, написание статей – раздел 2.2)
	(подпись, дата)	
ведущий научный сотрудник СПбГУ доктор биологических наук, профессор	_____	Хидиятова Ирина Михайловна (проведение экспериментов, написание статей – раздел 2.3)
	(подпись, дата)	
ведущий научный сотрудник СПбГУ доктор биологических наук	_____	Бермишева Марина Алексеевна (проведение экспериментов, написание статей – раздел 2.1.1)
	(подпись, дата)	
ведущий научный сотрудник СПбГУ доктор биологических наук	_____	Хусаинова Рита Игоревна (анализ данных, написание статей – раздел 2.1.2)
	(подпись, дата)	
старший научный сотрудник СПбГУ кандидат биологических наук	_____	Гилязова Ирина Ришатовна (проведение экспериментов, написание статей – раздел 2.1.3)
	(подпись, дата)	
научный сотрудник СПбГУ кандидат биологических наук	_____	Иванова Елизавета Алексеевна (проведение экспериментов, написание статей – раздел 2.1.3)
	(подпись, дата)	
научный сотрудник СПбГУ кандидат биологических наук	_____	Савельева Ольга Николаевна (проведение экспериментов, написание статей – раздел 2.2)
	(подпись, дата)	
научный сотрудник СПбГУ кандидат биологических наук	_____	Зарипова Алия Рамилевна (проведение экспериментов, написание статей – раздел 2.1.2)
	(подпись, дата)	
нормоконтролер	_____	Вершинин Андрей Владимирович
	(подпись, дата)	

РЕФЕРАТ

Отчет: 61 страница, 1 кн., 7 рисунков, 16 таблиц, 80 использованных источников.
МОНОГЕННЫЕ И МНОГОФАКТОРНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ГЕНЫ, ЭКЗОМ

Объект исследования: ДНК пациентов, жителей Республики Башкортостан с раком молочной железы и яичников, раком шейки матки, раком предстательной железы, бронхиальной астмой, наследственной спастической параплегией.

Цель – раскрытие молекулярных механизмов патогенеза многофакторных заболеваний – онкологических, аллергических, 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 анализ редких вариантов в генах предрасположенности к раку молочной железы; анализ ассоциации полиморфных локусов генов *MTHFR*, *MET*, *CHEK2*, *CLPTMIL*, *PAX8*, *CDC42* с развитием рака шейки матки у женщин из Республики Башкортостан; определение полигенного риска для прогноза развития рака предстательной железы на основе анализа генов биогенеза микроРНК; 2) исследования по идентификации генетических и эпигенетических маркеров риска развития аллергических заболеваний на основе анализа генов, участвующих в метаболизме гистамина, у больных бронхиальной астмой; 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. Анализ редких вариантов в генах предрасположенности к раку молочной железы.....	8
2.1.2. Анализ ассоциации полиморфных локусов генов MTHFR, MET, CHEK2, CLPTM1L, RAX8, CDC42 с развитием рака шейки матки у женщин из Республики Башкортостан....	12
2.1.3 Полигенные шкалы риска для прогноза развития рака предстательной железы на основе анализа генов биогенеза микроРНК.....	22
2.2. Поиск генетических и эпигенетических маркеров риска развития аллергических заболеваний на основании анализа генов, участвующих в метаболизме гистамина ..	28
2.3. 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.....	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	54
СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ И ПРИНЯТЫХ К ПЕЧАТИ В 2024 ГОДУ.....	57
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	58

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- GWAS – genome-wide association study – полногеномный анализ ассоциаций
- NGS – next generation sequence – секвенирование следующего поколения
- SNP (ОНП) – single nucleotide polymorphism – однонуклеотидные полиморфные варианты
- АД - атопический дерматит
- АЗ - аллергические заболевания
- АР - аллергический ринит
- БА – бронхиальная астма
- ВПЧ – вирус папилломы человека
- ВПЧ ВКР - вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- НСП – наследственные спастические параличи
- ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в реальном времени
- РБ – Республика Башкортостан
- РМЖ – рак молочной железы
- РПЖ – рак предстательной железы
- РШМ – рак шейки матки
- 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 шейки матки, 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.

Актуальность клинико-молекулярно-генетических исследований моногенных (олигогенных) патологий нервной системы связана с их широкой клинической и генетической гетерогенностью, перекрытием патогенетических механизмов различных нозологий и значительной долей случаев заболеваний с неустановленной генетической причиной. Поиск молекулярно-генетических причин их развития с использованием технологий секвенирования нового поколения открывает перспективы дальнейшего развития этого направления, нацеленного на разработку новых эффективных подходов диагностики, профилактики и лечения таких болезней.

В связи с вышесказанным, планируется провести комплексное исследование генетических и эпигенетических механизмов развития ряда онкологических и

аллергических заболеваний, а также отдельных наследственных заболеваний нервной системы с использованием современных технологий геномного анализа для разработки эффективных подходов диагностики, профилактики и лечения этих заболеваний.

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

В соответствии с целью, на 2024 год были поставлены следующие задачи:

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

- анализ редких вариантов в генах предрасположенности к раку молочной железы;
- анализ ассоциации полиморфных локусов генов *MTHFR*, *MET*, *CHEK2*, *CLPTM1L*, *PAX8*, *CDC42* с развитием рака шейки матки у женщин из Республики Башкортостан;
- определение полигенного риска для прогноза развития рака предстательной железы на основе анализа генов биогенеза микроРНК.

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

3. Провести полное секвенирование экзома у пациентов с наследственной спастической параплегией 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 Анализ редких вариантов в генах предрасположенности к раку молочной железы

Секвенирование таргетной панели генов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями, проводили на образцах ДНК, выделенных из лейкоцитов периферической крови пациентов с РМЖ или РЯ. Анализировались следующие гены: *ABL1, AKT1, ALK, APC, AR, ARID1A, ASXL1, ATM, ATR, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMP1A, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRIP1, BTNL2, CD82, CDC73, CDH1, CDK4, CDKN1B, CDKN2A, CEBPA, CHEK2, CTNNA1, CYLD, DDB2, DDR2, DICER1, EGFR, ELAC2, EPCAM, ERBB2, ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5, EXT1, EXT2, EZH2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCL, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FH, FLCN, GATA2, GDNF, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HNF1B, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDM6A, KDR, KIF1B, KIT, KMT2A, KMT2D, KRAS, LIG4, LZTR1, MAP2K1, MAX, MC1R, MEN1, MET, MITF, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH3, MSH6, MSRI, MTOR, MUTYH, MXI1, NBN, NF1, NF2, NOTCH1, NRAS, NSD1, PALB2, PALLD, PAX5, PDGFRA, PDGFRB, PHOX2B, PIK3CA, PIK3R1, PMS2, POLD1, POLE, POLH, POT1, PRKARIA, PRSS1, PTCH1, PTEN, PTPN11, RAD50, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL4, RET, RNASEL, RUNX1, SBDS, SDHA, SDHA2, SDHB, SDHC, SDHD, SLX4, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, SMO, SPINK1, SPRED1, STK11, SUFU, TMEH127, TP53, TSC1, TSC2, TSHR, VHL, WRN, WT1, XPA, XPC, XRCC3, ZFX3. В ряде случаев проводили секвенирование полного экзона.*

Фрагментация ДНК, подготовка библиотек и “захват” экзона были выполнены в соответствии с инструкциями фирмы-изготовителя. Секвенирование экзона осуществлялось на платформе Illumina Genome Analyzer HiSeq 1500 или 2500 (производство Illumina, США). Полученные прочтения картировали на референсный геном с использованием программы Burrows-Wheeler Alignment (BWA). При анализе результатов в качестве референсной использовалась последовательность генома человека (Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37 - hg19)). Определение вариантов осуществляли с помощью The Genome Analysis Tool Kit (GATK) version 3.3. Обнаруженные варианты аннотировались с помощью программного обеспечения ANNOVAR с использованием скриптов `table_annoar.pl`, `annotate_variation.pl`, позволяющей сравнивать однонуклеотидные замены, полученные в результате секвенирования, с рядом специализированных баз данных и аннотировать предсказательную функциональную значимость выявленных изменений с использованием десяти баз данных (SIFT, PolyPhen-2, LRT, Mutation Assessor, Mutation Taster, FATHMM, PROVEAN, MetaSVM, MetaLR, M-

CAP) из dbNSFPv. 3.3a, а также баз данных ICGCv.21 (International Cancer Genome Consortium), COSMIC v.70 (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer). Кроме того, дополнительно использовали инструменты SnpEff (effect prediction tool box) и CADD (Combined Annotation Dependent Depletion).

Секвенирование по Сэнгеру было выполнено с использованием Big Dye Terminator Cycle v1.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3500 или ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) согласно протоколу фирмы производителя. Реакционная смесь для секвенирования в общем объеме 10 мкл содержала: 2 мкл очищенного ПЦР -продукта, 1 мкл праймеров (5μM) и 1.5 μl Big Dye смеси. Для проведения реакции секвенирования использовали следующую программу: I Денатурация -95°C – 5 мин; 25 циклов: (II Денатурация -94°C –30 сек; III Отжиг праймеров – 50°C – 15 сек; IV Элонгация – 60°C – 4 мин). Готовый продукт для секвенирования очищали, добавляли 95% формамид, инкубировали в течение часа в темном месте, денатурировали 2-3 мин при 93°C и помещали в секвенатор. Анализ нуклеотидной последовательности осуществляли с помощью программ ChromasPro, FinchTV и BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

В результате массового параллельного секвенирования панели генов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями, у пациентки с наследственным РМЖ был выявлен вариант с.2395C>T, p.Arg799Trp (rs121913049) в гене *ERCC4* (NM_005236.2). Наличие данной замены подтверждено секвенированием по Сэнгеру (Рисунок 1).

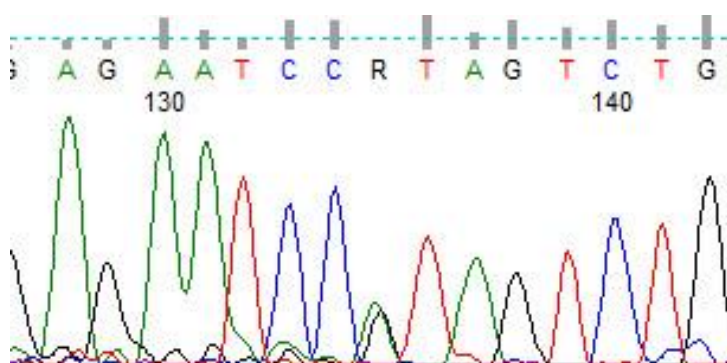


Рисунок 1 - определение мутации с.2395C>T в гене *ERCC4*

Выявленная мутация с.2395C>T локализована в эволюционно высоко консервативной области *ERCC4* (Doi et al., 2018) и является редкой, согласно рзличным базам данных: 0.00051 (ExAC), 0.00013 (gnomAD), 0.00048 (gnomAD (exomes)) и 0.00143 (TOPMed). Клиническое значение в Clin Var для варианта p.Arg799Trp соответствует

группе неопределенного значения, согласно предсказательным программам Polyphen - вероятно патогенный (probably_damaging), SIFT - патогенный (deleterious).

Пристальное внимание исследователей к гену *ERCC4*, вызвано тем, что *ERCC4* является универсальным белком, который необходим для различных типов репарации ДНК [1]. Дефекты *ERCC4* приводят к возникновению таких патологических состояний как пигментная ксеродерма группы комплементации F (XP-F), синдром Коккейна (CS), прогероидный синдром XFE (XFE), для которых характерны повышенная чувствительность к УФ свету, высокий риск возникновения рака, а также проявление симптомов нейродегенеративных заболеваний [2; 3]. Биаллельные мутации в гене *ERCC4* приводят к развитию анемии Фанкони типа Q (FANCOQ) [4].

Оценка риска развития онкологических заболеваний у гетерозиготных носителей патогенных вариантов в генах анемии Фанкони является важным направлением эпидемиологических исследований, поскольку хорошо известно, что носительство определенных гетерозиготных мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *SLX4*, *XPE*, *PALB2* в той или иной степени ассоциировано с повышенным риском развития РМЖ, рака яичников, рака пищевода и др.

Мутация *ERCC4**p.Arg799Trp в гетерозиготном состоянии обнаружена у пациентки с РМЖ татарского происхождения, у которой в возрасте 43 лет был диагностирован скirrрозный рак молочной железы. У ее сестры также был выявлен РМЖ. Вследствие отсутствия данных о частоте распространения *ERCC4**p.Arg799Trp в популяции нашего региона, которые необходимы для правильной интерпретации полученных результатов и оценки риска заболевания, мы провели скрининг мутантного аллеля на расширенной выборке больных РМЖ и контрольной группы. В результате исследования выявлены гетерозиготные носители *ERCC4**p.Arg799Trp как у пациенток с РМЖ (3 / 966), так и в группе контроля (1 / 686). У больных РМЖ частота мутантного варианта несколько выше, чем у здоровых женщин (0.31% и 0.15%, соответственно), но различия не достигают статистической значимости ($p > 0.05$). Вариант *ERCC4**p.Arg799Trp обнаружен у женщин разной этнической принадлежности, проживающих в Башкортостане, не демонстрируя специфичности для одной конкретной популяции. Клинические характеристики пациенток с РМЖ с мутацией *ERCC4**p.Arg799Trp представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристика пациенток с РМЖ - носительниц мутации с.2395С > Т в гене *ERCC4*

возраст	семейная история	TNM	гистология	этническая принадлежность
43	РМЖ	T2N1M0	скиррозный РМЖ, G3	татарка
54	-	T4N1M0	аденокарцинома, G1	русская
53	-	T1N0M0	инфильтрирующая протоковая карцинома	татарка

Примечание: РМЖ - рак молочной железы, РБ - Республика Башкортостан.

Ген *ERCC4* кодирует XPF (Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group F) - компонент эндонуклеазы ERCC1 / XPF, которая расщепляет ДНК в месте перехода дцДНК / оцДНК с 5'-стороны от повреждения и функционирует в эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), участвует в восстановлении межцепочечных сшивок (ICLs, interstrand cross-links). Показано, что нарушения как в процессах репарации GG-NER (global genome nucleotide excision repair), так и в TC -NER, сопряженной с транскрипцией (transcription-coupled nucleotide excision repair), являющихся разными вариантами NER и различающихся на уровне начального узнавания повреждения, и репарации ICL были связаны с фенотипами XP, CS (Cockayne Syndrome) и FA (Fanconi Anemia). Мутации *ERCC4* по-разному влияют на эти репаративные функции и вызывают различные фенотипы [2; 3]. Согласно литературным данным у пациентов с наследственной аутосомно-рецессивной церебеллярной атаксией была выявлена мутация с.2395С>Т (p.Arg799Trp) в гене *ERCC4* как в гомозиготном состоянии, так и в компаунд гетерозиготе [5]. У ЦА пациента с мутацией *ERCC4**p.Arg799Trp в гомозиготе от рака умерли две сестры. По данным исследования Doi et al. частота мутантного аллеля с.2395С>Т составила 0.0052 (3 / 575) при анализе экзомов «внутреннего» японского контроля, что на порядок выше, чем в базе данных Exome Aggregation Consortium (ExAc) - 0.00051 (62 / 121398) [5].

Мутация p.Arg799Trp в гене *ERCC4* также была обнаружена в компаунд гетерозиготе у больного с прогероидным синдромом (Atypical Werner syndrome) [6], клиническими проявлениями которого являются преждевременное старение, развитие злокачественных опухолей, вызванные нестабильностью генома. Молекулярный анализ выявил значительное снижение экспрессии мутантного *ERCC4* / XPF, что согласуется с результатами предыдущих исследований, где показано, что с.2395С>Т (p.Arg799Trp) вызывает нестабильность белка и его неправильную локализацию [7], также было выявлено нарушение в работе NER [6].

Многочисленные исследования свидетельствуют в пользу того, что нарушения *ERCC4* связаны с развитием онкологических заболеваний. Так, герминальная мутация c.1536dupA (p.G513Rfs) определена при эндометриодной карциноме тела матки (endometrioid endometrial carcinoma) [8]. Зародышевая мутация c.1853G>T (p.Arg618Leu) в гене *ERCC4* была выявлена у пациентки с раком легкого [9]. При таргетном секвенировании генома была обнаружена нонсенс мутация c.2169C>A (p.Cys723*) в гене *ERCC4* при sporadic саркоме у больных с манифестацией заболевания до 50 лет [10].

Проведение дальнейших исследований спектра и частот мутаций в гене *ERCC4* при изучении генетической структуры РМЖ в разных популяциях поможет оценить роль эндонуклеазы *ERCC4* в патогенезе заболевания.

2.1.2 Анализ ассоциации полиморфных локусов генов *MTHFR*, *MET*, *CHEK2*, *CLPTMIL*, *PAX8*, *CDC42* с развитием рака шейки матки у женщин из Республики Башкортостан

Рак шейки матки (РШМ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний у женщин. Вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) в совокупности с генетическими и эпигенетическими факторами остается основным предиктором риска развития РШМ и других видов аногенитальной карциномы [11; 12]. Персистирующая ВПЧ ВКР обуславливает более 99% РШМ [13]. Предполагается, что генотип ВПЧ является независимым прогностическим фактором предраковых патологий шейки матки (дисплазий), в то время как для РШМ определяющее значение для исхода заболевания имеет распространенность процесса [14]. Урогенитальная папилломавирусная инфекция представляет серьезную медико-социальную проблему не только в клинко-эпидемиологическом аспекте, но и в плане демографических последствий [15]. Несмотря на то что в литературе имеются данные о результатах локальных исследований оценки распространенности ВПЧ-инфекции и его отдельных типов в России, и даже более масштабные исследования, такие как результаты, предоставленные Донниковым и соавторами [16], актуальной задачей остается не только оценка распространенности инфекции на территории нашей страны и ее отдельных регионов, но и попытка проследить течение инфекции у пациенток из группы риска с учетом их клинических данных. Ввиду того что на сегодняшний день отсутствуют надежные маркеры развития РШМ (кроме носительства ВПЧ высокого канцерогенного риска), актуальным является поиск генетических маркеров предрасположенности к РМШ,

которые наряду с ВПЧ-инфекцией позволят проводить эффективную профилактику, диагностику и мониторинг течения заболевания.

Новейшие данные свидетельствуют о том, что герминальные замены не только увеличивают риск развития рака, но и влияют на прогрессирование опухоли и формируют картину соматических изменений при раке [17; 18].

Исходя из этого, целью нашего исследования являлся анализ герминальных мутаций в генах *MTHFR*, *MET*, *CHEK2*, *CLPTM1L*, *PAX8*, *CDC42* для оценки их значимости для формирования генетической предрасположенности к РШМ.

В качестве материала для исследования использована ДНК 111 женщин с клиническим диагнозом РШМ, не состоящих в кровном родстве, проживающих в РБ. Обследование, диагностика и лечение пациенток проводились на базе ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава здравоохранения РБ. Медиана возраста пациенток составила 50 лет. ВПЧ статус по умолчанию считается положительным. По национальности в выборке представлены три наиболее распространенные на территории РБ этнические группы: русские, татары и башкиры. В качестве группы сравнения для генетических исследований была использована ДНК 51 условно-здоровой женщины, у которых была зафиксирована элиминация ВПЧ, а значит носительство вируса не привело ни к персистенции вируса, ни к РШМ. Для некоторых полиморфных вариантов, в случае выявления ассоциации или тенденции к ассоциации, с целью расширения выборки и мощности исследования было также использована ДНК 333 здоровых женщин.

Геномная ДНК была выделена из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Количество и чистоту полученной ДНК оценивали с помощью флуориметра Qubit3.0 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Сингапур) и 1,5% агарозного гель-электрофореза.

Для 108 пациенток был проведен NGS-анализ с использованием разработанной нами кастомной NGS-панели для анализа 48 генов. В проведенном исследовании для обозначения и поиска геномных координат была использована 37 геномная сборка ([GRCh37](#)). Подготовка библиотек образцов для проведения NGS-анализа была произведена при помощи набора реагентов KAPA HyperCapWorkflowv3.0 (Roche diagnostics, Германия). Все этапы пробоподготовки мультиплексной, гибридизированной, обогащенной библиотеки были выполнены в соответствии с инструкцией, предложенной производителем. NGS-секвенирование выполнено при помощи секвенатора нового поколения MiSeq Series (Illumina, США) и набора реагентов MiSeqReagentKit v2 (300-циклов) (Illumina, США). Вторичный анализ полученных FASTQ-файлов произведен

отдельно по каждому образцу в облачном сервисе по анализу данных «Illumina BaseSpace» в приложении «BWA Enrichment» (Illumina, США). В результате этого мы получили vsf-файлы, содержащие информацию о различиях последовательностей исследуемой ДНК в сравнении с референсным геномом, и проанализировали образцы при помощи базы данных «Variant Interpreter» (Illumina, США). В результате такой обработки нами было получено 6 групп изменений нуклеотидной последовательности: доброкачественные (B), вероятно доброкачественные (LB), патогенные (P), условно патогенные (LP), варианты с неясным значением (VUS) и замены, о которых нет информации в используемой базе данных.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием технологии TaqMan для rs1801133 и rs1801131 гена *MTHFR* была выполнена при помощи набора реактивов «Синтол» (Россия), согласно инструкции производителя с использованием детектирующего амплификатора «CFX96» (BioRad, США). ПЦР-РВ для локусов rs34589476 гена *MET*, rs1060502712, rs17879961 гена *CHEK2*, rs27069 гена *CLPTMIL*, rs10175462 гена *PAX8* и rs2268177 гена *CDC42* проведена с использованием реактивов для детекции полиморфизмов “ДНК-Синтез” (Россия) согласно протоколу фирмы производителя с помощью системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени «ДТпрайм» (ДНК-Технология, Россия).

Для статистической обработки данных был использован веб-ресурс Plink с набором инструментов для полногеномного анализа ассоциаций (<https://zzz.bwh.harvard.edu/plink/data.shtml>), с помощью частей операционной системы Microsoft Windows, таких как Excel и Блокнот. Статистический анализ выполнен с применением критериев Краскелла-Уоллеса, медианный тест, критерий χ^2 Пирсона, использовали пакет программ Statistica 12., таблиц сопряженности 2*2. Показатель статистической значимости $p < 0,05$.

Полиморфные варианты в гене MTHFR.

В результате исследования было установлено, что полиморфные варианты rs1801133 и rs1801131 гена *MTHFR*, выявленные нами в результате NGS-анализа 48 генов с использованием кастомной панели, не ассоциированы с риском развития РШМ (таблицы 2 и 3), несмотря на то что в недавнем метаанализе была показана связь этих полиморфных вариантов с риском развития гинекологических раков, в том числе с РШМ, в некоторых этнических группах [19]. Ввиду того что не было обнаружено ассоциации, расширение контрольной группы мы посчитали нецелесообразным.

Таблица 2 – Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs1801133 гена *MTHFR* между группами сравнения

rs1801133	N	Частота вероятного аллеля риска	χ^2 , p	Число генотипов (%)			χ^2 , p
	159	T		TT	TC	CC	
РШМ	108	0,287	$\chi^2=0,003$ p=0,96	7 (0,065)	48 (0,444)	53 (0,491)	$\chi^2=0,59$ p=0,75
Элиминация ВПЧ	51	0,284		2 (0,039)	25 (0,490)	24 (0,471)	

Таблица 3 - Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs1801131 гена *MTHFR* между группами сравнения

rs1801131	N	Частота вероятного аллеля риска	χ^2 , p	Число генотипов			χ^2 , p
	159	C		CC	CA	AA	
РШМ	108	0,324	$\chi^2=0,511$ p=0,475	11 (0,102)	48 (0,444)	49 (0,454)	$\chi^2=0,845$ p=0,655
Элиминация ВПЧ	51	0,284		5 (0,098)	19 (0,373)	27 (0,529)	

Нуклеотидные варианты в гене *CHEK2*

Из 6 нуклеотидных замен, выявленных в гене *CHEK2*, вариант rs17879961 является условно-патогенным, rs1060502712, rs200050883, rs74751600 - варианты с неопределенной значимостью, с.1116C>T, p.(Ser372=) и с.684-107 T>G - доброкачественные варианты (таблица 4). Мы провели дополнительное исследование для условно-патогенного по базам данных варианта с.470A>C (rs17879961) гена *CHEK2* и показали, что данная замена является доброкачественной для РШМ (p=0,58, $\chi^2=0,299$) (таблица 5). Кроме этого, включили в дополнительное исследование вариант rs1060502712, продемонстрировавший тенденцию к ассоциации (p=0,05922, $\chi^2=3,559$). Однако данный вариант слишком редко встречается в популяциях и, вероятно, даже если имел влияние на развитие РШМ, не является фактором предрасположенности к нему (таблица 6).

Таблица 4 - Мутации гена *CHEK2* женщин с клиническим диагнозом рак шейки матки, проживающих на территории РБ

№	Нуклеотидный вариант	Позиция	Количество/ частота	Значимость варианта (ClinVar)
1	c.470A>G, p.(Ile157Thr) rs17879961	chr22:29121087	3 (0,027)	P (5) LP (13) с низкой пенетрантностью (1) Установленный аллель риска(1) VUS (9)
2	c.972C>G, p.(Cys324Trp) rs1060502712	chr22:29095862	1 (0,009)	VUS
3	c.1312C>A, p.(Asp438Tyr) rs200050883	chr22:29091178	1 (0,009)	VUS(15) LB (6)
4	c.1117T>C, p.(Lys373Glu) rs74751600	chr22:29091840	1 (0,009)	VUS(5) B (1)
5	c.1116C>T, p.(Ser372=)	chr22:29091841	1 (0,009)	B
6	CHEK2 c.684-107 T>G	chr22:29108112	21 (0,194)	B

Примечание. P – патогенный, LP – условно-патогенный, VUS – вариант с неизвестным клиническим значением, LB – условно-доброкачественный, B – доброкачественный.

Таблица 5 – Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs17879961 гена *CHEK2* между группами сравнения

rs17879961	N	Частота вероятного аллеля риска	χ^2 , p	Число генотипов			χ^2 , p
				GG	AG	AA	
	492	G		GG	AG	AA	
РШМ	108	0,0139	$\chi^2=0,299$ p=0,585	0 (0,0)	3 (0,028)	105 (0,972)	$\chi^2=0,305$ p=0,582
Контроль	384	0,0195		0 (0,0)	15 (0,039)	369 (0,961)	

Таблица 6 – Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs1060502712 гена *CHEK2* между группами сравнения

rs1060502712	N	Частота вероятного аллеля риска	χ^2 , p	Число генотипов		
				CC	CG	GG
	492	C	$\chi^2=3,559$ p=0,059			
РШМ	108	1 0,005		0 (0,0)	1 (0,009)	107 (0,991)
Контроль	384	0		0 (0,0)	0 (0,0)	384 (1,0)

Нуклеотидные варианты в гене MET

Из 11 замен, выявленных в результате исследования гена *MET*, нуклеотидные замены rs34589476 и rs56391007 являются вероятно доброкачественными, согласно «ClinVar», rs368144654, rs199701987, rs561295443, rs2117113682 - варианты с неопределенной значимостью, варианты rs2117108658, rs2116602432, rs2116602432, rs45516592 и с.1966-18T>G не описаны или описаны скудно (таблица 7). Мы провели дополнительное исследование для варианта с.2908C>T (rs34589476), в результате которого выявили ассоциацию с аллелем T (p=0,001, $\chi^2=10,7$) (таблица 8). Для того, чтобы достоверно установить патогенность данного варианта, необходимо провести функциональное исследование. Однако, согласно литературным данным, этот вариант ранее рассматривался как замена, которая приобретает патогенный эффект предрасположенности к раку при сочетании с онкогеном, который управляет клеточной пролиферацией, но не влияет напрямую на онкотрансформацию [20]. Таким образом, с учетом патогенеза РШМ, эти нуклеотидные варианты могут служить факторами предрасположенности к РШМ, усиливая онкогенный эффект ВПЧ.

Репликация результатов GWAS-исследований

Недавно проведенное крупное полногеномное ассоциативное исследование (GWAS) с оценкой более 9 миллионов однонуклеотидных замен (SNP) выявило генетическую предрасположенность к раку шейки матки, связанную с генами, отвечающими за апоптоз и иммунный ответ клеток, а также ряд ассоциаций с независимыми локусами [21]. В результате проведенного нами анализа источников литературы, мы определили три полиморфных локуса для репликации результатов ассоциаций с РШМ у женщин из Республики Башкортостан. В ходе сравнительного анализа частот аллелей и генотипов между группами сравнения было обнаружено, что аллель G полиморфного локуса rs27069

гена *CLTP1L* ассоциирован с риском развития РШМ ($\chi^2=4,098$, OR=1,395, ДИ=1,01-1,926, $p=0,043$), однако не было выявлено ассоциации с генотипом GG ($p=0,124$) (таблица 9).

Таблица 7 – миссенс-варианты в гене *MET* у женщин с клиническим диагнозом рак шейки матки, проживающих на территории РБ

№	Нуклеотидный вариант	Позиция в геноме	Количество/ частота	Значимость варианта (ClinVar)
1	c.2908C>T, (p. Arg988Cys/ (p.Arg970Cys), rs34589476)	chr7:116411923	3(0,027)	VUS (3) B (6), LB(6)
2	c.2975C>T (p. Thr1010Ile, rs56391007)	chr7:116411990	3(0,027)	VUS(3) B (15), LB (1)
3	c.818C>A (p. Thr273Asn, rs368144654)	chr7:116339956	1 (0,009)	VUS (4) LB (1)
4	c.406G>A (p. Val136Ile, rs199701987)	chr7:116339544	1 (0,009)	VUS (9) B (2), LB (1)
5	c.1063G>A (p.Glu355Lys, rs561295443)	chr7:116340201	1 (0,009)	VUS (2) LB (2)
6	c.3895G>C (p.Gly1317Arg, rs2117108658)	chr7:116435805	1 (0,009)	Не описан
7	c.4142C>T (p.Thr1399Ile, rs2117113682)	chr7:116436147	1 (0,009)	VUS (2)
8	c.979G>A (p.Ala327Thr, rs2116602432)	chr7:116340117	1 (0,009)	Не описан
9	c.979G>C (p.Ala327Pro, rs2116602432)	chr7:116340117	1 (0,009)	Не описан
10	c.2302A>T (p.Asn786Tyr, rs45516592)	chr7:116399482	1 (0,009)	Не описан
11	c.1966-18T>G	chr7:116397674	1 (0,009)	Не описан

Таблица 8 – Результаты анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs34589476 гена *MET* между группами сравнения

rs34589476	N	Частота вероятного аллеля риска	χ^2 , p, OR, (95%ДИ)	Число генотипов		
	492	T		TT	TC	CC
РШМ	108	0,0139	$\chi^2=10,7$ p=0,001, OR=25,20 (1,30 – 489,72)	0 (0,0)	3 (0,028)	105 (0,972)
Контроль	384	0		0 (0,0)	0 (0,0)	384 (1,0)

Таблица 9 – Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs27069 гена *CLTP1L* между группами сравнения

Аллели								
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Условно-здоровые женщины	χ^2	OR	95% ДИ	p	
rs27069	G	0,702	0,629	4,098	1,395	1,01-1,926	0,043	
Генотипы								
rs27069	N	Число генотипов			Частоты генотипов			χ^2 , p
Генотипы	162	AA	AG	GG	AA	AG	GG	
РШМ	111	9	48	54	0,081	0,432	0,486	
Условно-здоровые женщины	384	55	175	154	0,143	0,455	0,401	

Для локуса rs10175462 гена *PAX8* не было выявлено ассоциации ни для аллеля G (p=0,217), ни для гомозиготного генотипа GG (p=0,463) (таблица 10). Однако, при проведении сравнительного анализа между когортой пациенток с РШМ и женщин, у которых была зафиксирована элиминация ВПЧ, было показано, что для локуса rs10175462 гена *PAX8* была выявлена тенденция к ассоциации аллеля G (p=0,056, OR=1,58, $\chi^2=3,663$), что подтвердилось и при помощи логистического регрессионного анализа для гомозиготного генотипа GG (p=0,054) (таблица 11).

Таблица 10 – Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs10175462 гена PAX8 между группами сравнения

Аллели								
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Условно-здоровые женщины	χ^2	OR	95% ДИ	p	
rs10175462	G	0,603	0,556	1,526	1,212	0,8933-1,643	0,217	
Генотипы								
rs10175462	N	Число генотипов			Частоты генотипов			χ^2 , p
Генотипы	162	GG	GA	AA	GG	GA	AA	$\chi^2=1,54$ p=0,463
РШМ	111	40	54	17	0,360	0,486	0,153	
Условно-здоровые женщины	378	117	187	74	0,309	0,494	0,195	

Таблица 11 - Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов локуса rs10175462 гена PAX8 между группами сравнения (РШМ и женщин с элиминацией ВПЧ)

Аллели								
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Частота аллеля у женщин с элиминацией ВПЧ	χ^2	OR	95% ДИ	p	
rs10175462	G	0,604	0,490	3,663	1,584	0,987-2,54	0,056	
Генотипы								
rs10175462	N	Число генотипов			Частоты генотипов			χ^2 , p
Генотипы	162	GG	GA	AA	GG	GA	AA	$\chi^2=4,514$ p=0,105
РШМ	111	40	54	17	0,360	0,486	0,153	
Элиминация ВПЧ	51	14	22	15	0,275	0,431	0,294	

При сравнительном анализе частот аллелей и генотипов локуса rs2268177 гена CDC42 была выявлена статистически значимая ассоциация для рискованного аллеля Т ($\chi^2=16,99$, OR=1,945, ДИ=1,413-2,676, p=3,751e-005) и статистически значимая ассоциация с генотипом ТТ ($\chi^2=17,35$, p=0,00017) (таблица 12).

Таблица 12 – Результаты сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов rs2268177 гена *CDC42* между группами сравнения

Аллели								
SNP	Вероятный аллель риска	Частота аллеля при РШМ	Условно-здоровые женщины	χ^2	OR	95% ДИ	p	
rs2268177	T	0,373	0,234	16,99	1,945	1,413-2,676	3,751e-005	
Генотипы								
rs2268177	N	Число генотипов			Частоты генотипов			Ассоциация $\chi^2=17,35$ p=0,00017
Генотипы	162	ТТ	ТА	АА	ТТ	ТА	АА	
РШМ	111	18	47	46	0,162	0,423	0,414	
Условно-здоровые женщины	381	22	135	224	0,057	0,354	0,587	

Таким образом, в результате исследования полиморфных вариантов, ассоциированных в результате GWAS исследования с риском развития РШМ, были реплицированы статистически значимые ассоциации с рисковым аллелем G полиморфного локуса rs27069 гена *CLTPIL* и с рисковым аллелем T и генотипом ТТ локуса rs2268177 гена *CDC42*, однако не было выявлено ассоциации с полиморфным вариантом rs10175462 гена *PAX8*. Несмотря на то что мы не получили значимых ассоциаций в расширенной выборке пациенток для rs10175462 гена *PAX8*, включающих условно-здоровых женщин и пациенток с РШМ, нами была показана тенденция к ассоциации для группы сравнения, представленной женщинами с зафиксированной элиминацией ВПЧ для аллеля G (p=0,056, OR=1,58, $\chi^2=3,663$), что подтвердилось и при помощи логистического регрессионного анализа для гомозиготного генотипа GG (p=0,054). Мы считаем, что полученные результаты могут свидетельствовать о том, что некоторые рисковые полиморфные варианты, выявленные в результате GWAS (такие как rs10175462 гена *PAX8*) могут по-разному сегрегироваться в различных этнических группах и популяциях. Наши результаты свидетельствуют о том, что воспроизведение результатов GWAS в популяциях, не входящих в GWAS исследование, является необходимым этапом в изучении рисковых однонуклеотидных замен.

2.1.3 Полигенные шкалы риска для прогноза развития рака предстательной железы на основе анализа генов биогенеза микроРНК

Рак предстательной железы (РПЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований среди мужчин среднего возраста во всем мире. В 2020 году заболеваемость раком простаты составила 1 414 259 случаев по всему миру. В том же году в мире было зарегистрировано 375 304 случая смерти от РПЖ [22]. В Волго-Уральском регионе в 2022 году было зарегистрировано 8267 новых случаев рака предстательной железы [23]. Как и в случае со многими другими видами злокачественных новообразований, диагностика рака предстательной железы часто носит случайный характер и происходит в результате медицинских осмотров, диспансеризации и скрининга мужчин на простат-специфический антиген (ПСА).

Хорошо известно, что малые некодирующие РНК играют ключевую роль в развитии злокачественных опухолей. Среди всех некодирующих РНК наиболее изученным классом являются микроРНК, которые регулируют активность генов на посттранскрипционном уровне, ингибируя молекулы мРНК. На сегодняшний день с помощью GWAS и реализации проекта «1000 геномов» обнаружено около 10 миллионов полиморфных вариантов, при этом 90% таких вариантов сосредоточено в некодирующих регионах генома человека, которые могут включать последовательности малых некодирующих РНК [24]. Однако, несмотря на накопленные знания, предсказать биологические последствия таких геномных эффектов по-прежнему сложно из-за сложности механизмов развития заболевания, вовлеченности большого количества, в том числе генов биогенеза микроРНК.

Недавние исследования показали, что однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) могут модулировать риск развития различных заболеваний, включая рак простаты. Например, было показано, что гетерозиготный вариант rs2740348*GC в гене *GEMIN4* связан с более низким риском развития РПЖ [25]. В иранской популяции отмечен повышенный риск развития РПЖ у носителей генотипа miR-499 rs3746444*CC [26]. Хотя знания о влиянии полиморфных вариантов генов биогенеза и предшественников микроРНК на развитие злокачественных новообразований растут, вес отдельных полиморфизмов для оценки риска невелик.

В связи с этим актуальным является поиск набора полиморфных вариантов, сочетание которых позволит построить модели, позволяющие проводить такие оценки с большей точностью. Мы предположили, что полиморфизмы в генах механизмов биогенеза микроРНК могут модулировать риск развития рака предстательной железы и решили оценить влияние 28 SNP в трех наиболее многочисленных этнических группах,

проживающих в Волго-Уральском регионе, используя подход полигенной оценки риска (PGS) для оценки совокупного эффекта этих вариантов ДНК.

Образцы крови собирали в пробирки-вакутейнеры объемом 8 мл у лиц с раком предстательной железы и здоровых доноров без злокачественных новообразований в анамнезе. В исследование было включено 1082 человека из Волго-Уральского региона. Забор образцов проводился сотрудниками кафедры урологии с курсом ИПО и врачами РКОД г. Уфы в соответствии с этическими стандартами биоэтического комитета, разработанными Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека». У всех обследуемых лиц образцы биологического материала были получены с их информированного согласия. Диагноз был поставлен на основании данных клинического и гистологического обследования.

Все процедуры, начиная с отбора SNPs и заканчивая выделением геномной ДНК и генотипированием, были выполнены в соответствии с протоколами производителей. Отбор 28 SNPs в генах пути биогенеза микроРНК и пре-миРНК для генотипирования в исследуемых образцах проводили с использованием баз данных Международного проекта HapMap, dbSNP, реестра miRBase и Ensembl [27].

Контроль качества генотипирования осуществлялся путем оценки равновесия Харди-Вайнберга для каждого SNP. Коэффициент выявления для всех генотипированных SNP составил 97 %, после этого был проведен дальнейший анализ чувствительности и SNP с $r^2 > 0,2$ были исключены из анализа из-за высокого неравновесия по сцеплению LD. Таким образом, окончательная модель PGS была основана на наборе из 21 SNP. Значения эффектов (OR, odds ratio) для построения PGS-модели были получены из ассоциативного анализа наших выборочных групп в связи с отсутствием обучающего набора GWAS. Все расчеты проводились с использованием PLINK 1.9 [28] и программной среды R 4.1.1 [29]. Статистическая значимость всех тестов определялась как $p < 0,05$.

Расчет PGS для оценки риска развития рака предстательной железы.

Учитывая отсутствие обучающей выборки на основе полногеномных исследований ассоциаций (GWAS), была проанализирована модель логистической регрессии и определены коэффициенты шансов изученных полиморфных вариантов. Для каждого индивидуума с помощью логистической регрессии были рассчитаны модели PGS, основанные на сумме взвешенных эффектов аллелей риска каждого полиморфного варианта, исходя из его ассоциации с развитием РПЖ в рамках реализации логарифмической аддитивной модели. Мы определили аллели риска ($OR > 1$) для каждого проанализированного SNP и привели все эффекты в PGS в соответствие с аллелем,

повышающим риск развития рака предстательной железы. Таким образом, все весовые коэффициенты были основаны именно на аллелях риска.

Дискриминационные способности моделей, основанных на PGS, оценивали с помощью ROC-анализа. Мощность моделей для прогнозирования РПЖ по сравнению с контролем оценивалась с помощью площади под соответствующими ROC-кривыми. ROC-анализ обеспечивает наиболее полное доступное описание диагностической точности, поскольку он оценивает и представляет все комбинации чувствительности и специфичности, которые может обеспечить диагностический тест.

Ассоциативный анализ

В исследование было включено 1082 человека (таблица 13) из Волго-Уральского региона. Среди SNP, включенных в анализ, наиболее значимыми оказались rs595055 в гене *AGO1*, rs10719 в гене *DROSHA*, rs11060845 в гене *PIWIL1*, rs1057035 в гене *DICER1* и rs2740348 в гене *GEMIN4* (таблица 14).

Таблица 13 – Характеристика обследуемых групп индивидов

Характеристики	Пациенты с РПЖ	Здоровые индивиды
Всего	532	550
Пол, n (%)		
Мужчины	532 (100)	550 (100)
Возраст, годы, среднее \pm SD	66.74 \pm 8.13	56.34 \pm 13.35
TNM стадия		
I-II, n (%)	296 (55.7)	–
III-IV, n (%)	236 (44.3)	–
ПСА, среднее	15.38 (0.34-63.15)	2.02 (0.01-3.99)
Шкала Глисона, n(%)		
<8	317 (59.6)	–
\geq 8	215 (40.4)	–
Этническая принадлежность, n (%)		
Башкиры	104 (19.5)	112 (20.4)
Татары	138 (25.9)	274 (49.8)
Русские	282 (53.1)	148 (26.9)
Другие	8 (1.50)	16 (2.9)

Таблица 14 – Ассоциация между набором из 21 варианта ДНК в генах биогенеза микроРНК и раком предстательной железы в популяциях Волго-Уральского региона

Название гена	Хромосома	Позиция	rsID	Рисковый/Нерисковый аллель	OR	Частота аллеля риска	95% CI	p-Value
<i>AGO1</i>	1	36380133	rs595055	T/C	1.55	0.53	1.29-1.90	3.82×10^{-6}
<i>DDX20</i>	1	112308953	rs197412	T/C	1.02	0.27	0.83-1.16	0.83
<i>DROSHA</i>	5	31435627	rs4867329	A/C	1.15	0.25	0.73-1.03	0.10
<i>C5orf22</i>	5	31532789	rs17409893	A/G	1.00	0.49	0.83-1.20	0.99
<i>XPO5</i>	6	43492578	rs2257082	G/A	1.01	0.43	0.83-1.18	0.87
<i>AGO2</i>	8	141555862	rs3864659	A/C	1.01	0.75	0.77-1.26	0.92
<i>AGO2</i>	8	141594460	rs7005286	T/C	1.18	0.64	0.96-1.47	0.11
<i>MIR196A2</i>	12	54385599	rs11614913	T/C	1.10	0.39	0.76-1.08	0.25
<i>PIWIL1</i>	12	130852174	rs11060845	G/T	1.76	0.85	1.21-2.35	1.83×10^{-3}
<i>RAN</i>	12	131355546	rs3809142	C/T	1.03	0.79	0.74-1.28	0.83
<i>DICER1</i>	14	95554142	rs1057035	C/T	1.32	0.53	1.12-1.64	1.67×10^{-3}
<i>DICER1</i>	14	95556747	rs13078	T/A	1.27	0.04	1.03-1.60	0.03
<i>GEMIN4</i>	17	649232	rs3744741	C/T	1.30	0.69	1.01-1.60	0.04
<i>GEMIN4</i>	17	649505	rs4968104	T/A	1.09	0.04	0.88-1.34	0.43
<i>GEMIN4</i>	17	649935	rs2740348	G/C	1.37	0.03	1.10-1.72	4.88×10^{-3}
microRNA-423 (<i>NSRP1</i>)	17	28444183	rs6505162	A/C	1.04	0.22	0.88-1.23	0.65
<i>DDX5</i>	17	62502435	rs1991401	G/A	1.14	0.18	0.97-1.37	0.11
<i>MIR27A</i>	19	13947292	rs895819	T/C	1.13	0.44	0.73-1.05	0.14
<i>DGCR8</i>	22	20098544	rs417309	G/A	1.09	0.01	0.82-1.45	0.56
<i>DGCR8</i>	22	20098582	rs720012	A/G	1.01	0.03	0.82-1.26	0.89
<i>DGCR8</i>	22	20098882	rs720014	C/T	1.15	0.03	0.92-1.39	0.23

В результате, взвешенная модель PGS продемонстрировала в 1,65 раза более высокие шансы (95% ДИ=1,45-1,88) риска развития РПЖ в случаях по сравнению с контролем, со статистически значимым p -значением $2,7 \times 10^{-14}$. Для сравнения, невзвешенная модель PGS показала более низкое значение ($OR=1,45$; 95% ДИ=1,29-1,65) и менее значимое p -значение ($3,27 \times 10^{-9}$).

ROC-анализ

Дискриминационная способность двух моделей PGS для статуса случай/контроль оценивалась путем построения ROC-кривых. Взвешенная модель PGS продемонстрировала способность различать риск развития РПЖ в случае и контроле с $AUC=0,633$ (95% ДИ=0,60-0,67), чувствительностью 0,44 и специфичностью 0,77 (рисунок 2а), тогда как невзвешенная модель показала $AUC=0,60$ (95% ДИ=0,56-0,63), чувствительность 0,48 и специфичность 0,67 (рисунок 2б).

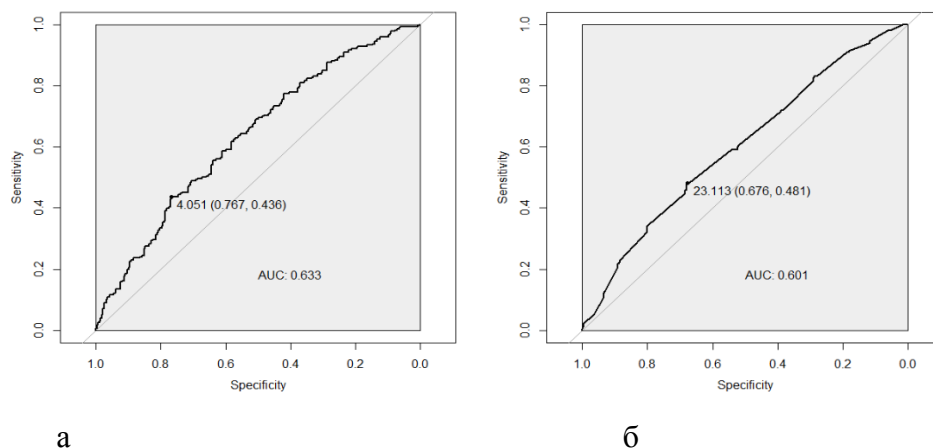


Рисунок 2 – ROC-кривые, оценивающие дискриминационную способность взвешенной (а) и невзвешенной (б) модели PGS для риска РПЖ. Лучшая прогностическая точка показана с идеальным отсечением для PGS и с оценками специфичности и чувствительности в этой точке. AUC- площадь под кривой

Недавно было описано, что подход оценки полигенных шкал PGS к прогнозированию генетического риска фенотипов человека на основе генных путей может пролить свет на биологию заболеваний и выявить основные генные сети, которые вносят наибольший вклад в риск развития полигенных заболеваний [30]. Сегодня наиболее популярной процедурой изучения генетических вариантов является GWAS, которая позволяет одновременно анализировать миллионы полиморфных вариантов ДНК. В результате такого подхода становится возможным выявить сотни локусов предрасположенности к заболеваниям, содержащих варианты с низким риском, лишь некоторые из которых будут наиболее значимо ассоциированы с риском заболевания.

Недавние исследования выявили немногочисленные, но редкие патогенные мутации в таких генах, как *BRCA2*, с сильной ассоциацией с риском и исходом рака простаты. Для рака простаты описано более 260 SNP, которые в сочетании с оценками PGS и другими эпидемиологическими факторами риска могут обеспечить надежное прогнозирование риска [31].

В другом исследовании способность PGS, основанного на 145 полиморфных вариантах, предсказывать летальный исход от рака простаты сравнивалась с ПСА и ранее коммерциализированной моделью, основанной на четырех маркерах калликреина. PGS ассоциировался с РПЖ, повторяя ранее зарегистрированные относительные риски, а также был ассоциирован со смертью от РПЖ. Однако, в отличие от ПСА, PGS не показал более сильной ассоциации со смертельным исходом: коэффициенты опасности для заболеваемости раком простаты по сравнению с метастазами рака простаты и смертью существенно не различались. ПСА был гораздо более сильным предиктором метастазирования или смерти от РПЖ: площадь под кривой составила 0,78 против 0,63 для PGS. Важно отметить, что добавление PGS к PSA не обеспечило дополнительной стратификации риска фатального РПЖ [32].

Мета-анализ GWAS выявил девять новых локусов предрасположенности к РПЖ, семь из которых встречались только или значительно чаще у мужчин африканского происхождения, включая афроспецифический вариант остановки роста в гене простат-специфического аноктамина 7 (*ANO7*). PGS, основанная на 278 вариантах риска, продемонстрировала сильную ассоциацию с риском РПЖ в исследованиях когорт лиц африканского происхождения (коэффициенты шансов $OR >3$ и >5 для мужчин в верхнем дециле и процентиле PGS, соответственно). Что еще более важно, по сравнению с мужчинами в категории 40-60 % PGS, мужчины в верхнем дециле PGS имели значительно более высокий риск агрессивного РПЖ ($OR = 1,23$, 95 % (ДИ = 1,10-1,38, $p = 4,4 \times 10^{-4}$)) [33].

Хорошо известно, что патогенные варианты в генах *BRCA1* и *BRCA2* связаны с повышенным риском развития рака молочной железы у женщин и рака простаты и груди у мужчин [34]. Пожизненный риск развития РПЖ у носителей мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* составляет 29% и 60%, соответственно [35]. Недавние исследования показали, что совместное влияние PGS и патогенных вариантов *BRCA1* и *BRCA2* позволяет выявить мужчин с клинически значимым уровнем риска развития простаты. Так, для PGS, основанной на 147 полиморфных вариантах, отношение шансов составило 1,73 (95% ДИ = 1,28-2,33) для *BRCA1* и 1,60 (95% ДИ = 1,34-1,91) для носителей вариантов *BRCA2*. У носителей *BRCA1* был выявлен более высокий риск агрессивного заболевания (оценка по

шкале Глисона ≥ 7 : OR = 2,09, 95% ДИ = 1,27-3,46; оценка по шкале Глисона < 7 : OR = 1,11, 95% ДИ = 0,70-1,77). Для носителей варианта *BRCA2* не было выявлено различий в ассоциации заболевания с высокой или низкой оценкой по шкале Глисона. Дискриминационная способность PGS была оценена как 0,62 (95% ДИ = 0,54-0,69) для *BRCA1* и 0,62 (95% ДИ = 0,57-0,67) для носителей вариантов *BRCA2* с помощью площади под кривой AUC [36].

Преобразование оценок PGS может быть полезным для выявления групп населения с высоким и низким риском развития заболевания. Оценки PGS преобразуются в распределение по группам с использованием пожизненных рисков, чтобы облегчить интерпретацию оценок. У некоторых людей PGS может быть настолько низким, что они никогда не превысят средний 10-летний риск развития рака простаты у 50-летнего мужчины - возраст, в котором в США, например, начинается скрининг рака простаты. И наоборот, мужчины с высоким пожизненным риском PGS могут преодолеть этот порог в возрасте 34 лет. Обоснование такого подхода было найдено в исследовании PGS 147 SNV, где у мужчин, входящих в верхний 1% PGS, риск был в 5,71 раза выше по сравнению с мужчинами из группы среднего 50 % риска [37].

2.2 Поиск генетических и эпигенетических маркеров риска развития аллергических заболеваний на основании анализа генов, участвующих в метаболизме гистамина

Аллергические заболевания (АЗ) являются распространенными хроническими заболеваниями многофакторной природы. К наиболее известным АЗ относятся бронхиальная астма (БА), аллергический ринит (АР) и атопический дерматит (АД). БА и АР представляют собой сложные заболевания, проявляющиеся в виде хронического воспаления верхних и нижних дыхательных путей. Слизистые оболочки полости носа и бронхов у индивидов с БА и АР имеют единый профиль аллергенов и медиаторов воспаления, патоморфологические исследования показывают сходный клеточный состав воспалительного инфильтрата слизистой оболочки носа и бронхов у пациентов. БА и АР тесно взаимосвязаны между собой и часто сочетаются друг с другом. Предполагается, что данные заболевания могут быть разными стадиями единого процесса, единой болезнью, основой которой является сенсibilизация верхних дыхательных путей и бронхов [38].

БА представляет собой многофакторное и гетерогенное заболевание, часто характеризующееся хрипами и одышкой, вызванными воспалением и гиперреактивностью дыхательных путей, наследуемость заболевания варьирует от 55 до 74% у взрослых и

достигает 90% у детей [39]. Показано, что более 80% пациентов с аллергической БА имеют сопутствующие симптомы АР, в то время как от 20% до 50% пациентов с АР имеют клинические проявления БА [40]. АР является заболеванием, зачастую характеризующимся иммуноглобулин Е опосредованным воспалением слизистой оболочки носа, формирующимся и прогрессирующим под действием аллергенов [41]. Известно, что симптомы АР не опасны для жизни, они часто причиняют беспокойство и негативно влияют на работу и качество жизни, наследуемость АР составляет более 65% [42]. В мире от АР страдают около 400 миллионов человек, причем в последние десятилетия из-за роста индустриализации и загрязнения воздуха число больных увеличивается [40]. В основе развития аллергических заболеваний (АЗ) лежит сложное взаимодействие между генетической предрасположенностью и воздействием различных факторов окружающей среды, наиболее важными из которых являются аллергены. В ряде полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) показано, что БА и АР имеют большое число как различных, так и общих полиморфных вариантов генов (*IL33*, *IL1RL1*, *IL13*, *RAD50*, *C11orf30*, *LRRC32*, *TSL* и др.), ассоциированных с развитием заболеваний и отдельных их фенотипов [43].

Важным направлением современных генетических исследований является поиск эпигенетических маркеров, влияющих на риск развития заболевания. Эпигенетические механизмы определяют взаимодействие между генетическими факторами и факторами окружающей среды, влияющими на риск развития заболевания. Метилирование ДНК представляет собой присоединение метильной группы с помощью ДНК-метилтрансферазы к цитозину в положении 5 с образованием 5-метилцитозина, где за цитозином следует гуанин, известный как CpG. Примерно 60–80% CpG-островков (кластеров CpG) у людей обычно метилированы, но не отдельные CpG-островки. Обычно CpG-островки содержат более 200 оснований с примерно 50% гуанина и цитозина (G+C) и соотношением 0,6 или более. Метилирование CpG-островков может приводить к активации или ингибированию генов, но обычно способствует репрессии, поскольку островки расположены в начале сайта транскрипции генов [44]. Метилирование ДНК является наиболее изученным эпигенетическим механизмом у больных АЗ. К настоящему моменту проведено 7 полноэпигеномных исследований БА, 1 полноэпигеномное исследование АР и 1 полноэпигеномное исследование АД по результатам которых выявлено большое число CpG сайтов дифференциальный уровень метилирования которых ассоциирован с развитием аллергопатологий (<https://ngdc.cncb.ac.cn/ewas/atlas>). В частности, показано, что изменение статуса метилирования ДНК зачастую приводит к дифференциальной экспрессии генов факторов транскрипции и генов, участвующих в развитии воспаления и формировании

иммунного ответа, что приводит к различным и уникальным фенотипическим проявлениям АЗ.

Гистамин играет центральную роль в патогенезе аллергических заболеваний, усиливает секрецию Th2-цитокинов (IL-5, IL-4, IL-10 и IL-13) и ингибирует продукцию Th1-цитокинов (IFN- γ , IL-12, IL-2), способствуя сдвигу баланса Т-клеток в сторону Th2-лимфоцитов. Гистамин также регулирует функции моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, В-клеток и дендритных клеток [45]. Синтез гистамина начинается с α -декарбоксилирования L-гистидина ферментом гистидиндекарбоксилазой, биологическое воздействие гистамина реализуется при взаимодействии с HR1, HR2, HR3 и HR4 рецепторами. Гистамин расщепляется под действием ферментов гистамин-N-метилтрансферазы (HNMT) и диаминоксидазы (DAO или AOC1), известен широкий ряд генов, кодирующих белки, ответственные за синтез и метаболизм гистамина (*HDC*, *HRH1*, *HRH2*, *HRH3*, *HRH4*, *HNMT* и *AOC1*) [46]. Выполнен ряд исследований полиморфных локусов генов, участвующих в метаболизме гистамина, у больных АЗ по результатам которых обнаружены полиморфные варианты генов, ассоциированные с риском развития аллергопатологий, а также с чувствительностью пациентов к использованию антигистаминных препаратов у индивидов различного происхождения [47; 48]. Крайне актуальным представляется анализ генов, участвующих в метаболизме гистамина, в группах индивидов из РБ с различными эндофенотипами АЗ.

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 гистамина. Проведено исследование полиморфных локусов генов *AOC1*, *HRH2*, *HRH3*, *ALDH7A1*, *ADCYAP1*, *HNMT*, *PSAP* и *SCG3*, участвующих в метаболизме гистамина, у больных с различными эндофенотипами АЗ и здоровых индивидов, проживающих в Республике Башкортостан (РБ).

Образцы ДНК 558 неродственных индивидов от 2 до 18 лет из Республики Башкортостан использованы в качестве материала исследования. Общая выборка пациентов составила 358 индивидов больных АЗ дыхательных путей различной этнической принадлежности (русские – 165, татары – 143, башкиры – 50). Все исследуемые индивиды с АЗ дыхательных путей являлись пациентами Клиники БГМУ, ГКБ № 21 г. Уфы и ГБУЗ РДКБ (г. Уфа). Диагноз заболеваний устанавливался на основании семейного анамнеза, истории болезни, результатов клинического осмотра и дополнительных лабораторных методов (кожная алергопроба, уровень иммуноглобулина Е (IgE), общий анализ крови, риноскопия). При проведении анализа объединенная группа больных была разделена на

несколько подгрупп: общая выборка пациентов, включающая всех индивидов с БА и АР, больных БА (без АР), больных АР (без БА) и больных БА с сопутствующим АР. В качестве контроля была использована группа, включающая 200 практически здоровых индивидов с неотягощенной наследственностью по АЗ (русские – 75, татары – 83, башкиры – 42), с низким уровнем общего IgE в сыворотке крови и показателями функции внешнего дыхания в пределах нормы. Исследование одобрено биоэтическими комитетами БГМУ (протокол № 28 от 29.10.2012 г.) и ИБГ УФИЦ РАН (протокол № 7 от 10.02.2011 г.).

Образцы ДНК выделены из периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование полиморфных вариантов генов *AOC1* (rs1049793, p.His664Asp) и *HNMT* (rs11558538, p.Thr105Ile) проведено методом ПДРФ-анализа, генов *HRH2* (rs2067474, с.-525-493G>A) и *HRH3* (rs3787429, p.Arg196His), *ALDH7A1* (rs13182402, с.517+395T>C), *ADCYAP1* (rs2231187, с.456A>G; p.Lys152=), *PSAP* (rs11000016, g.71819460C>T), полиморфного локуса rs17525472 (g.51677471T>C), локализованного вблизи гена *SCG3*, методом ПЦР в режиме реального времени.

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%). Мета-анализ выполнен с применением пакетов программ Plink 1.9 и WinPepi v.11.32.

Проведено исследование полиморфных вариантов 8 генов (*AOC1*, *HRH2*, *HRH3*, *ALDH7A1*, *ADCYAP1*, *HNMT*, *PSAP*, *SCG3*), участвующих в метаболизме гистамина, у больных АЗ дыхательных путей и в контрольной группе индивидов из РБ (таблица 15). Выполнен анализ ассоциаций исследуемых полиморфных вариантов генов с риском развития АЗ дыхательных путей, клинических проявлений только БА и только АР, а также БА с сопутствующим АР. Распределение частот генотипов полиморфных вариантов соответствовало равновесию Харди–Вайнберга ($p>0,05$).

Таблица 15 – Частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов, участвующих в метаболизме гистамина, у больных АЗ дыхательных путей и в контроле

Полиморфный вариант/ группа		Генотипы			Аллели		N
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>AOC1</i> , rs1049793		<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	
Больные АЗ	Русские	82 (50.93) p=0.02 OR=1.92 (1.09-3.38)	66 (40.99)	13 (8.07)	230 (71.43) p=0.01 OR=1.66 (1.1-2.49)	92 (28.57) p=0.01 OR=0.6 (0.4-0.91)	161
	Татары	65 (45.77)	63 (44.37)	14 (9.86)	193 (67.96)	91 (32.04)	142
	Башкиры	15 (30.0)	25 (50.0)	10 (20.0)	55 (55.0)	45 (45.0)	50
Контроль	Русские	26 (35.14)	37 (50.0)	11 (14.86)	89 (60.14)	59 (39.86)	74
	Татары	35 (43.21)	41 (50.62)	5 (6.17)	111 (68.52)	51 (31.48)	81
	Башкиры	18 (42.86)	18 (42.86)	6 (14.29)	54 (64.29)	30 (35.71)	42
<i>HRH2</i> , rs2067474		<i>Татары</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	
Больные	Башкиры	147 (90.74)	14 (8.64)	1 (0.62)	308 (95.06)	16 (4.94)	162
	Татары	128 (90.78)	13 (9.22)	-	269 (95.39)	13 (4.61)	141
	Башкиры	41 (82.0)	9 (18.0)	-	91 (91.0)	9 (9.0)	50
Контроль	Русские	68 (90.67)	7 (9.33)	-	143 (95.33)	7 (4.67)	75
	Татары	76 (92.68)	6 (7.32)	-	158 (96.34)	6 (3.66)	82
	Башкиры	36 (85.71)	5 (11.9)	1 (2.38)	77 (91.67)	7 (8.33)	42
<i>HRH3</i> , rs3787429		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	
Больные АЗ	Русские	51 (31.10)	88 (53.66)	25 (15.24)	190 (57.93)	138 (42.07)	164
	Татары	59 (41.84)	53 (37.59)	29 (20.57)	171 (60.64)	111 (39.36)	141
	Башкиры	16 (32.0)	27 (54.0)	7 (14.0)	59 (59.0)	41 (41.0)	50
Контроль	Русские	25 (33.33)	41 (54.67)	9 (12.0)	91 (60.67)	59 (39.33)	75
	Татары	32 (38.55)	41 (49.4)	10 (12.05)	105 (63.25)	61 (36.75)	83
	Башкиры	17 (40.48)	18 (42.86)	7 (16.67)	52 (61.9)	32 (38.1)	42
<i>ALDH7A1</i> , rs13182402		<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	
Больные АЗ	Русские	133 (81.60)	27 (16.56)	3 (1.84)	293 (89.88)	33 (10.12)	163
	Татары	107 (76.43)	32 (22.86)	1 (0.71)	246 (87.86)	34 (12.14)	140
	Башкиры	41 (82.0)	7 (14.0)	2 (4.0)	89 (89.0)	11 (11.0)	50
Контроль	Русские	57 (76.0)	17 (22.67)	1 (1.33)	131 (87.33)	19 (12.67)	75
	Татары	65 (79.27)	17 (20.73)	-	147 (89.63)	17 (10.37)	82
	Башкиры	32 (76.19)	10 (23.81)	-	74 (88.1)	10 (11.9)	42
<i>ADCYAP1</i> , rs2231187		<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	
Больные АЗ	Русские	76 (47.2)	62 (38.51)	23 (14.29)	214 (66.46)	108 (33.54)	161
	Татары	80 (57.55)	48 (34.53)	11 (7.91)	208 (74.82) p=0.08 OR=1.46 (0.96-2.23)	70 (25.18) p=0.08 OR=0.69 (0.45-1.05)	139

	Башкиры	33 (66.0)	17 (34.0)	-	83 (83.0) p=0.06 OR=1.95 (0.97-3.95)	17 (17.0) p=0.06 OR=0.51 (0.25-3.95)	50
Контроль	Русские	34 (45.33)	36 (48.0)	5 (6.67)	104 (69.33)	46 (30.67)	75
	Татары	40 (48.78)	30 (36.59)	12 (14.63)	110 (67.07)	54 (32.93)	82
	Башкиры	20 (47.62)	20 (47.62)	2 (4.76)	60 (71.43)	24 (28.57)	42
<i>HNMT</i> , rs11558538		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	
Больные АЗ	Русские	127 (78.4)	31 (19.14)	4 (2.47)	285 (87.96)	39 (12.04)	162
	Татары	105 (75.54)	34 (24.46)	-	244 (87.77)	34 (12.23)	139
	Башкиры	36 (72.0)	13 (26.0)	1 (2.0)	85 (85.0)	15 (15.0)	50
Контроль	Русские	58 (78.38)	13 (17.57)	3 (4.05)	129 (87.16)	19 (12.84)	74
	Татары	67 (81.71)	15 (18.29)	-	149 (90.85)	15 (9.15)	82
	Башкиры	36 (85.71)	6 (14.29)	-	78 (92.86)	6 (7.14)	42
<i>PSAP</i> , rs11000016		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	
Больные АЗ	Русские	117 (71.78)	44 (26.99)	2 (1.23)	278 (85.28)	48 (14.72)	163
	Татары	93 (66.43)	46 (32.86)	1 (0.71)	232 (82.86)	48 (17.14)	140
	Башкиры	41 (82.0)	9 (18.0)	-	91 (91.0)	9 (9.0)	50
Контроль	Русские	55 (74.32)	18 (24.32)	1 (1.35)	128 (86.49)	20 (13.51)	74
	Татары	53 (65.43)	27 (33.33)	1 (1.23)	133 (82.1)	29 (17.9)	81
	Башкиры	33 (80.49)	6 (14.63)	2 (4.88)	72 (87.8)	10 (12.2)	41
<i>SCG3</i> , rs17525472		<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	
Больные АЗ	Русские	119 (73.91)	40 (24.84)	2 (1.24)	278 (86.34)	44 (13.66)	161
	Татары	109 (77.86)	26 (18.57)	5 (3.57)	133 (82.1)	29 (17.9)	140
	Башкиры	37 (75.51)	10 (20.41)	2 (4.08)	84 (85.71)	14 (14.29)	49
Контроль	Русские	62 (82.67)	13 (17.33)	-	137 (91.33)	13 (8.67)	75
	Татары	63 (76.83)	19 (23.17)	-	145 (88.41)	19 (11.59)	82
	Башкиры	33 (78.57)	7 (16.67)	2 (4.76)	73 (86.9)	11 (13.1)	42

Примечание. *N* – общее количество индивидов; *n* – численность групп, в скобках частоты аллелей и генотипов, %; *p* – уровень значимости, указан при $p < 0,09$; OR – отношение шансов и 95%-ный доверительный интервал (в скобках).

Статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов между выборками больных АЗ дыхательных путей и контроля выявлены при анализе полиморфного варианта rs1049793 гена *AOC1*. Обнаружена более высокая частота генотипа rs1049793**CC* и аллеля rs1049793**C* гена *AOC1* в выборке больных АЗ дыхательных путей русских по этнической принадлежности (50,93% и 71,43%), чем в контроле (35,14%, $p=0,02$; OR=1,92; 95%CI 1,09-3,38 и 60,14%, $p=0,01$; OR=1,66; 95%CI 1,1-2,49). Далее, был проведен более дифференцированный анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов с клиническими проявлениями только БА и только АР, а также БА с сопутствующим АР, и с

уровнем общего IgE. В группе русских больных БА с сопутствующим АР также установлена значительно более высокая частота генотипа rs1049793*CC и аллеля rs1049793*C (56,94% и 74,31%) чем в контроле (35,14%, p=0,008; OR=2,44; 95%CI 1,25-4,76 и 60,14%, p=0,01; OR=1,92; 95%CI 1,17-3,15). Аллель rs1049793*G гена *AOC1* значительно реже встречался у русских, больных АЗ дыхательных путей (28,57%, p=0,01; OR=0,60; 95%CI 0,40-0,91) и больных БА с сопутствующим АР (25,69%, p=0,01; OR=0,52; 95%CI 0,32-0,86), чем в контроле (39,86%). Обнаружено значительное увеличение уровня общего IgE у русских больных АЗ дыхательных путей, носителей генотипа rs1049793*CC (432,9±45,89) гена *AOC1*, по сравнению с больными, имеющими генотип rs1049793*CG и rs1049793*GG (291,6±23,72 и 251±64,87, соответственно, p=0,04).

Ген *AOC1* расположен в хромосомной области 7q36.1, кодирует белок - медьсодержащую аминоксидазу 1, также известный как DAO, катализирующий окислительное дезаминирование гистамина (<https://omim.org/entry/104610>), полиморфный вариант rs1049793 влияет на уровень экспрессии *AOC1* в сыворотке крови (<https://www.ensembl.org>). В ряде опубликованных работ других авторов также показана роль полиморфного варианта rs1049793 и белка экспрессии гена *AOC1* в развитии АЗ дыхательных путей. García-Martín с коллегами показано, что у больных АЗ дыхательных путей европейского происхождения, несущих генотип rs1049793*GG гена *AOC1*, значительно чаще проявляются симптомы аллергии при низком уровне IgE чем у носителей альтернативных аллелей [49]. Установлено, что уровень экспрессии белка данного гена в сыворотке крови выше у пациентов с atopической БА и АР, чем в контрольной группе индивидов из Египта, также установлена положительная корреляция между тяжестью АЗ и уровнем экспрессии белка, кодируемого геном *AOC1* [50]. Обнаружено, что чем ниже катаболическая активность *AOC1*, тем ниже пиковая скорость носового вдоха у взрослых пациентов европейского происхождения с персистирующим АР [51].

Проведено исследование полиморфных вариантов rs2231187 гена *ADCYAP1* и rs11558538 гена *HNMT* в выборках больных и контроля из РБ. Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs2231187 гена *ADCYAP1* выявил тенденцию к повышению частоты встречаемости аллеля rs2231187*A у больных АЗ дыхательных путей (83,0%) и БА с сопутствующим АР (83,82%) башкирской этнической принадлежности по сравнению с контролем (71,43%, p=0,06 и p=0,07, соответственно), аналогичная тенденция обнаружена в группе татар больных АЗ дыхательных путей (p=0,08). Выявлена тенденция к ассоциации аллеля rs11558538*T гена *HNMT* с развитием БА с сопутствующим АР у башкир (p=0,08). Ген *ADCYAP1* (18p11.32) кодирует белок, активирующий аденилатциклазу гипофиза (PACAP), участвующий в метаболизме гистамина [48], а также эндогенной

регуляции тонуса гладких мышц дыхательных путей при БА [52]. По литературным данным, обнаружена более низкая экспрессия белка ADCYAP1 в эпителии носовой полости пациентов с хроническим риносинуситом из Хорватии по сравнению с контролем, причем наиболее низкий уровень экспрессии ADCYAP1 отмечался у пациентов с тяжелой формой заболевания. Показано, что воспаление в слизистой оболочке носа больных с хроническим риносинуситом может регулироваться через передачу сигналов ADCYAP1 [53]. Полиморфный вариант rs11558538, локализованный в 4 экзоне гена *HNMT* (2q22.1), кодирует аминокислотную замену Thr105Ile. Белок HNMT играет важную роль в деградации гистамина путем метилирования гистамин-N-метилтрансферазой. В ряде опубликованных работ подтверждается роль гена *HNMT* в патогенезе АЗ дыхательных путей. Fernández-Novoa L. с соавт. показано, что аллель rs11558538**T* гена *HNMT* ассоциирован со снижением активности фермента HNMT [54]. Установлена ассоциация генотипа rs1801105**TT* и аллеля rs1801105**T* гена *HNMT* с развитием БА у детей европейского происхождения [55]. Выявлена ассоциация аллеля rs11558538**T* гена *HNMT* с ярко выраженными клиническими симптомами АР у индивидов детского возраста из Мексики [47]. Полученные в настоящей работе данные и результаты ранее проведенных исследований могут свидетельствовать об определенной роли генов *ADCYAP1* и *HNMT* в патогенезе различных АЗ, однако, для ее подтверждения необходимо проведение дополнительных исследований.

При сравнительном анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs17525472 гена *SCG3*, между группами больных АР-дыхательных путей и контроля выявлено, что аллель rs17525472**C* достоверно чаще встречается у индивидов с АР русской этнической принадлежности (17,74%), чем в контрольной выборке (8,67%, $p=0,03$; OR=2,27; 95%CI 1,09-4,72). Частота более распространенного генотипа rs17525472**TT* и аллеля rs17525472**T* в группе больных АР была достоверно ниже (67,74% и 82,26%), чем в контроле у русских (82,67%, $p=0,04$; OR=0,44; 95%CI 0,20-0,98 и 91,33%, $p=0,03$; OR=0,44; 95%CI 0,21-0,91). Ген секретогранина 3 *SCG3* локализован в хромосомной области 15q21.2. Белок SCG3 относится к семейству нейроэндокринных секреторных белков гранинов, являющихся предшественниками ряда биологически активных белков. Показано, что некоторые гранины функционируют как вспомогательные белки при сортировке и протеолитическом процессинге прогормонов (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29106). При GWAS обнаружено, что полиморфный вариант rs17525472 с высоким уровнем значимости ассоциирован с тяжелой БА у европейцев [56]. В данной работе показано, что аллель rs17525472**C* ассоциирован с развитием АР, что

частично согласуется с результатами GWAS и подтверждает роль данного гена в развитии аллергопатологий.

С целью обобщения полученных данных и обнаружения общих маркеров риска развития АЗ у индивидов различной этнической принадлежности проведен мета-анализ ассоциаций исследуемых полиморфных вариантов генов с развитием АЗ дыхательных путей у русских, татар и башкир. Статистически достоверных различий между выборками больных АЗ дыхательных путей и контроля не обнаружено, но выявлена тенденция к ассоциации аллеля rs1049793*С гена *AOC1* с развитием АР (таблица 16, $p=0,07$), что предполагает возможную роль данного гена не только в развитии АЗ дыхательных путей у русских, но и в объединенной группе индивидов различного происхождения.

Таблица 16 – Результаты мета-анализа ассоциации полиморфных локусов исследуемых генов с развитием АР у индивидов русской, татарской и башкирской этнической принадлежности

Ген	SNP	A1	A2	N	Модель с фиксированным эффектом		Модель со случайным эффектом		Q	I ²
					P	OR	P(R)	OR (R)		
<i>AOC1</i>	rs1049793	G	C	3	0.07	0.69	0.07	0.69	0.49	0
<i>HRH2</i>	rs2067474	A	G	3	0.36	1.45	0.36	1.45	0.58	0
<i>HRH3</i>	rs3787429	T	C	3	0.75	1.06	0.75	1.06	0.41	0
<i>ALDH7A1</i>	rs13182402	G	A	3	0.26	1.36	0.26	1.36	0.39	0
<i>ADCYAP1</i>	rs2231187	G	A	3	0.56	0.88	0.46	0.77	0.15	47.98
<i>HNMT</i>	rs11558538	T	C	3	0.94	0.98	0.94	0.98	0.81	0
<i>PSAP</i>	rs11000016	T	C	3	0.29	1.31	0.41	1.32	0.24	30.35
<i>SCG3</i>	rs17525472	C	T	3	0.15	1.60	0.75	1.24	0.06	71.74

Примечание. N число групп, включенных в исследование, P - p-value fixed, P(R) – p-value random, Q – критерий гетерогенности Кохрена, I² – оценка индекса статистической гетерогенности, курсивом выделены результаты при $p<0,09$

На следующем этапе работы с целью оценки вклада эпигенетических механизмов в патогенезе АЗ нами был выполнен анализ уровня метилирования промоторных областей генов *AOC1* и *HRH2*, играющих важную роль в метаболизме гистамина, в группах больных БА и контроля русской и татарской этнической принадлежности (157 больных БА и 155 индивидов из группы контроля). Образцы ДНК, используемые для анализа метилирования, подвергнуты бисульфитной конверсии набором EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, США). Оценка уровня метилирования промоторной области генов 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. 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).

Выполнен анализ метилирования промоторной области гена *AOC1* (GRCh38:7:150824654-150824801), в которой обнаружено 7 CpG-сайтов у больных БА и индивидов контрольной группы из Республики Башкортостан. При MS-HRM-анализе промоторного региона гена *AOC1* установлено, что уровень метилирования у больных БА и в контрольной группе индивидов варьирует от 50% до 100% (рисунок 3).

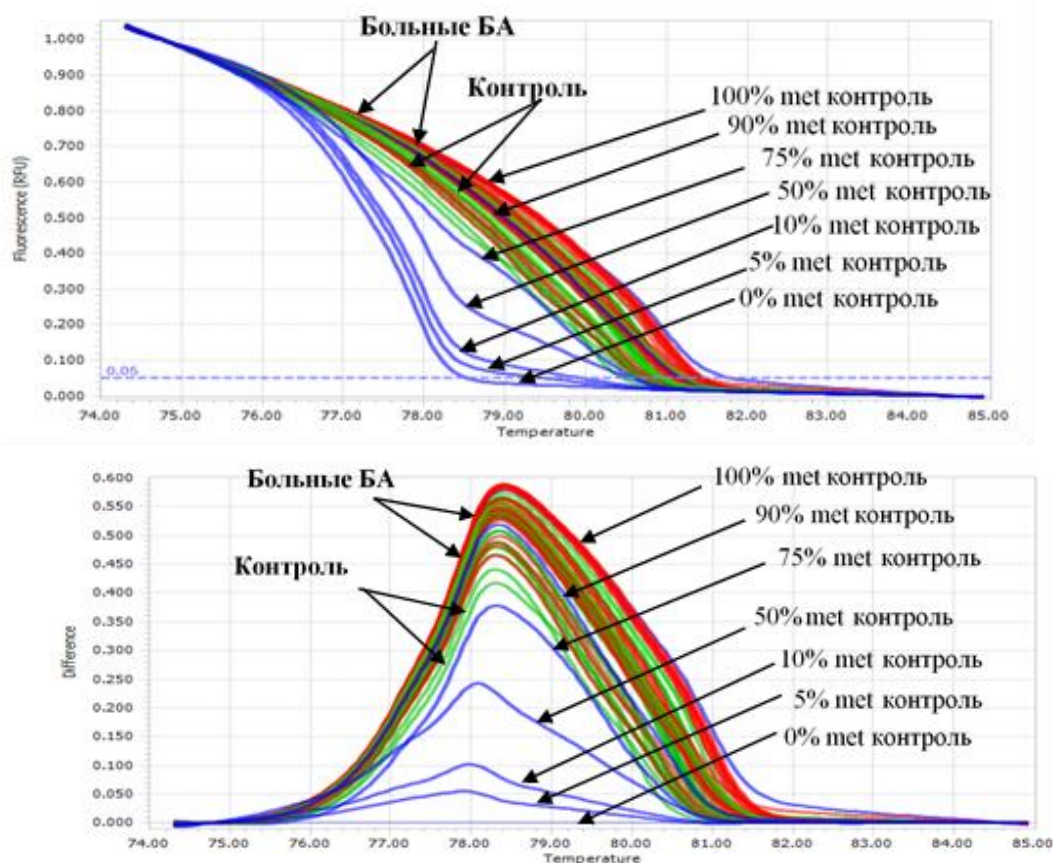


Рисунок 3 – MS-HRM-анализ промоторной области гена *AOC1* в группах больных БА и контроля. Синим цветом обозначены кривые плавления контрольных стандартов с разными уровнями метилирования (0% met, 5% met; 10% met, 50% met, 75% met, 90% met, 100% met); красным цветом – кривые плавления больных БА; зеленым цветом – кривые плавления индивидов из контрольной группы

При попарном сравнении частот встречаемости различного уровня метилирования промоторной области гена *AOC1* в исследуемых группах больных БА и контроля статистически значимых различий не выявлено ($p>0,05$). Однако, при сравнении групп пациентов с тяжелым течением БА и контроля обнаружена более высокая частота встречаемости полного метилирования исследуемой области гена *AOC1* (100%) у больных с тяжелым и среднетяжелым течением заболевания (61,84%) по сравнению с контрольной выборкой (38,61%; $p=0,002$; $OR=2,58$; 95%CI 1,4-4,75).

Для подтверждения результатов, полученных при MS-HRM, проведено секвенирование обработанных бисульфитом натрия образцов ДНК больных БА с разным уровнем метилирования и контрольных стандартов по метилированию. Результаты секвенирования подтвердили высокий уровень метилирования анализируемой области гена *AOC1* у исследуемых больных БА (рисунок 4).

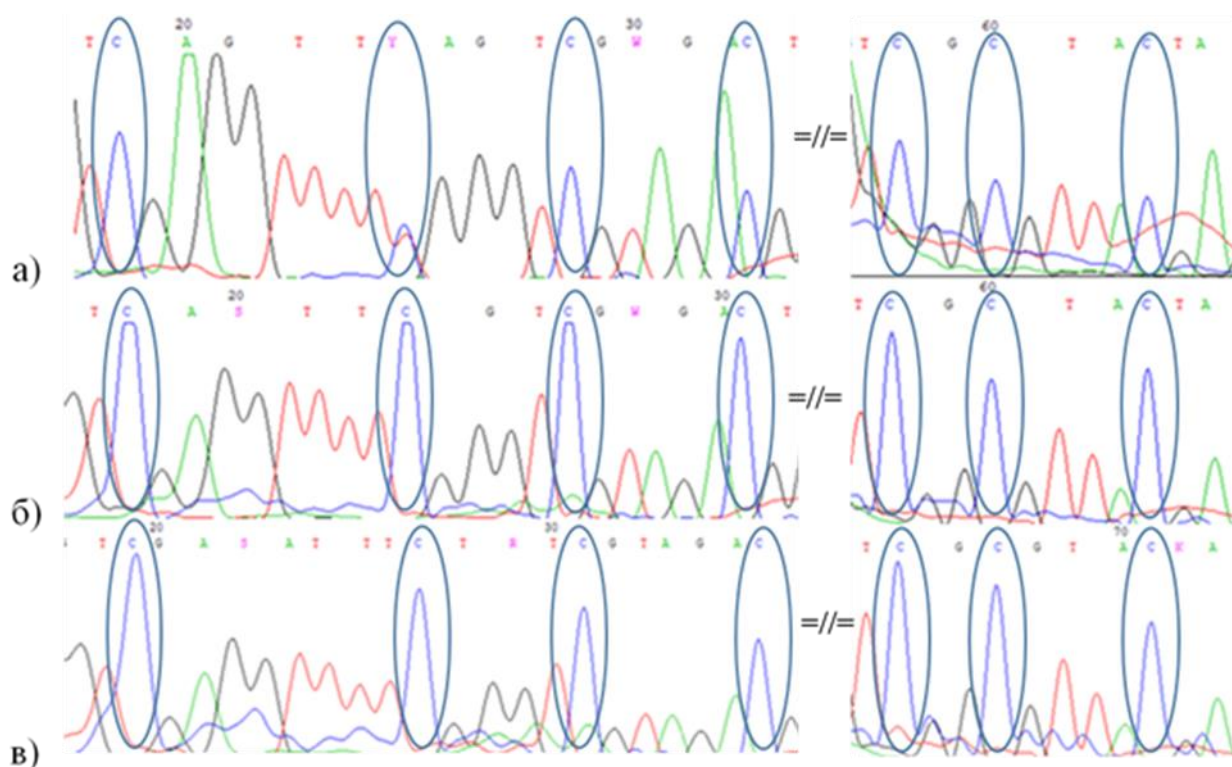


Рисунок 4 – Результаты секвенирования промоторной области гена *AOC1* у больных БА с высоким уровнем метилирования по данным MS-HRM-анализа (а, б) и контрольного стандарта 100% метилированной ДНК (в)

В анализируемом регионе гена *AOC1* расположен промотороподобный элемент EN38E2600888 (PLS, promoter-like signature), связанный с многофункциональным транскрипционным фактором CTCF, играющим важную роль в контроле экспрессии генов у позвоночных (ENCODE Registry of candidate cis-Regulatory Elements (cCREs, UCSC браузер), вблизи исследуемой области гена *AOC1* располагается область активного энхансера

(https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000002726;r=7:150824627-150861504). Промотороподобные элементы представляют собой цис-регуляторные элементы с высоким уровнем сигналов к ДНКазе и H3K4me3, локализованные обычно в пределах 200 п.н. от сайта начала транскрипции (<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-023-03142-1>). По данным онлайн-ресурсов ORegAnno и Jasparg подтверждается, что в исследуемой области находятся сайты связывания широкого ряда и других транскрипционных факторов таких как TBX20, TBX18, TBX21, TBX5, TCF7L1 и др. (ORegAnno и Jasparg). При полногеномном бисульфитном секвенировании клеток периферической крови здоровых индивидов, результаты которого размещены в базе данных MethBase, обнаружено, что уровень метилирования исследуемой в настоящей работе области гена *AOC1* варьирует от 50% до 100%, средний уровень метилирования составляет 80% (MethBase: a reference methylome database) [57; 58]. При полноэпигеномном анализе метилирования выявлен более низкий уровень метилирования cg26475742, локализованного в гене *AOC1*, в первичных эпителиальных клетках дыхательных у больных БА по сравнению с контрольной группой индивидов различного происхождения [59]. При EWAS эпителиальных клеток носа у больных с АЗ и индивидов контрольной группы различного происхождения выявлен 191 дифференциально метилированный CpG сайт, ассоциированный с изменениями в значениях уровня фракции оксида азота в выдыхаемом воздухе между исследуемыми когортами, в числе которых cg14909495, локализованный в гене *AOC1* [60]. Результаты, полученные в данном исследовании, частично согласуются ранее выполненными работами, свидетельствующими о различиях в профиле метилирования отдельных CpG сайтов гена *AOC1* между больными с аллергопатологиями и группой контроля.

Проведено исследование уровня метилирования 10 CpG сайтов промоторной области гена *HRH2* (GRCh38:5:175658642-175658809) в выборках больных БА и контроля из РБ. Согласно данным, полученным при MS-HRM-анализе, уровень метилирования в исследуемых группах больных БА и контроля был низким (рисунок 5). При анализе группы больных БА выявлен 10% уровень метилирования у 3,38% пациентов с тяжелым и среднетяжелым течением БА, 5% уровень метилирования у 93,24% больных БА, неметилированной промоторная область была у 3,38% пациентов. При анализе группы контроля показано, что у 94,12% индивидов уровень метилирования составил 5%, у 5,88% индивидов промоторная область гена *HRH2* была не метилирована (0%). Статистически значимых различий в частотах встречаемости различных уровней метилирования между группами больных БА и контроля не обнаружено ($p > 0,05$).

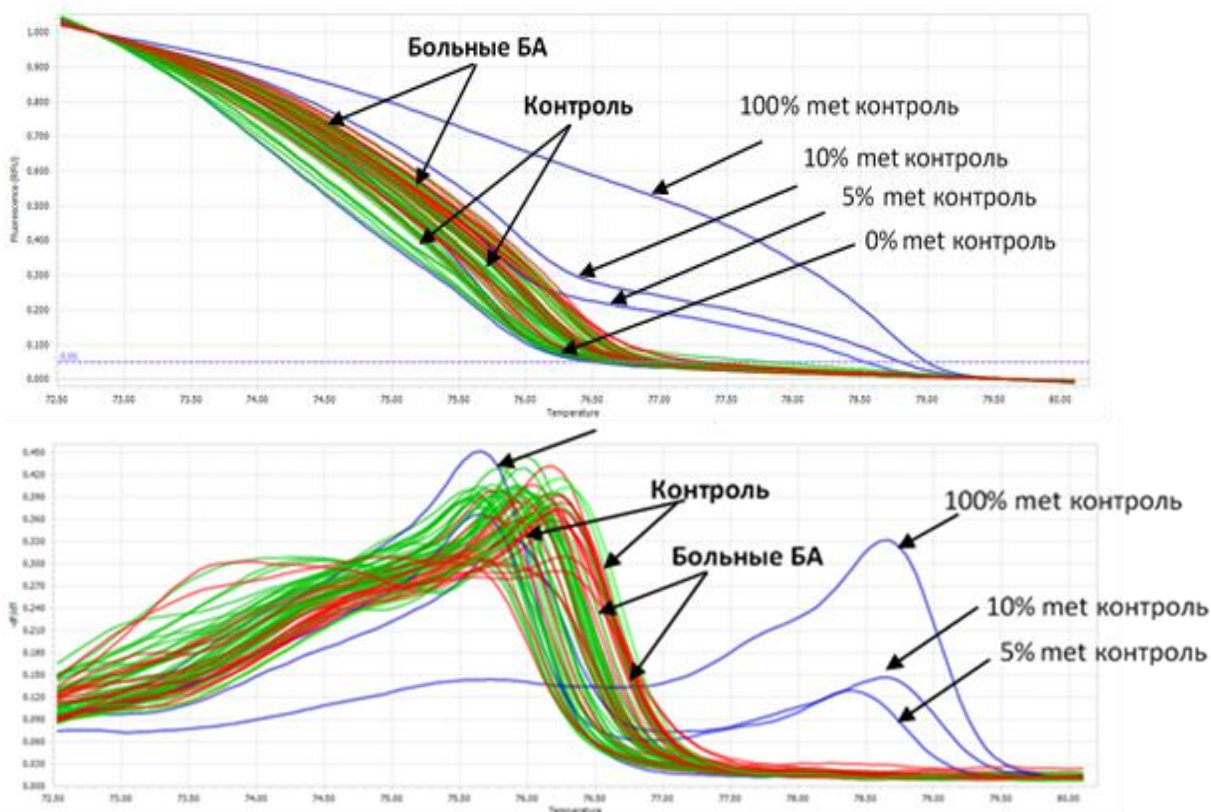


Рисунок 5 — MS-HRM - анализ промоторной области гена *HRH2* у больных БА и индивидов контрольной группы из РБ. Синим цветом обозначены кривые плавления контрольных стандартов с разными уровнями метилирования (0% met, 5% met; 10% met, 100% met); красным цветом – кривые плавления больных БА; зеленым цветом – кривые плавления индивидов из контрольной группы

Для проверки результатов, полученных при MS-HRM - анализе, проведено секвенирование обработанных бисульфитом натрия образцов ДНК больного БА с 0% уровнем метилирования, пациента с 10% уровнем метилирования по результатам MS-HRM-анализа и контрольных стандартов по метилированию (100% и 0%). Результаты секвенирования у 1-го пациента подтвердили отсутствие метилирования CpG сайтов промоторной области гена *HRH2*, у второго больного уровень метилирования разных CpG сайтов варьировал от 10% до 40% (рисунок 6).

В исследуемом нами промоторном регионе гена *HRH2* располагаются элементы проксимальной энхансероподобной сигнатуры (E2434432 и E2434433), ряд гистоновых меток транскрипционно активного хроматина и активных энхансеров (H3K4Me3, H3K27Ac, H3K4Me1). Известно, что гистоновая метка H3K4me3 привлекает ремоделирующие факторы, которые обеспечивают декомпактизацию хроматина и активацию транскрипции.

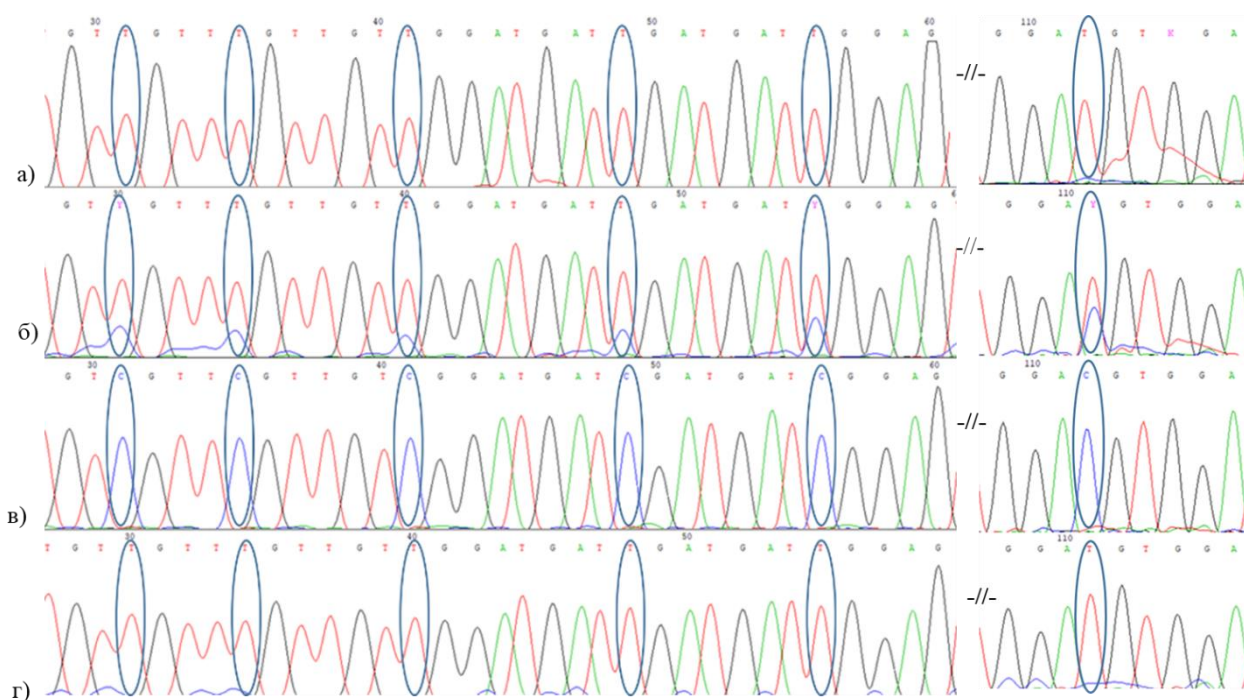


Рисунок 6 – Результаты секвенирования промоторной области гена *HRH2*: а) больной с 0% уровнем метилирования; б) больной БА с уровнем метилирования 10% по данным MS-HRM-анализа; в) контрольный стандарт 100% метилирования; г) контрольный стандарт 0% метилирования

В анализируемом регионе гена *HRH2* расположены сайты связывания для широкого ряда транскрипционных факторов (*ZNF76*, *PLAG1*, *SP1*, *SP4*, *ZNF263*, *ZNF766*, *SIX1*, *Zic2* и др) (https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr5%3A175658642-175658809&hgid=2391309585_dF5xAAcDnCHtWhePINC4et634Us0). По данным литературы, ранее также были проведены эпигенетические исследования гена *HRH2* у больных БА и аллергическими заболеваниями. При полноэпигеномном исследовании первичных эпителиальных клеток дыхательных путей индивидов смешанного этнического происхождения больных БА и контрольной группы [59] и при EWAS назального эпителия у детей пуэрториканского происхождения с атопией и детей без аллергических заболеваний, обнаружен более низкий уровень метилирования CpG-сайта cg22839180 гена *HRH2* у больных по сравнению с контролем [61]. Результаты ряда работ и полученные нами результаты свидетельствуют о важности проведения дополнительных исследований уровня метилирования гена *HRH2* на расширенной выборке больных АЗ и индивидов группы контроля для более глубокого понимания роли данного гена в патогенезе заболеваний.

Таким образом, на данном этапе проекта выполнено исследование генов (*AOC1*, *HRH2*, *HRH3*, *ALDH7A1*, *ADCYAP1*, *HNMT*, *PSAP* и *SCG3*), участвующих в метаболизме

гистамина, у больных с различными эндотипами АЗ и индивидов контрольной группы из РБ. У русских обнаружена ассоциация генотипа rs1049793*CC и аллеля rs1049793*C гена *AOC1* с развитием АЗ дыхательных путей и БА с сопутствующим АР, а также выявлено значительное повышение уровня общего IgE у больных АЗ дыхательных путей, являющихся носителями генотипа rs1049793*CC. Установлена ассоциация аллеля rs17525472*C гена *SCG3* с развитием АР у русских. При анализе метилирования промоторных областей генов *AOC1* и *HRH2* обнаружена более высокая частота встречаемости полного метилирования исследуемой области гена *AOC1* у больных с тяжелым и среднетяжелым течением БА по сравнению с контрольной выборкой, уровень метилирования промоторного региона гена *HRH2* был низким и варьирующим в диапазоне от 0% до 5% в обеих группах больных БА и контроля, 10% уровень метилирования промоторного региона гена *HRH2* выявлен у 5 пациентов с тяжелым и среднетяжелым течением БА. Результаты исследования свидетельствуют о роли генов *AOC1* и *SCG3*, участвующих в метаболизме гистамина, в патогенезе АЗ дыхательных путей. Более глубокое понимание молекулярно-генетических особенностей патогенеза АЗ может способствовать их своевременной диагностике и повышению эффективности лечения.

2.3 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

Наследственные спастические параплегии (НСП) – это генетически и клинически гетерогенная группа дегенеративных заболеваний нервной системы, обусловленных дистальным поражением длинных аксонов кортикоспинального тракта [62]. 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 экстракраневральными симптомами, выделяют неосложнённые («чистые») или осложненные формы заболевания [63]. 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% [64], 10% [65] и 2,4% - 6,5% случаев [66; 67].

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 эксонам (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 пациентки 40.0 (русской этнической принадлежности) с доминантной формой спастической параплегии не было выявлено релевантных генетических вариантов, которые, согласно общепринятым рекомендациям Американского колледжа медицинской генетики и геномики (AGMG) [68], могли бы быть отнесены к вариантам, являющимся наиболее вероятной причиной заболевания. В то же время, была идентифицирована в гетерозиготном состоянии нуклеотидная замена с.1008G>T в гене *ABCD1* (ChrX:152994794G>T), приводящая к аминокислотной замене p.Lys336Asn (NM_000033.3) в высококонсервативной области молекулы 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. На основании этих данных миссенс-вариант был классифицирован как вариант с неизвестным клиническим значением, тем более, что ген *ABCD1* не является причинным геном для наследственных спастических параплегий. Тем не менее, выявленный новый нуклеотидный вариант привлек наше внимание, поскольку *ABCD1* известен как ген, мутации в котором обуславливают X-сцепленную адренолейкодистрофию (X-ALD) и адреномиелонейропатию (AMN) (OMIM 300100), в клинической картине которых могут присутствовать спастические парезы. С целью первичной валидации выявленная у пациента миссенс-мутация была подтверждена методом секвенирования по Сэнгеру (рисунок 7).

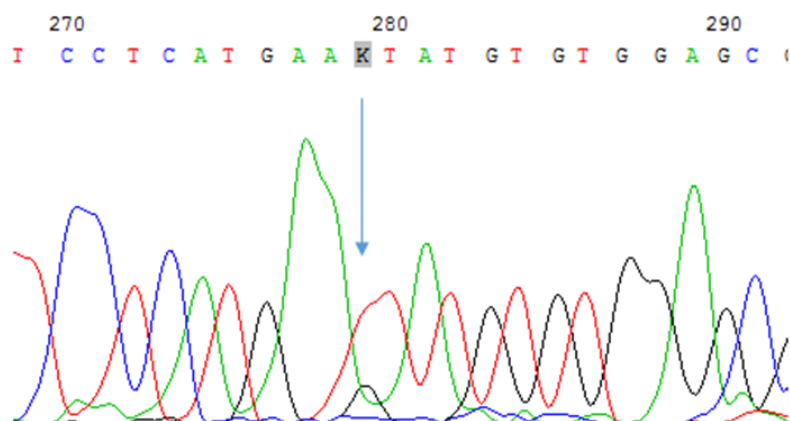


Рисунок 7 – Секвенирование 2-го экзона гена *ABCD1* у пациента с НСП: нуклеотидная замена с.1008G>Т в гетерозиготном состоянии.

Ген *ABCD1* (ATP-BINDING CASSETTE, SUBFAMILY D, MEMBER 1) локализован в хромосомной области Xq28, имеет длину 19,9 кб и содержит 10 экзонов; кодирует АТФ-связывающую кассету (ABC) подсемейства D члена 1 (*ABCD1*). Это 745-аминокислотный пероксисомальный трансмембранный белок, имеющий решающее значение для транспортировки очень длинноцепочечных жирных кислот (VLCFA) в пероксисомы, где они подвергаются β -окислению [69]. Мутации в белке *ABCD1* нарушают этот процесс, что приводит к накоплению VLCFA в крови и тканях надпочечников, яичек и нервной системы, в результате, обуславливая развитие наследственного заболевания - X-ALD или AMN.

X-сцепленная аденолейкодистрофия (X-ALD) — наследственное заболевание, приводящее к прогрессирующему ухудшению центральной и периферической нервной системы и коры надпочечников. Оно преимущественно поражает пациентов мужского пола и, по оценкам, присутствует примерно у 1 из 17 000 новорожденных [70]. X-ALD проявляется в трех фенотипах, которые различаются в зависимости от возраста начала и тяжести симптомов: церебральная ALD (CALD), которая проявляется как детская церебральная (CCALD) у лиц в возрасте 4–10 лет, подростковая церебральная (подростковая CALD) – у лиц в возрасте 10–20 лет, и взрослая церебральная (взрослая CALD) – у лиц старше 20 лет; аденомиелоневропатия (AMN), которая характеризуется демиелинизацией спинного мозга и аксональной дегенерацией; и Аддисон-подобная X-ALD, которая проявляется как недостаточность коры надпочечников [71]. CCALD и AMN являются наиболее распространенными формами X-ALD. CCALD обычно проявляется у мальчиков в возрасте 2,5–10 лет и характеризуется воспалительными процессами в белом веществе головного мозга, что приводит к демиелинизации. Это прогрессирование приводит к спастическому квадрипарезу, нарушению зрения, дисфагии и в конечном итоге к вегетативному состоянию [72]. CCALD является наиболее тяжелой формой церебральной

ALD, так как без вмешательства она приводит к прогрессирующим поражениям в белом веществе, что приводит к значительной инвалидности и затем смерти, в то время как AMN включает хроническое прогрессирование аксонопатии и в первую очередь проявляется дисфункцией спинного мозга и периферической невропатией. Симптомы AMN обычно начинают появляться у мужчин в возрасте 30–40 лет, тогда как клинические признаки AMN могут появляться у женщин после 60 лет [73]. AMN подразделяется на типы «чистый AMN» и «церебральный AMN» [74]. При чистом AMN патология ограничивается спинным мозгом, проявляясь в виде нарушений походки и дисфункции мочеиспускания. При церебральном AMN наблюдаются поражения спинного мозга, наблюдаемые при чистом AMN, и дополнительные церебральные воспалительные симптомы. Механизмы, лежащие в основе перехода от чистого AMN к церебральному AMN, четко не определены [75].

Информация о мутациях в гене *ABCD1* доступна в специализированной базе данных X-ALD <https://adrenoleukodystrophy.info/>), согласно которой на сегодняшний день зарегистрировано более 950 мутаций, вызывающих заболевание, в том числе миссенс-мутации (41,1%), мутации сдвига рамки считывания (30,6%), синонимичные мутации (13,7%), вставки или делеции аминокислот (5,8%), мутации сайта сплайсинга (5,0%), делеции одного или нескольких экзонов (2,6%) и более 120 вариантов неопределенной значимости (VUS). Как белок ABC, *ABCD1* содержит четыре функциональных домена: домен связывания пероксисомального фактора биогенеза 19 (PEX19), который участвует во взаимодействиях белок-белок; TMD с шестью трансмембранными спиралями; NBD с мотивами Walker A и B и сигнатурной последовательностью ABC; и домен димеризации. PEX19, шаперонный белок, взаимодействует с широким спектром пероксисомальных мембранных белков и играет решающую роль в пероксисомальном нацеливании *ABCD1*, взаимодействуя с его доменом связывания PEX19 [76]. Большинство миссенс-мутаций влияют на стабильность *ABCD1* и приводят к его деградации [77]. Более того, в то время как большинство пациентов с X-ALD наследуют дефектный аллель *ABCD1* от родителя, до 19% случаев X-ALD можно отнести к мутациям *de novo* [78].

Zuo and Chen *Lipids* (2024) [75] на основе анализа данных из базы *ABCD1* (<https://adrenoleukodystrophy.info/>) установили, что миссенс-мутации распределены в гене *ABCD1* неравномерно. Пиковые плотности миссенс-мутаций были обнаружены в TMD в экзонах 1 и 2, которые кодируют шесть трансмембранных спиралей, и в экзонах 6–9, которые кодируют домен связывания АТФ. Пиковая плотность патогенных мутаций была обнаружена в NBD в экзоне 6 (в домене Walker A), при этом высокие плотности также обнаружены в экзоне 8 (в последовательности сигнатуры ABC) и в экзоне 9 (в домене Walker B). NBD кодирует структуры, ответственные за связывание и гидролиз АТФ, и эти

процессы обеспечивают энергию для транспорта субстрата, что является основной функцией ABCD1. Кроме того, высокая плотность мутаций была обнаружена в области, кодирующей линкер между четвертой и пятой трансмембранными спиралями в пределах TMD. Этот линкер расположен на цитоплазматической стороне ABCD1 и в непосредственной близости от NBD и, таким образом, предположительно, имеет решающее значение для стабильности и функционирования ABCD1. Более того, пиковая плотность патогенных мутаций была обнаружена в области, кодирующей аминокислоты (aas) 656–668 N-концевой области домена димеризации. Эта область находится непосредственно ниже области, кодирующей NBD. Напротив, плотность мутаций в областях, кодирующих другие части домена, оказалась значительно ниже [75]. Выявленная нами новая нуклеотидная замена с.1008G>T (p.Lys336Asn) затрагивает высококонсервативную область второго экзона гена *ABCD1*, приводя к замене лизина на аспарагин в 336 положении аминокислотной последовательности трансмембранного домена белка. Учитывая, что лизин является положительно заряженной аминокислотой, а аспарагин – полярная незаряженная аминокислота, можно предположить негативное влияние такой замены на структуру и соответствующую функцию белка.

Известно, что X-ALD является клинически гетерогенным заболеванием, и даже одна и та же мутация в гене *ABCD1* может приводить к различным фенотипам, в том числе, среди больных родственников в одной семье. Прямой корреляции между конкретными мутациями и тяжестью X-ALD не выявляется [79 80].

У обследованной нами пациентки, 1953г.р., направительный диагноз был – наследственная спастическая параплегия. Пациентка жаловалась на нарушение походки, усиливающееся к вечеру, частые падения, слабость в мышцах ног, боли в голених, дрожание конечностей, усиливающееся при волнении, периодическое недержание мочи. Слабость в мышцах и нарушение походки началось после 45 лет, постепенно нарушение походки усиливается. Тремор рук беспокоит в течении 25 лет. Принимает ежедневно Баклосан по 10 мг. В неврологическом статусе: походка парапаретическая, неустойчивая. ЧМН: глазные щели D=S, движения глазных яблок в полном объеме, нистагма нет, сила мимических мышц 5б, лицо симметричное, язык по центру, мягкое небо подвижно, речь и глотание не нарушены. Гипотрофий мышц не выявлено. В положении стоя резкое повышение тонуса мышц по спастическому типу, в положении лежа тонус мышц снижается. Сила мышц снижена в проксимальной группе мышц нижних конечностей до 3б. СХП рефлексы оживлены, D=S, вызываются с расширенной зоны. Клонус стоп. Патологические рефлексы с 2-х сторон (Бабинского, Жуковского, Бехтерева). В позе Ромберга неустойчива. При выполнении координаторных проб легкая дисметрия и интенция в конечностях.

Постурально-кинетический тремор рук (непостоянный). Чувствительность не изменена. МРТ головного мозга от 10.06.2020г: МР картина множественных супратенториальных очагов хронической ишемии. Косвенные МР признаки внутричерепной гипертензии. Липома межполушарной щели. Признаки гиперостоза лобных костей.

У сына пациентки, умершего в возрасте 25 лет, были похожие симптомы заболевания, в том числе, парапарез нижних конечностей, но проявлявшиеся в более тяжелой форме, чем у матери. Первые клинические признаки болезни появились у него в конце второй декады жизни, после чего быстро прогрессировали, вплоть до потери ходьбы (передвигался на коляске). Первоначально ему также был выставлен диагноз «спастическая параплегия», но несколько позже, на основании клинических данных, был переквалифицирован в «адреномиелоневропатию». ДНК–диагностика ему не проводилась. Сопоставление основных признаков клинической картины заболевания у его матери с таковой у больных с точно установленным диагнозом X-ALD, в сочетании с выявленным нами гетерозиготным вариантом с.1008G>T (p.Lys336Asn) в гене *ABCD1*, позволил сделать предварительное заключение, что данный миссенс-вариант может являться патогенной мутацией, обуславливающей развитие болезни. На основании результатов клинко-генетического анализа обследованной нами больной, а также сведений о диагнозе ее сына (адреномиелоневропатия), первоначально поставленный диагноз НСП был переквалифицирован. В настоящее время диагноз у пациентки формулируется как «X-сцепленная адренолейкодистрофия, с грубым нижним спастическим парапарезом, нарушением функции тазовых органов, снижением социально-бытовой и трудовой адаптации; прогрессирующее течение».

Таким образом, в результате полноэкзомного секвенирования и последующего секвенирования по Сэнгеру у пациентки с направительным диагнозом «наследственная спастическая параплегия» не было выявлено патогенных или вероятно патогенных вариантов в генах НСП, но был идентифицирован в гетерозиготном состоянии новый, ранее неописанный, миссенс – вариант с неустановленной патогенетической значимостью с.1008G>T (p.Lys336Asn) в гене *ABCD1*, ответственном за наследственную X-сцепленную адренолейкодистрофию – заболевание, в клинической картине которого в большинстве случаев присутствуют спастические парезы. По большинству предсказательных компьютерных программ данный нуклеотидный вариант классифицируется как вероятно патогенный. На основании углубленного анализа клинической картины пациентки установлено значительное сходство с таковой у пациентов с наследственной X-сцепленной адренолейкодистрофией; у умершего сына пробанда с подобными проявлениями болезни, но протекавшими в более тяжелой форме, на основании клинических данных (без ДНК-

диагностики), при жизни был выставлен диагноз «адреномиелоневропатия». Исходя из этих данных, мы предполагаем, что нуклеотидная замена с.1008G>Т в гене *ABCD1* является патогенным вариантом и причиной развития заболевания - X-сцепленной аденолейкодистрофии. Для окончательной классификации нуклеотидного варианта требуются его функциональные исследования.

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, рака шейки матки, рака предстательной железы, бронхиальной астмы. В результате этих исследований получены результаты, представленные ниже.

Ген *ERCC4/FANCDQ* является потенциальным геном-кандидатом наследственного рака молочной железы (РМЖ), являясь участником анемии Фанкони / BRCA пути, необходимого для репарации ДНК. Ген *ERCC4* кодирует эндонуклеазу XPF, которая функционирует в эксцизионной репарации нуклеотидов (NER). Гетерозиготные мутации в гене *ERCC4* были выявлены при разных онкологических заболеваниях. В результате NGS секвенирования у пациентки с наследственным РМЖ обнаружена мутация с.2395C>T (p.Arg799Trp) в гене *ERCC4* в гетерозиготном состоянии. Результаты нашего исследования свидетельствуют в пользу того, что мутация *ERCC4**p.Arg799Trp не связана с высоким

риском развития РМЖ, хотя необходимы дальнейшие исследования для оценки клинического значения данной мутации.

Рак шейки матки (РШМ) является тяжелым и генетически неоднородным многофакторным заболеванием. ВПЧ, являясь его основной этиологической причиной, тем не менее спонтанно элиминирует в течение 2 лет в 90 % случаев, и в еще меньшем проценте приводит к РШМ. Ввиду данных о влиянии герминальных замен на риск развития рака и прогрессирование опухоли, перспективным направлением остается исследование герминального ландшафта нуклеотидных вариантов с последующей индивидуализацией подхода к терапии. В результате нашего исследования было показано, что вариант с.470A>C (rs17879961) гена *CHEK2* не вносит вклад в предрасположенность к РШМ, с.927C>G (rs1060502712) гена *CHEK2* продемонстрировала тенденцию к ассоциации с заболеванием ($p=0,059$), но частота минорного аллеля в исследуемой общей выборке (492 человека) составила 0,002%. Аллель, выявленный в результате анализа, единственный в выборке женщин с РШМ, и ввиду крайне редкой частоты данного варианта трудно сделать выводы о его вкладе в патогенез РШМ. Нами была показана ассоциация аллеля Т с.2908С>Т (rs34589476) гена *MET* между группами сравнения ($p=0,001$, $\chi^2=10,7$), что позволяет сделать вывод о значимости данного варианта для развития РШМ. В результате репликативного исследования полиморфных вариантов, ассоциированных по данным GWAS с риском развития РШМ, для пациентов из РБ были подтверждены статистически значимые ассоциации с рисковым аллелем G полиморфного локуса rs27069 гена *CLTP1L* и с рисковым аллелем Т и генотипом ТТ локуса rs2268177 гена *CDC42*, однако не было выявлено ассоциации заболевания с полиморфным вариантом rs10175462 гена *PAX8*.

Одним из перспективных методов биоинформатического анализа, позволяющего оценивать риск онкологических заболеваний, является полигенная оценка риска (polygenic risk score (PGS)) – метод, который вычисляет индивидуальный коэффициент предрасположенности к определенному фенотипу на основе анализа большого количества полиморфных вариантов. PGS, дополненный ROC-анализом, обеспечивает наиболее полное доступное описание диагностической точности, поскольку он оценивает и представляет все комбинации чувствительности и специфичности, которые может обеспечить диагностический тест. В рамках изучения молекулярно-генетических основ рака предстательной железы (РПЖ) мы исследовали полигенные шкалы риска (PGS), основанные на анализе путей биогенеза микроРНК, в исследовании случай-контроль в Волго-Уральском регионе России. В двух группах, состоящих из 532 человек с РПЖ и 550 человек без данного заболевания исследованы 21 SNP. На основе анализа ассоциации мы определили индивидуальные генетические риски развития РПЖ с использованием

эффектов вариантов SNP. В результате исследования показано, что взвешенная модель PGS выявила в 1,65 раза более высокие шансы риска развития РПЖ по сравнению с контрольной группой со значением $p=2,7 \times 10^{-14}$. Невзвешенная модель PGS показала более низкое значение отношение шансов (OR=1,45) и менее значимое значение ($p=3,27 \times 10^{-9}$). Взвешенная модель PGS продемонстрировала способность различать развитие риска развития РПЖ с AUC 0,633, чувствительностью 0,44 и специфичностью 0,77. Таким образом, наши данные о дискриминационной способности полигенных моделей оценки риска рака простаты согласуются с результатами, полученными мировым научным сообществом. Однако необходимы дальнейшие исследования в этом направлении, поскольку модели PGS, основанные на различных комбинациях полиморфных вариантов, на сегодняшний день демонстрируют довольно скромную чувствительность и специфичность.

С целью изучения генетической предрасположенности к аллергическим заболеваниям в рамках данной работы проведено исследование генов (*AOC1*, *HRH2*, *HRH3*, *ALDH7A1*, *ADCYAP1*, *HNMT*, *PSAP* и *SCG3*), участвующих в метаболизме гистамина, у больных с различными эндотипами АЗ и индивидов контрольной группы из РБ. У русских обнаружена ассоциация генотипа rs1049793*CC и аллеля rs1049793*C гена *AOC1* с развитием АЗ дыхательных путей и БА с сопутствующим АР, а также выявлено значительное повышение уровня общего IgE у больных АЗ дыхательных путей, являющихся носителями генотипа rs1049793*CC. Установлена ассоциация аллеля rs17525472*C гена *SCG3* с развитием АР у русских. При анализе метилирования промоторных областей генов *AOC1* и *HRH2* обнаружена более высокая частота встречаемости полного метилирования исследуемой области гена *AOC1* у больных с тяжелым и среднетяжелым течением БА по сравнению с контрольной выборкой, уровень метилирования промоторного региона гена *HRH2* был низким и варьирующим в диапазоне от 0% до 5% в обеих группах больных БА и контроля, 10% уровень метилирования промоторного региона гена *HRH2* выявлен у 5 пациентов с тяжелым и среднетяжелым течением БА. Результаты исследования свидетельствуют о роли генов *AOC1* и *SCG3*, участвующих в метаболизме гистамина, в патогенезе АЗ дыхательных путей. Более глубокое понимание молекулярно-генетических особенностей патогенеза АЗ может способствовать их своевременной диагностике и повышению эффективности лечения.

Наследственные моногенные (олигогенные) заболевания, в частности, наследственные спастические параличи, 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.

В результате полноэкзомного секвенирования и с последующего секвенирования по Сэнгеру у пациентки с направительным диагнозом «наследственная спастическая параплегия» не было выявлено патогенных или вероятно патогенных вариантов в генах НСП, но был идентифицирован в гетерозиготном состоянии новый, ранее не описанный, миссенс – вариант с неустановленной патогенетической значимостью с.1008G>T (p.Lys336Asn) в гене *ABCD1*, ответственном за наследственную X-сцепленную аденолейкодистрофию – заболевание, в клинической картине которого в большинстве случаев присутствуют спастические парезы. По большинству предсказательных компьютерных программ данный нуклеотидный вариант классифицируется как вероятно патогенный. На основании углубленного анализа клинической картины пациентки установлено значительное сходство с таковой у пациентов с наследственной X-сцепленной аденолейкодистрофией; у умершего сына пробанда с подобными проявлениями болезни, но протекавшими в более тяжелой форме, на основании клинических данных (без ДНК-диагностики), при жизни был выставлен диагноз «аденомиелоневропатия». Исходя из этих данных, сделано предварительное заключение, что нуклеотидная замена с.1008G>T в гене *ABCD1* является патогенным вариантом и причиной развития заболевания - X-сцепленной аденолейкодистрофии. Для окончательной классификации нуклеотидного варианта требуются его функциональные исследования.

СПИСОК НАУЧНЫХ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ И ПРИНЯТЫХ К ПЕЧАТИ

1. Мамадалиева Л.И., Иванова Е.А., Нургалиева А.Х., Хуснутдинова Э.К., Бермишева М.А. Мутация сайта сплайсинга с.290+1G>A в гене STK11 в семье с синдромом Пейтца-Егерса //Вопросы онкологии. - 2024. - Том 70, № 1. - С.127-131.
2. Savelieva O. N., Karunas A.S., Biktasheva A.R., Vlasova A.O., Khidiyatova I. M., Etkina E. I., and Khusnutdinova E.K. Study of the Role of Genes Involved in the Metabolism of Histamine in the Development of Allergic Respiratory Diseases// Russian Journal of Genetics. -2024. - V.60, N3. - P.352-359.
3. Первушина Е.В., Кутлубаев М.А., Сайфуллина Е.В., Гайсина Е.В., Смакова Л.А., Хидиятова И.М. Клинический случай бокового амиотрофического склероза с новой мутацией в гене ERBB4 // Ж. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2024. - Т.124, №7. - С.165-168.
4. Davidson AL, Michailidou K, Parsons MT, ... **Bermisheva MA**, ... **Khusnutdinova EK**, et al. Co-observation of germline pathogenic variants in breast cancer predisposition genes: Results from analysis of the BRIDGES sequencing dataset. //Am J Hum Genet. - 2024 Jul 30:S0002-9297(24)00246-5.
5. Lenkova, K.; Khusainova, R.; Minyazeva, R.; Zaripova, A.; Gilyazova, I.; Mokrysheva, N.; Minniakhmetov, I. Germline Variants in Proto-Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Women with Cervical Cancer //Biomedicines. -2024. - V12, N11. - P. 2454.
6. Yiangou K., Mavaddat N., Dennis J, ... M. **Bermisheva et al.** Differences in polygenic score distributions in European ancestry populations: implications for breast cancer risk prediction // Breast Cancer Research. - 2024 Feb 13:2024.02.12.24302043 DOI:10.1101/2024.02.12.24302043 (принята в печать).
7. Хидиятова И.М., Сайфуллина Е.В., Гайсина Е.В.5, Кутлубаева Р.Ф., Карунас А.С., Смакова Л.А., Поляков А.В., Щагина О.А., Кадникова В.А., Чаусова П.А, Магжанов Р.В., Хуснутдинова Э.К. Сейпинопатии: клинические варианты наследственной моторно-сенсорной нейропатии и спастической параплегии, обусловленные мутациями в гене BSCL2, у пациентов из Волго-Уральского региона// Научные результаты биомедицинских исследований (принята в печать).
8. Гарифуллина А.Г., Гилязова И.Р., Абдеева Г.Р., Кудлай Д.А., Низамова А.Р., Минязова А.А., Бакиров Б.А. Молекулярные аспекты патогенеза хронического лимфоцитарного лейкоза//Молекулярная медицина (принята в печать).

9. Savelieva O.N., Karunas A.S., Vlasova A.O., Ahmetshin A.A., Khidiyatova I.M., Khusnutdinova E.K. Epigenetic markers of asthma: a study of methylation patterns of genes involved in drug metabolism// *Opera Medica et Physiologica* (принята в печать).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Manandhar M., Boulware K., Wood R. et al. The ERCC1 and ERCC4 (XPF) genes and gene products // *Gene*. - 2015. - V. 569 (2). - P. 153-161.
2. Ferri, D. Orioli D., Botta E. et al. Heterogeneity and overlaps in nucleotide excision repair disorders // *Clinical Genetics*. - 2019. - V. 97 (1). - P. 12-24
3. Marín M., Ramírez M.J., Carmona M.A. et al. Functional Comparison of XPF Missense Mutations Associated to Multiple DNA Repair Disorders // *Genes*. - 2019. - V.10. - P. 60.
4. Kashiya K., Nakazawa Y., Pilz D.T. et al. Malfunction of nuclease ERCC1-XPF results in diverse clinical manifestations and causes Cockayne syndrome, xeroderma pigmentosum, and Fanconi anemia // *Am J Hum Genet*. - 2013. - V. 92. - P. 807-819.
5. Doi H., Koyano, Sh. Miyatake S. et al. Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with ERCC4 mutations // *Journal of Human Genetics*. - 2018. - 63. - P. 417-423.
6. Mori, T., Yousefzadeh, M. J., Faridounnia, M., et al. ERCC4 variants identified in a cohort of patients with segmental progeroid syndromes // *Hum. Mutat*. - 2018. - V.39. - P 255-265.
7. Sijbers A., van Voorst Vader P., Snoek J. et al. Homozygous R788W point mutation in the XPF gene of a patient with xeroderma pigmentosum and late-onset neurologic disease // *J Invest Dermatol*. - 1998. - V. 110. - P. 832-6.
8. Wang Y., Yu M., Yang J.X. et al. Genomic Comparison of Endometrioid Endometrial Carcinoma and Its Precancerous Lesions in Chinese Patients by High-Depth Next Generation Sequencing // *Front Oncol*. - 2019. - V. 9. - P. 123.
9. Donner I., Katainen R., Sipilä L. et al. Germline mutations in young non-smoking women with lung adenocarcinoma // *Lung Cancer*. - 2018. - V. 122. - P. 76-82.4
10. Chan S., Lim W., Ishak N. et al. Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes are Frequent in Sporadic Sarcomas // *Sci Reports*. - 2017. - V. 7: 10660.
11. Revathidevi, S. et al. APOBEC: A molecular driver in cervical cancer pathogenesis/ S. Revathidevi, A.K. Murugan, H. Nakaoka, et al. // *Cancer Lett*. - 2021. - V. 496. - P. 104–116.
12. Zhang L., Jiang Y., Lu X., et al. Genomic characterization of cervical cancer based on human papillomavirus status/. // *Gynecol. Oncol*. - 2019. - V. 152. - № 3. - P. 629–637.
13. Yuan Y., Cai X., Shen F., et al. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer // *Cancer Lett*. - 2021. - V. 497. - P. 243–254.
14. Чуруксаева О.Н. и др. Особенности папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска у больных местно-распространенным раком шейки матки/

Чуруксаева О.Н., Коломиец Л.А., Ибрагимова М.К., и др. // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2019. - V. 18. - № 3. - P. 21–28.

15. Нестеров А.С., Савчков Г.В. Видовой спектр возбудителей ИППП у женщин с папилломавирусной инфекцией гениталий / под ред. проф. Л.А.Б. отв. ред. д.м.н., доц. Т.А.И. сост. к.б.н. г. Ульяновск: NEXUS MEDICUS: Актуальные проблемы современной медицины. материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Ульяновский государственный университет, 2021. С. 314–316.

16. Донников А.Е., Маркелов М.И., Пестрикова Т.Ю., и др. Анализ распространенности и вирусной нагрузки различных типов вируса папилломы человека в регионах Российской Федерации // Акушерство и гинекология. - 2019. - V. 4. - P. 39–47.

17. Chanock S.J. How the germline informs the somatic landscape // Nat. Genet. - 2021. - V. 53. - № 11. - P. 1523–1525.

18. Srinivasan, P. et al. The context-specific role of germline pathogenicity in tumorigenesis/ P. Srinivasan, C. Bandlamudi, P. Jonsson, et al. // Nat. Genet. - 2021. - V. 53. - № 11. - P. 1577–1585.

19. Wang Z., Li K., Ouyang L., et al. Effects of methylenetetrahydrofolate reductase single-nucleotide polymorphisms on breast, cervical, ovarian, and endometrial cancer susceptibilities // Chronic Dis. Transl. Med. - 2021. - V. 7. - № 3. - P. 169–181.

20. Tyner J.W., Fletcher L.B., Wang E.Q., et al. MET Receptor Sequence Variants R970C and T992I Lack Transforming Capacity// Cancer Res. - 2010. - V. 70. - № 15. - P. 6233–6237.

21. Bowden S.J., Bodinier B., Kalliala I. et al. Genetic variation in cervical preinvasive and invasive disease: a genome-wide association study // Lancet Oncol. - 2021. - V. 22. - № 4. - P. 548–557.

22. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. The International Journal of Cancer. [Электронный ресурс] – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.33588> (дата обращения 18.11.2024).

23. Коллектив Авторов. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Редакторы: Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022 – 252 с.

24. Króliczewski J., Sobolewska A., Lejnowski D., Collawn J.F., Bartoszewski R. MicroRNA single polynucleotide polymorphism influences on microRNA biogenesis and mRNA target specificity. // Gene. – 2018 – V. 640. – p. 66–72.

25. Liu J., Liu J., Wei M., He Y., Liao B., Liao G., et al. Genetic Variants in the MicroRNA Machinery Gene GEMIN4 Are Associated with Risk of Prostate Cancer: A Case-control Study of the Chinese Han Population. // *DNA Cell Biol.* – 2012. – V. 31, №7. – p. 1296.
26. Hashemi M., Moradi N., Ziaee S.A.M., Narouie B., Soltani M.H., Rezaei M., et al. Association between single nucleotide polymorphism in miR-499, miR-196a2, miR-146a and miR-149 and prostate cancer risk in a sample of Iranian population. // *Journal of Advanced Research.* – 2016. – V.7, № 3. – p. 491–499.
27. Howe K.L., Achuthan P., Allen J., Allen J., Alvarez-Jarreta J., Ridwan Amode M., et al. Ensembl 2021. // *Nucleic Acids Research.* – 2021. V. 49, D1. – 884–891.
28. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A.R., Bender D., et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. // *The American Journal of Human Genetics.* – 2007. V. 81, № 3. – p. 559–575.
29. R Core Team. <https://www.R-project.org>. 2022. R: A Language and Environment for Statistical Computing. [Электронный ресурс] – URL: <https://www.r-project.org/> (дата обращения 19.11.2024).
30. Baker E., Schmidt K.M., Sims R., O'Donovan M.C., Williams J., Holmans P., et al. POLARIS: Polygenic LD-adjusted risk score approach for set-based analysis of GWAS data. // *Genetic Epidemiology.* – 2018. – V. 42, № 4. – p. 366–377.
31. De La Calle C.M., Bhanji Y., Pavlovich C.P., Isaacs W.B. The role of genetic testing in prostate cancer screening, diagnosis, and treatment. // *Current Opinion in Oncology.* – 2022. – V. 34, № 3. – p. 212–220.
32. Klein R.J., Vertosick E., Sjoberg D., Ulmert D., Rönn A.C., Häggström C., et al. Prostate cancer polygenic risk score and prediction of lethal prostate cancer. *NPJ Precision Oncology.* – 2022. – V. 6, №1. – p.25.
33. Chen F., Madduri R.K., Rodriguez A.A., Darst B.F., Chou A., Sheng X., et al. Evidence of Novel Susceptibility Variants for Prostate Cancer and a Multiancestry Polygenic Risk Score Associated with Aggressive Disease in Men of African Ancestry. // *European Urology.* – 2023. V. 84, № 1. – p.13–21.
34. Castro E., Eeles R. The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. // *Asian Journal of Andrology.* – 2012. – V.14, № 3. – p.409.
35. Nyberg T., Frost D., Barrowdale D., Evans D.G., Bancroft E., Adlard J., et al. Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. // *European Urology.* – 2020. V. 77, №1. – p. 24.

36. Barnes D.R., Silvestri V., Leslie G., et al.: Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2. Breast and Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variant Carriers Using Polygenic Risk Scores// *J Natl Cancer Inst.* – 2022.- V.114, N1. – P.109-122. doi: 10.1093/jnci/djab147.
37. Schumacher F.R, Al Olama A.A., Berndt S.I. et al., Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci// *Nat Genet.* – 2018.- V.50, N7. – P. 928-936. doi: 10.1038/s41588-018-0142-8.
38. Рузикулов А. Клинико-аллергологические особенности и распространение аллергического ринита и бронхиальной астмы // *Евразийский журнал медицинских и естественных наук.* - 2022. - Том. 2. - N 11. - С. 87–96.
39. Gautam Y., Johansson E., Mersha T.B. Multi-Omics Profiling Approach to Asthma: An Evolving Paradigm // *J. Pers. Med.* - 2022. - Vol. 12(1). - P. 66.
40. Zhang Y., Huang Y., Chen W. et al. Identification of key genes in allergic rhinitis by bioinformatics analysis // *Journal of International Medical Research.* - 2021. - Vol. 49(7). – P. 1–14.
41. Аллергический ринит. Клинические рекомендации. - 2020. - С. 1-55.
42. Choi B.Y., Han M., Kwak J. W., Kim T.H. Genetics and Epigenetics in Allergic Rhinitis // *Genes.* - 2021. - Vol. 12.
43. Bousquet J., Anto J. M., Bachert C. et al. Allergic rhinitis // *Nature Reviews.* - 2020. - Vol. 6 (95). - P. 1–17.
44. Wasti B, Liu SK, Xiang XD. Role of Epigenetics in the Pathogenesis, Treatment, Prediction, and Cellular Transformation of Asthma. *Mediators Inflamm.* 2021 Sep 15;2021:9412929. doi: 10.1155/2021/9412929. PMID: 34566492; PMCID: PMC8457970.
45. Thangam E.B., Jemima E.A., Singh H. et al. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets // *Front. Immunol.* - 2018. - Vol. 9. - P. 1873.
46. Anvari S., Vyhldal C. A., Dai H. et al. Genetic variation along the histamine pathway in children with allergic versus nonallergic asthma // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* - 2015. - Vol. 53(6). - P. 802–9.
47. Meza-Velázquez R., López-Márquez F., Espinosa-Padilla S. et al. Association between two polymorphisms of histamine-metabolising enzymes and the severity of allergic rhinitis in a group of Mexican children // *Allergol. Immunopathol. (Madr.).* - 2016. - Vol. 44(5). - P. 433–438.
48. Кучер А.Н., Черевко Н.А. Гены гистаминового метаболического пути и многофакторные заболевания человека // *Генетика.* - 2018. - Т. 54. - № 1. - С. 15–32.

49. García-Martín E., García-Menaya J., Sánchez B. et al. Polymorphisms of histamine-metabolizing enzymes and clinical manifestations of asthma and allergic rhinitis // *Clin. Exp. Allergy*. - 2007. - Vol. 37(8). - P. 1175–82.
50. Refaat M.M., Abdel-Rehim A.S., Elmahdi A.R. et al. Diamine oxidase enzyme: a novel biomarker in respiratory allergy // *International Forum of Allergy & Rhinology*. - 2019. - Vol. 9 (12).
51. Mayo-Yáñez M., Díaz-Díaz A., Vázquez-Barro J.C. et al. Relationship between allergic rhinitis and diamine oxidase activity: A preliminary report // *Allergol. Select.* - 2021. - Vol.5. - P. 187–194.
52. Chiba, Y., Ueda, C., Kohno, N., et al., Attenuation of relaxing response induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in bronchial smooth muscle of experimental asthma, *Am. J. Physiol.: Lung Cell Mol. Physiol.*, 2020, vol. 319, no. 5, pp. L786—L793.
53. Mihalj H., Butković J., Tokić S. et al. Expression of Oxidative Stress and Inflammation-Related Genes in Nasal Mucosa and Nasal Polyps from Patients with Chronic Rhinosinusitis // *Int. J. Mol. Sci.* - 2022. - Vol. 23(10). - P. 5521.
54. Fernández-Novoa L., Corzo L., Seoane S. & Cacabelos R.A. Genomic Approach to Histamine Function // *J. Genomic Med. Pharmacogenomics*. - 2017. - Vol. 1(2). - P. 233–241.
55. Szczepankiewicz A., Breborowicz A., Sobkowiak P., Popiel A. Polymorphisms of two histamine-metabolizing enzymes genes and childhood allergic asthma: a case control study // *Clin. Mol. Allergy*. - 2010. - Vol. 8. - P. 14.
56. Li X., Howard T.D., Zheng S.L. et al. Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2010. - Vol. 125(2). - P. 328–335.e11.
57. Li Y., Zhu J., Tian G. et al. The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells // *PLoS Biol.* – 2010. – V. 8(11). – P. e1000533.
58. Song Q, Decato B, Hong EE et al. A reference methylome database and analysis pipeline to facilitate integrative and comparative epigenomics // *PLoS One*. – 2013. – V. 8(12). – P. e81148.
59. Nicodemus-Johnson J., Myers R.A., Sakabe N.J. et al. DNA methylation in lung cells is associated with asthma endotypes and genetic risk // *JCI Insight*. – 2016. – V. 1(20). – P. e90151.
60. Cardenas A., Sordillo J.E., Rifas-Shiman S.L. et al. The nasal methylome as a biomarker of asthma and airway inflammation in children // *Nat Commun*. – 2019. – V. 10(1). – P. 3095.
61. Forno E., Wang T., Qi C. et al. DNA methylation in nasal epithelium, atopy, and atopic asthma in children: a genome-wide study // *Lancet Respir Med*. – 2019. – V. 7(4). – P. 336-346.

62. Fink, J.K. Advances in hereditary spastic paraplegia // *Curr Opin Neurol.* – 1997. – T. 10. - №4. – C. 313-318.
63. Harding, A. E. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias // *The Lancet.* – 1983. – V. 321. – №. 8334. – P. 1151-1155.
64. 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.
65. 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.
66. Züchner 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.
67. 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.
68. Richards S., Aziz N., Bale S., et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology// *Genetics in medicine.* – 2015. – V.17, N5. – P.405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
69. Cappa M., Todisco T., Bizzarri C. X-linked adrenoleukodystrophy and primary adrenal insufficiency// *Front Endocrinol (Lausanne).* -2023. - 14:1309053. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1309053>. 6
70. Videbaek C., Melgaard L., Lund A.M., Gronborg S.W. Newborn screening for adrenoleukodystrophy: International experiences and challenges// *Mol Genet Metab.*- 2023-140:107734. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107734>.
71. Palakuzhiyil S.V., Christopher R., Chandra S.R. Deciphering the modifiers for phenotypic variability of X-linked adrenoleukodystrophy. *World J Biol Chem.* – 2020. -11:99–111. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v11.i3.99>.
72. Engelen M., et al. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management// *Orphanet J Rare Dis.* – 2012.-7. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-51>

73. Engelen M., et al. X-linked adrenoleukodystrophy in women: a cross-sectional cohort study// *Brain*. – 2014. – N.137. - P693–706. <https://doi.org/10.1093/brain/awt361>.
74. Powers J.M., DeCiero D.P., Ito M., Moser A.B., Moser H.W. Adrenomyeloneuropathy: a neuropathologic review featuring its noninflammatory myelopathy// *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000.- N.59. – P.89–102. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.2.89>
75. Zuo X., Chen Z. From gene to therapy: a review of deciphering the role of ABCD1 in combating X-Linked adrenoleukodystrophy//*Lipids Health Dis*. – 2024. - V.23, N1. – P.369. doi: 10.1186/s12944-024-02361-0.
76. Pinto M.P., Grou C.P., Alencastre I.S., et al. The import competence of a peroxisomal membrane protein is determined by Pex19p before the docking step // *J Biol Chem*. – 2006. – N. 281. – P.34492–502. doi: 10.1074/jbc.M607183200.
77. Kemp S., Pujol A., Waterham H.R. et al. ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. *Hum Mutat*. 2001. – N.18. – P.499–515. <https://doi.org/10.1002/humu.1227>.
78. Wiesinger C., Eichler F.S., Berger J. The genetic landscape of X-linked adrenoleukodystrophy: inheritance, mutations, modifier genes, and diagnosis // *Appl Clin Genet*. – 2015. – N.8. – P.109–21. <https://doi.org/10.2147/TACG.S49590>.
79. Korenke G.C., Fuchs S., Krasemann E. et al. Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype // *Ann Neurol*.- 1996. –N.40. – P.254–7. <https://doi.org/10.1002/ana.410400221>.
80. Shibata Y., Matsushima M., Matsukawa T., et al. Adrenoleukodystrophy siblings with a novel ABCD1 missense variant presenting with phenotypic differences: a case report and literature review // *J. Hum Genet*. – 2021. – N. 66. – P.535–7. <https://doi.org/10.1038/s10038-020-00866-x>.